

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen  
Abteilung: Zelluläre Neurobiologie  
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.-J. Wagner

**Morphologische Charakterisierung tectopetaler  
retinaler Ganglienzellen beim  
Zebrafisch, *Danio rerio***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Bastian Christoph Walz  
aus Freudenstadt

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-J. Wagner  
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Zrenner

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Zebrafisch .....	1
1.2 Das Zebrafisch-Auge .....	2
1.3 Die Retina .....	3
1.4 Die retinale Ganglienzelle (RGZ) .....	6
1.5 Fragestellung und Versuchsansatz.....	9
1.6 Das Tectum opticum .....	10
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien .....	11
2.1.1 Wichtige Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	11
2.1.2 Farbstoffe .....	11
2.1.3 Medien .....	11
2.1.4 Geräte .....	11
2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	12
2.3 Präparation, Fisch.....	12
2.4 Injektion .....	13
2.4.1 Herstellung der Kapillaren .....	13
2.4.2 Farbstofflösung .....	13
2.4.3 Füllung der Kapillaren .....	14
2.4.4 Iontophorese .....	14
2.5 Inkubation .....	16
2.6 Präparation und Fixierung, Bulbus oculi.....	17
2.7 Microinjektion von <i>lucifer yellow</i> .....	18
2.8 Schnittbildkontrolle des Gehirns .....	18
2.8.1 Fixierung .....	19
2.8.2 Schnitthanfertigung .....	19
2.9 Digitalisierung der Ganglienzellen .....	19
2.10 Manuelle Weiterverarbeitung, Zeichnung .....	20
2.11 Quantitative Auswertung.....	21
2.11.1 Vermessung, Soma.....	21
2.11.2 Vermessung, dendritische Arborisierung.....	22
2.12 Klassifikation und Nomenklatur der Ganglienzellen.....	23
2.13 Verwendete statistische Methoden .....	24

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1 Anfärbung tectopetaler RGZ mit <i>TMRD</i> .....	25
3.2 Anfärbung vorgefärbter RGZ mit <i>Lucifer yellow</i> .....	27
3.3 Die einzelnen tectopetalen retinalen Ganglienzellen .....	28
3.3.1 Diffus-stratifizierende Ganglienzellen .....	28
3.3.1.1 Intermediate d-RGZ (im-d-RGZ) mit 2-3 PD .....	28
3.3.1.2 Doppelt markierte RGZ (dm-im-d-RGZ).....	31
3.3.1.3 Small-d-RGZ.....	33
3.3.1.4 Intermediate-d-RGZ mit 4-5 Primärdendriten .....	35
3.3.1.5 Intermediate-d- RGZ mit 3-4 PD .....	36
3.3.2 Mono-stratifizierte RGZ (m-RGZ) .....	37
3.3.2.1 Large-m-a-RGZ .....	37
3.3.2.2 Large-m-b-RGZ .....	39
3.3.2.3 Medium-m-a-RGZ.....	40
3.3.3 Bi-stratifizierte RGZ .....	41
3.3.4 Nicht-klassifizierte Ganglienzellen.....	43
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>46</b>
4.1 Methodendiskussion .....	47
4.1.1 Einflüsse bei der Haltung, Präparation, Injektion und Inkubation .....	47
4.1.2 Einflüsse durch Farbstoffe und Anfärbungen .....	49
4.1.3 Einflüsse der Bildgewinnung und Auswertung .....	50
4.2 Tectopetale RGZ im Vergleich zu bisher beschriebenen retinalen Ganglienzellen des Zebrafisches .....	53
4.3 Vergleich zu anderen Knochen-Fischen und Vertebraten.....	55
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>63</b>
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>64</b>

## Abkürzungen

Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin Perchlorat
dm-RGZ	doppeltmarkierte retinale Ganglienzelle/n
d-RGZ	diffus-stratifizierte retinale Ganglienzelle/n
GCL	Ganglienzellschicht
GZ	Ganglienzelle/n
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
im-RGZ	Intermediate retinale Ganglienzelle/n
INL	innere nukleäre Schicht
IPL	innere plexiforme Schicht
LSM	Laser-Scan-Mikroskop
m-RGZ	mono-stratifizierte retinale Ganglienzelle/n
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Saline)
PD	Primärdendriten
PFA	Paraformaldehyd
RGZ	retinale Ganglienzelle/n
TMRD	Tetramethylrhodamin-Dextran-Amin
ZNS	zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung eines Knochenfisch-Auges im Querschnitt.	2
Abb. 2	Schematische Zeichnung der Goldfischnetzhaut nach Toyoda et al. (1999).	4
Abb. 3	Schematisierte Darstellung der verschiedenen Schichten der inneren plexiformen Schicht der Netzhaut mit Hinweis auf die Einteilungen nach Ramon y Cajal (1892), Famiglietti und Kolb (1976/77) und Connaughton und Nelson (2000).	7
Abb. 4	Schematisierte Darstellung des Zebrafischgehirns mit den tektalen Injektionsstellen von <i>TMRD</i> .	15
Abb. 5	Objektträger mit konservierter Retina und noch anhaftendem Pigmentepithel.	17
Abb. 6	Darstellung der manuellen Übertragung einer RGZ aus einer LSM- Originalaufnahme.	21
Abb. 7	Größentabelle der dendritischen Felder an Beispielen; mit Einteilung in die vier verwendeten Größen small, intermediate, medium und large.	24
Abb. 8	Übersichtsaufnahme des Austrittes der GZ-Axone aus der Retina in den Nervus opticus nach multiplen Test-Injektionen in das kontralaterale Tectum.	26
Abb. 9	Zwei kryostatisch gewonnene, radiäre Hirnschnitte durch das Tectum opticum des Zebrafisches mit sichtbaren <i>TMRD</i> -Injektionsstellen.	27
Abb. 10	LSM-Originalaufnahmen und gezeichnete Darstellungen von intermediate-diffusen RGZ (im-d-RGZ) mit 2-3 Primärdendriten.	30
Abb. 11	Vertikale Ansichten doppeltmarkierter im-d-RGZ in Zeichnung und LSM-Bild.	32
Abb. 12	Seitenansicht einer doppeltmarkierten im-d-RGZ.	32
Abb. 13	Small-d-RGZ in mehreren Beispielen als LSM-Bilder und Zeichnungen illustriert.	34

Abb.14	Drei Darstellungen von intermediate-diffusen RGZ mit 4-5 Primärdendriten aus seitlicher und vertikaler Ansicht.	35
Abb. 15	Intermediate-diffuse RGZ mit 3-4 PD in Auf- und Seitenansicht.	36
Abb. 16	Darstellungen der large-mono-a-stratifizierten RGZ mit sehr großen dendritischen Feldern und Somata bei planaren Verzweigungen in S1 und S2 der IPL.	38
Abb. 17	Illustration eines Zellmosaik, das die Retina bedeckt; am Beispiel der large-m-RGZ.	38
Abb. 18	Darstellungen der large-mono-b-RGZ mit planaren Verzweigungen in S5 und der GCL bei runden Somata.	39
Abb. 19	Medium-m-RGZ in verschiedenen Ansichten und mit charakteristischer Verzweigung in der IPL bei S1 und S2.	40
Abb. 20	Bi-stratifizierte RGZ in Auf- und Seitenansicht. Zusätzlich sind in Zeichnungen die beiden Stratifizierung einer medium-bi-a/b-RGZ getrennt dargestellt. Dabei sind dendritische Übergänge und das Axon gekennzeichnet.	42
Abb. 21	Graphische Darstellung der Verzweigungs- und Endpunkte nach Zelltypen und Anzahl gegliedert.	43
Abb. 22	Schematisierte Darstellung der Stratifizierungen tectopetaler Ganglienzellen in S1-S5 der IPL nach Ramon y Cajal (1892) mit den Original-Seitenansichten.	45

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Morphologische Daten tectopetaler RGZ beim Zebrafisch.	44
--------	--	----

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Zebrafisch

Die Entwicklungsbiologie hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte erzielen können, indem sie sich auf einige wenige Modellorganismen beschränkt hat. Dabei sollten sich die Tiere vor allem gut für genetische Analysen und biochemische Experimente eignen. Dem Zebrafisch (lat. *Danio rerio*) gelang die Einreihung in diese wissenschaftliche Auswahl schon in den frühen siebziger Jahren durch das Interesse des Genetikers George Streisinger von der Universität Oregon, U.S.A.. Er begann mit Experimenten im Feld der Vorwärtsgenetik und etablierte damit den Zebrafisch als ein Modellorganismus der Vertebraten. Heute sind über 1900 Zebrafisch Mutanten und ihre phänotypischen Veränderungen beschrieben (Kahn, 1994).

Die Zebrafisch-Larven entwickeln sich bei hoher Nachkommenszahl außerhalb des Mutterleibs und sind fast vollkommen durchsichtig, was sie besonders wertvoll für die Untersuchung von neuronalen Trakten macht. Neben der geringen Körpergröße und günstigen Haltungsbedingungen unterliegen sie leichter genetischer Manipulationsfähigkeit und praktischen in-vitro Umgangsbedingungen.

In der vergleichenden Betrachtung des ZNS mit anderen Vertebraten sind viele der Kernzentren und Nervenverbindungen in anderer Weise ausgebildet oder proportioniert, um auf die spezifischen Anforderungen der Umgebung des Fisches reagieren zu können. Die Zebrafische bieten durch ihr den höheren Vertebraten sehr ähnlich entwickeltes visuelles System eine repräsentative Ausgangsbasis für anatomische und physiologische Beobachtungen. Dabei soll in dieser Arbeit besonderes Interesse auf die Netzhaut und den Hauptteil ihrer axonalen Verbindungen gelegt werden.

## 1.2 Das Zebrafisch-Auge

Die Augen aller Wirbeltiere (Säugetiere, Fische, Amphibien, Reptilien und Vögel) sind nach dem gleichen Prinzip aufgebaut: Das durch die Pupille einfallende Licht bildet sich auf einer inversen Netzhaut ab (Rodieck, 1998).

Für das Zebrafisch-Auge sind ferner einige Anpassungen an den Lebensraum notwendig: Da das Wasser, die Cornea und der intraokuläre Glaskörper annähernd die gleiche Brechkraft haben, wird die Fokussierung auf ein Objekt einzig durch die sphärische Linse erreicht. Diese ist nicht linsenförmig, sondern vollständig kugelig (Roberts 1985). Der geringe Akkomodationsgrad wird durch den Nervus retractor lentis erreicht. Die Iris ist fixiert und praktisch unbeweglich, da sie keine sphinkterische oder dilatatorische Muskulatur besitzt (Munz 1971).

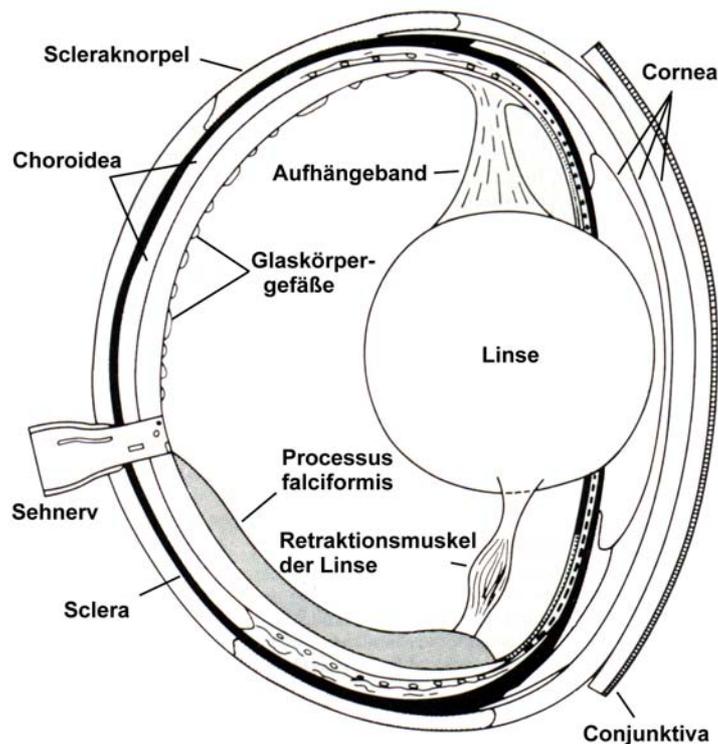


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines Knochenfisch-Auges im Querschnitt (nach Walls, 1942). Es findet sich die typische Einteilung in die stabilisierenden, gefäß-versorgenden und perzeptiven Schichten des Auges.

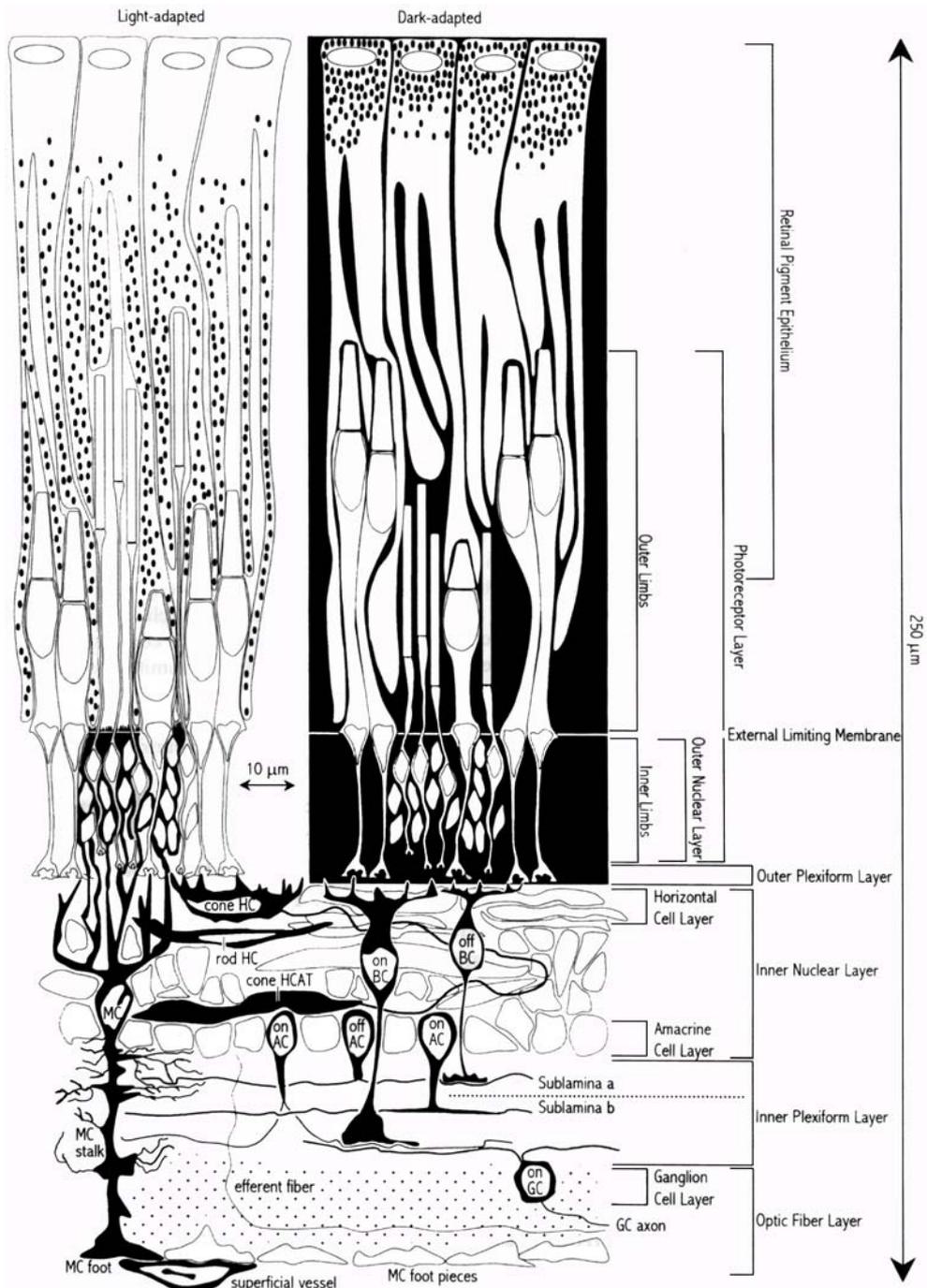
## 1.3 Die Retina

Zebrafische haben ein hoch entwickeltes optisches System, dessen zelluläre Architektur derer höherer Vertebraten entspricht. Sie zeigen schon nach drei Tagen ein visuell beeinflusstes Verhalten (Brockhoff, 1995) und besitzen im Vergleich zu Tiefseefischen vier verschiedene Zapfen-Rezeptorzellen bzw. sind tetrachromatisch (Munz, 1971).

Ihre Retina ist dünn, gelatinös und transparent. Sie ist in definierten Schichten angeordnet (Fernald, 1984), d.h. sie besteht aus drei zellulären Schichten mit sieben sich darin differenzierenden Zelltypen: sechs Neuronenarten und den Müllerschen Gliazellen – siehe Abbildung 2. Dabei ist die Zebrafischnetzhaute aus mehreren Gründen geeignet an ihr neuronale Strukturen und Muster des ZNS der Vertebraten zu untersuchen:

Die retinalen Zellen lassen sich sehr gut beobachten ohne histologische Schnitte anfertigen zu müssen, weil die Netzhaut sich auf einem Objektträger ausbreiten lässt. Für die Unterscheidung der neuronalen Subtypen gibt es molekulare Marker, mit denen man ihre Position leicht detektieren kann (Sandell et al., 1994; Connaughton et al., 1999). Weiterhin sind die Augen der Zebrafisch-Larven verhältnismäßig groß und sehr gut zugänglich.

Die ersten sich darin differenzierenden Zellen sind die Ganglienzellen der ventralen Retina, nasal des Nervus opticus, schon ~36 Stunden nach der Befruchtung (Schmitt & Dowling, 1996). Nach ~32-34 Stunden verlassen die ersten Axone die Retina. Und schließlich sind schon nach ~74 Stunden alle Zellarten und synaptischen Verbindungen an Ort und Stelle, so dass die Retina nach ungefähr drei Tagen als funktionell arbeitsfähig betrachtet werden kann (Schmitt & Dowling, 1999).



**Abbildung 2. Schematische Zeichnung der Goldfischnetzhaut nach Toyoda et al. (1999). Man beachte die Lage der synaptischen Kontakte der Ganglienzellen mit den Amakrin- und Bipolarzellen innerhalb der inneren plexiformen Schicht entlang des longitudinalen Reizverarbeitungsweges.**

Wie bei den meisten Knochenfischen wächst das Zebrafisch-Auge dann über das gesamte Leben hinweg weiter. Dabei wird der genaue Visus einerseits von einer Population Neuroblasten am Rande der Retina durch einen ständigen neuronalen Anbau und andererseits von Stäbchen-Vorläuferzellen in der zentralen Retina gewährleistet (Johns, 1977; Raymond & Rivlin, 1987; Raymond et al., 1988).

Die Kenntnis dieses Wachstums ist für die Beurteilung und Unterscheidung der Ganglienzellen sehr wichtig, da diese sich während ihrer Entwicklung in ihrer Gestalt je nach Spezies nicht unerheblich verändern. Bei den Ganglienzellen des Goldfisches konnte gezeigt werden, dass dies durch ein interstitielles Wachstum erfolgt, d.h. es werden keine neuen Dendriten angebaut, sondern die bestehenden in der Länge und im Durchmesser vergrößert; bildlich vorstellbar ähnlich der Schrift auf einem Ballon, der aufgeblasen wird. Dies geschieht von der neuroblastisch-aktiven Peripherie zum Netzhautzentrum hin zunehmend, wobei sich die dendritische Feldgröße bei Konsistenz der Architektur leicht verdoppeln kann (Bloomfield & Hitchcock, 1991, Goldfisch).

Bei Säugetieren gibt es hingegen keine randständige Keimzone, die pluripotente neue Zellen anbaut. Vielmehr kommt es hier primär zu einer starken Zellproliferation und -verteilung und dann sekundär zu einer Ausreifung, dem so genannten „remodelling“, um letztlich den charakteristischen Aufbau der einzelnen Zelltypen zu erlangen.

