

1. Einleitung	7
1.1 Apoptose	7
1.2 Embryonale Entwicklung und Apoptose	8
1.3 An Zelltodprozessen beteiligte Moleküle: Transformierende Wachstumsfaktoren beta (TGFB), Knochenwachstumsfaktoren (BMP) und Tumor-Nekrose-Faktoren alpha (TNFa)	9
1.4 Signaltransduktionswege von TGFB, BMP und TNFa	11
1.5 Die Rolle der TGFB-Superfamilie und TNFa-Familie in der embryonalen Entwicklung des Nervensystems	15
1.6 Das Modellsystem Retina bei Huhn und Maus	16
1.7 Zelltodphasen in der Entwicklung der Retina von Huhn und Maus	17
1.8 Die Rolle von TGFB, BMP und TNFa beim retinalen Zelltod	21
1.9 Expression der TGFB-Superfamilie im Nervensystem und in der Retina	23
1.10 Fragestellung	24
2. Material & Methoden	25
2.1 Versuchstiere: Hühner	25
2.2 Versuchstiere: Mäuse	25
2.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	25
2.4 Proteinbestimmungen	27
2.5 Western-Blot-Analyse	27
2.5.1 Gele	28
2.5.2 Probenansatz	29
2.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.5.4 Blotvorgang	30
2.5.5 Waschen, Blocken und Antikörperinkubation	31

2.5.6 Entwicklung der Membranen	32
2.5.7 Detektion der Gesamtproteinmenge durch Inkubation mit β -Actin	32
2.5.8 Quantifizierung und Auswertung	33
2.5.9 Mathematische Analyse des Western-Blot	34
2.6 MLEC-Assay	34
2.6.1 Vorbereitung der MLEC-Zellen	35
2.6.2 Aktivitätsmessung und Auswertung	36
2.6.3 Mathematische Analyse des MLEC-Assays	36
2.7 Immunzytochemische Färbungen	37
2.7.1 Mikroskopieren und Photographieren	38
2.8 Verwendete Chemikalien und Geräte	39
3. Ergebnisse: Huhnretinamodell	42
3.1 Immunzytochemische Untersuchungen der Lokalisation von TGFβ- und BMP-Liganden und -Rezeptoren in der Hühnerretina	42
3.1.1 Immunzytochemische Darstellung von TGF β -Liganden und -Rezeptoren in der Hühnerretina	42
3.1.2 Immunzytochemische Darstellung von BMP-Liganden und -Rezeptoren in der Hühnerretina	44
3.2 Untersuchungen der TGFβ-Aktivität in der embryonalen Hühnerretina	46
3.3 Untersuchungen der Expression von TGFβ-, BMP4- und TNFα- Liganden und -Rezeptoren in der sich entwickelnden Hühnerretina	47
3.3.1 Expression von TGF β -Liganden und -Rezeptoren in der sich entwickelnden Hühnerretina	47
3.3.2 Expression von BMP4-Liganden und BMP-Rezeptoren in der sich entwickelnden Hühnerretina	49
3.3.3 Expression von TNF α -Rezeptoren in der sich entwickelnden Hühnerretina	51

4. Ergebnisse: Mausretinamodell	52
4.1 Untersuchungen der Lokalisation von Liganden und Rezeptoren durch Immunzytochemie bei der Maus	52
4.1.1 Immunzytochemische Darstellung von TGF β -Liganden und Rezeptoren in der sich entwickelnden Mausretina	52
4.1.2 Immunzytochemische Lokalisation von BMP-Rezeptoren in der sich entwickelnden Mausretina	52
4.1.3 Untersuchung der TGF β -Aktivität in der sich entwickelnden Mausretina	54
4.2 Untersuchungen der Expression von Liganden und Rezeptoren in der Retina der Maus	54
4.3 Untersuchungen der Expression von TGFβ-, BMP4- und TNFα-Liganden und -Rezeptoren in der sich entwickelnden Mausretina	55
4.3.1 Expression von TGF β -Rezeptoren in der sich entwickelnden Mausretina	55
4.3.2 Expression des BMP4-Liganden und der BMP-Rezeptoren in der sich entwickelnden Mausretina	56
4.3.3 Expression von TNF α -Rezeptoren in der sich entwickelnden Mausretina	59
5. Diskussion	60
6. Zusammenfassung	65
7. Literaturverzeichnis	66
8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	73
Danksagung	74
Curriculum vitae	75

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Herstellung Phosphatpuffer	26
Tabelle 2	Herstellung von 4%igem PFA	26
Tabelle 3	Zusammensetzung der Trenngele	28
Tabelle 4	Zusammensetzung der Sammelgele	28
Tabelle 5	Zusammensetzung des Tris/HCl-0,4SDS	28
Tabelle 6	Pufferansätze	29
Tabelle 7	Pufferzusammensetzungen	31
Tabelle 8	Primärantikörper	31
Tabelle 9	Sekundärantikörper	32
Tabelle 10	Ansätze für immunzytochemische Färbungen	37
Tabelle 11	Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen	37
Tabelle 12	Verwendete Chemikalien	39
Tabelle 13	Verwendete Geräte	40
Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege von TGF β und BMP4	12
Abbildung 2:	Signaltransduktionskaskade von TNF α über den TNF α RI	13
Abbildung 3:	Caspase-Kaskade und Bcl-Familie bei der Induktion von Zelltod	14
Abbildung 4:	Aufbau der Retina	17
Abbildung 5:	Zelltodphasen in der Huhnretina	18
Abbildung 6a:	Zelltodphasen in der sich entwickelnden Mausretina nach Frade & Barde	20
Abbildung 6b:	Zelltodphasen in der sich entwickelnden Mausretina nach Pequignot et al.	20
Abbildung 7:	Behandlung von Huhnretinae mit anti-TGF β im Stadium E6	21
Abbildung 8:	Immunzytochemischer Nachweis von TGF β -Liganden und -Rezeptoren beim Huhn am Entwicklungsstadium E5	43
Abbildung 9:	Immunzytochemischer Nachweis von TGF β - und BMP-Liganden und Rezeptoren beim Huhn an den Entwicklungsstadien E5 und E11	45
Abbildung 10:	Endogene Aktivität von TGF β 2 und TGF β 3 im MLEC-Assay beim Huhn	46
Abbildung 11a:	Expressionslevel von TGF β 2	47
Abbildung 11b:	Expressionslevel von Alk1, Alk5, T β RII und T β RIII	48
Abbildung 12:	Expressionslevel von BMPRIb, BMPRII und BMP4	50
Abbildung 13:	Expressionslevel von TNF α RI	51
Abbildung 14:	Immunzytochemischer Nachweis von TGF β - und BMP-Rezeptoren bei der Maus am Entwicklungsstadium P2	53
Abbildung 15:	Endogene Aktivität von TGF β 2 und TGF β 3 im MLEC-Assay bei der Maus	54
Abbildung 16:	Expressionslevel von T β RI Alk5 und T β RII	57
Abbildung 17a:	Expressionslevel von BMP4	57
Abbildung 17b:	Expressionslevel von BMPRIb und BMPRII	58
Abbildung 18:	Expressionslevel von TNF α RI	59