

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

**Abnahme displatzierte Amakrinzellen in der zentralen
Netzhaut von Fischen während des Wachstums**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Christl Bettina Maria Elisabeth Süßmann
aus Wangen im Allgäu

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.- J. Wagner

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg

|

Inhalt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung.....	8
1.1 Einführung.....	8
1.1.1 Aufbau der Netzhaut	8
1.1.2 Der Fisch als Versuchstier	11
1.1.3 Spezifika der Fischnetzhaut	12
1.2 Fragestellung und Versuchsansatz.....	15
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	17
2.2 Präparation	18
2.3 Färbungen	20
2.3.1 Retrograde Färbung	20
2.3.2 Immunhistochemische Färbungen	22
2.3.3 Gegenfärbungen	25
2.4 Auswertung.....	26
2.4.1. Konfokale Laser Scan Mikroskopie	26
2.5 Datenerfassung	29
2.5.1. Ganglienzellen	29
2.5.2. Amakrinzellen.....	32
2.6 Berechnungen und Statistik	33
3. Ergebnisse	36
3.1 Ganglienzellen	37
3.1.1 Orthotope Ganglienzellen.....	37
3.1.2 Displatzierte Ganglienzellen.....	42
3.2 Amakrinzellen	47
3.3 Die untersuchten Zelltypen im Verhältnis zueinander.....	51
3.3.1 Orthotope Ganglienzellen und displatzierte Ganglienzellen.....	52

3.3.2 orthotope Ganglienzellen und displatzierte Amakrinzellen	53
3.3.3 Altersabhängige Unterschiede des Verhältnisses DAC/OGC	57
3.4 Ko-Lokalisation von Parvalbumin und ChaT	61
4. Diskussion	64
4.1 Diskussion der Ergebnisse	64
4.2 Methodendiskussion	81
4.3 Übertragbarkeit auf das menschliche Auge	83
5. Zusammenfassung	84
6. Anhang	86
6.1 Tiermaterial	86
6.2 Basisdaten (Tabellen)	88
6.2.1 Wholemounts	88
6.2.2 Schnitte	111
7. Literaturverzeichnis	122
Tabellenverzeichnis	128
Abbildungsverzeichnis	129
Lebenslauf	130

ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Aequidens pulcher
ChaT	Cholinacetyl Transferase
DAC	Displaced Amacrine Cell
DGC	Displaced Ganglion Cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GC	Ganglion Cell
HC	Horizontal Cell
INL	Inner Nuclear Layer
IPL	Inner Plexiform Layer
LSM	Laser Scan Mikroskop
MW	Molekulargewicht
OAC	Orthotopic Amacrine Cell
OGC	Orthotopic Ganglion Cell
ONL	Outer Nuclear Layer
OPL	Outer Plexiform Layer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PGZ	Peripheral Growth Zone
STABW	Standardabweichung
TMR	Tetramethyl Rhodamin

1. Einleitung

1.1 Einführung

1.1.1 Aufbau der Netzhaut

Die Netzhaut entsteht während der Embryonalentwicklung aus einer Ausstülpung des Diencephalons und weist als Teil des Gehirns einen komplexen neuronalen Aufbau auf. Es ist bemerkenswert, dass die Netzhaut die Grundzüge ihrer Struktur im Laufe der Evolution vom Fisch zum Mensch beibehalten hat. Sie baut sich auf aus drei Schichten von Zellkernen, in erster Linie den Zellkernen der Photorezeptoren, Bipolarzellen und Ganglienzellen. Diese werden durch zwei plexiforme Schichten getrennt, in denen sich die synaptischen Kontakte befinden.

Die Photorezeptoren bilden mit ihren Segmenten die äußerste, dem Licht abgewandte Schicht der Netzhaut, in der das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Man unterscheidet Stäbchen und Zapfen, wobei die Stäbchen das skotopische Sehen ermöglichen und die Zapfen für das photopische Sehen zuständig sind. Der Mensch verfügt über drei Arten von Zapfen, deren spektrale Absorptionsmaxima bei 425nm (blau), 540nm (grün) und 570nm (rot) liegen. In der menschlichen Netzhaut finden sich etwa 120 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen. Fische weisen große Unterschiede bezüglich ihres visuellen Systems auf. Der für diese Arbeit verwendete Blaupunkt Buntbarsch (*Aequidens pulcher* [AP]) verfügt ebenfalls über ein trichromatisches visuelles System. Die spektralen Absorptionsmaxima der Zapfen (453nm, 530nm, 570nm) ähneln denen des Menschen.

Die Zellkerne der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (outer nuclear layer [ONL]). Daran anschließend findet sich die äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer [OPL]), in der die Dendritenfortsätze der Bipolarzellen die Signale der Photorezeptoren aufnehmen.

In der inneren Körnerschicht (inner nuclear layer [INL]) liegen die Zellkerne der Bipolarzellen, die das zweite Neuron der Sehbahn darstellen. Über ihre Axone

werden die Signale in der inneren plexiformen Schicht (inner plexiform layer [IPL]) an die Ganglienzellen [GC] weiter gegeben.

Außer dem „direkten“ Signalfluss (Photorezeptoren – Bipolarzellen – Ganglienzellen) gibt es einen „lateralen Signalfluss“ von den Photorezeptoren über Interneurone (Horizontalzellen [HC], Amakrinzellen [AC]) zu den Bipolar- bzw. Ganglienzellen. Diese Quervernetzung durch Horizontalzellen in der OPL und durch Amakrinzellen in der IPL ermöglicht eine Signalmodulation durch die Interneurone, die so Einfluss auf die Reaktion von Bipolarzellen bzw. Ganglienzellen haben. Die Zellkerne von Horizontal- und Amakrinzellen liegen größtenteils wie die der Bipolarzellen in der INL.

Die Ganglienzellschicht umfasst das dritte Neuron der Sehbahn - die Ganglienzellen. Sie lassen sich anhand von Antwortverhalten (ON, OFF, ON-OFF), Morphologie (magno-, parvo-, koniozellulär) und Leitungsgeschwindigkeit ihrer Axone (α -, β -, γ - Zellen) grob in jeweils drei Gruppen gliedern (Schmidt et al., 2000). (Zu Aufbau und Zelltypen der Retina siehe auch Abbildung 1.)

Die Axone der Ganglienzellen bündeln sich in der Papille zum optischen Nerv und verlassen durch die Lamina cribrosa das Auge. Im Chiasma opticum kreuzen beim Menschen die Fasern der medialen Netzhauthälfte auf die Gegenseite und ziehen als Tractus opticus weiter zu den subkortikalen visuellen Zentren. Im menschlichen Gehirn gehören hierzu außer den Corpora geniculata laterales auch Hypothalamus, Area praetectalis, Colliculi superiores und die Kerne des optischen Traktes. Sie dienen vor allem der Steuerung der reflektorischen Blickmotorik. In den Corpora geniculata laterales erfolgt die Umschaltung auf das vierte optische Neuron, dessen Axon in der Radiatio optica zur am Okzipitalpol gelegenen Sehrinde zieht. Die Sehrinde gliedert sich in die primäre Sehrinde (Area 17 nach Brodmann) und die sekundäre Sehrinde (Area 18 und 19) (Trepel, 1999). Sowohl Sehbahn als auch Sehrinde sind retinotopisch organisiert.

Bei den Knochenfischen (Teleostei) kreuzt der N. opticus komplett ohne Fasern an die Gegenseite abzugeben und teilt sich dann in die Tractus opticus dorsomedialis und venterolateralis sowie einige kleinere Faszikel. Ein Großteil der optischen Fasern endet im optischen Tektum. Es werden jedoch auch

Projektionen in die suprachiasmatischen Kerne, den ventralen und dorsalen Thalamus und die Area praetectalis beobachtet (Fernald, 1982; Collin, 1989).

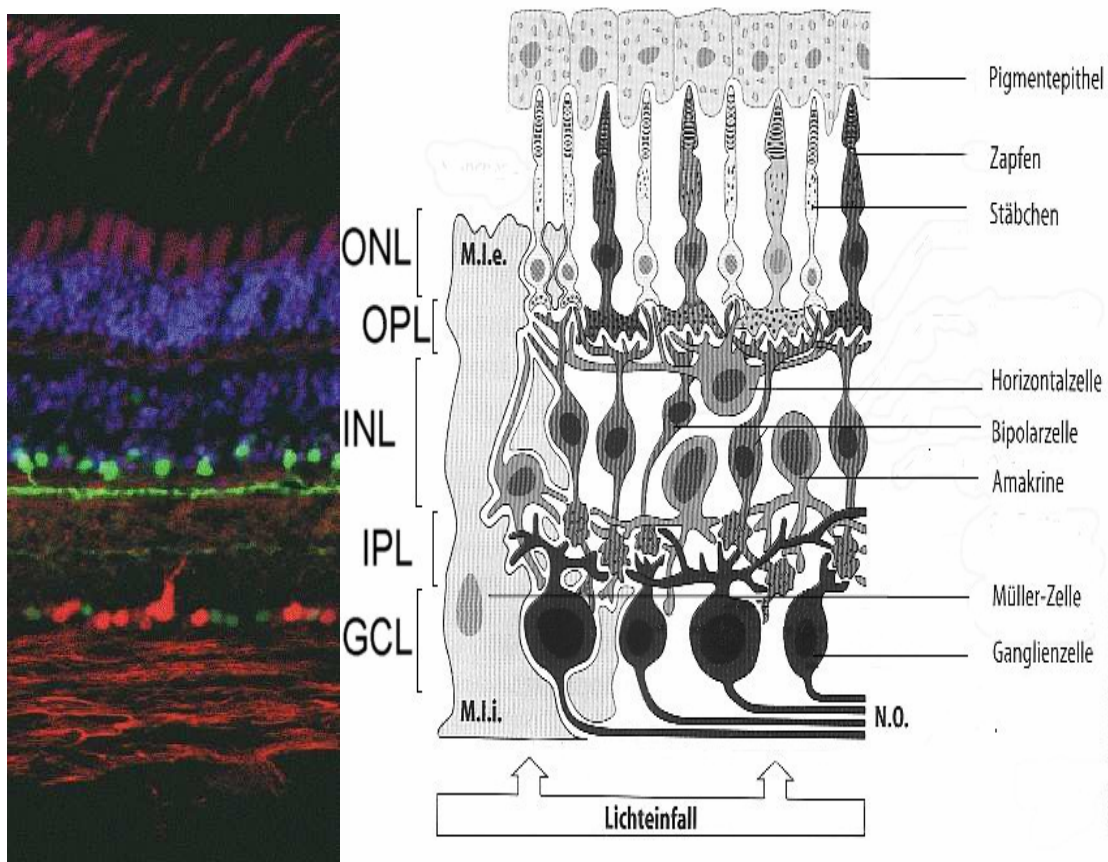


Abbildung 1: **Aufbau der Netzhaut**

Drei Schichten aus Zellkernen (ONL, INL, GCL) werden getrennt durch zwei plexiforme Schichten (OPL, IPL), welche die synaptischen Kontakte enthalten.

Links: Schnitt durch eine dreifach markierte Fischnetzhaut (LSM-Aufnahme, Markierungen s. Ergebnisse).

Rechts: Schematische Darstellung der menschlichen Netzhaut. (Nicht eingezeichnet sind displazierte Ganglienzellen und displazierte Amakrinzellen.)

ONL= Outer Nuclear Layer, OPL= Outer Plexiform Layer,

INL= Inner Nuclear Layer, IPL= Inner Plexiform Layer,

GCL= Ganglion Cell Layer, N.O. = Nervus Opticus,

M.l.e.= Membrana limitans externa, M.l.i.= Membrana limitans interna

(aus Schmidt, Thews, Lang: Physiologie des Menschen, 28. Auflage)

Außer in der Ganglienzellschicht finden sich auch in den INL Zellen, die mit Hilfe ihrer Axone als Ganglienzellen identifiziert werden können und aufgrund ihrer Lage als displatzierte Ganglienzellen [DGC] bezeichnet werden.

Wie oben beschrieben wird der Output der retinalen Ganglienzellen stark durch inhibitorische Interneurone beeinflusst, deren Somata sich hauptsächlich an der Innenseite der inneren Körnerschicht befinden.

Eine oder mehrere Populationen dieser Interneurone liegen jedoch in direkter Nachbarschaft zu den Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht und sind somit ebenfalls „displatziert“. Ihre unmittelbare Nähe zu den Ganglienzellen lässt vermuten, dass diese Zellen großen Einfluss auf den Output der Ganglienzellen haben.

1.1.2 Der Fisch als Versuchstier

Gerade Nicht - Säuger bieten aufgrund der leichteren Handhabung (in vivo und in vitro), der geringeren Kosten und auch aus ethischer Sicht enorme Vorteile für morphologische Untersuchungen sowie für Entwicklungs- und Evolutionsstudien. Unter den niederen Vertebraten bieten sich Fische in besonderer Weise zur Untersuchung der retinalen Zelltypen und der plastischen Vorgänge der Retina an. Von Vorteil ist, dass bereits zahlreiche Erkenntnisse über die funktionelle Organisation der äußeren Retina von Fischen vorliegen. Weiterhin weisen die Retinae vieler Fischarten eine außergewöhnlich regelmäßige Anordnung der Neurone auf, die sich durch alle Schichten und Sublaminae verfolgen lässt

Zwei grundlegende Merkmale unterscheiden die Retina der Fische von der Retina der Säugetiere:

1.) Die Netzhaut niederer Vertebraten ist häufig in einem Gitter ähnlicher sehr regelmäßiger Muster organisiert.

2.) Die Netzhaut von Fischen wächst das ganze Leben lang.

Dies ermöglicht, dass das Augenwachstum und die dadurch bedingten Veränderungen im Bereich der Netzhaut zu jeder Zeit untersucht werden können.

1.1.3 Spezifika der Fischnetzhaue

Während das menschliche Auge sich nach der Geburt in axialer Länge auf etwa das 1,4fache vergrößert, wächst das Fischauge im Laufe des Lebens um das über 25fache im naso-temporalen Durchmesser (Hirt, 1998) bei obligat vorhandener Sehfähigkeit .

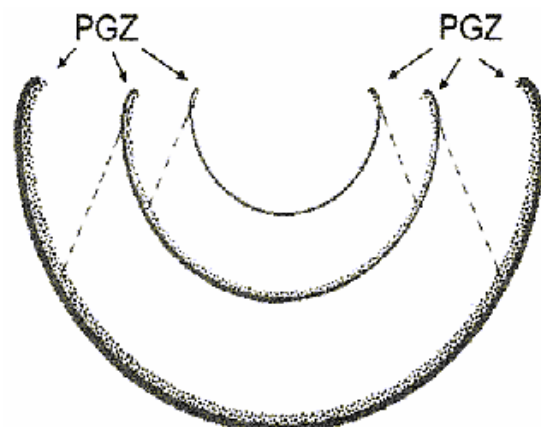
Das Wachstum der Fischretina erfolgt sowohl durch ballonartige Dehnung und Hyperplasie des bereits vorhandenen Gewebes als auch durch Zellproliferation (Müller, 1952; Lyall, 1957).

Die Dehnung des Gewebes bedingt eine zunehmende Distanz zwischen den einzelnen Zellkörpern, was eine Abnahme der Zelldichte von Ganglienzellen, Zellen der INL und der Zapfen zur Folge hat (Johns, 1977). Nur die Dichte der Stäbchen bleibt konstant, da diese ständig in der gesamten Netzhaut neugebildet werden (Fernald, 1989).

Die Neubildung von Zellen erfolgt, mit Ausnahme der Stäbchen, die auch zentral gebildet werden, in einer peripher gelegenen Wachstumszone der Netzhaut, wobei die Anzahl der neu gebildeten Stäbchen ungleich höher sein muss als die der anderen Zellarten, um eine konstante Dichte zu gewährleisten. Es muss schließlich nicht nur die Proliferation neuer Zellen in der peripheren Wachstumszone, sondern auch die Dehnung des Gewebes ausgeglichen werden. Die periphere Zunahme an Gewebe bewirkt, dass ältere Anteile der Netzhaut relativ gesehen in Richtung des Zentrums der optischen Achse verlagert werden (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: **Wachstum der Fischnetzhaue**

Die peripher gelegenen Anteile der jungen Fischnetzhaue (innen) wandern mit zunehmendem Alter, das heißt mit zunehmender Netzhautgröße (außen) immer weiter nach zentral (siehe unterbrochene Linien).
PGZ= Peripheral Growth Zone



Eine bestimmte Region der Retina muss also im Laufe der Zeit Informationen aus einem immer zentraleren Bereich des Gesichtsfeldes über die Axone der Ganglienzellen ans Gehirn liefern. Stürmer und Easter (1983) zeigten, dass dieser veränderten Topographie durch eine Verlagerung der Axonendigungen im optischen Tektum Rechnung getragen wird.

Es sind Anpassungsmechanismen auf synaptischer, zellulärer und Gewebeebene bekannt, die darauf hinweisen, wie das beständig wachsende Auge mit den wachstumsbedingten Veränderungen umgeht.

Die Sensitivität der Netzhaut bleibt trotz aller Veränderungen erhalten, da die Stäbchen der einzige Zelltyp sind, dessen Dichte sich während des Wachstums nicht ändert (Fernald, 1989). Stäbchen werden ausgehend von proliferierenden Vorläuferzellen nicht nur in der peripheren Wachstumszone, sondern überall im äußeren Teil der reifen ONL der Retina gebildet (Johns und Fernald, 1981; Mack und Fernald, 1995). Die zunehmende Zahl der Stäbchen bei konstant bleibender Zahl der Bipolarzellen bedeutet, dass neu gebildete Stäbchen Synapsen mit bereits bestehenden, differenzierten Bipolarzellen ausbilden müssen. Dabei vergrößern bestimmte Bipolarzellen (b1) ihr dendritisches Feld, indem sie neue Verzweigungen bilden und so die Dichte der Synapsen zwischen Stäbchen und Bipolarzellen (b1) konstant bei etwa einer Synapse/11 μm^2 halten (Kock und Stell, 1985).

Auch bei Ganglienzellen wurde eine Anpassung an die durch Gewebedehnung verursachte Abnahme der Zelldichte beobachtet. Für mindestens einen Ganglienzelltyp konnte gezeigt werden, dass die Größe der Dendritenbäume zunimmt, wobei die ursprüngliche Architektur der Dendriten erhalten bleibt und so trotz zunehmendem Abstand zwischen den einzelnen Zellkörpern weiterhin die gesamte Retina abgedeckt wird. Zusätzlich werden neue Synapsen ausgebildet, was wahrscheinlich dazu dient, die Eigenschaften der Signalverarbeitung der Zellen zu erhalten (Hitchcock, 1987; 1993).

Regionen größerer Zelldichte, wie sie bei vielen Knochenfischen im Bereich des temporalen Pols des Auges zu finden sind, werden möglicherweise verursacht durch asymmetrische Gewebedehnung entlang der naso-temporalen Achse (Zygar et al., 2000) oder durch asymmetrisches Wachstum, mit einer

verstärkten Zellproliferation temporal und einer geringeren nasal (Easter, 1992). Dadurch bleibt die Region mit der größten Zelldichte entsprechend der optischen Achse nach vorne ausgerichtet. Easter und Stürmer (1984) zeigten, dass die Verschiebung von Axonendigungen im optischen Tektum den peripheren ringförmigen Gewebezuwachs regelt, um die retinotopische Ordnung zu erhalten.

Über die Anpassungsvorgänge anderer Zellarten in der inneren Retina ist wenig bekannt, vor allem über das Verhalten von Interneuronen wie Horizontal- und Amakrinzellen. Außerdem ist nicht klar, ob es zu Veränderungen in retinalen Zellen kommt, welche die Änderung der relativen Lokalisation in der Retina (peripher vs. zentral) kompensieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem speziellen Typ von Amakrinzellen, die großen Einfluss auf die Signalverarbeitung und den Output der retinalen Ganglienzellen haben. Die Netzhaut von Fischen enthält eine Vielzahl verschiedener Amakrinzellen (Wagner und Wagner, 1988). Der Großteil dieser Zellen befindet sich an der Innenseite der inneren Körnerschicht. Eine oder mehrere Populationen der Amakrinzellen liegen mit ihren Somata jedoch zwischen den Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht und werden dem zu Folge als displatzierte Amakrinzellen [DAC] bezeichnet (Perry und Walker, 1980; Mosinger et al., 1986; Wässle et al., 1987). Aufgrund ihrer Nähe zu den Ganglienzellen geht man davon aus, dass die displatzierten Amakrinzellen großen Einfluss auf den Output der Ganglienzellen haben.

1.2 Fragestellung und Versuchsansatz

Die Netzhaut von Fischen wächst beständig durch die Neubildung von Zellen in einer peripher gelegenen Wachstumszone und durch die Dehnung des bereits bestehenden Gewebes. Das hat einerseits zur Folge, dass peripher gelegene Netzhautanteile im Laufe des Lebens immer weiter nach zentral verlagert werden, und andererseits die Dichte der Zellen beständig abnimmt.

Bekannt ist, dass sowohl bestimmte Bipolarzellen als auch mindestens ein Typ von Ganglienzellen auf die Abnahme der Zelldichte mit einer Vergrößerung ihrer dendritischen Felder und der Ausbildung neuer Synapsen reagieren. Daher stellt sich die Frage, wie andere Zellen der Ganglienzellschicht, die auf die Signalverarbeitung der Ganglienzellen unmittelbaren Einfluss haben, auf wachstumsbedingte Veränderungen reagieren.

In dieser Arbeit wurden Anzahl und Verteilung von Ganglienzellen und Nicht-Ganglienzellen der Ganglienzellschicht (displazierte Amakrinzellen) in Abhängigkeit von Alter bzw. Größe der Netzhaut erfasst. Man würde nun erwarten, dass die Anzahl der displazierten Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht, entsprechend der Gewebedehnung, linear mit der Anzahl der Ganglienzellen abnimmt und sich ihre Dendritenbäume ebenfalls vergrößern. Die Abnahme der absoluten Dichte displazierter Amakrinzellen in zentral gelegenen Netzhautabschnitten bestätigt diese Vermutung nur teilweise. Für das Verhältnis von displazierten Amakrinzellen [DAC] zu Ganglienzellen [GC] jedoch wurde ein deutlicher Unterschied zwischen peripherer und zentraler Netzhaut festgestellt. Wobei der Quotient DAC/ GC in den zentralen Netzhautanteilen am geringsten ausfällt.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden Dichte und Verteilungsmuster von Ganglienzellen und displazierten Amakrinzellen über die gesamte Fläche retinaler Präparationen sowie an retinalen Schnitten bestimmt.

Zellspezifische Färbungen ermöglichten ein gezieltes Ansprechen der einzelnen Zelltypen. Ganglienzellen wurden mit Hilfe retrograder Markierung durch Tetramethyl – Rhodamin Dextran angefärbt. Displazierte Amakrinzellen konnten durch immunhistochemische Färbung des kalziumbindenden Proteins Parvalbumin dargestellt werden.

Um wachstumsbedingte Veränderungen zu erfassen, wurden Färbungen und Zählungen an drei Gruppen verschieden großer Fische (Standardlänge= 2cm, 5cm und 9cm) durchgeführt.

Ziel der Arbeit war zu ermitteln:

- Verteilung und absolute Dichte der Ganglienzellen [GC]
- Verteilung und absolute Dichte der displazierten Amakrinzellen [DAC]
- Verhältnis DAC zu GC
- Veränderungen der absoluten und relativen Dichten von DAC und GC in Abhängigkeit vom Alter des Tieres bzw. von der Netzhautregion

Weiterhin galt es folgende Fragen zu klären:

- Können diese Veränderungen als wachstumsbedingt angesehen werden?
- Welche Mechanismen liegen diesen Veränderungen zugrunde?
- Weshalb kommt es überhaupt zu solchen Veränderungen?
- Welche Auswirkungen haben diese Veränderungen der Verhältnisse von DAC zu GC auf den Informationsfluss und das Sehvermögen?

2.Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Der Blaupunkt Buntbarsch (*Aequidens pulcher*, Cichlidae) ist ein Süßwasserfisch der in den Flüssen und Seen Mittel- und Südamerikas beheimatet ist. Er verfügt über ein hochentwickeltes trichromatisches visuelles System. Seine spektralen Absorptionsmaxima ähneln denen des Menschen (453nm, 530nm, 570nm). Die verwendeten Fische stammten aus eigener Zucht, deren Genpool durch Austausch mit anderen Populationen regelmäßig aufgefrischt worden war. Zur Aufzucht wurden die Tiere in einem 12h Licht-/ 12h Dunkelzyklus in Gruppen zu 50 Tieren in Aquarien mit einem Volumen von 150 Litern gehalten. Das mit Torf auf pH 6-7 angesäuerte Wasser hatte immer eine Temperatur von 27°C. Regelmäßiger Wasseraustausch und biologische Filter garantierten eine gute Wasserqualität.

Insgesamt wurden die Augen von 15 Tieren untersucht. Die Fische hatten ein Alter von drei bis 24 Monaten. Ihre Standardlänge betrug 2-9 cm, wobei die Standardlänge definiert ist als Strecke von der Spitze des Maules bis zum dorsalen Schwanzansatz (Johns und Easter, 1977).

Um eine quantitative Aussage über die Unterschiede zwischen Tieren verschiedenen Alters machen zu können, wurden drei Gruppen von Fischen unterschiedlicher Größe untersucht:

Zwei kleine Tiere mit einer Standardlänge von 2cm, was einem ungefähren Alter von 3 Monate entspricht.

Elf mittelgroße Tiere (SL=ca.5cm, Alter: 12 Monate); die Versuche an diesen Tieren dienten vor allem auch der Etablierung der Methodik.

Und zwei große Tiere, die mit einer Standardlänge von 9cm weitgehend ausgewachsen waren (Alter: 24 Monate).

Dieses Vorgehen stützt sich auf eine Arbeit von Johns und Easter (1977), die sowohl eine positive Korrelation für das Alter von Fischen und deren Körperlänge als auch für Körperlänge und Oberfläche der Retina bewiesen.

2.2 Präparation

Die Fische wurden durch Genickschnitt getötet, Gesundheitszustand und Standardlänge der Tiere wurden dokumentiert. Die Augen wurden aus der Augenhöhle herauspräpariert, der optische Nerv durchtrennt und der hintere Augenbulbus durch Abtragen von Sklera und Choroidea dargestellt.

Um die Diffusion des Farbstoffes zu erleichtern, wurde der optische Nerv direkt am hinteren Augenpol abgesetzt. Auf den Stumpf wurden einige Tetramethyl-Rhodamin Dextran Kristalle (siehe Kapitel 2.3.1: Retrograde Färbung) aufgetragen (Köbber et al., 2000). In einer feuchten Kammer wirkte dieser Farbstoff 3-4 min ein, bevor das Auge in Kulturmedium (Dulbecco's minimal essential Medium, Sigma) von Farbüberständen gereinigt und anschließend in offenen Petrischalen mit ca. 10ml Kulturmedium für 12 – 36 Stunden inkubiert wurde.

Sowohl während der Präparation als auch während der Inkubation wurde auf größtmögliche Reinheit geachtet, um einer bakteriellen Besiedelung des Präparates und daraus entstehender Artefaktbildung vorzubeugen.

Die Inkubationszeit richtete sich nach der Standardlänge des Tieres und somit nach der Augengröße. Sie betrug für kleine Tiere mit einer Standardlänge von bis zu 2,5 cm 12 Stunden, für Tiere mittlerer Größe (SL: 3,5-6 cm) 24 Stunden und für große Tiere (SL: 8-10cm) 36 Stunden.

Die Inkubation erfolgte bei 20°C und völliger Dunkelheit in carbogener Atmosphäre. Durch Zugabe eines Gasgemisches (5% Kohlendioxid, 95% Sauerstoff) wurde eine nahezu 100% Sauerstoffsättigung der Flüssigkeit erreicht (Zhan und Troy, 1997). Nach jeweils 12 Stunden erfolgte ein Wechsel des Carbonat gepufferten Kulturmediums und erneutes Herstellen eines pH neutralen Milieus durch Zufuhr von Gas. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der axonale Transport des Farbstoffes durch zweistündiges Fixieren in 4% Paraformaldehyd gestoppt. Anschließend wurden die Retinae in PBS (nicht länger als 2 Stunden) bis zur weiteren Präparation aufbewahrt.

Es schloss sich nun die Retinapräparation an. Mittels Ringschnitt wurden Kornea und Iris entfernt und anschließend Linse und Glaskörper abgetragen. Mit drei bis vier radiären Einschnitten wurde ein flaches Ausbreiten der Retina ermöglicht. Das Retinapräparat (= wholemount) wurde entweder mit Antikörpern direkt gefärbt (siehe Kapitel 2.3.2: Immunhistochemische Färbungen) oder nach Kryoprotektion in 30% Saccharose und Einbetten in Tissue Tek (Miles) auf Mikrotomtellen festgefroren. Dabei war die ventrale Seite der Retina im Schnittblock nach unten ausgerichtet, um eine spätere Orientierung am Schnitt zu ermöglichen. Mit einem Kryostat - Mikrotom wurden bei -20°C umgehend Schnitte mit einer Schnittdicke von $30\mu\text{m}$ angefertigt. Die Schnitte wurden auf Gelatine beschichteten Objektträgern bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Es wurde auf eine saubere Beschriftung bezüglich der Ausrichtung der Schnitte (temporal – nasal) geachtet.

2.3 Färbungen

Prinzipiell wichtig war die Auswahl der Fluorochrome bzw. Marker im Hinblick auf Doppel- und Dreifach- Markierungen. Die nachfolgende Auswertung am konfokalen Laser Scan Mikroskop [LSM] verlangte eine gute Auftrennbarkeit der Signale, d.h. es mussten Marker mit möglichst deutlich unterscheidbaren Emissionsmaxima gewählt werden. Dabei wurden folgende Techniken kombiniert:

2.3.1 Retrograde Färbung

Die Technik der retrograden Markierung nutzt die Fähigkeit der Axone, Substanzen aus der extrazellulären Matrix aufzunehmen und zu ihrem Zellkörper zurück zu transportieren (Llewlyn-Smith et al., 1990). Der Farbstoff wandert über die Axone des optischen Nervs zurück zu den Ganglienzellen der Netzhaut und ermöglicht so deren gezieltes Anfärben. Die retrograde intrazelluläre Markierung von Zellen setzt eine intakte Zellphysiologie voraus (Maxwell et al., 1985). Das heißt, die Präparation des Auges muss schnell und schonend durchgeführt werden.

Tetramethyl Rhodamin Dextran (MG 3000; Molecular Probes), ein hydrophiles Polysaccharid, war Farbstoff der Wahl, da er aufgrund seines geringen Molekulargewichtes schnell relativ große Strecken zurücklegen kann (Fritsch, 1993). Dextrane werden sehr viel besser von verletzten Axonen als von intakten Nervenendigungen aufgenommen. Das ermöglicht ein gezieltes Anfärben der Ganglienzellen von der Schnittfläche des optischen Nervs aus, ohne dass andere, intakte Zellen der Netzhaut Farbstoff aufnehmen. Außerdem lässt sich die retrograde Markierung mit Dextran problemlos mit einer Vielzahl anderer Färbetechniken, wie zum Beispiel Antikörperfärbungen, kombinieren.

Der Farbstoff wurde in Form von Kristallen direkt auf den Stumpf des Nervus opticus aufgetragen (Köbbert et al., 2000). Während einer Einwirkdauer von 3-4 min wurde das Auge in einer feuchten Kammer vor dem Austrocknen geschützt. Um die Entstehung von Artefakten zu vermeiden, wurde der überschüssige Farbstoff nun sorgfältig abgespült. Anschließend wurde das

Auge in oxygeniertem „minimal essential medium“ entsprechend der Standardlänge des Fisches und somit entsprechend der Augengröße für 12 bis 36 Stunden inkubiert (genaue Inkubationszeiten siehe Kapitel 2.2: Präparation). Mit Hilfe der retrograden Markierung war es möglich, nahezu alle Ganglienzellen anzufärben, was sich durch eine Kerngegenfärbung nachweisen ließ.