## 1.4 Die retinale Ganglienzelle (RGZ)

Die Identifikation von Zellen des ZNS und konsekutive Schlüsse auf ihre Entwicklung und Funktion ist seit jeher in großem Interesse der Hirnforschung. In den Ganglienzellen der Netzhaut stellt diese Suche häufig ein Problem dar, da die verschiedenen Zellarten sich in viele Haupt- und Unterklassen unterteilen. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Einteilungskriterien der einzelnen Ganglienzellen je nach Spezies und Ansicht des Untersuchers bzw. sogar je nach Wahl der Methodik und Definition einer Studie variieren können. Die retinalen Ganglienzellen bieten dennoch einige Vorteile: So folgen Ihre Axone z.B. genau definierten und gut beobachtbaren Wegen (Tractus opticus...) und ihre Zellkörper zeichnen sich durch eine relativ leichte Zugänglichkeit für mikroinjektive Fluoreszenz-Anfärbungen aus.

Die Morphologie der RGZ und ihre Verteilung innerhalb der Netzhaut wurde inzwischen an vielen Vertebraten untersucht, z.B. am Goldfisch: Hitchcock & Easter, 1986, am Gecko: Cook & Noden, 1998; am Frosch: Kock et al., 1989; und am Mensch: Peterson & Dacey, 2000. So konnten den einzelnen Ganglienzelltypen nach und nach verschiedene physiologische Eigenschaften zugeschrieben werden. In diese fällt auch die Zuordnung in ON- und OFF-Zentrum Ganglienzellen, je nachdem mit welcher elektrophysiologischen Antwort die Zellen auf einen Lichtreiz reagieren (z.B. Saito, 1983; Vallegra & Djamgoz 1991).

Von sehr großer Wichtigkeit ist dabei die Einteilung der inneren plexiformen Schicht (IPL), die der Erregungskette entsprechend Synapsen zwischen den Axonen des zweiten Neurons (amakrine und bipolare Nervenzellen) und den Dendriten des dritten Neurons (RGZ) enthält (siehe Abbildung 3). Folgende Definition der spezifischen IPL-Schichtung konnte über viele Jahre von mehreren Autoren bestätigt werden:



sehr großes Soma, dessen Hauptteil weit aus der Ganglienzellschicht (GCL) in die IPL hineinreicht. Ihr Vorteil ist es also, dass sie sehr einfach und eindeutig wieder erkannt werden können (beim Goldfisch z.B. Cook et al., 1992). Diese Prämisse ist nicht immer einfach zu erreichen, doch ist für die Wiedererkennbarkeit und praktische Anwendbarkeit eine detaillierte und konzentrierte Beschreibung der einzelnen Ganglienzellen von unverzichtbarer Wichtigkeit.

Nachdem für mehrere Fischarten inzwischen RGZ beschrieben sind, hat sich das Interesse an der Morphologie der RGZ in der nativen Zebrafischnetzhaut nun daraus ergeben, dass mehr und mehr genetische Mutationen gefunden wurden bzw. werden, die spezifische Defekte im ZNS oder in ihrem visuellen System haben.

Ende letzten Jahres (2002) gab es von Mangrum et al., die erste Veröffentlichung über RGZ beim Zebrafisch. Sie stellten einen möglichst vollständigen Katalog aller RGZ auf, indem sie mit direkt auf den N. opticus aufgetragenen *Dil*-Kristallen die RGZ unspezifisch retrograd anfärbten. Sie klassifizierten auf morphologischer Basis elf verschiedene GZ und beschrieben die Dichte der Zellen in einzelnen Netzhautarealen. Die Nomenklatur orientiert sich bei Mangrum et al. hauptsächlich an den Eigenarten der dendritischen Verzweigungen in der IPL (stratifiziert oder diffus), an der Lage dieser Verzweigung (S1-S5) und an der Größe der Zellen.

## 1.5 Fragestellung und Versuchsansatz

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun schon bekannte und eventuell auch neue RGZ-Typen einer bestimmten Region im ZNS des Zebrafisches, dem Tectum opticum, zuzuordnen und sie morphologisch zu beschreiben.

Die retinotektale Projektion stellt beim Zebrafisch die größte axonale Verbindung der Retina mit einem anderen Kerngebiet dar. Die ersten Axone erreichen noch innerhalb des zweiten Tages nach Befruchtung das Tectum opticum, und durch das appositionelle Wachstum der Retina hält die Erweiterung dieser topographisch organisierten Projektion in das kontralaterale Tectum opticum zeitlebens an. Sie wurde bereits mehrfach entwicklungsbiologisch und an vielen Mutanten des Zebrafisches erforscht (z.B. Trowe, 2000; Gnügge, 2001).

Durch die Technik der iontophoretischen Injektion (nach Whitehead et al., 1991, und Wylie et al., 1998) des Fluoreszenzfarbstoffes Tetramethylrhodamin-Dextran-Amin (*TMRD*) in die *axonalen* Verzweigungsschichten retinaler Ganglienzellen unter der tektalen Oberfläche sollen die RGZ retrograd angefärbt werden. Das dafür verwendete *TMRD* bietet im Vergleich zu früher verwendeten „Tracern“ eine sehr gute und schnelle Diffusionsfähigkeit bei einer kräftigen und detaillierten Darstellung der Zielzellen (Fritsch, 1993).

Im weiteren sollen einzelne *TMRD*-gefärbte GZ mittels in das Zellsoma appliziertem *lucifer yellow* (anderer Fluoreszenzfarbstoff) selektiv doppelgefärbt werden, und so eine zusätzliche Verbesserung der Darstellung dieser RGZ versucht werden.

Die Erfassung und Auswertung soll mit Hilfe eines Laser-Scan-Mikroskops (LSM) und der dazu angepassten Bildverarbeitungssoftware durchgeführt werden, womit eine hoch auflösende, mehrdimensionale Darstellung der Ganglienzellen möglich wird.

## 1.6 Das Tectum opticum

Das Dach des Mittelhirns wird bei Fischen als Tectum bezeichnet. Es ist durch eine longitudinale Furchung in zwei kugelförmige Hemisphären, die Corpora bigemina, unterteilt. Das Tectum opticum des Zebrafisches zählt dabei zu den höheren visuellen Zentren und ist als solches durch seinen mehrschichtigen Aufbau eine auffällige Hirnstruktur. Bei den Säugetieren entspricht diese Region dem *Colliculus superior* und ist im Verhältnis zu anderen Hirnstrukturen deutlich kleiner als dies bei den Knochenfischen zu finden ist (siehe Abbildung 4).

Die im Tectum opticum bestehende neuronale Schichtung kann in ähnlicher Ausprägung bei Goldfischen und anderen Vertretern dieser Familie gefunden werden (Sajovic & Levinthal, 1982). Durch geeignete Darstellung lässt sich zeigen, wie efferente Neurone, die im Tectum opticum liegen und in andere Regionen des ZNS projizieren, ihre Dendriten selektiv in einzelnen Schichten dieser Hirnrinde ausgebreitet haben. Die Schichtung des Tectums korrespondiert mit einer funktionell bedingten Laminierung der axonalen Projektion der retinalen Ganglienzellen (Wiggers, 1999).

Diese afferenten Axone der RGZ lassen sich also einzelnen Unterschichten der insgesamt vier Hauptschichten zuordnen, wobei sie bevorzugt in der superfiziellen Zone laminieren und deshalb sehr gut für gezielte Injektionen von Farbstoffen zugänglich sind und außerdem in histologischen Schnitten gut kontrolliert werden können (Wullimann et al., 1996). Dabei werden die Netzhautregionen topographisch auf die Tectum-Oberfläche abgebildet (retinotopische Projektion, Butler & Hodos, 1996).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Wichtige Chemikalien, Lösungen, Puffer

Amphotericin B	Serva
Fluor-Save	Calbiochem-Novobiochem
Hepes	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
PBS (NaCl, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Penicillin	Serva
Tissue Tek (Polyvinyl Alc.<11%, Carbonsax<5%, Nonreact. Ingred.)	Sakura

#### 2.1.2 Farbstoffe

Tetramethylrhodamin-Dextran-Amin	MoBiTec
Lucifer yellow	Sigma
Systox green	Molecular Probes

#### 2.1.3 Medien

Präparation:

Dulbecco`s MEM/ Nut Mix F12 HAM With L-Glutamine,Hepes, Pyridoxine	Life Technologies
---	-------------------

Inkubation:

D.MEM, Penicillin und Amphotericin	Life Technologies und Sigma
------------------------------------	-----------------------------

#### 2.1.4 Geräte

HP 72 LaminAir®, Sterilbank	Hetaeus Instruments
LSM 410 invert	Zeiss
MHR-Mikotom	Zeiss

MVCS 02 npi

npi electronic

Pul-1

World Precision Instruments

Vibrax-VXR

IKA

## 2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Der Zebraärbling (*Brachydanio rerio*, *Cyprinidae*) zählt als karpfenartiger zur Klasse der Knochenfische (Osteichthyes, wie z.B. auch der Goldfisch oder der Karpfen) und dabei zum Unterstamm der Vertebraten. Der Fisch stammt ursprünglich aus tropischen Süßwassergebieten mit Verbreitung in Süd- und Ostasien, vor allem Indien, Pakistan, Nepal und Burma (Barman 1991).

Die bei uns verwendeten Zebrafische stammen aus einer Zoohandlung und werden in Aquarien mit 250 l zu 30-50 Tieren bei 25°C gehalten (Brand et al., 1995), wobei sie einem 12h/12h Hell-Dunkel-Zyklus unterlagen. Die insgesamt 60 untersuchten Zebraärblinge waren sämtlich ausgewachsene Tiere (Standardlänge: ca. 2-3 cm).

## 2.3 Präparation, Fisch

Die Fische wurden mittels eines schnellen Scherenschnittes decapitiert und der Kopf anschließend zur Präparation in eine 60 mm Ø Petrischale mit auf 5-10 °C vorgekühltem Kultur-Medium MEM-Dulbecco F 12 (HAM) (Life Technologies, Paisley, UK) gebracht. Dabei musste möglichst genau auf eine Vermeidung von zusätzlichen Kontaminationen (die Fische sind nicht-steril aufgezogen) und auf (semi-)steriles Arbeiten geachtet werden. Die verwendeten Instrumente und Schalen wurden dazu vor Beginn in 70%-igen Alkohol gelegt, es wurden sterile Medien verwendet und an einer Sterilbank (HP72 LaminAir®, Hetaeus Instruments) mit installierter Gegenluft-Anlage zur Erzeugung von laminarer Strömung in einer klimatisierten Atmosphäre gearbeitet.

Unter mikroskopischer Aufsicht wurden dann die zusammenhängenden Anteile Gehirn ↔ Nervus/Tractus opticus ↔ Bulbi oculi herauspräpariert. Für die anschließende Überführung zur iontophoretischen Injektion wurde das Präparat in frisches Medium verbracht, wobei stets größtmögliche Vorsicht geboten ist, um mögliche Traumatisierungen des Gewebes zu verhindern.

## 2.4 Injektion

### 2.4.1 Herstellung der Kapillaren

Die verwendeten Kapillarnadeln mussten verschiedene Kriterien erfüllen: Die Spitze sollte möglichst dünn sein, um die Gewebsschädigung und die kapilläre Sogkraft beim Eintauchen in das umgebende Medium gering zu halten. Sie darf aber einen Mindest-Innendurchmesser (ca. 5  $\mu\text{m}$ ) nicht unterschreiten, da ansonsten die Farbstofflösung während der Iontophorese nicht aus der Kapillare fließt bzw. diese irreversibel verstopft.

Um eine der Methode angemessene Injektionsspitze zu erhalten, wurden Glaskapillaren (Glass 1BBL W/FIL 1,2mm 6IN, World Precision Instruments) mit einem Puller (PUL-1, World Precision Instruments) gezogen. Die erhaltene Spitze hatte einen Innendurchmesser von meist 1-2  $\mu\text{m}$  und wurde deshalb unter lichtmikroskopischer Kontrolle und zu Hilfenahme eines auf  $\mu\text{m}$  skalierten Objektträgers (Zeiss) mit einer Pinzette auf 5 - 10  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser abgebrochen.

### 2.4.2 Farbstofflösung

Zur Herstellung der Farbstofflösung wurden Kristalle des *TMRD* in wenigen  $\mu\text{l}$  PBS suspendiert (PBS erhöht zusätzlich die Leitfähigkeit der Lösung) und zur weiteren Verwendung in eine Spritze mit aufgesetzter langer und flexibler Kanüle aufgezogen (Nonmetallic syringe needle for filling micropipettes, MicroFil™, WPI).

### 2.4.3 Füllung der Kapillaren

Die Kapillaren wurden mit der flexiblen Spritzenkanüle von der unbehandelten Öffnung her durch langsames injizieren gefüllt, da die Spitze der Kapillare zu dünn war, um sich mittels Kapillarkraft bei einfachem Eintauchen in Farbstofflösung füllen zu können. Nach 15-30 min senkrechter Aufbewahrung der gefüllten Kapillare in einem Becher mit dazu passender Schaumstoffhalterung und hoher Luftfeuchtigkeit hatte sich die Lösung bis in die dünne Spitze ohne residuale Lufteinschlüsse abgesetzt. Nach der Füllung wurden sie nochmals unter dem Mikroskop auf Unversehrtheit überprüft.

### 2.4.4 Iontophorese

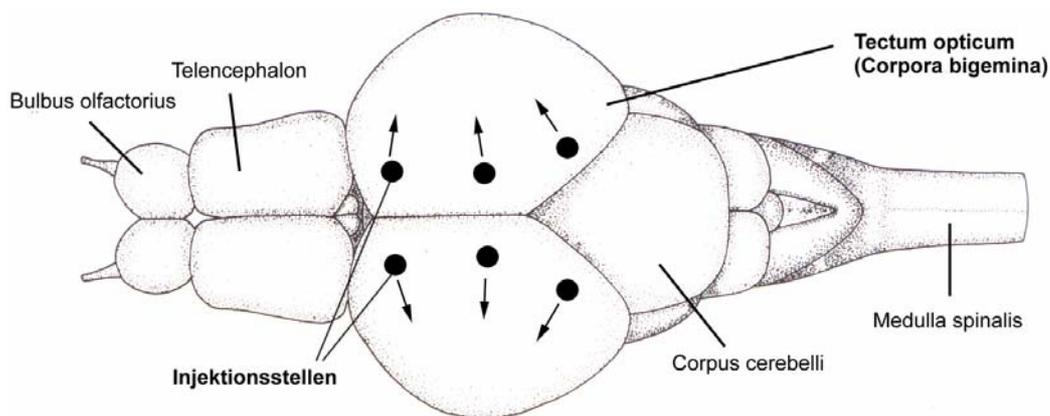
Die Technik der iontophoretischen Injektion wurde mit einigen Modifikationen an die Ausführungen von Whitehead et al. (1991) und Wylie et al. (1998) angelehnt. Unter ständiger Kühlung der Petrischale auf einem handelsüblichen Kühlblock wurde das Präparat direkt in die Iontophorese-Apparatur gebracht. Diese wurde vorbereitet, indem die gefüllte Kapillare in einem stereotaktisch-manipulierbaren Arm fixiert wurde und je ein chlorierter Silberdraht in die Farbstofflösung bzw. in die Inkubationslösung der Petrischale eintauchte. Die Drähte standen in gepolter Verbindung mit dem Applikationsgerät MVCS O2 npi. Das Gerät ermöglichte eine stufenlos einstellbare elektrische Stromstärke im  $\mu\text{A}$ /  $\text{nA}$  - Bereich, die bei Bedarf schnell an- und abgeschaltet werden konnte.

Zur exakten Positionierung der Injektionsspitze über der Oberfläche der beiden Corpora bigemina und zur bestmöglichen lichtmikroskopischen Sicht auf das initiale Durchstechen der Meninx primitiva war es notwendig, das Medium aus der Petrischale abzulassen, dann gezielt wenige  $\mu\text{m}$  tecto-cortical einzustechen und anschließend das Medium sofort wieder aufzufüllen. Unter ständiger Sichtkontrolle wurde nun mit 3-4  $\mu\text{A}$  in positiver Polung der Kapillare Strom appliziert, wodurch das anionische TMRD/PBS-Gemisch die Kapillarspitze verließ. Um den Farbstoff möglichst gewebeschonend injizieren zu können

wurde während der insgesamt 2-4 min (Dauer je nach Durchmesser der Spitze) dauernden Injektion der Stromfluss zyklisch alternierend in jeweils 15 sec langen Intervallen an- und abgeschaltet.

Das *TMRD* wird von den leicht verletzten terminalen Axonanteilen entlang des Stichkanals transmembranär aufgenommen und retrograd-axonal zum Soma der GZ in der Retina transportiert (sogenanntes „tracing“).

Nach erfolgreichem Procedere wurde die Kapillarspitze aus dem Tectum gezogen und insgesamt je drei Injektionen ipsi- und kontralateral gesetzt, um eine möglichst vollständige Abbildung der ganglionär-tektalen Projektion (Trowe, 2000) zu erzielen. Dabei wurde von Tectum zu Tectum der Abstand der Injektionsstellen zur intertectalen Kommissur variiert.



**Abbildung 4.** Schematisierte Darstellung des Zebrafischgehirns mit den tektalen Injektionsstellen von *TMRD*. Mit den Pfeilen sind die Änderungen der Injektionspunkte zur möglichst vollständigen retrograden Erfassung aller retinaler Gebiete gekennzeichnet. In dieser Abbildung ist das Größenverhältnis des Tectum opticum zu anderen Hirnschnitten sehr gut zu erkennen. (modifiziert nach Wullimann et al., 1996)

## 2.5 Inkubation

Zur Optimierung der Inkubation in Bezug auf die Erhaltung von Tonizität und Trophik des neuro-ektodermalen Gewebes wurden in anfänglichen Versuchsreihen die Parameter Medium, Dauer, Temperatur und O<sup>2</sup>- Insufflation variiert. Das Gewebe zeigte sich dabei äußerst empfindlich.

Als überlegenes Inkubationsmedium stellte sich ein Mix aus MEM Dulbecco F12 mit addiertem Penicillin und Amphotericin B heraus, um bakterielles und mykotisches Wachstum zu verhindern. Entgegen der Inkubationen anderer Fisch- bzw. Reptiliengehirne war es für das Gewebe günstiger, das Medium nicht zu wechseln, da ein Wechsel keinen sichtbaren Vorteil erbrachte und außerdem zusätzliche Traumata bedeutete. Falls es trotzdem gewechselt werden musste, so musste darauf geachtet werden, das neue Medium vorher auf die bisherige Inkubationstemperatur zu bringen.

Der retrograd-axonale Transport von *TMRD* und die vollständige Anfärbung der Ganglienzelle in der Retina benötigte ca. 48 Std.. Dafür galt es eine Strecke von ca. 4-8 mm intraaxonal aktiv zurückzulegen. Für die Inkubation befanden sich die Gehirn-Augen-Präparate in Petrischalen innerhalb einer Kunststoffbox, die mit einem Carbogengasgemisch (95% Sauerstoff/ 5% Kohlendioxid) atmosphärisch gefüllt wurde. Die Insufflation musste während den 48 Std. zweimalig wiederholt werden. Um eine gute Sauerstoff-Versorgung der Medien zu sichern war es sinnvoll, kleine Petrischalen (35x10 mm) zu verwenden und diese so gering wie gerade nötig aufzufüllen. Die Box wurde auf einem Schüttler (IKA-Vibrax-VXR) in einen Kühlschrank bei 9 °C eingestellt. Die Inkubation bei diesen Temperaturen brachte entscheidende Vorteile für den Gewebeerhalt und verzögerte den Farbstoff-Transport überraschenderweise nicht oder nur sehr wenig. Außerdem galt es zu bedenken, dass die Löslichkeit von Körpergasen bei zunehmender Temperatur abnimmt.

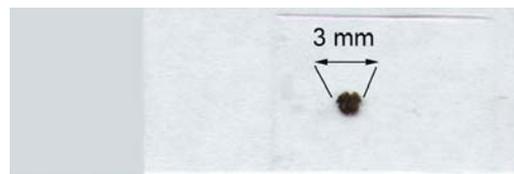
## 2.6 Präparation und Fixierung, Bulbus oculi

Die durch retrogrades Tracing „gefärbten Netzhäute“ wurden nun von der Sklera freipräpariert. Da das Gewebe trotz allem an Elastizität und Trophik abgenommen hatte, musste sehr vorsichtig präpariert werden. Zuerst wurden die beiden Nervi optici direkt am Ansatz der Bulbi durchtrennt, damit diese frei beweglich waren. Die Augen wurden sorgfältig mit einer kleinen Stahlkanüle im Übergangsbereich Cornea-Conjunctiva eröffnet, um dann mittels einer kreuzförmigen Inzision von Cornea, Conjunctiva und anteriorem Skleraanteil den Glaskörper entfernen zu können. Dann wurde mit einem circulären Schnitt entlang der Ora serrata der Augenkupel geöffnet bzw. auch die Adhärenz der Retina an die Augenhäute initial gelockert.

