

EXPRESSION KLASSISCHER CADHERINE
UND δ -PROTOCOLADHERINE
IN DER SICH ENTWICKELNDEN RETINA DES FRETTCHENS

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Johannes Etzrodt
geboren am 14. 10. 1985 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. C. Redies, Jena

2. Prof. Dr. C. Redecker, Jena

3. Prof. Dr. S. Kröger, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.06.2010

Abkürzungsverzeichnis

bHLH	basic helix-loop-helix
CDH	Cadherin
CELSR	cadherin, EGF (endothelial growth factor), LAG (laminin A G-type) seven-pass receptor
CM	(intrazelluläres) konserviertes Motiv
EC	extrazelluläre Cadherin-Domäne
EEM	Ektodermale Dysplasie, Ektrodaktylie & Makuladystrophie
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GTPase	Guanosintriphosphatase
HAV	Histidin-Alanin-Valin
HJMD	Hypotrichose mit juveniler Makuladystrophie
MASH 1	mammalian achaete-scute homologue 1
NeuroD 1	neurogenic differentiation 1 / $\beta 1$
Ng-CAM	neuron-glia cell adhesion molecule
NGF	nerve growth factor
PCDH	Protocadherin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP1 α	Proteinphosphatase 1 α
RA	retinoic acid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
SHh	Sonic hedgehog homolog
TAF1/Set	TBP- (TATA-bindendes Protein-) assoziierter Faktor 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Die Cadherin-Superfamilie	8
1.1.1	Überblick	8
1.1.2	Klassische Cadherine.....	10
1.1.3	Protocadherine	12
1.1.4	Allgemeine Funktionen der Cadherine	14
1.1.5	Cadherin-Dysfunktion und Krankheiten des Menschen.....	17
1.1.6	Rolle der Cadherine im ZNS	19
1.2	Die Retina.....	21
1.2.1	Entwicklung und Aufbau der Retina.....	22
1.2.2	Bisherige Studien	24
1.3	Das Modelltier Frettchen	26
2	Ziele Der Arbeit	27
3	Publizierte Originalarbeit	29
3.1	Expression of Classic Cadherins and δ -Protocadherins in the Developing Ferret Retina. Etzrodt J, Krishna-K K, Redies C. BMC Neuroscience, 10:153. 2009.....	29
4	Diskussion	42
4.1	Kritische Betrachtung der Methodik	42

4.2	Retinale Expressionsmuster der Cadherine.....	43
4.2.1	Ganglienzellen.....	45
4.2.2	Amakrine Zellen	46
4.2.3	Bipolarzellen und Müller-Zellen	46
4.2.4	Horizontalzellen.....	47
4.2.5	Photorezeptorzellen.....	47
4.3	Interspeziesvergleich Frettchen – Maus – Huhn.....	48
4.4	Mögliche Funktionen der Cadherine in der Retinogenese.....	49
4.4.1	Zelldifferenzierung, Zellmigration und Schichtbildung.....	49
4.4.2	Aussprossung, Wegfindung und Zielerkennung von Axonen.....	49
4.4.3	Synaptische Plastizität.....	50
4.4.4	Neuron-Glia Interaktion	51
4.4.5	Transportprozesse.....	51
4.4.6	Pathogenese in der Retina	51
5	Schlussfolgerungen	52
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	53
7	Anhang	64
7.1	Lebenslauf.....	64
7.2	Danksagung.....	65
7.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	66

Zusammenfassung

Hintergrund: In diversen Prozessen der Morphogenese der Tiere spielen Cadherine eine wichtige Rolle. Diese Superfamilie von calciumabhängigen Adhäsionsmolekülen nimmt entscheidende Funktionen während der Proliferation, Migration und Differenzierung etlicher Zelltypen wahr. Darüber hinaus sind insbesondere die Familie der klassischen Cadherine und die δ -Protocadherine in essentielle Mechanismen der Neurogenese involviert. Die transmembranären Glykoproteine tragen durch ihre vorwiegend homophile Zell-Zell-Bindung über diverse Signalkaskaden zum Aussprossen von Neuriten, zu axonaler Wegfindung und Zielerkennung, zur Synaptogenese sowie zur synaptischen Plastizität bei.

Zu den am besten erforschten Teilen des zentralen Nervensystems der Säugetiere gehört die Retina. Die in klaren Schichten mit unterschiedlichen Zelltypen organisierte Neuroretina bietet als embryonale Ausstülpung des Prosencephalons eine hervorragende Möglichkeit, die Neurogenese zu studieren. Obwohl die Histologie der Neuroretina bis dato fast vollständig bekannt ist, liegen ihre molekularen Entstehungsmechanismen noch weitgehend im Dunkeln. Frühere Expressionsanalysen und Funktionsverluststudien belegen, dass Cadherine eine entscheidende Rolle bei der Retinogenese spielen. Insbesondere die Funktionen einiger klassischer Cadherine und δ -Protocadherine wurden während der Retinogenese in Zebrafisch, Krallenfrosch, Huhn und Maus untersucht. Doch bis heute gibt es keine detaillierte Expressionsstudie von mehr als einer Handvoll Cadherine in der Retina und nur wenige Cadherine wurden über die gesamte Retinogenese einer Säugetierspezies betrachtet. Anhand des Modelltieres Frettchen zeigt die vorliegende Arbeit erstmals die Expression von 15, zum großen Teil bisher unbeschriebenen Cadherinen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Säugetierretina.

Methodik: Die Expression von 7 klassischen Cadherinen und 8 δ -Protocadherinen wird mittels In-situ-Hybridisierung in der sich entwickelnden Retina verschiedener Frettchen untersucht. Dazu werden 7 charakteristische Entwicklungsstadien von der frühen embryonalen bis hin zur adulten Neuroretina ausgewählt. Mittels PCR mit spezifischen und degenerierten Primern

können Digoxigenin-markierte mRNA-Sonden gegen CDH4, CDH6, CDH7, CDH8, CDH11, CDH14, CDH20, PCDH1, PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDH10, PCDH11, PCDH17 und PCDH18 des Frettchens gewonnen werden. Thionin- und Hoechst-Kernfärbungen werden ebenfalls durchgeführt.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Alle untersuchten Cadherine zeigen eine Expression in jeweils unterschiedlichen Zellpopulationen zu verschiedenen Entwicklungsperioden der Neuroretina von Embryonalstadien bis zum adulten Frettchen. Durch ihre differentielle Expression markieren die Cadherine retinale Schichten, Zellpopulationen und deren Subpopulationen, die jedoch mit der angewandten Methodik nicht vollständig identifiziert werden können. Die Expressionsmuster antizipieren histogenetische Veränderungen, welche später in Kernfärbungen und Nissl-Färbungen sichtbar werden. Die gefundenen Expressionsmuster ähneln den schon beschriebenen Mustern in anderen Spezies, was auf konservierte Funktionen der Cadherine hindeutet. Da die Expression auch nach dem Abschluss der Histogenese und nach dem Öffnen der Augen bis hin zum adulten Tier persistiert, ist davon auszugehen, dass sich die Funktionsbereiche der Cadherine in der Retina nicht auf Proliferation, Migration und Differenzierung beschränken. Vielmehr dürfen – gemäß den Vorkenntnissen über die Funktion einiger Cadherine – Beiträge zur neuronalen Netzbildung, synaptischen Plastizität und auch zu dauerhaften Stoffwechselprozessen diskutiert werden. Die räumlich und zeitlich streng regulierte Expression der untersuchten Cadherine weist auf einen kombinatorischen, Cadherin-basierten, adhäsiven Code hin, der die Morphogenese sowie eventuell auch spätere Funktionen der Neuroretina des Frettchens entscheidend steuert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten damit eine Grundlage für zukünftige Experimente, die Cadherin-assoziierte morphogenetische Ereignisse in der Retinogenese der Säugetiere untersuchen.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Cadherin-Superfamilie

1.1.1 Überblick

Cadherine sind calciumabhängige Adhäsionsmoleküle, transmembranäre Glykoproteine, die seit dem Erscheinen primitiver Tiere Zell-Zell-Kontakte herstellen (Hulpiau und van Roy 2009). Die Gruppe um Masatoshi Takeichi entdeckte schon 1981 die Adhäsion zwischen gleichartigen Zellen unter Anwesenheit von Calcium (Takeichi et al. 1981) und erbrachte bald darauf den ersten Nachweis der diese Adhäsion vermittelnden Proteine (Yoshida-Noro et al. 1984). In den fast 30 Jahren seit der Entdeckung der Cadherine hat sich herausgestellt, dass ihre Funktion weit über statische Zelladhäsion hinausgeht. Die ersten Experimente mit Cadherin-exprimierenden Zellkulturen zeigten bereits, dass Cadherine vorwiegend homotype Aggregationen von Zellen vermitteln (Nose et al. 1988). Heute gilt es als belegt, dass die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion vielfältige Prozesse während Entwicklung und Wachstum steuert: die Aggregation von gleichartigen Nachbarzellen und die Abgrenzung und Gruppierung von Zellverbänden, die gezielte Zellmigration und Zell- und Gewebeausrichtung, die Aussprossung, Navigierung und Synaptogenese von Neuriten bis hin zur Differenzierung von Zellen (Redies 2000, Hirano et al. 2003, Gumbiner 2005, Halbleib und Nelson 2006, Takeichi 2007). Obwohl die molekularen Mechanismen für diese morphogenetischen Fähigkeiten noch weitgehend unbekannt sind, spielen diverse intrazelluläre Signalwege sowie die zeitlich und räumlich auffallend spezifische Expression dieser überaus vielfältigen Molekülfamilie mit Sicherheit eine entscheidende Rolle (siehe unten).

Die über 100 Mitglieder der Cadherin-Superfamilie in Wirbeltieren lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Genetik in Subfamilien wie klassische Cadherine, Protocadherine, desmosomale Cadherine, Flamingo/CELSR und viele weitere Gruppen einteilen (Nollet et al. 2000, Hulpiau und van Roy 2009; siehe Tab. 1).

Zweig	Subfamilie	Symbol	Name(n)	Bemerkung
Cadherin-Hauptzweig (C)				
C-1	Klassische Cadherine Typ I	CDH1	Cadherin-1 (<i>E-Cadherin (epithelial)</i>)	
		CDH2	Cadherin-2 (<i>N-Cadherin (neuronal)</i>)	
		CDH3	Cadherin-3 (<i>P-Cadherin (placental)</i>)	
		CDH4	Cadherin-4 (<i>R-Cadherin (retinal)</i>)	
		CDH15	Cadherin-15 (<i>M-Cadherin (myotubule)</i>)	
	Klassische Cadherine Typ II	CDH5	Cadherin-5 (<i>VE-Cadherin (vascular epithelium)</i>)	
		CDH6	Cadherin-6 (<i>K-Cadherin (fetal kidney)</i>)	
		CDH7	Cadherin-7	
		CDH8	Cadherin-8	
		CDH9	Cadherin-9 (<i>T1-Cadherin</i>)	
		CDH10	Cadherin-10 (<i>T2-Cadherin</i>)	
		CDH11	Cadherin-11 (<i>OB-Cadherin (osteoblast)</i>)	
		CDH12	Cadherin-12 (<i>N-Cadherin 2</i>)	
		CDH18	Cadherin-18	
		CDH19	Cadherin-19	
		CDH20	Cadherin-20	
		CDH22	Cadherin-22	
CDH24	Cadherin-24			
	Desmocolline	<u>DSC1-3</u>	<i>desmosomale Cadherine</i>	
	Desmogleine	<u>DSG1-4</u>	<i>desmosomale Cadherine</i>	
	7D-Familie (einzeln)	<u>CDH16 (KSP-Cadherin), CDH 17 (LI-Cadherin (liver-intestine)), CDH13 (H-Cadherin (heart) or T-Cadherin (truncated)), CDH26</u>	<i>7 extrazelluläre Domänen</i>	
C-2	CELSR	<u>CELSR1-3 (cadherin, EGF L/AG seven-pass receptor 1-3)</u>		
Cadherin-Verwandte (Cv)				
Cv-1a	NC-Protocadherine (non-clustered)	PCDH1	Protocadherin-1	<i>β1-Protocadherin</i>
		PCDH7	Protocadherin-7	<i>β1-Protocadherin</i>
		PCDH8	Protocadherin-8	<i>β2b-Protocadherin</i>
		PCDH9	Protocadherin-9	<i>β1-Protocadherin</i>
		PCDH10	Protocadherin-10	<i>β2-Protocadherin</i>
		PCDH12	Protocadherin-12	
		PCDH17	Protocadherin-17	<i>β2-Protocadherin</i>
		PCDH18	Protocadherin-18	<i>β2-Protocadherin</i>
		PCDH19	Protocadherin-19	<i>β2-Protocadherin</i>
		PCDH20	Protocadherin-20	<i>β0-Protocadherin</i>
		PCDH11X	Protocadherin-11 x-linked	<i>β1-Protocadherin</i>
		PCDH11Y	Protocadherin-11 y-linked	<i>β1-Protocadherin</i>
		C-Protocadherine (clustered)	<u>PCDHA1-A13, PCDHAC1-C2</u>	
	<u>PCDHB1-B16</u>			<i>δ-Protocadherine</i>
<u>PCDHGA1-A12, PCDHGB1-B7, PCDHGC3-C5</u>			<i>γ-Protocadherine</i>	
Cv-1b	Ret	RET	RET (<i>rearranged during transfection</i>)	
	Dachsous	DCHS1	Dachsous1	
	Fat	<u>FAT1-4 (tumor suppressor homolog 1-4)</u>		
Cv-2		CDH23	Cadherin-23	
		PCDH21	Protocadherin-21	
		PCDH24	Protocadherin-24	
		Mu-PCDH	mucin-like protocadherin	
Cv-3	Calsyntenine	CLSTN1-3	Calsyntenin 1-3	
	Fat-like	FATL1-3	Fat-like Protocadherin 1-3	
	(einzeln)	PCDH15	Protocadherin-15	
		CDH28	Cadherin-28	
(einzeln)	Dachsous2	DCHS2	Dachsous2	

Tab. 1. Überblick über die Mitglieder der Cadherin-Superfamilie im Säugetier.
Modifiziert nach Hulpiau und van Roy (2009)

Allen Cadherinen ist gemeinsam, dass sie am N-terminalen Ende mehrere extrazelluläre Cadherin-Domänen (ECs) besitzen (siehe Abb. 1). Diese Motive von ca. 110 Aminosäuren sind durch alle Cadherine hindurch evolutionär hoch konserviert. Subfamilien unterscheiden sich anhand der Anordnung der verschiedenen ECs, zwischen den einzelnen Cadherinen einer Subfamilie sind bestimmte ECs nur gering variabel. Fast alle Cadherine vollführen nur einen Durchgang durch die Zellmembran. Eine Ausnahme bildet die Familie der Flamingo/CELSR-Cadherine mit 7 Transmembrandomänen. Die intrazelluläre Domäne am C-terminalen Ende der Cadherine ist relativ kurz. Sie ist ebenfalls für Subfamilien typisch aufgebaut und kontaktiert spezifische Interaktionspartner. Die Länge der Cadherine variiert zwischen weniger als 1000 Aminosäuren mit nur 2 EC-Domänen bei Calsyntenin und 4000 Aminosäuren mit 34 EC-Domänen bei FAT (Halbleib und Nelson 2006, siehe Abb. 1).

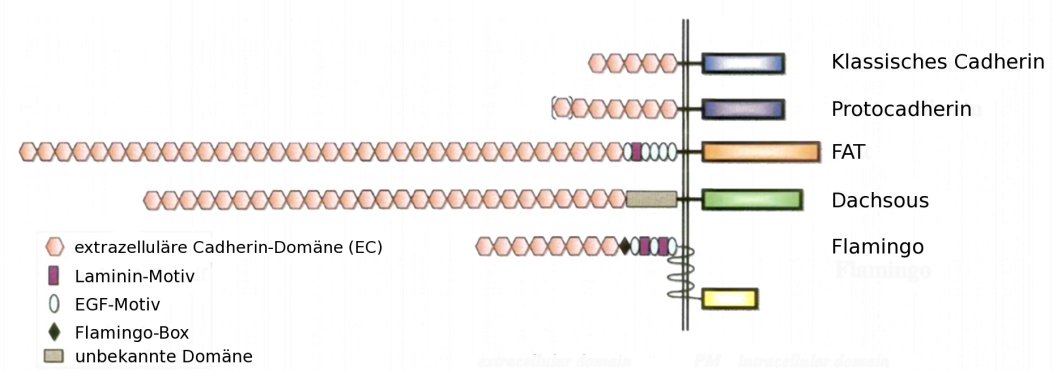


Abb. 1. Schematisierte Struktur der Cadherin-Subfamilien in Wirbeltieren. Modifiziert nach Halbleib und Nelson (2006).

Die zwei am längsten und besten bekannten sowie wohl auch größten Cadherin-Familien – die klassischen Cadherine und die Protocadherine – sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit und werden im Folgenden näher betrachtet.

1.1.2 Klassische Cadherine

Der Zusatz „klassisch“ rührt wohl von der langen und intensiven Erforschung dieser Subfamilie her. Ihren Namen erhielten diese zuerst entdeckten Cadherine anfangs gemäß dem Gewebe, in dem sie gefunden wurden (zum Beispiel *E-cadherin* im *Epithel*, siehe Tab. 1). Bis heute sind aber bis zu 20 verschiedene

Subtypen dieser Familie in einer einzigen Wirbeltierspezies gefunden worden – vorhanden in nahezu jedem Gewebe, so dass man diese Nomenklatur verlassen musste und auf eine Nummerierung übergang. Für Cadherin-8 (CDH8) und CDH11 gibt es zum Beispiel verschiedene Isoformen und Splice-Varianten (Hirano et al. 2003, Lin et al. 2008). Die ersten klassischen Cadherine vermitteln schon bei den frühen Chordatieren starke Zell-Zell-Interaktionen, können aber trotzdem vielmehr als „modern“ angesehen werden (Hulpiau und van Roy 2009).

Bei den Wirbeltieren zeichnen sie sich durch 5 extrazelluläre Cadherin-Motive aus, während die homologen Moleküle der Invertebraten mehr EC-Domänen besitzen. Für klassische Cadherine typische Sequenzen liegen in den Domänen EC3 und EC5. Seit Mitte der 1990er Jahre weisen Proteinstrukturanalysen auf die genauen Bindungsmechanismen der Cadherine hin (Hulpiau und van Roy 2009). EC1 ist wahrscheinlich für die Spezifität der Cadherin-Bindung verantwortlich. Für Bindungen zwischen klassischen Cadherinen vom Typ I sind jeweils in der äußersten Domäne ein Tryptophanrest und eine hydrophobe Tasche des Gegenmoleküls essentiell (siehe Abb. 2). Beim Typ II finden sich jeweils zwei Tryptophanreste und eine große hydrophobe Tasche, außerdem fehlt ein typisches HAV-Motiv. Trotz dieser Sequenz- und Strukturunterschiede zeigt der zweite Typ klassischer Cadherine aber kaum funktionale Unterschiede. Über die genaue Art der Cadherin-Cadherin-Bindung wird noch diskutiert. Unter anderem geht man von der Bildung zunächst gleichseitiger Cadherin-Paare (*cis*-Dimere) aus, die sich dann über die spezifischen Bindungsstellen an EC1 mit gegenüberliegenden Cadherinen verbinden (*trans*-Interaktion), wonach schließlich durch Bildung von Cadherin-Gruppen (*trans*-Oligomere) die Bindung verstärkt wird (Gumbiner 2005; siehe Abb. 2). Analysen der Bindungskinetik deuten einen mehrschrittigen Prozess an, der letztlich wohl alle extrazellulären Domänen einbezieht (Leckband 2008). An den Übergängen zwischen den EC-Domänen sind jeweils 3 Calcium-Ionen gebunden und bewirken eine zumindest für die Dimerisation notwendige Konformationsänderung (Cailliez und Lavery 2005). Gleichartige Bindungspartner werden bevorzugt, obwohl auch – schwächere – heterophile Bindungen zwischen verschiedenen Cadherinen beobachtet werden (Foty und Steinberg 2005, Prakasam et al. 2006). Die äußeren Domänen EC1 und EC2 vermitteln

ebenso Verbindungen zu anderen Molekülarten, wie zum Beispiel zu Integri-
nen oder zu dem FGF-Rezeptor (Halbleib und Nelson 2006).

Eine hoch konservierte zytoplasmatische Domäne der klassischen Cadherine bindet intrazellulär p120-Catenin und β -Catenin sowie indirekt über α -Catenin das Actin-Zytoskelett und α -Catenin-assoziierte Proteine wie Vinculin und Formin (Gumbiner 2005, Nelson 2008; siehe Abb. 2). Außerdem werden infolge der Cadherin-Adhäsion weitere Proteine wie die GTPasen der Rho-Familie und Signalwege wie Wnt oder Reelin aktiviert (Hirano et al. 2003). Damit wird maßgeblichen Einfluss auf die Morphogenese und die Motilität der Zellen genommen.