Als Vorteil des retrograden Tracings mit Dextran konnte somit die spezifische Anfärbung aller Ganglienzellen der Retina durch Transport des Farbstoffes in den Axonen Richtung Zellkörper genutzt werden. Weiterhin war eine Darstellung eines Teiles der Dendriten der Ganglienzellen möglich. Die Methode erwies sich als leicht anwendbar und kostengünstig, und die Ergebnisse der Färbung ließen sich unter einem Fluoreszenzmikroskop gut beurteilen.

Als Nachteil erwies sich, dass bei großen Netzhäuten lange Inkubationszeiten nötig waren, um eine zufriedenstellende Anfärbung der peripher gelegenen Ganglienzellen zu erreichen.

Auch konnte es durch kleinste Verletzungen der Retina während der Präparation zum Eindringen von Farbstoff in angeschnittene Axone oder Dendriten anderer Zellen (Nicht - Ganglienzellen) und somit zu deren Anfärbung kommen.

2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

a. Schnitte

Nach Rehydrierung der bereits mit Dextran markierten Schnitte mit PBS (+0,3% Triton+1%DMSO) erfolgte die Präinkubation mit Ziegen- bzw. Eselserum bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Die Präinkubation sollte eine unspezifische Bindung der Antikörper an diverse Zellstrukturen verhindern. Anschließend wurden die Erst - Antikörper (siehe Tabelle 1) auf die Objektträger aufgetragen und dort bei 4°C für ca. 12 Stunden belassen. Alle Antikörperlösungen wurden in PBS mit 0,3% Triton X und 1% DMSO hergestellt.

Tabelle 1: **Erst - Antikörper/ Schnitte**

Antikörper	Firma	Wirtstier	Verdünnung	Zeit
Anti-Parvalbumin	Sigma	Maus (monoklonal)	1:1000	20-24h
Anti-GAD	Chemicon	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	20-24h
Anti-ChaT	Chemicon	Ziege (polyklonal)	1:50	20-24h

Kurzbeschreibung der verwendeten Antikörper:

Parvalbumin ist ein niedermolekulares Kalzium bindendes Protein (Weruaga et al., 2000). Es bindet das als second messenger dienende Kalzium und moduliert so dessen Signale. Man geht davon aus, dass Parvalbumin die Erregbarkeit der Zelle entscheidend beeinflussen kann. Durch Antikörper gegen dieses Protein lassen sich in der Fischretina eine große Population intensiv anfärbbarer Amakrinzellen an der Innenseite der inneren Körner Schicht und displatzierten Amakrinzellen, das heißt Amakrinzellen, deren Zellkörper in der Ganglienzellschicht liegen, darstellen.

GAD, Glutamatdecarboxylase ist ein Enzym, das zur Bildung von Gamma – Aminobuttersäure [GABA] benötigt wird. Ein Antikörper, der an dieses Enzym bindet, markiert somit vor allem inhibitorische Zellen der Retina, die über GABA als Transmitter verfügen (Dmitrieva et al., 2001).

ChaT, die Cholinacetyl Transferase findet sich in cholinergen Neuronen des Gehirns und des zentralen Nervensystems. Eine Untergruppe der Amakrinzellen, sogenannte „star burst“ Zellen, ließ sich mit einem Antikörper gegen dieses Enzym darstellen (Dmitrieva et al., 2001).

Nach Auswaschen der Schnitte mit PBS wurden die Zweit-Antikörper aufgetragen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: **Zweit-Antikörper/ Schnitte**

Antikörper	Firma/ Charge	Antigenität	Verdünnung	Zeit
Alexa 488	Molecular Probes	Anti-Maus, Anti-Kaninchen	1:400	1,5h
Alexa 660	Molecular Probes	Anti-Maus, Anti-Ziege	1:400	1,5h

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Fluorosave konserviert, mit einem Deckglas versehen und gegen das Eindringen von Sauerstoff (Gefahr des vorzeitigen Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe) mit Klarlack versiegelt. Bei einem Teil der Schnitte erfolgte zusätzlich zur Antikörperfärbung eine Kerngegenfärbung (siehe Kapitel 2.3.3: Gegenfärbungen).

Besondere Sorgfalt in bezug auf die Auswahl von Präinkubationsserum und Zweit-Antikörper erforderte die Dreifach Färbung mit Dextran, Anti-Parvalbumin und Anti-ChaT. Hier musste mit Eselserum präinkubiert werden. Die Erst-Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 (Anti-ChaT aus der Ziege) bzw. 1:1000 (Anti-Parvalbumin aus der Maus) aufgetragen. Als Zweit-Antikörper wurden Alexa 660 (1:400, Anti-Ziege aus dem Esel) und Alexa 488 (1:400, Anti-Maus aus dem Kaninchen) verwendet.

b. Wholemounds

Die bereits mit Dextran retrograd markierten Retinae wurden frei flottierend gefärbt. Wichtig war hierbei, zuvor den Glaskörper so vollständig wie möglich von der Retina abzutragen, um das Eindringen der Farbstoffe zu erleichtern (Zhan und Troy, 1997). Das Entfernen des Glaskörpers erfolgte rein mechanisch, da bei Einsatz des Enzyms Hyaluronidase eine Beeinflussung der nachfolgenden Färbungen nicht ausgeschlossen werden konnte. Als Antikörper wurde ausschließlich Anti-Parvalbumin benutzt (siehe Tabelle 3). Die Einwirkdauer lag hier, bedingt durch die um ein Vielfaches längere Diffusionsstrecke, allerdings wesentlich höher als bei der Färbung von Schnitten.

Tabelle 3: **Erst-Antikörper/ Wholemounds**

Antikörper	Firma/ Charge	Wirtstier	Verdünnung	Zeit
Anti-Parvalbumin	Sigma	Maus (monoklonal)	1:1000	2-2,5d

Als Zweit-Antikörper wurde je nach gewünschtem Absorptionsspektrum, das heißt abhängig von der Kombination mit anderen Farbstoffen, Alexa 488 bzw. Alexa 660 verwendet (siehe Tabelle 4). Auch hier musste die Inkubationszeit erheblich erhöht werden, um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen.

Tabelle 4: **Zweit-Antikörper/ Wholemounds**

Antikörper	Firma/ Charge	Antigenität	Verdünnung	Zeit
Alexa 488	Molecular Probes	Anti-Maus,	1:400	1d
Alexa 660	Molecular Probes	Anti-Maus,	1:400	1d

Erst nach erfolgter Antikörperfärbung und Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Netzhäute mit der Ganglienzellschicht nach oben auf einem mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen, mit Fluorosave benetzt, mit einem Deckglas versehen und versiegelt.

2.3.3 Gegenfärbungen

Zur besseren Orientierung im Schnitt und um den Beweis zu erbringen, dass alle Zellen der Ganglienzellschicht durch retrograde Markierung mit Dextran bzw. durch Antikörperfärbung angesprochen werden können, wurden Kerngegenfärbungen mit dem Farbstoff Sytox Green (Molecular Probes) durchgeführt. Sytox Green ist ein fluoreszierender, basischer Farbstoff, der an die Nukleinsäuren aller Zellkerne bindet. Er erfasst somit alle Zellen der Netzhaut.

Um zu zeigen, dass mittels retrograder Markierung tatsächlich alle Ganglienzellen erfasst werden können, wurden zusätzlich Gegenfärbungen mit „Neuro Trace“ (Molecular Probes), einem der NISSL-Färbung entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff, durchgeführt. Dieser Farbstoff färbt vor allem neuronale Zellen, das heißt in der Netzhaut werden Photorezeptoren, Bipolarzellen und Ganglienzellen angesprochen, Interneurone wie zum Beispiel Amakrinzellen und Horizontalzellen werden auf Grund ihres geringeren Gehaltes an rauhem endoplasmatischem Retikulum nur schwach gefärbt. Die Gegenfärbungen erfolgten direkt im Anschluss an die Antikörperfärbungen. Die verwendeten Verdünnungen sowie die Einwirkdauer sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: **Farbstoffe zur Kerngegenfärbung**

Farbstoff	Firma/ Charge	Verdünnung	Einwirkdauer
Sytox Green	Molecular Probes	Schnitt: 1:20 000	30 min
		Retina: 1:10 000	45 min
Neuro Trace	Molecular Probes	Schnitt: 1:100	30 min

Kurzbeschreibung der zur Kerngegenfärbung verwendeten Farbstoffe:

Sytox Green bindet an die Nukleinsäuren des Zellkerns und ermöglicht so eine Darstellung aller Zellkerne in der Retina.

Neuro Trace ist ein Farbstoff der an das raue endoplasmatische Retikulum (die NISSL – Substanz) der Zellen bindet. Somit werden vor allem Zellen mit einer hohen Dichte an NISSL- Substanz, d.h. Neurone dargestellt.

2.4 Auswertung

2.4.1. Konfokale Laser Scan Mikroskopie

Die Schnitte und Wholemounts wurden an einem konfokalen Laser Scan Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 410) gesichtet und ausgewertet.

a. Aufbau und Funktion

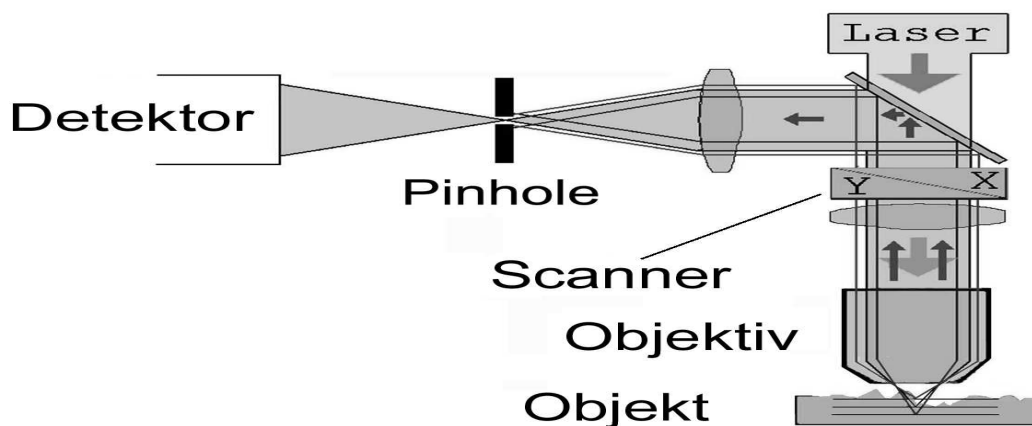


Abbildung 3: **Aufbau und Strahlengang eines Laser Scan Mikroskops**

graue Pfeile: von oben auf das Objekt einfallender Laserstrahl, der zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe führt

schwarze Pfeile: vom Objekt emittierte Strahlung

Pinhole= konfokale Blende (siehe unten)

Die Entstehung eines mikroskopischen Bildes an einem Laser Scan Mikroskop erfolgt in drei Schritten:

1. Zeilenweises Abrastern der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl, der mittels zweier galvanometrisch betriebener Scanner in x-/y- Richtung abgelenkt wird.
2. Pixelweise Detektion der vom jeweiligen Probenort emittierten Fluoreszenzstrahlung über einen Photomultiplier.
3. Digitalisierung der nach dem Photomultiplier als elektrisches Signal vorliegenden Objektinformationen.

Die Darstellung auf dem Bildschirm erfolgt durch pixelweises Ausgeben der Bilddaten aus einem digitalen Bildspeicher. Jedes Bild enthält 512x512 Pixel, so dass über die Pixelgröße die Vergrößerung des Bildes berechnet werden kann. Das heißt, Bilder mit mikroskopischer Auflösung entstehen im konfokalen LSM ausschließlich Computer-unterstützt digital. Die Auflösungsgrenze des Mikroskops liegt in Abhängigkeit von der Wellenlänge des verwendeten Lasers bei etwa 0,3µm. Das wird aber nur bei Objektiven mit hoher numerischer Apertur (NA) erreicht. Zur Verwendung kam für diese Arbeit ein 40x Wasser-Immersionsobjektiv, NA = 1,2 und für Übersichtsaufnahmen ein Objektiv mit 20facher Vergrößerung (NA = 0.5).

Pinhole: Das konfokale LSM verfügt über eine konfokale Blende (= Pinhole), die in einer zur Zwischenbildebene und damit auch zur Objektebene des Mikroskops konjugierten Ebene angeordnet ist. Der Durchmesser der Blende ist variabel und legt fest, in welchem Maß Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausgeblendet bzw. nicht detektiert wird. Die ausgeblendeten Bereiche des Objekts sind im Bild unsichtbar. Das konfokale Mikroskop als optisches System ist somit inhärent tiefendiskriminierend. Daraus ergibt sich die Möglichkeit aus dicken Präparaten, dünne Präparatschichten, sogenannte optische Schnitte, abzubilden. Diese optischen Schnitte wiederum ermöglichen eine dreidimensionale Rekonstruktion des Objekts.

Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, gezielt retinale Schichten aus nicht geschnittenen Retina-Präparationen (wholemounds) darzustellen und einzelne Zellen innerhalb dieser Schichten zu rekonstruieren.

b. Farbstoffe und Laser

Die verwendeten Fluorochrome (siehe Tabelle 6) wurden so gewählt, dass sich ihre Emissionswellenlängen deutlich voneinander unterscheiden, um eine optimale Auftrennung der Signale zu ermöglichen und so Überlagerungen zu vermeiden.

Tabelle 6: Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Anregungsmaximum(nm)	Emissionsmaximum (nm)
TMR- Dextran	555	580
Alexa 488	494	521
Alexa 660	633	660
Sytox Green	510	525
Neuro-Trace	530	615

Zur Anregung gebracht wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit Lasern der Wellenlänge 488nm, 543nm und 633nm. Dabei sollte die Wellenlänge des Lasers möglichst nahe am Anregungsmaximum des jeweiligen Farbstoffes liegen. Es können nur Farbstoffe kombiniert werden, deren Emissionsbereiche sich nicht zu stark überlappen. Zusätzlich wurden Long pass und Band pass Filter verwendet, um eine optimale Auftrennung der Signale vor allem bei Dreifach-Markierungen zu gewährleisten.

Obwohl die Wirkung des Laserlichtes auf fixiertes Gewebe unbekannt ist (Xue et al., 1998), wurde darauf geachtet sowohl die Scan – Zeit als auch die Laserintensität so niedrig wie möglich zu halten, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Farbstoffe und somit der Entstehung von Artefakten vorzubeugen.

2.5 Datenerfassung

2.5.1. Ganglienzellen

In den retrograd mit Dextran gefärbten Netzhäuten stellten sich ein Großteil der Zellen der Ganglienzellschicht und einige Zellen der INL dar. Da die retrograde Markierung mit Tetramethyl Rhodamin Dextran, ausgehend vom optischen Nerv, entlang der Axone erfolgte, musste es sich hierbei um Ganglienzellen bzw. um displazierte Ganglienzellen handeln. Axone und Somata waren gut darstellbar, und auch die Dendriten größerer Zellen ließen sich gut bis in die Peripherie verfolgen.

a. Orthotope Ganglienzellen

Anzahl und Verteilung der in der Ganglienzellschicht gelegenen Ganglienzellen wurden sowohl in Wholemounds als auch in Schnitten erfasst. Für die quantitative Analyse wurden die Netzhäute von zwei großen, drei mittleren und zwei kleinen Fischen untersucht.

Nur mit Dextran markierte Netzhäute wurden am LSM mit einem 20er-Objektiv erfasst, Netzhäute mit Doppelmarkierung mit einem 40er-Objektiv (Laser: 543nm). Rasterförmig wurde so die gesamte Retina eingescannt und anschließend am Computer rekonstruiert.

Die Zählung der Zellen erfolgte nachträglich am Computer. Hierbei wurde die Anzahl der Ganglienzellen jedoch nicht für das ganze Bild ermittelt, sondern nur für eine repräsentative Fläche von 0,01mm². Es folgte eine Hochrechnung auf die Anzahl der Zellen pro Quadratmillimeter Netzhaut (Statistische Aufarbeitung und Fehlerbereinigung siehe 2.6). Die berechneten Dichten konnten nun den entsprechenden Netzhautarealen zugeordnet werden.

Eine Einteilung der Ganglienzellen in morphologisch abgrenzbare Untergruppen erfolgte nur beispielhaft an ausgewählten Bildern und nicht flächendeckend für die ganze Netzhaut, da dies nicht Hauptthema der Untersuchung sein sollte.

Um einzelne Zellen möglichst in ihrer ganzen Ausdehnung zu erfassen, wurden mehrere Bilder in verschiedenen Tiefen mit einem Abstand von 1-10µm

aufgenommen und mittels Software übereinander projiziert. So war auch die dreidimensionale Rekonstruktion einzelner Zellen möglich.

An Schnitten erfolgte die Zählung von Ganglienzellen, displatzierten Amakrinzellen, orthotopen Amakrinzellen, Horizontalzellen und Zellen, die weder durch Parvalbumin noch durch Dextran, sondern nur durch die Kerngegenfärbung zur Darstellung kamen. Um eine reproduzierbare Zählung zu gewährleisten und eine Zuordnung der Ergebnisse zu einer bestimmten Netzhautregion zu ermöglichen, wurden die Netzhäute entsprechend ihrer Orientierung auf dem Objektträger in fünf gleich große Regionen unterteilt (siehe dazu Abbildung 4). Für jede dieser Regionen wurde ein repräsentativer Bildausschnitt mit einer Länge von 150µm ausgezählt.

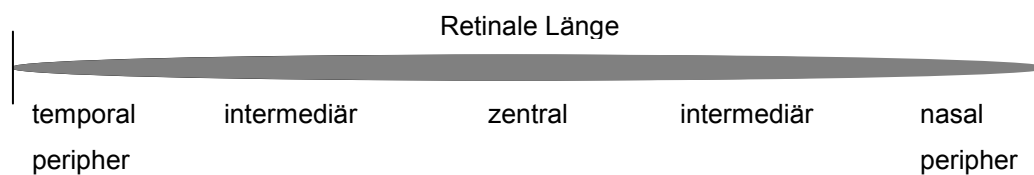


Abbildung 4: **Auswertung und Auszählung von Schnitten**

Um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden nur Schnitte ausgewählt die möglichst nah an der Papille lagen bzw. durch sie hindurch gingen. Ein weiteres Kriterium war die periphere Wachstumszone; es musste sowohl die temporale als auch die nasale periphere Wachstumszone komplett auf den auszählenden Schnitten vorhanden sein. Für jede Netzhaut wurden im Durchschnitt zwölf Schnitte ausgezählt und daraus für die fünf genannten Bereiche Durchschnittswerte für die Ganglienzellen bzw. displatzierten Amakrinzellen berechnet.

Aufgrund der Eigenschaften des konfokalen Mikroskops (Pinhole) konnte den Zählungen und den nachfolgenden Berechnungen eine optische Schnittdicke von etwa 1µm zu Grunde gelegt werden.

b. Displatzierte Ganglienzellen

Anzahl und Verteilung der displatzierten Ganglienzellen wurden ausschließlich an Wholemounds ermittelt. Für diese Untersuchungen wurden die Netzhäute von drei Fischen mittlerer Größe (SL= 4,4 - 4,8cm) und die Netzhaut eines kleinen Fisches (SL= 2,0cm) verwendet.

Am LSM wurden die Netzhäute mit einem 20er- Objektiv rasterförmig eingescannt (Laser: 543nm). In dieser Vergrößerung entspricht der Bildausschnitt einem Quadrat mit einer Kantenlänge von 638 μ m. Die Ebene der displatzierten Ganglienzellen wurde fokussiert, die Zellen ausgezählt und ein Bild angefertigt. Die Auszählung der displatzierten Ganglienzellen erfolgte direkt am Mikroskop, da sich herausstellte, dass eine nachträgliche Auszählung am Computer eine zu große Ungenauigkeit beinhaltetete. Am Computer wurden die angefertigten Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild der Retina zusammengefügt, um so einen besseren Überblick über die Verteilung dieses Zelltyps zu erhalten (siehe auch Abbildung 10).

Eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Subtypen (bistratifziert, monostratifziert) der displatzierten Ganglienzellen war in dieser Vergrößerung nicht immer eindeutig möglich.

2.5.2. Amakrinzellen

Zur quantitativen Erfassung der Amakrinzellen wurden sowohl Wholemounts, als auch Schnitte verwendet. Als Marker diente das Kalzium bindende Protein Parvalbumin. Es konnte in einer Vielzahl von Zellkörpern in der INL sowie in einigen Zellen der Ganglienzellschicht nachgewiesen werden. Die Markierung der Amakrinzellen mit Parvalbumin lässt nur eine Beurteilung des Zellkörpers nicht aber der Dendriten zu.

a. Orthotope Amakrinzellen

Die Amakrinzellen der Inneren Körner Schicht (INL) konnten nur in retinalen Schnitten dargestellt werden. In Wholemounts konnten auf Grund der geringen optischen Schnittdicke nicht alle Amakrinzellen der INL in einem Bild erfasst werden. Schnitte wurden nach demselben Verfahren ausgewertet wie zur Zählung der orthotopen Ganglienzellen (siehe 2.5.1 a).

Zusätzlich wurden bei der Auszählung von Schnitten Horizontalzellen in der INL und Zellen der Ganglienzellschicht, die nur durch die Kerngegenfärbung zur Darstellung kamen, erfasst.

b. Displazierte Amakrinzellen

Es zeigte sich, dass an Wholemounts nur die displazierten Amakrinzellen ausreichend gut beurteilbar waren. Die Wholemounts wurden mit einem 40er – Objektiv (Wasserimmersion) und einem Zoom von 3,2 eingescannt, was einem Bildausschnitt mit einer Kantenlänge von 100µm entspricht (Berechnung durch LSM Software). In diesem Quadrat wurden sowohl Ganglienzellen (543nm) als auch Amakrinzellen (488nm) quantitativ erfasst. Später erfolgte eine Hochrechnung auf die gesamte Retina bzw. bestimmte Areale der Netzhaut.

Die Auszählung von displazierten Amakrinzellen an Schnitten erfolgte auf gleiche Weise wie die der orthotopen Ganglienzellen und Amakrinzellen (siehe 2.5.1 a).

2.6 Berechnungen und Statistik

Nach Auszählung der Präparate folgte nun die Berechnung der absoluten Zellzahlen pro mm² für die jeweiligen Netzhautareale. Um eine unabhängig Größe zu erhalten, die einen Vergleich verschiedener Netzhautareale innerhalb einer Netzhaut sowie zwischen den verschiedenen Fischgrößen ermöglichte, wurden die absoluten Dichten von displatzierten Amakrinzellen [DAC] und orthotopen Ganglienzellen [OGC] in Bezug gesetzt. Mit dem Quotienten DAC zu OGC konnte die relative Dichte für alle Netzhautareale berechnet und verglichen werden.

Die Berechnung der absoluten Zelldichte pro mm² aus Daten, welche an Wholemounds erhoben wurden, erfolgte durch einfache Multiplikation, entsprechend der Größe des ausgezählten Feldes, da die Zellkörper in diesen Präparaten in ihrer Gesamtheit in Bildstapeln erfasst wurden.

Um den von Coggeshall (1992) bei Einzelzählungen an Schnitten beschriebene Fehler zu vermeiden, wurden die an Schnitten gewonnenen Daten mit der von ihm vorgeschlagenen Formel überarbeitet. Coggeshall sagt, dass die Anzahl der in verschiedenen Schnitten gezählten „Zellanschnitte“ (Profile) nicht mit der Anzahl tatsächlich vorhandener Zellen korrespondieren muss. Er schlägt daher vor, die Anzahl der gezählten Profile (n) mit der Schnittdicke (T) zu multiplizieren. Diese Zahl wird durch die Summe aus Schnittdicke (T) und Durchmesser des Profils an seiner breitesten Stelle (D) geteilt und ergibt dann die Anzahl tatsächlich vorhandener Zellen (N). Diese Formel geht ursprünglich zurück auf Abercombie (1946).

$$N = \frac{n * T}{T + D}$$

Gleichung 1: Fehlerberechnung zu Einzelzählungen an Schnitten

N = Anzahl tatsächlich vorhandener Zellen

n = Anzahl gezählter Profile

T = Schnittdicke

D = Durchmesser der Profile

Die Schnittdicke (T) entspricht der Dicke des optischen Schnittes von 1µm, die durch die Verwendung eines 40er-Wasser-Objektivs und eine Pinhole-Einstellung von einer Airy Unit gewährleistet war.

Für den Durchmesser (D) wurde ein Durchschnittswert für Ganglienzellen und Amakrinzellen bei großen, mittleren und kleinen Fischen berechnet (siehe dazu Tabelle 7).

Tabelle 7: Durchschnittlicher Zelldurchmesser

	DAC (StAbw.)	GC (StAbw.)
großer Fisch	4,01 µm (+/-0,36)	4,35 µm (+/-0,32)
mittlerer Fisch	4,4 µm (+/-0,32)	4,86 µm (+/-0,53)
kleiner Fisch	4,5 µm (+/-0,54)	5,2 µm (+/-0,94)

DAC = displatzierte Amakrinzellen

GC= Ganglienzellen

StAbw.= Standardabweichung

Die Absolutwerte der so errechneten Größe N für Ganglienzellen und displatzierten Amakrinzellen konnten jetzt in Bezug gesetzt werden und ergaben so das relative Verhältnis der DAC zu OGC.

Verglichen wurde nun der Quotient DAC/OGC für die fünf untersuchten Netzhautregionen (temporal, intermediär temporal, zentral, intermediär nasal, nasal) innerhalb einer Fischgruppe und zwischen den drei verschiedenen Fischgrößen. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede des Quotienten DAC/OGC für die verschiedenen Netzhautregionen und Fischgrößen zu prüfen wurde eine einfaktorielle, unabhängige Varianzprüfung (ANOVA) durchgeführt. Zum Vergleich der Quotienten in zentralen und peripheren Retina-Arealen innerhalb einer Gruppe von Fischen derselben Größe diente der t-Test nach Student für unabhängige Stichproben bei ungleichen Stichprobenumfängen.

3. Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigte sich mit Zellen, deren Zellkörper in der Ganglienzellschicht der Netzhaut von Cichliden lokalisiert sind. Von besonderem Interesse waren Anteil und Verteilung der Nicht-Ganglienzellen in dieser retinalen Zellschicht. Das Ziel war es, Anpassungsvorgänge dieser Zellen an die Alterung bzw. das Wachstum der Netzhaut herauszuarbeiten.

Um einen Bezugspunkt für die Veränderungen von Anzahl und Verteilung der Nicht-Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht zu haben, wurden zunächst die Ganglienzellen untersucht. Dabei war nicht Ziel, eine neuerliche Beschreibung der verschiedenen Ganglienzelltypen vorzunehmen. Vielmehr ging es um die quantitative Erfassung dieser Zellen und ihrer Verteilung innerhalb der Netzhaut.

Anschließend erfolgte eine Gegenüberstellung von Ganglienzellen und Nicht-Ganglienzellen für verschiedene Netzhautareale (peripher und zentral) sowie für drei Gruppen verschieden großer Fische mit der Idee, Veränderungen während des Wachstums auf diese Weise zu erkennen.

Die Kombination aus zwei zellspezifischen Färbungen zusammen mit einer Kerngegenfärbung erwies sich in dieser Studie als nützlich: die von der Schnittfläche des optischen Nerven ausgehende retrograde Färbung der Ganglienzellen mit Dextran und die immunhistochemische Färbung von Parvalbumin zum Nachweis der Nicht-Ganglienzellen.

Im folgenden wird zunächst die Verteilung der Ganglienzellen beschrieben. Unterschieden wurde hierbei zwischen Ganglienzellen der Ganglienzellschicht und sogenannten displatzierten Ganglienzellen, deren Somata am inneren Rand der INL lokalisiert sind.

3.1 Ganglienzellen

In retrograd gefärbten Netzhäuten zeigten viele, aber nicht alle Zellen der Ganglienzellschicht und einige Zellen in der IPL eine positive Anfärbung mit Tetramethyl Rhodamin Dextran. Aufgrund des Rücktransportes des Farbstoffs vom optischen Nerven über die Axone zum Zellkörper wurden diese Zellen als Ganglienzellen der Ganglienzellschicht beziehungsweise als displatzierte Ganglienzellen identifiziert.

3.1.1 Orthotope Ganglienzellen

Anzahl und Verteilung der orthotopen Ganglienzellen wurden an vier mit Dextran markierten Netzhäuten (AP1li, AP3re, AP7re, AP14re) sowie an Schnittmaterial von weiteren acht Netzhäuten (AP1re, AP7re, AP10re, AP11li, AP12re, AP13li, AP14li, AP15re) untersucht.

Die Zellkörper und dendritischen Fortsätze dieser Zellen färbten sich gut an. Es konnten allerdings nur die Dendriten größerer Ganglienzellen beurteilt werden. Die Dendritenbäume kleinerer Ganglienzellen waren entweder nur schwach mit Farbstoff gefüllt oder ihre Verzweigungen verloren sich in den Überlappungen mit Nachbarzellen (siehe Abbildungen 5 und 6).

Abbildung 5:

orthotope Ganglienzellen

Mit Dextran retrograd markierte Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht eines mittelgrossen Fisches. Die Aufnahme wurde mit einem 40er Objektiv angefertigt und diente der Auszählung von Ganglienzellen und displatzierten Amakrinzellen (in dieser Abbildung ausgeblendet). Dendriten sind in dieser Vergrösserung nur bei grösseren, kräftig angefärbeten Zellen zu erkennen.

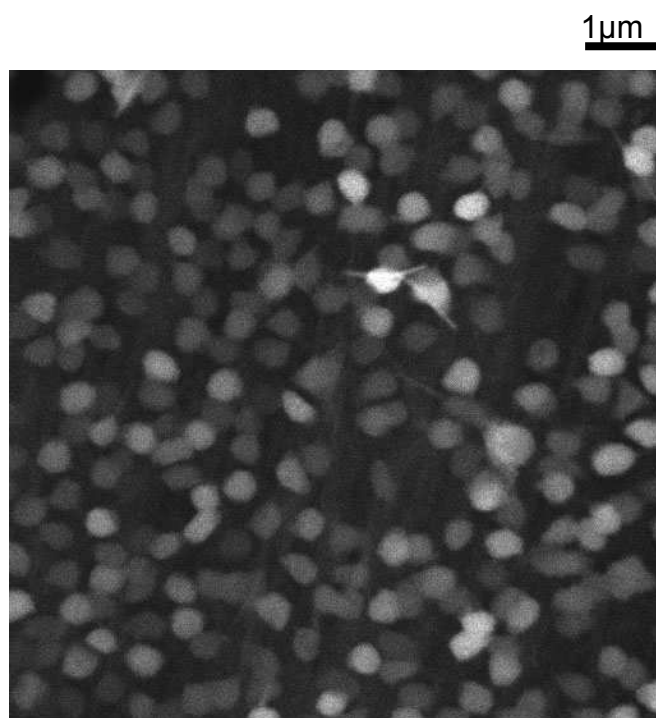
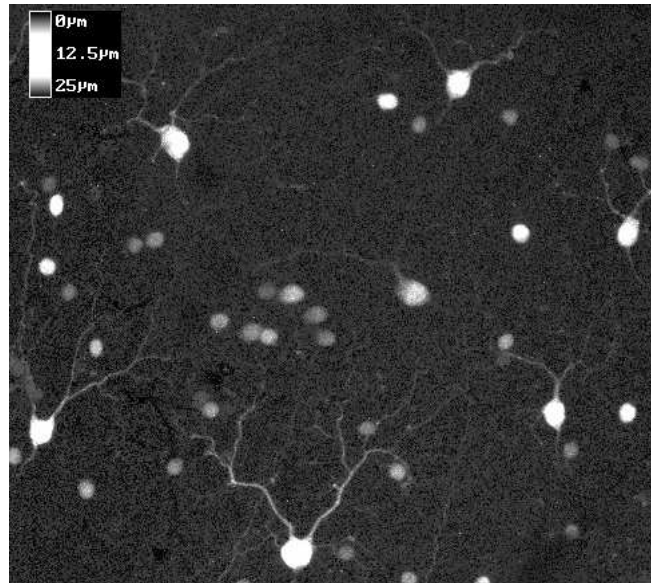


Abbildung 6:

Rekonstruktion mehrerer OGC

Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops ist es möglich einzelne Schichten eines Präparates darzustellen und später übereinander zu projizieren. So kamen diese Aufnahmen von Ganglienzellen und ihren Dendritenbäumen zustande. Der Abstand der Schichten beträgt $1\mu\text{m}$, insgesamt wurden $25\mu\text{m}$ in der z-Achse des Präparates betrachtet.