Die Kupel wurden dann zur leichten Fixierung bei Raumtemperatur mit einer Pinzette vorsichtig für 25 min in ein mit 2%-iger PFA-Lösung in PBS (0,1M) gefüllten Eppendorf-Cup eingebracht. Für das erfolgreiche Gelingen der weiteren Präparation war es besonders wichtig, den Glaskörper vor der Fixierung zu entfernen, da er sonst nicht mehr von der Retina abgelöst werden konnte.

Schließlich wurde die Sklera abpräpariert und die Retina an vier sich gegenüberliegenden Polen ( $90^\circ \leftrightarrow 180^\circ \leftrightarrow \dots$ ) eingeschnitten, so dass sie später problemlos aus dem Medium mit einem Objektträger aufgenommen werden und auf diesem zu einer planaren Lage gebracht werden konnte. Die Flüssigkeitsresiduen an der Netzhaut wurden mit abgerundetem Filterpapier vorsichtig aufgesogen.

Zu Konservierungszwecken wurde mit FluorSave (Calbiochem-Novobiochem., San Diego, Calif., USA) eingedeckelt, das sowohl die Fluoreszenz lange erhält als auch ein Eintrocknen der Netzhaut verhindert, indem es nach kurzer Zeit aushärtet.



**Abbildung 5.** Objektträger mit konservierter Retina und noch anhaftendem Pigmentepithel. Durch die Inzisionen lässt sich die Wölbung der Netzhaut abflachen.

## **2.7 Microinjektion von *lucifer yellow***

Bei 30 der insgesamt 120 präparierten und gefärbten Netzhäute wurde der Versuch unternommen, die vorgefärbten Ganglienzellen mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff, *lucifer yellow*, durch direkte Microinjektion doppelt anzufärben. Dies sollte als zusätzlicher Anhaltspunkt und Stütze bei der Frage dienen, ob die dendritische Arborisierung schon zuvor vollständig mit *TMRD* dargestellt wurde und, falls dies nicht der Fall gewesen wäre, dieses dann mit der im Institut schon mehrfach etablierten Methode der direkten, intrazellulären *lucifer yellow*-Injektion zu erzielen.

Aufgrund der besonderen Vulnerabilität des Zebrafisch-Gewebes und der einzelnen Ganglienzellen zeigte sich jedoch, dass die Microinjektion technisch nicht zufriedenstellend und schwerer durchzuführen war als bei den zuvor mit dieser Methode angefärbten Ganglienzellen (u.a. bei Tiefseefisch, Maus und Chameleon). Auch wenn diese Färbungen keine neuen Informationen in Bezug auf die Zellmorphologie erbrachten, werden im Ergebnisteil gut gefärbte retinale Ganglienzellen dieser Methode der Vollständigkeit halber dargestellt und in der Diskussion auf die einschränkenden Kriterien eingegangen.

## **2.8 Schnittbildkontrolle des Gehirns**

Zur Bestätigung der korrekten, cortico-tectalen Lage der iontophoretischen Injektion und um auszuschließen, dass kein anderer Kern mitgefärbt wurde, wurden mittels eines Kryostat-Microtoms (MHR, Zeiss) von einer randomisierten Auswahl der Gehirne Schnitte angefertigt und diese dann unter mikroskopischer Aufsicht kontrolliert.

### **2.8.1 Fixierung**

Die Gehirne wurden direkt nach der Inkubation in Eppendorf Cups mit einer 4%-igen PFA-Lösung in PBS (0,1M) mit 3% Sucrose eine Stunde lang bei Raumtemperatur fixiert.

### **2.8.2 Schnitthanfertigung**

Das in Tissue-Tek® (O.C.T™ Compound, Sakura) zur Erhärtung und Blockbildung eingebettete Gehirn wurde mit dem Kryotom bei -20 °C in 50 µm Coronalschnitte zerteilt und nach und nach je 6-10 Schnitte nebeneinander auf einen mit Gelatine überzogenen Objektträger gezogen.

Mittels eines Laser-Scan-Mikroskops konnten diese Schnitte dann zu Dokumentationszwecken digitalisiert werden.

## **2.9 Digitalisierung der Ganglienzellen**

Zur Gewinnung von digitalen dreidimensionalen Aufnahmen der RGZ, die in das Tectum opticum projizieren wurde ein konfokales Laser-Scan-Mikroskop (LSM 410 invert, Zeiss Micro Systems, Jena, Germany) verwendet. Insgesamt wurden von 182 RGZ Aufnahmen für potentielle, weitere Auswertungen gemacht. Diese Anzahl wurde nach genauer Durchsicht auf 86 RGZ reduziert, da nur diese vollständig allen Kriterien der Auswertung entsprachen.

Der Farbstoff *Tetramethylrhodamin-Dextran-Amin* hat ein Absorptions-Maximum bei 555 nm und ein Emissions-Maximum bei 580 nm. Zur Anregung wurde deshalb ein Helium-Neon-Laser 543 nm (grün) und ein Lowpass-Filter von 570 nm, der Licht unter 570 nm nicht durchlässt, verwendet. So wurde nur das von den Zellen emittierte Licht aufgenommen und das kurzwelligere Anregungslicht ausgeblendet.

Für die Analysen der mit *lucifer yellow* doppelt markierten Zellen (Absorptions-Max.: 428 nm, Emissions-Max.: 532 nm, Sigma) kam ein Argon-Laser 488 nm

(blau) zum Einsatz. Um eine auswertbare, verlustfreie Anzahl an Querschnitten (sogenannten „sections“) zu erhalten wurde eine Schrittweite des Scanvorgangs in z-Richtung von 1  $\mu\text{m}$  ausgewählt. Der Scanbereich (Schichtenfolge/-tiefe) begann im äußeren Teil der INL und reichte bis zu dem gefäß- und axondurchzogenen Stratum neurofibrarum (siehe Abbildung 3). Zur Sichtung der RGZ-Verteilung und -Lage auf der jeweiligen Retina wurde mit 10x- und 20x-Objektiven gearbeitet. Nachdem die einzelnen GZ in den sichtbaren Bereich eingestellt waren, konnte man über die LSM-Software die Lage der Schichten festlegen und sie als Stapel einscannen.

Sämtliche Bilder wurden je nach dendritischer Feldgröße mit 40x/ 1,2- oder 60x/ 1,2-Wasserimmersionsobjektiven angefertigt. Um das Optimum aus Scandauer („Belichtungszeit“  $\approx$  Ausbleichung) und Detailsichtbarkeit zu erzielen, lag die Auflösung bei 512x512 Pixel. Pro Zelle entsprach dies Stapeln von 30-70 Schnittbildern, die im tif-Format archiviert wurden.

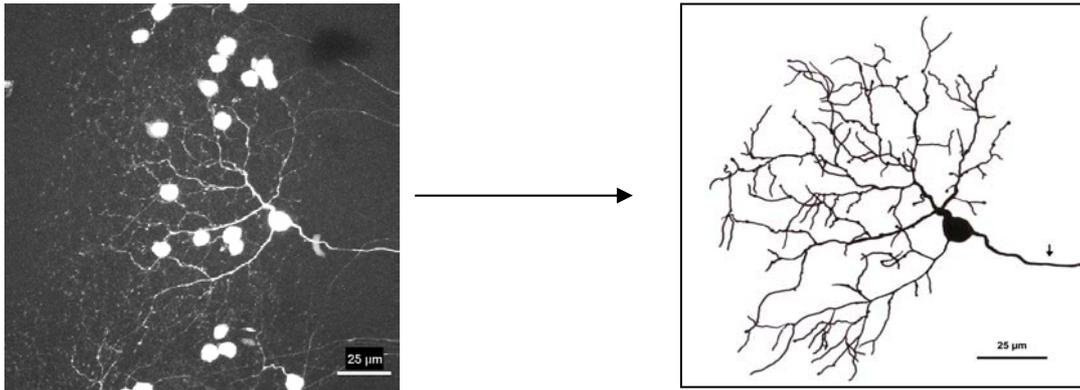
### **2.10 Manuelle Weiterverarbeitung, Zeichnung**

Trotz der relativ hoch aufgelösten Darstellung der Zellen in den LSM-Bildern war es von zweckmäßigem Interesse übersichtlichere und quantitativ exakter erfassbarere Abbildungen zu schaffen.

Für jeden presumierten Ganglienzelltyp wurden deshalb mehrere Exemplare manuell mit verschiedenen breiten Permanent-Stiften auf Klarsichtfolien, Ebene für Ebene, übertragen, indem die Folien auf einen umgeklappten Notebook-Bildschirm mit eingepasster Glasplatte und geeigneter Viewer-Software für maximale Schichtenvergrößerung (Irfan View 3.75, Freeware) gelegt wurden.

Das erhaltene zweidimensionale Bild der RGZ in Aufsicht wurde anschließend nochmals mit dem errechneten zweidimensionalen Aufsichtbild des Stapels auf Deckungskonkordanz überprüft und der Maßstab entsprechend übertragen.

Der Abbildungswandel einer RGZ ist an einem Beispiel in Abbildung 6 illustriert.



**Abbildung 6. Manuelle Übertragung einer RGZ aus einer LSM- Originalaufnahme. Da die umliegenden mitgefärbten Ganglienzell-Somata in einer anderen Tiefenebene als die dendritischen Verzweigungen der vollständig gefärbten RGZ liegen, kann diese durch die unter starken Vergrößerungen schichtweise durchgeführte Abzeichnung in eine klarere Darstellung überführt werden.**

## 2.11 Quantitative Auswertung

Um die Identifikation der gefärbten RGZ im Bezug auf eine Typisierung und den möglichen Vergleich mit schon beschriebenen Morphologien zu erreichen, sollten alle sinnvollen und anerkannten Zellparameter dokumentiert werden.

Zur Anwendung kam hierfür die LSM-Software (LSM-Zeiss 3.95), welche es ermöglichte, die gesammelten Stapel einzelner Schichtbilder als dreidimensionale Objekte darzustellen bzw. zweidimensionale Flächen und Strecken zu messen und eventuell benötigte nachträgliche Helligkeits- und Kontrastveränderungen durchzuführen, um den Beginn der INL erkennen zu können.

Für Einzelpunkt-Zählungen wurde die IT 3-Software benutzt (ImageTool 3.0, The University of Texas Health Science Center, San Antonio).

### 2.11.1 Vermessung, Soma

Das Zellsoma wurde durch manuelles Umfahren auf die Gesamtfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) hin vermessen. Für die verschiedenen Zellgruppen wurde ausschnittsweise auch die Breite und Länge ( $\mu\text{m}$ ) der Zellkörper gemessen, um die für die

Wiedererkennbarkeit sehr wichtigen Aussagen über ihre Form in Auf- und Seitenansicht objektivieren zu können.

### **2.11.2 Vermessung, dendritische Arborisierung**

Für diffus in der IPL stratifizierende Zellen wurden Messwerte für die Gesamtausdehnung des dendritischen Feldes ( $\mu\text{m}^2$ ), die Anzahl der primären Dendriten am Soma, die Dicke der IPL ( $\mu\text{m}$ ), die Anzahl der Verzweigungspunkte der Dendriten und die Anzahl der dendritischen Endausläufer registriert. Außerdem wurde die Dichte des Verzweigungsmusters beschrieben.

Die Gesamtdicke der IPL musste dabei für jede Netzhaut eigens bestimmt werden, da sie einer nicht unbedeutenden Variabilität unterlag (bei TMRD-gefärbten Zellen: 5-18 $\mu\text{m}$ ). Dies geschah durch einen langsamen Schichtendurchlauf bei verstärkter Bild-Helligkeit und -Kontrast, wodurch jeweils Ende (GCL bzw. Beginn der dendritischen Verzweigung in die IPL) und Anfang (am weitesten vitreal gelegener Anteil der INL) der IPL festgelegt werden konnten (ähnlich Cook und Sharma, 1995).

Bei RGZ mit einer Mono- oder Bi-Stratifizierung in der IPL wurde zusätzlich jede Laminierung quantitativ ausgewertet und der IPL-Abschnitt dieser Stratifizierungen notiert, um sie nach ON- bzw. OFF-Reaktionen ihrer Neurone auf einen Lichtreiz nach Famiglietti et al., 1977, einordnen zu können. Die Einteilung der IPL-Schichten in ON- und OFF-Neurone konnte wie eingangs beschrieben von Connaughton und Nelson, 2000, beim Zebrafisch am Beispiel der Bipolarzellen erfolgreich bestätigt werden. In der traditionellen Einteilung der IPL in fünf gleiche Schichten nach Ramon y Cajal (1892) entsprechen so die äußeren drei Schichten der IPL (S1-S3) den OFF-Neuronen und die Schichten S1-S2 am inneren Teil der IPL den ON-Neuronen (siehe Abbildung 3).

Um die dendritische Feldgröße einheitlich und vergleichbar bestimmen zu können, wurden die Endpunkte der Dendriten unter Vergrößerung linear

miteinander verbunden, so dass eine Art Polygon entstand. Die Zählung der Verzweigungs- und Endpunkte konnte aus Gründen der Genauigkeit nur für die insgesamt 35 gezeichneten RGZ durchgeführt werden.

## 2.12 Klassifikation und Nomenklatur der Ganglienzellen

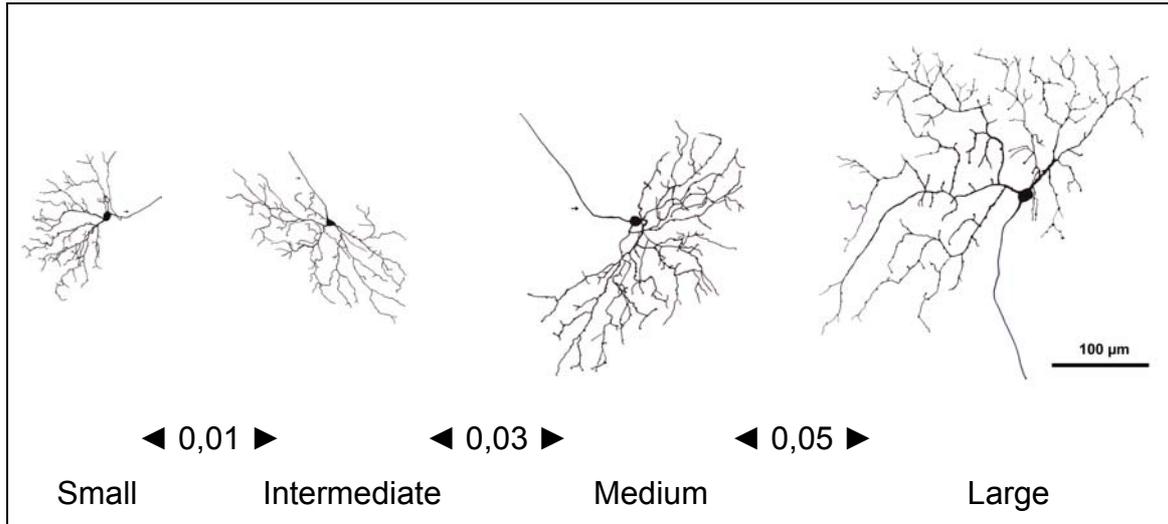
Die Einzelwerte wurden im Ergebnisteil, für Vergleiche untereinander und aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit, neben den einzelnen Besprechungen im Ergebnisteil zusätzlich tabellarisch und in Übersichtsabbildungen aufgetragen (Tabelle 1 bzw. Abb. 21 und 22).

Für die Typisierung der RGZ waren folgende vier Kriterien ausschlaggebend (nach Bellintani-Guardia und Ott, 2002) :

- (1) die Ausdehnung des dendritischen Feldes – small/ intermediate/ medium / large (siehe Abbildung 7)
- (2) die Art der Stratifizierungen – diffus/ mono/ bi-stratified (d/m/bi)
- (3) bei planar stratifizierten GZ die Einordnung in S1-S5 Schichten nach Ramon y Cajal (1892) und in a- (outer/OFF) bzw. b-Zone (inner/ON) nach Famiglietti und Kolb (1976)
- (4) die Abmessungen der Somata

Die Anzahl der Verzweigungs- und Endpunkte des dendritischen Feldes ist als Kontrolle der Konsistenz einer Zellgruppe und als weiteres Differenzierungsmerkmal ebenfalls mit einzubeziehen. Sie werden gesondert von der tabellarischen Ansicht der anderen Parameter in Abbildung 21 dargestellt.

Die Angabe der dendritischen Feldgrößen und Verzweigungsarten erfolgte im Hinblick auf eine Publikation und angelehnt an die international etablierte Nomenklatur in englischer Sprache bzw. deren Abkürzungen.



**Abbildung 7. Größentabelle der dendritischen Felder. Dargestellt sind einzelne Vertreter der jeweiligen Größenbereiche. Die Einteilung in verschiedene Größen ist in relativer Abhängigkeit voneinander zu sehen. Die Einheiten der dendritischen Feldgrößen sind  $\text{mm}^2$ , der Maßstab der Abbildung ist im Bild rechts aussen angegeben. Dabei sind die Einteilungen wie folgt: small – alle RGZ kleiner 0,01; intermediate – zwischen 0,01 und 0,03; medium – zwischen 0,03 und 0,05; large – alle RGZ größer 0,05.**

## 2.13 Verwendete statistische Methoden

Für die Auswertung der Ganglienzellmorphologie wurde aus Gründen der praktischen Vergleichbarkeit zu anderen Arbeiten (z.B. Mangrum et al., 2002) die Verwendung von arithmetischen Mittelwerten und der dazugehörigen Spannweite ( $124 \pm 10,4 \mu\text{m}^2$ ) einer Angabe von Median-Werten und ihren Percentillen bevorzugt. Obwohl dies meist „Ausreißer“-bedingt zu einer geringen Verzerrung der Ergebnisse führte, kann hier trotzdem festgestellt werden, dass die angegebenen Mittelwerte sehr nah an den jeweiligen Medianen lagen und durch diese Methode keine Unterschiede in der Zellklassifikation entstanden sind. Sonstige angegebene Werte sind dimensionslose, diskrete Zahlen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Anfärbung tectopetaler RGZ mit *TMRD*

Die Kontrolle des Injektionsgebietes in den Gehirnschnitten zeigte, dass der Farbstoff sich auf das Tectum beschränkte (siehe Abbildung 9). Die zelluläre Aufnahme des Tracers beschränkte sich nur auf die GZ-Axone, die von der Kapillarspitze beim Eindringen verletzt wurden und in der Umgebung lagen. Der Farbstoff *TMRD* durchwanderte die RGZ-Axone retrograd und färbte die kontralateral gelegenen GZ je nach Inkubationszeit und Position der Axone im Tectum bzw. der Somata in der Retina auf unterschiedliche Weise an. Die für die Auswertung verwendeten Zellen waren vollständig mit Somata und dendritischer Verzweigung angefärbt.

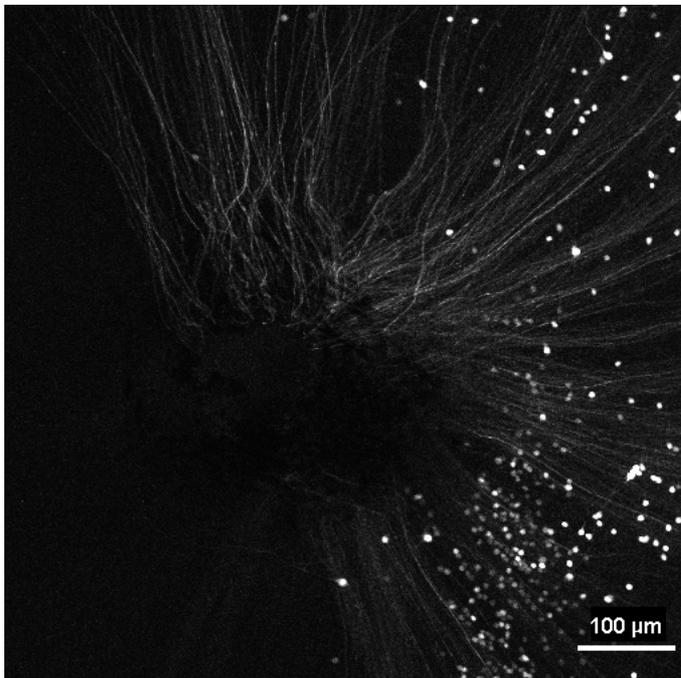
Nach der Theorie der topographischen Organisation neuronaler Projektionen (z.B. Udin und Fawcett, 1988) korrespondiert das Terminationsgebiet der retinalen Axone auf dem Tectum mit der Position ihrer Zellkörper in der Retina. Durch die möglichst punktuell klein gehaltenen Injektionsstellen an jeweils drei verschiedenen Punkten einer Tectum-Hälfte färbten sich daher auch bevorzugt einzelne Felder von Ganglienzellen in der Retina an.