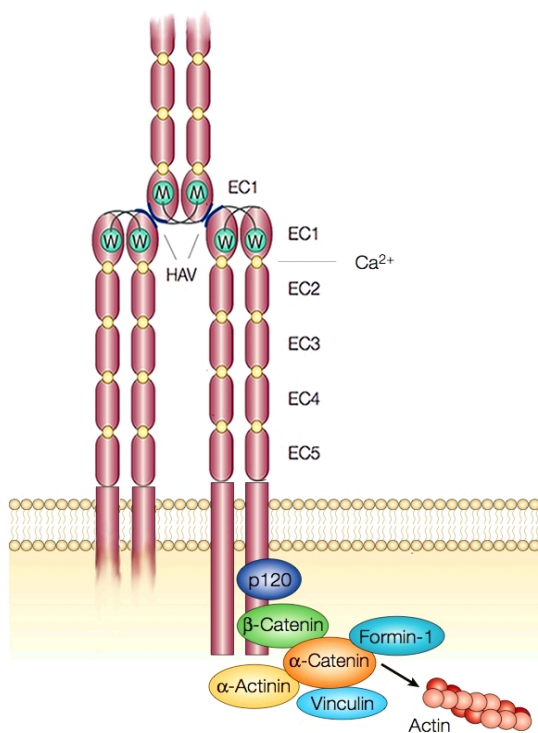


Abb. 2 Cadherin-Catenin-Komplex in hypothetischer *cis*- und *trans*-Bindung. Bindungsmodell des sog. Linearen Reißverschlusses. Tryptophan-Reste der EC1 (W) greifen in hydrophobe Taschen (Riehl et al.) des Partner-Cadherins, *trans*-Bindung durch andere Bindungsstellen um das HAV-Motiv (blau). Dargestellt sind diverse intrazelluläre Interaktionspartner. Modifiziert nach Gumbiner (2005)

1.1.3 Protocadherine

Protocadherine stellen die zahlenmäßig größte Subfamilie der Cadherine dar. Ihr Name wurde von Shintaro Suzuki und seinen Mitarbeitern eingeführt, als sie Transmembranproteine mit Cadherin-Motiven entdeckten, die sich deutlich von den klassischen Cadherinen unterschieden (Sano et al. 1993). Der Aufbau ihrer Gene erinnerte an alte Molekül-Superfamilien wie Immunoglobuline und T-Zell-Rezeptoren. Verwandte dieser „nicht-klassischen Cadherine“ wurden in einer Vielzahl von Spezies von Wirbeltieren wie auch Wirbellosen gefunden.

Dies führte zu der Annahme, eine Art Ursprung der Cadherine gefunden zu haben (griechisch proto- = erster). Heute gilt als sicher, dass Protocadherin-Vorläufer mit den Deuterostomia und Chordatieren, der Großteil der Protocadherine allerdings erst mit den Wirbeltieren erschienen, sie also auch eher als „modern“ bezeichnet werden müssten (Hulpiau und van Roy 2009).

Protocadherine besitzen sechs oder sieben ECs, ohne die klassischen Sequenzen von EC3 und EC5. Die äußerste Domäne EC1 zeigt eine ähnliche Topologie wie bei klassischen Cadherinen, besitzt jedoch völlig andere Bindungsstellen, die erst vor wenigen Jahren beschrieben wurden (Morishita und Yagi 2007, Hulpiau und van Roy 2009). Auch die zytoplasmatischen Domänen unterscheiden sich von der klassischen Form und weisen innerhalb der Subfamilie eine hohe Variabilität auf. Im Gegensatz zu klassischen Cadherinen werden die meisten, wenn nicht alle extrazellulären, die transmembranäre und ein Teil der intrazellulären Domänen der Protocadherine von nur einem Exon codiert (Redies et al. 2005). Ihre Bindungen zu anderen Cadherinen können ebenfalls homophiler Natur sein (Sano et al. 1993). Protocadherine vermitteln im Allgemeinen schwächere Zell-Zell-Kontakte als klassische Cadherine und haben andere intrazelluläre Aktionspartner, weshalb ihre Wirkungsweise zum großen Teil in der Signaltransduktion liegen könnte (Morishita und Yagi 2007). Obwohl eine große Anzahl verschiedener Protocadherine in vielen Körpergeweben vorhanden ist, bleibt ihre genaue Funktion noch unbekannt. In Säugetieren sind fast alle Protocadherine stark im Zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und scheinen eine entscheidende Rolle in dessen Entwicklung zu spielen (Frank und Kemler 2002, Hirano et al. 2003, Halbleib und Nelson 2006). Gemäß ihrer genomischen Struktur unterteilt man sie mittlerweile in die Untergruppen der gebündelten (engl. clustered) und die der nicht gebündelten (engl. non-clustered) Protocadherine (Redies et al. 2005; siehe Tab. 1).

Die nicht gebündelten δ -Protocadherine (Protocadherin-1 [PCDH1], PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDH10, PCDH11, PCDH17, PCDH18, und PCDH19) wurden erst kürzlich als eine separate Unterfamilie definiert (Wolverton und Lalande 2001, Vanhalst et al. 2005). Neben den klassischen Cadherinen sind sie ausschließlicher Gegenstand dieser Arbeit. Im Gegensatz zu den gebündelten α -, β - und γ -Protocadherinen stammen ihre Transkripte – gemäß ihrer Bezeichnung – von verschiedenen Gen-Loci. Sie lassen sich durch 2 intrazelluläre,

konservierte Motive (CM1 und CM2) von anderen Cadherinen abgrenzen. Die Untergruppe der δ 1-Protocadherine besitzt 7 EC-Domänen und enthält zusätzlich ein so genanntes CM3-Motiv, das den Signalpartner Proteinphosphatase 1 α (PP1 α) bindet. δ 2-Protocadherine, die nur 6 ECs besitzen und denen also das CM3-Motiv fehlt, müssen daher wohl nicht nur phylogenetisch sondern auch funktional unterschieden werden. Über Eigenheiten ihrer Funktion ist jedoch noch wenig bekannt.

δ -Protocadherine weisen diverse Splice-Varianten auf, die vorwiegend in ihren intrazellulären Domänen divergieren. Obwohl die intrazellulären Signalwege der δ -Protocadherine noch weitgehend ungeklärt sind, sprechen Interaktionspartner wie TAF1/Set, PP1 α und der Frizzled-7-Rezeptor für eine entscheidende Rolle insbesondere während der neuronalen Entwicklung (Redies et al. 2005). TAF1/Set ist ein Histon-bindendes Protein und moduliert durch PCDH7 während der neuronalen Differenzierung und Degeneration unter anderem die cyclinabhängige Kinase 5 (CDK5). δ 1-Protocadherine greifen über die PP1 α in den dendritischen Dornen der ZNS-Neurone in die synaptische Plastizität ein. PCDH8 bewirkt mit dem Frizzled-7-Rezeptor Zellseparierung in Krallenfrosch-Embryonen. Des Weiteren fand man auch für das δ 2-Protocadherin PCDH18 einen Einfluss auf den Reelin-Signalweg, der unter anderem für die korrekte Schichtung während der Hirnentwicklung verantwortlich ist.

1.1.4 Allgemeine Funktionen der Cadherine

Im Folgenden bezieht sich der Begriff Cadherine vorzugsweise auf die intensiv erforschten klassischen Cadherine und ferner auch auf Protocadherine. Wie oben bereits erwähnt, reicht die Bandbreite der Aufgaben der Cadherin-Superfamilie von der relativ simplen Zell-Zell-Adhäsion bis hin zu komplexen essentiellen Aufgaben während der Morphogenese (siehe Abb. 3).

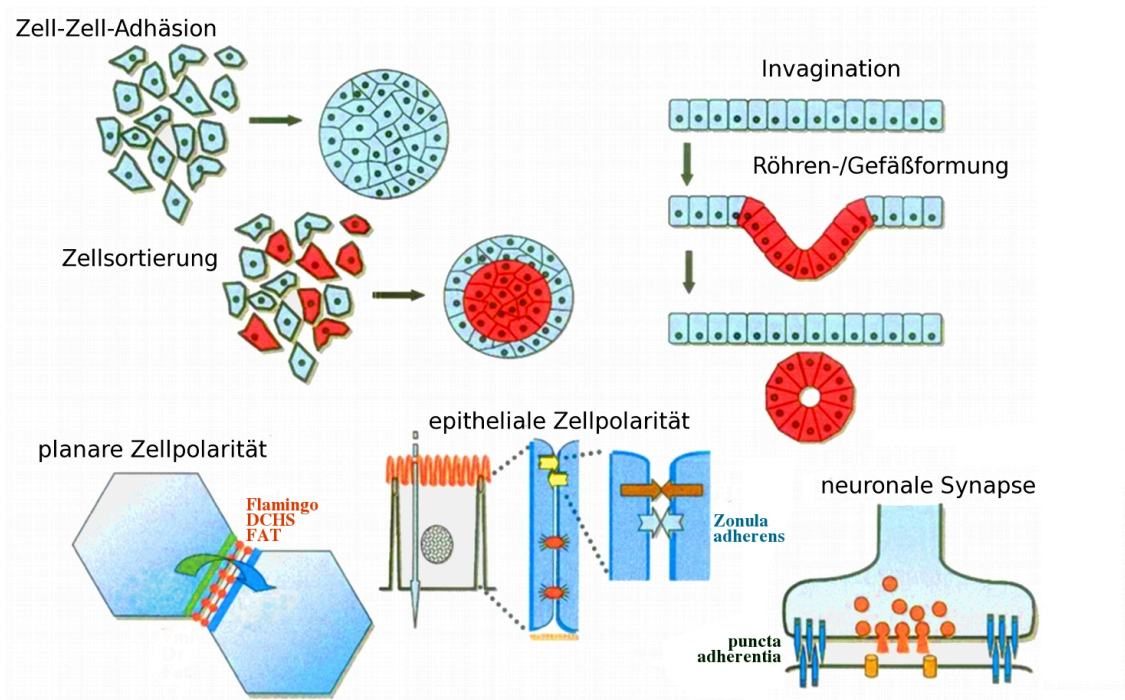


Abb. 3 Verschiedene allgemeine Funktionen der Cadherine. Modifiziert nach Halbleib und Nelson (2006)

Von den frühesten Embryonalstadien an vermitteln Cadherine den Zusammenschluss bestimmter Zellen und die Ausbildung von Gewebsgrenzen. Bis auf wenige Ausnahmen tendieren Zellen mit gleichartigen Cadherinen zur Adhäsion und trennen so verschiedene sich entwickelnde Zellpopulationen voneinander. Dieser homophile Bindungsmechanismus führt schließlich zur Ausbildung bestimmter Muster, Schichten und Grenzen von Zellverbänden im Organismus (Hirano et al. 2003, Redies et al. 2005). Nicht unerwähnt bleiben soll aber die Möglichkeit heterophiler Bindungen zwischen Cadherinen, Bindungen zu Mitgliedern anderer Molekülfamilien (siehe oben) und ein nur ansatzweise erleuchtetes Netzwerk von weiteren molekularen Interaktionen (Gumbiner 2005, Halbleib und Nelson 2006, Morishita und Yagi 2007).

Obwohl Cadherine vorwiegend in relativ statischen Zellkontakten wie den Zonulae adherentes und den Desmosomen gefunden werden, sind sie stark in der Regulation der Lokomotion involviert. Konformationsänderungen in den Geweben führen zu Zellrearrangements und zu weit reichender Zellmigration. Zum Beispiel wird die Wanderung der Neuralleistenzellen einerseits durch den Wechsel der Expression von CDH2 und CDH6 auf CDH7 eingeleitet und andererseits wieder gehemmt, wenn am Zielort der Migration andere Cadheri-

ne exprimiert werden (Nakagawa und Takeichi 1998). CDH2 ist, wie einige andere Cadherine auch, in der sich entwickelnden Blut-Hirn-Schranke zu finden (Gerhardt et al. 1999, Krishna und Redies 2009). Eine Hochregulation der CDH2-Expression ist auch für die arterielle Wundheilung notwendig (Jones et al. 2002). Doch ebenso kann CDH2, wie sein traditioneller Name *N-Cadherin* schon vermuten lässt, vor allem an sich entwickelnden Neuronen nachgewiesen werden (Letourneau et al. 1991, Redies et al. 1992). Dank vielfältiger Cadherine sprossen Neuriten gezielt aus, werden Axone über lange Strecken geführt und Synapsen zielgenau verbunden (siehe Kapitel 1.1.6).

Dynamische Zelladhäsionsvorgänge im erwachsenen Gewebe sind dagegen kaum erforscht, doch spielt zumindest CDH1 eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Umsatzes und der Veränderung sich schnell regenerierender Gewebe wie der Mukosa oder der Epidermis (Hermiston et al. 1996, Tinkle et al. 2004). Im adulten Organismus wirken Cadherine weiterhin in der Plastizität neuronaler Synapsen, in Transportvorgängen endothelialer und epithelialer Zellverbindungen und in der Integrität der Gewebe, um zum Beispiel Tumorstadium, -invasion und -metastasierung zu verhindern (Gumbiner 2005).

Zusätzlich zu den genannten adhäsiven Funktionen werden über diverse intrazelluläre Signalkaskaden (siehe Kapitel 1.1.2 und 1.1.3) grundlegende Zellfunktionen wie Proliferation und Differenzierung vermittelt (Hirano et al. 2003, Gumbiner 2005). Zum einen haben Cadherine dafür die Fähigkeit, über ihre Zell-Zell-Kontakte membrangebundene Rezeptoren und Liganden näher zu bringen und die Verteilung membranassoziierter Signalmoleküle zu beeinflussen. Zum anderen agieren Cadherine über vielfältige intrazelluläre Interaktionspartner auch selbst als Signalmolekül. Dabei wirken die verschiedenen Cadherin-Subtypen unterschiedlich, wie auch ihre intrazellulären Signalwege in verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Wirkungen führen können.

Im Einklang mit den genannten Besonderheiten konnte festgestellt werden, dass Cadherine von verschiedenen Zelltypen und Geweben zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung differentiell exprimiert werden (siehe auch Kapitel 1.1.6). Anzumerken ist, dass dabei oft gleiche Cadherine in verschiedenen Zellen eines Gewebes exprimiert werden, ebenso wie eine einzelne Zelle meist verschiedene Cadherine exprimiert. Obwohl bestimmte Cadherine das

Maximum ihrer Expression in der Entwicklung bestimmter Gewebe haben (zum Beispiel CDH4 [*R-Cadherin*] in der Retina), überlappen sich also die Expressionsmuster der Cadherine größtenteils. Unter Beachtung dieser Merkmale stellen die Cadherine eine Möglichkeit dar, die oben genannten Funktionen mit der Kombination ihrer adhäsiven Fähigkeiten zu steuern.

Die Regulation der Cadherine selbst wird zum einen über den Mechanismus der Phosphorylierung und Dephosphorylierung bewerkstelligt (Sallee et al. 2006), zum anderen greift die Proteolyse durch benachbarte Moleküle in die Cadherin-Aktivität ein. Zum Beispiel sind Mitglieder der ADAM-Familie in der Lage, verschiedene Cadherine an bestimmten Stellen zu schneiden und damit deren Funktion zu verändern (Toussey et al. 2006).

1.1.5 Cadherin-Dysfunktion und Krankheiten des Menschen

Aufgrund ihrer zentralen und vielfältigen Aufgaben (siehe oben) spielen Cadherine bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Die wohl größte Bedeutung haben sie momentan in der Onkologie. Da zum Beispiel CDH1 (*E-Cadherin*) hauptsächlich für die epitheliale Integrität verantwortlich ist, verwundert es nicht, dass man eine starke Verminderung seiner Expression während der malignen Transformation verschiedener epithelialer Tumorzellen beobachten kann. Die künstliche Überexpression von CDH1 versetzt maligne Tumorzellen sogar wieder in einen normalen epithelialen Phänotyp (Jeanes et al. 2008). Zusätzlich ist das Expressionsmuster maligner Zellen auch für andere klassische Cadherine verändert, was deutlich zu deren verringerten Adhäsion und der folglich erhöhten Invasivität beitragen dürfte (Wheelock et al. 2008). Bei der Metastasierung bestimmter Tumore findet sich dagegen wieder eine etwas höhere Expression von CDH1, was wohl die Ansiedlung der malignen Zellen in anderen Geweben begünstigt. Letztlich kann CDH1 somit als Tumorsuppressor angesehen werden. CDH2 hingegen gilt als Invasionsfaktor – die de-novo-Expression von CDH2 verstärkt die Motilität und damit die Invasivität der Zellen (Stemmler 2008). Ein vergleichbarer Wandel der Expression wurde bezüglich CDH11 im Prostatakarzinom beobachtet (Tomita et al. 2000). Die starke Expression von CDH1 in Ovarialkarzinomen stellt eine gewisse Ausnahme dar (Sundfeldt 2003). Sie belegt aber die Komplexität sowie das Potential zur weiteren Erforschung dieses Gebietes.

Zukünftig könnten Erkenntnisse bezüglich der Rolle der Cadherine in der Onkologie diagnostisch und therapeutisch vermehrt nutzbar gemacht werden. Neue Tumormarker für Histologie oder Serumnachweise, zielspezifische Medikamente oder gänzlich neue Therapieoptionen sind denkbar (siehe zum Beispiel De Wever et al. 2007, Mariotti et al. 2007). Ein besonders interessantes Feld dürfte die Beteiligung der Cadherine an der Tumorangiogenese sein (Cavallaro et al. 2006).

Ein weiteres Gebiet, auf dem Cadherine in eine Krankheit des Menschen involviert sind, sind die bullösen Dermatosen. Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus sind Autoimmundermatosen, bei der es aufgrund einer Zerstörung der Cadherine Desmoglein-1 beziehungsweise Desmoglein-3 in den Desmosomen der Epidermis zu teils lebensgefährlicher Blasenbildung kommt (Culton et al. 2008). Weitere Hautkrankheiten wie die autosomal-dominant vererbte Keratosis palmoplantaris striata sind ebenfalls mit Cadherin-Defekten assoziiert (McMillan und Shimizu 2001). Ein ähnlicher Mechanismus greift auch beim Schälblasensyndrom durch Staphylokokkus aureus, wobei ein so genanntes Exfoliativtoxin Desmoglein-1 angreift (Nishifuji et al. 2008).

Cadherine finden seit wenigen Jahren verstärkte Aufmerksamkeit in kardiovaskulären Erkrankungen wie der Kardiomyopathie (CDH2, DSC2), der Arteriosklerose (CDH13, CDH5) und der arteriellen Restenose (CDH2, CDH4) (siehe zum Beispiel Resink et al. 2009).

Die Rolle der Cadherine in Erkrankungen des ZNS beschränkt sich neben dem großen Feld der ZNS-Tumoren auf wenige Anhaltspunkte. α -Protocadherine gelten als mögliche Suszeptibilitätsfaktoren bei der Bipolaren Störung und den Schizophrenien (Pedrosa et al. 2008), PCDH19-Mutationen verursachen eine epileptische Enzephalopathie und mentale Retardierung (Depienne et al. 2009) und PCDH19 ist mit Morbus Alzheimer assoziiert (Carrasquillo et al. 2009), wie auch wahrscheinlich Desmocollin-1 (Ramos et al. 2006). Erst kürzlich fand man eine mögliche Assoziation des CDH7-Gens mit der Bipolaren Störung sowie mit dem zirkadianen Rhythmus, mit saisonalen Stimmungsschwankungen und mit weiteren visuell gesteuerten Merkmalen (Soronen et al. 2010).

Diverse Erkrankungen des Auges konnten Cadherin-Dysfunktionen zugeschrieben werden. Als häufigste Ursache für kombinierte erbliche Taubheit und Blindheit gilt das Usher-Syndrom, definiert durch frühzeitige Innenohrschwer-

hörigkeit und späterem Verlust des Gesichtsfeldes infolge von Retinitis pigmentosa. Beim Usher-Syndrom Typ 1D und 1F sind Mutationen in den Genen von PCDH15 und CDH23 ursächlich. Deren Genprodukte vermitteln Zellkontakte und Synapsen der Stereocilien der Haarzellen des Innenohres, der Außensegmente der Photorezeptoren sowie der Pigmentepithelzellen der Retina (Bork et al. 2001, Ahmed et al. 2003b). Eine Mutation von CDH3 verursacht die kongenitale Hypotrichose mit familiärer juveniler Makuladystrophie (HJMD-Syndrom) sowie das Syndrom der ektodermalen Dysplasie, Ektrodaktylie und Makuladystrophie (EEM-Syndrom) (Shimomura et al. 2008). CDH2 und CDH11 sind an der Entwicklung des Retinoblastoms beteiligt (Van Aken et al. 2002, Marchong et al. 2004).

1.1.6 Rolle der Cadherine im ZNS

Obwohl die Cadherine in fast jedem Gewebe anzutreffen sind und damit praktisch ubiquitär zu den oben beschriebenen Aufgaben beitragen, ist ihre Funktion im ZNS ein besonderer Schwerpunkt der aktuellen Forschung. Es ist ein zentrales Ziel der modernen Neurobiologie, die vielfältigen Vorgänge zu verstehen, die zur neuronalen Entwicklung, Reifung und Plastizität beitragen – und Cadherine scheinen dazu einen wichtigen Beitrag zu leisten. Insbesondere anhand der komplexen Netzwerke von Hirn und Rückenmark wird deutlich, wie wichtig die Fähigkeit zu flexiblen Zell-Zell-Kontakten für mehrzellige und hoch entwickelte Organismen ist. Adhäsive Oberflächenmoleküle sind in der dynamischen Konnektivität des ZNS unerlässlich. Dementsprechend verwundert es nicht, dass die meisten Mitglieder der Cadherin-Superfamilie im ZNS gefunden wurden, bezeichnender Weise vor allem an Wachstumskegeln und Synapsen der Neurone. Die Gruppe um Redies beschäftigt sich seit vielen Jahren intensiv mit der Rolle der Cadherine in der Neuroembryologie des Wirbeltieres. Die hohe Diversität der Cadherine und ihre spezifischen, homophilen Bindungen führten schließlich zu der Hypothese eines kombinatorischen, adhäsiven Codes, der vielen morphogenetischen Prozessen Rechnung trägt (Redies und Takeichi 1996, Redies 2000, Hirano et al. 2003).

Auffallend sind das zeitlich und räumlich streng begrenzte Vorkommen bestimmter Cadherin-Subtypen sowie die qualitativen wie quantitativen Unterschiede in deren Expression, was die Arbeitsgruppe um Redies für viele

Cadherine schon in diversen Hirnregionen zeigen konnte (siehe zum Beispiel Hertel et al. 2008, Lin et al. 2008, Neudert et al. 2008, Neudert und Redies 2008, Krishna et al. 2009). Diese Differenzen korrelieren eng mit neuronalen Mustern und der spezifischen neuronalen Konnektivität. Schon die Neurulation wird von einem Wechsel der Expression von CDH1 zu CDH2 (*N-Cadherin*) eingeleitet. Von der tangentialen Segmentierung des Neuralrohrs in verschiedene Neuomere über die Ausbildung longitudinaler Untereinheiten bis hin zur Formierung spezialisierter Kerngebiete, Schichten und Zellgruppen markieren verschiedene Cadherine embryonale und spätere funktionelle ZNS-Regionen der Wirbeltiere (Redies und Takeichi 1996). Mit fortschreitender Differenzierung des ZNS werden auch die Expressionsmuster der Cadherine immer vielschichtiger, bis schließlich spezielle Schaltkreise durch das spezifische Auftreten bestimmter Cadherine definierbar sind (siehe zum Beispiel Wöhrn et al. 1999). Bei einem Funktionsverlust der Cadherine kommt es zu Verwerfungen an Grenzen und zu fehlerhaften Vernetzungen von funktionalen Gebieten, was den Einfluss auf die zentralnervöse Differenzierung und Regionalisierung belegt (siehe zum Beispiel Gänzler-Odenthal und Redies 1998).