Die Dichte der Ganglienzellen, gemessen über die gesamte Netzhaut, liegt beim kleinen Fisch (AP14re) mit etwa 18 000 Zellen pro Quadratmillimeter deutlich höher als bei mittelgroßen Tieren. Diese weisen eine mittlere Dichte von etwa 9 000 Ganglienzellen pro Quadratmillimeter auf. In der Netzhaut junger Fische liegen die Zellkörper der Ganglienzellschicht dicht gedrängt in mehreren Reihen übereinander. Mit zunehmendem Wachstum der Netzhaut vergrößert sich der Abstand der Ganglienzellen durch Dehnung des Gewebes, die Ganglienzellschicht weist nur noch eine Reihe von Zellkörpern auf und die Dichte der Zellen nimmt ab. Diesem Mechanismus zu Folge wäre die höchste Dichte der Ganglienzellen gleichmäßig entlang der Wachstumszone in der Peripherie der Netzhaut zu erwarten.

Es zeigte sich aber, dass die absolute Zahl orthotoper Ganglienzellen in der dorsalen Hälfte der Netzhaut am höchsten ist. Die größte Dichte wird im dorso-temporalen Bereich der Netzhaut erreicht (siehe Abbildungen 7 und 8). In diesem Areal der Netzhaut befindet sich auch die höchste Zapfendichte.

Ursache dieser ungleichmäßigen Verteilung der Zellen könnte sowohl eine asymmetrische Gewebedehnung als auch eine lokal vermehrte Zellproliferation sein.

Der Grund dafür ist wohl eine bessere Verarbeitung von Informationen aus dem medialen unteren Quadranten des Gesichtsfeldes des Fisches. Der Fisch besitzt nicht wie der Mensch eine Fovea als Stelle des schärfsten Sehens. Die größere Zelldichte in der dorso-temporalen Netzhaut ermöglicht dem Fisch jedoch einen schärferen Blick nach vorne unten. Eine Blickrichtung, die für die Futtersuche unerlässlich ist. Er kann so den Nachteil der seitlich am Kopf angebrachten Augen ausgleichen.

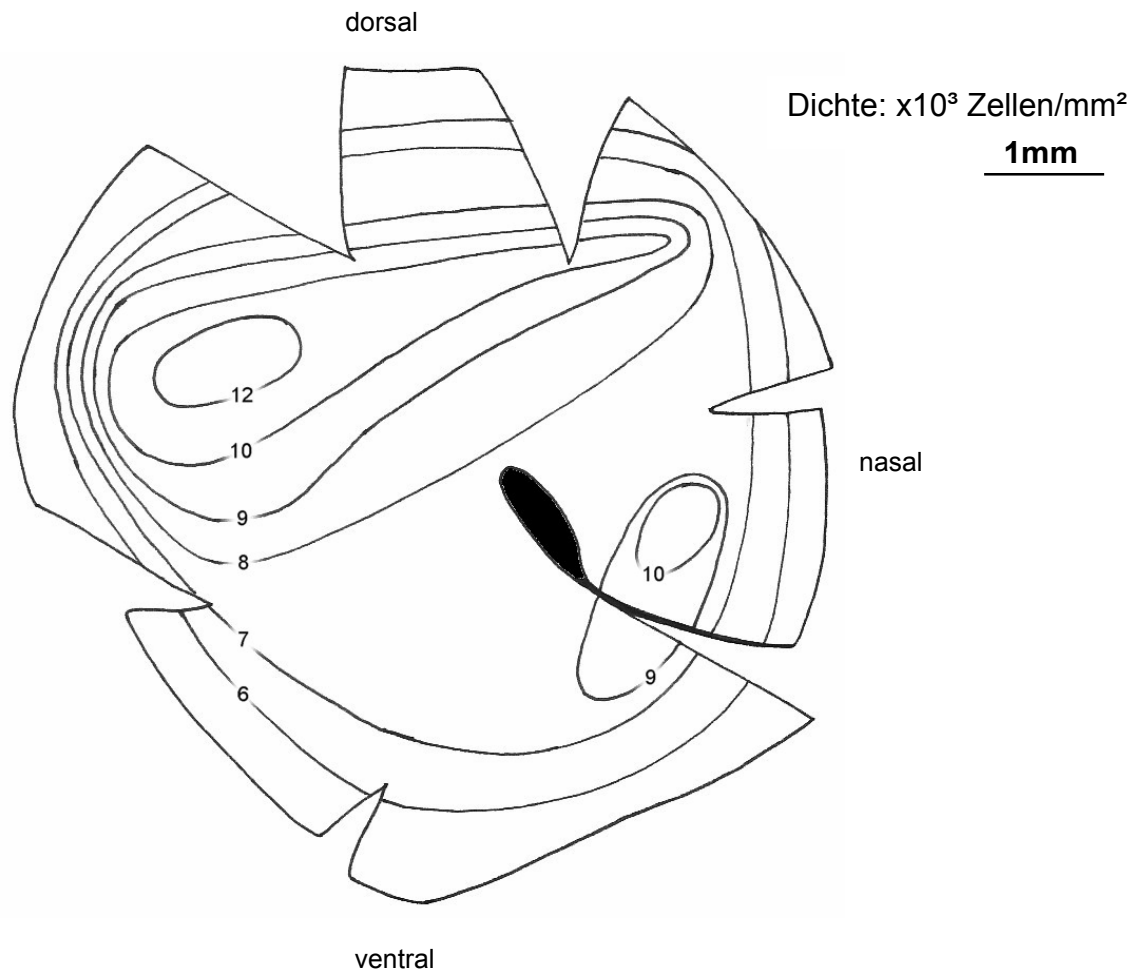


Abbildung 7: **Verteilung der OGC: rechtes Auge (Ap3re)**

Verteilung orthotoper Ganglienzellen in einer rechten Netzhaut nach retrograder Färbung der Zellen mit Tetramethyl Rhodamin Dextran.

Die Dichtelinien umfassen Bereiche mit einer Anzahl von Ganglienzellen $\times 10^3$ pro mm².

Retinale Länge (entspricht in etwa dem Durchmesser der Netzhaut) = 6996 μ m.

Auffallend ist ein dorso-temporales Areal in dem die Ganglienzellen, mit einer Zelldichte von 12×10^3 Zellen/mm², die größte Dichte aufweisen. Auf diesen Bereich der Netzhaut projiziert sich der mediale untere Quadrant des Gesichtsfeldes, das heißt alles was sich vor und unter dem Maul des Fisches befindet.

Weiterhin fällt ein zweites Areal mit vermehrter Zelldichte (10×10^3 Zellen /mm²) auf, das nasal der Papille gelegen ist.

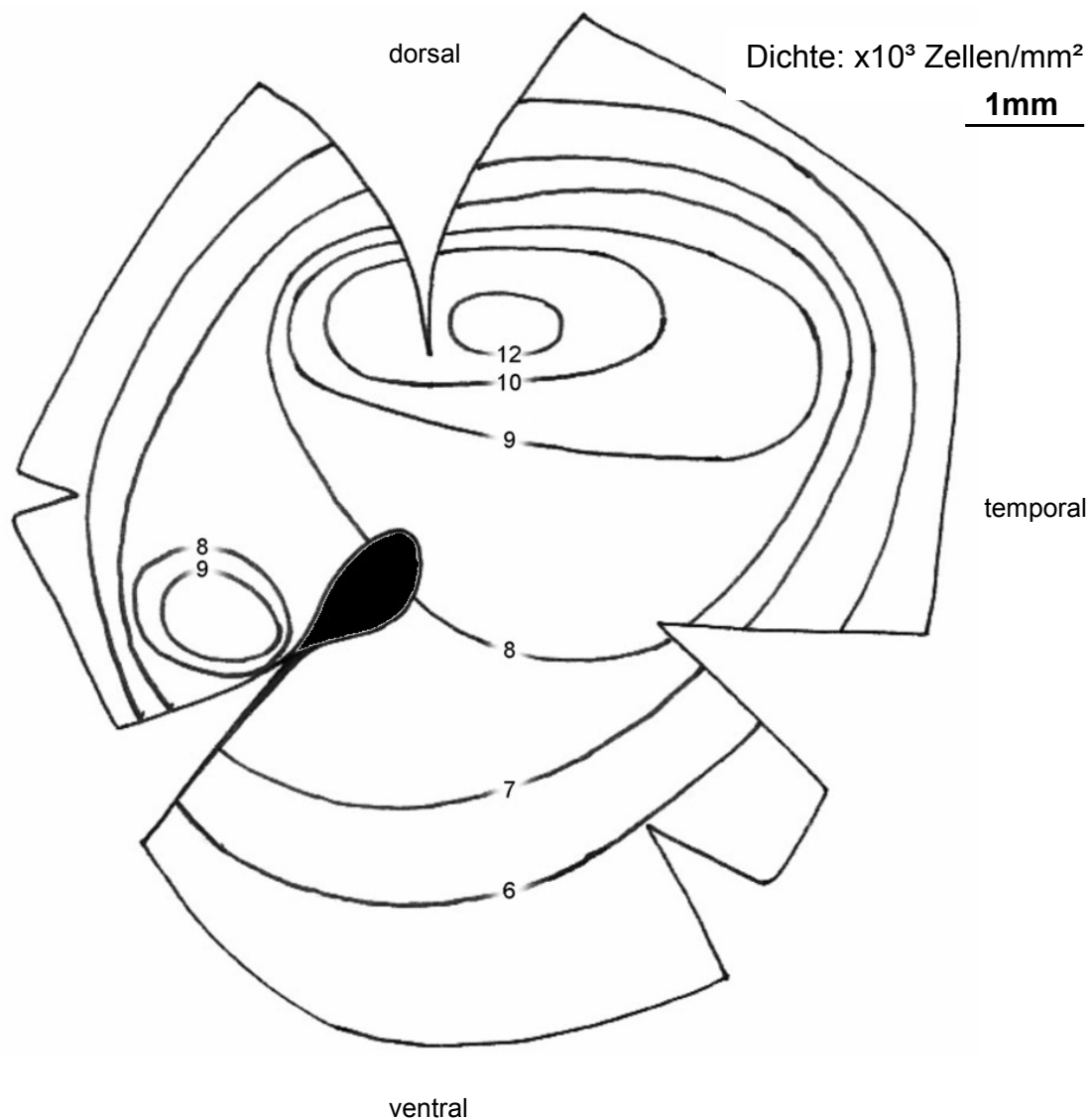


Abbildung 8: **Verteilung der OGC: linkes Auge (Ap1li)**

Verteilung orthotoper Ganglienzellen in einer linken Netzhaut nach retrograder Färbung der Zellen mit Tetramethyl Rhodamin Dextran.

Die Dichtelinien umfassen Bereiche mit einer Anzahl von Ganglienzellen $\times 10^3$ pro mm^2 .

Retinale Länge= $8268\mu\text{m}$

Auch bei diesem Tier findet sich ein dorso-temporal gelegenes Areal mit einer Zelldichte von 12×10^3 Zellen/ mm^2 .

Der nasal der Papille gelegene Bereich weist eine Zelldichte von 9×10^3 Zellen / mm^2 auf.

3.1.2 Displatzierte Ganglienzellen

Die Anzahl und Verteilung der displatzierten Ganglienzellen wurde an vier Netzhäuten (AP1li, AP3re, AP7re, AP14re) untersucht, die mit Tetramethyl Rhodamin Dextran retrograd gefärbt wurden.

Die Zellkörper der displatzierten Ganglienzellen lagen an der Grenze zwischen INL und IPL. Die retrograde Färbetechnik, ausgehend von den Axonen des optischen Nervs, konnte diese Zellen einwandfrei als Ganglienzellen identifizieren. Die dendritischen Fortsätze der displatzierten Ganglienzellen färbten sich gut an, so dass bei entsprechender Vergrößerung mindestens zwei morphologisch unterschiedliche Typen von displatzierten Ganglienzellen unterschieden werden konnten: monostratifizierte Zellen mit einem eher rundlichen Zellkörper, deren Dendriten sich ausschließlich in der IPL verzweigen und bistatifizierte Zellen mit einem schmalen, langgestreckten Zellkörper, die zusätzlich zu ihrem Dendritenbaum in der IPL über einen zweiten Dendritenbaum in der OPL verfügen (siehe Abbildungen 9).

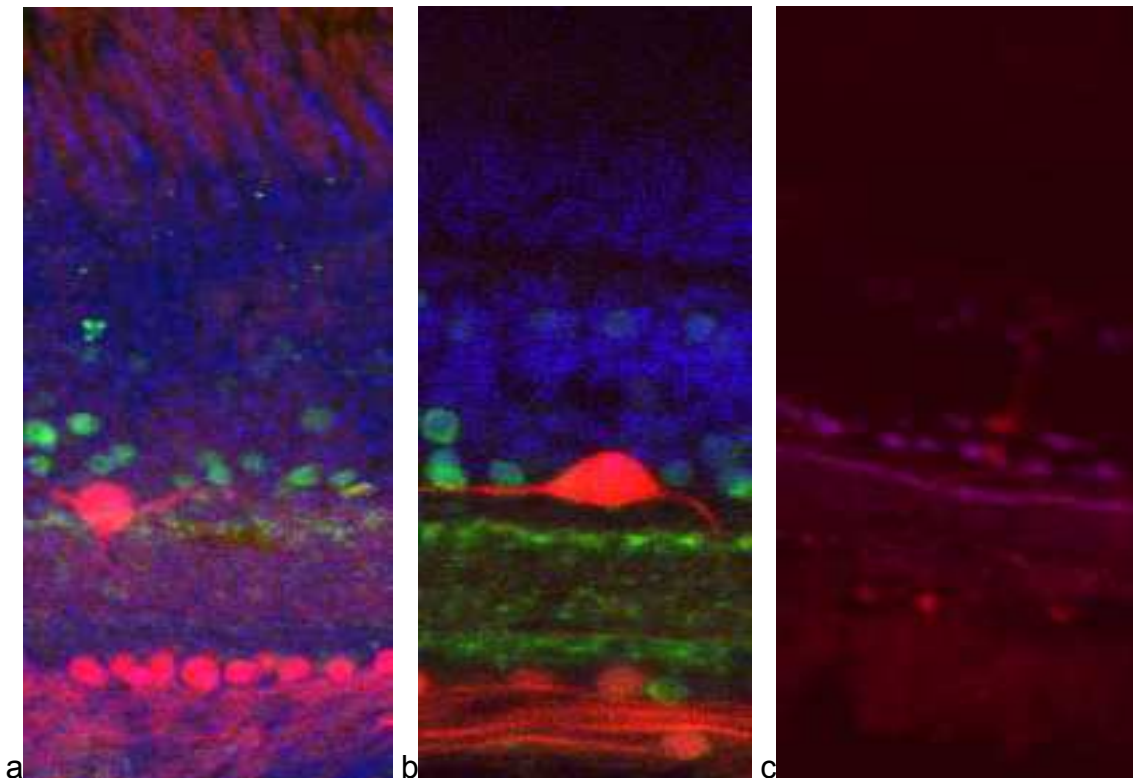


Abbildung 9: **displazierte Ganglienzellen**

Unterschiedliche Typen von displazierten Ganglienzellen, deren Zellkörper an der Grenze zwischen INL und IPL liegen.

Bei Abbildung a und b handelt es sich um dreifach markierte Präparate: orthotope und displazierte Ganglienzellen retrograd mit Dextran gefärbt, stellen sich rot dar. Parvalbumin positive Zellen (z.B. Amakrinzellen) sind grün. Sytox green als Kerngegenfärbung stellt alle Zellkerne blau dar.

Abbildung c zeigt zwei nahe nebeneinander liegende displazierte Ganglienzellen mit ihren Dendriten und Axonen in einem zweifach markierten Präparat (Dextran:rot; Sytox green: blau).

Die Dichte der displatzierten Ganglienzellen schwankte stark und war in den nasalen Anteilen der dorsalen Netzhauthälfte mit durchschnittlich 20 Zellen pro Quadratmillimeter beim mittelgroßen Fisch (SL= 4,5 cm) am höchsten. Beim kleinen Fisch (SL= 2,0cm) lag die durchschnittliche Dichte displatzierter Ganglienzellen in diesem Bereich mit etwa 30 Zellen pro Quadratmillimeter noch höher.

Das Verteilungsmuster der displatzierten Ganglienzellen scheint sich am Verlauf der Axone der Ganglienzellen zu orientieren. Es fiel eine radiäre Anordnung der displatzierten Ganglienzellen in Richtung Papille auf (siehe auch Abb.10), wobei in der Abbildung alle displatzierten Ganglienzellen zu sehen waren, und eine Unterscheidung der verschiedenen Typen in dieser Vergrößerung nicht möglich war. Eine regelmäßige Anordnung der Zellen im Sinne eines Mosaiks wäre denkbar, wurde aber nur für einen Typ der displatzierten Ganglienzellen beschrieben und ist in Abbildung 10 durch die Darstellung aller DGCs nicht erkennbar.

Die Abstände von Zellkörper zu Zellkörper betragen beim mittelgroßen Fisch in der Peripherie etwa 265 μm , im Zentrum der Netzhaut dorsal der Papille nur etwa 130 μm . Auffallend war, dass bistratifizierte displatzierte Ganglienzellen häufig in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer monostratifizierten displatzierten Ganglienzelle zu finden waren. Es wurde dagegen nicht beobachtet, dass zwei displatzierte Ganglienzellen desselben Typs so nahe nebeneinander liegen.

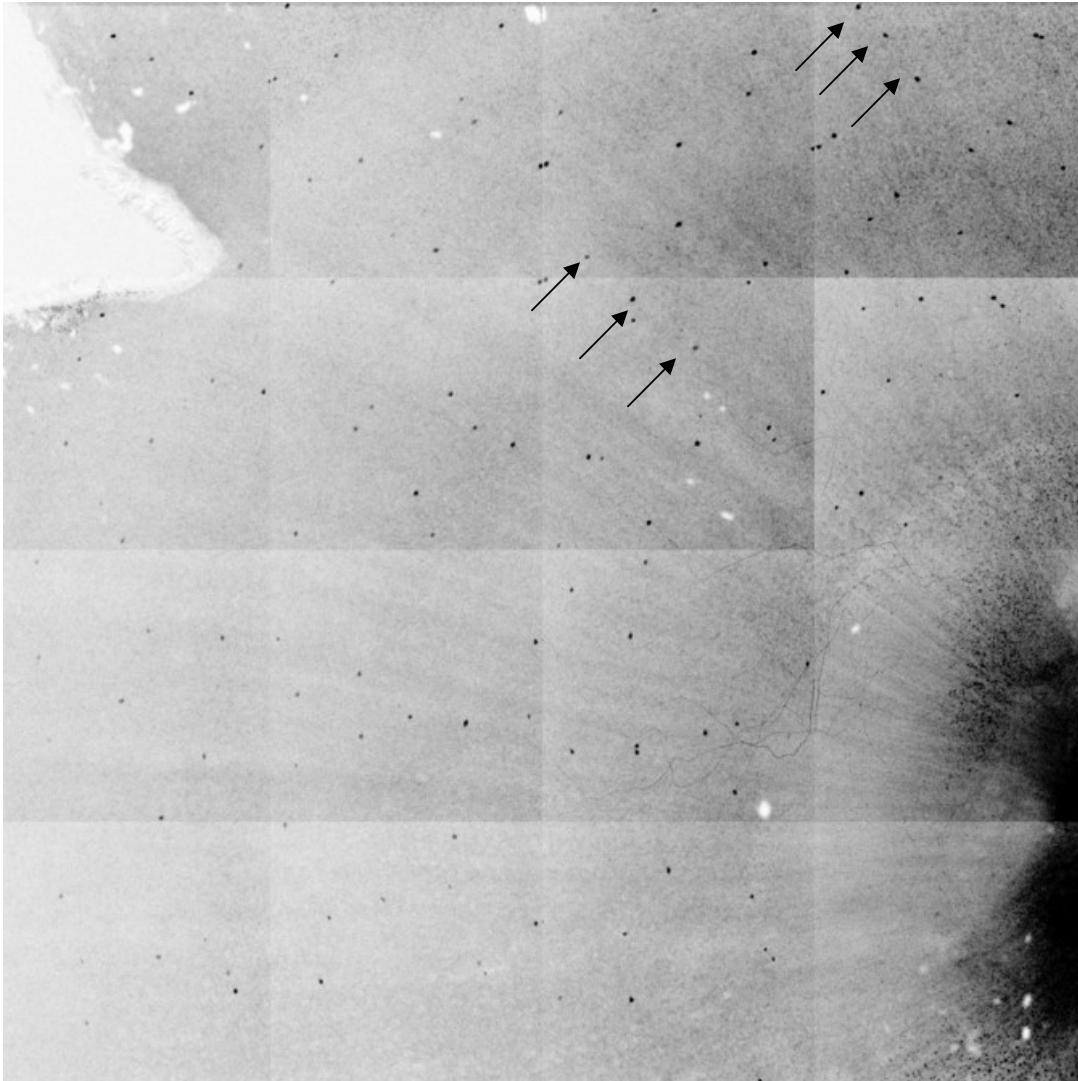


Abbildung 10: Verteilung der DGC (Originalbild)

Die Abbildung zeigt den vergrößerten Ausschnitt aus der rechten Netzhaut eines mittelgroßen Fisches (AP3re). Die einzelnen Aufnahmen (Kantenlänge: 636 μm) wurden mit einem 20er – Objektiv angefertigt. Durch anschließendes Zusammenfügen der einzelnen Bilder entsteht die Rekonstruktion einer kompletten vergrößerten Retina. Es handelt sich hier um eine invertierte Aufnahme, daher sind die mit Dextran gefärbten dislatzierten Ganglienzellen schwarz zu sehen, das restliche Gewebe sowie die Axone der Ganglienzellen in ihrem Verlauf zur Papille (rechts unten im Bild) stellen sich hell dar.

Die Pfeile (\rightarrow) markieren dislatzierte Ganglienzellen, deren Anordnung sich scheinbar am Verlauf der Axone orientiert.

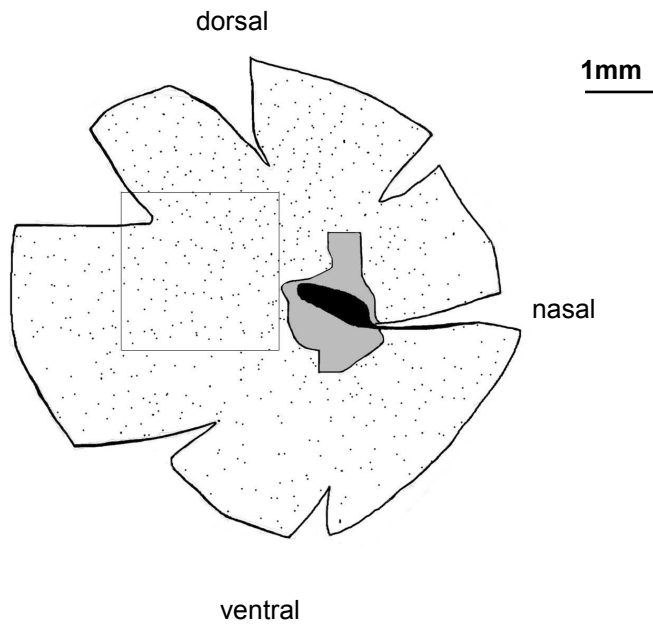


Abbildung 11: Verteilung der DGC über die gesamte Netzhaut

Schematische Darstellung der rechten Netzhaut eines mittelgroßen Fisches (AP3re, SL=4,7cm). Mit Hilfe des Laser Scan Mikroskops ist es möglich alle displatzierten Ganglienzellen in ihrer Lokalisation auf der Netzhaut darzustellen.

Kasten: siehe Vergrößerung auf der vorhergehenden Seite.

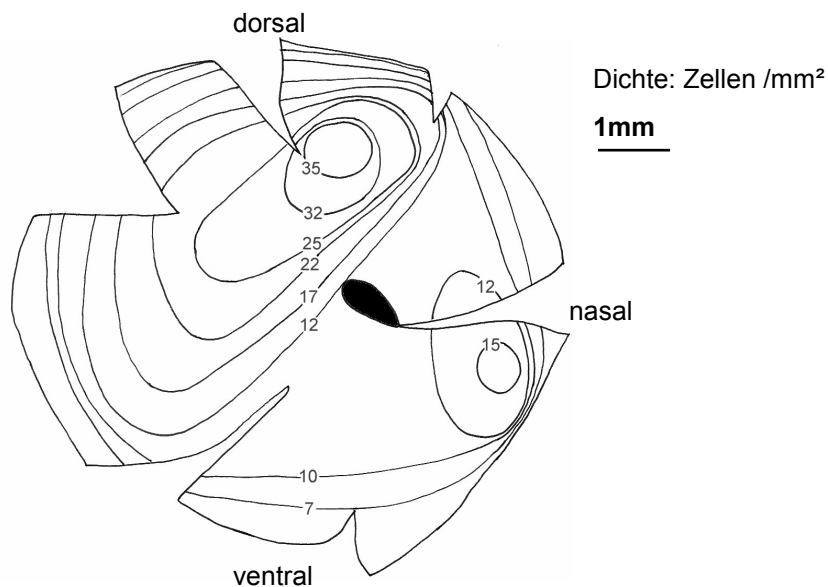


Abbildung 12: Dichte der DGC

Darstellung der Zelldichte der DGC mit Hilfe von Dichtelinien. Angegeben ist die Anzahl der Zellen pro mm^2 . Vergleiche auch Abb. 7 und 8. Es fällt wie bei der Verteilung der orthotopen Ganglienzellen ein Areal vermehrter Dichte in der dorsalen Netzhauthälfte auf. Allerdings liegt bei den displatzierten Ganglienzellen der Bereich der höchsten Zelldichte nicht temporal, sondern eher im nasal-analen Anteil der dorsalen Netzhauthälfte.

3.2 Amakrinzellen

Mit Hilfe von Kerngegenfärbungen ließ sich nachweisen, dass in retrograd markierten Netzhäuten viele aber nicht alle Zellen der Ganglienzellschicht mit Dextran angefärbt wurden. Um auch die bisher nicht markierten Zellen zu erfassen, wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung gegen das Kalzium bindende Protein Parvalbumin eingesetzt, welches vor allem von inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird.

Untersuchungen zu Vorkommen, Häufigkeit und Verteilung dieser Parvalbumin positiven Zellen wurden an zwei dreifach markierten Netzhäuten (AP7re, AP14re) sowie an einer Vielzahl von Schnitten aus weiteren acht Netzhäuten (AP1re, AP7re, AP10re, AP11li, AP12re, AP13li, AP14li, AP15re) durchgeführt. Um auf Veränderungen von Zellzahl und Zellverteilung während des Wachstums schließen zu können, wurden die Untersuchungen an Tieren verschiedenen Alters bzw. Größe durchgeführt. Es wurden je zwei große Tiere (AP10 und 11), zwei mittelgroße (AP12 und 13) sowie zwei kleine Tiere (AP14 und 15) verwendet (Standardlängen: siehe Anhang).

Bei der Färbung retinaler Schnitte mit Antikörpern gegen Parvalbumin zeigten sich positiv markierte Zellen unterschiedlicher Intensität:

Eine starke Antikörperbindung konnte an Zellen beobachtet werden, die auf der Innenseite der inneren Körnerschicht eine Reihe mit regelmäßigen Abständen bilden. Diese Zellen konnten gemäß ihrer Lokalisation und ihres Färbeverhaltens als eine Population von Amakrinzellen identifiziert werden.

Mehrere Zellpopulationen wiesen eine geringere Farbintensität auf. Schwach Parvalbumin positive Zellen finden sich im äußeren Bereich der inneren Körnerschicht sowie im inneren Teil der inneren Körnerschicht. Eine weitere Zellpopulation ist in der Ganglienzellschicht lokalisiert (siehe Abbildung 13: Pfeile).

Die Kombination aus Antikörperfärbung gegen Parvalbumin und retrograder Markierung mit Tetramethyl Rhodamin Dextran zeigte, dass die beiden Färbungen keine Überlappungen aufwiesen. Nahezu alle Zellen der Ganglienzellschicht wurden von einer der beiden Färbungen erfasst. Das wurde

durch eine Kerngegenfärbung, die alle Zellkerne der Ganglienzellschicht markiert, bestätigt. Es fand sich kaum ein Zellkern, der nicht entweder mit der Parvalbumin- oder der Dextranfärbung in Verbindung gebracht werden konnte. Da nie die Doppelmarkierung einer Zelle mit Parvalbumin-Antikörpern und Dextran beobachtet wurde, sind Parvalbumin positive Zellen in der Ganglienzellschicht keine Ganglienzellen. Diese Zellen können daher als displazierte Amakrinzellen charakterisiert werden, da ihr Färbeverhalten dem der Parvalbumin positiven Amakrinzellen in der INL entspricht.

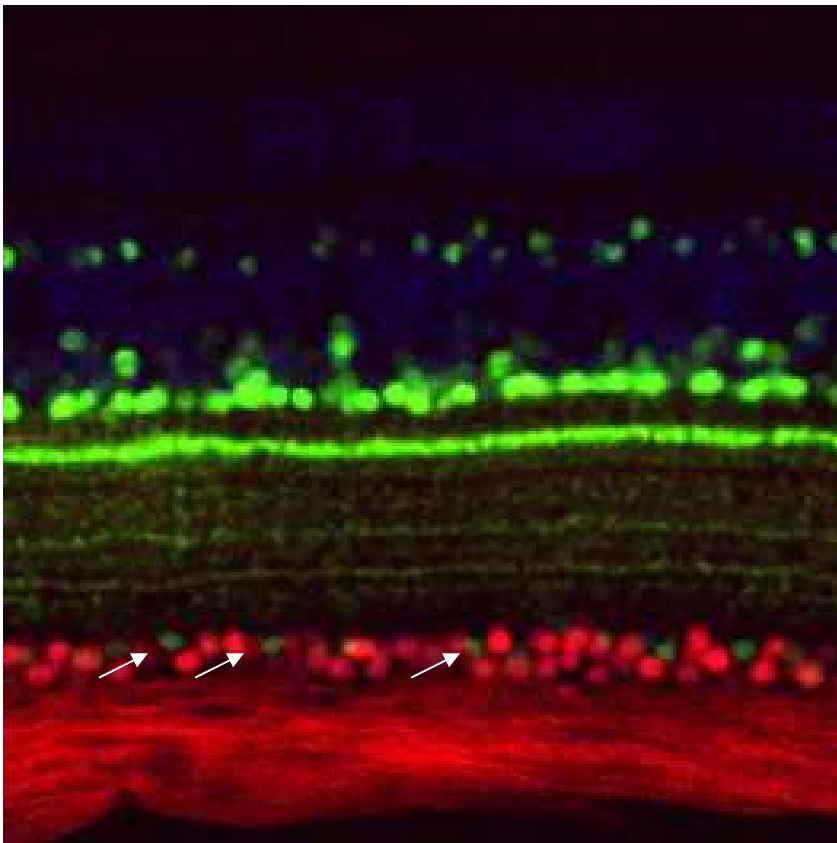


Abbildung 13: Parvalbumin positive Zellen im Schnitt

In einem dreifach markierten Schnittpräparat (Dextran, Parvalbumin, Sytox green) zeigen eine Vielzahl von Zellen ein positives Färbeverhalten auf Parvalbumin. Schwach positive Zellen finden sich im äusseren und inneren Bereich der INL. Eine stark anfärbbare Zellpopulation bildet am Innenrand der INL eine Reihe mit regelmässige Abständen (Amakrinzellen). In der Ganglienzellschicht findet man ebenfalls Parvalbumin positive Zellen, die displazierten Amakrinzellen (siehe Pfeile).

Die Betrachtung doppelt markierter Netzhäute (Tetramethyl Rhodamin Dextran und Antikörpern gegen Parvalbumin) als wholemount zeigte, dass nur die Amakrinzellen der Ganglienzellschicht gut zu beurteilen waren. Bedingt durch die Dicke der Netzhaut konnten die Antikörper bei der gewählten Inkubationszeit oft nicht tief genug eindringen, um die Amakrinzellen der INL ausreichend anzufärben. Eine Möglichkeit, um die Beurteilbarkeit der orthotopen Amakrinzellen auch im wholemount zu gewährleisten, wäre daher die Verlängerung der Inkubationszeit auf mehr als drei Tage gewesen.