Bezüglich der retinalen Position (temporal/nasal/ventral/dorsal) konnte keine ortsspezifische Verteilung der einzelnen GZ-Typen gefunden werden, einzig war die Quantität der angefärbten Zellen abhängig von der Exzentrizität zum Sehnerv, obwohl verschiedene Tectum-Areale injiziert wurden. Hierbei zeigte sich wie auch schon zuvor beim Zebrafisch (Mangrum et al., 2002), dass der am dichtesten und häufigsten gefärbte Bereich in einer etwa zwei-drittel des jeweiligen Netzhautradius messenden, zirkulär verlaufenden Entfernung von der Papilla nervi optici zur Netzhaut-Peripherie lag. Die Menge der angefärbten Zellen um das Zentrum und in der Peripherie war hingegen eher gering. Die meisten Darstellungen von RGZ in diesem Ergebnisteil stammen aus diesem Bereich, da diese GZ am wenigsten von Axonen anderer GZ überlagert waren. Da die Zellen eines Typus wie eingangs beschrieben von der

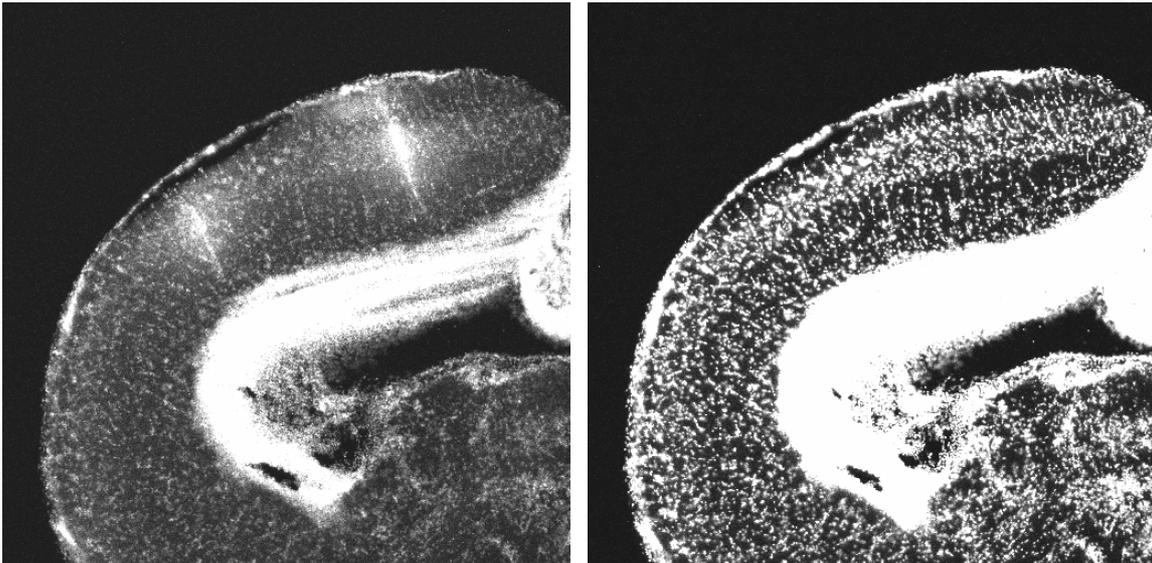
Netzhautperipherie zum -zentrum hin an dendritischer Feldgröße zunehmen, ist dadurch auch die relativ große Spannweite der in Tabelle 1 aufgelisteten Parameter zu erklären.

Ferner lässt sich über die Häufigkeit des Wiederfindens einzelner RGZ pro Netzhaut sagen, dass die jeweils angefärbten Zellen einer Retina sehr häufig isomorph waren. Diese Feststellung deckte sich sehr gut mit dem zu erwartenden Ergebnis, da hier davon ausgegangen werden muss, dass durch die gezielte iontophoretische Injektion nur bestimmte diskrete Schichten des Tectum opticum getroffen wurden. Da nun die Axone der verschiedenen RGZ jeweils ihre spezifische Laminierung mit tectalen Neuronen in diesen Schichten bilden, konnte teilweise sogar ausschnittartig das Verteilungsmosaik einer Ganglienzellart in der Retina dargestellt werden.

Bei der Charakterisierung einer Zellart werden im folgenden immer mindestens zwei RGZ als Vertreter einer Gruppe abgebildet, eine davon auch in Seitenansicht.



**Abbildung 8.**  
Übersichtsaufnahme des Austrittes der GZ-Axone aus der Retina in den Nervus opticus nach multiplen Test-Injektionen in das kontralaterale Tectum. Die Aufnahme entstand bei 20-facher Vergrößerung unter Fluoreszenz-Licht im Laser-Scan-Mikroskop. Retrograd angefärbte Somata stellen sich hier als helle weiße Punkte dar, die Papilla nervi optici mittig als „leere“ Fläche, da nur ein kleiner Anteil aller austretenden GZ-Axone gefärbt ist.



**Abbildung 9.** Zwei radiäre Hirnschnitte durch das Tectum opticum des Zebrafisches. Links wurde unter Fluoreszenzanregung die TMRD-Färbung an zwei Einstichstellen sichtbar gemacht; rechts wird bei gleich gewähltem Ausschnitt durch eine Kern-Gegenfärbung mit *Systox-Green* die tectale Schichtung sichtbar.

### **3.2 Anfärbung vorgefärbter RGZ mit *Lucifer yellow***

Die Doppelanfärbung durch Microinjektion in die mit *TMRD* gefärbten Somata zur Bestätigung der vollständigen Darstellung der dendritischen Bäume durch den ersten Farbstoff erwies sich als schwierig, glückte aber vereinzelt doch sehr gut. Diese Technik setzte eine schnelle digitale Erfassung innerhalb von zwei bis sechs Stunden voraus, da sich zeigte, dass die RGZ den zweiten Farbstoff (*lucifer yellow*) rapide wieder verloren; dies geschah häufig auch schon während der Injektion und sorgte dann für eine zu starke Hintergrundfärbung.

### **3.3 Die einzelnen tectopetalen retinalen Ganglienzellen**

Es wurden ausschließlich Zellen verwandt, bei denen eine eindeutige Bestimmung der IPL-Ausdehnung möglich war. Trotz der Bemühung eine vollständige Liste aller tectopetalen RGZ zu erstellen ist es natürlich möglich, dass manche Zelltypen nicht gefunden wurden, wenn keiner ihrer Vertreter in einer darstellbaren Form isoliert und erfasst werden konnte. Zellen die am äußeren Rande der Retina nahe der Wachstumszone lagen, wurden außer acht gelassen.

#### **3.3.1 Diffus-stratifizierende Ganglienzellen**

Alle RGZ, die sich bezüglich ihrer Stratifizierung innerhalb der IPL nicht in einzelne Schichten (S1-S5) einordnen ließen wurden als diffus-stratifizierende GZ insgesamt fünf verschiedenen Untergruppen zugeordnet. Sie waren von der Ausdehnung ihrer dendritischen Felder kleiner als die monostratifizierenden GZ und werden deshalb als „intermediate“ oder „small“ bezeichnet. Sie bilden mit 60 Zellen (~70%) die größte Gruppe unserer Zusammenstellung.

##### **3.3.1.1 Intermediate d-RGZ (im-d-RGZ) mit 2-3 PD**

Die Somata der im-d-RGZ (n=32) imponierten in der vertikalen und horizontalen Ansicht rund-ovoid und waren bezüglich ihrer Größe im unteren Mittelbereich gelegen ( $84,7 \mu\text{m}^2 \pm 38,6 \mu\text{m}^2$ ).

Von ihnen gingen zwei bis drei Primärdendriten gabelartig Richtung Netzhautperipherie ab, wobei sie am Abgang maximalen Abstand zueinander hielten und sich dann im Verlauf dichotom teilten, was bei den d-RGZ mit drei PD besonders prägnant war. Die Dendriten formten ein dichtes Feld, das sich in der Aufsicht schirmartig auf der dem Axonabgang gegenüberliegenden Seite verzweigte und eine durchschnittliche Größe von  $0,0199 \pm 0,0107 \text{ mm}^2$  hatte. Dabei wird die Bezeichnung „schirmartig“ für eine einseitig auf die Peripherie

gerichtete Verzweigung verwendet, die in der Aufsicht pilz- bzw. schirmförmig gegenüber dem Axonabgang liegt. Typisch waren die bei den meisten Zellen deutlich sichtbaren, teils sehr häufigen, runden Varikositäten, die bevorzugt an Tertiärdendriten begannen. Der dendritische Baum hatte im Mittel (n=10) 69 Verzweigungs- ( $\pm 19$ ) und 76 Endpunkte ( $\pm 20$ ).

Vertreter dieser Gruppe wurden praktisch in jeder der untersuchten Retinae gefunden und waren gleichzeitig die am häufigsten gefärbten RGZ. Sie waren prinzipiell in allen Netzhautregionen zu finden, allerdings, wie alle RGZ, in der äußeren Peripherie und um die Papilla nervi optici seltener.

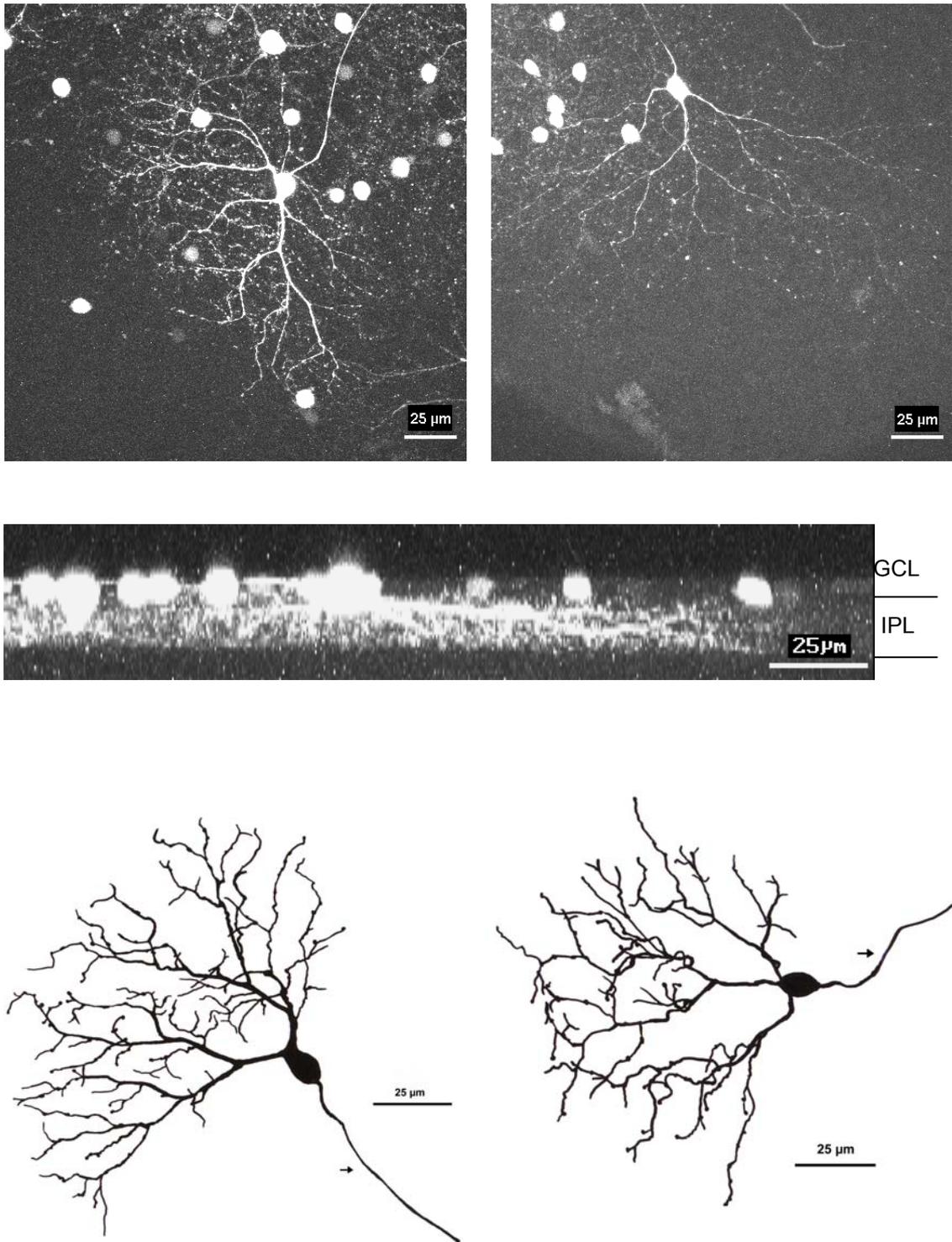


Abbildung 10. Oben: Originalaufnahmen von LSM-gescannten Zellen, mit den zwei bzw. drei PD der intermediate-d-RGZ; Mitte: Seitenansicht der RGZ von dem Bild oben links; unten: zwei Zeichnungen von RGZ ähnlich den oberen. Zu beachten ist, dass typischerweise zwei oder drei Primärdendriten bei gleichem Verzweigungsmuster gefunden werden konnten.

### 3.3.1.2 Doppelt markierte RGZ (dm-im-d-RGZ)

Da es nur sehr wenige vollständig gefärbte Zellen mit dem additiv durch Microinjektion applizierten *lucifer yellow*-Farbstoff gab und diese bis auf eine Ausnahme einem bestimmten Zelltypen entsprachen, wurden aus den insgesamt 22 digitalisierten vier RGZ (n=4) ausgewählt. Sie konnten allen Auswertungskriterien entsprechen und wurden zusätzlich gezeichnet, um mit den dadurch gewinnbaren Daten eine eindeutige Zuordnung zu den nur mit *TMRD* markierten GZ zu ermöglichen und um dann einen Vergleich mit deren Anfärbung durchführen zu können.

Sie entsprachen ihrer Morphologie nach den zuvor beschriebenen im-d-RGZ, da sie ein rundes Soma, zwei kräftige, gabelartige PD und eine dichotome Weiterverzweigung in starke Sekundär- und Tertiärdendriten hatten. Ihre dendritische Arborisierung hatte im Mittel 50 ( $\pm 6$ ) Verzweigungspunkte und 57 ( $\pm 6$ ) Endpunkte, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Anfärbung kleinster Dendriten mit der Zweitinjektion von *lucifer yellow* nicht so gut gelang wie mit der rein retrograden *TMRD*-Färbung. Die Zellkörper waren groß und imponierten übermäßig, fast prall gefüllt:  $117,25 \mu\text{m}^2$  ( $94,8\text{-}128,4 \mu\text{m}^2$ ). Sie waren damit etwa 50% größer als die nicht microinjektiv behandelten Zellen ( $84,7 \pm 38,6 \mu\text{m}^2$ ). Die IPL-Dicke lag methodikbedingt im Schnitt  $20 \mu\text{m}$  über derer von Netzhäuten, die nicht für die Microinjektion präpariert wurden, d.h. die nicht mit feinen Filzteilchen um ein freies Fenster herum eingedeckelt wurden. In diesem Zusammenhang ist auch die geringere dendritische Feldgröße von  $0,0080 \text{ mm}^2$  ( $0,0071 \leftrightarrow 0,0092 \text{ mm}^2$ ) zu sehen, was ziemlich genau der Hälfte der mittleren Feldgröße der im-d-RGZ entsprach ( $0,0156 \text{ mm}^2$ ).

Die *lucifer yellow* markierten RGZ (Abbildung 11 und 12) brachten folglich keine neuen Informationen für die Auswertung, aber konsolidieren um so mehr die gute Darstellung der RGZ durch die retrograde *TMRD*-Färbung.

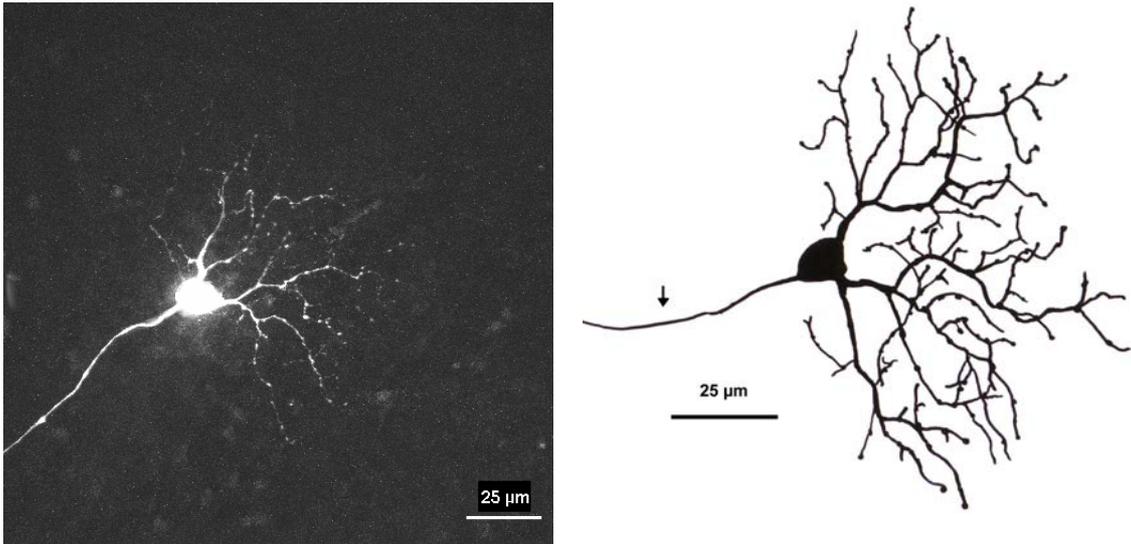


Abbildung 11. Links: Vertikale Aufsicht einer retinalen Zebrafisch-Ganglienzelle, die mit *TMRD* vorgefärbt und dann zusätzlich mit *lucifer yellow* microinjektiv gefüllt wurde, um anschließend wieder mithilfe der LSM-Software rekonstruiert werden zu können. Rechts: Dargestellt ist eine andere, sehr ähnliche dm-im-d-RGZ, die durch manuelle Zeichnung isoliert wurde und dadurch etwas detaillierter wirkt.

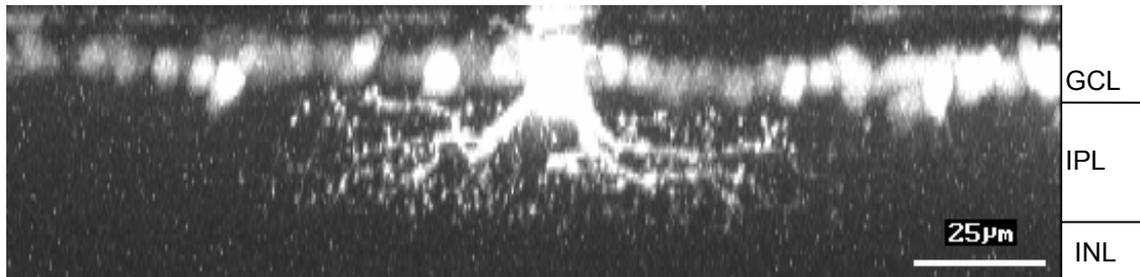


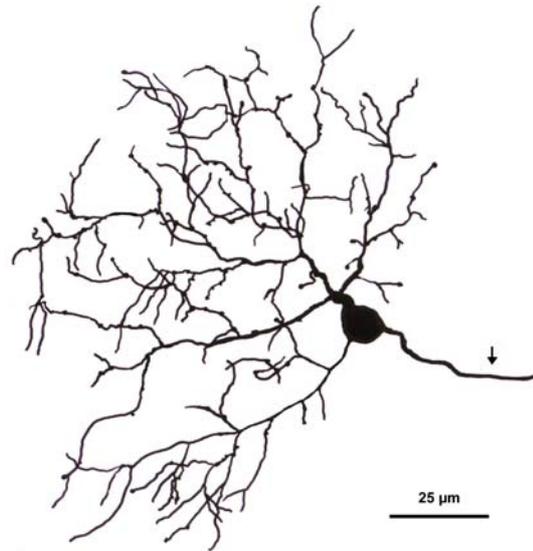
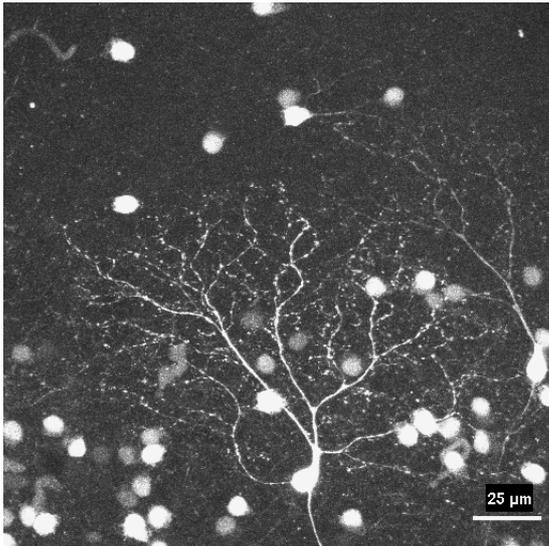
Abbildung 12. Horizontale Ansicht einer dm-im-d-RGZ, die in Abbildung 11 als Zeichnung rechts dargestellt ist. Deutlich erkennbar ist die ungeordnete Verzweigung innerhalb der IPL und die insgesamt größere Schichtdicke der IPL als dies bei den eigentlich gleichen intermediate-d-2-3 PD-Zellen in Abbildung 10 zu beobachten war.