Die für das ZNS essentielle Verbindung von Neuronen und ganzen Kerngebieten zu Schaltkreisen geschieht durch das gerichtete Aussprossen von Axonen, deren Hinführung zum Ziel und dem erfolgreichen synaptischen Kontakt mit den richtigen Neuronen im Zielgebiet. Dabei folgen neuronale Fortsätze löslichen und membrangebundenen Faktoren. Somata von nahen Gliazellen und Neuronen, benachbarte Axone und andere neuronale Faszikel sowie die Schichten und Kerne der Zielregion können sowohl anziehende als auch abstoßende Signale darbieten. Dabei gehen Neuriten vorübergehend Zell-Zell-Bindungen über Adhäsionsmoleküle ein (Chilton 2006). Viele Mitglieder der Cadherin-Superfamilie wurden an aussprossenden Axonen in den entsprechenden Entwicklungsstadien identifiziert (Redies 2000). Der CDH2-exprimierende und CDH2-geleitete Vagusnerv war eines der ersten *in vivo* -Belege dafür, dass Cadherine selektiv exprimiert werden und damit homophil beziehungsweise heterophob das Axonwachstum steuern (Redies et al. 1992). Gemäß ihren Bindungseigenschaften finden sich überwiegend ähnliche Expressionsmuster der Cadherine in den Axonen und ihren Zielgebieten, was durch Christoph Redies (1993) erstmals am tectofugalen System des Huhns

anhand CDH2 und CDH4 beschrieben wurde. Doch auch abstoßende Wirkung wurde beobachtet (siehe zum Beispiel Fredette et al. 1996). Mehrere Funktionsverluststudien bestätigten die genannten Eigenschaften in diversen neuronalen Verbindungen (siehe zum Beispiel Honig und Rutishauser 1996, Stone und Sakaguchi 1996, Lee et al. 2003). Mit ihrer Beteiligung am Aussprossen von Neuriten, der Axonverlängerung, Bündelung, Wegfindung und Zielerkennung von Axonen sind Cadherine also maßgeblich für die Formation neuronaler Netzwerke verantwortlich (Redies 2000, Hirano et al. 2003, Takeichi 2007).

An den Kontaktpunkten der Neurone werden schließlich Synapsen ausgebildet. Die spezifische und differentielle Expression verschiedener Cadherine an den Dornen der Dendriten und an den Wachstumskegeln der Axone könnte das Problem der noch immer ungelösten synaptischen Spezifität klären (Redies 1997, Obst-Pernberg und Redies 1999). Verschiedene Cadherine sind Bestandteil von *Puncta adherentia* am synaptischen Spalt und damit notwendig für die Synaptogenese, aber auch für die Stärke reifer Synapsen (Suzuki und Takeichi 2008). In diesem Sinne reicht ihre Funktion über die Ausbildung spezifischer Synapsen hinaus und umfasst ebenso dynamische Funktionen wie beispielsweise die synaptische Plastizität. Einflüsse auf Langzeitpotenzierung, Kurzzeitplastizität und Gedächtnisbildung wurden gleichsam festgestellt und unterstreichen die prominente Rolle der Cadherine im reifen Gehirn (Halbleib und Nelson 2006). Als klassisches Beispiel findet man CDH2 vor allem in sich ausbildenden Synapsen (Fannon und Colman 1996, Uchida et al. 1996); CDH2 beeinflusst in Verbindung mit NMDA-Rezeptor-Multiproteinkomplexen aber auch die Bindungsstärke reifer Synapsen, letzten Endes auch die synaptische Plastizität und die Langzeitpotenzierung im Hippocampus (Benson und Tanaka 1998, Bozdagi et al. 2000, Huntley et al. 2002).

1.2 Die Retina

Zu den am besten erforschten Teilen des ZNS – und dabei aber in ihrer Funktion und Komplexität sicher auch zu den faszinierendsten – zählt die Netzhaut unserer Augen. Von den ersten Photorezeptoren der frühen Wirbellosen bis zur trichromatischen Retina der Primaten hat sich Hunderte von Jahrtausenden ein hoch organisiertes Netzwerk verschiedener Neurone und Gliazellen

entwickelt (Arendt et al. 2004). Nach der Beschreibung der ersten retinalen Zellen durch Santiago Ramon y Cajal vor mehr als 100 Jahren können wir heute erstmals von einer annähernd vollständigen Identifikation und Klassifikation der Neurone dieses komplexen Teils des ZNS sprechen. Obwohl sicher noch einiges zur Histologie der Retina ergänzt werden wird, richtet sich der Fokus der biomedizinischen Forschung nun auch auf die bisher wenig verstandenen Mechanismen der Entwicklung und Reifung dieses Organs. Eine nicht unerhebliche Rolle scheinen dabei – schon allein in Anbetracht ihrer oben genannten allgemeinen Funktionen – die Cadherine zu spielen. Wegen der Ähnlichkeit zu anderen Teilen des ZNS dürfte man letztlich durch die Erforschung der Rolle der Cadherine in der Retinogenese weitere Einblicke in die Neurogenese des menschlichen ZNS gewinnen.

1.2.1 Entwicklung und Aufbau der Retina

Im Folgenden soll die Retina der Wirbeltiere – insbesondere die der Vögel und Säugetiere – betrachtet werden, da die Retina der Wirbellosen erheblich von der Säugetierretina abweicht. Die Retina der Wirbeltiere hat ihre Anlage in einer ventralen, bilateralen Ausstülpung des frühen embryonalen Vorderhirns (Prosenzephalon). Nach dem Schluss des Neuralrohrs bildet sich ein einwandiges Augenbläschen mit Verbindung zum 3. Ventrikel, das lateral in Richtung Ektoderm wächst (siehe Abb. 4 a). Auf die Induktion der ektodermalen Linsenanlage (siehe Abb. 4 b) folgt eine Invagination des Augenbläschens. Ein doppelwandiger Augenbecher entwickelt sich (siehe Abb. 4 c).

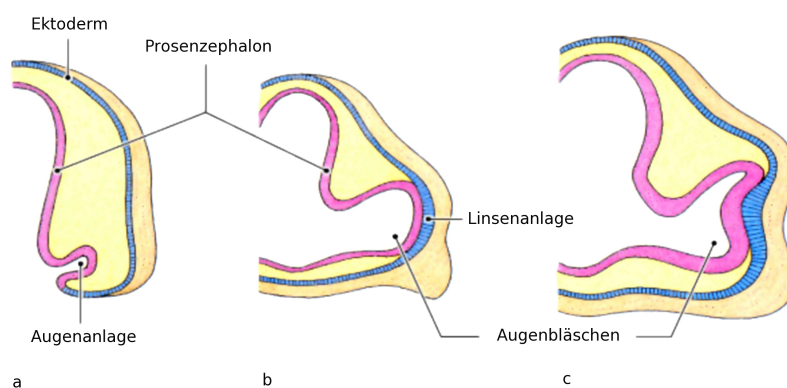


Abb. 4. Entwicklung des Augenbläschens (schematischer Schnitt durch das menschliche Vorderhirn). a 3. Embryonalwoche, b 4. Embryonalwoche, c 5. Embryonalwoche. Modifiziert nach Ulfing N., Kurzlehrbuch Embryologie. Georg Thieme Verlag 2005

Die äußere Wand des Augenbechers entwickelt sich zum einschichtigen Pigmentepithel, während die innere Zellschicht das mehrschichtige Neuroepithel bildet – die zukünftige Neuroretina und Gegenstand der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 5).

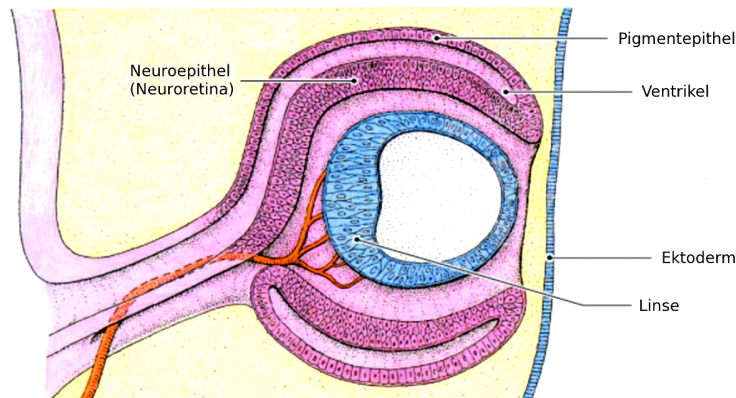


Abb. 5. Augenanlage (Augenbecher). Am Beispiel des Menschen in der 6. Embryonalwoche. Modifiziert nach Ulfig N., Kurzlehrbuch Embryologie. Georg Thieme Verlag 2005

Die beiden Augenbecherwände legen sich schließlich einander an und der Ventrikelspalt verschwindet. Es folgen diverse Differenzierungs- und Migrationsvorgänge, an deren Ende eine reife Neuroretina mit verschiedenen Zellen spezifischer Morphologie, Konnektivität und Lokalisierung in klaren Schichten steht (O'Rahilly 1975, Kolb et al. 2001; siehe Abb. 6). Zu Beginn werden Ganglienzellen des frühen Neuroepithels postmitotisch und wandern an die innere Oberfläche der Retina, der Glaskörperseite. Diese Ganglienzellschicht spaltet sich bald darauf ab und eine Zwischenschicht aus Neuriten und Glia (Neuropil) entsteht – die innere plexiforme Schicht. Ihre Neuriten verbinden die Ganglienzellen (und einige invertierte amakrine Zellen) mit der Mehrzahl der amakrinen Zellen (und einigen verlagerten Ganglienzellen) am inneren Rand der Neuroblastenschicht. Diese wiederum teilt sich deutlich später weiter in eine innere Körnerschicht (innere nukleäre Schicht) mit amakrinen Zellen, bipolare Zellen, Müller-Glia und Horizontalzellen sowie in eine äußere Körnerschicht (äußere nukleäre Schicht) mit Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen). Eine äußere plexiforme Schicht verbindet die beiden Körnerschichten. Astrozyten, Blutgefäße und Mikroglia treten erst spät vom Sehnerv aus in die Retina ein.

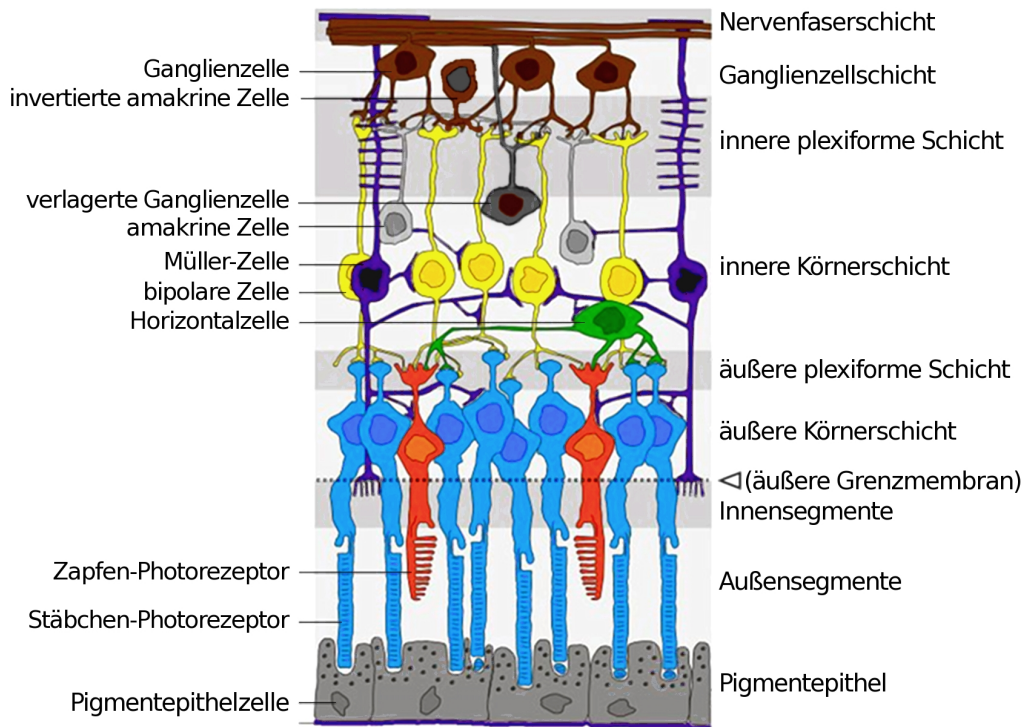


Abb. 6. **Schematischer Aufbau der menschlichen Retina.** Modifiziert nach Peter Hartmann, bearbeitet von Marc Gabriel Schmid. de.wikipedia.org 2009. (GFDL-Lizenz)

Aufgrund der besonderen Embryonalentwicklung ist verständlich, warum die Neuroblasten der Retina wie in anderen Hirnteilen in der „ventrikulären Zone“ proliferieren und zur „Oberfläche“ des Neuroepithel migrieren und sich differenzieren, die Neuroretina sich aber anatomisch gesehen von außen nach innen bildet und die Retina schließlich als invers bezeichnet wird.

Die Retinogenese beinhaltet – genau wie die Hirnentwicklung – Prozesse der Proliferation, Migration und Differenzierung. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese durch die gleichen molekularen Mechanismen gesteuert werden wie in den übrigen Teilen des ZNS (siehe unten).

1.2.2 Bisherige Studien

Bis zum heutigen Tag ist über die molekularen Mechanismen, die das komplexe neuronale Netzwerk der Retina zustande bringen, wenig bekannt. Trotzdem haben sich in den letzten Jahren viele Studien mit der Retinogenese beschäftigt (Morgan et al. 2005) und viele der molekularen Mechanismen erleuchtet. Genregulierende Faktoren wie der homeobox Transkriptionsfaktor pax6 oder die bHLH-Transkriptionsfaktoren MASH-1 und NeuroD, der Notch-Delta-

Signalweg, extrinsische lösliche Faktoren wie RA, SHh oder NGF, extrazelluläre Matrixproteine wie β 1-Integrine, Adhäsionsmoleküle an den Synapsen wie Sidekick, Synaptophysin und Synaptotagmin und schließlich Oberflächenproteine wie Ng-CAM oder CDH2 sind nur eine kleine Auswahl von morphoregulatorischen Faktoren der retinalen Neurogenese (Fuhrmann et al. 2000, Zhang et al. 2002, Harada et al. 2007, Schulte und Bumsted-O'Brien 2008). Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, weitere potentielle morphoregulatorische Moleküle und außerdem strukturelle Marker für neuronale Subtypen und Entwicklungsschritte der Neuroretina zu finden. Gemäß der Spezialisierung und Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Christoph Redies wird die Expression mehrerer Cadherine während der Retinogenese untersucht.

Zahlreiche Funktionsverluststudien geben zu erkennen, dass insbesondere klassische Cadherine und δ -Protocadherine diverse Beiträge zur Entwicklung der Wirbeltierretina leisten. Vom Zebrafisch (siehe zum Beispiel Liu et al. 2008) über den Krallenfrosch (siehe zum Beispiel Ruan et al. 2006) und das Huhn (siehe zum Beispiel Tanabe et al. 2006) bis zur Maus (siehe zum Beispiel Rattner et al. 2001) haben Cadherin-defizitäre Augen kleine Retinae mit missgestalteter Schichtung und Konnektivität gezeigt.

In Vögeln und Säugetieren wurden die retinalen Expressionsmuster verschiedener klassischer Cadherine und δ -Protocadherine intensiv analysiert, so zum Beispiel im Huhn CDH2, CDH3, CDH4, CDH6, CDH7 (Wöhrn et al. 1998) und PCDH10 (Müller et al. 2004). In der sich entwickelnden Retina der Maus identifizierten Faulkner-Jones et al. verschiedene Cadherine immunologisch (CDH1, CDH2, CDH3, CDH4, CDH5, CDH6, CDH10, CDH11, CDH12, CDH14; Faulkner-Jones et al. 1999a) und untersuchten die Expression von „CDH7“, das eigentlich CDH20 entspricht (Kools et al. 2000), mittels In-situ-Hybridisierung (Faulkner-Jones et al. 1999b). Gaitan und Bouchard (2006) zeigten in der frühembryonalen Retina der Maus PCDH19. Andere Gruppen haben ausführlichere Kartierungen in der Maus durchgeführt, wie zum Beispiel Honjo et al. (2000) an der postnatalen Retina (CDH2, CDH4, CDH6, CDH8 und CDH11), Xu et al. (2002) während der gesamten retinalen Entwicklung (CDH1, CDH2 und CDH3). Jede dieser Studien hat gezeigt, dass Cadherine auch in der Retina in der schon erwähnten zeitlich und räumlich streng beschränkten Weise exprimiert sind.

Eine umfassende und detaillierte Expressionsstudie für die Entwicklung der Neuroretina fehlt allerdings bis zum heutigen Tag, insbesondere für die δ -Protocadherine im Säugetier. In der vorliegenden Arbeit werden daher sieben klassische Cadherine und acht δ -Protocadherine mittels In-situ-Hybridisierung im Frettchen untersucht. Die vorliegende Arbeit schließt an die Analyse der Cadherin-Expression im embryonalen bis adulten visuellen Cortex des Frettchens durch einen meiner Kollegen an (Krishna et al. 2009).

1.3 Das Modelltier Frettchen

Das Frettchen (*Mustela putorius furo*) ist ein Raubtier aus der Familie der Marder und als Labortier relativ günstig und einfach zu halten. Es dient als ein hervorragendes und mittlerweile etabliertes Modell für die Entwicklung des Sehsystems. Sein visuelles System hat große Ähnlichkeit zu dem der Katze, das bis dato eines der Standardmodelle für experimentelle Studien war (Jackson und Hickey 1985, Vitek et al. 1985, Henderson et al. 1988). Die Gestationsperiode des Frettchens ist mit 42 Tagen deutlich kürzer als die der Katze und seine gleichzeitig relativ lange postnatale neuronale Entwicklungs- und Reifepériode ist von großem Vorteil für Entwicklungsstudien. Greiner und Weidman (1981, 1984) haben die Retinogenese des Frettchens histologisch detailliert ergründet. Am 38. Tag nach der Befruchtung hat sich die Ganglienzellschicht vollständig von der Neuroblastenschicht separiert. Um die Geburt ist die Frettchenretina deutlich unreifer als die der Katze, aber ähnlich weit entwickelt wie die der Nagetiere. Die meisten Horizontalzellen und Photorezeptorzellen, sowie etwas später auch die amakrinen Zellen, sind am Ende der Embryonalperiode postmitotisch und auf dem Weg zu ihren typischen Positionen in der Retina (in Ratte: Rapaport et al. 2004). Am Ende der zweiten postnatalen Woche ist die Neuroblastenschicht in die innere und äußere Körnerschicht geteilt. Die histologische Struktur der Frettchenretina gilt erst zum Zeitpunkt der Augenöffnung – 30 bis 33 Tage nach der Geburt – als ausgebildet. Das ZNS der Nagetiere entwickelt sich postnatal bedeutend schneller. Ein Vergleich mit der Katze legt nahe, dass eine vollständige funktionelle Ausreifung der Retina des Frettchens acht Wochen nach der Geburt vollzogen sein sollte.

2 ZIELE DER ARBEIT

Die Möglichkeit, 15 verschiedene klassische Cadherine und δ -Protocadherine zumindest auf mRNA-Ebene darzustellen, ist bei einem dem Menschen so ähnlichen und für neuroembryonale Studien so geeigneten Tier wie dem Frettchen erst seit kurzer Zeit gegeben. Zum Teil wurden die analysierten Cadherine noch nie zuvor in der Retina beschrieben. Die vorliegende Arbeit fügt sich in die anatomisch-molekularbiologischen Studien zur Cadherin-Expression der Arbeitsgruppe von Christoph Redies ein und stellt einen weiteren Schritt von Modelltieren wie dem Huhn oder der Maus über das Frettchen in Richtung Mensch dar. Direkten Anschluss findet die vorliegende Arbeit an die Kartierung fast der gleichen Cadherine im visuellen Cortex des Frettchens durch meinen Kollegen Krishna (2009), der mir auch die entsprechenden mRNA-Sonden zur Verfügung stellte (siehe Methodenteil der publizierten Originalarbeit).

Durch die vorliegende Arbeit werden hilfreiche Ergänzungen zu schon bekannten Fakten aber auch zu in Diskussion befindlichen Hypothesen (siehe Einleitung) erwartet. Weitere Beiträge für die Aufklärung der restringierten Expression einzelner Cadherine in neuronalen Populationen und damit Anhaltspunkte für die Hypothese des (kombinatorischen) adhäsiven Codes (Redies 2000) sollten zutage treten. Endgültige Aussagen über die Funktionen der Cadherine im ZNS lassen sich allerdings nicht treffen, da die gewählte deskriptive Methodik diesbezüglich Grenzen setzt (siehe Kapitel 4.1). Dennoch sollten sich neue Feststellungen zur Expression der Cadherine im höheren Säugetier zeigen. Schließlich könnte die vorliegende Expressionsanalyse neue Einsichten auf dem Gebiet der Retinogenese liefern. Cadherine dürften aufgrund ihrer zeitlich und räumlich kontrollierten Expression als morphoregulatorische Moleküle und somit auch als Marker für Zellpopulationen, Subpopulationen und Entwicklungsschritte derselben dienen. Die detaillierten Expressionsmuster während der Retinogenese im Frettchen sollen also Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der Cadherine sein.