Da das Interesse dieser Arbeit jedoch ausschließlich den Zellen der Ganglienzellschicht galt, war eine Änderung der Methode nicht notwendig.

Die displatzierten Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht konnten hingegen in ihrer Verteilung und Dichte gut beurteilt werden. Die größte Dichte fand sich in den peripheren Netzhautanteilen, die geringste Dichte in der papillennahen Region.

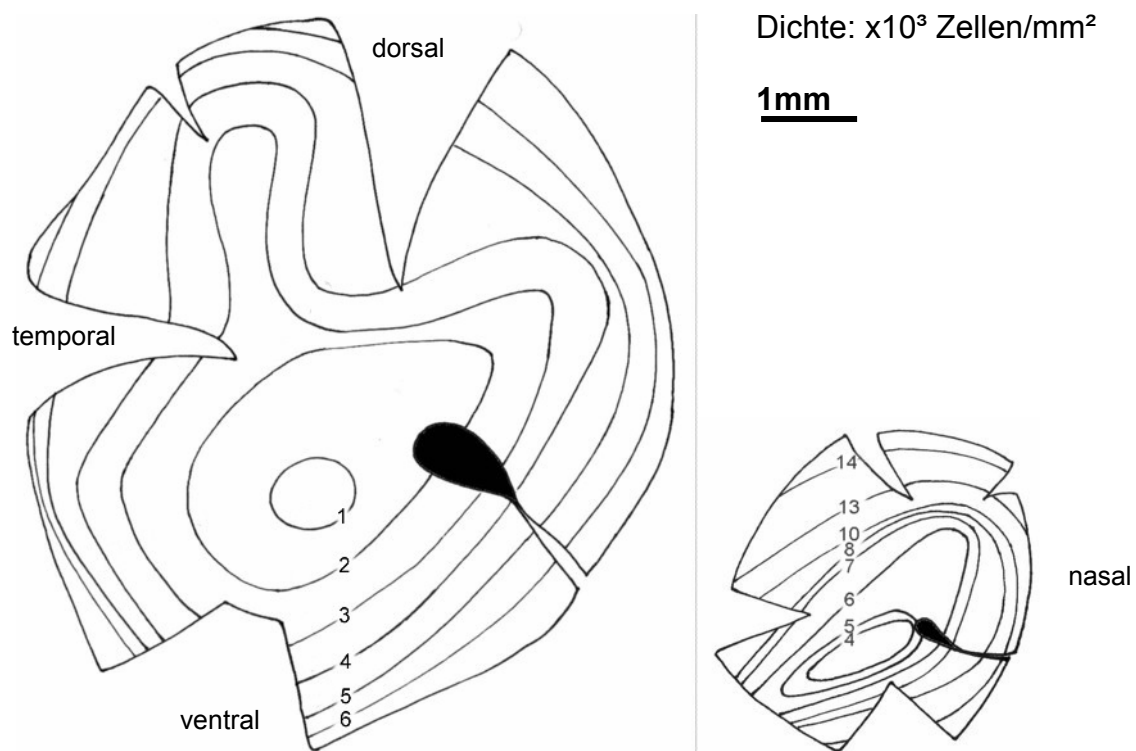


Abbildung 14: Verteilung der DAC (mittlerer und kleiner Fisch)

Verteilung der displatzierten Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht in der rechten Netzhaut eines Fisches mittlerer (li: Ap7re, SL= 4,4cm) und kleiner Größe (re: AP14re, SL= 2,0cm). Darstellung anhand von Dichtelinien. Angegeben ist die Anzahl der Zellen $\times 10^3$ pro mm².

Dabei unterscheiden sich die Werte von mittelgroßen und kleinen Fischen stark. Beim kleinen Fisch finden sich durchschnittlich 7650 Zellen pro mm² im zentralen, papillennahen Bereich, beim mittelgroßen Fisch sind es dagegen nur etwa 2900 pro mm². Die Peripherie der Netzhaut beim kleinen Fisch weist durchschnittlich 10500 dislatzierte Amakrinzellen pro mm² auf, beim mittelgroßen Fisch sind es im Durchschnitt nur 5800 Zellen/mm².

Tabelle 8: **Verteilung der DAC**

Fisch	Standardlänge	peripher (Durchschnitt)	zentral (Durchschnitt)
AP 7 re (mittel)	4,4 cm	5800 DAC/ mm ²	2900 DAC/ mm ²
AP14 re (klein)	2,0 cm	10500 DAC/ mm ²	7650 DAC/ mm ²

Die Netzhäute großer Fische ließen sich nicht als wholemount untersuchen. Trotz stark verlängerter Inkubationszeit konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis der Antikörperfärbung in den zentralen Netzhautbereichen erreicht werden, um eine sichere Quantifizierung von Ganglienzellen und dislatzierten Amakrinzellen zuzulassen. Die dicke Schicht der Ganglienzellaxone behinderte das Eindringen der Antikörper zu stark, so dass nur in den Randbereichen der Netzhaut die dislatzierten Amakrinzellen ausreichend angefärbt wurden.

3.3 Die untersuchten Zelltypen im Verhältnis zueinander

Die bisher erhobenen Daten ergaben eindeutig, dass die absolute Zellzahl und damit die Dichte der Zellen sowohl abhängig ist von der Lokalisation innerhalb der Netzhaut als auch von Größe und Alter des Tieres. Die Darstellung der Zelldichten anhand von Dichtelinien in den Abbildungen 7,8,12 und 14 zeigt allerdings für Ganglienzellen der Ganglienzellschicht, displatzierten Ganglienzellen in der INL und displatzierten Amakrinzellen ein mehr oder weniger unterschiedliches Verteilungsmusters. Um zu erfassen wie sich die verschiedenen Zelltypen während des Wachstums im Verhältnis zueinander verändern, wurden die Absolutzahlen der gezählten Zellen in Bezug zu einander gesetzt. So ergibt sich ein dimensionsloser Quotient, der das Verhältnis der entsprechenden Zelltypen für jeden Ort auf der Netzhaut widerspiegelt. Diese Zahl ermöglicht somit einen Vergleich verschiedener Netzhautareale nicht nur innerhalb einer Netzhaut, sondern auch zwischen Netzhäuten verschieden großer Fische. Ein von den Absolutzahlen unabhängiger Vergleich zwischen Fischen verschiedener Altersgruppen wird so möglich.

3.3.1 Orthotope Ganglienzellen und displatzierte Ganglienzellen

Bei der Betrachtung des Quotienten DGC zu OGC fallen zwei grundlegende Dinge auf: Erstens nimmt das Verhältnis ausgehend von einem dorso-nasal gelegenen Pol in Richtung Peripherie der Netzhaut konstant ab (siehe Abbildung 15). Das Areal mit dem größten Quotienten entspricht dabei ungefähr dem Bereich in dem die displatzierten Ganglienzellen ihre höchste absolute Zelldichte erreichen (vgl. Abbildung 12).

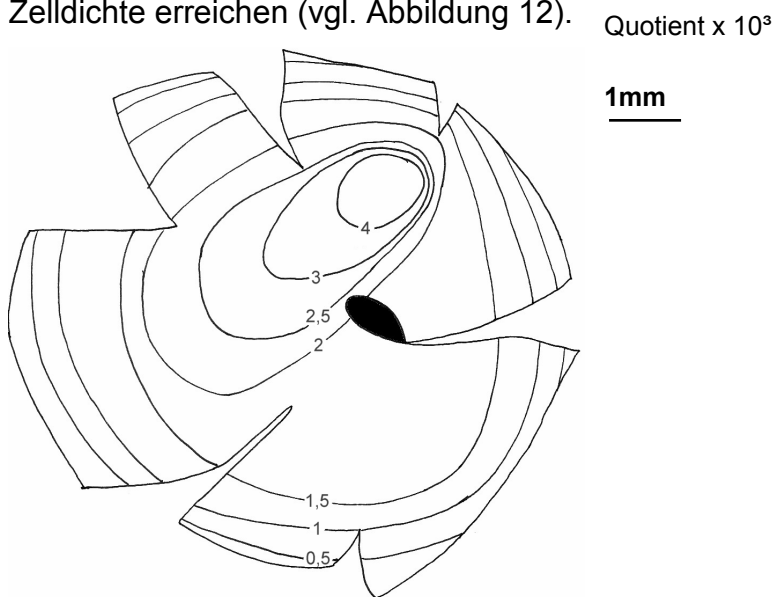


Abbildung 15: **Verhältnis von DGC zu OGC**

Als Linien eingezeichnet ist der Quotient x 10³ aus displatzierten Ganglienzellen und orthotopen Ganglienzellen. Auf 1000 orthotope Ganglienzellen kommen also zwischen 0,5 und 4 displatzierte Ganglienzellen.

Zweitens fällt ein Unterschied zwischen den einzelnen Tiergrößen auf, wenn man das durchschnittliche Verhältnis von DGC zu OGC über die gesamte Retina berechnet. Der für die gesamte Retina berechnete Durchschnittswert ergab für kleine Fische (SL= 2,0 cm) ein Verhältnis von $1,155 \times (10)^{-3}$ von displatzierten Ganglienzellen zu orthotopen Ganglienzellen. Bei mittelgroßen Fischen konnte ein durchschnittliches Verhältnis von bis zu $2,269 \times (10)^{-3}$ beobachtet werden.

Tabelle 9: **Verhältnis DGC /OGC**

Fisch	Standardlänge	Durchschnittswert Verhältnis DGC/OGC
AP 1 li	4,8 cm	$2,269 \times 10^{-3}$
AP 3 re	4,7 cm	$1,782 \times 10^{-3}$
AP 7 re	4,4 cm	$1,299 \times 10^{-3}$
AP 14 re	2,0 cm	$1,155 \times 10^{-3}$

3.3.2 orthotope Ganglienzellen und displatzierte Amakrinzellen

Der Vergleich verschiedener Retina-Areale im Bezug auf das Vorkommen von displatzierten Amakrinzellen zeigte, dass in der retinalen Peripherie deutlich mehr Zellen der Ganglienzellschicht Parvalbumin-positiv sind als in zentralen Regionen. Um diese Beobachtung zu erhärten, wurde die Dichte von Ganglienzellen und displatzierten Amakrinzellen über die gesamte Fläche von retinalen wholemounts gemessen. Die absolute Dichte ist zunächst nicht überraschend, da absolute Dichten in der Retina von Fischen abhängig sind von der Augengröße sowie von der wachstumsbedingten, vorangegangenen Gewebedehnung. Daher wurde das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen an doppelt gefärbten Präparationen berechnet. Dabei stellte sich heraus, dass es einen Unterschied der Verhältnisse von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen gibt, wobei das Verhältnis in zentralen Netzhautanteilen geringer ausfällt als in peripheren Regionen (siehe Abbildung 16). Ähnliche Ergebnisse wurden in retinalen Schnitten beobachtet (siehe Abbildung 17).

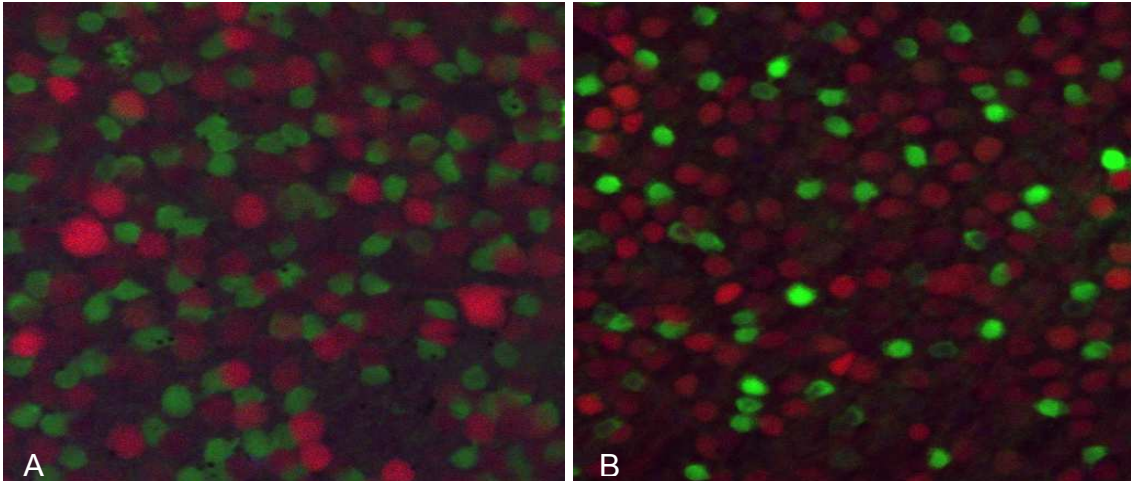


Abbildung 16: **DAC und GC im wholemount (peripher und zentral)**

A: Ganglienzellschicht in der Peripherie einer Netzhautpräparation. Rot stellen sich die mit Dextran retrograd markierten Ganglienzellen dar. Dazwischen liegen, grün, die mit Antikörpern gegen Parvalbumin gefärbten displatzierten Amakrinzellen.

B: Ganglienzellschicht im Zentrum der Netzhaut. Die Dichte der Ganglienzellen (rot) verändert sich im Vergleich zu A kaum. Die Anzahl der displatzierten Amakrinzellen hingegen ist stark reduziert.

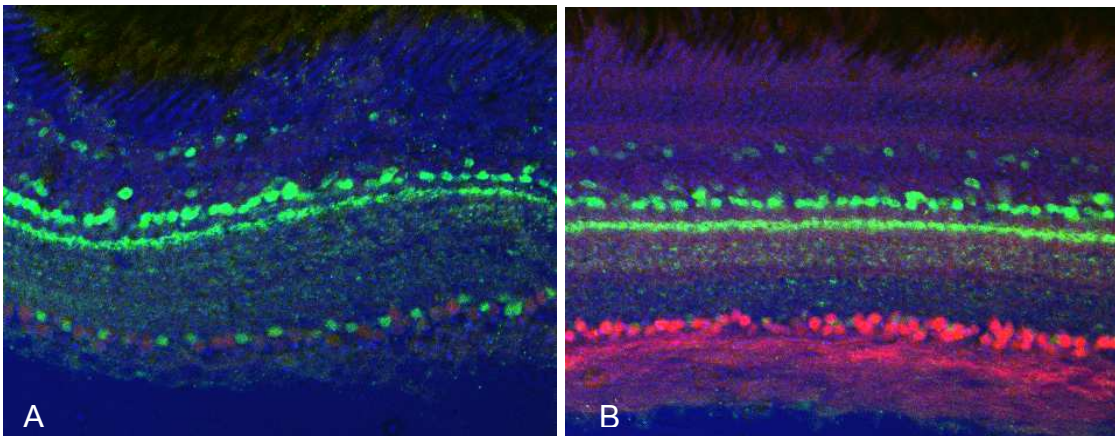


Abbildung 17: **DAC und GC im Schnitt (peripher und zentral)**

A: Schnitt durch eine dreifach markierte Netzhaut. Rot, die mit Dextran markierten Ganglienzellen, immunhistochemisch mit Anti-Parvalbumin gefärbt, die displatzierten und orthotopen Amakrinzellen (grün) und blau, alle Zellkerne, dargestellt, durch eine Kerngegenfärbung mit Sytox Green.

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Rate der Zellproduktion sich für einen der Zelltypen (OGC oder DAC) ändert, wenn das Tier bzw. das Auge wächst.

Um festzustellen, ob sich das Verhältnis von displazierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen tatsächlich abhängig vom Wachstum verändert, wurden Färbungen und Zählungen an drei verschiedenen Größen von Fischen durchgeführt: Es wurden die Netzhäute von zwei kleinen Tieren mit einer Standardlänge von etwa 2cm, zwei mittleren Tieren (SL= 5cm) und zwei großen Tieren (SL= 9cm) ausgewertet.

Wie in der Einleitung erwähnt, basieren die Überlegungen für diese Untersuchung auf der Tatsache, dass neues Gewebe in der peripher gelegenen Wachstumszone gebildet wird und also peripher an die Netzhaut angefügt wird. Das bedeutet, dass die periphere Netzhaut jünger ist als die etwas zentraler gelegenen Anteile. Wächst nun ein kleiner Fisch, wird die periphere Retina weiter nach zentral verlagert, bedingt durch das ständig hinzukommende neue Gewebe in der Peripherie.

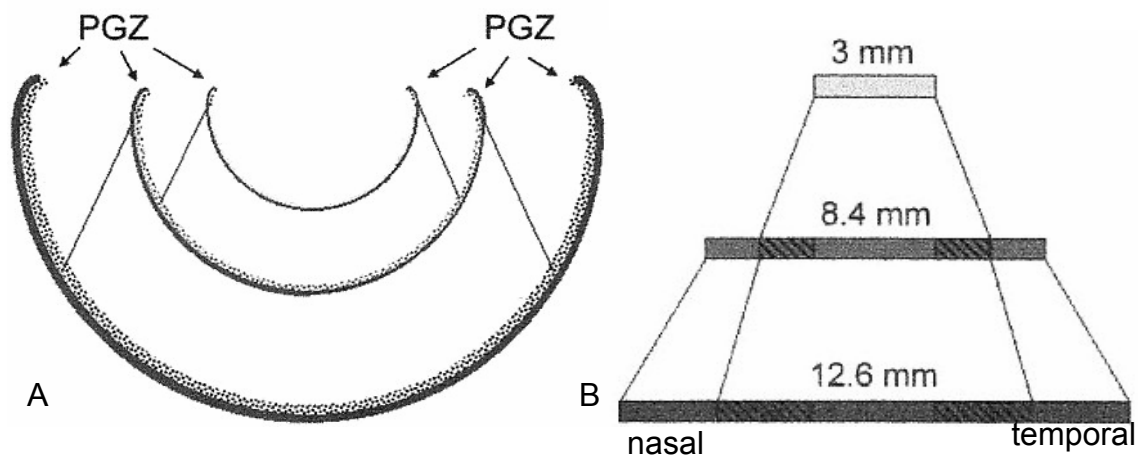


Abbildung 18: **Wachstum der Fisch- Netzhaut**

A: Die schematische Darstellung unterschiedlich großer Netzhäute soll die von der Peripherie ausgehende Größenzunahme während des Wachstums verdeutlichen. Neues Gewebe wird in der peripheren Wachstumszone (PGZ) an bereits bestehendes Gewebe angegliedert. Das bedeutet, dass Gewebe, das beim kleinen Fisch noch am Rande der Netzhaut lokalisiert ist, mit zunehmendem Alter des Fisches bzw. Wachstum des Auges immer weiter nach zentral verlagert wird, was die im Schema eingezeichneten Linien verdeutlichen sollen.

B: Dieses Schema flach ausgebreiteter Netzhäute zeigt die Zunahme des retinalen Durchmessers bei den für diese Arbeit verwendeten Fischgruppen. Dargestellt ist der durchschnittliche Abstand der nasal von der temporalen PGZ bei den drei verwendeten Fischgrößen. Die Größenzunahme der Netzhaut wird zu gleichen Teilen durch Dehnung und durch Zellproliferation verursacht (Fernald, 1985). Die schraffierten Flächen kennzeichnen die durch Gewebedehnung hinzukommenden Netzhautflächen. Das Areal zwischen den verbindenden Linien stellt die Dehnung der vorhandenen Retina dar. Die Areale außerhalb der Linien entstehen durch Proliferation von neuem Gewebe.

Wenn das Verhältnis, in welchem displatzierte Amakrinzellen und Ganglienzellen neu gebildet werden, sich verändert, müsste das Verhältnis in den peripheren Netzhautanteilen eines kleinen Fisches anders sein als bei einem großen Fisch. Wenn das Verhältnis dieser Zellen sich jedoch ändert, nachdem sie gebildet wurden, müsste das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen in der Peripherie aller Netzhäute dasselbe sein, unabhängig von der Größe des Fisches. Aber es müsste sich mit

zunehmendem Alter des Gewebes, also entsprechend der zentralen Verlagerung ändern.

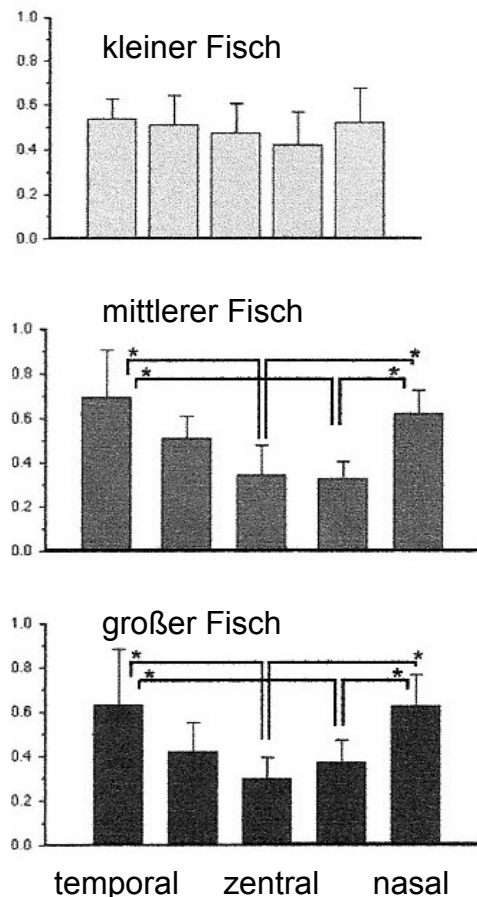
3.3.3 Altersabhängige Unterschiede des Verhältnisses DAC/OGC

Die Analyse retinaler Schnitte der drei verschiedenen Fischgrößen ergab wie anhand der wholemout Daten zu erwarten eine Abnahme der absoluten Dichte von displatzierten Amakrinzellen und Ganglienzellen mit zunehmender Größe des Auges aufgrund der Dehnung des retinalen Gewebes.

Das Verhältnis displatzierte Amakrinzellen zu Ganglienzellen hingegen änderte sich nicht mit der Augengröße, sondern in Abhängigkeit von der retinalen Lokalisation. In der retinalen Peripherie aller Fische war das Verhältnis mit einem Wert von 1:1,7 (= 0,588) im Durchschnitt am höchsten. Die niedrigsten Werte (1:4 = 0,25) wurden in der zentralen Retina von großen Fischen gemessen.

Abbildung 19: **Verhältnis DAC/OGC bei verschiedenen Fischgrößen**

Die Diagramme stellen das Verhältnis displatzierte Amakrinzellen zu orthotopen Ganglienzellen für drei unterschiedliche Größen von Fischen in fünf Regionen der Netzhaut dar. Die Diagramme gehen aus den an Schnitten erhobenen Daten hervor. Es handelt sich um Durchschnittswerte aus Zählungen für fünf Regionen (temporal, intermediär temporal, zentral, intermediär nasal und nasal) der Netzhaut. Es wurden pro ausgewertete Netzhaut durchschnittlich 10 Schnitte ausgezählt, das entspricht einer Anzahl von etwa 300 Ganglienzellen und den dazugehörigen displatzierten Amakrinzellen für jede Netzhautregion. Zusätzlich eingezeichnet ist die Standardabweichung.



Dem statistischen Vergleich diente die Unterteilung der Netzhaut in fünf Abschnitte (temporal, intermediär temporal, zentral, intermediär nasal, nasal), sowie die Untersuchung von drei verschiedenen Fischgrößen.

Mit einer Varianzanalyse (ANOVA) wurden einerseits die fünf Abschnitte einer Netzhaut miteinander verglichen, andererseits wurden die entsprechenden Abschnitte für die verschiedenen Tiergrößen untereinander verglichen.

Die statistische Auswertung mittels ANOVA-Test ergab einen signifikanten Unterschied des Verhältnisses DAC/OGC für die fünf Netzhautregionen von mittleren und großen Fischen ($p < 0,0001$) jedoch nicht für kleine Fische ($p > 0,05$). (Verhältnis DAC/OGC peripher größer als zentral)

Der statistische Vergleich der fünf Netzhautregionen zwischen den unterschiedlichen Fischgrößen zeigte für die zentralen Regionen einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0017$). Für die angrenzenden Regionen ergab sich ein empirisches Signifikanzniveau von $p = 0,125$ für den intermediär nasalen Netzhautabschnitt sowie $p = 0,101$ für das intermediär temporale Areal. In der Peripherie der Netzhaut war mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,143$ (nasal) und $p = 0,276$ (temporal) kein statistischer Unterschied nachweisbar.

Zum Vergleich des Quotienten in zentralen und peripheren Retina-Arealen innerhalb einer Fischgröße, diente der t-Test nach Student. Der paarweise Vergleich von zentralen und peripheren Regionen zeigte im t-Test für große und mittlere Tiere ein signifikant niedrigeres Verhältnis in den zentralen Netzhautanteilen als im peripheren jüngeren Gewebe ($p < 0,01$), nicht jedoch für kleine Fische.

Diese statistischen Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die Anzahl der displatzierten Amakrinzellen relativ zur Anzahl der Ganglienzellen abnimmt, wenn mit zunehmendem Alter bzw. zunehmender Größe des Auges, peripher gelegene Netzhautareale mehr nach zentral verlagert werden.

Die Ergebnisse aus Zählungen an Wholemounds von mittleren und kleinen Fischen deuten ebenfalls in diese Richtung (siehe unten: Tabelle und Abbildungen), auch wenn eine quantitative Auswertung und ein Vergleich der verschiedenen Fischgrößen anhand von Wholemounds aufgrund der eingeschränkten Anfärbbarkeit nicht möglich war (siehe Material und Methoden).

Tabelle 10: Verteilung DAC und OGC in Wholemounds

Die Tabelle enthält Daten, die an Netzhaut Präparationen von AP7 (mittelgroß) und AP14 (klein) erhoben wurden. Die Spalten drei und vier enthalten Durchschnittswerte für displatzierte Amakrinzellen und orthotope Ganglienzellen in der Peripherie der Netzhäute. Spalte fünf und sechs umfassen Durchschnittswerte aus Zählungen in zentralen Netzhautbereichen. In den Zeilen drei und fünf finden sich die aus den Durchschnittswerten berechneten Quotienten von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen.

Fisch	SL	Peripher (Zellen/mm ²)		Zentral (Zellen/mm ²)	
AP 7 re (mittel)	4,4 cm	5800 DAC	11860 OGC	2900 DAC	8580 OGC
		=> DAC / OGC = 0,489		=> DAC / OGC = 0,338	
AP14 re (klein)	2,0 cm	10500 DAC	19400 OGC	7650 DAC	20250 OGC
		=> DAC / OGC = 0,541		=> DAC / OGC = 0,388	

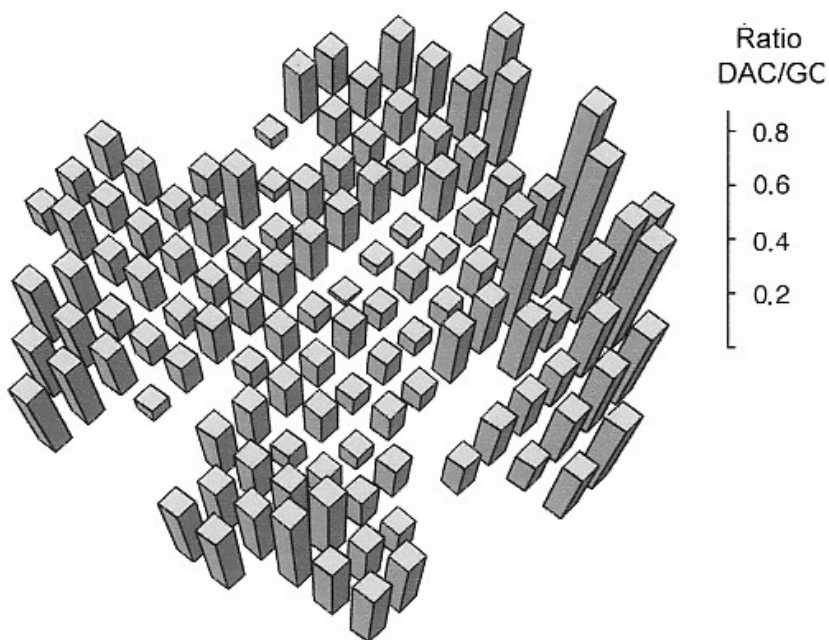
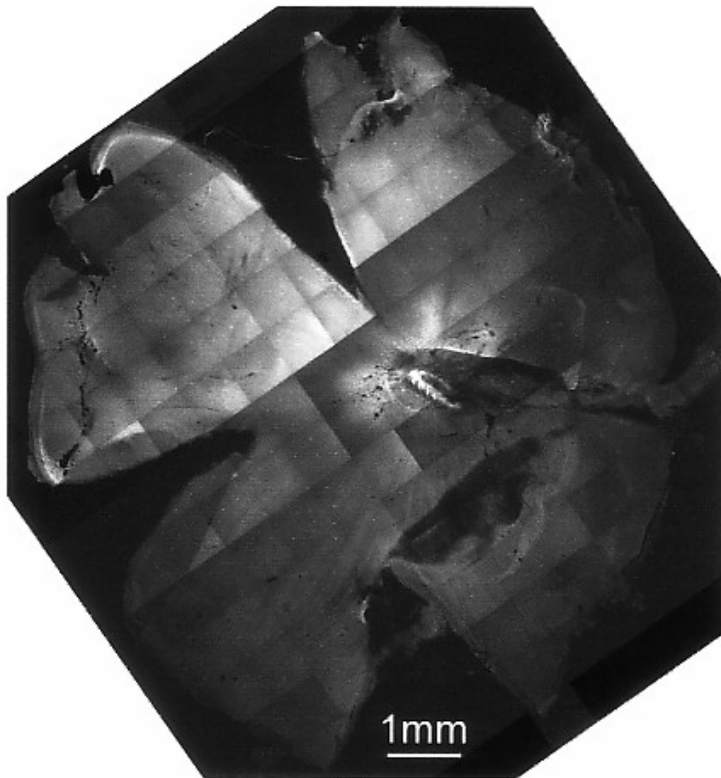


Abbildung 20: Verhältnis DAC/OGC im wholemout

Oben: Am Computer rekonstruierte Abbildung einer Netzhaut (AP7re). Das Präparat wurde am konfokalen Mikroskop mit einem 20er-Objektiv rasterförmig eingescannt und anschließend computergestützt rekonstruiert.

Unten: Darstellung des Verhältnisses DAC/OGC in einem Säulendiagramm. Als Grundlage für dieses Diagramm dienen die an AP7re erhobenen Daten. Deutlich zu sehen ist, dass der Quotient im zentralen Bereich der Netzhaut wesentlich niedriger ausfällt als in der Peripherie.

3.4 Ko-Lokalisation von Parvalbumin und ChaT

Um das Färbemuster von Dextran und Parvalbumin in Kontext zu setzen zu anderen bekannten Zelltypen der inneren Retina, wurden Antikörper gegen ChaT verwendet, um cholinerge Amakrinzellen anzufärben. Eine starke Immunreaktion fand sich nur bei Zellen in der INL.

In retinalen Schnitten waren in der IPL zwei breite ChaT positive Streifen bei 25%-40% und bei 60-70% der IPL deutlich erkennbar. Getrennt wurden sie durch eine ChaT negative Bande bei 40-60% der IPL (siehe Abbildung 22). Zusätzlich waren mindestens zwei weitere schwach gefärbte Schichten vorhanden.

Die innere plexiforme Schicht (IPL) weist bei *Aequidens pulcher* eine durchschnittliche Dicke von 20 bis 25 μm auf. Um eine Orientierung in der IPL zu ermöglichen wurden 0% als Innenrand der IPL definiert. 100% entsprechen dem Außenrand der IPL, das heißt dem Beginn der Ganglienzellschicht. Es lassen sich grob fünf Zonen von einander abgrenzen. Jeder dieser Bereiche (Banden) wird von den Dendriten einer bestimmten Zellpopulation dominiert. Dadurch färben sich die Banden der IPL entsprechend dem Färbeverhalten der verschiedenen Zelltypen, was gewisse Rückschlüsse auf deren Terminationsgebiete zulässt.