### 3.3.1.3 Small-d-RGZ

Innerhalb der Gruppe der diffus-verzweigten Neurone fanden sich regelmäßig relativ kleine RGZ (n=18), die sich in mehreren Aspekten ihrer Morphologie von den intermediate-d-RGZ mit 2-3 PD unterschieden.

Ihre Somata hatten eine mittlere Größe von  $63,9 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 16,5 \mu\text{m}^2$ ) und waren somit die zweitkleinsten der gefundenen Zellkörper. Sie erschienen in allen Seitenansichten ausgesprochen rund und reichten nur selten für wenige  $\mu\text{m}$  in die IPL hinein. Ihr dendritisches Feld erreichte mit einer mittleren Ausdehnung von  $0,0098 \text{ mm}^2$  ( $\pm 0,0043 \text{ mm}^2$ ) nur etwa  $\frac{2}{3}$  der Größe der intermediate-d-2-3-PD-Zellen, war diesen aber im Bezug auf die Verzweigungsdichte sehr ähnlich. Die Dendriten bildeten ein dichtes, in unserer Anfärbung varikositätenreiches Netz und waren ebenfalls schirmartig auf die Netzhautperipherie gerichtet, wobei das Axon den Zellkörper auf dem Gegenpol verließ. In der Zählung (n=6) fanden sich durchschnittlich 50 dendritische Verzweigungs- und 56 Endpunkte.

Hohen Wiedererkennungswert erhielten die small-d-RGZ durch ihre beiden unterschiedlich dicken Primärdendriten. Das Soma bildete zu einem sehr stark angelegten Primärdendriten hin eine tropfenartige Eminenz, die sich nach kurzer Verlaufsstrecke schnell weiterteilte. Der zweite Primärdendrit war meist auffällig schmaler ausgeprägt und ergänzte das schirmartige Verzweigungsfeld des großen PD seitwärts. Die small-d-RGZ (Abbildung 13) wurden in der gesamten Retina gefunden, wobei auffällig war, dass das dendritische Feld der Zellen um die Papille eher länglich-gestreckt als nur auf die Peripherie gerichtet aussah.



**Abbildung 13. Oben und links mehrere small-d-RGZ mit charakteristischem Soma und dendritischem Baum. Die seitliche Ansicht im Bild unten entspricht der darüber liegenden, gezeichneten Zelle. Die Dendriten finden ein weit und diffus verzweigtes dendritisches Ende in der IPL, welches immer der Netzhautperipherie zugewandt ist. Auf allen Abbildungen ist die typische Ungleichheit der beiden Primärdendriten deutlich sichtbar. Die Maßstäbe sind im Bild als Balken angegeben; die Axone sind jeweils durch einen kleinen Pfeil gekennzeichnet.**



### 3.3.1.4 Intermediate-d-RGZ mit 4-5 Primärdendriten

Eine weitere Untergruppe der diffusen RGZ bilden Neurone, die insgesamt seltener (n=6) vollständig gefunden wurden als die vorigen diffusen retinalen Ganglienzellen.

Ihre Somata waren mit durchschnittlich  $90,4 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 20,7\mu\text{m}^2$ ) mittelgroß und liefen tropfenförmig auf die Netzhautperipherie zu. Es gingen mindestens vier Primärdendriten ab, die dann in der Aufsicht eine schirmartige, sehr dichte varikositätenreiche Verzweigung bildeten (>100 Verzweigungspunkte). Typischerweise stellte auf jeder Seite des Zellkörpers je ein Primärdendrit die Begrenzung des Feldes, das mit einer mittleren Größe von  $0,0120 \text{ mm}^2$  ( $\pm 0,0019\text{mm}^2$ ) im Vergleich zur Somagröße und zu den anderen d-RGZ eher klein war. In der Seitenansicht imponierte der dendritische Baum oft leuchterartig verzweigt.

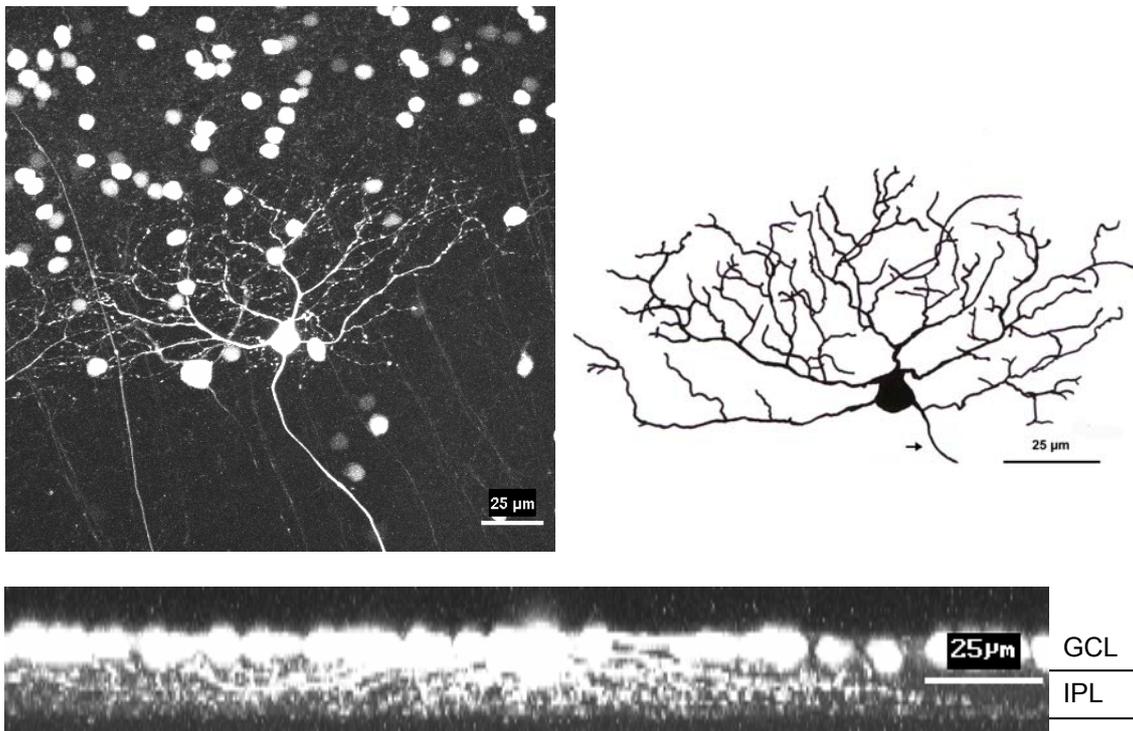


Abbildung 14. Drei Darstellungen von intermediate-d-RGZ mit 4-5 Primärdendriten. Die Seitenansicht unten entspricht hierbei der Original-LSM-Aufnahme im Bild links-oben. Das mittelmäßig große Soma ist dabei auch im Vergleich zu mitgefärbten Zellkörpern in der Umgebung gut aufgrund seiner Form zu unterscheiden. Rechts-oben: Das aus einem Primärdendriten abgehende Axon einer gezeichneten Zelle stellt eine von den üblichen Axonabgängen abweichende, seltenere Variante dar.

### 3.3.1.5 Intermediate-d- RGZ mit 3-4 PD

Zu der Gruppe der diffusen RGZ, die in das Tectum opticum projizieren, gehörte auch eine Zellart, die selten (n=4) vollständig gefärbt vorzufinden war und sich von den anderen diffusen RGZ durch die Morphologie ihres dendritischen Feldes abgrenzen ließ.

Ihre Somata und das dendritische Feld hatten in der *TMRD*-Färbung variable Größen (Soma:  $65,7\mu\text{m}^2 \leftrightarrow 143,5\mu\text{m}^2$ ; Dendrit. Feld:  $0,0110\text{mm}^2 \leftrightarrow 0,0188\text{mm}^2$ ) bei einem typischerweise linsenförmigen Zellkörper, von dem drei, teils auch vier Primärdendriten abgingen. Diese bildeten ein nicht ausschließlich auf die Peripherie gerichtetes, schirmartiges Verzweigungsmuster und verließen das Soma an zwei sich gegenüberliegenden Polen (Abbildung 15). Sie waren in ihren Endungen varikositätenreich und dicht verzweigt. Diese RGZ lagen in ihren Verzweigungs- ( $61 \leftrightarrow 85$ ) und Endpunkten ( $69 \leftrightarrow 101$ ) im Mittelfeld der diffusen RGZ.

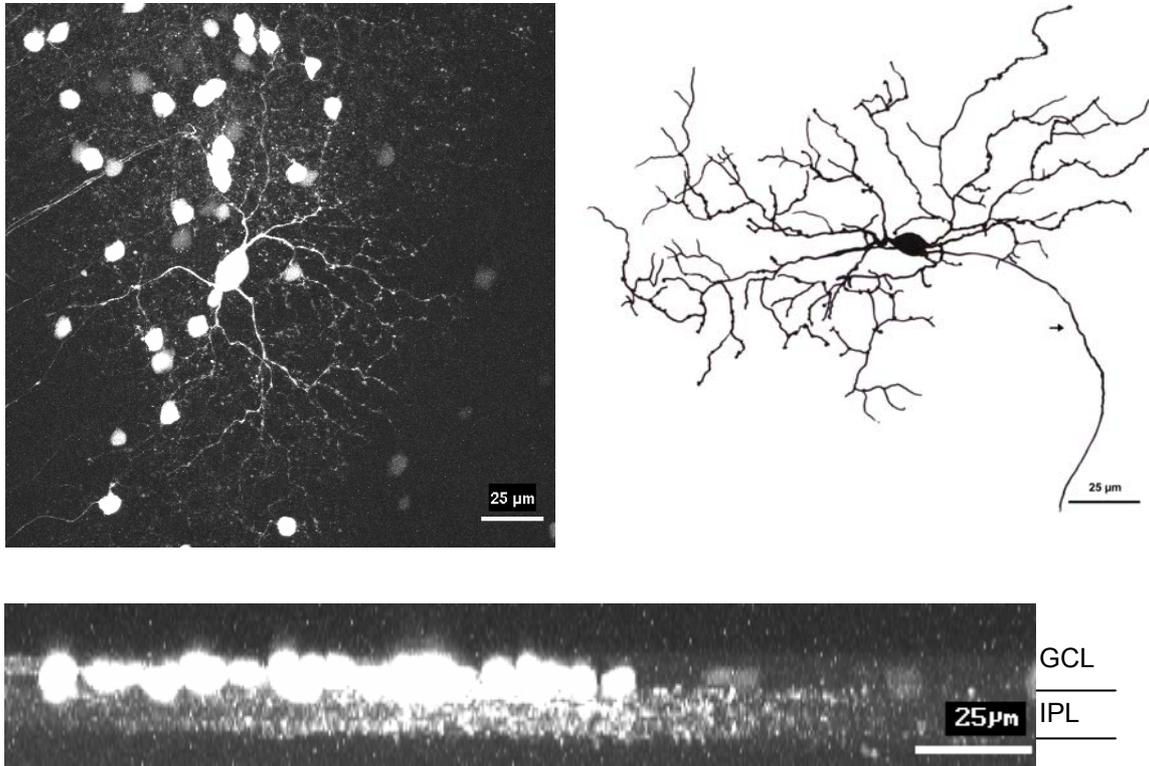


Abbildung 15. Oben: Verschiedene nicht schirmartige intermediate-diffuse RGZ mit 3-4 PD in der Ansicht von vertikal; Unten: In horizontaler Ansicht der in der IPL diffus-stratifizierte dendritische Baum der RGZ links oben.

### **3.3.2 Mono-stratifizierte RGZ (m-RGZ)**

Die mono-stratifizierenden Zellen zeichnen sich durch eine einzelne planare Verzweigungsebene ihrer Dendriten innerhalb der IPL aus.

Es fanden sich dabei sowohl Zellen, die in S1 und S2 (a/OFF-Zone) stratifizierten, als auch RGZ, die in S5 der IPL (b/ON-Zone) ihre Laminierung hatten. Sie wurden nach der Ausdehnung ihres dendritischen Feldes in drei Untergruppen klassifiziert (medium und large a bzw. b), wobei sie alle deutlich größere Arborisierungen ausbilden als sie unter den diffusen-RGZ zu finden waren.

In allen verwendeten Netzhäuten waren im Vergleich zu den diffusen-RGZ nur selten monostratifizierte Zellen angefärbt, insgesamt wurden 17 mono-RGZ (~20%) in die Auswertung aufgenommen.

#### **3.3.2.1 Large-m-a-RGZ**

Unter sämtlichen tectopetalen RGZ waren diese monostratifizierten RGZ (n=10) im Bezug auf die Vermessungsparameter die größten Zellen.

Ihre Zellkörper erschienen in der Aufsicht rund, in der Seitenansicht aber deutlich länger (eiförmig) als die anderen RGZ; die Relation von Länge / Breite des Somas betrug  $21,3\mu\text{m} / 13,9\mu\text{m}$  also ziemlich genau  $1,5 / 1$ . Damit reichten sie weit in die IPL, teilweise bis an die Grenze von S2. Sie kommen trotz der im Vergleich zur Seitenansicht kleineren Aufsicht auf eine mittlere Größe von  $141,3 \mu\text{m}^2 (\pm 33,3 \mu\text{m}^2)$ . Die zwei bis drei abgehenden Primärdendriten wiesen immer einen leichten Unterschied in der Abgangsstärke auf und zogen verzweigungsfrei in kurzem Verlauf in ihre Laminierungen S2 und S1. Dort bildete sich ein, im Vergleich zu den d-RGZ, weniger dicht ausgeprägtes dendritisches Feld mit sehr langem Verlauf der Primär- und Sekundärdendriten und größtenteils auf die Peripherie orientierter schirmartiger Ausrichtung; gelegentlich strebte ein kleiner Sekundärdendrit aus dem Feld zentralwärts. Die Arborisierung erreichte eine mediane Größe von  $0,0638 \text{ mm}^2 (\pm 0,0248 \text{ mm}^2)$  und durchschnittlich 90 (53-113) Verzweigungen und 104 (67-133) Endpunkte.

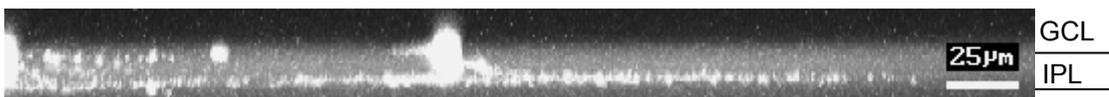
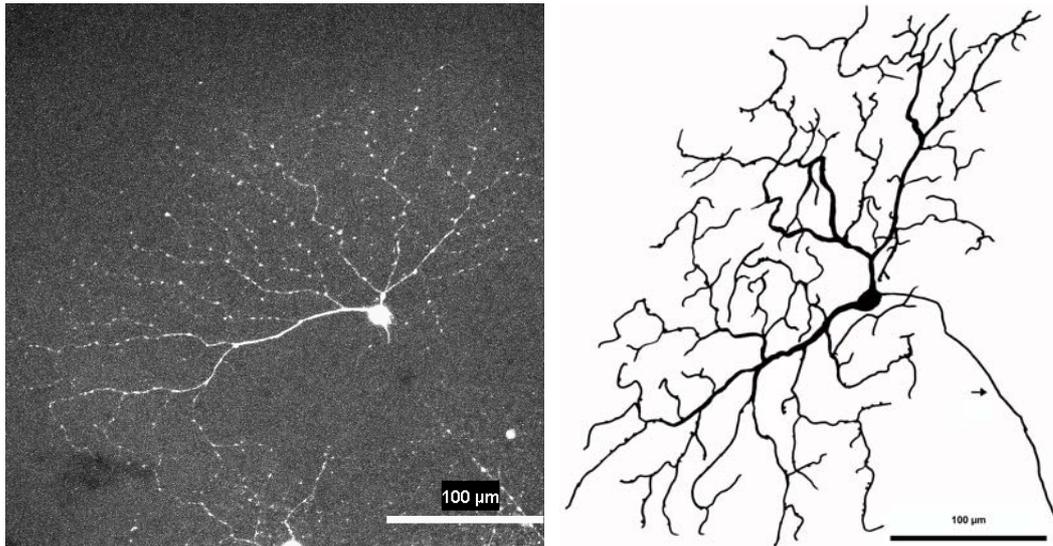


Abbildung 16. Darstellungen der large-mono-stratifizierten RGZ mit sehr großen dendritischen Feldern und Somata bei planaren Verzweigungen in S1 und S2 der IPL. Die beiden Original LSM-Aufnahmen stammen von der selben large-m-RGZ.

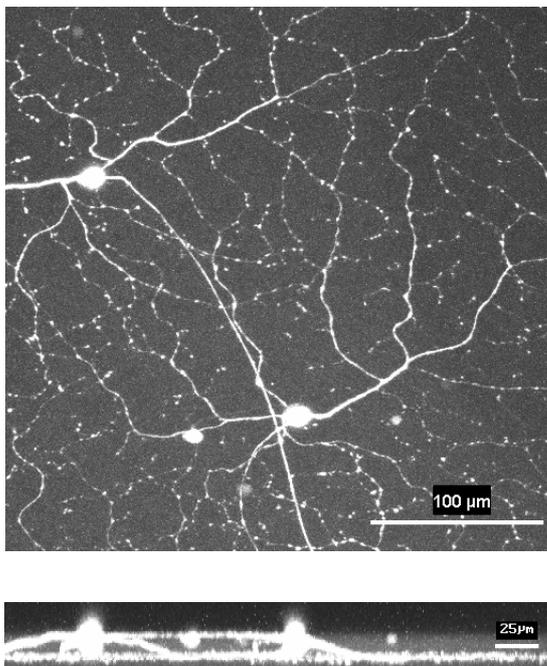
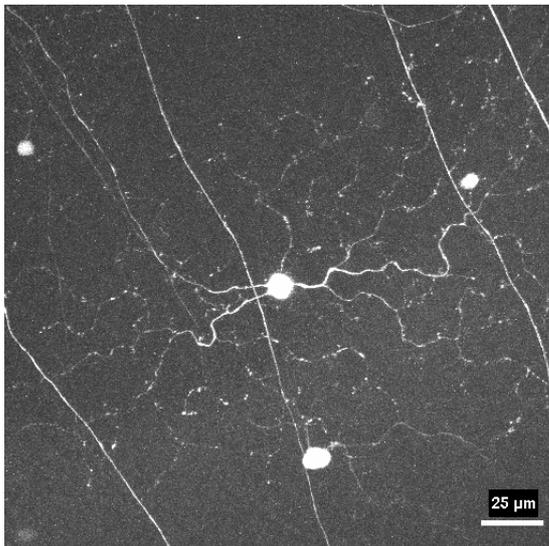


Abbildung 17. Oben: Large-m-RGZ mit sehr langen und gerade verlaufenden PD und jeweils vom linken PD ausgehendem kleinen Sekundärdendriten, der nicht nach peripher gerichtet ist. Die Abbildung soll illustrieren, dass innerhalb einer Retina sehr häufig isomorphe Ganglienzellen gefunden wurden. Dieses Beispiel stellt einen Ausschnitt aus dem sogenannten „Zellmosaik“, hier durch die large-m-RGZ gebildet, dar. Unten: Nochmals sichtbare, weit die GCL überragende Somata in der Seitenansicht mit eindeutig planaren Verzweigungen auf Höhe von S1 im OFF-Bereich der Zebrafisch-Retina.