Um die oben genannten Ziele zu erreichen, analysiere ich die Expressionsmuster von CDH4, CDH6, CDH7, CDH8, CDH11, CDH14, CDH20 und PCDH1,

PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDH10, PCDH11, PCDH17 und PCDH18 zu charakteristischen Entwicklungsstadien der Retina des Frettchens vom frühen Embryo bis zum adulten Tier. Zu Beginn sind die charakteristischen Stadien der retinalen Entwicklung des Frettchens histologisch darzustellen. Ausgewählt wurden fixierte und geschnittene Retinae von embryonalen Frettchen am 23., 30. und 38. Entwicklungstag (E23, E30, E38) sowie 2, 13, 25 und 60 Tage nach der Geburt (P2, P13, P25, P60). Die schichtspezifische Verteilung sowie die Expression der einzelnen Cadherine in den Zellpopulationen der Retina werden ausführlich beschrieben, interpretiert und mit vorherigen Studien auf diesem Gebiet verglichen.

Research article

Open Access

Expression of classic cadherins and δ -protocadherins in the developing ferret retina

Johannes Etzrodt, K Krishna-K and Christoph Redies*

Address: Institute of Anatomy I, University of Jena School of Medicine, Teichgraben 7, D-07743 Jena, Germany

Email: Johannes Etzrodt - johannes.etzrodt@uni-jena.de; K Krishna-K - Krishna.Muthukumarappan@mti.uni-jena.de; Christoph Redies* - redies@mti.uni-jena.de

* Corresponding author

Published: 22 December 2009

Received: 18 June 2009

BMC Neuroscience 2009, 10:153 doi:10.1186/1471-2202-10-153

Accepted: 22 December 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/10/153>

© 2009 Etzrodt et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Cadherins are a superfamily of calcium-dependent adhesion molecules that play multiple roles in morphogenesis, including proliferation, migration, differentiation and cell-cell recognition. The subgroups of classic cadherins and δ -protocadherins are involved in processes of neural development, such as neurite outgrowth, pathfinding, target recognition, synaptogenesis as well as synaptic plasticity. We mapped the expression of 7 classic cadherins (CDH4, CDH6, CDH7, CDH8, CDH11, CDH14, CDH20) and 8 δ -protocadherins (PCDH1, PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDH10, PCDH11, PCDH17, PCDH18) at representative stages of retinal development and in the mature retina of the ferret by in situ hybridization.

Results: All cadherins investigated by us are expressed differentially by restricted populations of retinal cells during specific periods of the ferret retinogenesis. For example, during embryonic development, some cadherins are exclusively expressed in the outer, proliferative zone of the neuroblast layer, whereas other cadherins mark the prospective ganglion cell layer or cells in the prospective inner nuclear layer. These expression patterns anticipate histogenetic changes that become visible in Nissl or nuclear stainings at later stages. In parallel to the ongoing development of retinal circuits, cadherin expression becomes restricted to specific subpopulations of retinal cell types, especially of ganglion cells, which express most of the investigated cadherins until adulthood. A comparison to previous results in chicken and mouse reveals overall conserved expression patterns of some cadherins but also species differences.

Conclusions: The spatiotemporally restricted expression patterns of 7 classic cadherins and 8 δ -protocadherins indicate that cadherins provide a combinatorial adhesive code that specifies developing retinal cell populations and intraretinal as well as retinofugal neural circuits in the developing ferret retina.

Background

The vertebrate retina develops as a ventral outgrowth of the forebrain vesicle; invagination of the primary optic vesicle leads to a two-layered optic cup that differentiates into an outer, pigmented epithelium and an inner, multi-

layered, neural epithelium, which is the focus of our study. The mature neural retina comprises distinct sets of neurons, each with a characteristic morphology, location and connectivity. Together, they form a highly sophisticated network, arranged in distinct layers [reviewed in

[1,2]]. Retinal development involves the processes of cellular proliferation, migration and differentiation. These processes are mediated by molecular mechanisms similar to those in the rest of the brain.

Many studies have investigated the organization and developmental dynamics of the mammalian retina in recent years [reviewed in [3]] and some of the molecular events that regulate retinal neuronal development have been elucidated. For example, genes that play a role in retinogenesis include gene regulatory factors like the homeobox transcription factor Pax6 or the transcription factors MASH-1 and NeuroD, surface proteins like Ng-CAM or N-cadherin (cadherin-2), the Notch-Delta signaling pathway, diffusible factors like retinoic acid, sonic hedgehog or NGF, extracellular matrix molecules like β 1-integrins and synaptic adhesion molecules like sidekick, synaptophysin and synaptotagmin [reviewed in [4-6]].

To identify additional potential morphoregulatory molecules as well as structural markers for developmental events, we focus on cadherins in the present study. Cadherins are Ca^{2+} -dependent cell surface glycoproteins, which mediate cell adhesion and also have functions in cell signaling from early stages of animal evolution [reviewed in [7]]. The more than 100 members of the cadherin superfamily in vertebrates are grouped into several subfamilies designated as classic, desmosomal, Flamingo/CELSR, Fat-type cadherins, protocadherins and others [reviewed in [8]]. The well-studied classic cadherins mediate strong cell-cell interactions and prefer homophilic over heterophilic binding. They constitute integral components of adherens junctions, interact with the cytoskeleton through catenins and participate in many signaling pathways. Most members of this subfamily are expressed in the nervous system and were proposed to be involved in the functional regionalization of the brain and in the formation, maintenance and plasticity of neural circuits [reviewed in [9-11]]. Protocadherins constitute the largest cadherin subfamily and contain several subgroups, such as α -, β - and δ -protocadherins; they seem to have arisen with the onset of vertebrates [7]. Protocadherins exhibit weaker binding activity than classic cadherins but have a high potential for intracellular signaling and play crucial roles in neuronal development although their precise functions are largely unknown [12-14]. A more recently discovered subgroup are the non-clustered δ -protocadherins [15,16]. The differential and restricted expression patterns of individual cadherins in specific brain regions and neuronal subpopulations suggests that classic cadherins as well as δ -protocadherins provide an adhesive code for developing and mature neural circuits of the central nervous system [reviewed in [9,17]].

Loss-of-function studies demonstrate that classic cadherins and δ -protocadherins play a crucial role in vertebrate

retinogenesis. They have multiple morphoregulatory functions in retinal proliferation, migration, differentiation and layer formation as well as in axonal outgrowth, pathfinding, target recognition and synaptogenesis. In general, cadherin-deficient eyes have small, dislayered and disconnected retinæ [reviewed in [10,11]]. However, not only the establishment of intraretinal neural networks and retinofugal projections, but also synaptic plasticity [18] and transport processes in photoreceptors [19,20] in the adult retina are found to be cadherin-regulated. In retinal pathology, Usher syndrome type 1 [19], different syndromes with macular dystrophy in humans [21] and retinoblastoma [22,23] are associated with cadherin dysfunction.

In the avian and mammalian retina, the developmental expression patterns of several classic cadherins and δ -protocadherins have been mapped, including, in chicken, cadherin-2 (CDH2), CDH3, CDH4, CDH6B, CDH7 [24] and protocadherin-10 (PCDH10) [25]. In the developing mouse retina, Faulkner-Jones et al. [26] identified several cadherins (CDH1, CDH2, CDH3, CDH4, CDH5, CDH6, CDH10, CDH11, CDH12, CDH14) by immunoblotting and examined the expression of "CDH7", which actually corresponds to CDH20 [27], by in situ hybridization. Other researchers carried out more extensive expression mappings in mouse, for example, Honjo et al. [28] in the postnatal retina (CDH2, CDH4, CDH6, CDH8 and CDH11) and Xu et al. [29] throughout retinal development (CDH1, CDH2 and CDH3). Each of these studies revealed that cadherins are expressed in a temporally and spatially restricted fashion in the retina, as shown previously for the brain (see above). However, a comprehensive study of the expression of multiple cadherins throughout all stages of retinal development in a single mammalian species is missing to date, especially for δ -protocadherins.

The ferret visual system serves as a suitable experimental model for visual development; it shows close similarity to the cat visual system [30,31]. Compared to the cat, the shorter gestational period of 42 days and a larger portion of postnatal development are of great advantage. Greiner and Weidman [32,33] described ferret retinogenesis in detail (see nuclear staining in Fig. 1A). 23 days after conception (E23), the ferret neural retina consists of a pseudostratified neuroepithelium, the neuroblast layer (NBL). Ganglion cells are the first retinal neurons that become postmitotic and migrate towards the vitreous side. At E38, the ganglion cell layer (GCL) has completely separated from the NBL, creating the inner plexiform layer (IPL) in between the other two layers. Most horizontal cells and cone photoreceptors become postmitotic and migrate to their final position before birth; most amacrine cells are differentiated around birth [for rat, see [34]]. In the second postnatal week, the NBL divides into an outer nuclear

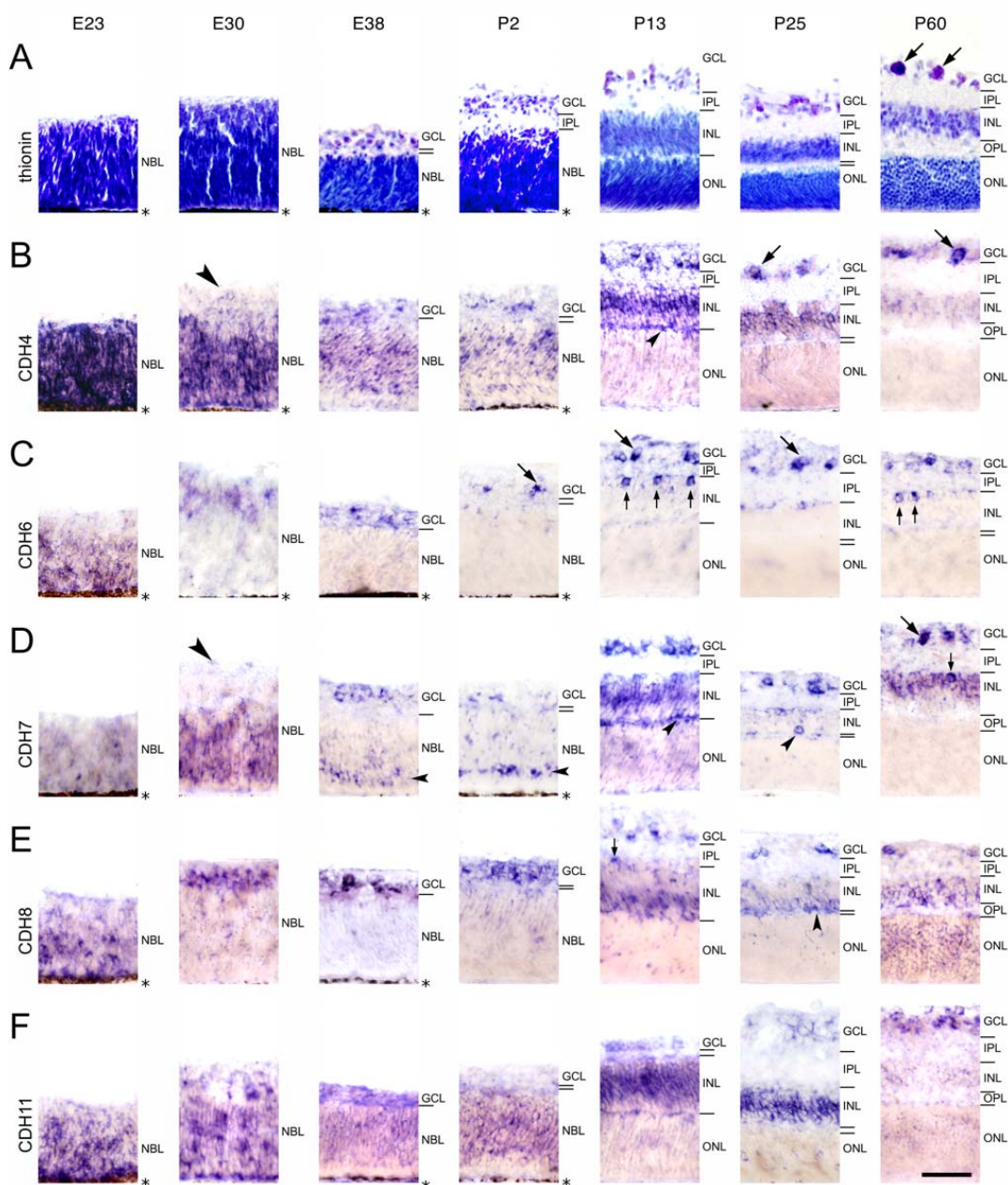


Figure 1

Histology and differential expression of cadherins in central regions of the developing ferret retina. Expression of cadherin-4 (CDH4; B), cadherin-6 (CDH6; C), cadherin-7 (CDH7; D), cadherin-8 (CDH8; E) and cadherin-11 (CDH11; F) was mapped with cRNA probes at embryonic day 23 (E23), E30, E38, postnatal day 2 (P2), P13, P25, and at the mature stage (P60). For neuroanatomical orientation, Nissl-stained sections (thionin) are shown in A. The different layers of the retina are indicated on the right side of each panel. Large arrows point at large ganglion cells ($> 15 \mu\text{m}$ in largest diameter) in the ganglion cell layer (GCL). Small arrows point at single, large cells of the inner nuclear layer (INL) adjacent to the inner plexiform layer (IPL). Large arrowheads point at negative inner layers of the neuroblast layer (NBL). Small arrowheads point at putative horizontal cells adjacent to the outer plexiform layer (OPL) or putative developing horizontal cells in the NBL, respectively. The outer nuclear layer (ONL) is shown up to the outer limiting membrane and does not include the outer photoreceptor segments after P13. The pigment epithelium next to the neuroblast layer (NBL) is indicated by an asterisk. Scale bar in F, $50 \mu\text{m}$, applies to all panels.

layer of photoreceptors (ONL) and an inner nuclear layer of interneurons (INL), with the outer plexiform layer (OPL) in between. All structural parts of the retina have formed at the time of eye opening, which is not until 30 days after birth. At P60, only the photoreceptor outer segments and the INL have changed their size, and the histology of the ferret retina can be considered mature. Note that the thickness of the retina does not increase linearly throughout development but also decreases intermittently due to stretching of the retina when the diameter of the eye bulb is growing [Fig. 1A; see also [32]].

In the present study, we investigate the developmental expression of seven classic cadherins (CDH4, CDH6, CDH7, CDH8, CDH11, CDH14, CDH20) and eight δ -protocadherins (PCDH1, PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDH10, PCDH11, PCDH17, PCDH18) in a single species, the ferret, by *in situ* hybridization. Finally, we compare our results with previous data about cadherin expression in the retina.

Results and Discussion

General Results

All 15 cadherins examined are expressed in the developing neural retina of the ferret in different locations, continuously from early embryonic to adult stages (Figs. 1, 2, 3). Exceptions are CDH14 and PCDH18, which are expressed very weakly and with interruptions. All cadherins exhibit a restricted, spatiotemporally regulated expression pattern. Each cadherin is expressed in specific layers, sublayers and subsets of cells at different stages (see Table 1). Thus, each retinal layer is marked by the combinatorial expression of multiple classic and δ -protocadherins during development (see Table 2). In general, cadherin expression is especially widespread and intense at P13. After P13, expression patterns remain relatively stable, although gradual changes are observed. Sense probes, which served as a control, did not result in any significant signal (data not shown). The pigmented epithelium is not visible in all panels of Figures 1, 2, 3 because, in some cases, albino animals were used or retinal detachment occurred. Images from P13 and later stages show the neural retina without the photoreceptor outer segments, which are devoid of *in situ* signal. Peripheral regions of the retina show expression patterns similar to central ones (data not shown). Nevertheless, a maturational delay of around 10 to 15 days has been reported for extreme peripheral parts of the ferret retina [35]. Dorsoventral differences of ganglion cell distribution have also been reported [36]. For identification of retinal layers and cell types, we mainly refer to the histological study of the developing ferret retina by Greiner and Weidman [32,33], to some detailed morphology studies [31,37,38] and to previous cadherin expression studies in the developing vertebrate retina (see Introduction).

Neuroblast layer (NBL)

At E23, a strong expression of some cadherins marks the entire neuroepithelium, whereas other cadherins mark only a subpopulation of NBL cells or start expression later, respectively. Remarkably, the outer, proliferative zone of the NBL is selectively marked by CDH4, CDH7 and CDH20 at E30 (arrows in Figs. 1B, 1D, 2B). PCDH1 expression is restricted to the outermost layers (Fig. 2C, E30). In contrast, most cadherins exclusively label the innermost retinal zone, which contains prospective ganglion cells and amacrine cells, before birth. These two cell types display the same cadherin expression profile, respectively, also at later stages of development (for example, see Fig. 2E). Remarkably, in the early retina, the cadherin-expressing cell populations do not show borders that run strictly in parallel to the retinal surface but form cluster-like protrusions into adjacent zones (for example, CDH4 or CDH7 at E30 in Fig. 1).

Ganglion cell layer (GCL)

The ganglion cell layer shows the most prevalent and consistent pattern of expression for all cadherins up to adulthood. According to Vitek et al. and Henderson et al. [31,36], the cells with diameters of more than 15 μm in the postnatal GCL include mainly ganglion cells ("large" ganglion cells). The largest ganglion cells in our sample had a soma of 26 μm in diameter. The majority of cells in the GCL has a diameter of less than 15 μm and comprise other ganglion cell types as well as numerous inverted amacrine cells and glia, which are not distinguishable by our methods ("small cells of the GCL"). Apparently all cadherins label large ganglion cells or a subset thereof (for example, see large arrows in Figs. 1, 2 & 3, and arrowheads Figs. 4A and 4B).

Astrocytes are rarely seen (see small arrow in Fig. 4B). The study of these non-neuronal cells as well as blood vessel cells and microglia is beyond the scope of the present investigation.

Inner nuclear layer (INL)

Most cadherins are expressed by amacrine cells from E38 onward, the earliest stage, at which developing amacrine cells can be identified on the basis of their location. After P13, when most amacrine cells have differentiated [[32], for rat, see [34]], they stop expression of some cadherins (CDH4, CDH8, CDH11, PCDH8) while they begin to express CDH20 at P13; CDH14 faintly labels amacrine cells only around P13.

A few large positive cells are sparsely scattered along the inner margin of the INL (for example, see Fig. 4C-E). Cells of similar morphology have been described as displaced ganglion cells in other species [for chicken, see [24,39]]. Even if the size of their soma and nucleus is similar to

Table 1: Cadherin expression in the developing ferret retina.

CDH4	NBL	E23: (a)+++; E30: (a)+++, except inner tier; E38, P2: (n)++
	GCL	E38—P60: (n)++, large ganglion cells +++
	INL	inner P13: (n)++; P25: (s)+; P60: - middle P13: (a)+++; P25: (a)++; P60: (n)+ outer P13: patchy signal; P25, P60: -
	ONL	-
CDH6	NBL	E23: (n)++; E30: (n)+, only inner layers; E38, P2: (s)+, only inner cells
	GCL	E38—P60: (s)++, mainly large ganglion cells +++
	INL	inner P13—P60: (n)++, single larger cells +++ middle P13: (s)+; P25—P60: - outer P13—P60: -
	ONL	-
CDH7	NBL	E23: (n)+; E30: (n)++, only outer two thirds; E38, P2: (n)+, one outer layer (n)+++
	GCL	E38—P60: (n)++, large ganglion cells +++
	INL	inner P13: (n)++; P25: (n)+; P60: (n)++; single larger cells +++ middle P13: (a)+++; P25: (s)+; P60: (n)++, only inner part outer P13: (n)++; P25: (s)++; P60: -
	ONL	P13: (n)+; P25—P60: -
CDH8	NBL	E23: (a)++; E30: (n)++, only inner layers; E38, P2: -
	GCL	E38, P2: (n)++; P13—P60: (s)+
	INL	inner P13: (s)++; P25, P60: - middle P13: (n)++, only outer part; P25: (n)+ P60: (n)++ outer P13: (n)++; P25, P60: (n)+
	ONL	P13, P25: -; P60: (a)+
CDH11	NBL	E23, E30: (a)+++; E38, P2: (a)++, outermost layer -
	GCL	E38—P25: (n)+; P60: (n)++
	INL	inner P13: (n)+; P25, P60: - middle P13, P25: (a)+++; P60: (s)+ outer P13—P60: -
	ONL	-
CDH14	NBL	E23: -; E30: (n)+, only innermost layers; E38: (n)+; P2: -
	GCL	E38: (n)+; P2: -; P13—P60: (s)+
	INL	inner P13: (s)+; P25, P60: - middle P13—P60: - outer P13—P60: -
	ONL	-
CDH20	NBL	E23: (a)+++; E30: (a)++, except inner tier; E38, P2: (n)++, only middle layers
	GCL	E38, P2: -; P13—P60: (n)++
	INL	inner P13, P25: (s)++; P60: (n)++ middle P13: (a)+++; P25: (n)++; P60: (n)++ outer P13—P60: -
	ONL	P13, P25: -; P60: (n)+
PCDH1	NBL	E23, E30: (n)++, inner two thirds (s)+; E38: (a)++, outermost layer -; P2: (n)++, (s)+++
	GCL	E38, P2: (s)+; P13—P60: (n)+++
	INL	inner P13—P60: (n)++, single larger cells ++ middle P13: (n)+; P25, P60: (s)+ outer P13—P60: (n)++
	ONL	-
PCDH7	NBL	E23: (a)+++; E30- P2: (n)+++; only inner layers
	GCL	E38: (n)++, only outer cells; P2: (s)++; P13—P60: (n)++, most large ganglion cells +++
	INL	inner P13—P60: (n)+++; single larger cells ++ middle P13, P25: (n)+; P60: (s)+ outer P13, P25: (n)++; P60: -
	ONL	-

Table 1: Cadherin expression in the developing ferret retina. (Continued)

PCDH8	NBL	E23: -; E30: (n)++, only inner half; E38, P2: (n)+, only innermost cells
	GCL	E38: (n)+++; P2: (n)++; P13, P25: (s)++; P60: (n)++, large ganglion cells +++
	INL	inner P13: (n)++; P25, P60: - middle P13—P60: - outer P13—P60: -
	ONL	-
PCDH9	NBL	E23: (a)+++; E30, E38: (n)++, only inner layers; P2: (n)++, one outer layer (s)+++
	GCL	E38-P60: (a)++, large ganglion cells +++
	INL	inner P13-P60: (n)++, single larger cells ++ middle P13: (n)+; P25: -; P60: (n)++ outer P13: (a)++; P25: (n)++; P60: (n)++
	ONL	-
PCDH10	NBL	E23: (a)+++; E30: (n)++; E38, P2: (n)++, only inner layers
	GCL	E38, P2: (a)+++; P13—P60: (n)++, large ganglion cells +++
	INL	inner P13—P25: (n)++; P60: (n)+; single larger cells ++ middle P13: (n)++; P25: (n)+; P60: - outer P13: patchy signal; P25: (s)++; P60: -
	ONL	-
PCDH11	NBL	E23: (a)+++; E30: (n)+, only inner layers; E38, P2: (n)++
	GCL	E38—P60: (n)++
	INL	inner P13: (n)++; P25: (s)+; P60: (n)+ middle P13: (n)+; P25: -; P60: (n)+ outer P13—P60: (s)+
	ONL	P13, P25: -; P60: (a)+
PCDH17	NBL	E23: (n)+; E30: (n)++, only inner layers; E38: -; P2: (a)+, one outer layer (n)++
	GCL	E38—P60: (n)++
	INL	inner P13: (a)++; P25, P60: (n)++ middle P13—P60: (a)+ outer P13—P60: (n)+
	ONL	P13—P60: (a)+
PCDH18	NBL	E23, E30: (s)++; E38, P2: -
	GCL	E38, P2: -; P13—P60: (s)++
	INL	inner P13—P60: (s)+ middle P13—P60: - outer P13—P60: -
	ONL	-

Approximate number of positive cells: -, no cell positive; (s), single cells (up about 20%) positive; (n), numerous cells (about 20—80%) positive; (a), all or almost all cells (more than 80%) positive. Expression level: -, absent; +, weak; ++, moderate; +++, strong.

large amacrine cells around P13 (on average, $12.9 \mu\text{m} \pm 0.2 \text{ SD}$ and $9.8 \mu\text{m} \pm 0.5$, respectively), they can be distinguished from amacrine cells by their sparse distribution, their occupation of large gaps between neighboring cells as well as by their relatively large somata and nuclei after P13 up to adulthood (on average, $14.6 \mu\text{m} \pm 0.9$ and $11.9 \mu\text{m} \pm 0.7$, respectively, at P60). Displaced ganglion cells apparently express CDH7, PCDH1, PCDH7 (data not shown), PCDH9 (Fig. 4E) and, most prevalent, CDH6 (Fig. 4C) and PCDH10 (Fig. 4D) at several stages. Nevertheless, our morphological analysis could have missed smaller displaced ganglion cells.