In der inneren plexiformen Schicht von *Aequidens pulcher* grenzen sich zwei große Parvalbumin positive Banden ab. Eine stark gefärbte Bande befindet sich bei ungefähr 20% der IPL-Breite und eine weniger intensiv gefärbte bei 75%. Teilweise konnte zusätzlich eine schwächere Bande bei 50% der IPL- Breite beobachtet werden.

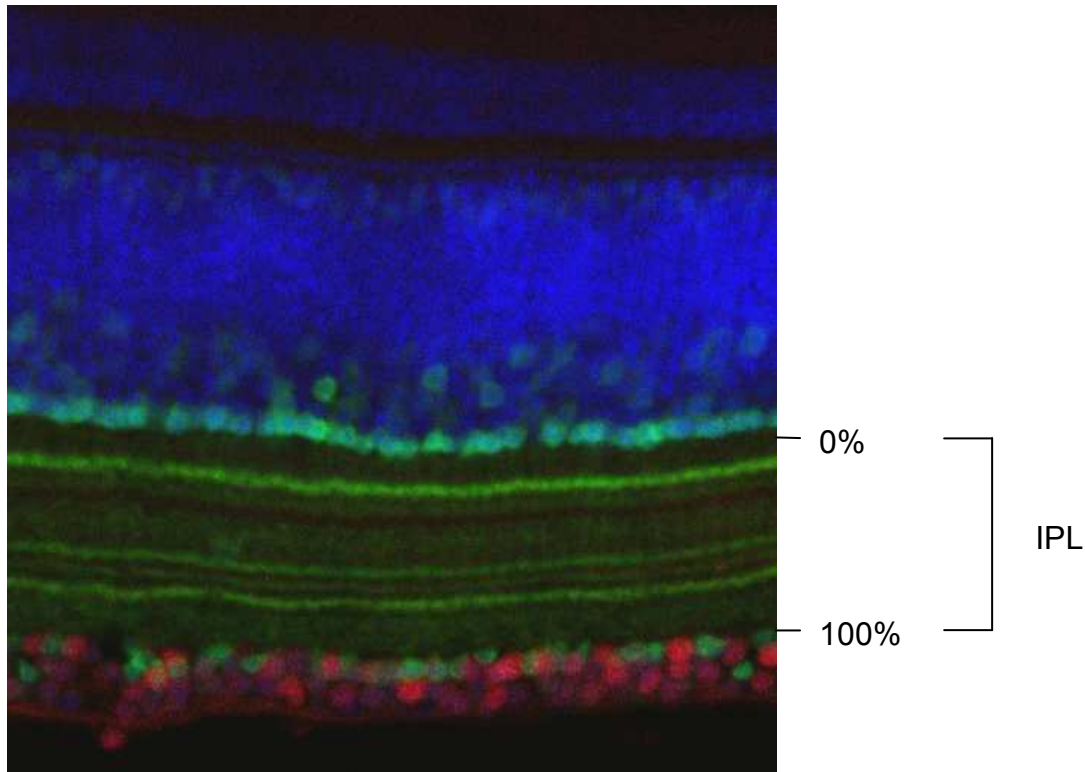


Abbildung 21: Innere Plexiforme Schicht im Schnitt

Dreifach markiertes Schnittpräparat (Dextran (rot), Parvalbumin (grün), Sytox green (blau)) in welchem die einzelnen Schichten der Netzhaut gut erkennbar sind.

Die innere plexiforme Schicht reicht von der INL (0%) bis zur Ganglienzellschicht (100%). Es lassen sich bei ca. 20%, 50% und 75% der IPL drei Parvalbumin positive Banden von einander abgrenzen, welche Rückschlüsse auf die Terminationsgebiete der orthotopen und dislatzierten Amakrinzellen zulassen.

Eine schwache, getüpfelte Färbung konnte in einer Untergruppe von Zellen in der Ganglienzellschicht beobachtet werden. Dreifach Markierungen mit retrograd gefüllten Ganglienzellen und Antikörpern gegen ChaT und Parvalbumin zeigten, dass wahrscheinlich alle Parvalbumin positiven dislatzierten Amakrinzellen auch positiv für Antikörper gegen ChaT sind. Die Parvalbumin positiven DACs sind die dominierenden Amakrinzellen der Ganglienzellschicht und entsprechen den cholinergen und GABAergen dislatzierten Amakrinzellen, die bereits für Knochenfische beschrieben wurden

(Marc et al., 1993). Diese Zellen entsprechen den „Starburst“ Amakrinzellen von Säugetieren (Marc et al., 1993).

Die Ganglienzellen zeigten keine Immunreaktion auf ChaT. Auch die Amakrinzellen der INL wiesen keine Doppelmarkierung auf. Insgesamt reagierten in der Inneren Körnerschicht deutlich weniger Zellen positiv auf den Antikörper gegen ChaT als auf den Antikörper gegen Parvalbumin. Die einzige Überlappung von ChaT und Parvalbumin Antikörper Färbung fand sich mit einer schwachen ChaT Reaktivität an der Innenseite der IPL bei etwa 7%.

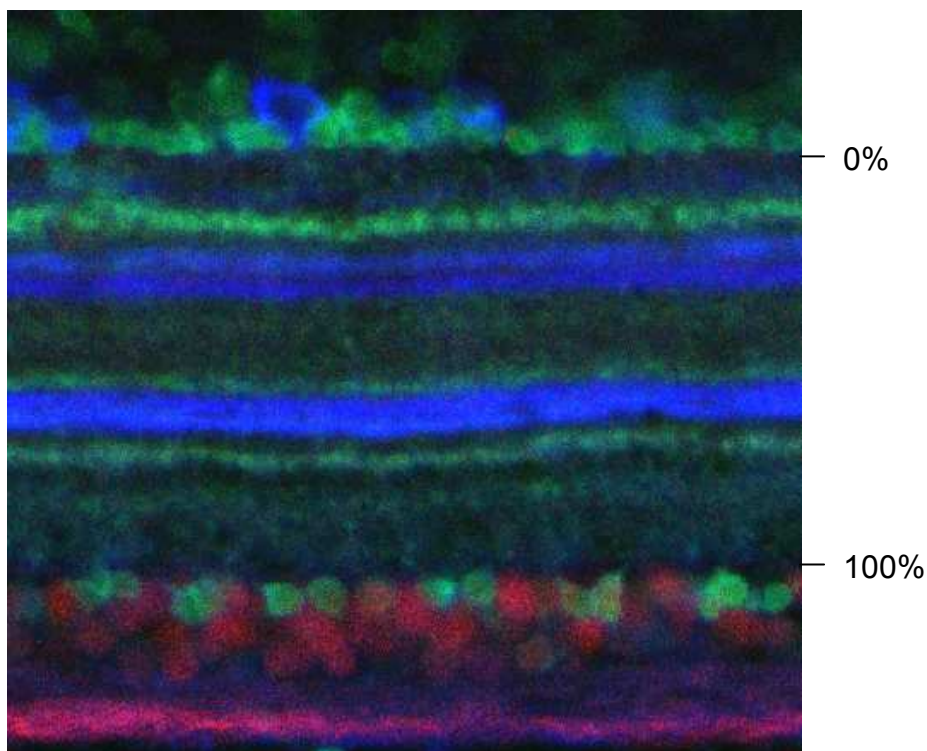


Abbildung 22: **ChaT positive Zellen und Banden im Schnitt**

Dreifach markierter Retinaschnitt (Dextran (rot), Parvalbumin (grün), ChaT (blau)).

In der IPL fallen deutlich die ChaT positiven Banden (blau) bei 25-40% sowie bei 60-70% auf. Ausserdem zu sehen sind die Parvalbumin positiven Banden bei 20%, 50% und 75%. Vereinzelt finden sich ChaT positive Zellen in der INL. Bei Auftrennung der einzelnen Farbkanäle zeigte sich, dass alle Parvalbumin positiven displatzierten Amakrinzellen der Ganglienzellschicht auch mit einer schwachen Färbung auf ChaT reagierten.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Das menschliche Auge wächst auch nach der Geburt noch um das etwa 1,4 fache in axialer Länge (Fledelius und Christensen, 1996). Man muss davon ausgehen, dass sich während dieses Wachstums einige Anpassungsvorgänge und Änderungen in der Netzhaut abspielen. Um einen Einblick in eventuelle Veränderungen von Struktur und Funktion der Netzhaut zu bekommen, wurde in dieser Arbeit als Versuchstier ein Fisch (*Aequidens pulcher*, Cichlidae) gewählt, dessen Netzhaut sich im Laufe seines Lebens auf das über 25fache vergrößert. Das Wachstum der Netzhaut betrifft alle ihre Schichten. Die Ganglienzellschicht mit Axonen, die bis in die visuellen Zentren des Gehirns reichen, muss ein besonderes Maß an Anpassung aufweisen, um ein geordnetes Wachstum bei voll erhaltener Sehfähigkeit zu gewährleisten. Um festzustellen, ob und wie sich wachstumsbedingte Veränderungen in der Netzhaut auf den Informationsfluss zu höher gelegenen Hirnzentren auswirken, galt das Hauptaugenmerk dieser Arbeit daher den Zellen der Ganglienzellschicht.

Untersucht wurde die Verteilung und Dichte der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht (siehe Kapitel 3.1), ebenso wie die Verteilung und Dichte von sogenannten displazierten Amakrinzellen (siehe Kapitel 3.2), denen man großen, inhibitorisch modulierenden Einfluss auf den Signalfluss der Ganglienzellen zuschreibt. Diese Parameter wurden auf wachstumsbedingte Veränderungen geprüft, indem die Werte von kleinen (SL = 2cm), mittelgroßen (SL = 5cm) und großen (SL = 10cm) Fischen verglichen wurden.

Zusätzlich wurde das Verhältnis dieser Zellarten zueinander für verschiedene Regionen der Netzhaut berechnet. So konnte nicht nur gezeigt werden wie unterschiedlich das Verhältnis der beiden Zellarten zueinander innerhalb einer Netzhaut ist (siehe Kapitel 3.3.2), sondern es konnte auch untersucht werden, wie sich dieses Verhältnis durch das Wachstum des Auges verändert, indem

die Werte für Netzhäute verschiedenen Alters bzw. Größe berechnet und verglichen wurden (siehe Kapitel 3.3.3).

Mit dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob und wie sich das Wachstum des Auges auswirkt auf die Anzahl der Zellen in der Ganglienzellschicht sowie deren Dichte und Verteilung. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob das Wachstum der Netzhaut Einfluss hat auf das Verhältnis von displazierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht. Eine Veränderung des Verhältnisses von exzitatorischen Ganglienzellen und inhibitorischen, displazierten Amakrinzellen erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion der Zellen, den Informationsfluss innerhalb der Netzhaut und die Modulation des Informationsflusses in Richtung subkortikal gelegener visueller Zentren.

Die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass sich das Verhältnis displazierter Amakrinzellen zu orthotopen Ganglienzellen während des Augenwachstums abhängig von der Lokalisation auf der Netzhaut ändert. Mit zunehmendem Alter der Retina kommt es in den zentralen Anteilen der Netzhaut zu einer relativen Abnahme der displazierten Amakrinzellen gegenüber den orthotopen Ganglienzellen.

Um dieses Ergebnis zu belegen, mussten folgende Fragen geklärt werden:

*1. Welches Verteilungsmuster weisen die Ganglienzellen bei dem Versuchstier *Aequidens Pulcher* auf?*

Die Zählungen von Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht von vier mit Dextran gefärbten Netzhäuten ergaben in dieser Arbeit, dass die absolute Zahl der orthotopen Ganglienzellen in der dorsalen Netzhauthälfte größer ist als in den ventralen Anteilen der Netzhaut. Die höchste Dichte der Ganglienzellen wird in einem dorso-temporal gelegenen Areal der Retina erreicht. Ein zweiter Bereich mit einer erhöhten Dichte der Ganglienzellen befindet sich im ventro-nasalen Anteil der Netzhaut (siehe dazu Abbildungen 7 und 8).

Die Verteilung der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht von *Aequidens Pulcher* (AP) unterscheidet sich somit nicht wesentlich von der Zellverteilung anderer Knochenfische. Collin und Pettigrew (1988) beschrieben bereits für eine Reihe von Knochenfischen ein dorso-temporal gelegenes Areal mit vermehrter Zelldichte. Diese ungleichmäßige Verteilung der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht kann theoretisch mehrere Ursachen haben. Es kann in den Bereichen höherer Zelldichte eine vermehrte Proliferation von Ganglienzellen stattfinden. Ein vermehrter Untergang von Ganglienzellen in den Gebieten geringerer Zelldichte wäre denkbar. Die unterschiedliche Dichte der Ganglienzellen kann durch eine partielle Dehnung des Netzhautgewebes während des Wachstums bedingt sein. Letztere Möglichkeit erscheint am wahrscheinlichsten, da Fernald (1984) in seiner Arbeit zeigte, dass Ganglienzellen in einer Wachstumszone am Rande der Netzhaut mit einer konstanten Rate gebildet werden. Die gleichmäßige Entstehung von Ganglienzellen in der Peripherie der Netzhaut und das spätere Verteilungsmuster dieser Zellen über die gesamte Retina deuten daher daraufhin, dass die Netzhaut während des Wachstums nicht gleichmäßig gedehnt wird, sondern durch partielle Gewebedehnung Areale mit vermehrter Ganglienzelldichte zustande kommen. Zygari et al. (1999) zeigten das ebenfalls für eine andere Cichlidenart.

2. Gibt es Auffälligkeiten in der Verteilung von displatzierten Amakrinzellen?

Amakrinzellen, deren Zellkörper sich in der Ganglienzellschicht befinden, sogenannte displatzierte Amakrinzellen, wurden bereits bei vielen Arten von Wirbeltieren beschrieben (Perry, 1979; Peterson und Ulinski, 1979; Layer, 1982; Ball und Dickson, 1983) unter anderem auch bei Knochenfischen (Marc et al., 1993; Mosinger et al., 1986; Osborne et al., 1986).

Diese displatzierten Amakrinzellen konnten mit Antikörpern gegen Parvalbumin, ein Kalzium bindendes Protein, angefärbt werden. Wie Hamano et al. (1990) zeigten, lassen sich bei den meisten Wirbeltierarten einige Untergruppen von inhibitorischen Interneuronen (Horizontal- und Amakrinzellen) in der inneren Körnerschicht ebenfalls mit Antikörpern gegen Parvalbumin anfärben. Dieses

Färbeverhalten wurde auch bei Netzhäuten von Fischen beobachtet (Weruaga et al., 2000). Es wurde ebenfalls bereits beschrieben (Cuenca et al., 2002), dass einige Amakrinzellen eine Anfärbarkeit sowohl für Antikörper gegen Parvalbumin als auch für ChaT, ein Markerenzym, welches in cholinergen Neuronen zu finden ist, aufweisen. In dieser Arbeit wurden einige displatzierte Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht beobachtet, die eine Immunoreaktion für ChaT zeigten. Im Vergleich zu anderen nicht Parvalbumin positiven Amakrinzellen in der Inneren Körnerschicht fiel diese Reaktion allerdings eher schwach aus. Eine mögliche Erklärung für die geringe Anfärbarkeit dieser Zellen liegt darin, dass sich das Enzym Cholinacetyl- Transferase weniger im Zellkörper als vielmehr in den Fortsätzen befindet.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Parvalbumin positiven Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht nicht mit der Verteilung und Dichte der Ganglienzellen korreliert. Wie die Ganglienzellen werden die displatzierten Amakrinzellen in einer germinativen Zone in der Peripherie der Netzhaut gebildet (Kwan et al., 1995). Entlang dieser peripheren Wachstumszone findet man die höchste Dichte der displatzierten Amakrinzellen. Von der Peripherie in Richtung Zentrum der Netzhaut weist die Verteilung der displatzierten Amakrinzellen eine nahezu konzentrische Abnahme der Zelldichte auf. Die Absolutzahl dieser Zellen ist im Zentrum, in einem Bereich temporal der Papille, am geringsten (siehe 3.2, Abbildung 14).

Die displatzierten Amakrinzellen weisen nicht wie die Ganglienzellen ein Areal vermehrter Zelldichte innerhalb der Ganglienzellschicht auf. Die Abnahme der Zelldichte der displatzierten Amakrinzellen in Richtung des Netzhautzentrums könnte also durch eine gleichmäßige Dehnung des Gewebes während des Wachstums erklärt werden. Diese Annahme widerspricht jedoch den Überlegungen von Zygar et al. (1999) zur Verteilung der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht bei Cichliden. Zygar et al. gehen von einer partiellen Dehnung des Gewebes aus und erklären so die Entstehung unterschiedlicher Zelldichten für die Ganglienzellen.

Die Richtigkeit dieser Ergebnisse vorausgesetzt muss man davon ausgehen, dass die Verteilung der displatzierten Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht

durch einen anderen Mechanismus als die reine Dehnung des Gewebes während des Augenwachstums kontrolliert wird. Um diese Vermutung zu belegen und eventuell eine Erklärung für die unterschiedliche Verteilung der beiden Zellarten zu erhalten sowie um die Mechanismen, die zu dieser ungleichen Verteilung führen, aufzudecken, wurden in dieser Arbeit Netzhäute unterschiedlich großer bzw. unterschiedlich alter Fische untersucht.

3. Verändert sich die absolute Dichte der Zellen im Laufe des Augenwachstums?

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit an Fischen verschiedenen Alters zeigten, dass sowohl die Dichte der Ganglienzellen als auch die Dichte der displazierten Amakrinzellen mit zunehmender Augengröße abnimmt. Diese Ergebnisse sind durch die Dehnung des Gewebes im wachsenden Auge erklärbar. Mehrere Autoren beschrieben diese Abnahme der Zelldichte durch das Augenwachstum bereits für andere Zellarten der Fisch-Netzhaut (Müller, 1952; Johns, 1977; Mack et al. 1998).

Zählungen der Ganglienzellen ergaben, dass die Dichte der Ganglienzellen, gemessen über die gesamte Netzhaut, beim kleinen Fisch (ca. 2cm) mit etwa 18 000 Zellen pro Quadratmillimeter deutlich höher liegt als bei mittelgroßen (ca. 5cm) Tieren. Die 5cm langen Tiere weisen eine mittlere Zelldichte von etwa 9 000 Ganglienzellen pro Quadratmillimeter auf (siehe auch 3.1.1).

In der Netzhaut junger Fische liegen die Zellkörper der Ganglienzellschicht dicht gedrängt in mehreren Reihen übereinander. Mit zunehmendem Wachstum der Netzhaut werden die Ganglienzellen durch Dehnung des Gewebes auseinander gezogen, die Ganglienzellschicht weist nur noch eine Reihe von Zellkörpern auf und die Dichte der Zellen nimmt ab. Diesem Mechanismus zu Folge wäre die höchste Dichte der Ganglienzellen gleichmäßig entlang der Wachstumszone in der Peripherie der Netzhaut zu erwarten. Wie bereits auf Seite 56 beschrieben, weist die Verteilung der Ganglienzellen jedoch bei jeder untersuchten Augengröße ein Areal höherer Zelldichte im dorso-temporalen Teil der Netzhaut auf.

Die Zählungen von displatzierten Amakrinzellen in den Netzhäuten von kleinen und mittelgroßen Fischen zeigten ebenfalls sehr unterschiedliche Werte. Kleine Fische weisen durchschnittlich 7650 displatzierte Amakrinzellen pro Quadratmillimeter nahe der Papille im zentralen Bereich der Netzhaut auf. Beim mittelgroßen Fisch zählt man in diesem zentralen Bereich dagegen nur etwa 2900 displatzierte Amakrinzellen pro Quadratmillimeter. Die Peripherie der Netzhaut beim kleinen Fisch weist durchschnittlich 10500 displatzierte Amakrinzellen pro Quadratmillimeter auf, beim mittelgroßen Fisch sind es im Durchschnitt nur 5800 Zellen pro Quadratmillimeter (siehe auch 3.2, Tabelle 8). Beim Vergleich von kleinem und mittlerem Fisch zeigt sich also, dass die absolute Dichte der displatzierten Amakrinzellen in der Peripherie der Netzhaut des kleinen Fisches mehr als doppelt so hoch ist wie beim mittelgroßen Fisch. In Richtung des Zentrums der Netzhaut zeigt sich bei allen Größen von Fischen eine gleichmäßige Abnahme der Dichte für die displatzierten Amakrinzellen (siehe 3.2, Abb. 14).

Für beide Zelltypen konnte also gezeigt werden, dass sich die Dichte der Zellen in der Ganglienzellschicht mit zunehmender Größe des Fisches also mit zunehmender Augengröße verringert. Wobei die Verteilung der Ganglienzellen bei jeder Augengröße ein dorso-temporalen gelegenes Areal mit erhöhter Zelldichte aufweist (siehe Abbildungen 7 und 8). Die Verteilung der displatzierten Amakrinzellen ergibt hingegen für jede Augengröße eine konzentrische Abnahme der Zelldichte in Richtung Netzhautzentrum (siehe Abbildung 14).

Sowohl die Abnahme der Dichte von Ganglienzellen als auch von displatzierten Amakrinzellen kann auf die Dehnung bzw. partielle Dehnung des Netzhautgewebes während des Wachstums zurückgeführt werden (Müller, 1952; Johns, 1977; Mack et al. 1998; Zygare et al. 1999). Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der beiden Zelltypen innerhalb einer Schicht der Netzhaut deuten allerdings daraufhin, dass es für mindestens einen dieser Zelltypen einen weiteren Mechanismus gibt, der mit zunehmender Netzhautgröße modulierend auf die Dichte der Zellen einwirkt. Geht man davon aus, dass beide Zellen in einer peripheren Wachstumszone mit konstanter Rate gebildet

werden (Fernald, 1984 und Kwan et al., 1995), kommt eine zusätzliche Proliferation von Ganglienzellen im dorso-temporalen Anteil der Netzhaut als Erklärung nicht in Frage. Dagegen spricht auch, dass zwar Stäbchen in der zentralen Netzhaut gebildet werden, aber in Proliferationsstudien nie Zellteilungen in anderen Netzhautschichten nachgewiesen wurden.

Legt man wie Zygar et al. (1999) eine partielle Dehnung des Netzhautgewebes zugrunde, lässt sich die Verteilung der Ganglienzellen erklären, nicht jedoch die konzentrische Abnahme der displatzierten Amakrinzellen. Bei jeder Art von Gewebedehnung müsste das relative Verhältnis der beiden Zelltypen zueinander gleich bleiben.

Denkbar wäre daher eine gezielte Anpassung der displatzierten Amakrinzellen an die Verteilung der Ganglienzellen beziehungsweise an die Erfordernisse der Informationsverarbeitung der Netzhaut. Es wäre also möglich, dass in bestimmten Gebieten der Netzhaut die Dichte der displatzierten Amakrinzellen stärker abnimmt als durch die Dehnung des Gewebes erklärbar ist. Das heißt, die Dichte der displatzierten Amakrinzellen nimmt stärker ab als die Dichte der Ganglienzellen. Um eine mögliche zahlenmäßige Anpassung der displatzierten Amakrinzellen an die Dichte der Ganglienzellen aufzudecken, war es nötig, das Verhältnis von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen an verschiedenen Orten der Netzhaut und bei verschieden alten Versuchstieren zu berechnen und zu vergleichen (siehe 3.2).

4. Verändert sich das relative Verhältnis von displatzierten Amakrinzellen zu orthotopen Ganglienzellen während des Wachstums in Abhängigkeit von Alter und Netzhautregion?

Mit Hilfe von Doppelmarkierungen konnten in dieser Arbeit im Grunde genommen alle Zellen der Ganglienzellschicht für jeden Ort auf der Netzhaut gezählt werden. Die Ganglienzellen wurden retrograd mit Dextran markiert. Die displatzierten Amakrinzellen wurden durch den Amakrinzellmarker Parvalbumin dargestellt (siehe 2.5.1a und 2.5.2b).

Um zu erfassen wie sich diese Zelltypen während des Wachstums im Verhältnis zueinander verändern, wurden die Absolutzahlen der gezählten Zellen in

Bezug zueinander gesetzt. Durch die Berechnung des Verhältnisses von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen stand nun ein dimensionsloser Quotient zur Verfügung, der das Verhältnis der entsprechenden Zelltypen für jeden Ort auf der Netzhaut widerspiegelt und dabei unabhängig von der Augengröße ist. Diese Zahl ermöglicht somit einen Vergleich verschiedener Netzhautareale innerhalb einer Netzhaut (siehe 3.3.2). Zusätzlich wurde es möglich, die Netzhäute verschieden großer Fische unabhängig von den Absolutzahlen der Zellen zu vergleichen (siehe 3.3.3)

Die Analyse retinaler Schnitte von drei verschiedenen Fischgrößen (2, 5 und 10cm) ergab eine Abnahme der absoluten Dichte von Ganglienzellen und displatzierten Amakrinzellen mit zunehmender Größe des Auges. Das ist aufgrund der Dehnung des retinalen Gewebes während des Wachstums zu erwarten. Das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen hingegen ändert sich nicht mit der Augengröße, sondern in Abhängigkeit von der retinalen Lokalisation.

In der retinalen Peripherie aller Fische war das Verhältnis mit einem Wert von 1:1,7 (= 0,588) im Durchschnitt am höchsten. Die niedrigsten Werte (1:4 = 0,25) wurden in der zentralen Retina von großen Fischen gemessen. Diese statistischen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Anzahl der displatzierten Amakrinzellen relativ zur Anzahl der Ganglienzellen abnimmt, wenn mit zunehmendem Alter bzw. zunehmender Größe des Auges, peripher gelegene Netzhautareale mehr nach zentral verlagert werden (siehe dazu Abbildung 18).

Würde sich das Verhältnis, mit dem displatzierte Amakrinzellen und Ganglienzellen neu gebildet werden, verändern, müsste das Verhältnis in den peripheren Netzhautanteilen eines kleinen Fisches anders sein als bei einem großen Fisch.

Wenn das Verhältnis dieser Zellen sich jedoch erst ändert, nachdem sie gebildet wurden, müsste das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen in der Peripherie aller Netzhäute dasselbe sein, unabhängig von der Größe des Fisches. Aber es müsste sich mit zunehmendem Alter des Gewebes, also entsprechend der zentralen Verlagerung, ändern.

Die oben genannten Daten (siehe auch 3.3.3, Abbildung 19 und 20) belegen sehr deutlich die Vermutung, dass sich der Quotient aus displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen tatsächlich in bereits bestehendem Netzhautgewebe verändert. Ein zentro-peripheres Gefälle des Quotienten ist zu beobachten. Das Verhältnis displatzierte Amakrinzellen zu Ganglienzellen fällt in der zentralen Netzhaut großer Fische am geringsten aus.

Ein weiterer Beleg für die Richtigkeit dieser Beobachtung sind frühere Studien. Es wurde bereits für mehrere Knochenfischarten nachgewiesen, dass der prozentuale Anteil der Ganglienzellen an der Gesamtzahl der Zellen der Ganglienzellschicht in zentralen Bereichen der Netzhaut höher ausfällt (Mednick und Springer, 1988; Collin und Pettigrew, 1988). Diese Studien basieren auf der Betrachtung retrograd gefüllter Netzhäute und NISSL Gegenfärbungen, wobei die Verlässlichkeit sehr von der retrograden Markierungstechnik abhängt.

Die Experimente dieser Arbeit stützten sich ebenfalls auf die retrograde Markierung der Ganglienzellen. Durch die Kombination von retrograder Markierung mit einem Marker für Nicht-Ganglienzellen, zusammen mit einer Kerngegenfärbung, war es möglich alle Zellen der Ganglienzellschicht darzustellen und zu zählen. Entweder waren sie als Ganglienzellen retrograd mit Dextran markiert oder sie wurden durch den Amakrinzellmarker Parvalbumin dargestellt. Mit Hilfe der Kerngegenfärbung konnte sicher gestellt werden, dass alle Zellen durch das eine oder andere Verfahren zur Darstellung kamen.

Mit Hilfe dieser Techniken und der Auswertung mehrerer hundert Schnitte konnte also eindeutig gezeigt werden, dass sich das Verhältnis von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen abhängig von Alter und Lokalisation des Gewebes verändert. Je älter das Gewebe und je näher am Zentrum der Netzhaut gelegen, desto geringer fällt der Quotient displatzierte Amakrinzellen zu Ganglienzellen aus.

Wenn also in bereits bestehendem, alterndem Gewebe die displatzierten Amakrinzellen der Ganglienzellschicht stärker abnehmen als die Ganglienzellen, wirft sich die Frage auf, ob diese Veränderungen nur durch das

Wachstum der Netzhaut zu erklären sind oder ob es noch andere Einflüsse auf die Abnahme der Zelldichte gibt.

5. *Ist die Veränderung des Quotienten DAC/OGC allein wachstumsbedingt?*

Um auf Veränderungen während des Wachstums schließen zu können, wurde in dieser Arbeit das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen in den Netzhäuten von drei Gruppen unterschiedlich großer Fische untersucht. Das Alter der Fische betrug ca. ein halbes, ein und zwei Jahre. Die Versuchstiere hatten eine Standardlänge von etwa 2cm, 5cm und 10cm. Eine Unterteilung der Netzhaut in fünf Abschnitte (temporal, intermediär temporal, zentral, intermediär nasal, nasal) machte außerdem, den statistischen Vergleich innerhalb einer Netzhaut, sowie einen Vergleich entsprechender Areale auf verschiedenen Netzhäuten möglich.

Mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) wurden die fünf Abschnitte einer Netzhaut miteinander verglichen. Für kleine Fische ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) für das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen zwischen dem Zentrum der Netzhaut und den peripheren Netzhautanteilen. Das bedeutet, dass im relativ jungen Gewebe des kleinen Fischauges das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen über die gesamte Retina nahezu gleich ist.

Der Vergleich der fünf Netzhautabschnitte in Netzhäuten von mittleren und großen Fischen zeigte einen signifikanten Unterschied des Quotienten displazierte Amakrinzellen zu Ganglienzellen ($p < 0,0001$). Der Quotient fiel in der Peripherie der Netzhaut größer aus als in den zentralen Anteilen nahe der Papille. Das bedeutet, je größer die Netzhaut ist, desto größer wird der Unterschied zwischen dem Verhältnis von displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen in der Peripherie und im Zentrum.

Es folgte nun der Vergleich der fünf Netzhautregionen für die verschiedenen Fischgrößen. Der statistische Vergleich der zentralen Bereiche der Netzhäute zeigte einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0017$) zwischen kleinem, mittlerem und großem Fisch. Das bedeutet je größer der Fisch und damit seine Netzhaut,

desto geringer fällt der Quotient displatzierte Amakrinzellen zu Ganglienzellen im Zentrum der Netzhaut aus.

In der Peripherie der Netzhaut ist mit einem Signifikanzniveau von $p=0,143$ in den nasalen Anteilen und $p=0,276$ in den temporalen Netzhautabschnitten kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den verschiedenen Fischgrößen nachweisbar (zur statistischen Auswertung siehe auch 3.3.3).

Das bedeutet, dass Ganglienzellen und displatzierte Amakrinzellen sowohl bei kleinen als auch bei großen Fischen im selben, konstanten Verhältnis in der peripheren Wachstumszone gebildet werden. Die beobachtete Veränderung des Quotienten mit zunehmender Augengröße unterstützt daher die Vermutung, dass die Anzahl der displatzierten Amakrinzellen relativ zur Anzahl der Ganglienzellen abnimmt, wenn mit zunehmendem Alter bzw. zunehmender Größe des Auges, peripher gelegene Netzhautareale mehr nach zentral verlagert werden.

Müller (1952) und Lyall (1957) zeigten in ihren Arbeiten, dass das Wachstum der Netzhaut einerseits durch Proliferation neuer Zellen entlang einer peripher gelegenen Wachstumszone erfolgt und andererseits durch die Dehnung des bereits vorhandenen Gewebes bedingt ist.

Die statistischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass displatzierte Amakrinzellen und Ganglienzellen bei Fischen jeden Alters in einem konstanten Verhältnis gebildet werden. Eine Veränderung des Quotienten von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen lässt sich daher durch die Proliferation der Zellen nicht erklären. Die reine Dehnung des retinalen Gewebes bei zunehmender Augengröße hätte ebenfalls ein konstant bleibendes Verhältnis der beiden Zelltypen zur Folge. Das heißt, weder durch Zellproliferation noch durch Dehnung des bestehenden Gewebes kann die Veränderung des Verhältnisses von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen hervorgerufen werden.