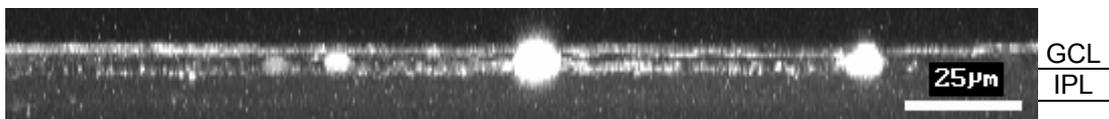
### 3.3.2.2 Large-m-b-RGZ

Unter den sehr selten gefundenen Zellen fanden sich zwei große RGZ, deren Monostratifizierung am vitrealen Ende der IPL lag und eine der größten gefundenen dendritischen Felder ausbildete. Diese Zellen (n=2) hatten große, runde Zellkörper ( $89,5 \pm 7,4 \mu\text{m}^2$ ) und dendritische Felder ( $0,0501 \pm 0,0157 \text{mm}^2$ ), die in S5 der IPL (b/ON) und auch auf Höhe der Ganglienzellschicht gleichmäßig stratifizierten (siehe Abbildung 18).

Ihr dendritischer Baum verzweigte sich gleichmäßig und wenig dicht über die gesamte Fläche.

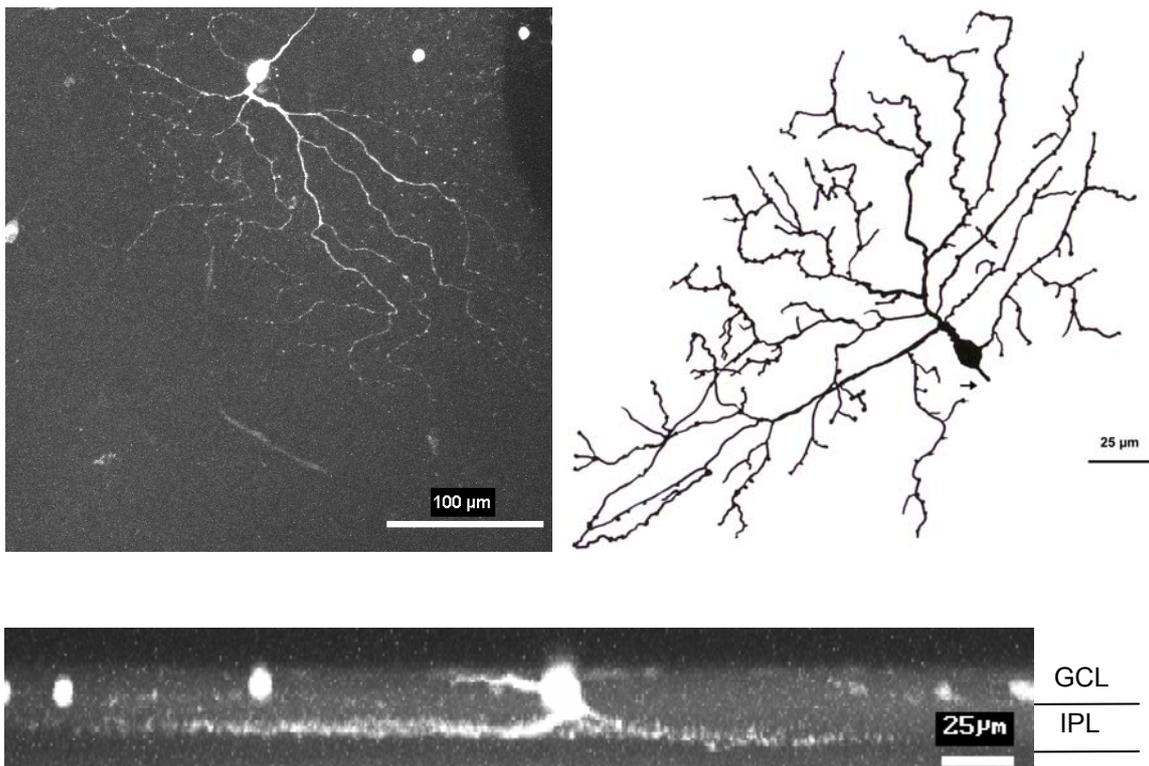


**Abbildung 18. Large-m-b-RGZ im Bild links in Aufsicht, im Bild unten als Seitenansicht. Die Dendriten sind gleichmäßig über das gesamte Verzweigungsfeld verteilt und zeigen in der seitlichen Projektion eine eindeutige Stratifizierung in der S5-Schicht der IPL (b/ON) bis leicht in die Ganglienzellschicht (GCL) hinein. Dicht darüber verlaufen im Stratum neurofibrosum die Axone der Ganglienzellen und ziehen Richtung Netzhautzentrum zur Papilla nervi optici.**



### 3.3.2.3 Medium-m-a-RGZ

Die medium-m-a-RGZ (n=6) hatten neben der kleineren Größe auch einen anderen dendritischen Aufbau als die large-m-a-RGZ, jedoch war der Übergang zwischen den beiden Untergruppen nicht immer scharf getrennt und sofort erkennbar.



**Abbildung 19.** Die medium-m-RGZ mit ihrem weit verzweigten und varikositätenreichen dendritischen Feld und dem ovoiden Soma, das in den beiden Abbildungen oben erkennbar ist. Unten ist die Monostratifizierung bei S1 und S2 der Zelle oben-links dargestellt.

Ihre Somata waren im Mittel  $104,6 \text{ mm}^2 (\pm 38,85 \text{ mm}^2)$  groß und lagen bezüglich ihrer Ausdehnungen im Längsdurchmesser leicht über der Breite. Sie überragten die GCL praktisch nie in Richtung Stratum neurofibromatosum, jedoch reichten sie, wie die Zellkörper der large-m-a-RGZ, in die IPL hinein. Man erkennt auf den ersten Blick vor allem einen starken Primärdendriten, der den Zellkörper über den Axon-abgewandten Pol erreicht, nachdem er sich zu einem schirmartigen dendritischen Feld aufteilt, das durchschnittlich  $0,0386$

( $\pm 0,0106$ ) mm<sup>2</sup> hatte. Teilweise gab es noch einen kleineren Primärdendriten, der das Soma seitlich verließ. Die Dendriten bildeten ein mittelmäßig dichtes Netz und haben an den Endästen disseminierte Varikositäten. In der Zählung ergaben sich durchschnittlich 67 Verzweigungs- und 78 Endpunkte.

### **3.3.3 Bi-stratifizierte RGZ**

Diese Gruppe enthält die am seltensten gefundenen Zellen (n=4; ~5%). Sie hatten in ihrer Arborisierung der IPL zwei voneinander getrennte Laminierungen (medium-bi-a/b-RGZ).

Ihre Somata waren klein mit durchschnittlich 47,3  $\mu\text{m}^2$  (42,0 ↔ 52,6  $\mu\text{m}^2$ ) und zeigten sich in allen Ansichten kreisrund. Sie hatten zwei Primärdendriten von ungefähr gleicher Größe und bildeten ein rund-ovales Verzweigungsnetz. Dendritische Übergänge aus der ersten in die zweite Laminierung gab es an vielen Stellen (10-16), wobei es jeweils an zwei Stellen auch zu einer Rückkehr der Dendriten in ihre Ausgangsschicht mit dortiger Endverzweigung gekommen ist. Die Ausmaße des dendritischen Feldes waren sehr inkonstant und erreichten 0,0191 mm<sup>2</sup>, 0,0367 mm<sup>2</sup> und 0,0691 mm<sup>2</sup>. Aus den Zählungen der Verzweigungs- und Endpunkte wurde ersichtlich, dass sich die beiden Arborisierungsebenen in ihrer Dichte sehr ähnlich waren, wobei sich pro Zelle insgesamt in beiden Parametern jeweils um oder etwas über 100 Punkte finden ließen.

Die eine Laminierung lag in der Einteilung nach Connaughton und Nelson (2000) in der ON-Neuronen-Schicht, an der Grenze von S4-S5 (b-Zone), von wo sie viele Verbindungsäste in die zweite Laminierung gab, welche hingegen ausschließlich im OFF-Neuron-Bereich (a-Zone) der IPL lag.

In Tabelle 1 (S. 44) werden die beiden Stratifizierungen mit S4/S5 und S1/S2 bezeichnet, da die Laminierungen jeweils die Grenze zwischen den beiden skleralen und vitrealen Randschichten der IPL überlappten (Abbildung 22).

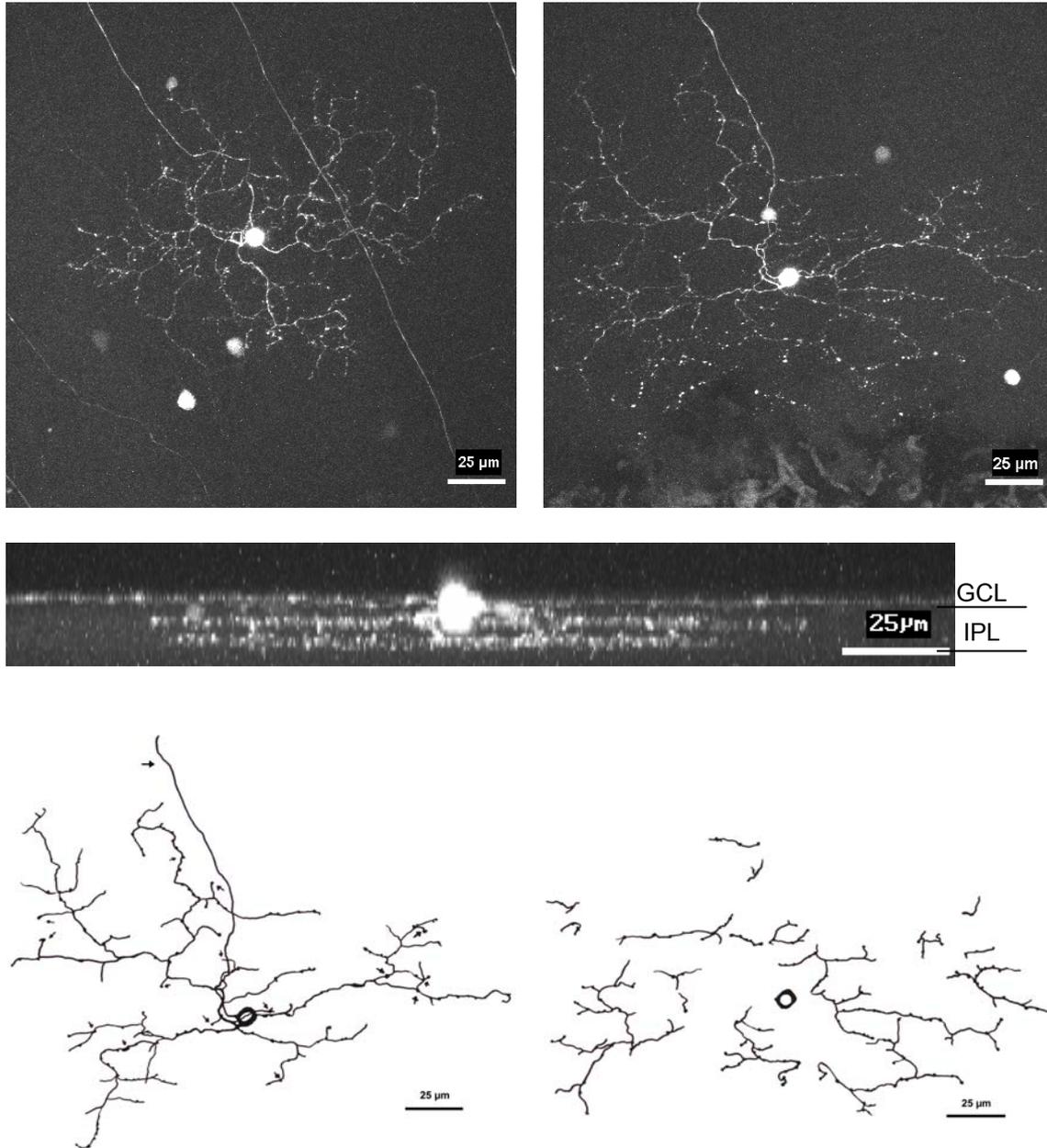


Abbildung 20. Medium-bi-stratifizierte RGZ im Original-LSM-Bild als Auf- und Seitenansicht oben-links und in der Mitte zu sehen; unten die bi-Stratifizierte RGZ aus dem Original-Bild von oben-rechts, jedoch mit gesondert gezeichneten Laminierungen und Kennzeichnungen (kleine Pfeile in der ersten Laminierung links) von Dendriten, die in die zweite Verzweigungsschicht (rechts) übergehen. Mit dem größeren Pfeil ist das abgehende Axon markiert.

### 3.3.4 Nicht-klassifizierte Ganglienzellen

Die bisher beschriebenen Zellen wurden jeweils in verschiedenen Versuchsansätzen und Netzhäuten gefunden und waren damit reproduzierbar. Eine vollständige Erfassung aller RGZ mit tektopetaler Projektion ist hiermit jedoch nicht notwendigerweise gewährleistet, da die Möglichkeit besteht, dass einzelne Zelltypen aufgrund ihrer Seltenheit oder anderer Eigenschaften nicht gefärbt bzw. gefunden werden konnten. Als Indiz dafür können Zellen (n=4) angesehen werden, die nur in jeweils einer einzigen der 120 präparierten Netzhäute vollständig angefärbt waren.

So genannte displaced GZ, die mit ihrem Soma in der INL liegen, konnten nicht gefunden werden, sodass alle beschriebenen RGZ orthotop waren. Bei zwei RGZ entsprang das Axon aus einem Primärdendriten (siehe Abbildung 14).

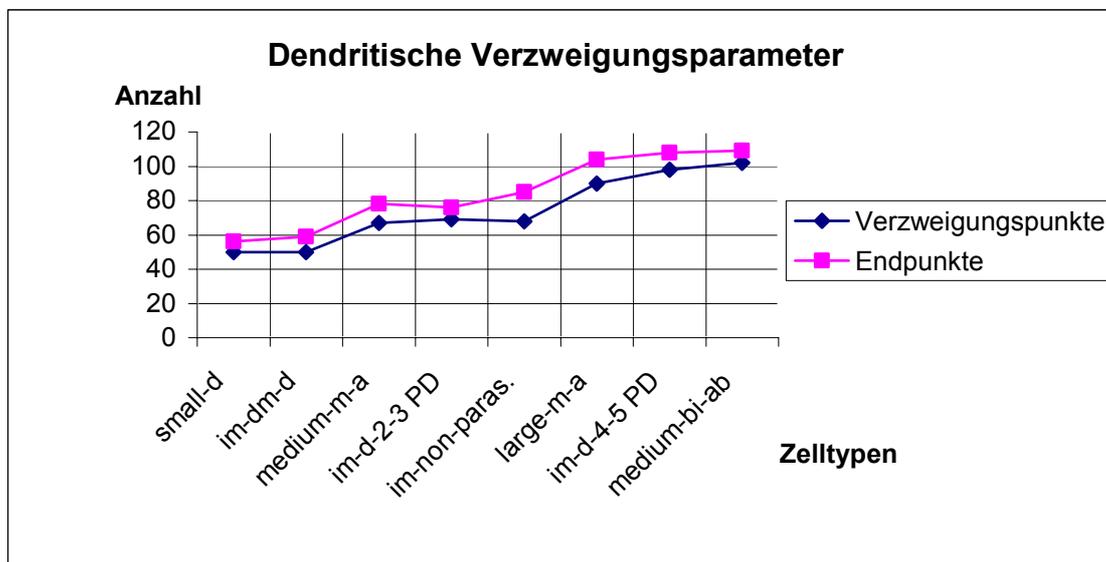


Abbildung 21. Graphische Darstellung der Verzweigungs- und Endpunkte, nach Zelltypen und Anzahl gegliedert. Die gekennzeichneten Einzelwerte entsprechen den Mittelwerten aus allen gezeichneten und somit hierfür erfassbaren RGZ einer Zellart.

## Ergebnisse

**Tabelle 1. Morphologische Daten tektopetaler RGZ beim Zebrafisch.**

Ganglion cell type	Soma area ( $\mu\text{m}^2$ )	Dendritic field area ( $\text{mm}^2$ )	Dendritic arborization level(s) in IPL	Dendritic Branching: Stratified/diffuse	Mangrum et al. cell type	No. of cells
intermediate-d- 2-3 PD	84,7 $\pm 38,6$	0,0199 $\pm 0,0107$	S1 – S5	Diffuse	VII (VIII)	32
intermediate-d- 4-5 PD	90,4 $\pm 20,7$	0,0120 $\pm 0,0019$	S1 – S5	Diffuse	-	6
small-d	63,9 $\pm 16,5$	0,0098 $\pm 0,0043$	S1 – S5	Diffuse	-	18
Intermediate-d-3-4 PD	110,4 $\pm 57,5$	0,0144 $\pm 0,0034$	S1 – S5	Diffuse	-	4
medium-mono-a	104,6 $\pm 38,9$	0,0386 $\pm 0,0106$	S1 + S2	Monostratified	III	6
large-mono-a	141,3 $\pm 33,3$	0,0638 $\pm 0,0248$	S1 + S2	Monostratified	II	10
large-mono-b	89,5 $\pm 7,4$	0,0501 $\pm 0,0157$	S5	Monostratified	I	2
medium-bi-a/b	47,3 $\pm 5,3$	0,0445 $\pm 0,0254$	~S2 and S4/S5	Bistratified	X	4
Not classified						4
<b>Total</b>						<b>86</b>

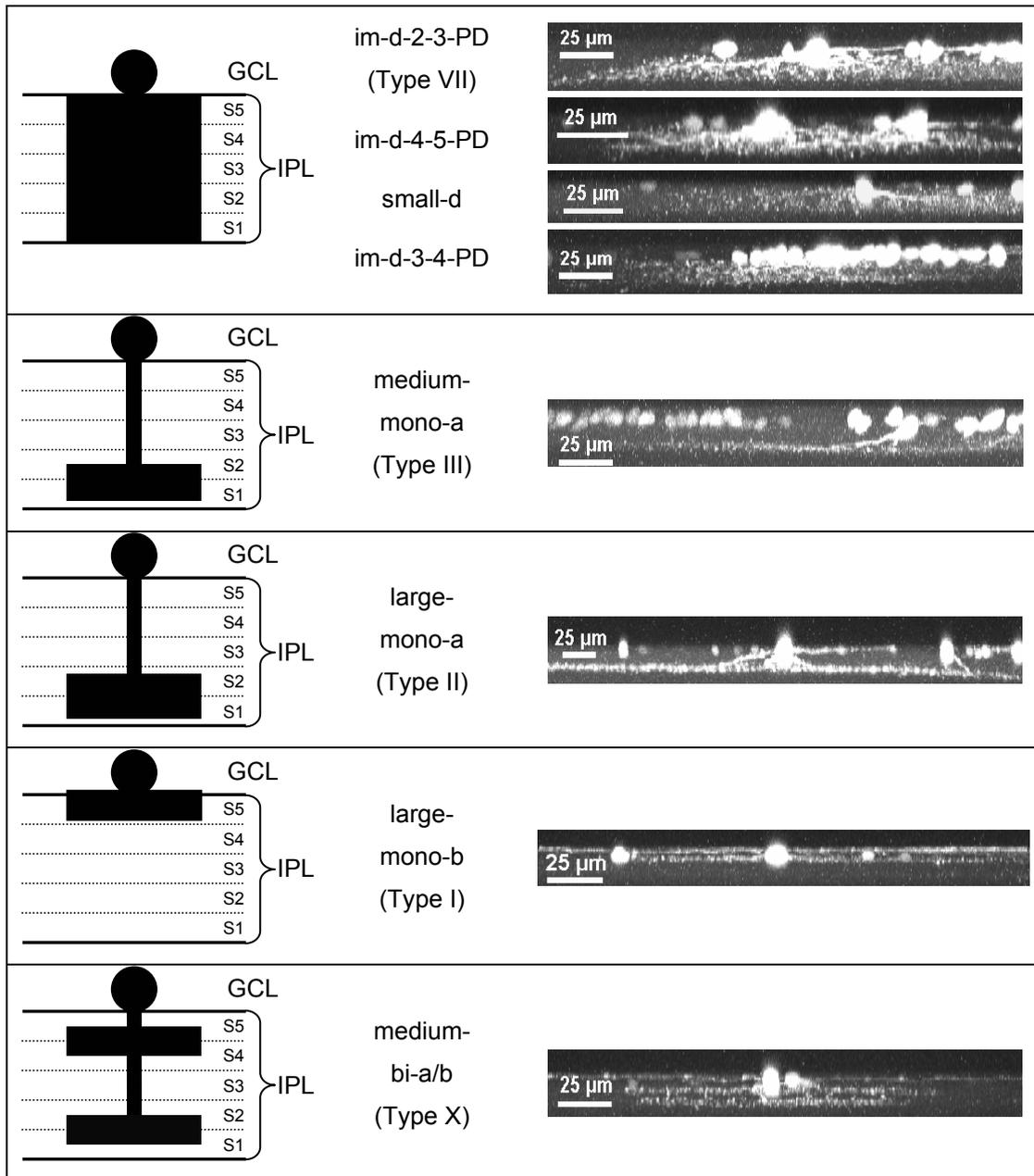


Abbildung 22. Schematisierte Darstellung der Stratifizierungen tectopetaler Ganglienzellen in S1-S5 der IPL nach Ramon y Cajal (1892) mit Angabe der GZ-Typ-Bezeichnungen nach Mangrum et al. (2002) in Klammern. (GCL=Ganglienzellschicht, IPL=Innere plexiforme Schicht).