Noteworthy, CDH6 strongly labels numerous large cell bodies at the inner margin of the INL from P13 onward

(small arrows in Fig. 1C, P13 and P60). These cells are smaller than large ganglion cells ($12.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ [mean \pm SD] at P13, and $13.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ at P60), have a relatively small nucleus (not more than $9 \mu\text{m}$) and are sometimes spaced not more than $30 \mu\text{m}$ apart (Fig. 1C, P13 and P60). Because they retain a medium size also at later stages, are numerous and densely packed in between similar but smaller cells, these cells may represent a distinct type of large amacrine cells rather than displaced ganglion cells.

The middle part of the inner nuclear layer, which primarily contains the cell bodies of Müller glial cells and some inner bipolar cells, is positive for CDH4, CDH7, CDH11, CDH20 and PCDH10 (for example, see arrowhead in Fig. 4F). The outer part of the INL, which mainly contains

Table 2: Summary of cadherin expression in the retinal layers.

	NBL	GCL	inner INL	middle INL	outer INL	ONL
CDH4	+++	++	++	+++	+	-
CDH6	++	+	++	+	-	-
CDH7	++	++	++	+++	++	(+)
CDH8	+++	+	+	++	++	-
CDH11	+++	++	-	+++	-	-
CDH14	-	+	(+)	-	-	-
CDH20	+++	++	+	+++	-	-
PCDH1	++	++	++	+	++	-
PCDH7	+++	++	++	++	++	-
PCDH8	-	+	+	-	-	-
PCDH9	+++	+++	++	++	+++	-
PCDH10	+++	++	++	++	+	-
PCDH11	+++	++	++	++	+	-
PCDH17	++	++	+++	+++	++	(+)
PCDH18	+	+	+	-	-	-

Expression level was roughly determined at E23 (NBL) and P13 (all other layers). Abbreviations: -, no cell positive; +, single cells (up about 20%) positive; ++, numerous cells (about 20-80%) positive; +++, all or almost all cells (more than 80%) positive; (+) faint expression

bipolar cell somata, expresses CDH8, PCDH7 and PCDH9 (for example, see arrowhead in Fig. 4G).

Some single cells express PCDH1, PCDH9 and PCDH17 in a sublayer of the outer NBL from P2 onward (small arrowheads in Figs. 2C, F; 3C). Already at E38, CDH7 is expressed by some cells at this location (small arrowhead in Fig. 1D, E38). This sublayer anticipates the later splitting of the NBL (small arrowheads in Fig. 1D, P2 and P13). According to their radial position and distribution, we tentatively identify them as horizontal cells. At later stages, cadherin-expressing horizontal cells can be more clearly identified morphologically (for example, see small arrowhead in Fig. 1D, P25, and Fig. 4H). Around P13, some patchy signal is observed transiently at the outer margin of the INL for some cadherins (CDH4, CDH8, PCDH10, PCDH11; see small arrowheads in Figs. 1B, P13; 1E, P25; 3A, P25; 3B, P13); it is possible that these signals are also associated with horizontal cells or their proximal processes. Interestingly, these mRNA signals disappear from most of this site by the time of eye opening when horizontal cells have differentiated.

Outer nuclear layer (ONL)

The ONL is not visible with most cadherin probes. Transiently, the ONL expresses a few cadherins faintly around P13 (CDH7 and PCDH17), when the photoreceptor outer segments grow out, as well as at the mature stage (CDH8, CDH20, PCDH11, PCDH17; for example, see arrowhead in Fig. 4I). Prospective photoreceptor cells do not express most of the cadherins at E38 and P2 in the outermost layers of the NBL.

General Discussion

To our knowledge, this study is the first to map the developmental expression of CDH14, PCDH1, PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDH11, PCDH17 and PCDH18 during development of the vertebrate retina. Moreover, for the first time, the expression of cadherins was mapped in the retina of the ferret. In contrast to previous studies in other vertebrate species [24,25,28,29,40,41] multiple classic cadherins and δ -protocadherins were mapped in detail throughout retinogenesis.

Each of the cadherins studied exhibits a unique expression pattern, although some similarity and overlap between

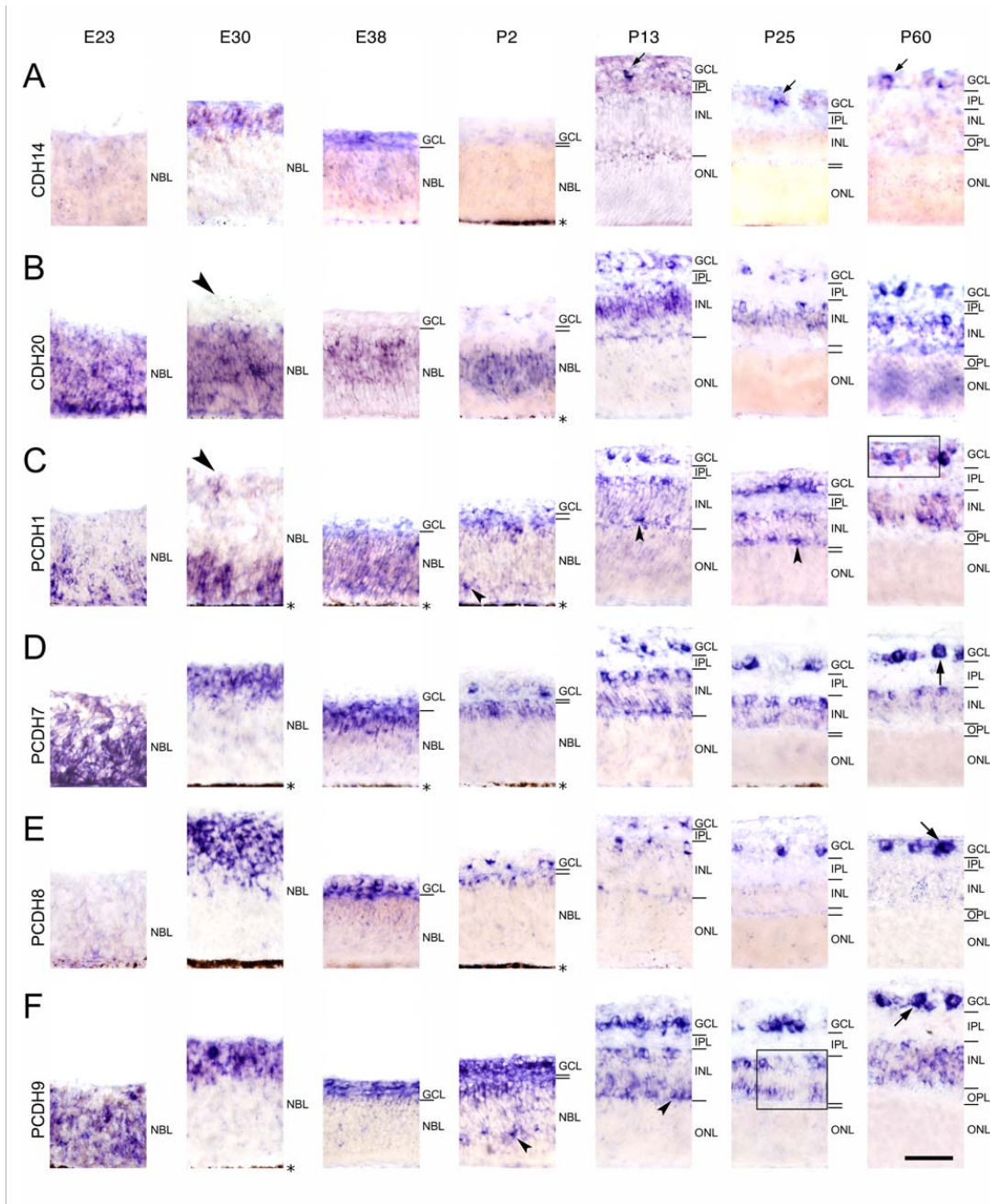


Figure 2
Differential expression of cadherins in central regions of the ferret retina during development. Expression of cadherin-14 (CDH14; A), cadherin-20 (CDH20; B), protocadherin-1 (PCDH1; C), protocadherin-7 (PCDH7; D), protocadherin-8 (PCDH8; E) and protocadherin-9 (PCDH9; F) was mapped with cRNA probes at embryonic day 23 (E23), E30, E38, postnatal day 2 (P2), P13, P25 and at the mature stage (P60). For neuroanatomical orientation, the different layers of the retina are indicated on the right side of each panel. Large arrows point at large ganglion cells (> 15 μm in largest diameter), whereas small arrows point at several cells of the ganglion cell layer (GCL) in A (CDH14). Large arrowheads point at negative inner layers of the neuroblast layer (NBL). Small arrowheads point at putative horizontal cells adjacent to the outer plexiform layer (OPL) or putative developing horizontal cells in the NBL, respectively. The outer nuclear layer (ONL) is shown up to the outer limiting membrane and does not include the outer photoreceptor segments after P13. The pigment epithelium next to the NBL is indicated by an asterisk. Areas boxed in C and F are shown at a higher magnification in Figure 4B and G, respectively. Other abbreviations: INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Scale bar in F, 50 μm, applies to all panels.

cadherins are observed. In general, until P13, expression is restricted to proliferating and differentiating cell populations. This observation is in agreement with the morphogenetic roles of cadherins in the CNS and vertebrate retina (see Background). Changes in cadherin expression patterns coincide with specific steps of neuronal development; in some cases, developmental events are even anticipated before they become visible in Nissl or nuclear stainings. This anticipation is especially evident around E30 and from P2 to P13, when major advances in retinal development occur. For example, the innermost layers of the NBL, which mainly include prospective ganglion cells, express selectively particular cadherins at E30. The same cadherins mark ganglion cells in the later GCL (for example, see Figs. 1E, 3C) and sometimes, in addition, amacrine cells in the later INL (for example, see Figs. 2D, 2E and 2F). Vice versa, CDH20 does not label the innermost layers of NBL at E30 (see arrow in Fig. 2B, E30) and the GCL is also negative for this molecule at later stages. Moreover, signal in some outer layers consistently marks the radial position of the future INL, especially its later positive middle part, where Müller cells reside. Strikingly, putative developing horizontal cells are marked by some cadherins from E38 onwards (for example, see small arrowheads in Fig. 1D). Although the identification of cell types and subtypes required confirmation by double labeling with cell type-specific markers, the anticipation of histological transformations by cadherin expression seems evident on histological grounds.

As development proceeds, specific combinations of cadherins turn into markers for different retinal cell types or subpopulations thereof. Because each cell type resides in a particular retinal layer, most cadherins exhibit a layer-specific expression profile at later stages of development. Thus, each retinal layer is marked by the combinatorial expression of multiple cadherins (see Table 2). A layer-specific expression of cadherins has been described previously for the germinal zones and layers of the cerebral cortex [42]. We did not find that any of the cadherins studied by us was expressed by only a single retinal cell type. Cadherins with this type of highly restricted expression are the evolutionary ancient horizontal cell cadherin in non-mammalian animals [cHZ-cadherin; [43]] and the photoreceptor-specific PCDH21 [prCAD; [44]],

The cadherins studied continue to be expressed at high levels after neurogenesis, during the period of neurite outgrowth and neural circuit formation. Most strikingly, ganglion cells, especially large ones, express almost all cadherins at high levels from P13 onward. Many of the cadherins examined are expressed among neuronal populations that are synaptically connected to each other, like amacrine cells and ganglion cells. Moreover, expression profiles seem to be highest in these populations during

the peak of intraretinal circuit formation (from P13 onward), whereas mRNA signal begins to decrease in other populations at this stage of development. It remains to be studied at the protein level whether arborization and synaptogenesis depend on the homotypic binding of simultaneously expressed cadherin molecules or on a temporally restricted competence of ingrowing axons to interact with multiple adhesion molecules already present in the area, as Petrovic and Hummel [45] proposed. Alternatively, Prakash et al. [46] suggested a "two step process" including rough cadherin-dependent target recognition followed by a more specific cadherin-independent synaptogenesis. The persistence of cadherin expression into adulthood in subsets of cells suggests that cadherins may also help to sustain the proper function of the mature neural retina.

In summary, our findings suggest that cadherins may provide a combinatorial adhesive code that specifies developing retinal cell populations and neural circuits during retinogenesis and in the mature retina [9]. This adhesive code may be based on qualitative as well as quantitative differences in adhesiveness between retinal cells expressing multiple cadherins and other adhesive molecules [28]. The functional role of cadherins in brain development has been studied extensively in the retina and other parts of the CNS (see Background). To relate these functional studies to the present expression data is beyond the scope of this paper.

Comparison between Ferret, Mouse and Chicken

Our results confirm previous studies in other vertebrates [24,25,28,29,40,41], showing that cadherins are subject to a tight temporal and spatial regulation during retinogenesis. In particular, compared to the previously published expression patterns for chicken and mouse retina, we generally found similar expression in developing ferret for most of the cadherins. However, we also noted the following differences.

The prominent expression of PCDH10 mRNA in the GCL sets in significantly later in chicken [25] than in ferret. In the ferret, mRNAs for CDH4, CDH6 and CDH7 are found in the NBL as early as E23 and E30. At comparable stages in the chicken (E5-E8), the same cadherins cannot be detected in the NBL by immunostaining [24,41]. Because a temporal delay between mRNA and protein expression is rarely observed for cadherins in the developing vertebrate nervous system [reviewed in [17]], it is more likely that the expression of the cadherins is differentially regulated in the retina of avian species and mammals. This notion is supported by the finding that CDH4 is intensively expressed by ganglion cells in ferret (this study) and mouse [28] but not in chicken [24,41]. Additionally, an expression of CDH6 is observed at the outer margin of the

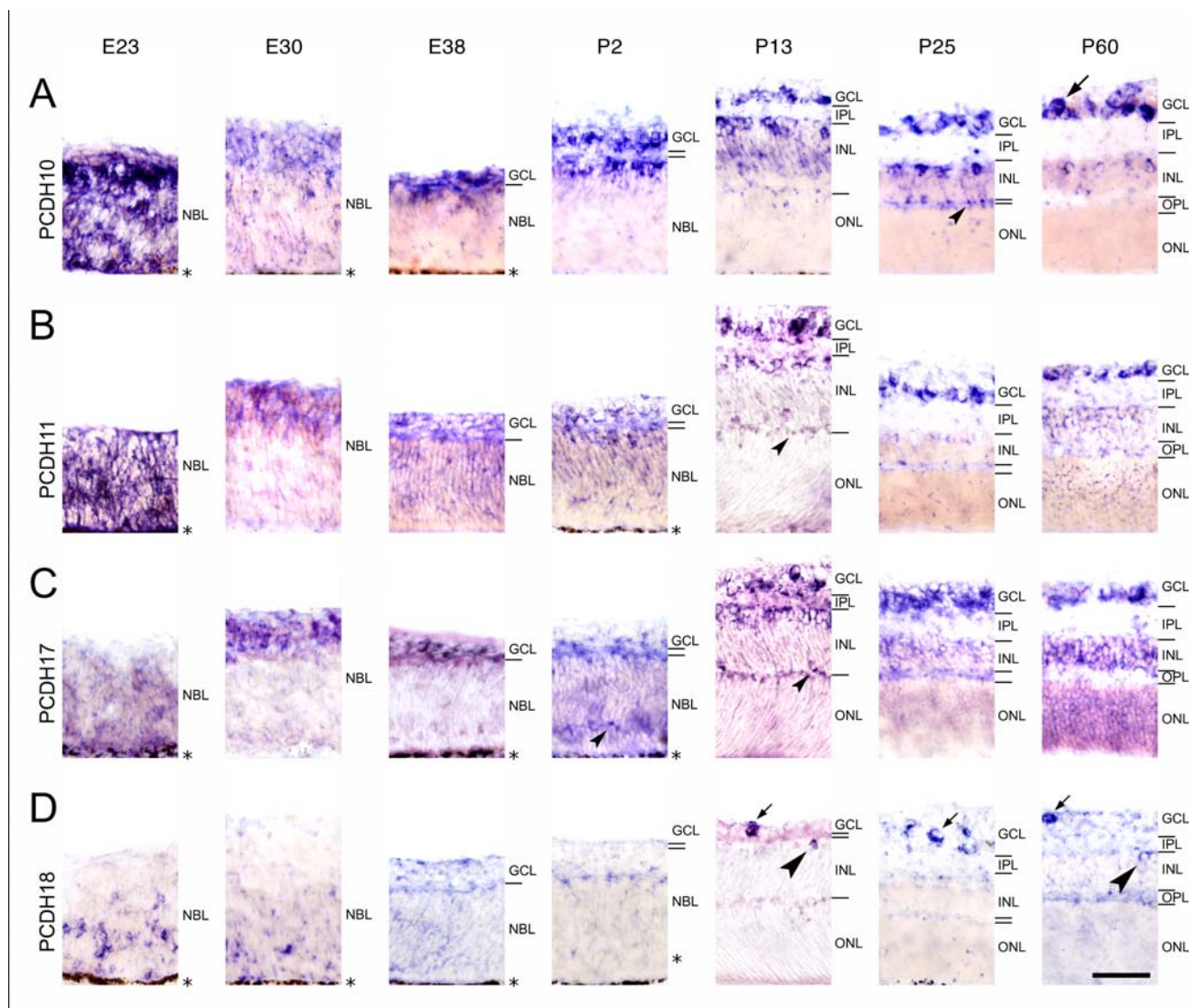


Figure 3
Differential expression of cadherins in central regions of the ferret retina during development. Expression of protocadherin-10 (PCDH10; A), protocadherin-11 (PCDH11; B), protocadherin-17 (PCDH17; C) and protocadherin-18 (PCDH18; D) was mapped with cRNA probes at embryonic day 23 (E23), E30, E38, postnatal day 2 (P2), P13, P25 and at the mature stage (P60). For neuroanatomical orientation, the different layers of the retina are indicated on the right side of each panel. Large arrows point at large ganglion cells (> 15 µm in largest diameter), whereas small arrows point at several cells in the ganglion cell layer (GCL) in D (PCDH18). Large arrowheads point at amacrine cells at the inner margin of the inner nuclear layer (INL), next to the inner plexiform layer (IPL). Small arrowheads point at putative horizontal cells adjacent to the outer plexiform layer (OPL). The outer nuclear layer (ONL) is shown up to the outer limiting membrane and does not include the outer photoreceptor segments after P13. The pigment epithelium next to the neuroblast layer (NBL) is indicated by an asterisk. Scale bar in F, 50 µm, applies to all panels.

INL in chicken [24] but neither in mouse [28] nor in ferret.