Somit ist die Abnahme des Quotienten mit zunehmender Größe der Netzhaut und zunehmendem Alter des Netzhautgewebes nicht durch das reine Wachstum des Auges erklärbar.

Der relativen Abnahme der displatzierten Amakrinzellen scheinen daher andere Mechanismen zugrunde zu liegen als nur der Vorgang des Wachsens.

6. *Welche Mechanismen liegen der Abnahme der displatzierten Amakrinzellen in der zentralen Netzhaut zugrunde?*

Es können nur Vermutungen darüber angestellt werden was für Mechanismen eine Änderung der Verhältnisse von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen in den zentralen, älteren Netzhautanteilen der Versuchstiere bewirken. In der Literatur finden sich mehrere Theorien zur Veränderung des Verhältnisses von Nicht-Ganglienzellen zu Ganglienzellen.

Lia et al. (1987) postulierten ein unterschiedliches Wachstum der Retina als Erklärung für den relativ größeren Anteil der Ganglienzellen in manchen Retinaarealen. Das Wachstum des Auges durch Dehnung und Zellproliferation entfällt jedoch als Erklärung für die Abnahme der displatzierten Amakrinzellen bzw. für das sich verändernde Verhältnis von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen wie unter Diskussionspunkt 5 (siehe oben) ausführlich erläutert wurde.

Hinds und Hinds erörterten 1983 in einer Arbeit über die Entwicklung von Amakrinzellen in der Netzhaut von Mäuseembryonen, die Möglichkeit der Umwandlung von Ganglienzellen in displatzierte Amakrinzellen. Diese Überlegung erklärt allerdings nicht die Abnahme der displatzierten Amakrinzellen in der zentralen Netzhaut älterer Fische, sondern könnte nur eine Zunahme der displatzierten Amakrinzellen begründen. Wenn allerdings displatzierte Amakrinzellen tatsächlich nur Ganglienzellen sind, die ihr Axon verloren haben, stellt sich die Frage, ob eine erneute Umdifferenzierung zu Ganglienzellen möglich ist. Eine solche Umdifferenzierung der displatzierten Amakrinzellen in Ganglienzellen würde die nachträgliche oder erneute Bildung eines bis ins Tektum reichenden Axons voraussetzen. Obwohl die Idee der Umdifferenzierung von neuronalem Gewebe nicht neu ist (Hinds und Hinds, 1983), gibt es bisher keinen Beweis für diese Vermutung und erscheint sehr unwahrscheinlich.

Es gibt auch keinen Hinweis dafür, dass displatzierte Amakrinzellen sich zu Stütz- und Nährzellen wie etwa Müllerzellen umdifferenzieren. Wenn eine Umwandlung von displatzierten Amakrinzellen zu anderen Nicht-Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht stattfinden würde, hätte man in der vorliegenden Arbeit bei der Untersuchung retinaler Schnitte in den zentralen Bereichen der Netzhaut vermehrt Zellen gefunden, die nur durch die Kerngegenfärbung zur Darstellung kommen und nicht durch die retrograde Markierung als Ganglienzellen oder durch Parvalbumin als displatzierte Amakrinzelle zu erkennen sind. Da das nicht der Fall war, kommt auch diese Möglichkeit als Erklärung für das sich verändernde Verhältnis der beiden Zelltypen nicht in Frage.

Eine weitere Vermutung ist, dass in bestimmten Bereichen der Netzhaut während der Entwicklung des Auges Zellen selektiv zugrunde gehen (Sengelaub et al., 1986). Selektiver Zelltod kann als Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Es wäre denkbar, dass das Verhältnis der displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen durch Apoptose der displatzierten Amakrinzellen in den zentralen Bereichen der Netzhaut kontrolliert wird. Untersuchungen zur Apoptose ergaben allerdings relativ selten Zeichen für selektiven Zelltod in der Netzhaut von ausgewachsenen Fischen.

Hoke und Fernald (1998) konnten in einer Arbeit Apoptosevorgänge während der embryonalen Entwicklung des Auges beobachten. Selbst in der retinalen Peripherie von ausgewachsenen Cichliden konnte von ihnen jedoch keine Apoptose nachgewiesen werden. Auch Biehlmaier et al. (2001) zeigte, dass zumindest in der zentralen Netzhaut von adulten Zebrafischen kein selektiver Zelluntergang stattfindet.

Um die Theorie zu belegen, dass displatzierte Amakrinzellen in der wachsenden Netzhaut selektiv zugrunde gehen, müsste eine umfangreiche Studie an Netzhautschnitten, die Zentrum und Peripherie der Netzhaut beinhalten, erfolgen. Eine Mehrfachfärbung mit einem Apoptosemarker, Antikörpern gegen Parvalbumin und einer retrograden Dextranfärbung der Ganglienzellen wäre denkbar.

Eine weitere denkbare Erklärung für die Abnahme der displatzierten Amakrinzellen ist die Wanderung displatzierte Amakrinzellen von der Ganglienzellschicht durch die Innere Plexiforme Schicht in die Innere Körnerschicht. In Netzhäuten von Ratten wurden während der späten Embryonalentwicklung wandernde Amakrinzellen aus der Ganglienzellschicht beobachtet.

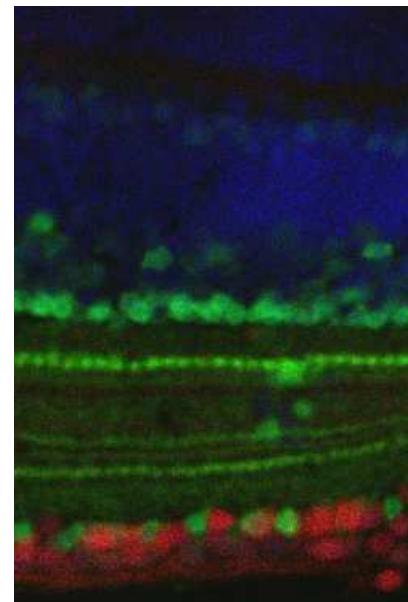
Tatsächlich konnten auch in der vorliegenden Arbeit selten Parvalbumin positive Zellen in der Inneren Plexiformen Schicht beobachtet werden. Ob diese Zellen zu den regulär auftretenden interstitiellen Amakrinzellen der Inneren Plexiformen Schicht gehören, die von Wagner et al. (1991) beschrieben wurden oder ob sie möglicherweise migrierende displatzierte Amakrinzellen auf dem Weg von der Ganglienzellschicht zur Inneren Körnerschicht sind, konnte bisher nicht mit Sicherheit geklärt werden. Diese interessante Möglichkeit wirft außerdem neue Fragen auf, zum Beispiel, ob solche Zellen ihre synaptischen Kontakte beibehalten oder ob sie ihre Dendritenbäume „mitnehmen“ und von ihrem neuen Standort aus neue Synapsen ausbilden.

Abbildung 23:

Parvalbumin positive Zellen in der IPL

Dreifach markierter Netzhautschnitt: Dextran (rot), Parvalbumin (grün), Sytox green (blau).

In der IPL sind drei parvalbumin positive Zellen zu erkennen, welche das selbe Färbeverhalten wie orthotope und displatzierte Amakrinzellen aufweisen. Amakrinzellen auf „Wanderschaft“?



Auch wenn mit dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte durch welche Mechanismen es zu einer relativen Reduktion der displatzierten Amakrinzellen in den zentralen Anteilen der wachsenden Fischnetzhaut kommt, stellt sich

doch die Frage, weshalb es überhaupt zu einer Veränderung des Verhältnisses von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen kommt und was das für Konsequenzen nach sich zieht. Eine gezielte Anpassung der displatzierten Amakrinzellen an die Verteilung der Ganglienzellen beziehungsweise an die Erfordernisse der Informationsverarbeitung der Netzhaut ist denkbar.

7. *Welche Auswirkungen hat die Veränderungen der Verhältnisse von DAC zu OGC auf die Funktion der Zellen, den Informationsfluss und das Sehen insgesamt?*

Um auf die Folgen einer Abnahme der displatzierten Amakrinzellen schließen zu können, müsste zunächst deren genaue Funktion bekannt sein. Die unmittelbare Nähe der displatzierten Amakrinzellen zu den Ganglienzellen der Ganglienzellschicht lässt vermuten, dass diese inhibitorischen Zellen großen Einfluss auf die Ganglienzellen und deren Signalfluss haben. Es gibt jedoch nur wenige Arbeiten, die sich mit der spezifischen Funktion von displatzierten Amakrinzellen beschäftigen.

Nirenberg und Meister (1997) beschäftigten sich mit dem Einfluss der displatzierten Amakrinzellen auf das Antwortverhalten der Ganglienzellen. In der Netzhaut von Säugern gibt es Ganglienzellen, die vor allem auf bewegte Bilder reagieren. Ein bewegter Reiz löst eine vorübergehende, heftige Entladung der Ganglienzellen aus. Nirenberg und Meister zeigten, dass dieses Antwortverhalten durch displatzierte Amakrinzellen beeinflusst wird. Sie schalteten eine Subpopulation der displatzierten Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht aus und beobachteten anschließend das Antwortverhalten der Ganglienzellen. Die Ganglienzelle reagierte jetzt auf den selben Reiz mit einer prolongierten, anhaltenden Entladung. Das legt die Vermutung nahe, dass displatzierte Amakrinzellen einen inhibitorisch-modifizierenden Einfluss auf die Entladungsrate der Ganglienzellen haben.

Zhou beschreibt in einer Arbeit (1998) displatzierte, cholinerge Amakrinzellen, sogenannten Starburst Amakrinzellen, in der Netzhaut von Kaninchen.

Während der Entwicklung der Netzhaut kommt es zu spontanen rhythmischen Erregungswellen, welche die Netzhaut durchlaufen und denen eine wichtige Rolle in der Ausbildung neuronaler Kontakte innerhalb des visuellen Systems nachgesagt wird. Bisher war nicht genau bekannt, wodurch diese Erregungswellen ausgelöst werden. Zhou identifiziert Starburst Amakrinzellen als beteiligte Interneurone an der Ausbildung dieser wellenförmigen Erregung. Wahrscheinlich kommen die Erregungswellen durch eine rhythmische Freisetzung von Acetylcholin, unter anderem aus den cholinergen Starburst Amakrinzellen, zustande.

Außerdem wird den Starburst Amakrinzellen Einfluss auf das Richtungsselektive Antwortverhalten bestimmter Ganglienzellen zugeschrieben (Famiglietti, 1987). Einige Subtypen der retinalen Ganglienzellen antworten selektiv auf visuelle Reize, welche sich in einer bestimmten Richtung bewegen. Euler et al. (2002) konnten nachweisen, dass diese Richtungsselektivität bereits in den dendritischen Feldern der Starburst Amakrinzellen entsteht.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten cholinerge, displatzierte und orthotope Amakrinzellen mit Hilfe eines ChAT-Antikörpers nachgewiesen werden. Wenn diese Zellen auch richtungsselektive Eigenschaften haben, könnte man vermuten, dass Detektion von Bewegung in der Peripherie der Netzhaut und damit auch des Blickfeldes besser ausgeprägt bleibt.

Die Literatur liefert diverse Hinweise darauf, dass displatzierte Amakrinzellen das Antwortverhalten der Ganglienzellen koordinieren und modulieren. Die Frage ist nun, wie sich die Abnahme der Zelldichte auf die displatzierten Amakrinzellen, die Ganglienzellen, den Informationsfluss und das Sehen an sich auswirken. Sowohl Bipolarzellen als auch Ganglienzellen reagieren auf Abnahme der Zelldichte mit einer Vergrößerung ihrer dendritischen Felder und der Ausbildung neuer Synapsen (Collin und Pettigrew, 1988). Es ist möglich, dass displatzierte Amakrinzellen ebenso reagieren. Wenn das Verhältnis von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen in den zentralen Bereichen der

Netzhaut abnimmt, hat das zur Folge, dass sich der „Zuständigkeitsbereich“ der einzelnen displatzierten Amakrinzelle vergrößert, vorausgesetzt es soll dieselbe inhibitorische Leistung erbracht werden. Das würde bedeuten, dass die Zellen ihr dendritisches Feld vergrößern müssten, um eine größere Anzahl von Ganglienzellen beeinflussen zu können, und eine Vielzahl neuer Synapsen ausbilden müssten.

Ebenso denkbar wäre aber auch, dass die displatzierten Amakrinzellen nur ihre ursprünglich vorhandenen synaptischen Kontakte beibehalten und es nicht zu einer Vergrößerung der dendritischen Felder kommt. Das hätte bei kleiner werdendem Verhältnis von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen, eine verminderte Inhibition der zentral gelegenen Ganglienzelle zur Folge. Das heißt die Antwort der Ganglienzellen im Zentrum der Netzhaut würde stärker ausfallen als in peripheren Arealen.

Für das Sehen an sich hätte das zur Folge, dass mehr Informationen aus dem Zentrum der Netzhaut in höhergelegene visuelle Zentren des Gehirns weiter geleitet werden, eine Verstärkung der Informationen auf diese Weise wäre denkbar. Als Ersatz für eine Fovea kann das nicht gesehen werden, da *Aequidens Pulcher*, wie viele andere Cichliden über eine Area centralis in der dorso-temporalen Netzhaut mit vermehrter Ganglienzelldichte verfügt, die als Fovea- äquivalent gilt (Collin und Pettigrew, 1988). Vielleicht ist eine verminderte Inhibition in der zentralen Netzhaut als Anpassung an die Alterung der Ganglienzellen zu werten. Es wäre möglich, dass sich das Antwortverhalten der Ganglienzellen mit zunehmendem Alter verändert und sie deutlich weniger inhibiert werden müssen, um denselben Signalfluss zu erreichen.

Auch wenn die Mechanismen, die zur Eliminierung von displatzierten Amakrinzellen aus der Ganglienzellschicht führen, unbekannt bleiben, lassen die hier präsentierten Ergebnisse einen Anpassungsprozeß vermuten, der der relativen Verlagerung von retinalem peripheren Gewebe in Richtung zentraler gelegener Areale, während des kontinuierlichen Wachstums, Rechnung trägt.

4.2 Methodendiskussion

Die für diese Arbeit verwendeten Färbungen zeigten große Verlässlichkeit. Ganglienzellen wurden retrograd mit Dextran markiert. Displazierte Amakrinzellen wurden mit Antikörpern gegen Parvalbumin und ChaT dargestellt. Die Kerngegenfärbung mit Sytox Green stellte sicher, dass alle Zellen der Ganglienzellschicht mit einer der beiden Färbungen erfasst werden konnten. Die Verwendung des Amakrinzellmarkers Parvalbumin zur Markierung der Nicht-Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht zeigte deutlich Vorteile gegenüber der Verwendung von NISSL-Färbungen in früheren Arbeiten (Collin und Pettigrew, 1988). Es kam durch die spezifische Markierung der displazierten Amakrinzellen nicht zu Doppelmarkierungen. Die Zählung der Zellen wurde so deutlich vereinfacht.

Leider gelang es nicht, Wholemounts großer Versuchstiere verlässlich mit Parvalbumin zu färben (siehe 2.3.2 b). Eine Änderung der Präparationstechnik mit vollständiger Entfernung des Glaskörpers durch Hyaluronidase und einer deutlichen Verlängerung der Inkubationszeit müsste das Eindringen der Antikörper aber auch in große Netzhäute ermöglichen.

Die Unterteilung der Netzhaut-Schnitte in fünf Abschnitte (temporal, intermediär temporal, zentral, intermediär nasal, nasal) ermöglichte einen direkten Vergleich der erhobenen Daten innerhalb eines Auges und zwischen den verschiedenen Tiergrößen. Eine mögliche Ungenauigkeit dieser Einteilung durch einzelne, beschädigte Schnitte konnte durch die große Anzahl an ausgewerteten Schnitten ausgeglichen werden.

Nach Vorversuchen an 9 Tieren wurden in dieser Arbeit drei Gruppen unterschiedlich großer Fische betrachtet, wobei für jede Größe nur zwei Tiere, das heißt vier Augen untersucht wurden. Die an diesen Tieren erhobenen Daten zeigten bereits statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem Verhältnis von displazierten Amakrinzellen und Ganglienzellen in der Peripherie der Netzhaut und in ihrem Zentrum. Eine größere Anzahl an Versuchstieren hätte daher keine zusätzlichen Erkenntnisse im Bezug auf die Fragestellung erbracht.

Interessant wäre es jedoch zu überprüfen, ob auch bei Säugetieren, deren Netzhaut nach der Geburt nicht mehr so stark wächst wie die des Fisches, ebenfalls eine Abnahme des Verhältnisses von displatzierten Amakrinzellen und Ganglienzellen in Richtung Zentrum der Netzhaut vorliegt.

Außerdem würde sich eine genauere Untersuchung der displatzierten Amakrinzellen anbieten. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden, war es nicht möglich die dendritischen Felder der displatzierten Amakrinzellen darzustellen. Die Antikörper gegen Parvalbumin und ChAT färbten die Somata der Zellen und ihre Fortsätze (Dendriten) an. Aufgrund ihrer Dichte konnten die Dendriten jedoch nicht einzelnen Zellen zugeordnet werden. Eine Möglichkeit die Reaktion der displatzierten Amakrinzellen auf die Dichteabnahme zu untersuchen ist die Mikroinjektion einzelner Zellen mit einem Farbstoff der Soma und Dendriten anfärbt, wie zum Beispiel Lucifer Yellow oder Meerrettich Peroxidase. Es könnten mit dieser Methode displatzierte Amakrinzellen in der Peripherie der Netzhaut und im Zentrum markiert werden und die Größe der dendritischen Felder verglichen werden. Bei der Untersuchung von Schnitten müsste es mit Hilfe eines Laser Scan Mikroskops möglich sein die Dendriten der displatzierten Amakrinzellen bis in die Peripherie des dendritischen Feldes zu verfolgen und so einen Einblick in die Terminationsgebiete dieser Zellen zu gewinnen.

Der Nachteil der Mikroinjektion von Zellen ist, dass dieses Verfahren relativ aufwendig ist und sehr viele Zellen markiert werden müssten, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Eine weitere Möglichkeit, Genaueres über displatzierte Amakrinzellen zu erfahren, wäre die Dreifachfärbung von Netzhäuten mit Dextran, Parvalbumin- und ChAT-Antikörpern. Damit können Ganglienzellen, displatzierte Amakrinzellen und cholinerge displatzierte Amakrinzellen unterschieden werden. Man müsste Netzhäute verschiedener Größe in dieser Form markieren, um die Verteilung der cholinergen displatzierten Amakrinzellen zu beurteilen. Es wäre möglich, ihr Verhältnis zu nicht cholinergen displatzierten Amakrinzellen und Ganglienzellen zu berechnen. Der Vergleich verschieden

alter Netzhäute würde weitere Rückschlüsse auf die Entwicklung der displazierten Amakrinzellen in der wachsenden Netzhaut zulassen.

4.3 Übertragbarkeit auf das menschliche Auge

Für eine Studie am wachsenden Auge bieten sich Fische als Versuchstiere in besonderem Maße an, da ihre Augen beständig wachsen und ihre Netzhaut häufig einen sehr regelmäßigen Aufbau aufweist. Das menschliche Auge hat seine Entwicklung zum Zeitpunkt der Geburt bereits nahezu abgeschlossen und wächst nur noch um das 1,4fache in axialer Länge.

Die Frage ist nun, ob und wie sich die Ergebnisse dieser Arbeit vom Fisch auf andere Tiermodelle bzw. auf das menschliche Auge übertragen lassen. Elektrophysiologische Untersuchungen am menschlichen Auge in vivo zeigen, dass die Inhibition der Ganglienzellen in den zentralen Bereichen der Netzhaut deutlich geringer ausfällt als in der Peripherie .

Welcher Zelltyp der Netzhaut für diese stärkere Inhibition der Ganglienzellen in der Peripherie verantwortlich ist bzw. wodurch die verminderte Inhibition im Zentrum der Netzhaut zustande kommt, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Die Beobachtungen am menschlichen Auge passen jedoch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Es ist denkbar, dass auch in der menschlichen Netzhaut eine Abnahme der inhibitorischen, displazierten Amakrinzellen in den zentralen Anteilen der Netzhaut zu finden ist. Die Verminderung inhibitorischer Einflüsse durch eine Veränderung des Verhältnisses von displazierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen könnte das beobachtete Inhibitionsmuster durchaus erklären.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Zellen der Ganglienzellschicht in der Netzhaut von Cichliden.

Zur Darstellung der Zellen wurden folgende Färbetechniken kombiniert:

Die retrograde Markierung mit Tetramethyl Rhodamin Dextran diente der Anfärbung der Ganglienzellen vom optischen Nerv aus. Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Parvalbumin (ein Kalzium bindendes Protein in inhibitorischen Interneuronen) und ChaT (Cholinacetyl Transferase findet sich in cholinergen Neuronen des Gehirns und des zentralen Nervensystems) dienten der Darstellung von Amakrinzellen in der INL und von displatzierten Amakrinzellen in der Ganglienzellschicht. Die beiden Färbungen wiesen keinerlei Überlappung auf. Mit Hilfe einer Kerngegenfärbung mit Sytox Green zeigte sich, dass mit den verwendeten Färbungen nahezu alle Zellen der Ganglienzellschicht zur Darstellung gebracht werden konnten.

Untersucht wurden einerseits Verteilung und absolute Dichte der Ganglienzellen und displatzierten Amakrinzellen. Beide Zellarten werden in einer peripheren Wachstumszone in konstantem Verhältnis gebildet. Durch Dehnung des Gewebes nimmt ihre Dichte mit zunehmender Augengröße ab. Die Dichte der displatzierten Amakrinzellen ist im Zentrum der Netzhaut am geringsten. Die Verteilung der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht und der displatzierten Ganglienzellen am Rande der INL weist ein Areal vermehrter Zelldichte im temporo-dorsalen Bereich der Netzhaut auf.

Andererseits wurde das Verhältnis displatzierter Amakrinzellen zu Ganglienzellen in Abhängigkeit von der Netzhautregion bzw. dem Alter des Fisches an drei Gruppen unterschiedlich großer Fische untersucht, um auf wachstumsbedingte Veränderungen schließen zu können. Es zeigte sich eine von der Netzhautregion bzw. dem Alter der Netzhaut abhängige Veränderung des Quotienten DAC/OGC. In der Peripherie der Netzhäute zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Fischgrößen. Bei mittleren und großen Fischen fiel ein Gradient von peripher nach zentral für das Verhältnis von DAC/OGC auf, wobei das Verhältnis im Zentrum der Netzhäute großer Fische am geringsten ausfiel.

Als Ursache dieses verminderten Verhältnisses in der zentralen Retina kommen die beiden, das Wachstum der Netzhaut von Fischen bedingenden Faktoren nicht in Frage. Dehnung würde beide Zellarten gleichermaßen betreffen. Für die Zellproliferation konnte nachgewiesen werden, dass beide Zellarten in der peripheren Wachstumszone in gleichem Verhältnis produziert werden.

Über die Mechanismen, die zu dieser Veränderung führen, kann nur spekuliert werden. Umdifferenzierung von displatzierten Amakrinzellen zu Ganglienzellen erscheint eher unwahrscheinlich. Selektiver Zelltod wird in der Netzhaut adulter Cichliden so gut wie nicht beobachtet. Möglich wäre noch die Wanderung der displatzierten Amakrinzellen von der Ganglienzellschicht in die INL und somit die Umwandlung in orthotope Amakrinzellen.

Klar scheint, dass die Abnahme der displatzierten Amakrinzellen in den zentralen Bereichen der Netzhaut zu einer verminderten Inhibition der Ganglienzellen führt und somit die Antwort der Ganglienzellen im Zentrum stärker ausfällt.

6. Anhang

6.1 Tiermaterial

Für diese Arbeit wurden 15 Fische der Gattung *Aequidens pulcher* (AP) verwendet. Die Nummerierung erfolgte fortlaufend, die Präparate wurden mit „li“ für linkes, sowie „re“ für rechtes Auge gekennzeichnet.

AP 1: SL= 4,8cm; Alter: 1 – 1,5a

Li: Wholemount → Dextran

Re: Schnitte → Dextran, PKC b, GAD, Parvalbumin, NISSL

AP 2: SL= 5,1cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemount → Dextran

Re: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

AP 3: SL= 4,7cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemount → Dextran

Re: Wholemount → Dextran

AP 4: SL= 5,5cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemount → Dextran, Parvalbumin

Re: Wholemount → Dextran, PKC b

AP 5: SL= 4,8cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemount → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, PKC b, GAD

AP 6: SL= 3,9cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemount → Dextran

Re: Wholemount → Dextran

AP 7: SL= 4,4cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemount → keine Färbungen

Re: Wholemount → Dextran, Parvalbumin

AP 8: SL= 3,7cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemount → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Wholemount → Dextran

AP 9: SL= 5,7cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

AP 10: SL= 10cm; Alter: 2- 2,5a

Li: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green, GAD

AP 11: SL= 8,9cm; Alter: 2- 2,5a

Li: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

AP 12: SL= 5,1cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, ChaT, Sytox Green

AP 13: SL= 4,7cm; Alter: 1- 1,5a

Li: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green, ChaT

Re: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

AP 14: SL= 2,0cm; Alter: 0,5 - 1a

Li: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

AP 15: SL= 2,3cm; Alter: 0,5 - 1a

Li: Wholemout → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

Re: Schnitte → Dextran, Parvalbumin, Sytox Green

6.2 Basisdaten (Tabellen)

6.2.1 Wholemounds

Nachfolgende Tabellen beinhalten sämtliche an Netzhaut Präparationen gesammelte Daten. Die Kopfzeile enthält die Kennung des Fisches (AP x) und gibt Auskunft darüber, ob linkes oder rechtes Auge ausgewertet wurde.

Die erste Spalte (Scan) bezeichnet die mit dem LSM eingescannten Quadrate. Grau hinterlegt finden sich in Spalte zwei bis vier die Ergebnisse der Zählungen in den jeweiligen Quadraten. Dabei steht DGC für displatzierte Ganglienzellen, OGC für orthotope Ganglienzellen und DAC für displatzierte Amakrinzellen. Die darunter befindlichen Zahlen geben die Kantenlänge des Quadrates in μm an, in dem die jeweilige Zellart gezählt wurde.

Spalte fünf bis sieben beinhalten eine Hochrechnung der nur in repräsentativen Ausschnitten ausgezählten Zellen (OGC und DAC) auf das gesamte Scan-Areal.

In Spalte acht bis zehn erfolgt die Berechnung der Anzahl dieser Zellen pro mm^2 .

Die Spalten elf und zwölf stellen den Quotienten displatzierte Ganglienzellen zu orthotopen Ganglienzellen bzw. displatzierte Amakrinzellen zu orthotopen Ganglienzellen dar.

Finden sich in einer Zeile keine Angaben, so ist in diesem Quadrat kein Netzhautgewebe vorhanden bzw. die entsprechende Zellart wurde an diesem Präparat nicht gezählt.

Tabelle 11: Basisdaten AP1li (Aequidens pulcher, Tier 1, linkes Auge)

Erklärung der Abkürzungen: DGC: displatzierte Ganglienzellen OGC: orthotope Ganglienzellen DAC: displatzierte Amakrinzellen

AP 1li (1a-5i)												
scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis		
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC	
	Zählfeldgröße in µm:											
	636x636	200x200	100x100									
1a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1d	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1e	0	111		0	1122	0	0	2775	0	0,00000	0,00000	
1f	4	234		4	2366	0	10	5850	0	0,00169	0,00000	
1g	3	196		3	1982	0	7	4900	0	0,00151	0,00000	
1h	5	210		5	2124	0	12	5250	0	0,00235	0,00000	
1i	1	151		1	1527	0	2	3775	0	0,00065	0,00000	
1j	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2d	1	263		1	2660	0	2	6575	0	0,00038	0,00000	
2e	3	235		3	2376	0	7	5875	0	0,00126	0,00000	
2f	4	241		4	2437	0	10	6025	0	0,00164	0,00000	
2g	8	252		8	2548	0	20	6300	0	0,00314	0,00000	
2h	9	234		9	2366	0	22	5850	0	0,00380	0,00000	
2i	7	229		7	2316	0	17	5725	0	0,00302	0,00000	
2j	5	231		5	2336	0	12	5775	0	0,00214	0,00000	
2k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	200x200	100x100								
2m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3c	2			2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3d	4	309		4	3125	0	10	7725	0	0,00128	0,00000
3e	8	295		8	2983	0	20	7375	0	0,00268	0,00000
3f	6	251		6	2538	0	15	6275	0	0,00236	0,00000
3g	8	264		8	2670	0	20	6600	0	0,00300	0,00000
3h	14	370		14	3742	0	35	9250	0	0,00374	0,00000
3i	11	418		11	4227	0	27	a	0	#WERT!	0,00000
3j	6			6	0	0	15	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4c	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4d	6	349		6	3529	0	15	8725	0	0,00170	0,00000
4e	10	365		10	3691	0	25	9125	0	0,00271	0,00000
4f	7	220		7	2225	0	17	5500	0	0,00315	0,00000
4g	6	315		6	3185	0	15	7875	0	0,00188	0,00000
4h	15	408		15	4126	0	37	10200	0	0,00364	0,00000
4i	12			12	0	0	30	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4j	6			6	0	0	15	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4k	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4l	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4m	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5a	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5b	2	224		2	2265	0	5	5600	0	0,00088	0,00000
5c	2	187		2	1891	0	5	4675	0	0,00106	0,00000
5d	5			5	0	0	12	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5e	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5f	2			2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm										
	636x636	200x200	100x100								
5g	3	271		3	2740	0	7	6775	0	0,00109	0,00000
5h	7	326		7	3297	0	17	8150	0	0,00212	0,00000
5i	12			12	0	0	30	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5j	8			8	0	0	20	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5k	8			8	0	0	20	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5l	6			6	0	0	15	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5m	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

Erklärung der **Abkürzungen:**

DGC: displatzierte Ganglienzellen

OGC: orthotope Ganglienzellen

DAC: displatzierte Amakrinzellen

Tabelle 12: Fortsetzung: Basisdaten Ap1li

Erklärung der Abkürzungen :
DGC: displatzierte Ganglienzellen
OGC: orthotope Ganglienzellen
DAC: displatzierte Amakrinzellen

AP 1li (5i-12m)											
scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
5i	12	126		12	5090	0	30	12600	0	0,00235	0,00000
5j	8	112		8	4525	0	20	11200	0	0,00177	0,00000
5k	8	83		8	3353	0	20	8300	0	0,00238	0,00000
5l	6	83		6	3353	0	15	8300	0	0,00179	0,00000
5m	3	62		3	2505	0	7	6200	0	0,00120	0,00000
6a	3	39		3	1576	0	7	3900	0	0,00190	0,00000
6b	2	56		2	2262	0	5	5600	0	0,00088	0,00000
6c	4	69		4	2788	0	10	6900	0	0,00143	0,00000
6d	6	67		6	2707	0	15	6700	0	0,00221	0,00000
6e	3	29		3	1172	0	7	2900	0	0,00256	0,00000
6f	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6g	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6h	8	92		8	3717	0	20	9200	0	0,00215	0,00000
6i	14	93		14	3757	0	35	9300	0	0,00372	0,00000
6j	11	96		11	3878	0	27	9600	0	0,00283	0,00000
6k	8	100		8	4040	0	20	10000	0	0,00198	0,00000
6l	8	91		8	3676	0	20	9100	0	0,00217	0,00000
6m	6	78		6	3151	0	15	7800	0	0,00190	0,00000
7a	0	33		0	1333	0	0	3300	0	0,00000	0,00000
7b	4	68		4	2747	0	10	6800	0	0,00145	0,00000
7c	4	33		4	1333	0	10	3300	0	0,00300	0,00000
7d	4	47		4	1899	0	10	4700	0	0,00210	0,00000
7e	8	46		8	1858	0	20	4600	0	0,00430	0,00000
7f	5			5	0	0	12	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
7g	8	66		8	2666	0	20	6600	0	0,00300	0,00000