## 4. Diskussion

Der Zebrafisch ist ein genetischer Modellorganismus und bietet zusätzlich viele Vorteile in der Entwicklungsforschung. So sind in den letzten Jahren vor allem die Netzhautbildung und die axonale Projektion der retinalen Ganglienzellen (RGZ) in das Interesse der Genetik- und Entwicklungsforschung geraten, nicht zuletzt deshalb, weil sie sehr früh beobachtbar sind.

Die meisten Axone der retinalen Ganglienzellen ziehen ins Tectum opticum, welches bei Zebrafischen sehr groß angelegt ist. Die RGZ wurden über diese Axone mittels iontophoretischer Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen in das Tectum opticum retrograd angefärbt.

Dabei fanden sich insgesamt sieben verschiedene Ganglienzelltypen, die über rein morphologische Kriterien definiert wurden. In der Klassifikation dieser Zellen wurden je nach Stratifizierung des dendritischen Baumes in der inneren plexiformen Schicht (IPL) die diffus-, mono- bzw. die bi- stratifizierten Zellen unterschieden und als Hauptgruppen festgelegt. Sie wurden weiter über ihre Größe und das Verzweigungsmuster mit den Abgängen der Primärdendriten in verschiedene Untergruppen unterteilt, wie es in Tabelle 1 dargestellt wurde.

Damit werden die ersten Darstellungen einzelner retinaler Ganglienzellen beim Zebrafisch von Mangrum et al. (2002) weitergeführt und um die axonalen Projektionen einzelner RGZ ergänzt.

## 4.1 Methodendiskussion

Viele der bisherigen Arbeiten in der RGZ-Morphologie basierten auf *Horseradish peroxidase*- und neuerdings auch auf *Dil*-gefärbten Zellen. Hier kam hingegen die im Labor an anderen Spezies schon etablierte Methode der *TMRD*-Injektion zum Einsatz.

Diese Technik erforderte durch die lange Dauer des retrograden Tracer-Transports und der damit verbundenen Inkubationszeit (48h) eine Optimierung aller manipulativen Eingriffe am lebenden Gewebe. Es zeigte sich eine höhere Vulnerabilität des ektodermalen Zebrafischgewebes als dies von z.B. Reptiliengewebe bekannt ist. Da sowohl die inkubierten Augenkelche/ Retinae als auch die Gehirne ausgewertet wurden und die Vitalität der RGZ sich als entscheidend erwies, kommen den Einfluss- und Störgrößen der einzelnen Versuchsschritte große Bedeutung zu.

### 4.1.1 Einflüsse bei der Haltung, Präparation, Injektion und Inkubation

Für die Widerstandsfähigkeit gegen Änderungen der äußeren Bedingungen und für die Vitalität der Knochenfische sollte bei der Aufzucht der Tiere genau auf ein gleich bleibendes Lichtklima geachtet werden. So fand man nicht nur eine embryonale Beeinflussung von Körperwachstum und Geschlechtsreife durch Variation der Lichtintensität und Beleuchtungsdauer (Hamdorf, 1960; Eisler, 1961), sondern auch eine Störung der Temperaturtoleranz bei variierender Photoperiodik (Hoar & Robertson, 1959). Für die Zebrafische war deshalb eine 12h/ 12h- Hell-Dunkel-Periodik vorgegeben.

Die Lage der Temperaturoptima wird außerdem von Sauerstoffgehalt, ph-Wert und der Konzentration verschiedener organischer und anorganischer Stoffe beeinflusst. In vivo rechnet man auf eine Änderung der Temperatur von 10°C eine Verdoppelung der Stoffwechselrate. Das Temperaturoptimum für

Zebrafische lag bei 23-27°C. Plötzliche Temperaturschwankungen, wie sie im Labor häufig beim Umsetzen in ein anderes Medium vorkommen, erhöhten unter anderem die Anfälligkeit des Gewebes auf Keimbesiedlung und förderten so die Zellschädigung (Schlotfeld, 1985). Daher sollten die Medien vor der Umflutung des Gewebes akklimatisiert werden, bzw. bei der hier erwünschten Abkühlung, dies möglichst langsam geschehen. Es könnte vermutet werden, dass eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur einen langsameren axonalen Farbstofftransport verursacht, doch hatte die Temperatur keinen wesentlichen Einfluss auf die Transportrate des *TMRD* (im Versuch getesteter Bereich: 9-20°C). Dafür kam es bei niedrigen Temperaturen (9°C) zu einem besseren Gewebeerhalt; nicht zuletzt durch sehr viel ungünstigere Keimwachstumsbedingungen.

Für die Versorgung des Inkubationsmediums mit Sauerstoff gilt außerdem zu berücksichtigen, dass die Löslichkeit von Gasen in Wasser mit zunehmender Temperatur abnimmt. In diesem Sinne sollte auch darauf geachtet werden, dass das Verhältnis Oberfläche/ Gesamtmenge des Mediums zugunsten der Oberfläche gewählt wird, um das Präparat, bewegt durch das Rütteln während der Inkubation, auch in minder belüfteten Randlagen der Petrischale gut versorgen zu können.

Da die iontophoretische Injektion des *TMRD* mindestens 10 min in Anspruch nahm, musste auch hier eine Erwärmung des Mediums vermieden werden. Für die gezielte, minimal-traumatische Penetration des Gehirns mit der Kapillare wird an Säugetieren vorsichtig die Dura aufpräpariert, um einen Widerstand und ein damit verbundenes plötzliches, relativ unkontrolliertes Durchdringen des Parenchyms zu vermeiden. Beim Zebrafisch ist das ZNS durch eine primitive meningeale Membran, der *Meninx primitiva*, geschützt. Da dieses Häutchen nicht präparabel war, wurde unter mikroskopischer Aufsicht das Penetrationsmoment vorsichtig und langsam geführt. Dieser Vorgang wurde durch ein temporäres Ablassen des Mediums deutlich erleichtert. Es ergab sich für diesen Versuch ein optimaler Innendurchmesser der Injektionsspitze von

5-10 $\mu$ m, womit einerseits die Gefahr einer Verdünnung des Farbstoffs an der Spitze mit Medienflüssigkeit durch Kapillarkraft und andererseits eine Verstopfung in Flussrichtung vermieden werden konnte.

#### 4.1.2 Einflüsse durch Farbstoffe und Anfärbungen

Durch die iontophoretische Applikationstechnik bietet sich der Vorteil einer selektiven Begrenzung des Injektionsgebietes. Die verwendeten Dextrane mit 3000 MW haben im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. höher molekulare 10000 MW Dextrane, oder dem klassischen Tracer *horseradish peroxidase*) den Vorteil, dass sie von den Axonterminalen leichter endocytiert werden und einem schnelleren axonalen Transport bzw. Diffusion unterliegen, sowie eine stärkere Fluoreszenz erreichen (Richmond et al., 1994). Man muss davon ausgehen, dass sie in lebenden Zellen einem aktiven Transport unterliegen, aber es zusätzlich eine rein diffusorische Komponente gibt, da die axonale Weiterleitung experimentell durch Colchicin nicht vollständig gehemmt werden konnte (Fritsch, 1993). Laut Hersteller (Molecular Probes®) ist für *TMRD* 3000 MW eine Diffusionsgeschwindigkeit von 2mm/h bei 22°C (*Xenopus laevis*) anzunehmen, was in unseren Versuchen auch mit leichter Korrektur der Dauer nach oben bestätigt werden konnte.

Die Dextrane haben atypische  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen, die einen intrazellulären Abbau durch Glykosidasen verhindern und den Farbstoff so ideal für den Transport in lebenden Zellen machen. Die Lysin-Seitengruppen des verwendeten *TMRD* bedingen eine Konjugation des Tracers an umgebende Biomoleküle während der Fixierung mit Paraformaldehyd. Die Golgi-ähnliche Anfärbung ermöglicht dann eine vollständige Darstellung der Somata und dendritischen Fortsätze der RGZ. Hier gäbe es noch die Möglichkeit einer anschließenden immunhistochemischen Detektierung des fixierten *TMRD* durch Anti-Farbstoff-Antikörper oder fluoreszierendem Streptavidin-Konjugat, was für die Darstellung von sehr feinen Dendriten oder Spinules von Vorteil sein könnte.

Das für die microinjektiven Versuche verwendete *lucifer yellow* erforderte wegen eines raschen Effluxes durch die Membrantraumatisierungen eine schnelle digitale Aufarbeitung. Die Frage nach der Ursache der im Vergleich zur *TMRD*-Färbung ungenügenden Ergebnisse ist wegen eines sicherlich anzunehmenden multikausalen Zusammenhanges schwierig zu beantworten, wobei der unter in vitro Bedingungen anhaltende Zellverfall und die zusätzlichen Traumatisierungen großen Einfluss haben dürften.

### **4.1.3 Einflüsse der Bildgewinnung und Auswertung**

Die Verwendung des confokalen Laser-Scan-Mikroskops erforderte eine vorhergehende technische Optimierung des Systems auf die Größe der dendritischen Fortsätze und die Stärke der Eigenfluoreszenz (z.B. nach Sheppard und Shotten, 1997), um etwaige Verluste in der Bildauflösung zu vermeiden.

Die Erfassung der quantitativen Zellparameter wurde von einer Person durchgeführt und an verschiedenen Tagen mehrmals wiederholt. Die genaue morphologische Beschreibung retinaler Neurone unterliegt bisher keinen internationalen Richtlinien. Sie wurde an verschiedenen Spezies von diversen Autoren seit dem Beginn der confokalen Laser-Mikroskopie 1985 auf unterschiedliche Art und Weise durchgeführt und erschwert häufig den Vergleich von Methoden und Ergebnissen zwischen den veröffentlichten Arbeiten (siehe unten den Abschnitt: IPL-Ausdehnung).

Die Auswertung basierte in dieser Arbeit auf rein morphologischen Kriterien der somatischen und dendritischen Größe und deren Verzweigungsmuster; zusätzliche, korrelierende elektrophysiologische und biochemische Untersuchungen mit Schlussfolgerungen auf die Funktion der einzelnen RGZ wurden inzwischen an einigen Vertebraten (z.B. bei der Katzenretina von Saito, 1983, Fukuda et al., 1984), aber nur wenigen Fischen mit Erfolg durchgeführt (z.B. beim Goldfisch Vallegra und Djamgoz, 1991); beim Zebrafisch begannen in den letzten Jahren die Untersuchungen der Retina vor allem anhand der

Bipolarzellen (Connaughton et al. 1999, Connaughton & Nelson 2000). So werden die hier als diffus-, mono- oder bi-stratifiziert eingegliederten Untergruppen der RGZ als Populationsfamilien aufgefasst, mit dem einzig physiologischem Zusatz der Einteilung in OFF- und ON- Antworten der RGZ auf Lichtreiz, je nachdem in welcher Schicht der IPL sie stratifizieren.

Die für die Aussagen über einzelne Arborisierungstypen wichtige Erfassung der IPL-Ausdehnung, wurde mittels computergestützter Analyse einerseits auf den Beginn dendritischer Verzweigungen und dem gleichbedeutenden vitrealen Ende der INL und andererseits dem Eintritt der Dendriten in das GZ-Soma als äußere Grenze festgelegt (wie bei Hitchcock und Easter, 1986). Es gilt hierbei zu berücksichtigen, dass diese Definition in bisherigen Arbeiten unterschiedlich gewählt und angewandt wurde. So beziehen z.B. Cook und Sharma, 1995, das Ende der IPL in der Wels-Retina (*Ictalurus punctatus*) auf die sichtbare unterste Verzweigungsschicht der RGZ-Axone, bei Cook und Becker, 1991, und Cook et al., 1992, wird hingegen im Sinne der Vermeidung größerer anderer methodikbedingter Fehler das vitreale Ende der IPL auf die Mittelebene der GCL bezogen.

Die IPL des Zebrafisches war in unserem Versuch sehr dünn und maß 5-18  $\mu\text{m}$ . Wegen dieser hohen relativen Variation und wegen den physiologischen regionalen Unterschieden in der Netzhaut wurde sie für jede RGZ einzeln bestimmt, und es wurde versucht einen Zusammenhang von artifiziellem, methodikbedingtem äußerem Einfluss und der Dicke der IPL herzustellen. Die Tatsache der ungefähren Vervierfachung der IPL-Dicke im Vergleich zur „normalen“ IPL durch das spezielle Eindeckeln für die Mikroinjektion mit Filterpapier lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine Größe handelt, die bei der Zebrafischnetzhaut einer methodikbedingten Variabilität unterliegt. Es wäre deshalb sinnvoll, eine Methode zu etablieren, die sich an der Dicke der IPL in der unbehandelten Zebrafischnetzhaut orientiert und gleichzeitig leichte, aber zufällige Änderungen der Retinaausdehnungen in Fläche und Tiefe, wie sie z.B.

beim Eindeckeln oder auch mit Variation der Einstellung von osmotischen Umgebung und Temperatur entstehen, verhindert.

Hier schien die Retina der Zebrafische insgesamt empfindlicher zu sein, als dies z.B. von Reptilien bekannt ist (Ott und Belintanni-Guardia, 2002). In der Arbeit von Mangrum et al., 2002, wurden die trockenungsbedingten Verziehungen der Retina, die regional verschieden stark ausgeprägt waren, an der Oberfläche vermessen und als durchschnittliche Prozentzahl in die anderen Werte mit eingerechnet; bei Hitchcock und Easter, 1986, wurde eine mittlere Schrumpfung um 20% hingegen nicht eingerechnet. Unklar bleibt letztlich wie stark diese Verkleinerungen und Dehnungen der Netzhaut Einfluss auf die relativen Größen der einzelnen Schichten und auf die Ausdehnung des dendritischen Feldes nehmen.

Die manuelle Abzeichnung und Re-Digitalisierung der RGZ ermöglichte eine klarere Darstellung der RGZ-Morphologie, da dadurch eine Isolierung einzelner Zellen von ihrer Umgebung entstand. Durch die für die manuelle Abzeichnung benötigten starken Vergrößerungen ließen sich auch kleine dendritische Fortsätze erfassen, womit die Ganglienzellen einer verwertbaren Quantifizierung der dendritischen Verzweigungen und Endpunkte zugänglich wurden. Diese für die Zelldifferenzierung wichtigen Strukturen waren aus den *TMRD*-gefärbten Originalaufnahmen oft nur sehr schwer zu erfassen. Daher waren die gezeichneten Ganglienzellen sowohl für eine übersichtlichere Darstellung als auch für die Auswertung von Nutzen.

## 4.2 Tectopetale RGZ im Vergleich zu bisher beschriebenen retinalen Ganglienzellen des Zebrafisches

Um dem Status des genetischen Modellorganismus gerecht zu werden, konzentrierten sich in den letzten Jahren viele der Arbeiten am Zebrafisch auf die Entwicklung des Auges bzw. der Retina und auf deren genetische Beeinflussung durch Beobachtung von bestimmten Mutationen (z.B. Burill and Easter, 1994, Fadool et al., 1997, Malicki et al., 1996). Die RGZ sind dabei unter den ersten sich differenzierenden und Synapsen bildenden Neurone im ZNS (Schmitt & Dowling, 1999).

Die erste Arbeit, die sich an einer morphologischen Beschreibung der RGZ beim Zebrafisch und deren Verteilungsmuster versucht, stammt von Mangrum et al., 2002, und basiert auf *Dil*-gefärbten Zellen. Der Farbstoff wurde auf den geschnittenen Nervus opticus aufgebracht, um so eine (möglichst) vollständige Erfassung aller RGZ durch retrograden axonalen Transport zu erreichen. Es wurden dabei 11 verschiedene GZ-Typen über rein morphologische Kriterien beschrieben. Nur etwa die Hälfte der RGZ aus unseren kernspezifischen Injektionen ließen sich den Typen von Mangrum et al. zuordnen:

Die RGZ mit der größten Ausdehnung hatten stets eine dünne Monostratifizierung. Die large-m-a-RGZ stratifizierten mit ihren 2-3 starken Primärdendriten hierbei in S1 und S2 (OFF) und bildeten ein nicht sehr dichtes Verzweigungsnetz. Damit waren sie den Typen I-Zellen in der Aufsicht sehr ähnlich, diese laminieren jedoch in S5 der IPL. Eine große Übereinstimmung bestand deshalb nur zu den Typ II-Zellen nach Mangrum et al., obwohl für diese von den Autoren nur ein starker Primärdendrit beschrieben wurde.

Die large-mono-b-RGZ waren in ihrer Morphologie den Typ I-Zellen von Mangrum et al. sehr ähnlich. Bezüglich der Größe ihrer Somata und dendritischen Felder lagen sie unter den größten gefundenen GZ und hatten eine sehr typische planare Stratifizierung in S5 der IPL bis hinein in die Ganglienzellschicht (GCL).

Bei den medium-m-a-RGZ zeigte sich eine große strukturelle Übereinstimmung mit den Typ III-Zellen, da sie ein schirmartig orientiertes, dichtes dendritisches Feld auf der Basis eines starken PD hatten und in S1-S2 (OFF) laminierten.

Die bistratifizierten a/b-RGZ waren selten gefundene Zellen und hatten kleine, runde Somata und zwei dichte, ungefähr gleich varikositätenreiche dendritische Felder, die über sehr dünne Verbindungsäste aus der ersten Schicht (a=S5-S4=ON) in die zweite (b=OFF,~S2) gebildet wurden. Damit entsprachen sie den Typ X-Zellen von Mangrum et al..

Unter den diffusen RGZ war der Vergleich etwas schwieriger, da bei Stratifizierungen, die über drei oder mehr IPL-Schichten reichten, eine genaue Zuordnung zu den Schichten nicht immer klar möglich war und so der Vergleich zwischen den Arbeiten mit großer Sorgfalt anzugehen war.

Als häufigste der registrierten diffusen RGZ waren die intermediate-d-RGZ mit 2-3 PD mit ihrem schirmartig dicht verzweigten dendritischen Feld den Typ VII-Zellen sehr ähnlich. Auch sie imponierten in der Seitenansicht dicht und diffus über alle IPL-Schichten verzweigt.

Durch die in diese Gruppe gehörenden doppelt-markierten Zellen stellte sich auch die Überlegung einer Ähnlichkeit zu den Typ VIII-Zellen von Mangrum et al., da sie wie die Typ VIII-Zellen eine ungewöhnliche Relation von dendritischer Feldgröße (klein) zu Soma (groß) hatten. Diese Ähnlichkeit ist letztlich aber nicht zu halten, da die besagte Relation in unserer Arbeit ihre Ursache wie vorab beschrieben in der präparatorischen Bearbeitung des Gewebes hatte.

Für einen Bezug auf die small-d-RGZ und die intermediate-d-RGZ mit 4-5 PD fand sich kein passender Zelltyp bei Mangrum et al.. Ebenso fand sich für die intermediate-d-RGZ mit 3-4 PD kein Korrelat.