An example for differences between ferret and mouse is observed in the INL where CDH4 is expressed in single horizontal and amacrine cells in both the mouse [28] and the ferret, but in the ferret, CDH4 is expressed addition-

ally in the outer zone of Müller cells and bipolar cells. Another example is the expression of CDH8 and CDH11 in a subset of ganglion cells that is prominent in both species at intermediate stages of development; at late stages, however, CDH8 and CDH11 expression by GCL cells is seen in ferret but not in mouse [28]. Moreover, although the early embryonic expression of CDH20 is similar in

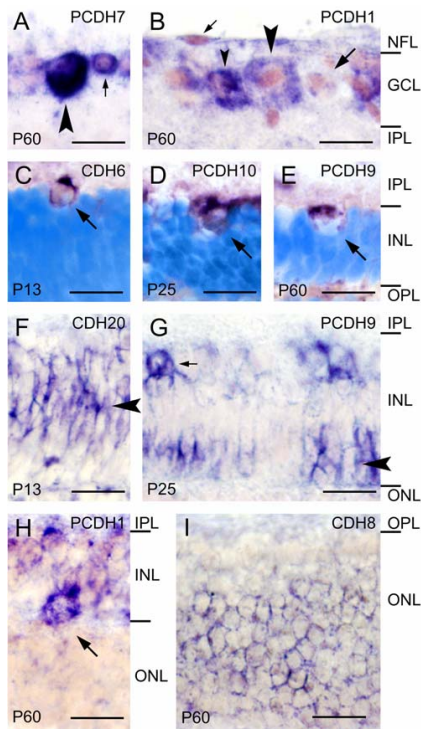


Figure 4
Cell type-specific expression of cadherins revealed by in situ hybridization (dark purple precipitate). A, B: Expression of protocadherin-7 (PCDH7; A) and protocadherin-1 (PCDH1; B) in the ganglion cell layer (GCL) at postnatal day 60 (P60). Note the positive large ganglion cells (large arrowhead in A, 19 μ m diameter; large arrowhead in B, 26 μ m; small arrowhead in B, 20 μ m), a negative large ganglion cell (large arrow in B, 25 μ m), and a positive, putative small ganglion cell (small arrow in A, 11 μ m). The elongated cell in the nerve fiber layer (NFL, small arrow in B) probably represents an astrocyte. Panel B shows the area boxed in Fig. 2C. C-E: Putative displaced ganglion cells adjacent to the inner plexiform layer (IPL; arrows) express cadherin-6 at P13 (CDH6; C), protocadherin-10 at P25 (PCDH10; D), and protocadherin-9 at P60 (PCDH9; E). Cells are identified as ganglion cells based on their large somata (13 μ m, 15 μ m, and 14 μ m, respectively) and nuclei (10 μ m, 11 μ m, and 12 μ m, respectively) and the large gaps occupied by them between neighboring amacrine cells. F, G: Cadherin-20 expression by putative Müller glia at P13 (CDH20, arrowhead in F) and PCDH9 expression by putative bipolar cells (arrowhead in G). The small arrow marks a positive amacrine cell. Panel G shows the area boxed in Fig. 2F. H: A large horizontal cell expressing protocadherin-1 at P60 (PCDH1; arrow). I: Photoreceptor cells throughout most of the outer nuclear layer (ONL) express cadherin-8 at P60 (CDH8; arrowhead). Cell nuclei are shown in light pink color (A, B, F-I) or light blue color (Hoechst nuclear counterstain; C-E). The different layers of the retina are indicated on the right-hand side of each row of panels. Other abbreviations: INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bars are 20 μ m.

Table 3: Size and accession number of the cadherin fragments used for in situ hybridization.

Cadherin	Size (bp)	GenBank number
CDH4	1501	EU665238
CDH6	1824	EU665239
CDH7	1824	EU665240
CDH8	1825	EU665241
CDH11	1110	EU665242
CDH14	1474	EU665243
CDH20	2000	EU665244
PCDH1	1961	EU665245
PCDH7	2326	EU665246
PCDH8	1702	EU665247
PCDH9	1749	EU665248
PCDH10	1860	EU665249
PCDH11	2044	EU665250
PCDH17	2038	EU665251
PCDH18	2351	EU665252

mouse and ferret, this molecule is prominently expressed in the GCL already at embryonic mouse stages [40] while the expression in ferret sets in postnatally at P13.

The observed differences are minor and may relate to species differences in the genetic regulation of retinal morphogenesis. Similar species differences have been described for other morphoregulatory factors [reviewed in [6]]. Overall, the observed general similarities in cadherin expression suggest evolutionarily conserved functions of cadherins in retinal development.

Conclusions

Fifteen classic cadherins and δ -protocadherins were found to be expressed differentially by restricted populations of retinal cells during retinogenesis in the ferret. The observed expression patterns anticipate histogenetic changes that become visible in nuclear or Nissl stainings at later stages. A comparison to previous results in chicken and mouse reveals overall conserved expression patterns of some cadherins but also species differences. The remarkable spatiotemporally restricted fashion of cadherin expression in the developing ferret retina suggests that cadherins provide a combinatorial adhesive code that might specify developing retinal cell populations and intraretinal as well as retinofugal neural circuits during retinogenesis. A more detailed classification of the different cadherin-positive retinal cell classes would require double-labeling with cell type-specific antibodies at the protein level or lineage analysis in transgenic animal models. The expression patterns described in the present work provide a basis for experiments that investigate cadherin-related morphogenetic events during mammalian retinal development.

Methods

Animals and Preparation of Tissues

Ferrets (*Mustela putorius furo*) bred in captivity were purchased from the Federal Institute of Risk Assessment (Berlin-Marienfelde, Germany). Under deep anesthesia by an overdose of intraperitoneal pentobarbital, animals used in this study were quickly decapitated. National and institutional guidelines on the welfare of animals in research were strictly followed. We studied eyes of embryos delivered by cesarean section from timed pregnant ferrets at 23, 30 and 38 days after conception (E23, E30, E38) and post-natal eyes of 2, 13, 25 and 60 days old animals (P2, P13, P25, P60). These stages represent major steps in retinal development. Day of birth was designated as P0. The number of animals used in this study was kept to a minimum necessary to produce reliable data. Efforts were made to minimize animal suffering.

For E23 and E30 embryos, eyes were left in the skull and fixed in situ. From E38 onward, eyes were enucleated for fixation. From P2 onward, the lens was removed from the eye to allow for better penetration of the fixative. Specimens were immersed overnight in ice-cold 4% formaldehyde dissolved in phosphate-buffered salt solution (PBS; 13 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄; pH 7.4). After incubation in a graded series of sucrose solutions (12%, 15% and 18%) for cryoprotection, specimen were embedded in Tissue Tek (Science Services, Munich, Germany), frozen in liquid N₂ and stored at -80°C.

Consecutive series of 20 µm-thick sections were cut in a microtome-cryostat (HM 560 Cryo-Star, Microtome International, Walldorf, Germany). They were directly thawed onto SuperFrost Plus slide glasses (Menzel, Braunschweig, Germany) and dried at 50°C. In total, sections through the eyes were cut from 3 whole embryos (E23), 3 embryonic heads (E30) and 14 enucleated eyes (E38 to P60, 2-4 eyes per stage).

cRNA Probe Synthesis

Digoxigenin-labeled antisense cRNA probes were synthesized for 7 classic cadherins and 8 δ-protocadherins, as described by Krishna et al. [42]. The complementary DNA fragments of 1.1 to 3 kb length used for probe synthesis are listed in Table 3. After linearized plasmids were transcribed with T7 or SP6 RNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA), we used the DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) to generate digoxigenin-labeled sense and antisense probes. Probes were purified by LiCl/EtOH precipitation or by using Quick Spin Columns (Roche Diagnostics). Probe size was verified by formaldehyde agarose gel electrophoresis.

In Situ Hybridization

In situ hybridization was performed according to a previously published protocol [47]. In brief, we postfixed cryo-

stat sections with 4% formaldehyde in PBS at 4°C. For better probe penetration, sections were pretreated with 1 µg/ml proteinase K (Sigma, Steinheim, Germany) in 100 mM Tris (pH 8.0), 50 mM EDTA for 5 minutes and with 0.25% acetic anhydride in triethanolamine buffer. Sense and antisense cRNA probes at a concentration of about 1.5 ng/µl in hybridization buffer (50% formamide, 10 mM EDTA, 3× SSC, 1× Denhardt's solution, 10× dextran sulfate, 42 µg/ml yeast RNA, 42 µg/ml salmon sperm DNA) were applied to the sections and hybridized overnight at 70°C in a humid chamber. After several washing steps and RNase A treatment (20 µg/ml in NTE buffer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5 mM NaCl, pH 8.0]), alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin Fab fragments (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) were applied overnight at 4°C. Sections were washed and reacted with a substrate mixture of nitroblue tetrazolium salt (NBT; 75 mg/ml) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP; 50 mg/ml) in alkaline buffer for 1-3 days at 4°C or at room temperature, until enough reaction product had formed. Sections were mounted in Entellan (Merck, Whitehouse Station, New Jersey). For nuclear counterstaining, some sections were stained with Hoechst 33342 (Sigma) in PBS and mounted in Mowiol (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The in situ hybridization procedure was performed up to 5 times for each probe and stage to verify the results.

All sections were examined under a light transmission/fluorescence microscope (BX40, Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a digital camera (DP70, Olympus, Hamburg, Germany). Finally, selected areas of interest were cropped from the photomicrographs and adjusted in contrast, brightness and tonal value with the gimp software (GNU Image Manipulation Program, under auspices of the GNOME project) and Photoshop software (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) for optimal display of staining patterns. Overlays of nuclear counterstaining and in situ data were generated.

Retinal cell types were identified on the basis of their radial position, morphology and embedding between neighboring cells. For determination of cell soma size of large CDH6-positive amacrine cells (see below), the largest diameter of 10 of these cells was measured at P13 and at P60, respectively. Cell soma as well as nucleus size of 5 displaced ganglion cells positive for several cadherins were measured at P13 and P60, respectively.

Authors' contributions

JE carried out the experiments, analyzed and documented the results and wrote the first draft of the manuscript. KK participated in the design of the study, performed the cRNA probe synthesis, carried out some of the in situ hybridizations and assisted in writing the manuscript. CR

designed the study, supervised the project at all stages and edited the manuscript.

Acknowledgements

Sponsor/grant information: Interdisciplinary Clinical Research Center of the University of Jena (IZKF Jena, TP I.16). The authors thank Dr. Dieter Wolff and Dr. Stefanie Banneke, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, for kindly providing ferrets. Ms. Jessica Heyder, Ms. Silke Schreiber and Ms. Nicole Mergel provided expert technical support, and Ms. Nicole Hertel and Dr. Juntang Lin made helpful suggestions.

References

- Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N: **Cellular organization of the vertebrate retina.** *Prog Brain Res* 2001, **131**:3-26.
- Wässle H, Boycott BB: **Functional architecture of the mammalian retina.** *Physiol Rev* 1991, **71**:447-480.
- Morgan J, Huckfeldt R, Wong RO: **Imaging techniques in retinal research.** *Exp Eye Res* 2005, **80**:297-306.
- Mey J, Thanos S: **Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis.** *Brain Res Brain Res Rev* 2000, **32**:343-379.
- Zhang SS, Fu XY, Barnstable CJ: **Molecular aspects of vertebrate retinal development.** *Mol Neurobiol* 2002, **26**:137-152.
- Fuhrmann S, Chow L, Reh TA: **Molecular control of cell diversification in the vertebrate retina.** *Results Probl Cell Differ* 2000, **31**:69-91.
- Hulpiau P, van Roy F: **Molecular evolution of the cadherin superfamily.** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**:349-369.
- Nollet F, Kools P, van Roy F: **Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members.** *J Mol Biol* 2000, **299**:551-572.
- Redies C, Takeichi M: **Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions.** *Dev Biol* 1996, **180**:413-423.
- Hirano S, Suzuki ST, Redies C: **The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules.** *Front Biosci* 2003, **8**:d306-355.
- Takeichi M: **The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions.** *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:11-20.
- Gumbiner BM: **Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:622-634.
- Halbleib JM, Nelson WJ: **Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis.** *Genes Dev* 2006, **20**:3199-3214.
- Frank M, Kemler R: **Protocadherins.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**:557-562.
- Vanhalst K, Kools P, Staes K, van Roy F, Redies C: **delta-Protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:1247-1259.
- Redies C, Vanhalst K, Roy F: **delta-Protocadherins: unique structures and functions.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:2840-2852.
- Redies C: **Cadherins in the central nervous system.** *Prog Neurobiol* 2000, **61**:611-648.
- Huntley GW, Gil O, Bozdagi O: **The cadherin family of cell adhesion molecules: multiple roles in synaptic plasticity.** *Neuroscientist* 2002, **8**:221-233.
- Kremer H, van Wijk E, Marker T, Wolfrum U, Roepman R: **Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**(Spec No 2):262-270.
- Junghans D, Heidenreich M, Hack I, Taylor V, Frotscher M, Kemler R: **Postsynaptic and differential localization to neuronal subtypes of protocadherin beta16 in the mammalian central nervous system.** *Eur J Neurosci* 2008, **27**:559-571.
- Shimomura Y, Wajid M, Shapiro L, Christiano AM: **P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle.** *Development* 2008, **135**:743-753.
- Van Aken EH, Papeleu P, De Potter P, Bruyneel E, Philippe J, Seregard S, Kvant A, De Laey JJ, Mareel MM: **Structure and function of the N-cadherin/catenin complex in retinoblastoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, **43**:595-602.
- Marchong MN, Chen D, Corson TW, Lee C, Harmandayan M, Bowles E, Chen N, Gallie BL: **Minimal 16q genomic loss implicates cadherin-11 in retinoblastoma.** *Mol Cancer Res* 2004, **2**:495-503.
- Wöhrn JC, Puelles L, Nakagawa S, Takeichi M, Redies C: **Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo.** *J Comp Neurol* 1998, **396**:20-38.
- Müller K, Hirano S, Puelles L, Redies C: **OL-protocadherin expression in the visual system of the chicken embryo.** *J Comp Neurol* 2004, **470**:240-255.
- Faulkner-Jones BE, Godinho LN, Tan SS: **Multiple cadherin mRNA expression and developmental regulation of a novel cadherin in the developing mouse eye.** *Exp Neurol* 1999, **156**:316-325.
- Kools P, van Imschoot G, van Roy F: **Characterization of three novel human cadherin genes (CDH7, CDH19, and CDH20) clustered on chromosome 18q22-q23 and with high homology to chicken cadherin-7.** *Genomics* 2000, **68**:283-295.
- Honjo M, Tanihara H, Suzuki S, Tanaka T, Honda Y, Takeichi M: **Differential expression of cadherin adhesion receptors in neural retina of the postnatal mouse.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**:546-551.
- Xu L, Overbeek PA, Reneker LW: **Systematic analysis of E-, N- and P-cadherin expression in mouse eye development.** *Exp Eye Res* 2002, **74**:753-760.
- Jackson CA, Hickey TL: **Use of ferrets in studies of the visual system.** *Lab Anim Sci* 1985, **35**:211-215.
- Vitek DJ, Schall JD, Leventhal AG: **Morphology, central projections, and dendritic field orientation of retinal ganglion cells in the ferret.** *J Comp Neurol* 1985, **241**:1-11.
- Greiner JV, Weidman TA: **Histogenesis of the ferret retina.** *Exp Eye Res* 1981, **33**:315-332.
- Weidman TA, Greiner JV: **Histology of the ferret retina.** *Anat Anz* 1984, **157**:329-341.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM: **Timing and topography of cell genesis in the rat retina.** *J Comp Neurol* 2004, **474**:304-324.
- Reese BE, Johnson PT, Baker GE: **Maturation gradients in the retina of the ferret.** *J Comp Neurol* 1996, **375**:252-273.
- Henderson Z, Finlay BL, Wikler KC: **Development of ganglion cell topography in ferret retina.** *J Neurosci* 1988, **8**:1194-1205.
- Miller ED, Tran MN, Wong GK, Oakley DM, Wong RO: **Morphological differentiation of bipolar cells in the ferret retina.** *Vis Neurosci* 1999, **16**:1133-1144.
- Keyser KT, Karten HJ, Katz B, Bohn MC: **Catecholaminergic horizontal and amacrine cells in the ferret retina.** *J Neurosci* 1987, **7**:3996-4004.
- Prada C, Medina JI, Lopez R, Genis-Galvez JM, Prada FA: **Development of retinal displaced ganglion cells in the chick: neurogenesis and morphogenesis.** *J Neurosci* 1992, **12**:3781-3788.
- Faulkner-Jones BE, Godinho LN, Reese BE, Pasquini GF, Ruefli A, Tan SS: **Cloning and expression of mouse Cadherin-7, a type-II cadherin isolated from the developing eye.** *Mol Cell Neurosci* 1999, **14**:1-16.
- Inuzuka H, Miyatani S, Takeichi M: **R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina.** *Neuron* 1991, **7**:69-79.
- Krishna K, Nuernberger M, Weth F, Redies C: **Layer-specific expression of multiple cadherins in the developing visual cortex (VI) of the ferret.** *Cereb Cortex* 2009, **19**:388-401.
- Tanabe K, Takeichi M, Nakagawa S: **Identification of a nonchordate-type classic cadherin in vertebrates: chicken Hz-cadherin is expressed in horizontal cells of the neural retina and contains a nonchordate-specific domain complex.** *Dev Dyn* 2004, **229**:899-906.
- Rattner A, Smallwood PM, Williams J, Cooke C, Savchenko A, Lyubarsky A, Pugh EN, Nathans J: **A photoreceptor-specific cadherin is essential for the structural integrity of the outer segment and for photoreceptor survival.** *Neuron* 2001, **32**:775-786.
- Petrovic M, Hummel T: **Temporal identity in axonal target layer recognition.** *Nature* 2008, **456**:800-803.
- Prakash S, Caldwell JC, Eberl DF, Clandinin TR: **Drosophila N-cadherin mediates an attractive interaction between photoreceptor axons and their targets.** *Nat Neurosci* 2005, **8**:443-450.
- Redies C, Engelhart K, Takeichi M: **Differential expression of N- and R-cadherin in functional neuronal systems and other structures of the developing chicken brain.** *J Comp Neurol* 1993, **333**:398-416.

4 DISKUSSION

Mit der vorliegenden Arbeit wird erstmals seit der Entdeckung der Cadherine vor fast 30 Jahren ihre Expression in der Retina des Frettchens analysiert. In der sich entwickelnden Retina eines Wirbeltieres werden CDH14, PCDH1, PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDH17 und PCDH18 gar zum ersten Mal dargestellt. Im Gegensatz zu vorherigen Studien der Cadherin-Expression in diversen Wirbeltierspezies (Inuzuka et al. 1991, Wöhrn et al. 1998, Faulkner-Jones et al. 1999b, Honjo et al. 2000, Xu et al. 2002, Müller et al. 2004) kartierte ich mehr als ein Dutzend klassischer Cadherine und δ -Protocadherine im Detail über die gesamte Spanne der Retinogenese bis hin zum adulten Tier (siehe Kapitel 4.2). Damit wird dem Ziel der Arbeitsgruppe von Christoph Redies Rechnung getragen, die Expression diverser Cadherine im sich entwickelnden ZNS und ihre Rolle während der Neurogenese zu untersuchen. Insbesondere wird damit die Erforschung der ZNS-Entwicklung im Modelltier Frettchen bereichert. Die Ergebnisse bestätigen und erweitern vergleichbare Studien in anderen Spezies dahingehend, dass sich für die Expression eines jedes der 15 untersuchten Cadherine ein einzigartiges räumlich-zeitliches Muster zeigt. Trotz wohl konservierter Eigenschaften gibt es aber Unterschiede zwischen den Spezies (siehe Kapitel 4.3). Schließlich wird mit der Kartierung der vorliegenden 15 Cadherine ein wichtiger Beitrag zur Erforschung der Retinogenese geleistet (siehe Kapitel 4.2). Es wurde bisher kaum beachtet, dass die analysierten Cadherine in der Retina morphoregulatorische Schlüsselpositionen einnehmen könnten (siehe Kapitel 4.4). Damit ist ein Grundstein für eine intensivere funktionelle Erforschung der Cadherine gelegt. Weiterführende Forschung auf der synaptischen und der zellulären Ebene wird eventuell Klarheit bringen.

4.1 Kritische Betrachtung der Methodik

Das Pigmentepithel ist nicht in allen Abbildungen sichtbar, da sich in einigen Fällen die Netzhaut infolge der Fixation ablöste. In anderen Fällen wurden Albinotiere benutzt. Doch die hier vorliegende Analyse beschränkt sich auf die Betrachtung der Neuroretina. Abbildungen nach P13 zeigen die Neuroretina überdies ohne die Außensegmente der Photorezeptoren, da in diesen generell

keine mRNA detektierbar ist. Des Weiteren verzichtete ich bewusst auf die Betrachtung von Blutgefäßen, Astrozyten und Mikroglia, da eine Analyse dieser Zelltypen den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte (Provis et al. 1996, Kopatz und Distler 2000).

Die Verwendung einiger Albinotiere könnte sich auf die Expressionsmuster auswirken. Morgan et al. (1987) zeigten, dass die Projektionsbahnen von Ganglienzellen bei Albinos anders kreuzen und also ihre nasotemporale Verteilung auch bezüglich der Zellgröße vom pigmentierten Typ abweicht. Dies könnte eventuell einen Einfluss auf die Expression der Cadherine bei diesen Tieren haben. Um diese Verzerrung weitgehend auszuschließen, habe ich mehrfache Untersuchungen in unterschiedlichen Tieren durchgeführt. Sie kamen zu gleichen Expressionsmustern. Weitere Unterschiede in der Verteilung der Ganglienzellen wurden aufgrund dorsoventraler, centroperipherer sowie entwicklungsbedingter Gradienten über die Retina beschrieben (Vitek et al. 1985, Henderson et al. 1988, Reese et al. 1996, Müller et al. 2004). Unveröffentlichte Untersuchungen (Etzrodt und Redies) ergaben keine generellen Unterschiede der Cadherin-Expressionsmuster zwischen zentralen und peripheren Bereichen, mit Ausnahme des extremen Randbereiches der Retina. Eine detaillierte Klassifikation und eine quantitative Analyse der verschiedenen Cadherine exprimierenden retinalen Zell(-sub-)typen würde weitaus anspruchsvollere Methoden benötigen und sollte Zielsetzung für anschließende Projekte sein. Mit der In-situ-Hybridisierung beschränkte ich mich in der vorliegenden Studie bewusst auf die Darstellung der Cadherin-exprimierenden Zellkörper und analysierte diese morphologisch und aufgrund ihrer relative Position in den Schichten der Retina. Die Kombination der Ergebnisse mit Cadherin-Antikörpern und zellsubpopulationsspezifischen Markern oder Abstammungsanalysen in transgenen Tiermodellen wird in Zukunft definitive Aussagen über die unten diskutierten Eigenschaften und Funktionen liefern.

4.2 Retinale Expressionsmuster der Cadherine

Von den 15 in der Retina untersuchten Cadherinen zeigt jedes ein einzigartiges und dynamisches Expressionsmuster. Die untersuchten Subtypen sind im Frettschen auch in anderen Hirnregionen, auch außerhalb des visuellen Systems

anzutreffen (Krishna et al. 2009, Krishna und Redies - nicht publizierte Daten). Die weit verbreitete, aber regional spezifische Expression steht im Einklang mit den ubiquitären Funktionen der Cadherine im ZNS (siehe Kapitel 1.1.6 sowie 4.4). Obwohl jeder Cadherin-Subtyp eine spezifische, räumlich und zeitlich streng eingeschränkte Expression zeigt, können doch viele Ähnlichkeiten und Überlappungen zwischen den Cadherinen beobachtet werden. Jedes Cadherin ist in bestimmten Populationen von retinalen Zellen anzutreffen, wobei oftmals (nicht näher zu definierende) Teil- beziehungsweise Subpopulationen ausgemacht werden können. Es ist nun die Kombination der Expressionsmuster, die jede Zellpopulation während ihrer Entwicklung kennzeichnet. Kein retinaler Zelltyp scheint dabei ausgeschlossen. Eine Expression eines Cadherins nur in einem einzigen Zelltyp, wie bei dem Horizontalzellcadherin (cHZ-cadherin; Tanabe et al. 2004) oder dem Photorezeptor-spezifischen PCDH21 (prCAD; Rattner et al. 2001), konnte bei den vorliegenden Cadherin-Subtypen nicht erkannt werden.

Interessanter Weise ist die Expression der Cadherine besonders in sich entwickelnden Zellpopulationen nachzuweisen. Zum einen fallen Veränderungen in der Cadherinexpression mit bestimmten Schritten der neuronalen Entwicklung zusammen, zum anderen werden Entwicklungsschritte sogar antizipiert. Bevor migrierende Zellpopulationen und sich bildende Schichten in Kernfärbungen sichtbar werden, nehmen zum Teil Veränderungen im kombinatorischen Expressionsmuster der Region diesen Schritt vorweg. Die Einleitung der Entwicklungsschritte durch einen Wechsel der Cadherinexpression wird besonders zu Zeitpunkten tief greifender Veränderung deutlich. Zum Beispiel geht bereits die initiale Neurogenese mit einer differentiellen Cadherinexpression einher und es wird während der Embryonalstadien E23 und E30 die äußerste, proliferative Zone der Neuroblastenschicht von einigen Cadherinen markiert (CDH4, CDH7, CDH20, PCDH1), während viele andere Cadherine schon die zukünftige Schicht der Ganglienzellen und die Unterschicht der amakrinen Zellen andeuten. Spätestens ab den großen Umgestaltungen in der zweiten postnatalen Entwicklungswoche erkennt man deutlich die zellspezifische Expression der Cadherine. Da die Zellen der Wirbeltier-Retina in Schichten angeordnet sind, ergibt sich bis zum adulten Tier ein schichtspezifisches

Expressionsmuster. Eine ähnliche schichtspezifische Expression wurde schon im visuellen Kortex des Frettchens gefunden (Krishna et al. 2009).

Die kombinierten Expressionsmuster der Cadherine können also als Marker für bestimmte Zellpopulationen beziehungsweise Subpopulationen und Schichten angesehen werden. Auf diese Weise wird der Begriff vom kombinatorischen, adhäsiven Code verständlich, der die Neurogenese des ZNS über Cadherine regulieren könnte (Redies 2000).

4.2.1 Ganglienzellen

Viele Cadherine werden während der gesamten Retinogenese stark von Ganglienzellen exprimiert. Schon vor der Separierung der Ganglienzellschicht markieren Cadherine wie PCDH9 fast ausschließlich die innersten Zellschichten. Auffallend ist aber auch gerade das Fehlen von Signal zum Beispiel für CDH20 im Bereich der zukünftigen Ganglienzellschicht. In der reifen Retina hingegen sind fast alle untersuchten Cadherine in gewissen Teilpopulationen von Ganglienzellen vertreten. Wahrscheinlich kennzeichnen alle Cadherine auch große Ganglienzellen ($> 15 \mu\text{m}$), während CDH6 und CDH20 hauptsächlich in kleinen Zellen der Ganglienzellschicht exprimiert sind. Nach Vitek (1985) sollten also alle von mir untersuchten Cadherine Zellen markieren, die den so genannten α -Ganglienzellen der Katze entsprechen. Ähnlich wie im Primaten könnten CDH6 und CDH20 hingegen ein anderes funktionelles System mit kleineren Ganglienzellen markieren (Kaplan und Benardete 2001). Ob dies tatsächlich (kleine) Ganglienzellen oder aber invertierte amakrine Zellen oder Gliazellen sind, bleibt noch zu untersuchen. Ebenso war nicht zu klären, ob die unterschiedlich markierten Untergruppen von Ganglienzellen bekannten funktionalen Subtypen entsprechen.

Ab der zweiten Postnatalwoche findet sich Cadherinexpression in der Population der verlagerten Ganglienzellen. Obwohl diese Zellen vor allem in frühen Stadien leicht mit großen amakrinen Zellen verwechselt werden können, lassen sie sich anhand ihrer spärlichen Verteilung, ihrer Größe sowie des von ihnen eingenommenen Raumes in der Schicht der kleineren, amakrinen Zellen identifizieren. Wie Wöhrn et al. (1998) schon für CDH6 und CDH7 im Huhn gezeigt hat, tragen also vermutlich auch PCDH1, PCDH7, PCDH9 und PCDH10 zu Projektionen verlagelter Ganglienzellen ins akzessorische visuelle System

bei. Dessen ungeachtet kann die Expression weitere Cadherine in dieser Zellart nicht ausgeschlossen werden und so genannte kleine verlagerte Ganglienzellen auch übersehen worden sein (für Vogel: siehe zum Beispiel Heaton et al. 1979, Fite et al. 1981).

4.2.2 Amakrine Zellen

Ein weiterer retinaler Zelltyp, der zahlreiche Cadherine während der gesamten Entwicklung exprimiert, ist die amakrine Zelle. Die meisten Cadherine sind in Subpopulationen vermutlicher amakriner Zellen ab E38 zu finden. Ab diesem Stadium ist eine Identifizierung aufgrund ihrer relativen Lokalisation gut möglich. Interessanterweise endet die Expression von einigen Cadherinen (CDH4, CDH8, CDH11, PCDH8) nach P13, während die von CDH20 erst beginnt. Zu diesem Zeitpunkt sind fast alle amakrinen Zellen ausdifferenziert (Greiner und Weidman 1981, für Ratte: siehe Rapaport et al. 2004). CDH14 markiert einzelne amakrine Zellen nur schwach, vorübergehend um P13.

Zahlreiche Zellen, die sich am inneren Rand der Inneren Körnerschicht befinden und einen größeren Zellkörper besitzen, exprimieren CDH6. Diese Zellen stellen wahrscheinlich einen Subtyp von großen amakrinen Zellen dar, denn sie sind nur von mittlerer Größe, häufiger anzutreffen und liegen eng beieinander. Dies könnten Typ I TH-positive dopaminerge amakrine Zellen sein, die im Frettchen von Eglén et al. (2003) als im Durchschnitt fast 13 µm groß beschrieben wurden. Interessant ist die Tatsache, dass Honjo et al. (2000) gezeigt haben, dass CDH6-exprimierende amakrine Zellen hauptsächlich cholinerg, aber gelegentlich TH-positiv und daher dopaminerg sind. Diese Ergebnisse würden mit meinen Beobachtungen zu CDH6 übereinstimmen. Trotz allem ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Zellen aufgrund ihres großen Zellkörpers einige verlagerte Ganglienzellen mit einschließen.

4.2.3 Bipolarzellen und Müller-Zellen

Diese beiden Zelltypen können allein aufgrund ihrer Morphologie nicht unterschieden werden. Beide haben während ihrer Entwicklung einen elongierten Zellkörper. Doch mit dem Erscheinen der Inneren Körnerschicht, etwa um P2, nehmen sie unterschiedliche radiale Positionen ein und scheinen eine unterschiedliche Cadherinexpression zu haben. Zum Beispiel markiert CDH20

einen breiten Bereich in der Mitte der Inneren Körnerschicht, wo hauptsächlich Müller-Zellen liegen (für Kaninchen: siehe Strettoi und Masland 1995, für Maus: siehe Jeon et al. 1998). PCDH9 hingegen ist zum Beispiel deutlich im äußeren Bereich der Inneren Körnerschicht zu finden, der überwiegend Bipolarzellen enthält (Miller et al. 1999). Die Stärke der Cadherinexpression scheint auch hier nach der Differenzierung dieser beiden Zelltypen in der zweiten Postnatalwoche abzunehmen.

4.2.4 Horizontalzellen

Ab der Geburt exprimieren einige relativ große, einzelne Zellen PCDH1, PCDH9 und PCDH17 am äußeren Rand der Neuroblastenschicht, wo sich die zukünftigen Horizontalzellen entwickeln. Schon pränatal wird CDH7 von einigen auffälligen Zellen exprimiert, die aufgrund ihrer relativen Position und ihrer Verteilung ebenso als sich entwickelnde Horizontalzellen angesehen werden.

Horizontalzellen, die eines der anderen Cadherine exprimieren, konnten nicht klar identifiziert werden. Um P13 erscheint für einige Cadherine (CDH4, CDH8, PCDH10 und PCDH11) Signal am äußeren Rand der Inneren Körnerschicht. Es ist durchaus möglich, dass dieses Signal mit Horizontalzellen oder nur ihren proximalen Fortsätzen assoziiert ist. Dieses Signal ist nach dem Zeitpunkt der Augenöffnung, wenn Horizontalzellen ausdifferenziert sind, kaum mehr zu finden.

4.2.5 Photorezeptorzellen

Zukünftige Photorezeptoren, die ab den Stadien E38 und P2 die zukünftige äußere Körnerschicht in den äußersten Zellreihen der Neuroblastenschicht bilden, exprimieren kaum eines der untersuchten Cadherine. Sehr deutlich ist die Differenz zur restlichen Neuroblastenschicht zum Beispiel anhand des Expressionsmusters von CDH7. Vorübergehend exprimiert aber die äußere Körnerschicht CDH7 um P13, wenn die Außensegmente der Photorezeptoren auszuwachsen beginnen. Im adulten Tier, nach der enormen Elongation der Außensegmente im Zuge der Augenöffnung (Greiner und Weidman 1981), exprimiert die äußere Körnerschicht wieder nur einige wenige Cadherine (CDH8, CDH20, PCDH11, PCDH17).

Insgesamt gesehen unterstützen diese Erkenntnisse das hypothetische Modell eines kombinatorischen, adhäsiven Cadherinbasierten Codes, der die sich entwickelnden retinalen Zellpopulationen durch die differentielle Expression verschiedener Cadherine spezifiziert. Dieser adhäsive Code könnte auf qualitativen wie auf quantitativen Unterschieden der Bindung zwischen diversen Cadherinen und anderen Adhäsionsmolekülen beruhen, die von den verschiedenen retinalen Zelltypen exprimiert werden (Redies und Takeichi 1996, Honjo et al. 2000, Redies 2000).

4.3 Interspeziesvergleich Frettchen – Maus – Huhn

Vergleicht man die retinalen Expressionsmuster im Frettchen mit Arbeiten in der Maus und im Huhn (siehe Kapitel 1.2.2) kann man, generell betrachtet, von ähnlichen Ergebnissen sprechen. Es ergaben sich jedoch auch diskrete Auffälligkeiten im Vergleich zu Maus und Huhn.

Die prominente Expression von PCDH10 in der Ganglienzellschicht sowie die Expression von CDH4, CDH6 und CDH7 in der Neuroblastenschicht beginnt im Frettchen (diese Studie) deutlich früher als im Huhn (Inuzuka et al. 1991, Wöhrn et al. 1998, Müller et al. 2004). Da eine relevante zeitliche Verzögerung zwischen dem Erscheinen der mRNA und der Expression des Proteins für Cadherine im Wirbeltier-ZNS kaum beobachtet wird (siehe zum Beispiel Honjo et al. 2000, Redies 2000), ist es wahrscheinlich, dass die Expression der Cadherine in Vögeln und Säugetieren unterschiedlich gestaltet ist. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, dass CDH4 in Ganglienzellen des Frettchens (diese Studie) und der Maus (Honjo et al. 2000) prominent exprimiert wird, aber nicht im Huhn (Inuzuka et al. 1991, Wöhrn et al. 1998). Des weiteren konnte im Huhn eine Expression von CDH6 am äußeren Rand der Inneren Körnerschicht gefunden werden (Wöhrn et al. 1998), wohingegen Horizontalzellen CDH6 weder in der Maus (Honjo et al. 2000) noch im Frettchen (diese Studie) aufweisen.

Bezüglich des Ortes und des Zeitpunktes der Cadherinexpression bestehen aber darüber hinaus auch Unterschiede zwischen Frettchen (diese Studie) und Maus (Faulkner-Jones et al. 1999b, Honjo et al. 2000). Zum Beispiel ist CDH4 im Frettchen zusätzlich in der Zone der Müller-Zellen und der Bipolarzellen

exprimiert. CDH8 und CDH11 kann in Ganglienzellen zu späteren Stadien ausschließlich im Frettchen, nicht mehr in der Maus gesehen werden. Dafür beginnt die Expression von CDH20 in der Ganglienzellschicht im Frettchen deutlich später als in der Maus, nämlich erst zu P13.

Die beobachteten Unterschiede sind im Allgemeinen gering und könnten auf Speziesunterschieden in der genetischen Regulation der retinalen Morphogenese beruhen, wie es auch für andere morphoregulatorische Faktoren beschrieben wurde (Fuhrmann et al. 2000). Alles in allem betrachtet, lassen die beobachteten Ähnlichkeiten in der Cadherinexpression auf evolutionär konservierte Funktionen der Cadherine in der retinalen Entwicklung schließen.

4.4 Mögliche Funktionen der Cadherine in der Retinogenese

4.4.1 Zelldifferenzierung, Zellmigration und Schichtbildung

Zahlreiche Funktionsverluststudien belegen eine Mitwirkung der klassischen Cadherine in der Proliferation, Differenzierung, Migration und Schichtbildung von retinalen Zellen (Erdmann et al. 2003, Masai et al. 2003, Babb et al. 2005, Ruan et al. 2006, Liu et al. 2008). Andere Cadherine, wie das δ -Protocadherin PCDH19, γ -Protocadherine, β -Protocadherine (insbesondere PCDH β 16), Fat, Dachous und Flamingo sind ebenso an der Histogenese der Retina beteiligt (Das et al. 2002, Hirano et al. 2002, Rawls et al. 2002, Lee et al. 2003, Gaitan und Bouchard 2006, Junghans et al. 2008, Lefebvre et al. 2008). In Übereinstimmung mit diesen Funktionen ist die Expression der hier untersuchten Cadherine in der Zeit größter histologischer Veränderungen, bis zur zweiten postnatalen Woche, stark ausgeprägt und weit verbreitet. Der mögliche Cadherinbasierte adhäsive Code scheint somit einen wichtigen Beitrag zur Morphogenese der Retina leisten zu können (siehe Kapitel 1.1.6 und 4.2).

4.4.2 Aussprossung, Wegfindung und Zielerkennung von Axonen

Neben den allgemeinen Funktionen der Cadherine für die neuronale Konnektivität (siehe Kapitel 1.1.6) konnte beispielsweise CDH2, CDH4 und PCDH7 als essentiell für die Entwicklung von retinalen Axonen dargestellt werden (Riehl et al. 1996, Inoue und Sanes 1997, Babb et al. 2005, Piper et al. 2008). Die Gruppe um Redies hat durch ihre deskriptiven Studien die Korrelation von CDH6- und

CDH7-positiven retinofugalen Axonen verlagertes Ganglienzellen und Neurone des akzessorischen optischen Systems gezeigt (Wöhrn et al. 1998). Auf ähnliche Art und Weise demonstrierten Müller et al. (2004) die Assoziation von bestimmten retinofugalen und retinopetalen Projektionsneuronen mit PCDH10. Passend zu dieser Datenlage zeigen die untersuchten Cadherine eine fortwährend hohe Expression in der Periode der Bildung neuronaler Netzwerke. Zum Beispiel exprimieren Ganglienzellen zahlreiche Cadherine in hohem Maße nach der Formierung der retinalen Zellverbände, ab P13.

Andere Funktionsverluststudien legen nahe, dass CDH1, CDH2 und CDH4 insbesondere für die Ausbildung intraretinaler neuraler Netzwerke benötigt werden (Masai et al. 2003, Tanabe et al. 2006, Yonekura et al. 2007). Beachtenswert sind die Gemeinsamkeiten von funktional verbundenen retinalen Zellen wie den amakrinen Zellen und den Ganglienzellen in der Expression bestimmter Cadherine. Beide exprimieren zu ungefähr gleichen Zeiten die gleichen Cadherine – und dies am prominentesten während der Spitze der intraretinalen Netzwerkbildung, nach der zweiten postnatalen Woche. Ein Beitrag des cadherinbasierten, adhäsiven Codes zu den funktionellen Neuronenkreisen der Retina, die einen kontrollierten Informationsfluss zwischen verschiedenen Zellpopulationen ermöglichen, wäre also denkbar. Aussagen über die Cadherinexpression an den Synapsen verwehren sich natürlich aufgrund der gewählten Methodik (siehe Kapitel 4.1).

Es bleibt zu erforschen, ob Arborisation und Synaptogenese durch Cadherine reguliert werden, die sowohl von einwachsenden Axonen als auch von deren Zielen exprimiert werden, wie die homophile Bindung und ihre spezifische Expression nahelegen. Petrovic und Hummel (2008) schlugen alternativ vor, dass einwachsende Axone eine vorübergehende Kompetenz besitzen könnten, mit zahlreichen in der Zielregion ständig vorhandenen Adhäsionsmolekülen zu interagieren. Prakash et al. (2005) haben hingegen einen zweischrittigen Prozess vorgeschlagen – mit einer Cadherin-abhängigen groben Zielerkennung und einer spezifischen, Cadherin-unabhängigen Synaptogenese.

4.4.3 Synaptische Plastizität

Cadherine scheinen ebenso essentiell für die Entwicklung der Neuroretina wie für deren Funktion im reifen Auge zu sein. Diese These basiert auf der erst vor

einigen Jahren beschriebenen Rolle der Cadherine in der Synaptogenese und synaptischen Plastizität (Huntley et al. 2002, Takeichi und Abe 2005, Takeichi 2007). In Einklang mit dieser These persistiert die Expression aller untersuchten Cadherine in der Neuroretina des Frettchens nach der Augenöffnung in einigen Subpopulationen bis zum adulten Tier.

4.4.4 Neuron-Glia Interaktion

Drazba and Lemmon (1990) beschrieben, dass CDH2 die Interaktion zwischen retinalen Axonen und Müller-Glia vermittelt. CDH3 und CDH4 werden von Gliazellen des Nervus opticus exprimiert (Gerhardt et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit fanden sich einige Cadherine in der Schicht der Müller-Zellen. Ob diese Cadherine ähnliche Funktionen haben, bleibt allerdings in zukünftigen Forschungsprojekten zu untersuchen.

4.4.5 Transportprozesse

PCDH15, CDH23 und PCDH β 16 vermitteln Protein- und Lipidtransport in den verbindenden Zilien und Außensegmenten der Photorezeptoren (Ahmed et al. 2003a, Kremer et al. 2006, Junghans et al. 2008). Die Cadherinexpression in der äußeren Körnerschicht der reifen Retina legt die Möglichkeit nahe, dass CDH8, CDH20, PCDH11 und PCDH17 eine ähnliche Eigenschaft haben könnten.

4.4.6 Pathogenese in der Retina

Ein Funktionsverlust von PCDH15 und CDH23 führt zu Retinitis pigmentosa als ein Teil des Usher Syndroms Typ 1 des Menschen, die Mutation des CDH3-Gens verursacht Makuladystrophie beim HJMD-Syndrom und beim EEM-Syndrom, CDH2 und CDH11 sind mit dem Retinoblastom assoziiert und CDH7 wahrscheinlich – neben visuellen Merkmalen – mit der Bipolaren Störung (siehe Kapitel 1.1.5). Dies unterstreicht die Bedeutung der Cadherine in der Retina des Menschen auch aus medizinisch-pathologischer Sicht und veranschaulicht eine mögliche Zielrichtung dieser ersten deskriptiven Studie.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die analysierten 15 klassischen Cadherine und δ -Protocadherine zeigen während der Entwicklung der Retina des Frettchens ein Subpopulationenspezifisches und dynamisches Expressionsmuster. Das Erscheinen ihrer mRNA, als Ausdruck Ihrer Expression, verläuft im retinalen Gewebe für jedes Cadherin räumlich wie zeitlich unterschiedlich und spezifisch. In ihrer Kombination markieren die untersuchten Cadherine bestimmte Schichten und Zellpopulationen beziehungsweise -subpopulationen zu bestimmten Zeitpunkten in deren Entwicklung (siehe Kapitel 4.2). Besonderheiten im Muster ihrer Expression weisen außerdem auf ihre vielfältigen – bestätigten wie potentiellen – morphogenetischen Funktionen während der Retinogenese hin (siehe Kapitel 4.4). Die vorliegende deskriptive Studie ist ein weiteres Indiz dafür, dass nicht nur histologische Strukturen der Neuroretina, sondern auch die funktionale Differenzierung und die Vernetzung der retinalen Neurone sowie deren Funktionen im adulten Tier in großem Maße durch Cadherine reguliert sein könnten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die zeitlich wie örtlich beschränkten Expressionsmuster der untersuchten Cadherine in der Retina des Frettchens einen cadherinbasierten, kombinatorischen adhäsiven Code für die Steuerung der Retinogenese wahrscheinlich machen. Zur Überprüfung dieser Hypothesen werden jedoch intensivere, experimentelle neuroanatomische und molekularbiologische Analysen benötigt. Detaillierte ontogenetische Untersuchungen einer großen Anzahl von Genen aus einer Familie sind selten. Mit der vorliegenden Arbeit konnte daher ein Anfang und einzigartiger Überblick über die Rolle verschiedener Cadherine in der Retina des Frettchens gewonnen werden. Das Studium der genauen Signaltransduktion der Cadherine im ZNS wäre ein weiteres wichtiges neurobiologisches Arbeitsfeld. Ausblickend bleibt darüber hinaus eine Unzahl von Interaktionen der Cadherine mit anderen Molekülen und Signalwegen zu vermuten.

6 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Ahmed ZM, Riazuddin S, Riazuddin S, Wilcox ER. 2003a. The molecular genetics of Usher syndrome. *Clin Genet*, 63:431-444.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, Sabar MF, Sieving P, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Belyantseva IA, Wilcox ER. 2003b. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet*, 12:3215-3223.
- Arendt D, Tessmar-Raible K, Snyman H, Dorresteyn AW, Wittbrodt J. 2004. Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science*, 306:869-871.
- Babb SG, Kotradi SM, Shah B, Chiappini-Williamson C, Bell LN, Schmeiser G, Chen E, Liu Q, Marrs JA. 2005. Zebrafish R-cadherin (Cdh4) controls visual system development and differentiation. *Dev Dyn*, 233:930-945.
- Benson DL, Tanaka H. 1998. N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 18:6892-6904.
- Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailpathy CR, Wayne S, Bellman S, Desmukh D, Ahmed Z, Khan SN, Kaloustian VM, Li XC, Lalwani A, Riazuddin S, Bitner-Glindzicz M, Nance WE, Liu XZ, Wistow G, Smith RJ, Griffith AJ, Wilcox ER, Friedman TB, Morell RJ. 2001. Usher syndrome 1D and non-syndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet*, 68:26-37.
- Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL, Huntley GW. 2000. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron*, 28:245-259.
- Cailliez F, Lavery R. 2005. Cadherin mechanics and complexation: the importance of calcium binding. *Biophys J*, 89:3895-3903.
- Carrasquillo MM, Zou F, Pankratz VS, Wilcox SL, Ma L, Walker LP, Younkin SG, Younkin CS, Younkin LH, Bisceglia GD, Ertekin-Taner N, Crook JE,

- Dickson DW, Petersen RC, Graff-Radford NR, Younkin SG. 2009. Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 41:192-198.
- Cavallaro U, Liebner S, Dejana E. 2006. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res*, 312:659-667.
- Chilton JK. 2006. Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol*, 292:13-24.
- Culton DA, Qian Y, Li N, Rubenstein D, Aoki V, Filho GH, Rivitti EA, Diaz LA. 2008. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *J Autoimmun*, 31:311-324.
- Das G, Reynolds-Kenneally J, Mlodzik M. 2002. The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the *Drosophila* eye. *Dev Cell*, 2:655-666.
- De Wever O, Derycke L, Hendrix A, De Meerleer G, Godeau F, Depypere H, Bracke M. 2007. Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clin Exp Metastasis*, 24:685-697.
- Depienne C, Bouteiller D, Keren B, Cheuret E, Poirier K, Trouillard O, Benyahia B, Quelin C, Carpentier W, Julia S, Afenjar A, Gautier A, Rivier F, Meyer S, Berquin P, Helias M, Py I, Rivera S, Bahi-Buisson N, Gourfinkel-An I, Cazeneuve C, Ruberg M, Brice A, Nabbout R, Leguern E. 2009. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet*, 5:e1000381.
- Drazba J, Lemmon V. 1990. The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Muller cells. *Dev Biol*, 138:82-93.
- Eglen SJ, Raven MA, Tamrazian E, Reese BE. 2003. Dopaminergic amacrine cells in the inner nuclear layer and ganglion cell layer comprise a single functional retinal mosaic. *J Comp Neurol*, 466:343-355.
- Erdmann B, Kirsch FP, Rathjen FG, More MI. 2003. N-cadherin is essential for retinal lamination in the zebrafish. *Dev Dyn*, 226:570-577.
- Fannon AM, Colman DR. 1996. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron*, 17:423-434.
- Faulkner-Jones BE, Godinho LN, Tan SS. 1999a. Multiple cadherin mRNA

- expression and developmental regulation of a novel cadherin in the developing mouse eye. *Exp Neurol*, 156:316-325.
- Faulkner-Jones BE, Godinho LN, Reese BE, Pasquini GF, Ruefli A, Tan SS. 1999b. Cloning and expression of mouse Cadherin-7, a type-II cadherin isolated from the developing eye. *Mol Cell Neurosci*, 14:1-16.
- Fite KV, Brecha N, Karten HJ, Hunt SP. 1981. Displaced ganglion cells and the accessory optic system of pigeon. *J Comp Neurol*, 195:279-288.
- Foty RA, Steinberg MS. 2005. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol*, 278:255-263.
- Frank M, Kemler R. 2002. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14:557-562.
- Fredette BJ, Miller J, Ranscht B. 1996. Inhibition of motor axon growth by T-cadherin substrata. *Development*, 122:3163-3171.
- Fuhrmann S, Chow L, Reh TA. 2000. Molecular control of cell diversification in the vertebrate retina. *Results Probl Cell Differ*, 31:69-91.
- Gaitan Y, Bouchard M. 2006. Expression of the delta-protocadherin gene *Pcdh19* in the developing mouse embryo. *Gene Expr Patterns*, 6:893-899.
- Gänzler-Odenthal SI, Redies C. 1998. Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J Neurosci*, 18:5415-5425.
- Gerhardt H, Liebner S, Redies C, Wolburg H. 1999. N-cadherin expression in endothelial cells during early angiogenesis in the eye and brain of the chicken: relation to blood-retina and blood-brain barrier development. *Eur J Neurosci*, 11:1191-1201.
- Gerhardt H, Rascher G, Schuck J, Weigold U, Redies C, Wolburg H. 2000. R- and B-cadherin expression defines subpopulations of glial cells involved in axonal guidance in the optic nerve head of the chicken. *Glia*, 31:131-143.
- Greiner JV, Weidman TA. 1981. Histogenesis of the ferret retina. *Exp Eye Res*, 33:315-332.
- Gumbiner BM. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:622-634.
- Halbleib JM, Nelson WJ. 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, 20:3199-3214.
- Harada T, Harada C, Parada LF. 2007. Molecular regulation of visual system

- development: more than meets the eye. *Genes Dev*, 21:367-378.
- Heaton MB, Alvarez IM, Crandall JE. 1979. The displaced ganglion cell in the avian retina: developmental and comparative considerations. *Anat Embryol (Berl)*, 155:161-178.
- Henderson Z, Finlay BL, Wikler KC. 1988. Development of ganglion cell topography in ferret retina. *J Neurosci*, 8:1194-1205.
- Hermiston ML, Wong MH, Gordon JI. 1996. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev*, 10:985-996.
- Hertel N, Krishna K, Nuernberger M, Redies C. 2008. A cadherin-based code for the divisions of the mouse basal ganglia. *J Comp Neurol*, 508:511-528.
- Hirano S, Wang X, Suzuki ST. 2002. Restricted expression of protocadherin 2A in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 98:119-123.
- Hirano S, Suzuki ST, Redies C. 2003. The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci*, 8:d306-355.
- Honig MG, Rutishauser US. 1996. Changes in the segmental pattern of sensory neuron projections in the chick hindlimb under conditions of altered cell adhesion molecule function. *Dev Biol*, 175:325-337.
- Honjo M, Tanihara H, Suzuki S, Tanaka T, Honda Y, Takeichi M. 2000. Differential expression of cadherin adhesion receptors in neural retina of the postnatal mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41:546-551.
- Hulpiau P, van Roy F. 2009. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*, 41:349-369.
- Huntley GW, Gil O, Bozdagi O. 2002. The cadherin family of cell adhesion molecules: multiple roles in synaptic plasticity. *Neuroscientist*, 8:221-233.
- Inoue A, Sanes JR. 1997. Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science*, 276:1428-1431.
- Inuzuka H, Miyatani S, Takeichi M. 1991. R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron*, 7:69-79.
- Jackson CA, Hickey TL. 1985. Use of ferrets in studies of the visual system. *Lab Anim Sci*, 35:211-215.
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin

- dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27:6920-6929.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci*, 18:8936-8946.
- Jones M, Sabatini PJ, Lee FS, Bendeck MP, Langille BL. 2002. N-cadherin upregulation and function in response of smooth muscle cells to arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22:1972-1977.
- Junghans D, Heidenreich M, Hack I, Taylor V, Frotscher M, Kemler R. 2008. Postsynaptic and differential localization to neuronal subtypes of protocadherin beta16 in the mammalian central nervous system. *Eur J Neurosci*, 27:559-571.
- Kaplan E, Benardete E. 2001. The dynamics of primate retinal ganglion cells. *Prog Brain Res*, 134:17-34.
- Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N. 2001. Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res*, 131:3-26.
- Kools P, Van Imschoot G, van Roy F. 2000. Characterization of three novel human cadherin genes (CDH7, CDH19, and CDH20) clustered on chromosome 18q22-q23 and with high homology to chicken cadherin-7. *Genomics*, 68:283-295.
- Kopatz K, Distler C. 2000. Astrocyte invasion and vasculogenesis in the developing ferret retina. *J Neurocytol*, 29:157-172.
- Kremer H, van Wijk E, Marker T, Wolfrum U, Roepman R. 2006. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet*, 15:R262-270.
- Krishna K, Redies C. 2009. Expression of cadherin superfamily genes in brain vascular development. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29:224-229.
- Krishna K, Nuernberger M, Weth F, Redies C. 2009. Layer-specific expression of multiple cadherins in the developing visual cortex (V1) of the ferret. *Cereb Cortex*, 19:388-401.
- Leckband D. 2008. Beyond structure: mechanism and dynamics of intercellular adhesion. *Biochem Soc Trans*, 36:213-220.
- Lee RC, Clandinin TR, Lee CH, Chen PL, Meinertzhagen IA, Zipursky SL. 2003. The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the *Drosophila* visual system. *Nat Neurosci*, 6:557-563.
- Lefebvre JL, Zhang Y, Meister M, Wang X, Sanes JR. 2008. γ -Protocadherins

- regulate neuronal survival but are dispensable for circuit formation in retina. *Development*, 135:4141-4151.
- Letourneau PC, Roche FK, Shattuck TA, Lemmon V, Takeichi M. 1991. Interactions of Schwann cells with neurites and with other Schwann cells involve the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. *J Neurobiol*, 22:707-720.
- Lin J, Luo J, Redies C. 2008. Molecular cloning and expression analysis of three cadherin-8 isoforms in the embryonic chicken brain. *Brain Res*, 1201:1-14.
- Liu Q, Londraville R, Marrs JA, Wilson AL, Mbimba T, Murakami T, Kubota F, Zheng W, Fatkins DG. 2008. Cadherin-6 function in zebrafish retinal development. *Dev Neurobiol*, 68:1107-1122.
- Marchong MN, Chen D, Corson TW, Lee C, Harmandayan M, Bowles E, Chen N, Gallie BL. 2004. Minimal 16q genomic loss implicates cadherin-11 in retinoblastoma. *Mol Cancer Res*, 2:495-503.
- Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Ruegg C. 2007. N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 16:451-465.
- Masai I, Lele Z, Yamaguchi M, Komori A, Nakata A, Nishiwaki Y, Wada H, Tanaka H, Nojima Y, Hammerschmidt M, Wilson SW, Okamoto H. 2003. N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development*, 130:2479-2494.
- McMillan JR, Shimizu H. 2001. Desmosomes: structure and function in normal and diseased epidermis. *J Dermatol*, 28:291-298.
- Miller ED, Tran MN, Wong GK, Oakley DM, Wong RO. 1999. Morphological differentiation of bipolar cells in the ferret retina. *Vis Neurosci*, 16:1133-1144.
- Morgan J, Huckfeldt R, Wong RO. 2005. Imaging techniques in retinal research. *Exp Eye Res*, 80:297-306.
- Morgan JE, Henderson Z, Thompson ID. 1987. Retinal decussation patterns in pigmented and albino ferrets. *Neuroscience*, 20:519-535.
- Morishita H, Yagi T. 2007. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 19:584-592.
- Müller K, Hirano S, Puelles L, Redies C. 2004. OL-protocadherin expression in the visual system of the chicken embryo. *J Comp Neurol*, 470:240-255.

- Nakagawa S, Takeichi M. 1998. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development*, 125:2963-2971.
- Nelson WJ. 2008. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*, 36:149-155.
- Neudert F, Redies C. 2008. Neural circuits revealed by axon tracing and mapping cadherin expression in the embryonic chicken cerebellum. *J Comp Neurol*, 509:283-301.
- Neudert F, Nuernberger KK, Redies C. 2008. Comparative analysis of cadherin expression and connectivity patterns in the cerebellar system of ferret and mouse. *J Comp Neurol*, 511:736-752.
- Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. 2008. Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci*, 49:21-31.
- Nollet F, Kools P, van Roy F. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, 299:551-572.
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, 54:993-1001.
- O'Rahilly R. 1975. The prenatal development of the human eye. *Exp Eye Res*, 21:93-112.
- Obst-Pernberg K, Redies C. 1999. Cadherins and synaptic specificity. *J Neurosci Res*, 58:130-138.
- Pedrosa E, Stefanescu R, Margolis B, Petruolo O, Lo Y, Nolan K, Novak T, Stopkova P, Lachman HM. 2008. Analysis of protocadherin alpha gene enhancer polymorphism in bipolar disorder and schizophrenia. *Schizophr Res*, 102:210-219.
- Petrovic M, Hummel T. 2008. Temporal identity in axonal target layer recognition. *Nature*, 456:800-803.
- Piper M, Dwivedy A, Leung L, Bradley RS, Holt CE. 2008. NF-protocadherin and TAF1 regulate retinal axon initiation and elongation in vivo. *J Neurosci*, 28:100-105.
- Prakasam AK, Maruthamuthu V, Leckband DE. 2006. Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:15434-15439.

- Prakash S, Caldwell JC, Eberl DF, Clandinin TR. 2005. Drosophila N-cadherin mediates an attractive interaction between photoreceptor axons and their targets. *Nat Neurosci*, 8:443-450.
- Provis JM, Diaz CM, Penfold PL. 1996. Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol*, 3:213-222.
- Ramos MC, Tenorio R, Martinez-Garcia A, Sastre I, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Rosich-Estrago M, Valdivieso F, Bullido MJ. 2006. Association of DSC1, a gene modulated by adrenergic stimulation, with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 408:203-208.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM. 2004. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol*, 474:304-324.
- Rattner A, Smallwood PM, Williams J, Cooke C, Savchenko A, Lyubarsky A, Pugh EN, Nathans J. 2001. A photoreceptor-specific cadherin is essential for the structural integrity of the outer segment and for photoreceptor survival. *Neuron*, 32:775-786.
- Rawls AS, Guinto JB, Wolff T. 2002. The cadherins fat and dachsous regulate dorsal/ventral signaling in the Drosophila eye. *Curr Biol*, 12:1021-1026.
- Redies C. 1997. Cadherins and the formation of neural circuitry in the vertebrate CNS. *Cell Tissue Res*, 290:405-413.
- Redies C. 2000. Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 61:611-648.
- Redies C, Takeichi M. 1996. Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Dev Biol*, 180:413-423.
- Redies C, Inuzuka H, Takeichi M. 1992. Restricted expression of N- and R-cadherin on neurites of the developing chicken CNS. *J Neurosci*, 12:3525-3534.
- Redies C, Engelhart K, Takeichi M. 1993. Differential expression of N- and R-cadherin in functional neuronal systems and other structures of the developing chicken brain. *J Comp Neurol*, 333:398-416.
- Redies C, Vanhalst K, Roy F. 2005. delta-Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci*, 62:2840-2852.
- Reese BE, Johnson PT, Baker GE. 1996. Maturation gradients in the retina of

- the ferret. *J Comp Neurol*, 375:252-273.
- Resink TJ, Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Erne P. 2009. Cadherins and cardiovascular disease. *Swiss Med Wkly*, 139:122-134.
- Riehl R, Johnson K, Bradley R, Grunwald GB, Cornel E, Lilienbaum A, Holt CE. 1996. Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron*, 17:837-848.
- Ruan G, Wedlich D, Koehler A. 2006. *Xenopus* cadherin-6 regulates growth and epithelial development of the retina. *Mech Dev*, 123:881-892.
- Sallee JL, Wittchen ES, Burridge K. 2006. Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases: II. Cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 281:16189-16192.
- Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, Taketani S, Suzuki S. 1993. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *Embo J*, 12:2249-2256.
- Schulte D, Bumsted-O'Brien KM. 2008. Molecular mechanisms of vertebrate retina development: implications for ganglion cell and photoreceptor patterning. *Brain Res*, 1192:151-164.
- Shimomura Y, Wajid M, Shapiro L, Christiano AM. 2008. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development*, 135:743-753.
- Soronen P, Ollila HM, Antila M, Silander K, Palo OM, Kiesepä T, Lönnqvist J, Peltonen L, Tuulio-Henriksson A, Partonen T, Paunio T. 2010. Replication of GWAS of bipolar disorder: association of SNPs near CDH7 with bipolar disorder and visual processing. *Mol Psychiatry*, 15:4-6.
- Stemmler MP. 2008. Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst*, 4:835-850.
- Stone KE, Sakaguchi DS. 1996. Perturbation of the developing *Xenopus* retinotectal projection following injections of antibodies against beta1 integrin receptors and N-cadherin. *Dev Biol*, 180:297-310.
- Strettoi E, Masland RH. 1995. The organization of the inner nuclear layer of the rabbit retina. *J Neurosci*, 15:875-888.
- Sundfeldt K. 2003. Cell-cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule. *Mol Cell Endocrinol*, 202:89-96.
- Suzuki SC, Takeichi M. 2008. Cadherins in neuronal morphogenesis and

- function. *Dev Growth Differ*, 50:S119-130.
- Takeichi M. 2007. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci*, 8:11-20.
- Takeichi M, Abe K. 2005. Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol*, 15:216-221.
- Takeichi M, Atsumi T, Yoshida C, Uno K, Okada TS. 1981. Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells by Ca²⁺-dependent sites. *Dev Biol*, 87:340-350.
- Tanabe K, Takeichi M, Nakagawa S. 2004. Identification of a nonchordate-type classic cadherin in vertebrates: chicken Hz-cadherin is expressed in horizontal cells of the neural retina and contains a nonchordate-specific domain complex. *Dev Dyn*, 229:899-906.
- Tanabe K, Takahashi Y, Sato Y, Kawakami K, Takeichi M, Nakagawa S. 2006. Cadherin is required for dendritic morphogenesis and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells. *Development*, 133:4085-4096.
- Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA, Fuchs E. 2004. Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:552-557.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. 2000. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res*, 60:3650-3654.
- Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D. 2006. (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 78:24-46.
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M. 1996. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol*, 135:767-779.
- Van Aken EH, Papeleu P, De Potter P, Bruyneel E, Philippe J, Seregard S, Kvanta A, De Laey JJ, Mareel MM. 2002. Structure and function of the N-cadherin/catenin complex in retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43:595-602.
- Vanhalst K, Kools P, Staes K, van Roy F, Redies C. 2005. delta-Protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain. *Cell Mol Life Sci*, 62:1247-1259.

- Vitek DJ, Schall JD, Leventhal AG. 1985. Morphology, central projections, and dendritic field orientation of retinal ganglion cells in the ferret. *J Comp Neurol*, 241:1-11.
- Weidman TA, Greiner JV. 1984. Histology of the ferret retina. *Anat Anz*, 157:329-341.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci*, 121:727-735.
- Wöhrn JC, Puelles L, Nakagawa S, Takeichi M, Redies C. 1998. Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo. *J Comp Neurol*, 396:20-38.
- Wöhrn JC, Nakagawa S, Ast M, Takeichi M, Redies C. 1999. Combinatorial expression of cadherins in the tectum and the sorting of neurites in the tectofugal pathways of the chicken embryo. *Neuroscience*, 90:985-1000.
- Wolverton T, Lalande M. 2001. Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins. *Genomics*, 76:66-72.
- Xu L, Overbeek PA, Reneker LW. 2002. Systematic analysis of E-, N- and P-cadherin expression in mouse eye development. *Exp Eye Res*, 74:753-760.
- Yonekura S, Xu L, Ting CY, Lee CH. 2007. Adhesive but not signaling activity of *Drosophila* N-cadherin is essential for target selection of photoreceptor afferents. *Dev Biol*, 304:759-770.
- Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M. 1984. Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol*, 101:19-27.
- Zhang SS, Fu XY, Barnstable CJ. 2002. Molecular aspects of vertebrate retinal development. *Mol Neurobiol*, 26:137-152.

Danksagung

Besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Christoph Redies, der mich von Anfang an mit offenen Armen empfangen hat. Er führte mich mit sicherer, beruhigender Hand durch die für einen Medizinstudenten nicht selbstverständlichen Gefilde der Naturwissenschaft. Er ließ mir aber ebenso viel Freiraum, förderte meine Eigenständigkeit und wusste es vortrefflich, meine Neugier zu unterstützen.

Meinem Koautor und lieben Freund Krishna verdanke ich einen stetig frischen und fröhlichen Geist während der manchmal so trockenen Arbeit. Er brachte mich auf viele neue Ideen und half mir, interessante Lösungen zu finden – und all das mit einem unverwüstlichen und definitiv ansteckenden Lächeln.

Die technischen Assistentinnen Jessica Heyder, Silke Schreiber und Nicole Mergel halfen mir sehr, die zeitintensive Arbeit der In-situ-Hybridisierung mit meinem Studium zu vereinbaren. Insbesondere Jessica habe ich als eine hervorragende MTA kennen lernen dürfen, von der ich viel gelernt habe.

Meine Kollegen Nicole Hertel und Juntan Lin waren angenehme Mitarbeiter, die immer ein offenes Ohr für methodische Probleme hatten.

Schließlich möchte ich meiner Ehefrau Katrin Etzrodt meinen tiefsten Dank aussprechen. Noch während ich diese letzten Zeilen schreibe, wartet sie weit entfernt auf meine Rückkehr und befürwortet doch all mein Engagement für meinen Beruf. Sie unterstützte jeden Schritt meiner entbehrungsvollen Arbeit, versüßte mir die langen Stunden über Objektträgern und Artikeln und zeigte mir auf angenehme Weise, wie wichtig doch auch ein festes Leben außerhalb der Labore und Publikationen ist.

7.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,
dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe,
dass ich keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

 mein Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Christoph Redies,
 mein Kollege und Koautor Dr. rer. nat. Krishna,
 meine Ehefrau Katrin Etzrodt,

dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe,
dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.