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
7h	13	79		13	3192	0	32	7900	0	0,00407	0,00000
7i	13	114		13	4606	0	32	11400	0	0,00282	0,00000
7j	9	97		9	3919	0	22	9700	0	0,00229	0,00000
7k	7	70		7	2828	0	17	7000	0	0,00247	0,00000
7l	3	62		3	2505	0	7	6200	0	0,00120	0,00000
7m	6	47		6	1899	0	15	4700	0	0,00316	0,00000
8a	1	26		1	1050	0	2	2600	0	0,00095	0,00000
8b	1	46		1	1858	0	2	4600	0	0,00054	0,00000
8c	2	44		2	1778	0	5	4400	0	0,00112	0,00000
8d	4	30		4	1212	0	10	3000	0	0,00330	0,00000
8e	6	59		6	2384	0	15	5900	0	0,00251	0,00000
8f	6	69		6	2788	0	15	6900	0	0,00215	0,00000
8g	10	80		10	3232	0	25	8000	0	0,00309	0,00000
8h	10	66		10	2666	0	25	6600	0	0,00375	0,00000
8i	8	94		8	3798	0	20	9400	0	0,00210	0,00000
8j	7	87		7	3515	0	17	8700	0	0,00199	0,00000
8k	6	88		6	3555	0	15	8800	0	0,00169	0,00000
8l	6	63		6	2545	0	15	6300	0	0,00235	0,00000
8m	6	43		6	1737	0	15	4300	0	0,00345	0,00000
9a	2			2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
9b	3	32		3	1293	0	7	3200	0	0,00232	0,00000
9c	3	32		3	1293	0	7	3200	0	0,00232	0,00000
9d	4	43		4	1737	0	10	4300	0	0,00230	0,00000
9e	7	62		7	2505	0	17	6200	0	0,00279	0,00000
9f	9	77		9	3111	0	22	7700	0	0,00289	0,00000
9g	9			9	0	0	22	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
9h	8	78		8	3151	0	20	7800	0	0,00254	0,00000
9i	11	81		11	3272	0	27	8100	0	0,00336	0,00000
9j	9	68		9	2747	0	22	6800	0	0,00327	0,00000
9k	6	86		6	3474	0	15	8600	0	0,00172	0,00000
9l	5	60		5	2424	0	12	6000	0	0,00206	0,00000
9m	5			5	0	0	12	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
10a	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10b	2	57		2	2303	0	5	5700	0	0,00087	0,00000
10c	4	42		4	1697	0	10	4200	0	0,00235	0,00000
10d	4	42		4	1697	0	10	4200	0	0,00235	0,00000
10e	8	57		8	2303	0	20	5700	0	0,00347	0,00000
10f	7	53		7	2141	0	17	5300	0	0,00327	0,00000
10g	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10h	4	69		4	2788	0	10	6900	0	0,00143	0,00000
10i	8	65		8	2626	0	20	6500	0	0,00304	0,00000
10j	6	81		6	3272	0	15	8100	0	0,00183	0,00000
10k	4	47		4	1899	0	10	4700	0	0,00210	0,00000
10l	5			5	0	0	12	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10m	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11a				0	0		0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11b	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11c	5	44		5	1778	0	12	4400	0	0,00281	0,00000
11d	6			6	0	0	15	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11e	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11f	6	54		6	2182	0	15	5400	0	0,00275	0,00000
11g	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11h	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11i	11	47		11	1899	0	27	4700	0	0,00579	0,00000
11j	3	42		3	1697	0	7	4200	0	0,00177	0,00000
11k	2			2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11l	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12c	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12d	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12e	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12f	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12g	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
12h	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12i	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12j	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

Erklärung der **Abkürzungen:**

DGC: displatzierte Ganglienzellen

OGC: orthotope Ganglienzellen

DAC: displatzierte Amakrinzellen

Tabelle 13: Basisdaten Ap3re

Erklärung der **Abkürzungen**:
 DGC: displatzierte Ganglienzellen
 OGC: orthotope Ganglienzellen
 DAC: displatzierte Amakrinzellen

AP 3 re (1a-12l)												
scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis		
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC	
	Zählfeldgröße in µm:											
	636x636	100x100	100x100									
1a	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1b	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1c	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1d	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1e	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1f	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1g	4	59		4	2384	0	10	5900	0	0,00168	0,00000	
1h	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1i	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
1l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2c	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2d	0	84		0	3394	0	0	8400	0	0,00000	0,00000	
2e	9	112		9	4525	0	22	11200	0	0,00199	0,00000	
2f	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2g	7	88		7	3555	0	17	8800	0	0,00197	0,00000	
2h	10	103		10	4161	0	25	10300	0	0,00240	0,00000	
2i	8	82		8	3313	0	20	8200	0	0,00241	0,00000	
2j	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
3a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3c	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3d	8	109		8	4404	0	20	10900	0	0,00181	0,00000
3e	10	110		10	4444	0	25	11000	0	0,00225	0,00000
3f	9	109		9	4404	0	22	10900	0	0,00204	0,00000
3g	14	99		14	4000	0	35	9900	0	0,00350	0,00000
3h	14	84		14	3394	0	35	8400	0	0,00412	0,00000
3i	10	57		10	2303	0	25	5700	0	0,00434	0,00000
3j	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3k	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4d	3	84		3	3394	0	7	8400	0	0,00088	0,00000
4e	9	86		9	3474	0	22	8600	0	0,00259	0,00000
4f	9	86		9	3474	0	22	8600	0	0,00259	0,00000
4g	13	137		13	5535	0	32	13700	0	0,00235	0,00000
4h	13	83		13	3353	0	32	8300	0	0,00387	0,00000
4i	5	58		5	2343	0	12	5800	0	0,00213	0,00000
4j	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4k	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4l	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5a	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5b	5	115		5	4646	0	12	11500	0	0,00107	0,00000
5c	5	110		5	4444	0	12	11000	0	0,00112	0,00000
5d	7	77		7	3111	0	17	7700	0	0,00225	0,00000
5e	10	97		10	3919	0	25	9700	0	0,00255	0,00000
5f	11	69		11	2788	0	27	6900	0	0,00394	0,00000
5g	10	96		10	3878	0	25	9600	0	0,00258	0,00000

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
5h	7	55		7	2222	0	17	5500	0	0,00315	0,00000
5i	4	56		4	2262	0	10	5600	0	0,00177	0,00000
5j	3	97		3	3919	0	7	9700	0	0,00076	0,00000
5k	2	73		2	2949	0	5	7300	0	0,00068	0,00000
5l	2			2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6a	0	64		0	2586	0	0	6400	0	0,00000	0,00000
6b	0	91		0	3676	0	0	9100	0	0,00000	0,00000
6c	4	98		4	3959	0	10	9800	0	0,00101	0,00000
6d	6	116		6	4686	0	15	11600	0	0,00128	0,00000
6e	9	102		9	4121	0	22	10200	0	0,00218	0,00000
6f	9	86		9	3474	0	22	8600	0	0,00259	0,00000
6g	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6h	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6i	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6j	5	101		5	4080	0	12	10100	0	0,00122	0,00000
6k	4	94		4	3798	0	10	9400	0	0,00105	0,00000
6l	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
7a	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
7b	0	104		0	4202	0	0	10400	0	0,00000	0,00000
7c	7	121		7	4888	0	17	12100	0	0,00143	0,00000
7d	7	101		7	4080	0	17	10100	0	0,00171	0,00000
7e	9	91		9	3676	0	22	9100	0	0,00245	0,00000
7f	8	53		8	2141	0	20	5300	0	0,00373	0,00000
7g	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
7h	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
7i	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
7j	1	71		1	2868	0	2	7100	0	0,00035	0,00000
7k	0	73		0	2949	0	0	7300	0	0,00000	0,00000
7l	3	64		3	2586	0	7	6400	0	0,00116	0,00000
8a	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
8b	0	60		0	2424	0	0	6000	0	0,00000	0,00000
8c	5	98		5	3959	0	12	9800	0	0,00126	0,00000

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
8d	8	102		8	4121	0	20	10200	0	0,00194	0,00000
8e	4	86		4	3474	0	10	8600	0	0,00115	0,00000
8f	5	99		5	4000	0	12	9900	0	0,00125	0,00000
8g	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
8h	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
8i	3	66		3	2666	0	7	6600	0	0,00112	0,00000
8j	5	90		5	3636	0	12	9000	0	0,00137	0,00000
8k	6	79		6	3192	0	15	7900	0	0,00188	0,00000
8l	4	72		4	2909	0	10	7200	0	0,00137	0,00000
9a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
9b	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
9c	0	60		0	2424	0	0	6000	0	0,00000	0,00000
9d	5	76		5	3070	0	12	7600	0	0,00163	0,00000
9e	4	85		4	3434	0	10	8500	0	0,00116	0,00000
9f	0	57		0	2303	0	0	5700	0	0,00000	0,00000
9g	1	73		1	2949	0	2	7300	0	0,00034	0,00000
9h	2	54		2	2182	0	5	5400	0	0,00092	0,00000
9i	4	61		4	2464	0	10	6100	0	0,00162	0,00000
9j	5	81		5	3272	0	12	8100	0	0,00153	0,00000
9k	5	92		5	3717	0	12	9200	0	0,00134	0,00000
9l	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10b	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10c	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10d	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10e	1	50		1	2020	0	2	5000	0	0,00049	0,00000
10f	6	61		6	2464	0	15	6100	0	0,00243	0,00000
10g	4	84		4	3394	0	10	8400	0	0,00118	0,00000
10h	3	52		3	2101	0	7	5200	0	0,00143	0,00000
10i	2	61		2	2464	0	5	6100	0	0,00081	0,00000
10j	3	64		3	2586	0	7	6400	0	0,00116	0,00000
10k	1			1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	636x636	100x100	100x100								
10l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11d				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11e	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11f	1	60		1	2424	0	2	6000	0	0,00041	0,00000
11g	3	70		3	2828	0	7	7000	0	0,00106	0,00000
11h	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11i	1	53		1	2141	0	2	5300	0	0,00047	0,00000
11j	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12d				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12e				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12f				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12g				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12h	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12i	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

Erklärung der **Abkürzungen:**

DGC: displatzierte Ganglienzellen

OGC: orthotope Ganglienzellen

DAC: displatzierte Amakrinzellen

Tabelle 14: Basisdaten Ap7re

Erklärung der Abkürzungen: DGC: displatzierte Ganglienzellen OGC: orthotope Ganglienzellen DAC: displatzierte Amakrinzellen

AP 7re (1a-15n)											
scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/OGC	DAC/OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	100x100	100x100								
1a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
d				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
e	3	146	47	3	5898	1899	7	14600	4700	0,00050	0,32192
f	6	168	57	6	6787	2303	15	16800	5700	0,00088	0,33929
g	3	114	43	3	4606	1737	7	11400	4300	0,00065	0,37719
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
2a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
d	2	0	0	2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
e	3	138	59	3	5575	2384	7	13800	5900	0,00053	0,42754
f	9	109	38	9	4404	1535	22	10900	3800	0,00203	0,34862
g	7	119	44	7	4808	1778	17	11900	4400	0,00145	0,36975
h	1	0	0	1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j	4	0	0	4	0	0	10	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k	4	0	0	4	0	0	10	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/OGC	DAC/OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	100x100	100x100								
l	4	0	0	4	0	0	10	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c	6	98	50	6	3959	2020	15	9800	5000	0,00150	0,51020
d	3	113	48	3	4565	1939	7	11300	4800	0,00065	0,42478
e	4	93	32	4	3757	1293	10	9300	3200	0,00106	0,34409
f	5	96	33	5	3878	1333	12	9600	3300	0,00128	0,34375
g	5	133	42	5	5373	1697	12	13300	4200	0,00092	0,31579
h	5	162	54	5	6545	2182	12	16200	5400	0,00076	0,33333
i	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j	8	194	48	8	7838	1939	20	19400	4800	0,00101	0,24742
k	7	129	55	7	5212	2222	17	12900	5500	0,00133	0,42636
l	5	180	68	5	7272	2747	12	18000	6800	0,00068	0,37778
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	3	115	59	3	4646	2384	7	11500	5900	0,00064	0,51304
c	7	106	49	7	4282	1980	17	10600	4900	0,00162	0,46226
d	4	112	37	4	4525	1495	10	11200	3700	0,00088	0,33036
e	10	100	39	10	4040	1576	25	10000	3900	0,00246	0,39000
f	4	97	33	4	3919	1333	10	9700	3300	0,00101	0,34021
g	7	118	47	7	4767	1899	17	11800	4700	0,00146	0,39831
h	1	100	48	1	4040	1939	2	10000	4800	0,00025	0,48000
i	3	164	40	3	6626	1616	7	16400	4000	0,00045	0,24390
j	8	177	35	8	7151	1414	20	17700	3500	0,00111	0,19774
k	7	163	55	7	6585	2222	17	16300	5500	0,00106	0,33742
l	8	169	61	8	6828	2464	20	16900	6100	0,00116	0,36095
m	2	179	79	2	7232	3192	5	17900	7900	0,00027	0,44134
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5a	1	93	53	1	3757	2141	2	9300	5300	0,00026	0,56989

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	100x100	100x100								
b	3	89	49	3	3596	1980	7	8900	4900	0,00083	0,55056
c	3	113	50	3	4565	2020	7	11300	5000	0,00065	0,44248
d	5	108	36	5	4363	1454	12	10800	3600	0,00114	0,33333
e	3	87	27	3	3515	1091	7	8700	2700	0,00085	0,31034
f	6	110	37	6	4444	1495	15	11000	3700	0,00134	0,33636
g	3	153	48	3	6181	1939	7	15300	4800	0,00048	0,31373
h	3	103	29	3	4161	1172	7	10300	2900	0,00072	0,28155
i	7	118	47	7	4767	1899	17	11800	4700	0,00146	0,39831
j	7	118	42	7	4767	1697	17	11800	4200	0,00146	0,35593
k	11	119	40	11	4808	1616	27	11900	4000	0,00227	0,33613
l	8	119	43	8	4808	1737	20	11900	4300	0,00165	0,36134
m	6	180	80	6	7272	3232	15	18000	8000	0,00082	0,44444
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	2	0	0	2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c	8	119	32	8	4808	1293	20	11900	3200	0,00165	0,26891
d	2	111	40	2	4484	1616	5	11100	4000	0,00044	0,36036
e	8	107	45	8	4323	1818	20	10700	4500	0,00184	0,42056
f	6	90	33	6	3636	1333	15	9000	3300	0,00164	0,36667
g	5	100	40	5	4040	1616	12	10000	4000	0,00123	0,40000
h	5	99	41	5	4000	1656	12	9900	4100	0,00124	0,41414
i	3	117	48	3	4727	1939	7	11700	4800	0,00063	0,41026
j	6	108	45	6	4363	1818	15	10800	4500	0,00136	0,41667
k	9	81	26	9	3272	1050	22	8100	2600	0,00273	0,32099
l	10	91	32	10	3676	1293	25	9100	3200	0,00270	0,35165
m	7	97	44	7	3919	1778	17	9700	4400	0,00177	0,45361
n	1	114	64	1	4606	2586	2	11400	6400	0,00022	0,56140
7a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c	2	0	0	2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
d	3	0	0	3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
e	5	90	29	5	3636	1172	12	9000	2900	0,00136	0,32222
f	7	78	29	7	3151	1172	17	7800	2900	0,00220	0,37179

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	100x100	100x100								
g	2	81	24	2	3272	970	5	8100	2400	0,00061	0,29630
h	1	106	23	1	4282	929	2	10600	2300	0,00023	0,21698
i	3	95	25	3	3838	1010	7	9500	2500	0,00078	0,26316
j	3	93	24	3	3757	970	7	9300	2400	0,00079	0,25806
k	4	74	32	4	2990	1293	10	7400	3200	0,00133	0,43243
l	5	117	46	5	4727	1858	12	11700	4600	0,00105	0,39316
m	5	84	51	5	3394	2060	12	8400	5100	0,00146	0,60714
n	3	0	0	3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
8a	2	0	0	2	0	0	5	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	5	0	0	5	0	0	12	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c	9	88	43	9	3555	1737	22	8800	4300	0,00251	0,48864
d	9	112	50	9	4525	2020	22	11200	5000	0,00197	0,44643
e	7	110	43	7	4444	1737	17	11000	4300	0,00156	0,39091
f	8	63	22	8	2545	889	20	6300	2200	0,00312	0,34921
g	2	87	34	2	3515	1374	5	8700	3400	0,00056	0,39080
h	0	78	24	0	3151	970	0	7800	2400	0,00000	0,30769
i	0	104	36	0	4202	1454	0	10400	3600	0,00000	0,34615
j	0	94	28	0	3798	1131	0	9400	2800	0,00000	0,29787
k	3	72	24	3	2909	970	7	7200	2400	0,00102	0,33333
l	4	100	38	4	4040	1535	10	10000	3800	0,00098	0,38000
m	5	0	0	5	0	0	12	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n	1	0	0	1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
9a	5	88	55	5	3555	2222	12	8800	5500	0,00140	0,62500
b	6	45	24	6	1818	970	15	4500	2400	0,00328	0,53333
c	5	77	37	5	3111	1495	12	7700	3700	0,00160	0,48052
d	4	77	25	4	3111	1010	10	7700	2500	0,00128	0,32468
e	10	51	20	10	2060	808	25	5100	2000	0,00482	0,39216
f	8	72	22	8	2909	889	20	7200	2200	0,00273	0,30556
g	3	62	21	3	2505	848	7	6200	2100	0,00119	0,33871
h	1	59	17	1	2384	687	2	5900	1700	0,00042	0,28814
i	0	82	25	0	3313	1010	0	8200	2500	0,00000	0,30488
j	0	84	31	0	3394	1252	0	8400	3100	0,00000	0,36905
k	3	94	48	3	3798	1939	7	9400	4800	0,00078	0,51064

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	100x100	100x100								
l	3	106	47	3	4282	1899	7	10600	4700	0,00070	0,44340
m	9	73	52	9	2949	2101	22	7300	5200	0,00303	0,71233
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10a	1	82	54	1	3313	2182	2	8200	5400	0,00030	0,65854
b	4	62	37	4	2505	1495	10	6200	3700	0,00158	0,59677
c	5	53	28	5	2141	1131	12	5300	2800	0,00232	0,52830
d	9	64	23	9	2586	929	22	6400	2300	0,00345	0,35938
e	7	81	24	7	3272	970	17	8100	2400	0,00212	0,29630
f	6	41	15	6	1656	606	15	4100	1500	0,00360	0,36585
g	1	44	14	1	1778	566	2	4400	1400	0,00056	0,31818
h	1	41	21	1	1656	848	2	4100	2100	0,00060	0,51220
i	2	36	18	2	1454	727	5	3600	1800	0,00136	0,50000
j	1	60	40	1	2424	1616	2	6000	4000	0,00041	0,66667
k	1	109	41	1	4404	1656	2	10900	4100	0,00023	0,37615
l	7	75	56	7	3030	2262	17	7500	5600	0,00229	0,74667
m	3	0	0	3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	4	69	53	4	2788	2141	10	6900	5300	0,00142	0,76812
c	6	68	45	6	2747	1818	15	6800	4500	0,00217	0,66176
d	5	68	28	5	2747	1131	12	6800	2800	0,00181	0,41176
e	4	68	28	4	2747	1131	10	6800	2800	0,00145	0,41176
f	1	25	23	1	1010	929	2	2500	2300	0,00098	0,92000
g	1	21	26	1	848	1050	2	2100	2600	0,00117	1,23810
h	1	24	23	1	970	929	2	2400	2300	0,00102	0,95833
i	2	49	27	2	1980	1091	5	4900	2700	0,00100	0,55102
j	2	90	35	2	3636	1414	5	9000	3500	0,00055	0,38889
k	2	91	50	2	3676	2020	5	9100	5000	0,00054	0,54945
l	3	146	86	3	5898	3474	7	14600	8600	0,00050	0,58904
m	0	173	83	0	6989	3353	0	17300	8300	0,00000	0,47977
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	3	112	71	3	4525	2868	7	11200	7100	0,00066	0,63393

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	100x100	100x100								
c	9	83	43	9	3353	1737	22	8300	4300	0,00266	0,51807
d	6	83	32	6	3353	1293	15	8300	3200	0,00178	0,38554
e	1	0	0	1	0	0	2	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
f	1	46	19	1	1858	768	2	4600	1900	0,00053	0,41304
g	2	49	23	2	1980	929	5	4900	2300	0,00100	0,46939
h	3	65	29	3	2626	1172	7	6500	2900	0,00113	0,44615
i	7	89	37	7	3596	1495	17	8900	3700	0,00193	0,41573
j	2	80	45	2	3232	1818	5	8000	4500	0,00061	0,56250
k	3	80	62	3	3232	2505	7	8000	6200	0,00092	0,77500
l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
13a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	0	125	86	0	5050	3474	0	12500	8600	0,00000	0,68800
c	2	108	70	2	4363	2828	5	10800	7000	0,00045	0,64815
d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
g	6	61	24	6	2464	970	15	6100	2400	0,00242	0,39344
h	3	62	32	3	2505	1293	7	6200	3200	0,00119	0,51613
i	4	79	47	4	3192	1899	10	7900	4700	0,00124	0,59494
j	3	91	58	3	3676	2343	7	9100	5800	0,00081	0,63736
k	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
14a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
d				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
e				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
g	6	82	44	6	3313	1778	15	8200	4400	0,00180	0,53659

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	100x100	100x100								
h	4	103	68	4	4161	2747	10	10300	6800	0,00095	0,66019
i	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
15a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
c				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
d				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
e				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
f				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

Erklärung der **Abkürzungen:**

DGC: displatzierte Ganglienzellen

OGC: orthotope Ganglienzellen

DAC: displatzierte Amakrinzellen

Tabelle 15: **Basisdaten Ap14re**

Erklärung der Abkürzungen :
DGC: displatzierte Ganglienzellen
OGC: orthotope Ganglienzellen
DAC: displatzierte Amakrinzellen

AP 14re (1a-7g)												
scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis		
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC	
	Zählfeldgröße in µm:											
	638x638	31,3x31,3	31,3x31,3									
1a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
b	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
c	6	21	8	6	214	82	15	21435	8166	0,00069	0,38095	
d	4	16	14	4	163	143	10	16332	14290	0,00060	0,87500	
e	9	23	16	9	235	163	22	23477	16332	0,00094	0,69565	
f	4	25	14	4	255	143	10	25518	14290	0,00039	0,56000	
g		23	14	0	235	143	0	23477	14290	0,00000	0,60870	
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2a	0			0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
b	5	24	12	5	245	122	12	24498	12249	0,00050	0,50000	
c	6	12	8	6	122	82	15	12249	8166	0,00120	0,66667	
d	7	19	13	7	194	133	17	19394	13270	0,00089	0,68421	
e	13	22	13	13	224	133	32	22456	13270	0,00142	0,59091	
f	18	21	13	18	214	133	44	21435	13270	0,00206	0,61905	
g	6			6	0	0	15	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638	31,3x31,3	31,3x31,3								
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
3a	8	18	10	8	184	102	20	18373	10207	0,00107	0,55556
b	8	13	5	8	133	51	20	13270	5104	0,00148	0,38462
c	5	16	11	5	163	112	12	16332	11228	0,00075	0,68750
d	8	20	7	8	204	71	20	20415	7145	0,00096	0,35000
e	17	18	6	17	184	61	42	18373	6124	0,00227	0,33333
f	18	17	6	18	173	61	44	17352	6124	0,00255	0,35294
g	16	20	9	16	204	92	39	20415	9187	0,00193	0,45000
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
4a	3			3	0	0	7	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	3	17	7	3	173	71	7	17352	7145	0,00042	0,41176
c	8	19	7	8	194	71	20	19394	7145	0,00101	0,36842
d	10	24	8	10	245	82	25	24498	8166	0,00100	0,33333
e	8	19	9	8	194	92	20	19394	9187	0,00101	0,47368
f	12	20	7	12	204	71	29	20415	7145	0,00144	0,35000
g	5	17	8	5	173	82	12	17352	8166	0,00071	0,47059
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
5a	4	20	9	4	204	92	10	20415	9187	0,00048	0,45000
b	6	8	7	6	82	71	15	8166	7145	0,00181	0,87500

scan	Zellen/Zählfeld			Zellen/scan area			Zellen/mm ²			Verhältnis	
	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC	OGC	DAC	DGC/ OGC	DAC/ OGC
	Zählfeldgröße in µm:										
	638x638 31,3x31,3 31,3x31,3										
c	10	15	6	10	153	61	25	15311	6124	0,00160	0,40000
d	8	17	4	8	173	41	20	17352	4083	0,00113	0,23529
e	4	16	5	4	163	51	10	16332	5104	0,00060	0,31250
f	10	16	9	10	163	92	25	16332	9187	0,00150	0,56250
g	3	19	8	3	194	82	7	19394	8166	0,00038	0,42105
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
6a	2	15	6	2	153	61	5	15311	6124	0,00032	0,40000
b	11	12	5	11	122	51	27	12249	5104	0,00221	0,41667
c	7	11	4	7	112	41	17	11228	4083	0,00153	0,36364
d	8	10	6	8	102	61	20	10207	6124	0,00193	0,60000
e	6	12	7	6	122	71	15	12249	7145	0,00120	0,58333
f	18	19	5	18	194	51	44	19394	5104	0,00228	0,26316
g				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
h				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
i				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
j				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
k				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
l				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
m				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
n				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
7a				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
b	5	17	9	5	173	92	12	17352	9187	0,00071	0,52941
c	6	18	8	6	184	82	15	18373	8166	0,00080	0,44444
d				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
e	1	22	11	1	224	112	2	22456	11228	0,00011	0,50000
f	0	17	10	0	173	102	0	17352	10207	0,00000	0,58824
g				0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

6.2.2 Schnitte

Nachfolgende Tabellen enthalten die an Schnitten erhobenen Daten von sechs Fischen verschiedener Größe. AP 10 und 11 sind große Tiere, Ap12 und 13 mittelgroße und Ap14 und 15 kleine Tiere (Standardlänge siehe 6.1).

Die Kopfzeile der Tabellen enthält die Kennung des Fisches mit Seitenangabe und die retinale Länge, das heißt den Durchmesser der ausgewerteten Netzhaut. Die erste Spalte bezeichnet den Ort der Netzhaut aus dem die nachfolgenden Werte stammen: peripher temporal, intermediär temporal, zentral, intermediär nasal, peripher nasal. Spalte zwei gibt an in welchem Schnitt die Zählung erfolgte. Die Spalten drei bis sieben enthalten die Werte der Zählungen von orthotopen Ganglienzellen, displatzierten Amakrinzellen, der Gesamtzahl aller Zellen der Ganglienzellschicht, orthotope Amakrinzellen (das heißt Amakrinzellen der INL) und Horizontalzellen. In den letzten beiden Spalten erfolgt die Berechnung der Verhältnisse von displatzierten Amakrinzellen zu orthotopen Ganglienzellen und von displatzierten Amakrinzellen zu orthotopen Amakrinzellen. Am Ende jedes ausgezählten Abschnitts findet sich für den entsprechenden Zelltyp eine Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

Tabelle 16: **Basisdaten AP10re**

Erklärung der **Abkürzungen**:
 OGC: orthotope Ganglienzellen
 DAC: displatzierte Amakrinzellen
 HC: Horizontalzellen

Ap 10 re		<u>retinale Länge: 13200µm</u>						
		Absolut					Verhältnis	
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC
p(temp.)	1	16,00	8,00	24,00	30,00	-	0,500	0,267
	2	15,00	14,00	29,00	30,00	14,00	0,933	0,467
	3	9,00	5,00	14,00	27,00	-	0,556	0,185
	5	20,00	9,00	29,00	19,00	14,00	0,450	0,474
	6	13,00	10,00	23,00	21,00	10,00	0,769	0,476
	7	10,00	6,00	20,00	34,00	20,00	0,600	0,176
	STABW		3,72	2,92	5,21	5,27	3,57	0,167
Mittelwert		13,83	8,67	23,17	26,83	14,50	0,635	0,341
i(temp.)	1	11,00	2,00	13,00	20,00	-	0,182	0,100
	2	10,00	5,00	15,00	25,00	-	0,500	0,200
	3	13,00	6,00	19,00	32,00	-	0,462	0,188
	5	13,00	6,00	19,00	18,00	6,00	0,462	0,333
	6	9,00	6,00	15,00	28,00	9,00	0,667	0,214
	7	10,00	4,00	14,00	19,00	9,00	0,400	0,211
	STABW		1,53	1,46	2,34	5,12	1,41	0,144
Mittelwert		11,00	4,83	15,83	23,67	8,00	0,445	0,208
zentral	1	20,00	7,00	27,00	18,00	9,00	0,350	0,389
	2	16,00	5,00	21,00	24,00	9,00	0,313	0,208
	3	20,00	9,00	29,00	35,00	16,00	0,450	0,257
	5	17,00	4,00	21,00	25,00	10,00	0,235	0,160
	6	13,00	3,00	16,00	20,00	9,00	0,231	0,150
	7	20,00	8,00	28,00	34,00	14,00	0,400	0,235
	STABW		2,62	2,16	4,68	6,45	2,79	0,080
Mittelwert		17,67	6,00	23,67	26,00	11,17	0,330	0,233

<u>Ap 10 re</u>		<u>retinale Länge: 13200µm</u>						
		Absolut			Verhältnis			
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC
i(nasal)	1	24,00	12,00	37,00	30,00	-	0,500	0,400
	2	12,00	2,00	14,00	21,00	9,00	0,167	0,095
	3	27,00	11,00	39,00	36,00	15,00	0,407	0,306
	6	31,00	16,00	47,00	40,00	16,00	0,516	0,400
STABW		7,09	5,12	12,28	7,15	3,09	0,140	0,124
Mittelwert		23,50	10,25	34,25	31,75	13,33	0,398	0,300
p(nasal)	1	25,00	10,00	35,00	37,00	-	0,400	0,270
	2	20,00	14,00	34,00	53,00	10,00	0,700	0,264
	3	16,00	9,00	26,00	51,00	18,00	0,563	0,176
	6	18,00	15,00	33,00	46,00	16,00	0,833	0,326
	7	22,00	13,00	36,00	56,00	22,00	0,591	0,232
STABW		3,12	2,32	3,54	6,65	4,33	0,145	0,049
Mittelwert		20,20	12,20	32,80	48,60	16,50	0,617	0,254

Tabelle 17: **Basisdaten AP11li**

Erklärung der **Abkürzungen**:
OGC: orthotope Ganglienzellen
DAC: displatzierte Amakrinzellen
HC: Horizontalzellen

<u>Ap 11 li</u>		<u>retinale Länge: 12000µm</u>						
		Absolut			Verhältnis			
	Schnitt	GC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC
p(temp.)	1	11,00	7,00	18,00	21,00	-	0,636	0,333
	2	10,00	12,00	22,00	35,00	-	1,200	0,343
	3	11,00	6,00	17,00	26,00	-	0,545	0,231
	4	15,00	6,00	21,00	24,00	-	0,400	0,250
	5	18,00	5,00	23,00	35,00	-	0,278	0,143
	6	12,00	8,00	20,00	33,00	-	0,667	0,242
STABW		2,79	2,29	2,11	5,57	#DIV/0!	0,292	0,067
Mittelwert		12,83	7,33	20,17	29,00	#DIV/0!	0,621	0,257

<u>Ap 11 li</u>		retinale Länge: 12000µm						
		Absolut			Verhältnis			
	Schnitt	GC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC
i(temp.)	1	11,00	4,00	16,00	26,00	-	0,364	0,154
	2	12,00	5,00	17,00	33,00	-	0,417	0,152
	3	9,00	5,00	14,00	27,00	-	0,556	0,185
	4	10,00	4,00	14,00	26,00	-	0,400	0,154
	5	16,00	5,00	21,00	27,00	-	0,313	0,185
	6	19,00	5,00	25,00	23,00	-	0,263	0,217
STABW		3,53	0,47	3,98	3,00	#DIV/0!	0,092	0,024
Mittelwert		12,83	4,67	17,83	27,00	#DIV/0!	0,385	0,174
zentral	1	17,00	4,00	21,00	29,00	-	0,235	0,138
	2	11,00	4,00	16,00	27,00	-	0,364	0,148
	3	14,00	5,00	20,00	28,00	-	0,357	0,179
	4	13,00	4,00	17,00	23,00	-	0,308	0,174
	5	13,00	2,00	16,00	36,00	-	0,154	0,056
	6	26,00	4,00	30,00	29,00	13,00	0,154	0,138
STABW		4,96	0,90	4,86	3,86	0,00	0,087	0,040
Mittelwert		15,67	3,83	20,00	28,67	13,00	0,262	0,139
i(nasal)	1	19,00	6,00	25,00	31,00	-	0,316	0,194
	2	19,00	6,00	25,00	35,00	-	0,316	0,171
	3	18,00	6,00	24,00	31,00	14,00	0,333	0,194
	4	19,00	7,00	27,00	32,00	13,00	0,368	0,219
	5	16,00	6,00	23,00	36,00	16,00	0,375	0,167
	6	22,00	8,00	31,00	47,00	21,00	0,364	0,170
STABW		1,77	0,76	2,61	5,56	3,08	0,025	0,018
Mittelwert		18,83	6,50	25,83	35,33	16,00	0,345	0,186
p(nasal)	1	20,00	17,00	38,00	48,00	17,00	0,850	0,354
	2	16,00	9,00	25,00	54,00	22,00	0,563	0,167
	3	22,00	12,00	34,00	63,00	22,00	0,545	0,190
	4	19,00	9,00	28,00	45,00	17,00	0,474	0,200
	5	19,00	14,00	33,00	56,00	20,00	0,737	0,250
	6	19,00	11,00	30,00	48,00	14,00	0,579	0,229
STABW		1,77	2,83	4,23	6,07	2,92	0,128	0,061
Mittelwert		19,17	12,00	31,33	52,33	18,67	0,625	0,232

Tabelle 18: **Basisdaten AP12re**

Ap 12 re		retinale Länge: 7800 µm							
		Absolut			Verhältnis				
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC	
p(temp.)	1	20,00	22,00	42,00	53,00	28,00	1,100	0,415	
	2	22,00	16,00	38,00	50,00	19,00	0,727	0,320	
	7	27,00	19,00	46,00	59,00	27,00	0,704	0,322	
	9	18,00	15,00	33,00	61,00	30,00	0,833	0,246	
	11	23,00	15,00	39,00	56,00	24,00	0,652	0,268	
STABW		3,03	2,73	4,32	3,97	3,83	0,899	0,058	
Mittelwert		22,00	17,40	39,60	55,80	25,60	0,791	0,314	
i(temp.)	1	33,00	21,00	54,00	38,00	13,00	0,636	0,553	
	2	23,00	15,00	38,00	48,00	26,00	0,652	0,313	
	3	31,00	17,00	49,00	43,00	-	0,548	0,395	
	6	30,00	17,00	48,00	53,00	-	0,567	0,321	
	7	32,00	17,00	50,00	62,00	26,00	0,531	0,274	
	8	32,00	12,00	44,00	44,00	26,00	0,375	0,273	
	9	26,00	14,00	40,00	39,00	-	0,538	0,359	
	10	30,00	15,00	46,00	57,00	-	0,500	0,263	
	11	26,00	15,00	42,00	51,00	23,00	0,577	0,294	
	STABW		3,22	2,38	4,85	7,69	5,04	0,076	0,086
Mittelwert		29,22	15,89	45,67	48,33	22,80	0,547	0,338	
zentral	1	28,00	14,00	43,00	56,00	27,00	0,500	0,250	
	2	27,00	14,00	42,00	25,00	18,00	0,519	0,560	
	3	22,00	7,00	29,00	18,00	-	0,318	0,389	
	4	24,00	6,00	30,00	25,00	-	0,250	0,240	
	7	29,00	2,00	32,00	30,00	13,00	0,069	0,067	
	8	24,00	8,00	32,00	32,00	-	0,333	0,250	
	9	31,00	11,00	42,00	26,00	-	0,355	0,423	
	10	31,00	6,00	38,00	22,00	-	0,194	0,273	
	11	35,00	12,00	47,00	40,00	13,00	0,343	0,300	
	12	30,00	15,00	45,00	66,00	26,00	0,500	0,227	
	STABW		3,75	4,10	6,36	14,80	6,09	0,137	0,126
	Mittelwert		28,10	9,50	38,00	34,00	19,40	0,338	0,298

Ap 12 re		<u>retinale Länge: 7800 µm</u>							
		Absolut					Verhältnis		
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC	
i(nasal)	3	23,00	9,00	32,00	20,00	9,00	0,391	0,450	
	4	18,00	6,00	24,00	30,00	11,00	0,333	0,200	
	5	28,00	8,00	37,00	34,00	-	0,286	0,235	
	6	25,00	7,00	33,00	42,00	-	0,280	0,167	
	7	21,00	5,00	26,00	28,00	7,00	0,238	0,179	
	8	16,00	6,00	22,00	19,00	-	0,375	0,316	
	9	19,00	8,00	27,00	27,00	10,00	0,421	0,296	
	10	16,00	8,00	24,00	28,00	-	0,500	0,286	
	11	20,00	6,00	26,00	36,00	-	0,300	0,167	
	12	33,00	13,00	47,00	40,00	22,00	0,394	0,325	
	STABW		5,19	2,15	7,26	7,30	5,27	0,075	0,086
	Mittelwert		21,90	7,60	29,80	30,40	11,80	0,352	0,262
p(nasal)	1	27,00	15,00	44,00	42,00	18,00	0,556	0,357	
	3	19,00	11,00	31,00	24,00	7,00	0,579	0,458	
	4	19,00	12,00	31,00	35,00	-	0,632	0,343	
	5	21,00	12,00	34,00	37,00	16,00	0,571	0,324	
	6	17,00	9,00	26,00	26,00	-	0,529	0,346	
	8	15,00	12,00	28,00	44,00	-	0,800	0,273	
	9	23,00	16,00	40,00	33,00	9,00	0,696	0,485	
	10	22,00	18,00	41,00	42,00	15,00	0,818	0,429	
	11	22,00	13,00	35,00	37,00	-	0,591	0,351	
	12	19,00	11,00	30,00	37,00	15,00	0,579	0,297	
	STABW		3,20	2,55	5,66	6,26	3,94	0,097	0,066
	Mittelwert		20,40	12,90	34,00	35,70	13,33	0,635	0,366

Erklärung der **Abkürzungen:**

OGC: orthotope Ganglienzellen
 DAC: displatzierte Amakrinzellen
 HC: Horizontalzellen

Tabelle 19: **Basisdaten AP13li**

Erklärung der Abkürzungen :
OGC: orthotope Ganglienzellen
DAC: displatzierte Amakrinzellen
HC: Horizontalzellen

Ap 13 li		retinale Länge: 9000µm							
		Absolut				Verhältnis			
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC	
p(temp.)	2	14,00	9,00	23,00	24,00	14,00	0,643	0,375	
	4	17,00	8,00	25,00	31,00	14,00	0,471	0,258	
	5	18,00	8,00	26,00	39,00	17,00	0,444	0,205	
STABW		1,70	0,47	1,25	6,13	1,41	0,088	0,071	
Mittelwert		16,33	8,33	24,67	31,33	15,00	0,519	0,279	
i(temp.)	2	17,00	6,00	23,00	16,00	18,00	2,833	0,375	
	4	15,00	6,00	21,00	28,00	9,00	2,500	0,214	
	5	15,00	7,00	22,00	36,00	14,00	2,143	0,194	
STABW		0,94	0,47	0,82	8,22	3,68	0,282	0,081	
Mittelwert		15,67	6,33	22,00	26,67	13,67	2,492	0,261	
zentral	1	21,00	11,00	32,00	20,00	-	0,524	0,550	
	2	21,00	7,00	28,00	28,00	10,00	0,333	0,250	
	4	16,00	6,00	22,00	14,00	11,00	0,375	0,429	
	5	19,00	4,00	23,00	19,00	11,00	0,211	0,211	
STABW		2,05	2,55	4,02	5,02	0,47	0,112	0,137	
Mittelwert		19,25	7,00	26,25	20,25	10,67	0,361	0,360	
i(nasal)	1	34,00	7,00	41,00	37,00	24,00	0,206	0,189	
	2	35,00	10,00	45,00	34,00	-	0,286	0,294	
	4	31,00	9,00	40,00	32,00	17,00	0,290	0,281	
	5	20,00	6,00	26,00	34,00	-	0,300	0,176	
STABW		5,96	1,58	7,18	1,79	3,50	0,038	0,053	
Mittelwert		30,00	8,00	38,00	34,25	20,50	0,270	0,235	
p(nasal)	1	26,00	12,00	38,00	44,00	28,00	0,462	0,273	
	2	19,00	14,00	33,00	34,00	15,00	0,737	0,412	
	4	24,00	12,00	36,00	35,00	18,00	0,500	0,343	
	5	24,00	15,00	39,00	48,00	21,00	0,625	0,313	
STABW		2,59	1,30	2,29	5,93	4,82	0,108	0,051	
Mittelwert		23,25	13,25	36,50	40,25	20,50	0,581	0,335	

Tabelle 20: **Basisdaten AP14li**

Erklärung der Abkürzungen : OGC: orthotope Ganglienzellen DAC: displatzierte Amakrinzellen HC: Horizontalzellen

Ap 14 li		retinale Länge 3000µm						
		Absolut			Verhältnis			
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC
p (temporal)	1	25,00	12,00	40,00	42,00	11,00	0,480	0,286
	8	26,00	10,00	36,00	24,00	16,00	0,385	0,417
	9	30,00	19,00	50,00	53,00	24,00	0,633	0,358
	10	27,00	17,00	44,00	42,00	27,00	0,630	0,405
	11	31,00	18,00	70,00	67,00	25,00	0,581	0,269
	12	32,00	13,00	45,00	45,00	17,00	0,406	0,289
	13	34,00	16,00	50,00	39,00	22,00	0,471	0,410
STABW		3,10	3,12	10,18	12,20	5,34	0,095	0,060
Mittelwert		29,29	15,00	47,86	44,57	20,29	0,512	0,348
i (temporal)	8	25,00	12,00	37,00	39,00	18,00	0,480	0,308
	9	22,00	12,00	35,00	46,00	24,00	0,545	0,261
	10	27,00	14,00	42,00	38,00	-	0,519	0,368
	11	31,00	14,00	45,00	46,00	29,00	0,452	0,304
	12	23,00	6,00	29,00	27,00	13,00	0,261	0,222
	13	26,00	12,00	38,00	35,00	18,00	0,462	0,343
	STABW		2,92	2,69	5,09	6,55	5,54	0,092
Mittelwert		25,67	11,67	37,67	38,50	20,40	0,453	0,301
zentral	1	44,00	10,00	61,00	29,00	19,00	0,227	0,345
	8	42,00	14,00	57,00	42,00	18,00	0,333	0,333
	9	48,00	24,00	72,00	53,00	27,00	0,500	0,453
	10	55,00	16,00	71,00	39,00	22,00	0,291	0,410
	11	63,00	31,00	97,00	52,00	41,00	0,492	0,596
	12	42,00	13,00	55,00	43,00	26,00	0,310	0,302
	13	46,00	16,00	62,00	49,00	28,00	0,348	0,327
STABW		7,21	6,73	13,31	7,79	7,16	0,095	0,095
Mittelwert		48,57	17,71	67,86	43,86	25,86	0,357	0,395

Ap 14 li		<u>retinale Länge 3000µm</u>							
		Absolut					Verhältnis		
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC	
i (nasal)	1	46,00	12,00	59,00	41,00	21,00	0,261	0,293	
	8	31,00	17,00	50,00	40,00	26,00	0,548	0,425	
	9	40,00	16,00	62,00	43,00	27,00	0,400	0,372	
	10	46,00	16,00	65,00	47,00	34,00	0,348	0,340	
	11	55,00	20,00	77,00	43,00	27,00	0,364	0,465	
	12	48,00	19,00	67,00	42,00	-	0,396	0,452	
	13	53,00	13,00	67,00	39,00	15,00	0,245	0,333	
STABW		7,50	2,70	7,68	2,42	5,86	0,094	0,061	
Mittelwert		45,57	16,14	63,86	42,14	25,00	0,366	0,383	
p (nasal)	1	41,00	18,00	61,00	48,00	22,00	0,439	0,375	
	10	52,00	18,00	70,00	67,00	25,00	0,346	0,269	
	11	39,00	21,00	62,00	72,00	27,00	0,538	0,292	
	12	43,00	17,00	60,00	69,00	27,00	0,395	0,246	
	13	47,00	18,00	65,00	64,00	-	0,383	0,281	
	STABW		4,63	1,36	3,61	8,41	2,05	0,066	0,044
	Mittelwert		44,40	18,40	63,60	64,00	25,25	0,420	0,293

Tabelle 21: Basisdaten AP15re

Erklärung der **Abkürzungen**:
 OGC: orthotope Ganglienzellen
 DAC: displatzierte Amakrinzellen
 HC: Horizontalzellen

Ap 15 re		<u>retinale Länge 3000µm</u>						
		Absolut			Verhältnis			
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC
p(temp.)	9	29,00	17,00	48,00	34,00	21,00	0,586	0,500
	10	23,00	14,00	37,00	52,00	18,00	0,609	0,269
	11	25,00	14,00	39,00	40,00	13,00	0,560	0,350
	12	29,00	17,00	47,00	56,00	22,00	0,586	0,304
Standardab.		2,60	1,50	4,82	8,87	3,50	0,017	0,088
Mittelwert		26,50	15,50	42,75	45,50	18,50	0,585	0,356
i(temp.)	8	54,00	25,00	79,00	54,00	-	0,463	0,463
	9	44,00	29,00	74,00	67,00	26,00	0,659	0,433
	10	37,00	28,00	65,00	49,00	25,00	0,757	0,571
	11	43,00	21,00	64,00	48,00	21,00	0,488	0,438
Standardab.		6,10	3,11	6,26	7,57	2,16	0,121	0,056
Mittelwert		44,50	25,75	70,50	54,50	24,00	0,592	0,476
zentral	3	28,00	12,00	40,00	50,00	18,00	0,429	0,240
	4	22,00	10,00	32,00	39,00	19,00	0,455	0,256
	5	38,00	17,00	58,00	47,00	21,00	0,447	0,362
	6	37,00	25,00	62,00	56,00	37,00	0,676	0,446
	7	34,00	18,00	52,00	50,00	26,00	0,529	0,360
	8	35,00	21,00	63,00	48,00	32,00	0,600	0,438
	9	42,00	24,00	70,00	57,00	33,00	0,571	0,421
	10	33,00	23,00	57,00	45,00	19,00	0,697	0,511
	11	32,00	18,00	50,00	52,00	21,00	0,563	0,346
Standardab.		5,50	4,90	11,18	5,21	6,76	0,09	0,08
Mittelwert		33,44	18,67	53,78	49,33	25,11	0,55	0,38

Ap 15 re		<u>retinale Länge 3000µm</u>							
		Absolut			Verhältnis				
	Schnitt	OGC	DAC	gesamt	OAC	HC	DAC/OGC	DAC/OAC	
i(nasal)	2	69,00	29,00	101,00	93,00	56,00	0,420	0,312	
	3	75,00	26,00	102,00	83,00	39,00	0,347	0,313	
	4	54,00	19,00	73,00	44,00	23,00	0,352	0,432	
	5	62,00	23,00	85,00	42,00	32,00	0,371	0,548	
	6	58,00	30,00	88,00	-	39,00	0,517	#WERT!	
	7	70,00	18,00	89,00	82,00	42,00	0,257	0,220	
	8	70,00	42,00	113,00	74,00	49,00	0,600	0,568	
	9	53,00	33,00	88,00	82,00	41,00	0,623	0,402	
	10	45,00	36,00	83,00	53,00	35,00	0,800	0,679	
	11	47,00	14,00	61,00	48,00	22,00	0,298	0,292	
	Standardab.		9,96	8,28	14,06	18,68	9,99	0,163	0,144
Mittelwert		60,30	27,00	88,30	66,78	37,80	0,458	0,418	
p(nasal)	2	48,00	24,00	74,00	-	-	0,500	#WERT!	
	3	56,00	22,00	78,00	80,00	44,00	0,393	0,275	
	4	44,00	16,00	60,00	70,00	35,00	0,364	0,229	
	5	50,00	29,00	79,00	-	-	0,580	#WERT!	
	6	78,00	43,00	121,00	-	-	0,551	#WERT!	
	8	42,00	38,00	83,00	82,00	40,00	0,905	0,463	
	9	49,00	34,00	85,00	76,00	41,00	0,694	0,447	
	10	30,00	17,00	47,00	-	34,00	0,567	#WERT!	
	11	47,00	29,00	76,00	90,00	45,00	0,617	0,322	
	Standardab.		12,16	8,69	18,94	6,62	4,14	0,152	0,093
	Mittelwert		49,33	28,00	78,11	79,60	39,83	0,574	0,347

7. Literaturverzeichnis

- Abercombie, M. (1946)
Estimation of nuclear population from microtome sections
Anat. Rec., 94, 239-247
- Ball, A.K., Dickson, D.H. (1983)
Displaced amacrine and ganglion cells in the new retina
Exp. Eye res., 36, 199-213
- Barnstaple, C.J., Hofstein, R., Akagawa, K. (1985)
A marker of early amacrine cell development in rat retina
Brain Res., 352, 286-290
- Biehlmaier, O., Neuhauss, S.C., Kohler, K. (2001)
Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina
Cell Tissue Res., 306, 199-207
- Collin, S.P., Pettigrew, J.D. (1988)
Retinal Topographie in Reef Teleosts
Brain Behav, Evol., 31, 283-295
- Collin, S.P., Pettigrew, J.D. (1988)
Retinal ganglion cell topography in teleost: a comparison between NISSL-stained material and retrograd labelling from the optic nerve
J. Comp. Neurol., 276, 412-422
- Collin, S.P. (1998)
Anterograde labelling from the optic nerve reveals multiple central targets in the teleost, *Lethrinus chrysostomus* (Perciformes)
Cell Tissue Res., 256, 327-335
- Cuenca, N., Deng, P., Linberg, K.A., Lewis, G.P., Fisher, S.K., Kolb, H. (2002)
The neurons of the ground squirrel retina as revealed by immunostains for calcium binding proteins and neurotransmitters
J. Neurocytol., 31, 649-666
- Dmitrieva, N.A., Lindstrom, J.M., Keyser, K.T. (2001)
The relationship between GABA-containing cells and the cholinergic circuitry in the rabbit retina.
Vis. Neurosci., 18, 93-100
- Easter, S.S. (1992)
Retinal growth in foveated teleosts – Nasotemporal Asymmetry Keeps the Fovea in Temporal Retina
J. Neurosci., 12, 2381-2392

- Easter, S.S.J., Stuermer, C.A., (1984)
An evaluation of the hypothesis of shifting terminals in goldfish optic tectum
J. Neurosci., 4, 1052-1063
- Euler, T., Detwiler, P.W., Denk, W. (2002)
Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells
Nature, 418, 845-852
- Famiglietti, E.V. (1987)
Starburst amacrine cells in cat retina are associated with bistratified presumed directionally selective, ganglion cells
Brain Res., 413, 404- 408.
- Fernald, R.D. (1981)
Chromatic organization of a cichlid fish retina
Vision Research, 21, 1749-1753.
- Fernald, R.D. (1982)
Retinal projections in the african cichlid fish, *Haplochromis burtoni*
J of Comp. Neurology, 206, 379-389
- Fernald, R.D. (1984)
Vision and behaviour in an african cichlid fish
Am. Sci., 72, 58-65
- Fernald, R.D. (1985)
Growth of the teleost eye: novel solutions to complex constraints
Env. Biol. Fishes, 13, 113-123
- Fernald, R.D. (1989)
Retinal rod neurogenesis
New York, London: Plenum Press
- Fledelius, H., Christensen, A. (1996)
Reappraisal of the human ocular growth curve in fetal life, infancy and early childhood.
British Journal of Ophtalmology, 80, 918-921
- Fritzsche, B. (1993)
Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines
- Hamano, K., Kiyama, H., Emson, P.C., Manabe, R., Nakauchi, M., Tohyama, M. (1990)
Localization of two calcium binding proteins, clbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina
J. Comp. Neurol., 302, 417-424

- Hinds, J.W.; Hinds, P.L. (1983)
Development of retinal amacrine cells in the mouse embryo: evidence for two modes of formation
J. Neurol., 213, 1-23
- Hirt, B. (1998)
Die Rolle von Dopamin bei der retinalen Regulation des Augenwachstums bei Fischen
Med. Dissertation, Universität Tübingen
- Hitchcock, P.F. (1987)
Constant dendritic coverage by ganglion cells with growth of the goldfish's retina
Vision Res., 27, 17-22
- Hitchcock, P.F. (1993)
Mature, growing ganglion cells acquire new synapses in the retina of goldfish
Vis. Neurosci., 10, 17-22
- Hoke, K.L., Fernald, R.D. (1998)
Cell death precedes rod neurogenesis in embryonic teleost retinal development
Dev. Brain Res., 111, 143-146
- Johns, P.R., Easter S.S. (1977)
Growth of the adult goldfish eye: II. Increase in the retinal cell number
J. Comp. Neurol., 176, 331-342
- Johns, P.R., Fernald, R.D. (1981)
Genesis of rods in teleost fish retina
Nature, 293, 141-142
- Kock, J.H., Stell, W.K. (1985)
Formation of new rod photoreceptor synapses onto differentiated bipolar cells in goldfish retina
Anat. Rec., 211, 69-74
- Köbber, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J.L., Mey, J., Thanos, S. (2000)
Current concepts in neuroanatomical tracing
Progress in Neurobiology, 62, 327-351
- Kwan, J.W., Lee, M.J., Mack, A.F., Chiu, J.F., Fernald, R.D. (1996)
Nonuniform distribution of cell proliferation in the adult teleost retina
Brain Research, 712, 40-44

- Layer, P.G., Vollmer, G. (1982)
 Lucifer yellow stains displaced amacrine cells of the chicken retina during embryonic development
 Neurosci. Lett., 31, 99-104
- Lia, B., Williams, R.W., Chalupa, L.M. (1987)
 Formation of retinal ganglion cell topography during prenatal development
 Science, 236, 848-851
- Llewellyn-Smith, I.J., Pilowsky, P., Minson Jane B. (1990)
 Retrograde Tracers for light and electron microscopy
 J. Comp. Neurol., 294, 179
- Lyall, A.H. (1957)
 The Growth of the Trout Retina
 Q. J. Micros. Sci., 98, 101-110
- Mack, A.F., Fernald, R.D. (1995)
 New rods move before differentiating in adult teleost retina
 Dev. Biol., 170, 136-141
- Mack, A.F., Germer, A., Janke, C., Reichenbach, A. (1998)
 Müller (glial) cells in the teleost retina: consequences of continuous growth
 Glia., 42, 306-313
- Marc, R.E., Li, H.-B., Kalloniatis, M., Arnold, J. (1993)
 Cholinergic subsets of GABAergic amacrine cells in the goldfish retina
 IOVS, 34, 1061
- Maxwell, D.J., Koerber, H.R., Bannatyne, B.A. (1985)
 Intrazellular staining in vivo
 Neurosci., 16, 375
- Mednick, A.S., Springe, A.D. (1988)
 Asymmetric distribution of retinal ganglion cells in goldfish
 J. Comp. Neurol., 268, 49-59
- Mosinger, J.L., Yazulla, S., Studholme, K. (1986)
 Gaba-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison
 Exp. Eye. Res., 42, 631-644
- Müller, H. (1952)
 Bau und Wachstum der Netzhaut des Guppy (Lebistes reticulatus)
 Zool. Jb., 63, 275-324

- Nierenberg, S., Meister, M. (1997)
 The light response of retinal ganglion cells is truncated by a displaced amacrine circuit
Neuron., 18, 637-650
- Osborne, N.N., Patel, S., Beaton, D.W., Neuhoff, V. (1986)
 GABA neurones in retinas of different species and their postnatal development in situ and in culture in the rabbit retina
Cell tissue Res., 243, 117-123
- Perry, V.H. (1979)
 The ganglion cell layer of the retina of the rat: a GOLGI study
Soc. Lond. B. Biol. Sci., 204, 363-375
- Perry, V.H., Walker, M. (1980)
 Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of a rat
Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 208, 415-431
- Peterson, E.H., Ulinski, P.S. (1979)
 Quantitative studies of retinal ganglion cells in a turtle, *Pseudemys scripta elegans*. Number and distribution of ganglion cells
J. Comp. Neurol., 186, 17-42
- Schmidt, R.F., Thews, G., Lang, F. (2000)
 Physiologie des Menschen
 Springer
 Berlin, Heidelberg, New York
- Sengelau, D.R., Dolan, R.P., Finlay, B.L. (1986)
 Cell generation, death and retinal growth in the development of the hamster retinal ganglion cell layer
J. Comp. Neurol., 246, 527-543
- Sun, X.J., Tolbert, L.P., Hildebrand, J.G. & Meinertzhagen, I.A. (1998)
 A rapid method for combined laser scanning confocal microscopic and electron microscopic visualization of biocytin or neurobiotin-labeled neurons
Journal of histochemistry and cytochemistry
- Trepel, M. (1999)
 Neuroanatomie, Struktur und Funktion
 Urban und Fischer
 München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Wagner, H.J., Wagner, E. (1988)
 Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): a Golgi study on differentiation and layering
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 321, 263-324

- Wagner, H.J., Wulle, I., Meerfeld, N., Wewetzer, K. (1991)
 Characterization of a GABAergic population of interstitial amacrine cells in the teleost retina
Vis. Res., 31, 1489-1500
- Wässle, H., Chun, M.H., Müller F. (1987)
 Amacrine cells in the ganglion cell layer of the cat retina
J. Comp. Neurol., 265, 391-408
- Weruga, E., Velasco, A., Brinon, J.G., Arevalo, R., Alonso, J.R. (2000)
 Distribution of the calcium binding proteins parvalbumin, calbindin D-28k and calretinin in the retina of two teleosts
J. Chem. Neuroanat., 19, 1-15
- Yazulla, S., Studholme, K., Wu, J.Y. (1986)
 Comparative distribution of 3H-GABA uptake and GAD immunoreactivity in goldfish retinal amacrine cells: a double-label analysis
J. Comp. Neurol., 244, 149-162
- Yazulla, S., Studholme, K. (1990)
 Multiple subtypes of glycine-immunoreactive neurons in the goldfish retina: single-label studies
Vis. Neurosci., 4, 299-309
- Zhan, X.J., Troy, J. B. (1997)
 An efficient method that reveals both the dendrites and the soma mosaics of retinal ganglion cells
J. Neurosci., 72, 109-116
- Zhou, Z.J. (1998)
 Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina
J. Neurosci., 18, 4155-4165
- Zygar, C.A., Lee, M.J., Fernald, R.D. (1999)
 Nasotemporal asymmetry during teleost retinal growth: preserving an area of specialization
J. Neurobiol., 41, 435-442

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erst - Antikörper/ Schnitte.....	22
Tabelle 2: Zweit-Antikörper/ Schnitte.....	23
Tabelle 3: Erst-Antikörper/ Wholemounds.....	24
Tabelle 4: Zweit-Antikörper/ Wholemounds.....	24
Tabelle 5: Farbstoffe zur Kerngegenfärbung.....	25
Tabelle 6: Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe	28
Tabelle 7: Durchschnittlicher Zelldurchmesser.....	34
Tabelle 8: Verteilung der DAC.....	50
Tabelle 9: Verhältnis DGC /OGC.....	53
Tabelle 10: Verteilung DAC und OGC in Wholemounds	59
Tabelle 11: Basisdaten AP1li.....	89
Tabelle 12: Fortsetzung: Basisdaten Ap1li	92
Tabelle 13: Basisdaten Ap3re	96
Tabelle 14: Basisdaten Ap7re	101
Tabelle 15: Basisdaten Ap14re	108
Tabelle 16: Basisdaten AP10re	112
Tabelle 17: Basisdaten AP11li.....	113
Tabelle 18: Basisdaten AP12re	115
Tabelle 19: Basisdaten AP13li.....	117
Tabelle 20: Basisdaten AP14li.....	118
Tabelle 21: Basisdaten AP15re	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Netzhaut.....	10
Abbildung 2: Wachstum der Fischnetzhaut	12
Abbildung 3: Aufbau und Strahlengang eines Laser Scan Mikroskops	26
Abbildung 4: Auswertung und Auszählung von Schnitten	30
Abbildung 5: orthotope Ganglienzellen.....	37
Abbildung 6: Rekonstruktion mehrere OGC	38
Abbildung 7: Verteilung der OGC: rechtes Auge (Ap3re).....	40
Abbildung 8: Verteilung der OGC: linkes Auge (Ap1li)	41
Abbildung 9: displazierte Ganglienzellen.....	43
Abbildung 10: Verteilung der DGC (Originalbild).....	45
Abbildung 11: Verteilung der DGC über die gesamte Netzhaut	46
Abbildung 12: Dichte der DGC	46
Abbildung 13: Parvalbumin positive Zellen im Schnitt.....	48
Abbildung 14: Verteilung der DAC (mittlerer und kleiner Fisch)	49
Abbildung 15: Verhältnis von DGC zu OGC.....	52
Abbildung 16: DAC und GC im wholemout (peripher und zentral)	54
Abbildung 17: DAC und GC im Schnitt (peripher und zentral).....	54
Abbildung 18: Wachstum der Fisch- Netzhaut	56
Abbildung 19: Verhältnis DAC/OGC bei verschiedenen Fischgrößen.....	57
Abbildung 20: Verhältnis DAC/OGC im wholemout.....	60
Abbildung 21: Innere Plexiforme Schicht im Schnitt.....	62
Abbildung 22: ChaT positive Zellen und Banden im Schnitt.....	63
Abbildung 23: Parvalbumin positive Zellen in der IPL	77

Danksagung

Herrn Professor Dr. H.- J. Wagner danke ich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur Nutzung der notwendigen Geräte und Räumlichkeiten, sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Andreas Mack für die gute Betreuung und Beratung, die Unterstützungen bei der Anfertigung und Auswertung von Daten am LSM, die schnelle Korrektur des Manuskriptes und die kritischen Anmerkungen.

Dr. Beppo Hirt danke ich für die Idee im anatomischen Institut zu promovieren, die anfängliche Betreuung dieser Arbeit und die Einarbeitung an den entsprechenden Geräten bzw. in die erforderlichen Präparationstechniken.

Den Mitarbeitern des anatomischen Instituts danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der Präparate.

Den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Biometrie danke ich für ihre hilfreichen Hinweise zur statistischen Aufarbeitung der erhobenen Daten.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinem Freund Richie für ihre Unterstützung, Motivation und Geduld, sowie das vielfache Korrekturlesen bedanken.

Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

- Andreas F. Mack, Christl Süssmann, Bernhard Hirt & Hans-Joachim Wagner
“Displaced Amacrine Cells Disappear from the Ganglion Cell Layer in the Central Retina of Adult Fish during Growth”
Investigative Ophthalmology and Visual Science, 45, 3749-3755
- Poster- Präsentation beim
“Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology”
Mai/2004 in Fort Lauderdale/ Florida, USA

Lebenslauf

Persönliche Daten:

- Geburtsdatum: 14.03.1978
- Geburtsort: Wangen im Allgäu
- Familienstand: ledig
- Eltern: Dr. med. Hans-Eckhardt Süssmann, Arzt
Dr. med. Gabriele Süssmann, Ärztin

Schulbildung:

- 1984- 1988 Grund- und Hauptschule Fischbach
- 1988- 1997 Graf-Zeppelin-Gymnasium Friedrichshafen
- 1997 Abitur, Note 1,9

Studium:

- 01/ 1999 Immatrikulation an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 10/ 1999 Immatrikulation an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 08/ 2000 Ärztliche Vorprüfung, Note 2,0
- 08/ 2002 1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0
- 08/ 2003 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,66
- 04.05.2005 3.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, 2,0

Berufstätigkeit:

- 08/ 05- 09/06 Assistenzärztin, Kantonsspital Baden (Schweiz)
Interdisziplinäres Notfallzentrum
- 10/06- 03/07 Assistenzärztin, Kantonsspital Baden (Schweiz)
Orthopädie und Traumatologie
- ab 06/2007 Assistenzärztin, Kantonsspital Münsterlingen
Anästhesie, Intensiv- und Notfallmedizin