### 4.3 Vergleich zu anderen Knochen-Fischen und Vertebraten

Für die vergleichende Einordnung der RGZ des Zebrafisches werden im folgenden Ähnlichkeiten mit schon beschriebenen Zellen von verwandten Spezies dargestellt. Dafür war es notwendig, bei den früheren Publikationen zu retinalen Ganglienzellen bei Fischen auch Arbeiten aus den achtziger und neunziger Jahren zu verwenden, da es in den letzten beiden Dekaden zu den einzelnen Spezies nur sehr wenige und häufig aufeinander aufbauende Publikationen gegeben hat. Durch den enormen technischen Fortschritt in der Bildgewinnung und computergestützten Rekonstruktion sind in der Neuroanatomie inzwischen genauere Darstellungen und Aussagen möglich geworden – daher sollte bei den Vergleichen zwischen den Veröffentlichungen auf diesen wichtigen Unterschied in der Methodik geachtet werden. Dunn-Meynell und Sharma benutzten 1986 für die Auswertung der IPL-Stratifizierungen noch transversale histologische Schnitte, da ihnen kein Laser-Scan-Mikroskop mit der Möglichkeit der 3D-Rekonstruktion zur Verfügung stand. Durch dieses frühere Verfahren konnte es bei schematisierten Darstellungen der genauen Somaform oder der Verzweigungen innerhalb der IPL zu leichten Unterschieden in der Vollständigkeit der wiedergegebenen Zellen kommen. Dies erschwerte den Vergleich zu den retinalen Ganglienzellen, vor allem wenn die dazu passenden Beschreibungen kürzer gehalten wurden als dies inzwischen notwendig wäre. Bei der von vielen Autoren gerne zitierten Veröffentlichung zu RGZ beim Goldfisch von Hitchcock und Easter, Jr. (1986) finden sich zu manchen der klassifizierten Zellen keine Abbildungen, wodurch es bei den teils sehr ähnlichen Beschreibungen für den fremden Betrachter zu Überschneidungen unter den einzelnen Zelltypen kommen kann.

Diese Schwierigkeiten bei der Suche nach korrespondierenden Zellen wird durch die früher vorwiegend verwendete *Horseradish-peroxidase*-Färbung zusätzlich erschwert, da diese teilweise zu schwer abgrenzbaren, unvollständigen Anfärbungen führte.

Wie es unter anderem bei der Katze, dem Karpfen und dem Goldfisch (Famiglietti & Kolb, 1976, Famiglietti et al., 1977, Vallegra & Djamgoz, 1991) gezeigt werden konnte, hatten auch beim Zebrafisch die in den OFF- Schichten S1-S2 monostratifizierenden RGZ die größten dendritischen Felder. Von diesen monostratifizierten RGZ (m-RGZ) konnten hier zwei Typen unterschieden werden: die large-m-a-RGZ und die medium-m-a-RGZ. Die Größe der Zellkörper und dendritischen Felder lag stets weit über dem Durchschnitt der diffusen RGZ. Beide Zellarten laminieren in den OFF-Schichten S1 und S2 am skleralen Rand der IPL. Ihre Dendriten waren mit relativ vielen Varikositäten versehen. Im Bezug auf diese morphologischen Daten ließen sich nur zu den large-m-RGZ ähnliche Zellen beim Goldfisch (Hitchcock & Easter, 1986, Cook et al., 1992) und beim Wels, *Ictalurus punctatus*, (Cook & Sharma, 1995, Dunn-Meynell & Sharma, 1986) finden, wo sie als 1.2.- und large-outer-stratified-Ganglienzellen bzw.  $\alpha_1$ - und G1-Ganglienzellen beschrieben wurden.

Die large-m-b-RGZ zählten mit den large-m-a-RGZ zu den beiden größten Zelltypen und wurden in dieser Arbeit nur sehr selten gefunden. Sie stratifizierten in S5 der IPL und auf Höhe der GCL, bei einer gleichmäßigen Verteilung ihres dendritischen Feldes. Auch diese monostratifizierten Zellen sind bei anderen Fischen beschrieben, so z.B. beim Goldfisch als 1.1- und inner-alpha Zellen (Hitchcock & Easter, 1986, Cook et al., 1992) oder beim Wels als G2- und  $\alpha_c$ -Zellen (Dunn-Meynell & Sharma, 1986, Cook & Sharma, 1995).

Zu den medium-bistratifizierten Zellen, deren beide untereinander ähnlichen Laminierungen in der ON- (a,~S2) und OFF-Schicht (b,S4/5) der IPL lagen und ein dichtes, rund-ovales Verzweigungsnetz hatten, fanden sich beim Goldfisch und Wels, *Ictalurus punctatus*, sehr ähnliche retinale Ganglienzellen, die als 2.3.- und  $\alpha_{AB}$ -Ganglienzellen (Hitchcock & Easter, 1986, Cook und Sharma, 1995, Goldfisch) und G3-Zellen (Dunn-Meynell & Sharma, 1986, Wels) klassifiziert wurden. Sie waren in anderen Arbeiten jedoch prozentual deutlich häufiger gefärbt und identifiziert worden als dies bei den tectopetalen RGZ beim Zebrafisch möglich war.

Unter den diffusen (S1-S5) RGZ beim Zebrafisch wurden bei verwandten Knochenfischen nur Repräsentanten der intermediate-d-RGZ mit 2-3 PD und der intermediate-d-RGZ mit 4-5 PD beschrieben; dem Bild der small-d-RGZ mit einem abgehenden PD und der charakteristischen, leicht geschwungenen Somaform und den im-d-RGZ mit 3-4 PD fanden sich hingegen keine klaren Korrelate in der eingesehenen Literatur.

Die stets am häufigsten gefundenen im-d-RGZ mit 2-3 PD mit dem auf die Peripherie gerichteten dendritischen Feld, welches sich über die gesamte IPL in dicht stehenden Verzweigungen ausspannte, entsprachen dabei am ehesten den S2-GZ beim Wels, *Ictalurus punctatus* (Dunn-Meynell & Sharma, 1986) und beim Goldfisch (Hitchcock & Easter, 1986) den 4.3.-GZ. Von diesen 4.3.-GZ gibt es allerdings in der Publikation keine Abbildungen und da in der Beschreibung der Typ 4 Zellen 2-5 Primärdendriten als gängig betrachtet wurden, war hier eine genaue Differenzierung zu den im-d-RGZ mit 4-5 PD nicht möglich. Diese Zellen entsprachen nach den Beschreibungen aber am ehesten den 4.2.-GZ bei Goldfisch (Hitchcock & Easter, 1986) – diese hatten auch ein tropfenförmiges Soma mit beidseits und an der Spitze abgehenden Primärdendriten, die sich dann auf der dem Axon abgewandten Seite verzweigen und einen sehr dicht stehenden, in der Seitenansicht leuchterartigen dendritischen Baum bilden.

## 5. Zusammenfassung

Der Zebrafisch ist in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt der Genetik und Entwicklungsforschung gerückt. Die gute Sichtbarkeit seiner neuronalen Strukturen machten ihn auch für die Untersuchung verschiedener Ganglienzellen (GZ) in der Retina interessant. In der ersten Erfassung dieser Ganglienzellen wurden elf Zelltypen beschrieben und auf rein morphologischer Basis unterscheiden.

Diese Arbeit konzentriert sich nun auf die Identifikation und Beschreibung von retinalen Ganglienzellen, die axonale Projektionen in das Tectum opticum ausbilden.

Gruppen einzelner retinaler GZ wurden durch retrograden, axonalen Farbstofftransport aus Injektionen von Tetramethylrhodamin-Dextran in unterschiedliche Stellen des Tectum opticum angefärbt und digital mittels eines Laser-Scan-Mikroskops aufgearbeitet. Dabei wurden die morphologischen Parameter der Zellkörper und der dendritischen Stratifizierungen innerhalb der inneren plexiformen Schicht (IPL) für jede Zelle beschrieben und jeweils durch mehrere Abbildungen visualisiert. Insgesamt konnten acht verschiedene Arten tectopetaler retinaler Ganglienzellen identifiziert werden, wovon sich fünf Zelltypen in einer früheren Arbeit wieder finden ließen.

Unter den diffus-stratifizierenden Ganglienzellen, die deutlich kleinere dendritische Felder hatten als die mono-stratifizierten GZ, waren die intermediate-diffus-GZ mit 2-3 Primärdendriten die am häufigsten gefärbten Zellen. Daneben fanden sich intermediate-Zellen mit 4-5 Primärdendriten, small GZ und intermediate Ganglienzellen mit 3-4 PD, die alle diffuse Stratifizierungen hatten und sich anhand ihrer Größe und der Verzweigungsarten voneinander unterscheiden ließen. Die sehr großen mono-stratifizierten GZ bildeten eine planare dendritische Verzweigungsebene, entweder in den ersten beiden skleralen Schichten der IPL (a/OFF) oder in der am weitesten vitreal gelegenen Schicht der IPL (b/ON), und ließen sich in medium-a-, large-a- und large-b-GZ unterteilen. Eine sehr selten gefärbte Zellart stellten die bistratifizierenden GZ mit mittelgroßem dendritischen Feld und jeweils in den skleralen und vitrealen Randschichten der IPL (a/b) gelegenen Stratifizierungen dar.

Die Untersuchungen beinhalten neben der morphologischen Beschreibung einzelner Ganglienzellen beim Zebrafisch erstmals Angaben zu den Projektionsorten in das Tectum opticum und liefern so die Grundlage für die Erforschung von Effekten einzelner Gene auf die strukturelle Bildung tectopetaler retinaler Ganglienzellen und deren axonaler Verbindungen.

## 6. Literaturverzeichnis

Bellintani-Guardia, B., Ott, M. (2002). Displaced retinal ganglion cells project to the accessory optic system in the chameleon (*Chameleo calypratus*). *Experimental Brain Research* 145.1: 56-63.

Brand, M., Beuchle, D., Endres, F., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Mullins, M., Schulte-Werker, S., Nüsslein-Volhard, C., Lück, R., Schwarz, K.J., Schwarz, S. (1995). Keeping and raising zebra fish (*Danio rerio*) in Tübingen. *The Zebrafish Science Monitor* 3: 2-7.

Brockerhoff, S.E., Hurley, J.B. (1995). A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 92: 10545-10549.

Burill, J.D., Easter, Jr. S.S. (1994). Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *The Journal of the Comparative Neurology* 346: 583-600.

Butler, A.B., Hodos, W. (1996). *Comparative vertebrate neuroanatomy*. New York: Wiley Liss, Inc., John Wiley & Sons.

Cajal, S. Ramon y (1896). *Die Retina*. Translation by A. Greeff. Wiesbaden: Bergmann.

Connaughton, V., Behar, T., Liu, W., Massey, S. (1999). Immunocytochemical localization of excitatory and inhibitory neurotransmitters in the zebrafish retina. *Visual Neuroscience* 16: 483-490.

Connaughton, V., Nelson, R. (2000). Axonal stratification patterns and glutamate-gated conductance mechanisms in zebrafish retinal bipolar cells. *Journal of Physiology* 524: 135-146.

Cook, J.E., Becker, D.L., Kapila, R. (1992). Independent mosaics of large inner- and outer-stratified ganglion cells in the goldfish retina. *The Journal of Comparative Neurology* 318: 355-366.

Cook, J.E., Noden, A.J. (1998). Somatic and dendritic mosaics of large ganglion cells in the retina of the common house gecko (*Hemidactylus frenatus*). *Brain, Behavior and Evolution* 51: 263-283.

Cook, J.E., Sharma, S.C. (1995). Large retinal ganglion cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Three types with distinct dendritic stratification patterns form similar but independent mosaics. *The Journal of Comparative Neurology* 362: 331-349.

Dunn-Meynell, A.A., Sharma, S.C. (1986). The visual system of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). I. Retinal ganglion cell morphology. *The Journal of Comparative Neurology* 247: 32-55.

Eisler, R. (1961). Effects of visible radiation on salmonid embryos and larvae. *Growth* 25: 281-346.

Fadool, J., Brockerhoff, S., Hyatt, G., Dowling, J. (1997). Mutations affecting eye morphology in the developing zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Genetics* 20: 288-295.

Famiglietti, E.V., Kolb, H. (1976). Structural basis for On- and Off-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 194: 193-195.

Famiglietti, E.V., Kaneko, A., Tachibana, M. (1977). Neuronal architectures of On and Off pathway to ganglion cells in carp retina. *Science* 198: 1267-1269.

Famiglietti, E.V. (1992). Dendritic co-stratification of ON and ON-OFF directionally selective ganglion cells with starburst amacrine cells in rabbit retina. *The Journal of Comparative Neurology* 324: 322-335.

Fernald, R.D. (1984). Vision and behaviour in an African cichlid fish. *American Scientist* 72: 58-65.

Fritzsche, B. (1993). Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *The Journal of Neuroscience Methods* 50: 95-103.

Fukuda, Y., Hsiao, C.F., Watanabe, M., Ito, H. (1984). Morphological correlates of physiologically identified y-, x- and w-cells in the cat retina. *Journal of Neurophysiology* 52: 999-1013.

Gnügge, L. (2001). Aktivitätsabhängige Entwicklung der retinotektalen Projektion beim Zebrafisch *Danio rerio*. Dissertation Tübingen. Berlin: dissertation.de.

Hamdorf, K. (1960). Die Beeinflussung der Embryonal- und Larvalentwicklung der Regenbogenforelle (*Salmo irideus* Gibb.) durch die Strahlung im sichtbaren Bereich. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 42: 525-565.

Hitchcock, P.F., Easter, Jr. S.S. (1986). Retinal ganglion cells in goldfish: A qualitative classification into four morphological types, and a quantitative study of the development of one of them. *The Journal of Neuroscience* 6: 1037-1050.

Hoar, W.S., Robertson, G.B. (1959). Temperature resistance of goldfish maintained under controlled photoperiods. *Canadian Journal of Zoology* 37: 419-428.

Johns, P.R. (1997). Growth of the adult goldfish retina: III. Source of the new retinal cells. *The Journal of Comparative Neurology*. 176: 343-358.

Kahn, P. (1994). Zebrafish hit the big time. *Science* 264: 904-905.

Malicki, J., Neuhauss, S., Schier, A., Solnica-Krezel, C., Stemple, D., Stainier, D., Abdelilah, S., Zwartkrius, F., Rangini, Z., Driever, W. (1996). Mutations affecting development of the zebrafish retina. *Development* 123: 263-273.

Mangrum, W.I., Dowling J.E., Cohen, E.D. (2002). A morphological classification of ganglion cells in the zebrafish retina. *Visual Neuroscience* 19.6: 767.

Munz, F.W. (1971). Vision: Visual Pigments. In: *Fish Physiology*, ed. Hoar, W.S. and Randall, D.J., 5: 1-23 New York, London: Academic Press.

Peterson, B.B., Dacey, D.M. (2000). Morphology of wide-field bistratified and diffuse human retinal ganglion cells. *Visual Neuroscience* 17: 567-578.

Ramon y Cajal, (1892). *La retine des vertebres*. English translation by R. Greeff (1894). In S.A. Thorpe and M. Glickstein (eds) : *The structure of the retina* (1972). Springfield, Illinois: Charles S. Thomas.

Raymond, P.A., Hitchcock, P.F., Palopoli, M.F. (1988). Neuronal cell proliferation and ocular enlargement in the black moor goldfish. *The Journal of Comparative Neurology* 276: 231-238.

Raymond, P.A., Rivlin, P.H. (1987). Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Developmental Biology* 122: 120-138.

Richmond, F.J., Gladdy, R., Creasy, J.L., Kitamura, S., Smits, E., Thomson, D.B. (1994). Efficiency of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *The Journal of Neuroscience Methods* 53: 35-46.

Roberts, R.J., Schlotfeld, H.-J. (1985). *Grundlagen der Fischpathologie*. Übersetzte Neuauflage Schlotfeld, H.-J.. Hrs. von Roberts, R.J.. Berlin, Hamburg: Paul Parey.

Rodieck, R.W. (1998). *The first steps in seeing*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc..

Saito, H. (1983). Morphology of the physiologically identified x-, y- and w-type retinal ganglion cells of the cat. *The Journal of Comparative Neurology* 221: 279-288.

Sajovic, P., Levinthal, C. (1982). Visual cells of zebrafish optic Tectum: Mapping with small spots. *Neuroscience* 10: 2407-2426.

Sandell, J.H., Martin, S.C., Heinrich, G. (1994). The development of GABA immunoreactivity in the retina of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *The Journal of Comparative Neurology* 345: 596-601.

Schmitt, E.A., Dowling, J.E. (1994). Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *The Journal of Comparative Neurology* 344: 532-542.

Sheppard, C.J.R., Shotton, D.M. (1997). *Confocal laser scanning microscopy*. Oxford: Bios Scientific Publishers.

Toyoda, J.-i., Murakami, M., Kaneko, A., Saito, T. (1999). *The retinal basis of vision*. Amsterdam, New York, Tokyo: Elsevier.

Trowe, T. (2000). *Analyse von Mutationen mit Einfluss auf die topographische Ordnung von Axonen im retinotektalen System des Zebrabärblings, Danio rerio*. Dissertation Tübingen. Berlin: dissertation.de.

Udin, S.B., Fawcett, J.W. (1988). Formation of topographic maps. *Annual Review Neurosciences* 11: 289-327.

Vallegra, S., Djamgoz, M. (1991). Ganglion cells in the goldfish retina: Correlation of light-evoked response and morphology. *Vision Research* 31: 487-497.

Walls, G. (1942). The vertebrate eye had its adaptive radiation. *Bulletin Cranbrook Institute Science* 19.

Whitehead, M.C., Gangrow, J.R., Ganchrow, D., Yao, B. (1991). Organization of geniculate and trigeminal ganglion cells innervating single fungiform taste papillae: A study with tetramethylrhodamine dextran amin labelling. *Neuroscience* 93.3: 931-941.

Wiggers, W. (1999). Projections of single retinal ganglion cells to the visual centers: An intracellular staining study in a plethodontid salamander. *Visual Neuroscience* 16: 435-447.

Wullimann, M.F., Rupp, B., Reichert, H. (1996). *Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topographical atlas*. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag.

Wylie, D.R.W., Glover, R.G., Lan, K.L. (1998). Projections from the accessory optic system and pretectum to the dorsolateral thalamus in the pigeon (*Columba livia*): A study using both anterograde and retrograde tracers. *The Journal of Comparative Neurology* 391: 456-469.

## 7. Danksagung

An dieser Stelle gilt Herrn Professor Dr. H.- J. Wagner mein besonderer Dank für das Ermöglichen und Leiten dieser Arbeit am Anatomischen Institut Tübingen. Sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine von Beginn an währende, allseitige Unterstützung waren mir eine sehr wertvolle Hilfe.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Matthias Ott, dessen Freude an der Forschung und große Fachkenntnis es geschafft haben mich für die Neurowissenschaft zu begeistern. Ohne die vielen bereichernden und kritischen Gespräche mit ihm wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Des weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der gesamten Forschungsgruppe für die vielen kleinen und großen Hilfen bei meiner Arbeit bedanken. Vor allem Herrn Dr. Breno Bellintani-Guardia für die geduldige und fachkundige Einweisung in die LSM-Mikroskopie und die Technik der intrazellulären Injektion, Frau Xenia Härtel für ihre tatkräftige Unterstützung bei den mikroinjektiven Versuchen, sowie Frau Karin Thiedemann für die immer freundliche Hilfe bei der Lösung vieler „alltäglicher“ Probleme.

Aus der Reihe der außerwissenschaftlichen Begleitern meiner Arbeit möchte ich mich bei meinen Eltern sowie bei Carolin Armbruster bedanken, da sie mir zu jeder Zeit eine unschätzbare Unterstützung waren. Daneben geht ein großer Dank natürlich an alle anderen Freunde, die teilweise erheblichen Anteil an meiner Motivation hatten.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Bastian Walz
Geburtsdatum	14. März 1979
Geburtsort	Freudenstadt
Eltern	Dr. Bernd Walz, Facharzt für Allgemeinmedizin Heidi Walz-Groener, Fachärztin für Allgemeinmedizin
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Ausbildungsdaten

Schulausbildung	1985 – 1989 Grundschule Effringen  1989 – 1998 Otto-Hahn-Gymnasium Nagold Abschluß: Abitur
Ersatzdienst	1998-1999 Zivildienst im Haus Saron/ Wildberg  1999-2000 Rettungssanitäterausbildung DRK Nagold
Studium	03/ 2000 Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  03/ 2002 Ärztliche Vorprüfung  03/ 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  09/ 2002 - 10/ 2003 Promotion am Anatomischen Institut Tübingen  03/ 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  04/ 2005 - 03/ 2006 PJ Städtische Kliniken Esslingen, Wahlfach Pädiatrie  05/ 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung