

Das Gehirn der Europäischen Sardelle (*Engraulis encrasicolus*): 3D-Anatomie, Histologie und Aspekte der Larvalentwicklung

Dissertation

der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Marc Tassilo Dominik Sieber

München, Juni 2018



1. Gutachter: PD Dr. Martin Heß

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Melzer

Tag der Abgabe: 07.06.2018

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Evolution, Embryonalentwicklung und Aufbau des Gehirns bei den Craniota.....	3
1.2 Unterschiede des Gehirnaufbaus verschiedener Vertebratenklassen.....	5
1.3 Das Sehsystem der Sardelle.....	9
1.4 Stand der Forschung.....	13
1.5 Fragestellungen.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Materialbeschaffung.....	17
2.2 Präparation und Einbettung des Sardellengehirns (adult).....	19
2.3 Präparation und Einbettung junger Entwicklungsstadien von Sardellen.....	21
2.4 Schneiden und Färben.....	22
2.5 Bildbearbeitung und Datenerfassung.....	22
2.5.1 Aufnahme der Bilder.....	22
2.5.2 Bearbeitung der Bilder.....	23
2.5.3 Erstellung von Bilderstapeln für 3D-Rekonstruktionen.....	25
2.5.4 3D-Rekonstruktion.....	25
2.5.5 Parametererfassung unter Amira®.....	26
2.5.6 MikroCT-Aufnahmen.....	27
2.6 Fluoreszenzlaufexperimente.....	34
2.6.1 Vorexperimente: Die Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe und deren Konfiguration.....	34
2.6.2 Ansatz Fluoreszenzlaufexperimente.....	35
2.6.3 Anfertigung von Vibratomschnitten und Bildaufnahme.....	37
2.7 Manuelle Verfolgung der Sehnerven unter Amira.....	40
2.8 Abbildungstafelerstellung mit Photoshop.....	40
2.8.1 Atlastafeln.....	40
2.8.2 Sonstige Abbildungen.....	41
3 Ergebnisse.....	42
3.1 Das Gehirn der adulten Sardelle.....	42
3.1.1 Telencephalon, olfaktorischer Nerv und Bulbus olfactorius.....	42
3.1.2 Linker- und rechter optischer Nerv.....	43
3.1.3 Diencephalon.....	43
3.1.4 Mesencephalon.....	48
3.1.5 Metencephalon.....	49
3.1.6 Myelencephalon und Übergang ins Rückenmark.....	51
3.1.7 Ventrikuläres System.....	51
3.1.8 μ CT-Aufnahmen.....	92
3.2 Die Gehirne der Entwicklungsstadien.....	94
3.2.1 Histologie.....	94
3.2.2 3D-Mikroanatomie und Volumetrie.....	110
3.3.1 Fluoreszenzlaufexperimente.....	118
3.3.2 3D-Rekonstruktion der Ganglienzellaxone des linken- und rechten optischen Nerven.....	120
3.3.3 3D-Rekonstruktion der Ganglienzellaxone bei 10- bzw. 60-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung.....	125
4 Diskussion.....	127
4.1 Histologie, Atlas und 3D-Model des adulten Sardellengehirns.....	127
4.1.1. Neue Datenlage und Erklärungspotential.....	127
4.1.2 Fischgehirn mit spezifischen Adaptationen.....	128
4.1.3 Unerwartete Kommissur.....	128
4.1.4 Verfügbarkeit digitaler 3D Strukturdaten.....	129

4.1.5 Gehirnatlanten.....	130
4.1.6 Tomographische Bildgebung.....	134
4.2 Larvenstadien.....	136
4.2.1 Neue Datenlage.....	136
4.2.2 Wachstum und Differenzierung, kritische Betrachtung.....	136
4.2.3 Chiasma opticum.....	139
4.2.4 Die Histologie der Larvengehirne im Vergleich.....	139
4.3 Retinale Projektionen.....	141
4.3.1 Neurotracing mit lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen.....	141
4.3.2 3D-Rekonstruktion der Ganglienzellaxone.....	144
4.4 Ausblick.....	149
5. Literaturverzeichnis.....	152
6 Anhang.....	160
iAtlas.pdf.....	161
Poster und Vorträge.....	163
Danksagung.....	164
Eidesstattliche Versicherung.....	166

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, eine vollständige und lückenlose Semidünnschnittserie des Gehirns einer adulten Europäischen Sardelle (*Engraulis encrasicolus* Linnaeus, 1758) anzufertigen (Schnittdicke 1,5 µm, 8487 Einzelschnitte). Darauf basierend wurde ein digitaler 3D-Bildstapel in lichtmikroskopischer Auflösung erstellt und wesentliche Hirnregionen, sowie Kerne und Nervenbahnen identifiziert, markiert und deren Lage innerhalb des Gehirns beschrieben. Darüber hinaus wurde ein interaktiv manipulierbares 3D-Oberflächenmodell und ein Gehirnatlas mit 18 ausgewählten Querschnitten angefertigt.

Ein weiteres adultes Sardellengehirn wurde per µCT aufgenommen und ein vollständiger dreidimensionaler Datensatz bei vergleichsweise geringem Zeitaufwand erstellt. Bei dieser Methode ist die Schnittebene frei wählbar und mehrfach parallel darstellbar, sobald der Stapel erstellt ist. Jedoch lassen sich kleinere Strukturen oft nicht unterscheiden, da Auflösung und Kontrast im Gegensatz zur konventioneller Histologie deutlich geringer sind.

Die Untersuchungen des Sardellengehirns haben ergeben, dass der Bauplan prinzipiell dem zu erwartenden Grundaufbau des Gehirns bei Fischen entspricht, mit Ausnahme einer bislang bei Knochenfischen noch nicht beschriebenen Kommissur, welche die posterioren pretektalen Nuklei beider Gehirnhälften miteinander verbindet. Ob diese Kommissur bei der Verarbeitung visueller Informationen speziell in Bezug auf das Polarisationskontrastsehen eine Rolle spielt, kann rein morphologisch nicht belegt werden.

Neben dem optischen Tektum gelten spezielle Kerne innerhalb des Diencephalons für die visuellen Datenverarbeitung bei Fischen als relevant: Der parvozelluläre Nukleus des superfiziellen Prätektums (Psp), der magnozellanuläre Nukleus des superfiziellen Prätektums (Psm), der posteriore prätektale Nukleus (PO) und der Nukleus corticalis (NS). Alle Kerne wurden bei großer lichtmikroskopischer Auflösung aufgenommen und ihr histologischer Aufbau im Detail dokumentiert und beschrieben.

Des Weiteren wurden aus bereits vorliegenden Schnittserien junger Sardellenlarven unterschiedlichen Alters (5d, 10d, 20d, 31d, 36d und 45d) 3D-Modelle der Gehirne rekonstruiert, unter Amira® vermessen (Länge, Breite, Höhe und Volumen), gegenübergestellt und anhand ausgewählter histologischer Querschnitte soweit möglich miteinander verglichen. Bei der 5 Tage alten Larve lässt sich bereits eine Differenzierung des Gehirns in somadominierte Bereiche mit dicht gepackten Zellkernen und in Neuropile beobachten.

Zusammenfassung

Generell lässt sich feststellen, dass mit steigendem Alter die Anzahl der Zellen, die Größe des Gehirns und Gehirnkplexität zunimmt. Je älter eine Sardellenlarve, umso ähnlicher erscheint das Gehirn dem einer adulten Sardelle und es lassen sich zunehmend mehr Gehirnsstrukturen erkennen.

Die Untersuchung von Kreuzungsmustern der Sehnerven bei Sardellenlarven erbrachte, dass sowohl der linke oberhalb des rechten und umgekehrt der rechte oberhalb des linken Sehnerven kreuzt. Eine eindeutige bevorzugte Präferenz lässt sich aufgrund der geringen Stichprobenanzahl nicht feststellen.

Um die retinalen Projektionen über die Sehnerven ins Gehirn zu verfolgen, wurden die Sehnervenaxone über alignierte Bilderstapel der lückenlosen 3D-Strukturdaten mit histologischem Auflösungs-niveau verfolgt (bei 5 facher lichtmikroskopischer Auflösung) und die primären und sekundären Projektionsgebiete identifiziert. Hierbei wurden die Sehnerven über das Chiasma, das Diencephalon bis hin in das optischen Tektum, Teil des dorsalen Mesencephalons, verfolgt. Mit Amira® wurde eine 3D-Rekonstruktion des Verlaufs der Sehnerven erstellt, beschrieben und dargestellt.

Auf beiden Seiten des Gehirns werden die parvozellulären Nuklei des superfiziellen Prätektums (Psp) von den Ganglienzellaxonen umschlossen. Die magnozellularen Nuklei des superfiziellen Prätektums (Psm) und die posterioren prätektalen Nuklei (PO) sind nur anterolateral von Axonfasern umgeben. Die contralateralen Sehnervaxone stehen nachweislich mit den Psp's, den Psm's und den PO's in Verbindung. Es grenzen auf beiden Seiten die Nuklei corticales (NS) dorsomedial an. Diese diffusen Gehirnkern werden allerdings nur von einigen Axonen durchzogen. Nur basierend auf den histologischen Querschnitten kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die Ganglienzellaxone an den Kernen vorbeiziehen oder dort enden.

Weitere Rekonstruktionen bei zunehmender Vergrößerung erbrachten weitere Details. Es ließ sich bei 10 facher Vergrößerung sogar eine scheinbar ipsilateral verlaufende Nervenbahn erkennen. Darüber hinaus ist es möglich bei 60 facher Vergrößerung einzelne Nervenfasern zu verfolgen. Die manuelle Verfolgung von Nervenbahnen bzw. Fasern ist somit durchaus eine bedingte Alternative zum herkömmlichen Neurotracing mit lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen. Eigene Versuche dazu erbrachten keine durchschlagenden Ergebnisse.

1 Einleitung

1.1 Evolution, Embryonalentwicklung und Aufbau des Gehirns bei den Craniota

Innerhalb der Craniota ähneln sich Aufbau und Gliederung des zentralen Nervensystems auffallend stark, wobei in den verschiedenen Gruppen Variationen in den Proportionen und in der Komplexität der einzelnen Hirnabschnitte zu Tage treten. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die unterschiedlichen Konstruktionen durch die Transformation eines ursprünglichen Grundbauplans entstanden sind und gleichermaßen die Verwandtschaftsverhältnisse wie die neuroethologischen Anforderungen an den Organismus widerspiegeln. Die Diversität der Nervensystembaupläne ist somit eine Folge der Variation ein und desselben gemeinsamen, genetischen Grundplanes (Butler, 2000; O'Connell, 2013).

Die Gehirne der Craniota können aufgefasst werden als eine Erweiterungen eines Hirnbläschens, welches dem bei *Branchiostoma* ähnlich ist, jedoch neue Ebenen der neuronalen Organisation aufweisen und somit die Grundlage für evolutionäre Fortschritte bilden. Als einfachste Erklärung für den Ursprung des Craniotagehirns gilt die Verdoppelung mehrerer Homeobox-Gene und die daraus resultierende Fähigkeit komplexere Gewebs-Gewebs-Interaktionen zu ermöglichen (Hildebrand & Goslow, 2004).

Die Embryonalentwicklung des Gehirns verläuft bei allen Vertebraten annähernd gleich (O'Connell, 2013): Unmittelbar nach der Neurulation bilden sich drei durch Einschnürungen gegeneinander abgegrenzte Gehirnbläschen am anterioren Pol der Neuralleiste. Aus ihnen entsteht letztlich das gesamte adulte Gehirn.

Die primären Gehirnbläschen, von anterior nach posterior benannt, sind das Pros- (Vorderhirn), Mes- (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Hinterhirn). In einem weiteren Stadium der Entwicklung kommt es zu zwei zusätzlichen Einschnürungen, die das Gehirn in fünf sekundäre Gehirnbläschen unterteilen. Das Prosencephalon bildet ein anteriores Telencephalon und ein dahinter liegendes Diencephalon. Das Cerebrum ist das adulte Derivat des Telencephalons. Im Laufe der Evolution wird diese Hirnregion immer weiter vergrößert, bis es schließlich bei Säugetieren den größten Teil des Gehirns bildet und die meisten Kontrollfunktionen dominiert. Das Mesencephalon bleibt ungeteilt erhalten und bildet unter anderem die Lobi/Tecti optici (bzw. die Colliculi bei Säugern). Das Rhombencephalon untergliedert sich in ein vorne gelegenes Metencephalon, aus dem später auch das

1 Einleitung

adulte Cerebellum (Kleinhirn) und die Pons (Brücke) hervorgeht, und ein dahinter gelegenes, zur Wirbelsäule anschließendes Myelencephalon, im adulten Stadium auch Medulla oblongata genannt (Hildebrand & Goslow, 2004; Bear et al., 2007). In Abbildung 1 ist die Entwicklung des Gehirns bei Vertebraten dargestellt.

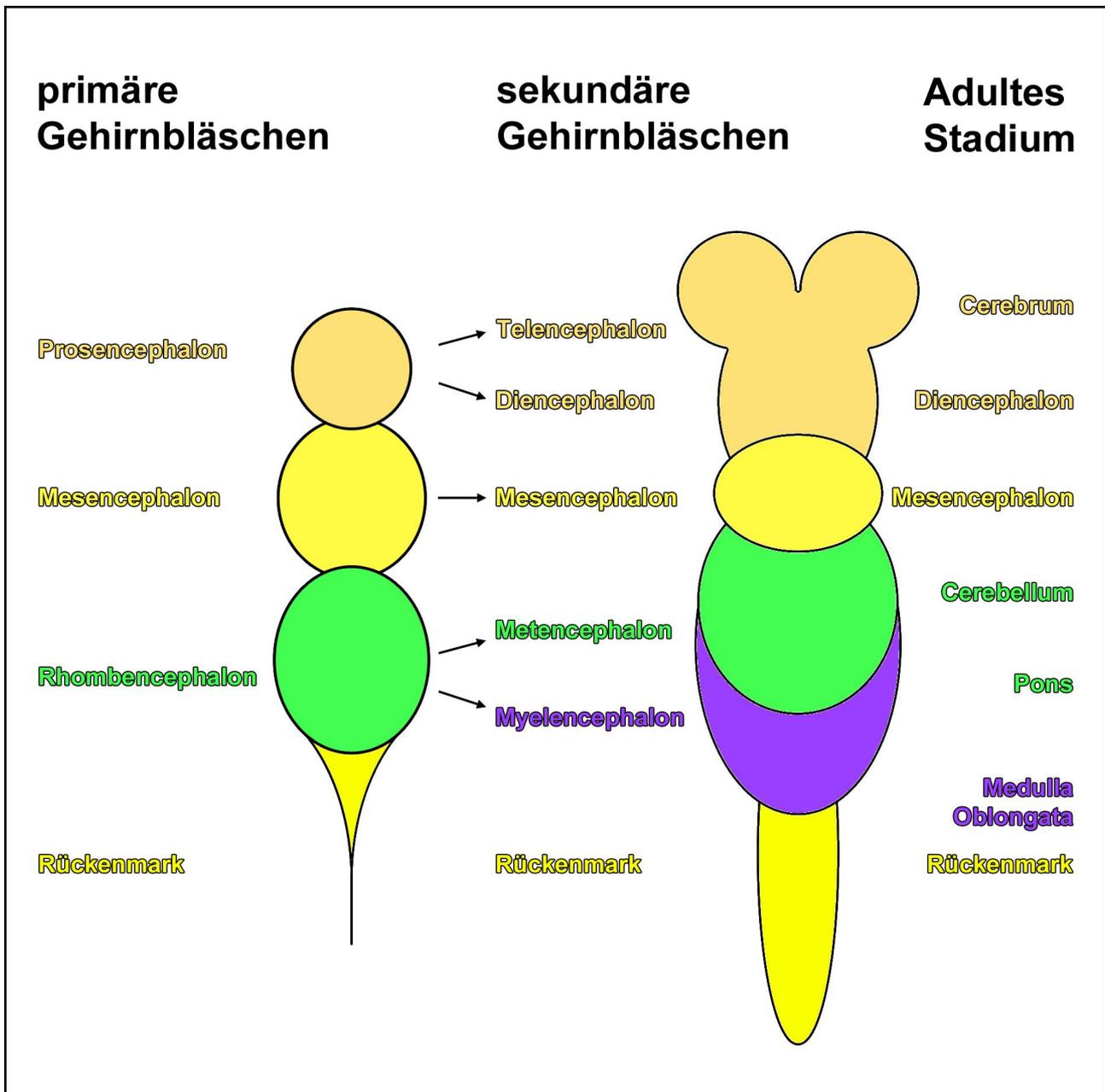


Abbildung 1: Embryonalentwicklung des Vertebratengehirns

Die primären Gehirnbläschen sind Pro-, Mes- und Rhombencephalon. Durch zwei zusätzliche Gehirneinschnürungen kommt es zur Entstehung der sekundären Gehirnbläschen. Das Prosencephalon unterteilt sich in Tel- und Diencephalon; das Rhombencephalon in ein Met- und Myelencephalon. Das Cerebrum ist das adulte Derivat des Telencephalons. Aus dem Metencephalon entsteht beim Adultstadium Cerebellum (Kleinhirn) und Pons (Brücke). Aus dem Myelencephalon geht die Medulla oblongata hervor. Oben anterior und unten posterior.

1.2 Unterschiede des Gehirnaufbaus verschiedener Vertebratenklassen

Zur Grundkonfiguration des Gehirns bei Wirbeltieren gehören (von anterior nach posterior) ein olfaktorischer Bulbus, paarige zerebrale Hemisphären, das Diencephalon, das paarige Tectum opticum, das unpaare Cerebellum und eine Medulla (Northcutt, 2002; Jarvis et al., 2005). Im Folgenden werden die Gehirne der unterschiedlichen Wirbeltierklassen kurz beschrieben und verglichen. Eine Übersicht darüber, wie sich die Gehirne der unterschiedlichen Wirbeltierklassen auf den ersten Blick unterscheiden, ist in Abbildung 2 dargestellt.

Cyclostomata Die Gehirnkongfiguration bei den Cyclostomata ist sehr ursprünglich, aber in mancherlei Hinsicht spezialisiert. Der anteriore Gehirnteil ist verkürzt und die großen Bulbi olfactorii sind von den dicken cerebralen Hemisphären getrennt. Bei Neunaugen sind die Lobi optici gut ausgebildet, bei blinden Schleimaalen funktionsbedingt eher klein. Die Medulla ist relativ groß und das Cerebellum ist bei diesen eher trägen Tieren nicht vorhanden bzw. rudimentär (Northcutt, 2002; Kuratani & Ota, 2008).

Elasmobranchia Die Knorpelfische weisen große und weit abgetrennte Bulbi olfactorii auf. Der Tractus olfactorius ist vorhanden, die cerebralen Hemisphären sind in der Mitte miteinander vereint und teilen sich einen gemeinsamen Ventrikel. Bei dieser Gruppe ist das Gehirn relativ groß. Das Verhältnis Gehirn- zu Körpermasse entspricht eher dem von Vögeln und Säugetieren, als dem von Knochenfischen (Northcutt, 2002). Ein Pinealorgan (Zirbeldrüse) ist Teil des Gehirns, jedoch ist kein Parietalorgan (Scheitelauge) vorhanden. Bei Tetrapoden fehlend und als charakteristische Strukturen für Fische im Allgemeinen gelten ein Hypothalamus mit seitlich anliegenden, paarigen Lobi inferiores und ein dünner Saccus vasculosus. Letzterem werden Aufgaben bei der Perzeption der Wassertiefe und damit in Verbindung stehendem Verhalten (wie z.B. tageszeitabhängige Tiefenwanderungen), sowie beim transzellulären Ionentransport zwischen Blut und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) zugesprochen. Die optischen Loben sind gut ausgebildet und umgeben den ausgedehnten Mittelhirnventrikel. Das Cerebellum ist groß, teils gefurcht (z.B. bei großen Haien wie dem Schaufelnasen-Hammerhai *Sphyrna tiburo* (Yopak et al., 2016) und enthält eine Ausdehnung des vierten Ventrikels. Es spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die Elektrorezeption.

1 Einleitung

Knochenfische Die Gehirne der Knochenfische sind äußerst divers (Hildebrand & Goslow, 2004). Bei Dipnoi ähnelt es dem der Knorpelfische. Der auffälligste Teil des Gehirns bei Knochenfischen sind die vorgewölbten Lobi optici (oft auch Tecti optici genannt). Die Sehnerven kreuzen im Chiasma opticum oder vermischen sich miteinander in unterschiedlichen Mustern (Mogi et al., 2009). Das Cerebellum ist meistens groß und glatt, ähnlich dem der Knorpelfische. Bei den Actinopterygiern bildet das Kleinhirn eine nach anterior, in den Ventrikel des Mittelhirns vorstoßende Auswölbung (Valvula) aus, welche die optischen Loben trennt.

Zudem fallen die Actinopterygier durch eine spezielle Vorderhirnarchitektur auf. Im Gegensatz zu allen anderen Vertebraten stülpen sich die cerebralen Hemisphären bei den Actinopterygiern nach außen (Northcutt, 2002). Der Cortex und der Corpus striatum sind dick und miteinander verschmolzen. Wie bei den Knorpelfischen sind Lobi inferiores und der Saccus vasculosus unter dem Diencephalon vorhanden. Auffällig sind ein die Medulla durchziehendes, einzelnes Paar riesiger Neuronen. Diese sogenannten Mauthner Zellen stehen in Verbindung mit dem „Ohr“ und dem Seitenliniensystem und vermitteln Fluchtreflexe zu den Schwimmmuskeln. Die Plexus chorioidei sind baumartig verzweigte Adergeflechte und sind bei dieser Gruppe in dünne flüssigkeitsgefüllte Säcke ausgestülpt. Sie bilden die CSF und übernehmen zudem lokal die Funktionen von „Nieren“ - d.h. Aufnahme von Stoffwechselabfallprodukten über CSF und Entsorgung über das Blut (Spector & Johanson, 1989).

Gegenüber allen anderen Teleostiern weist das Tektum der Clupeomorpha eine Besonderheit auf. Die tektalen Hemisphären bestehen aus jeweils zwei Loben, die durch einen flachen Sulcus von einander getrennt werden. Zudem lässt sich die an den tektalen Ventrikel anliegenden graue Zone des Tektums in drei separate, mediolaterale Bereiche untergliedern (Butler, 1992; Butler & Northcutt, 1993; Northcutt & Butler, 1993).

Amphibien Das Gehirn der Amphibien ist bemerkenswert unspezialisiert und ähnelt dem der Elasmobranchier und Dipnoi (Roth et al., 1993). Die cerebralen Hemisphären sind weiter voneinander getrennt und teilen sich nur einen kleinen gemeinsamen Ventrikel. Der Corpus striatum ist klein, die Pinealkörper sind bei Anuren gut ausgebildet, der dorsale Thalamus nimmt an Größe zu und die Vorläufer der Mamillarkörper im Hypothalamus sind vorhanden. Das Ausmaß der Lobi optici reicht von klein (z.B. bei Urodela) bis mittelgroß (z.B. bei Anura) und das Cerebellum ist rudimentär (Paulin, 1993).

Reptilien Das Gehirn der Reptilien ist schmal bis länglich, die Bulbi olfactorii sind kleiner als bei den Fischen und der Tractus olfactorius ist lang (Hildebrand & Goslow, 2004). Das Cerebrum ist groß und die oberflächlichen Teile des Cortex sind dünn, die graue Substanz liegt außen. In Bezug auf das Vorderhirn deutet die relative Größe und Lage des Cortex und Corpus striatum innerhalb der Reptilien darauf hin, dass es zwei Evolutionstendenzen gegeben hat. Linie eins (Anapsida) weist in Richtung Säugetiere und wird rezent von den Schildkröten repräsentiert und Linie zwei (Archosauria) geht in Richtung Vögel repräsentiert durch die Krokodile (Hildebrand & Goslow, 2004). Bei Echsen ist das Parietalorgan funktionsfähig, der dorsale Thalamus ist größer und komplexer im Vergleich zu den niederen Wirbeltierklassen und der ventrale Thalamus enthält bereits alle Kerne, die auch bei den Säugetieren vorkommen. Die Lobi optici sind sehr gut ausgebildet, das Mittelhirn schließt einen ausgedehnten Ventrikel ein und das Cerebellum ist glatt. Letzteres ist bei Schwimmern am größten und bei Schlangen eher rudimentär. Die Plexus chorioidei sind invertiert, d.h. sie liegen innerhalb der Ventrikel (Northcutt, 2002).

Vögel Das Gehirn von Vögeln ist relativ groß, kurz, breit und einheitlich gebaut (Hildebrand & Goslow, 2004). Die Bulbi- und der Tractus olfactorius sind im Allgemeinen kleiner als bei anderen Vertebraten, nur bei Aasfressern (und beim Kiwi) sind sie funktionsbezogen verstärkt ausgebildet (Corfield, 2009). Cerebrale Hemisphären sind sehr stark ausgebildet und die Teile des Cerebrums sind sehr divers und abhängig von den jeweiligen Spezialisierung (z.B. der feine Umgang mit dem Schnabel bei einem Papagei oder das Hören bei einer Eule). Die oberflächlichen Teile des Cortex sind sehr dünn und feste Areale übernehmen spezifische Funktionen. Der dorsale Thalamus ist sehr stark entwickelt. Nervi optici, Chiasma opticum und Tractus opticus sind bei dieser sehr stark optisch orientierten Gruppe in der Regel groß. Besonders groß sind die Lobi optici, die zudem eine Schichtung und eine einzigartig laterale Lage aufweisen (Jarvis et al., 2005). Das Cerebellum ist mit am größten im Vergleich zu anderen Vertebraten mit Ausnahme mancher Säugetiere.

Säugetiere Die Bulbi und der Tractus olfactorius sind bei Säugetieren sehr divers. Sie können riesig sein (z.B. beim Erdferkel) oder aber auch relativ klein (z.B. bei Primaten). Der Corpus striatum ist gut ausgebildet, aber kleiner als bei Reptilien und Vögeln. Das Hauptmerkmal dieser Klasse ist der riesige Neocortex (Hildebrand & Goslow, 2004). Dieser ist bei den meisten kleinen Säugetierarten eher glatt und bei den größeren zunehmend aufgewunden. Eine neue Kommissur, der sogenannte Corpus callosum, verbindet

1 Einleitung

beiden Hemisphären miteinander. Thalamus und Hypothalamus sind stark differenziert. Die Lobi optici heißen jetzt Colliculi superiores oder -anteriores. Nachdem der cerebrale Cortex einen Großteil ihrer Funktionen übernommen hat, weisen sie nur noch eine geringe Größe auf. Zusammen mit den Colliculi posteriores und -inferiores vervollständigen sie die Corpora quadrigemina des Mittelhirndaches. Der Ventrikel des Mittelhirns ist nur noch auf einen engen Aquaeductus cerebri begrenzt. Das Cerebellum ist groß, breit und stark aufgewunden. Der cerebellare Kernkomplex hat sich in drei bis vier voneinander getrennte Paare von Kernen differenziert und eine Pons ist stark ausgebildet (Paulin, 1993).

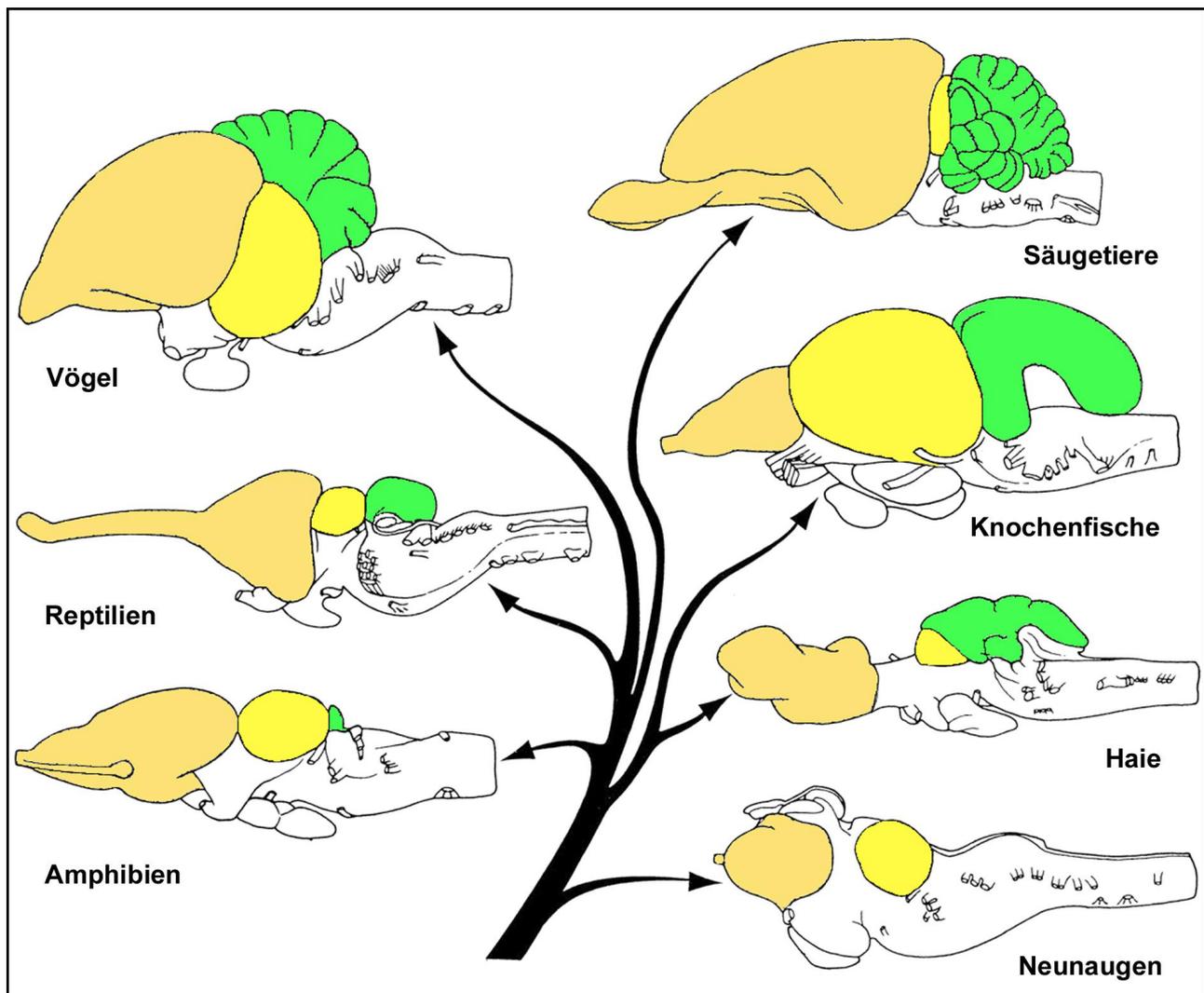


Abbildung 2: Übersicht über die Vertebratengehirne nach Northcutt 2002

Telencephalon: gelborange; Mesencephalon: gelb; Cerebellum: grün.

1.3 Das Sehsystem der Sardelle

Die Europäische Sardelle *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) ist innerhalb der Teleostei ein Vertreter der Familie der Engraulididae (Sardellen) aus der Ordnung der Clupeiformes (Heringsfische). Die genaue Stellung der Familie Engraulididae innerhalb der Gnathostomata, ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Europäische Sardelle ist ein pelagischer Schwarmfisch, ernährt sich von Zooplankton und kann eine Körperlänge von bis zu 20 Zentimetern erreichen. Ihr Lebensraum erstreckt sich vom Schwarzen Meer, über das Mittelmeer bis hin zu den Westküsten des Nord- und Zentralatlantiks (Abbildung 4). Sie ist in Tiefen von bis zu 400 Metern anzutreffen (Whitehead et al., 1985).

In der Vergangenheit war die Europäische Sardelle von großer wirtschaftlicher Bedeutung für die Fischereiindustrie und sie ist auch heute noch ein wichtiger Speisefisch. Bevorzugte Fangmethoden sind die sonarunterstützte Schleppnetzfischerei und die konventionelle nächtliche Ringwaden- bzw. Lichtfallenfischerei.

Von besonderem Interesse für die Wissenschaft ist die Sardelle, da das retinale Zapfensystem bei einigen Vertretern der Engraulididae einzigartig im Tierreich ist (Fineran & Nicol, 1978; Heß et al., 2002; Heß et al., 2006) und als solches das einzig biophysikalisch nachvollziehbare Polarisationsdetektionssystem bei Vertebraten darstellt (Horvath & Varju, 2004): Sie besitzt vorwiegend zwei Arten von Zapfen, die abwechselnd in Reihen angeordnet sind. Die photopigmenttragenden Lamellen sind parallel zum einfallenden Licht ausgerichtet (und nicht senkrecht wie bei praktisch allen anderen Vertebratenzapfen), und stehen dabei innerhalb beider Zapfentypen orthogonal zueinander. Dadurch wird eine Art Zwei-Kanal-Analysator generiert, der es der Sardelle erlaubt linear polarisiertes Licht als spezifische Qualität wahrzunehmen, anstelle eines Farbkontrastsehens (Bernard & Wehner, 1977; Heß, 2000, 2009).

Licht dessen „wavicles“ gleich orientierte e-Vektoren aufweisen wird als linear polarisiert bezeichnet. Sonnenlicht ist unpolarisiert. Erst durch den Eintritt in die Erdatmosphäre und den Zusammenstoß der Lichtquanten mit den atmosphärischen Komponenten, kommt es zur Streuung und Teilpolarisation. Die maximale lineare Polarisation entsteht, wenn Sonnenstrahlen im Winkel von 90° von den Atmosphärenpartikeln gestreut werden. Dadurch lässt sich ein charakteristisches Polarisationsmuster am Himmel beobachten, welches sich

1 Einleitung

je nach Sonnenstand ändert (Horvath & Varju, 2004). Ein entsprechendes Polarisationsmuster entsteht unter Wasser und führt zu einer Teilpolarisation des Hintergrundlichtes (Waterman, 1954). Die Reflexion von Licht an zufällig ausgerichteten Grenzflächen (z.B. Cuticulae von Planktonkrebsen, in geringerem Maße auch Fischschuppen) depolarisiert das Licht dagegen wieder.

Auch bei anderen Knochenfischarten sind Hinweise auf ein Polarisationssehen publiziert z.B. Lachse (Hawryshyn et al., 1990; Hawryshyn & Bolger, 1990), Sonnenbarsche (Cameron & Pugh, 1991), Regenbogenforellen (Novales Flamarique, 2013), wenn auch in diesen Fällen der biophysikalische Mechanismus noch Gegenstand kontroverser Diskussion bzw. fragwürdig ist. Ansonsten sind Vertebraten nicht spezifisch polarisationssensitiv – ganz im Gegensatz zu den Cephalopoden (Shashar & Cronin, 1996) und zahlreichen Arthropodenarten (v. Frisch, 1949; Wellington, 1953; Altevogt & Hagen, 1964; v. Helversen & Edrich, 1974; Frantsevich et al., 1977; Wehner, 1982; Rost & Honegger, 1987; Brownell & Weber, 1995; Dacke et al., 2001), bei denen die Ausnutzung polarisierten Lichtes zur Orientierung oder zur Kontrastbildung eher der Regelfall als die Ausnahme ist.

Das Polarisationssehen ermöglicht in erster Linie eine verbesserte Kontrastwahrnehmung. Für Tiere die in einer Umwelt mit geringen spektralen Kontrasten leben, ist es möglich Objekte, wie z.B. transparentes Zooplankton, besser wahrzunehmen, was zu einer effizienteren Nahrungsaufnahme führt. Weitere denkbare Vorteile sind eine inter- bzw. intraspezifische visuelle Kommunikation, sowie eine verbesserte räumlichen Orientierung und die Navigation nach dem Sonnenkompass (Kamermans & Hawryshyn, 2011).

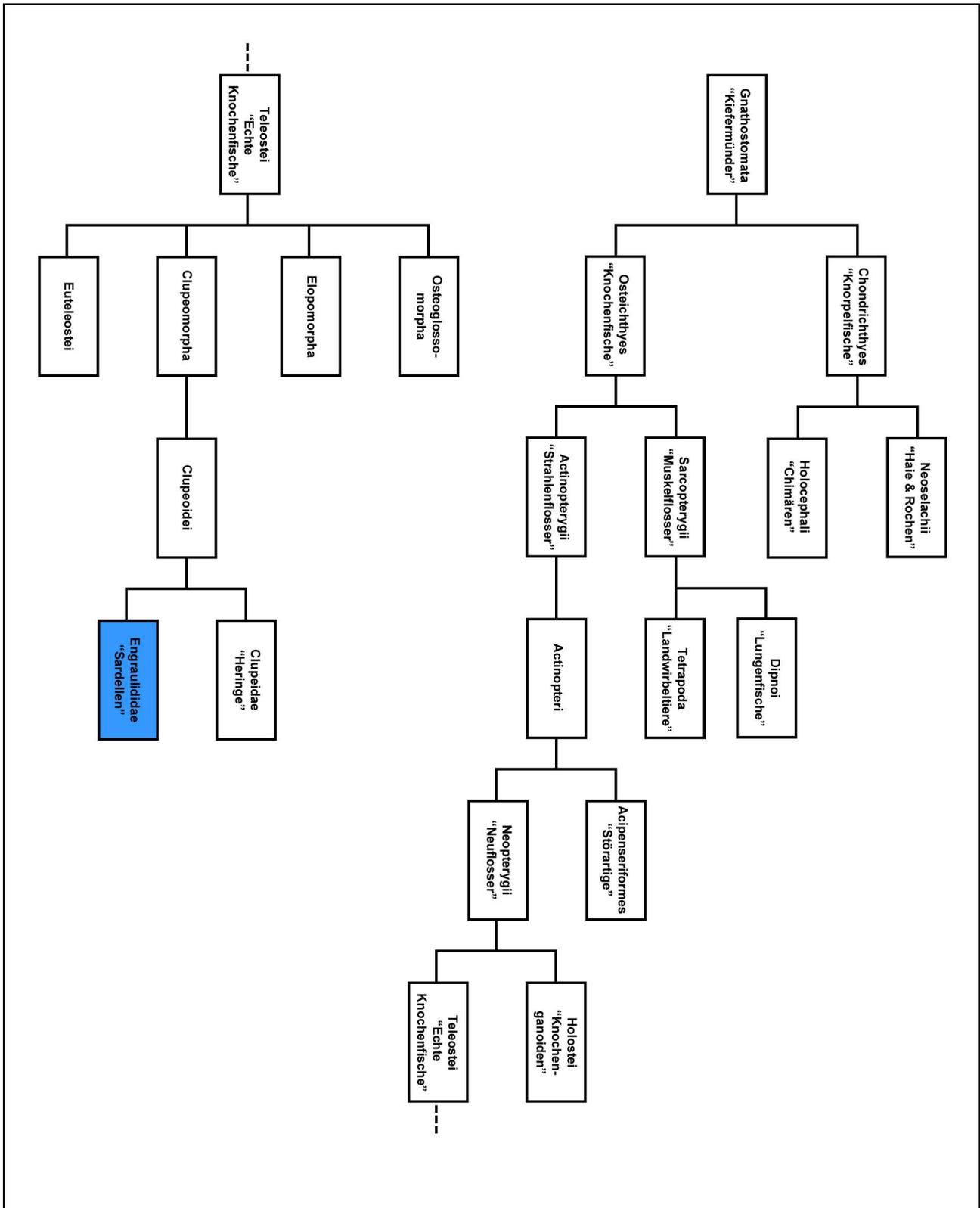


Abbildung 3: Stammbaum der Gnathostomata und Stellung der Sardellen

Stark vereinfacht nach Butler et al. (1991) und Westheide & Rieger (2010).

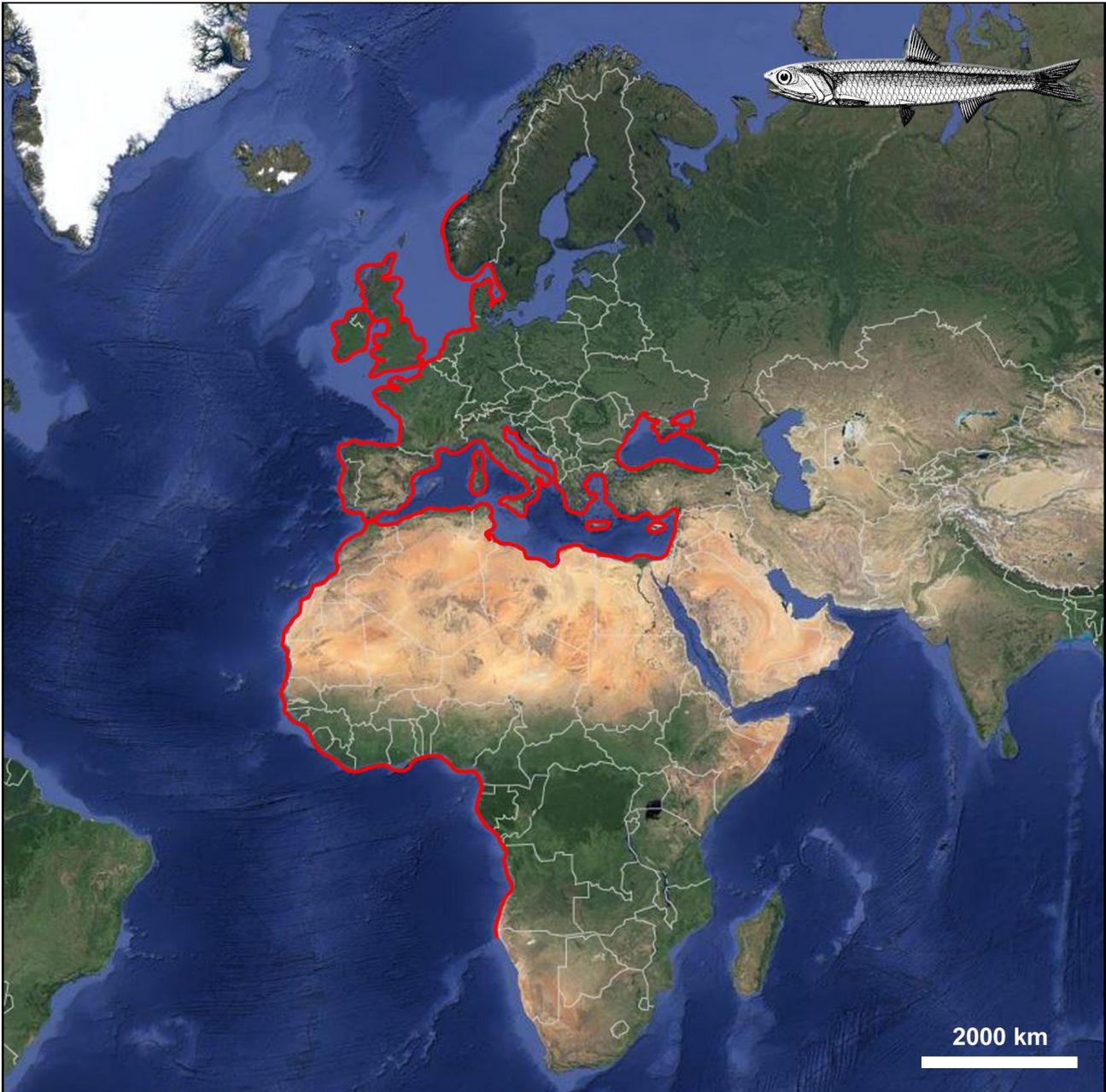


Abbildung 4: Verbreitungsgebiete der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus*.

Hauptverbreitungsgebiete der Europäischen Sardelle sind das Mittelmeer, das schwarze Meer, sowie die Ostatlantikküste Europas und Afrikas (nach Whitehead et al. (1985); Karte aus <https://maps.google.de/>).

1.4 Stand der Forschung

Der Aufbau der inneren- und äußeren Sardellenretina, d.h. deren Morphologie, Ultrastruktur, Konnektivität und Zelldichtevertelung sind eingehend erforscht (Fineran & Nicol, 1976, 1977, 1978; Zueva, 1982; Novales Flamarique & Hawryshyn, 1998; Heß, 2000; Awaiwanont et al., 2001; Heß et al., 2002; Novales Flamarique & Harosi, 2002; Heß et al., 2006; Heß, 2009; Koch et al., 2010; Koch, 2011; Koch & Heß, 2011; Novales Flamarique, 2011; Kondrashev et al., 2012; Kondrashev et al., 2013; Kondrashev et al., 2016; Novales Flamarique, 2017) bzw. Gegenstand laufender Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Heß (laufende Dissertationen Scheungrab und Schulze).

Der nächste logische Schritt bei der Aufklärung der dem (bei Wirbeltieren seltenen) Polarisationskontrastsehen zugrundeliegenden Strukturen führt von den Ganglienzellen der Retina über den Sehnerv in das Gehirn und zu den dort befindlichen ersten visuellen Verschaltungsgebieten. Während bei uns Menschen die visuelle Datenverarbeitung über die seitlichen Kniehöcker (LGN = lateral geniculate nuclei) letztlich im zerebralen Cortex, d.h. einem Teil des Telencephalons erfolgt, übernimmt diese Aufgabe bei „niederen“ Vertebraten wie den Fischen das Mesencephalon mit seinem optischen Tektum, das Hauptziel retinaler Projektionen (Bear et al., 2007). Daneben gibt es weitere direkte retinale Projektionsgebiete in Form mehrerer dem Tektum vorgelagerter Kerne. Hierbei gibt es zwei Grundpläne von Verschaltungsmustern bei Fischen (Butler et al., 1991). Das erste Muster gilt als das ursprünglichere von beiden und kommt vor allem bei Osteoglosso-, Elopo- und Clupeomorpha vor. Hierbei erfolgt eine direkte retinale Projektion zum Nukleus corticalis (NS) und zum parvozellulären Nukleus des superfiziellen Prätektums (Psp). Beide Kerne projizieren weiter zum posterioren prätektalen Nukleus (PO).

Das zweite Muster findet man vor allem bei Euteleostiern, die Verschaltung ist dem des ersten Musters zunächst sehr ähnlich. Die Retina projiziert zum Psp und zum NS. Der Unterschied besteht darin, dass beide Kerne zu einem Nukleus glomerulosus (NG) projizieren, jedoch ist zwischen dem Psp und dem NG noch ein weiterer Kern, der intermedialer Nukleus des Prätektums (Psi) zwischengeschaltet.

Die europäische Sardelle gehört der Gruppe der Clupeomorpha an (Abbildung 3). Folglich würde man bei ihr zunächst das ursprünglichere Muster retinaler Verschaltungen vermuten. In Anbetracht der Tatsache, dass die Sardelle in der speziellen Lage ist polarisiertes

1 Einleitung

Licht wahrzunehmen, wäre eine Abweichung im Grundschemata des Verschaltungsmusters durchaus vorstellbar.

1.5 Fragestellungen

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Histologie und 3D-Mikroanatomie des Sardellengehirns vollständig zu erfassen und einen lückenlosen Gehirnatlant in lichtmikroskopischer Auflösung zu erstellen. Die Idee des Gehirnatlantens ist nicht neu. Für den Aufstieg des Zebrafisches *Danio rerio* als Modellorganismus in der Biologie war unter anderem auch dessen Brain-Atlas unerlässlich (Wullimann et al., 1996). Hier soll noch ein Schritt weiter gegangen werden und nicht nur in Anlehnung an die Nomenklatur von (Butler & Northcutt, 1993) ein vollständiger 2D-Atlas, sondern darüber hinaus ein digitales 3D-Modell des gesamten Sardellengehirns aus dem segmentierten Rohdatensatz erstellt werden. Freie Skalier- und Drehbarkeit, frei wählbare Konstellation von Gehirnabschnitten, sowie Volumen- und Streckenmessung werden dadurch ermöglicht. Durch das Hinterlegen und die freie Verfügbarkeit solcher Datensätze und 3D-Modelle im „World Wide Web“ eröffnet sich für die Zukunft ein komplett neuer Ansatz für das funktionsmorphologisch vergleichende Arbeiten an Gehirnen von Fischen und anderen Vertebraten. Durch die Schaffung eines 3D-Bezugssystems wird zudem ein erster Grundstein für weiteres stereotaktisches Arbeiten gelegt, der die wiederholte Manipulation einer anatomisch definierten Hirnregion bzw. im Idealfall die wiederholte Manipulation eines bestimmten Zelltyps (Mikroinjektionen z.B. in Verbindung mit Mikro-CT) erlaubt. Die lückenlosen 3D Strukturdaten auf histologischem Auflösungslevel dienen nicht zuletzt auch der Lokalisierung der retinofugalen Projektionsgebiete zur Erforschung des zentralen Sehsystems der Sardelle.

Zweites Ziel: Um die Entwicklung des Gehirns bei der Europäischen Sardelle besser verstehen zu können, sollen Gehirne von Sardellenlarvenstadien unterschiedlichen Alters untersucht und auf histologischer, sowie mikroanatomischer Ebene miteinander verglichen werden. Histologische Querschnittserien von Sardellenlarvenstadien unterschiedlichen Alters liegen bereits vor.

Die Schnitte sollen abfotografiert, zu einem in anatomisch korrekter Reihenfolge angeordneten Bilderstapel zusammengefügt und passgenau übereinander gelagert werden. In einem weiteren Arbeitsschritt kann im Anschluss daran für jedes Larvenstadium unter Amira® ein 3D-Modell des Gehirns erstellt werden. Erst das 3D-Modell ermöglicht die Erfassung gewisser quantitativer Parameter, wie z. B. Gesamtlänge, Maximalbreite, Maximalhöhe und Gesamtgehirnvolumen. Mit den so erhobenen Daten und unter Berücksichtigung des Alters der jeweiligen Sardellenlarve, lassen sich Rückschlüsse auf gewisse As-

1 Einleitung

pekte der Gehirnentogenese einzelner Areale oder Strukturen schließen und ggf. neue Erkenntnisse über die Entwicklungsgeschichte bei *Engraulis encrasicolus* gewinnen.

Drittes Ziel: In der Regel erfolgen bei Fischen retinale Projektion über den Sehnerv in das optische Tektum, dem Hauptverarbeitungsort optischer Informationen. Weitere Projektionsgebiete sind Hypothalamus, Thalamus und prätektale Regionen (Burrill & Easter, 1994).

Ziel ist es nun bei der Europäischen Sardelle aufzuzeigen, wohin genau die optischen Nerven in das Gehirn projizieren und welche Kerne bzw. Gehirnareale neben dem Tektum noch an der Verarbeitung visueller Informationen beteiligt sein sollten. Erste Erkenntnisse darüber sollen (1) Neurotracing-Experimente mit lipidgängigen Fluoreszenzfarbstoffen liefern. Langkettige, wasserabweisende Dialkylcarbocyanine bzw. Dialkylaminostyryle sind weitverbreitete antero- und retrograde neuronale Tracer, die bei lebenden, sowie fixierten Gewebe und Zellen (erstmalige Vorstellung durch Godement et al. (1987)) zum Einsatz kommen. Sie sind in der Lage via lateraler Diffusion die Plasmamembran von Neuronen einheitlich zu färben, ohne dabei das Überleben der Zelle, sowie dessen Entwicklung oder die physiologische Eigenschaften zu verändern (Honig & Hume, 1986, 1989). Zudem werden die Tracer in der Regel von markierten zu nicht markierten Zellen nicht übertragen. Durch das Aufbringen dieser lipophilen Fluoreszenzfarbstoffe auf die (hier fixierte) Retina bzw. die Sehnerven, sollen die Nervenaxone aus der Retina über das Chiasma (kontralateral, ggf. ipsilateral) bis hin in das optische Tektum sichtbar gemacht und verfolgt werden. Neben den zu erwartenden Projektionen in das optische Tektum, sollen auch weitere an der Verarbeitung optischer Information beteiligte Regionen bzw. Kerne innerhalb des Sardellengehirns nachgewiesen werden. Das zuvor erstellte 3D-Modell und der Atlas sollen als Orientierungshilfe innerhalb des Sardellengehirns dienen.

Zudem soll die (2) Verfolgung der Nervenstränge innerhalb der digital alignierten histologischen Semidünnschnittserie die aus den Neurotracing-Experimenten resultierenden Ergebnisse bestätigen bzw. ergänzen. Die Sehnerven der Europäischen Sardelle sollen manuell, Schnitt für Schnitte, unter Amira® verfolgt und etwaige Projektionsgebiete aufgezeigt und dokumentiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialbeschaffung

Das Versuchsmaterial, adulte Europäische Sardellen (*Engraulis encrasicolus*), wurde im August 2011 im Adriatischen Meer westlich vor Rovinj (Kroatien) gefangen und direkt von einem Fischerboot beim Anlanden nach dem morgendlichem Fang bezogen. Die Fische wurden dekapitiert und die Köpfe in 4% Formol (0,1 M Phosphatpuffer; pH 7,2) fixiert. Um eine optimale Fixierung des Versuchsmaterials zu gewährleisten wurden die Köpfe mit einer Nadeln mehrfach perforiert, ohne dabei das Gehirn zu beschädigen. Die eindeutige Bestimmung der Tiere erfolgte nach dem Bestimmungsschlüssel von Whitehead et al. (1985).

Für die Untersuchung an Gehirnen von Entwicklungsstadien der Europäischen Sardelle standen insgesamt sechs Fischlarven unterschiedlichen Alters zur Verfügung. Die 5 und 10 Tage alten Fischlarven sind Wildfänge und stammen aus den Gewässern der Küste vor San Sebastián in Spanien. 20, 31, 36 und 45 Tage alte Fischlarven kommen aus der Aufzuchtstation des Aquariums in Donostia San Sebastián (Spanien). Abbildung 5 zeigt fünf der sechs Larvenstadien. Für das 31 Tage alte Larvenstadium war kein Bild mehr von vor der histologischen Aufarbeitung aufzufinden. Die Fischlarven wurden in unterschiedlichen Fixativen zugesandt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Larvenstadien, deren Alter und Länge, das verwendete Fixativ, sowie deren Herkunft.

Tabelle 1: Übersicht der Sardellenlarven

Larvenstadium/Alter [d]	Länge [mm]	Fixativ	Herkunft
<i>E. encrasicolus</i> A 5	3	Formol	Wildfang, San Sebastián (U. Cotano; AZTI)
<i>E. encrasicolus</i> B 10	5	Glutaraldehyd	Wildfang, San Sebastián (U. Cotano, AZTI)
<i>E. encrasicolus</i> C 20	8	Formol	Aufzucht, Aquarium San Sebastián (A. M. de Murguia)
<i>E. encrasicolus</i> D 31	11	Formol	Aufzucht, Aquarium San Sebastián (A. M. de Murguia)
<i>E. encrasicolus</i> E 36	16,5	Formol	Aufzucht, Aquarium San Sebastián (A. M. de Murguia)
<i>E. encrasicolus</i> F 45	18	Glutaraldehyd	Aufzucht, Aquarium San Sebastián (A. M. de Murguia)

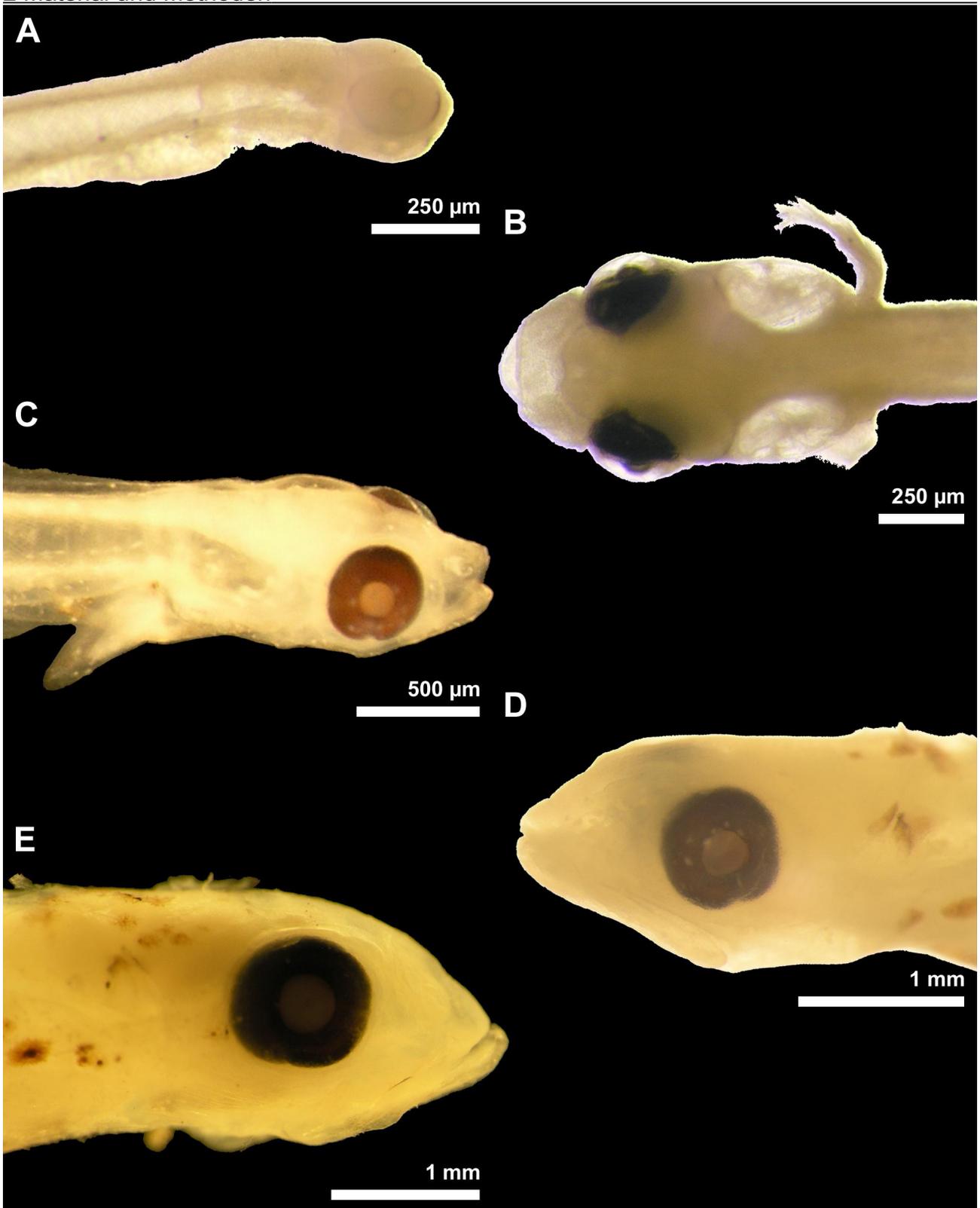


Abbildung 5: Die untersuchten Sardellenlarven unterschiedlichen Alters

A: 5 Tage altes Larvenstadium – 3 mm, Ansicht lateral. B: 10 Tage altes Larvenstadium – 5 mm, Ansicht dorsal. C: 20 Tage altes Larvenstadium – 8 mm, Ansicht lateral. D: 36 Tage altes Larvenstadium – 16,5 mm, Ansicht lateral. E: 45 Tage altes Larvenstadium – 18 mm, Ansicht lateral.

2.2 Präparation und Einbettung des Sardellengehirns (adult)

Der in Formol fixierte, adulte Sardellenkopf wurde in eine mit Wachs ausgekleidete und mit Phosphatpuffer nach Sörensen (0,1 M, pH 7,2; z.B. (Mulisch & Welsch, 2010)) gefüllte Petrischale überführt und dort präpariert. Mit einer Mikroschere wurden durch Zirkumzision zunächst die Fetttlieder beider Augen abgehoben, die Augenmuskeln weg präpariert, die Sehnerven an der Augapfelbasis durchtrennt und die Augen entfernt.

Am anterioren Ende des Kopfes wurden die paarigen Riechgruben und die davon abgehenden Riechnerven nach caudal zum Ansatz der Schädelkapsel frei präpariert. Dieser Schritt erforderte viel Geduld und es war stets darauf zu achten, dass sich keine Spannung in Bezug auf die durch die Fixierung nicht mehr elastischen Nerven entwickelte. Für eine besserer Handhabung der darauf folgenden Präparation wurden die Riechgruben an den unteren Fortsatz der anterior hervorstehenden Schädelkapsel angelegt, so dass die Riechnerven in einer lockeren Schleife zu liegen kamen.

Im nächsten Schritt wurde die Haut der dorsalen Schädeldecke abgezogen, die Kiemendeckel entfernt und die Knochenkapsel auf beiden Seiten von weichem organischen Material mit einer feinen Pinzette befreit. Die Schädelkapsel wurde vorsichtig beidseitig hinter den Augengruben ventrolateral aufgebrochen und die Kapseldecke Stück für Stück abgetragen. Der dorsale Teil des Gehirns lag nun frei (Abbildung 6 A). Das Telencephalon geht nach anterior in die Riechnerven über. Es liegt anterior in einem abgeflachten zylinderförmigen Knochenkapselfortsatz, der sich von posterior nach anterior verengt. Der Zylinder wurde lateral zu beiden Seiten vorsichtig aufgeschnitten, der dorsale Teil entfernt und das Telencephalon von der Unterseite gelöst.

Die Sehnerven sind durch Öffnungen der Schädelkapsel mit dem Gehirn verbunden. Der anteriore Teil der Knochenkapsel wurde auf beiden Seiten lateral der Sehnervenöffnung eingeschnitten, das zwischen Sehnerven und Diencephalon liegende Knochenstück entfernt, das Gehirn aus der verbleibenden wannenförmigen Knochenkapsel gelöst, in frischem Puffer überführt und 4x für 30 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen.

Es folgte die Nachfixierung bzw. Kontrastierung mit Osmiumtetroxid (OsO_4). Für gewöhnlich reicht es aus, kleinere Gewebeproben für einen relativ geringen Zeitraum von wenigen Minuten mit 1% OsO_4 zu behandeln. Vorexperimente haben ergeben, dass bei einem so großen Objekt wie dem kompletten Gehirn einer adulten Sardelle die Anwendung des Standardprotokolls nicht ausreicht, damit das ganze Gewebe vom OsO_4 durchdrungen wird (Scheungrab, 2011). Die Einwirkzeit wurde daher auf 16 Stunden angehoben.

2 Material und Methoden

Nach der Osmierung wurde das Gehirn 4x 30 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Acetonreihe (30%, 50%, 70% je 2x 60 Minuten, 90%, 96% je 2x 30 Minuten, 100% 8x je 30 Minuten) entwässert. Das 100% Aceton wurde hierbei aus mit wasserfreien CaCl_2 versetzten 99,9% Aceton gewonnen, am Vortag in einer luftdichten Glasflasche angesetzt. Das Volumen des CaCl_2 nimmt hierbei beachtlich zu.

Das Gehirn wurde in relativ weiches Epoxy-Polyesterharz („Epon A“) eingebettet. Essenziell für eine erfolgreiche Einbettung ist der Schutz vor Feuchtigkeit. Hierfür wurden die einzelnen Komponenten frühzeitig aus dem Kühlschrank entnommen und in geschlossenen Flaschen auf Zimmertemperatur gebracht, damit nicht die Luftfeuchtigkeit an den einzelnen Komponenten kondensiert. Das Mischverhältnis der Komponenten der Firma Roth für Epon A betrug 31 ml Glycidether 100, 50 ml DBA Härter und 0,18 g Beschleuniger DMP 30 pro 10 ml Stammlösung. Eine Zusammenstellung der Einzelkomponenten der Eponeinbettung kann Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Komponenten des Kunstharzgemisches „Epon“ (Roth)

Komponente	Menge [ml]	Menge [ml]	Menge [ml]
	Adult Epon A	Larven Epon A	Larven Epon B
Glycidether 100	31	31	31
Härter DBA	50	50	-
Härter MNA	-	-	44,5
Beschleuniger DMP 30	0,18 g pro 10 ml Stammlösung	0,18 g pro 10 ml Stammlösung	0,18 g pro 10 ml Stammlösung

Nach der Entwässerung wurde das in 100%igem Aceton lagernde Gehirn langsam in reines Epon A überführt. Hierbei wurde das Gehirn zunächst in geschlossene Rollrandgläschen mit verschiedenen Gemischen aus 100%igem Aceton und zunehmendem Epon A Anteil gegeben und infiltriert (Epon A / Aceton 100% 1:2 Gemisch für 8 Stunden, 2x Epon A / Aceton 100% 2:1 Gemisch für 2 Stunden). Es folgte die Überführung in ein offenes Rollrandgläschen mit reinem Epon A im Trockenschrank (mit Silikagel) damit das Aceton gänzlich aus der Probe abdampfen konnte und nur noch reines Epon A zurück blieb (2x 60 Minuten und 1x über Nacht).

Das Gehirn wurde in eine mit Epon A gefüllte Form aus Silikonkautschuk gebracht und mit zwei Zahnstochern in geeigneter Weise orientiert. Über einen Zeitraum von 72 Stunden ließ man das Kunstharz langsam bei Raumtemperatur auspolymerisieren. Es folgte eine weitere Aushärtephase im Wärmeschrank bei 60°C über 48 Stunden. Tabelle 3 zeigt die Zusammenfassung eingesetzter Reagenzien und die Dauer der einzelnen Arbeitsschritte.

Tabelle 3: Protokoll der Eponeinbettung des adulten Sardellengehirns

Reagenz:	Dauer:
0,1 M Phosphatpuffer	4x ½ h
1% Osmiumtetroxid (OsO ₄)	16 h
0,1 M Phosphatpuffer	4x ½ h
Aceton 30%, 50%, 70%	je 2x 1 h, über Nacht in Aceton 70%
Aceton 90%, 96%	je 2x ½ h
Aceton 100%	8x ½ h
Epon A / Aceton 100% (1:2 Gemisch)	8 h
Epon A / Aceton 100% (2:1 Gemisch)	2x 2 h
Reines Epon A (mit Deckel offen)	2x 1 h und 1x über Nacht
Reines Epon A	Einbettung → Langsames Auspolymerisieren über 72 h bei Raumtemperatur
Reines Epon A	Auspolymerisieren über 72 h im Wärmeschrank bei 60°C

2.3 Präparation und Einbettung junger Entwicklungsstadien von Sardellen

Die sechs Larvenstadien der Europäischen Sardelle wurden jeweils komplett in Epoxidharz der Firma Roth eingebettet. Die Einbettung erfolgte wie unter 2.2 beschrieben, jedoch bei abweichender Dauer der jeweiligen Arbeitsschritte. Die Details sind Tabelle 4. zu entnehmen. Das Epoxy-Polyesterharz wurde hierbei aus den Komponenten Epon A und Epon B im Verhältnis 1:1 gemischt. Epon A setzte sich aus 31 ml Glycidether 100, 50 ml DBA (Härter 1) zusammen und Epon B aus 50 ml Glycidether 100 und 44,5 ml MNA (Härter 2). Zudem wurde pro 10 ml Stammlösung 0,18 g Beschleuniger DMP 30 hinzugegeben, um das Auspolymerisieren des Kunststoffes zu beschleunigen. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Komponenten für die Eponeinbettung ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 4: Protokoll der Eponeinbettung der Sardellenlarven

Reagenz:	Dauer:
0,1 M Phosphatpuffer	6x ½ h
1% Osmiumtetroxid (OsO ₄)	2 h
0,1 M Phosphatpuffer	4x ½ h
Aceton 30%, 50%, 70%	je 2x 1/2h, über Nacht in Aceton 70%
Aceton 90%, 96%	je 2x ½ h
Aceton 100%	6x ½ h
Aceton 100% / Epon (1:1 Gemisch)	2-4 h
Reines Epon (mit Deckel offen)	über Nacht
Reines Epon	Einbettung → Auspolymerisieren über 72 h im Wärmeschrank bei 60°C

2.4 Schneiden und Färben

Der Kunstharzblock mit dem darin eingebetteten Gehirn der adulten Sardelle (Abbildung 6 B) wurde mit einer Rasierklinge zurecht getrimmt und mit einem mechanischen Ultramikrotom (MT-7000 Ultra, RMC Microtoms) von anterior nach posterior mit einem Diamanten (Histo Jumbo, Diatom) semidünn geschnitten (Schnittdicke 1,5 µm). Voran ging eine einseitige Beschichtung des Eponblocks mit Pattexkleber nach der Methode von Ruthensteiner (Ruthensteiner, 2008). Dadurch war es möglich die aneinander klebenden Bänder aus Einzelschnitte von einem Wasserfilm auf Objektträger zu überführen, ohne dabei auch nur einen einzigen Schnitt zu verlieren (vollständige Schnittserie des Sardellengehirns in 8487 Einzelschnitten). Die Bänder wurden auf gereinigte Glasobjektträger (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, geschnitten, Mattrand) aufgebracht und auf einer Heizplatte bei 80°C festgebacken. Die Schnitte wurden für 10 Sekunden mit Richardson-Färbelösung (Richardson et al., 1960) auf der Heizplatte (80°C) behandelt, gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet.

Die Herstellung der Semidünnschnittserien der Köpfe junger Sardellen erfolgte durch Heidemarie Gensler, die Technische Assistentin der Arbeitsgruppe Haszprunar / Heß. Hierbei entstanden Schnittserien der Kopfregion (Transversalschnitte) der jeweiligen Stadien in unterschiedlichen Schnittstärken (s. Tabelle 5). Sie wurden entsprechend in 400-2400 Schnitte zerlegt, auf 5 bis 31 Objektträger überführt, auf einer Heizplatte bei 80°C festgebacken, für 30-40 Sekunden mit Richardson-Färbelösung eingefärbt, im Anschluss daran mit destilliertem Wasser abgespült und auf der Heizplatte getrocknet.

2.5 Bildbearbeitung und Datenerfassung

2.5.1 Aufnahme der Bilder

Um die Bilderfassung unter dem Mikroskop zu verbessern, befreite man die Objektträger ggf. von Staub und deckelte die Schnitte unter einem Deckglas mit DPX Mounting Medium der Firma Agar Scientific ein. Dadurch wurden zusätzlich Unebenheiten im Kunstharz ausgeglichen (Abbildung 6 C).

Insgesamt 307 Objektträger (adultes Gehirn: 213 Objektträger; 6 Larvenstadien: 94 Ob-

jektträger) wurden mit dem Mikroskop Olympus BX61VS mit automatisiertem Tisch und vierfach Objektträgerhalter erfasst und mit der Kamera Olympus XC10 bei 10-facher Vergrößerung (Objektiv UplanSApo 10x/0,40) automatisch eingescannt. Hierbei nahm das Bilderfassungsprogramm Virtual Slide System Fluoreszenz VS-ASW FL 2,5 der Olympus Soft Imaging Solution GmbH für jeden einzelnen Objektträger zahlreiche Einzelbilder auf und setzte diese nahtlos zu einem einzelnen großen Gesamtbild in proprietärem Datenformat aneinander (sogenanntes „Stitchen“). Zur lichtmikroskopischen Bilderfassung siehe auch Kap. 2.7.

Die Virtual Slide System Dateien (*.vsi) der einzelnen Objektträger wurden mit dem Programm OlyVIA® V.2.3 (Olympus Soft Imaging Solution GmbH) geöffnet, einzelne Schnitte ausgewählt und bei 2,5- (adultes Gehirn) bis 10-facher Vergrößerung (jüngstes Larvalstadium) mit der „Snapshotfunktion“ abfotografiert.

Damit der Größenumfang der einzelnen Bilderstapel des jeweiligen Sardellenstadiums die zur Verfügung stehenden Rechenleistung nicht überstieg, konnte nicht jeder einzeln angefertigte histologische Schnitt aufgenommen werden. Daher wurde für die Larvenstadien A, B, C, D jeder zweite-, für die Stadien E und F jeder vierte- und für das adulte Stadium jeder zehnte Schnitt aufgenommen.

Für die 3D-Rekonstruktion des adulten Gehirns wurden die Bilder der Objektträger 48-213 herangezogen. Diese 166 Objektträger beinhalten 6507 Einzelschnitte, bei Aufnahme jedes zehnten Schnittes ergeben sich 650 Einzelbilder für die 3D-Rekonstruktion.

Die ersten 47 Objektträger beinhalten ausschließlich die Riechgruben und die olfaktorischen Nerven. Sie umfassen 1980 Einzelschnitte und wurden von der 3D-Rekonstruktion ausgeschlossen, da anderenfalls der unter Amira® zu bearbeitende Datenstapel, bei vorhandener Rechenleistung, nicht mehr sinnvoll zu bearbeiten gewesen wäre.

2.5.2 Bearbeitung der Bilder

Beim Abfotografieren einzelner Schnitte kam es vor, dass manche Gehirnquerschnitte bei der gewählten Vergrößerung nicht vollständig auf dem Bildschirm angezeigt wurden. Es mussten daher teilweise mehrere Bilder von verschiedenen Ausschnitten ein und des selben Gehirnquerschnittes aufgenommen werden. Es wurde darauf geachtet, dass immer ein geringer Teil des einen Bildes mit dem eines anderen überlappte, damit die Bilder in einem

2 Material und Methoden

weiteren Arbeitsschritt zu einem großen Gesamtbild zusammengesetzt werden konnten. Sämtliche Bildbearbeitungsaktionen wurden mit dem Programm Adobe Photoshop® CS5 V 12.0.4 x64 vorgenommen und die bearbeiteten Bilder als Tiff-Datei abgespeichert. Das Zusammensetzen einzelner Bilder, mit teilweise überlappenden Ausschnitten, erfolgte unter Anwendung der Funktion „Ebenen automatisch ausrichten“ - „Repositionieren“ oder zu einem geringen Anteil manuell. Daraus resultierende unterschiedliche Arbeitsflächen der Bilder untereinander, mussten auf einen einheitlichen Nenner gebracht werden, bevor diese in das Programm für die 3D-Rekonstruktion geladen werden konnten. Damit alle Bilder innerhalb eine Bilderstapels eine einheitliche Größe aufwiesen, wurde das Bild mit der größten Arbeitsfläche als Referenz gewählt und alle anderen Bilder an dessen Arbeitsflächengröße angepasst.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die einzelnen Bilder mit dem „Lasso-Tool“ von Schmutz und Schneideartefakten „gereinigt“ und mit den Funktionen „Weißabgleich“, „Graustufen“, „Autokontrast“ und „Scharfzeichnungsfilter - Unschärf maskieren“ optimiert. Sich wiederholende Arbeitsschritte wurden hierbei zu einem großen Teil mit der automatischen Stapelverarbeitung unter Photoshop durchgeführt. Die wichtigsten Parameter für die Bildbearbeitung können in Tabelle 5 eingesehen werden.

Tabelle 5: Überblick der wichtigsten Parameter für die Bildbearbeitung

Stadium	Schnitt- dicke [µm]	Objektträgeranzahl	Verwendeter Schnitt	Vergrößerung unter OlyVIA®	Anzahl Bilderstapel- querschnitte	Voxelsize (X, Y, Z)[µm]
<i>E. encrasicolus</i> A	1	5	jeder 2.	10x	472	0.376x0.376 x2
<i>E. encrasicolus</i> B	1,44	5	jeder 2.	10x	259	0.639x0.639 x2.88
<i>E. encrasicolus</i> C	1,92	6	jeder 2.	10x	435	0.637x0.637 x3.84
<i>E. encrasicolus</i> D	1,5	19	jeder 2.	10x	361	0.641x0.641x 3
<i>E. encrasicolus</i> E	1,64	28	jeder 4.	10x	420	0.641x0.641 x6.56
<i>E. encrasicolus</i> F	1,8	31	jeder 4.	5x	590	2.015x2.015 x7,2
<i>E. encrasicolus</i> Adult	1,5	213	jeder 10.	2,5x	650	2.56x2.56 x15

2.5.3 Erstellung von Bilderstapeln für 3D-Rekonstruktionen

Die Bilder wurden in das Programm Amira[®] 5.3.3 in anatomisch korrekter Abfolge eingeladen, möglichst passgenau übereinander gelagert (sogenanntes „Alignieren“, Abbildung 6 D). Hierfür wurden die Einzelbilder an dem vorherigen oder folgenden Bild mittels der automatischen Alignierfunktion unter Amira[®] („Align-Slices“) ausgerichtet und bei Bedarf abermals manuell korrigiert. Danach wurde die Voxel Size unter Amira der tatsächlichen Bildauflösung angepasst, um die korrekten Proportionen des Versuchsobjektes im digitalen Raum zu definieren. Voxel weisen eine Ausdehnung im drei-dimensionalen Raum auf (X-, Y- und Z-Richtung) und beschreiben als solches das kleinste dreidimensionale, digitale Volumenelement eines Datensatzes.

Für die Bestimmung der X- und Y-Werte diente ein eingeblendeter Maßstab bei der jeweiligen unter OlyVIA[®] aufgenommenen Vergrößerung, der in Photoshop[®] übertragen und vermessen wurde. Dadurch ließ sich errechnen, wie viel μm ein Pixel des jeweiligen Versuchsobjektes in der X- bzw. Y-Ebene entsprach. Der Z-Abstand lässt sich ganz leicht aus dem mechanischen Schnittabstand der einzelnen Bilder zueinander bestimmen (die Bilder der adulten Sardelle wurden bei 2,5 facher Vergrößerung aufgenommen, ein Pixel entsprach dabei letztlich $2,56 \mu\text{m}$ für X- und Y-Ebene. Der Z-Abstand berechnet sich aus der Anzahl der verwendeten Schnitte mal der Schnittdicke: $10 \times 1,5 \mu\text{m} = 15 \mu\text{m}$; Übersicht siehe Tabelle 5).

2.5.4 3D-Rekonstruktion

Mit der 3D-Rendering Software Amira[®] 5.3.3 wurde zunächst unter dem „Segmentation Editor“ das gesamte Sardellengehirn manuell, Schnitt für Schnitt und für jedes Entwicklungsstadium erfasst. Der äußere Raum und gehirnfremde Einbettungsartefakte wurden hierbei ausgeschlossen. Als nächster Schritt wurden Teile des Gehirns in Großstrukturen untergliedert (z.B. Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Cerebellum, usw.). Für jede einzelne Großstruktur wurden mehrere Labels in einem Field mit definierter Farbe eingefügt und benannt. Dazugehörige Strukturen wurden manuell durch das Nachfahren der Organstruktur mittels des „Brush-Werkzeugs“ markiert und hinzugefügt (Abbildung 6 E und 7).

Für die Erstellung eines 3D-Modells wurden die Labelfields jeder Substruktur als eigene Label-Datei abgespeichert und mit der „Resample“ Funktion die Auflösung verringert,

2 Material und Methoden

indem je 4 Pixel (2 in X- und 2 in Y-Richtung) zusammengefasst wurden. Anderenfalls wäre eine Weiterverarbeitung der Daten bei vorhandener Rechenleistung nicht möglich gewesen.

Die Anwendung des „Surface Generator“ mit der Einstellung „unconstrained smoothing“ ergab jeweils ein erstes 3D-Oberflächenmodell. Dieses ist aus zahlreichen Polygonen aufgebaut. Je nach Komplexität einer Struktur, besteht diese aus mehr oder weniger Polygonen. Damit das Modell mit einer sinnvollen Arbeitsgeschwindigkeit bearbeitet werden konnte, wurde die ursprüngliche Polygonanzahl mit dem „Simplify“ Makro unter Amira® auf 1-2 Millionen für alle Oberflächen reduziert. Damit das 3D-Modell realistischer erscheint, wurde die Oberfläche im „Surface Viewer“ mit der Einstellung „Direct normals“ geglättet (Abbildung 6 F).

Um das zu untersuchende Objekt anschaulich darzustellen verfügt Amira® über eine ganze Palette an Möglichkeiten. Die Perspektive und der Zoomfaktor sind frei wählbar (Abbildung 8 B und C). Es lassen sich einzelne Substrukturen miteinander kombinieren und deren Transparenz variieren, wodurch sich neue Erkenntnisse in Bezug auf Struktur und Form erschließen lassen (Abbildung 8 D und E).

Mit dem Amira® Snapshot-Tool zum Erfassen von Screenshots wurden ausgewählte Ansichten des 3D-Modells aufgezeichnet und für die Tafelerstellung in Photoshop als PSD- und JPG-Datei abgespeichert.

2.5.5 Parametererfassung unter Amira®

Zur Vermessung wurden die Oberflächenmodelle der einzelnen Larvalgehirne in Amira geladen, mit „Surface View“ angezeigt, auf „Orthographic View“ umgeschaltet und mit dem „Measurement-Tool“ vermessen. Die Länge wurde in dorsaler Aufsicht von der vordersten Spitze bis zum hintersten Punkt des Gehirns gemessen; die Breiten- und Höhenmessungen erfolgten bei frontaler Ansicht. Als maximale Breite bzw. Höhe wurde der Messwert herangezogen, der beim horizontalen bzw. vertikalen Anlegen des Messbalkens, den größten Wert ergab.

Für die Volumenberechnung wurden alle dem Gehirn zugehörigen Bereiche, innerhalb der jeweiligen Bilderstapel, einem Labelfield zugeordnet. Mit dem „Measurement-Tool“, unter Anwendung des „Material Statistics-Tool“, ließ sich hieraus das Volumen des Gesamtgehirns bzw. seiner Untereinheiten berechnen (Voxelvolumen x Anzahl der gelabelten Voxel).

2.5.6 MikroCT-Aufnahmen

Für die MikroCT-Aufnahmen wurde ein in Formol gelagertes Sardellengehirn frei präpariert (wie unter 2.2 beschrieben), mit H₂O gewaschen und drei Tage in 2 %iger J₂/KJ Lösung (sogenannter Lugol'sche Lösung) gelagert. Danach wurde das Gehirn mit H₂O gewaschen und mit einem µCT „Phoenix Nanotom m“ bei einer Voxelsize von (2 µm)³ erfasst (d.h. isotrope Auflösung). Insgesamt wurden bei einer 360° Rotation in ¼ ° Schritten 1440 16-bit Bilder mit 100kV und bei 120 µA unter der Einstellung „500 ms average 3“ aufgenommen. Der vollständige Scan dauerte 52 Minuten. Es erfolgte daraufhin eine Rückprojektion der Serie von Projektionsbildern in einen Tiff-Stapel bei einer gegebenen Vorzugsorientierung (transversal bis leicht schief) mit 2102 x 2467 x 2309 Pixeln. Für die folgenden Arbeitsschritte war es nötig den Tiff-Stapel in 8 bit-Bilder zu exportieren, da Bildbearbeitungsprogramme unter Windows häufig 16 bit-Bilddateien nicht verarbeiten können. Die Umwandlung der Bilder dauerte 45 Minuten.

Der 8-bit-Bilderstapel wurde in das Programm Amira[®] geladen. Mit dem Werkzeug „Oblique-Slicer“ war es möglich, unter zuvor sorgfältiger Ausrichtung des Bilderstapels, Querschnitte des Sardellengehirns auf in etwa gleicher Höhe wie die Histologiebilder des Atlas zu erhalten.

Abbildung 6: Vom Fischkopf zur 3D-Rekonstruktion. ▶

A: Lateralansicht des Kopfs einer adulten Sardelle während der Präparation. Das Gehirn liegt frei*. Links ist rostral. **B:** Ventralansicht auf das im Eponblock eingebettete, adulte Sardellengehirn. Links ist rostral. **C:** Objektträger mit lückenloser Schnittserie des adulten Sardellengehirns auf Höhe des Tektums. **D:** Alignierter Bilderstapel. Aus Übersichtsgründen sind nur 11 (Ebene 125, 175, 225, 275, 325, 375, 425, 475, 525, 575 und 625) von insgesamt 650 Schnittebenen des Gehirns der adulten Sardelle gezeigt. Die Zahlen an der Seite geben die jeweilige Schnittebene an. **E:** Horizontale Schnittebene auf Höhe des optischen Tektums der adulten Sardelle mit farbigen Labels. Oben ist dorsal und unten Ventral. **F:** Lateralansicht der 3D-Rekonstruktion des adulten Sardellengehirns unter Amira®. Links ist rostral und oben dorsal.

Blutgefäße (**rot**), Cerebellum (**grün**), Diencephalon (**orange**), Mesencephalon (**türkis**), Metencephalon (**dunkelblau**), Medulla oblongata (**violett**), linker Sehnerv (**dunkelgrau**), rechter Sehnerv (**hellgrau**), Telencephalon (**gelborange**), Tectum opticum (**gelb**).

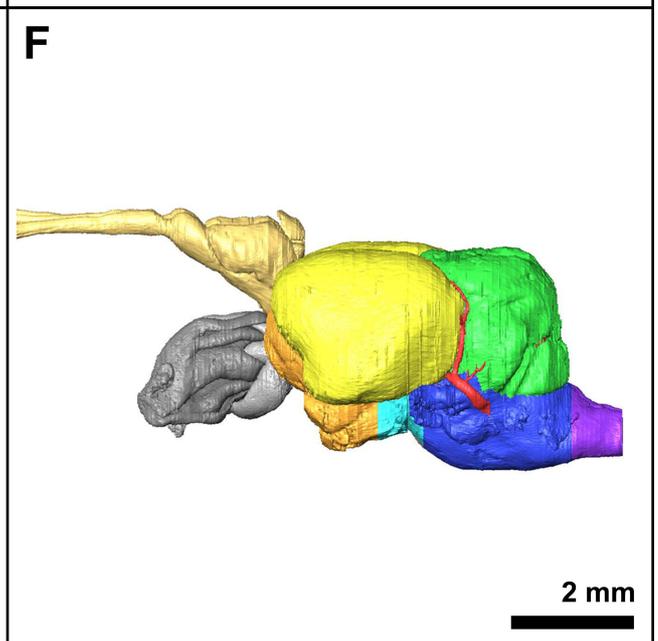
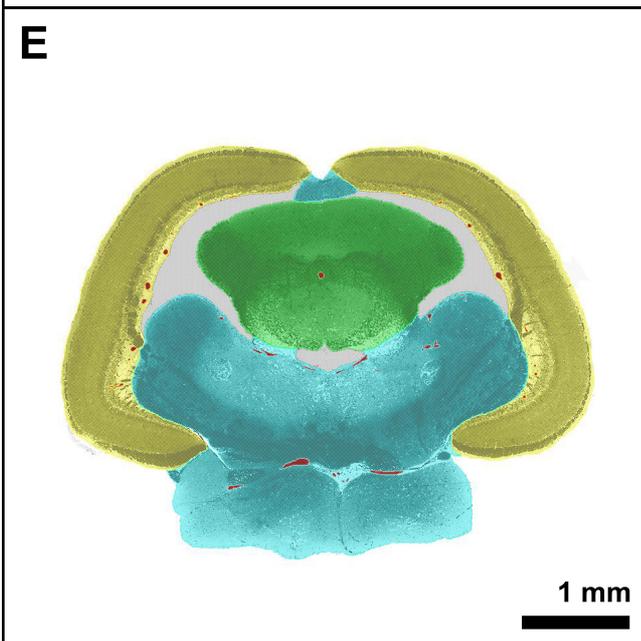
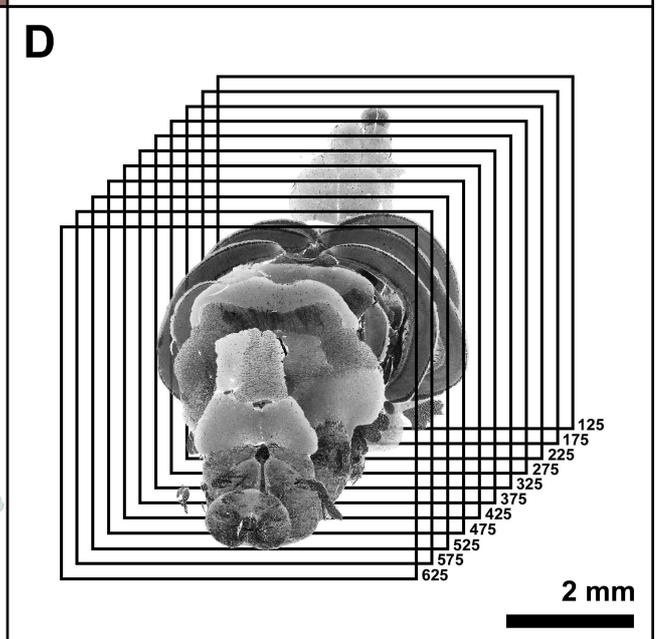
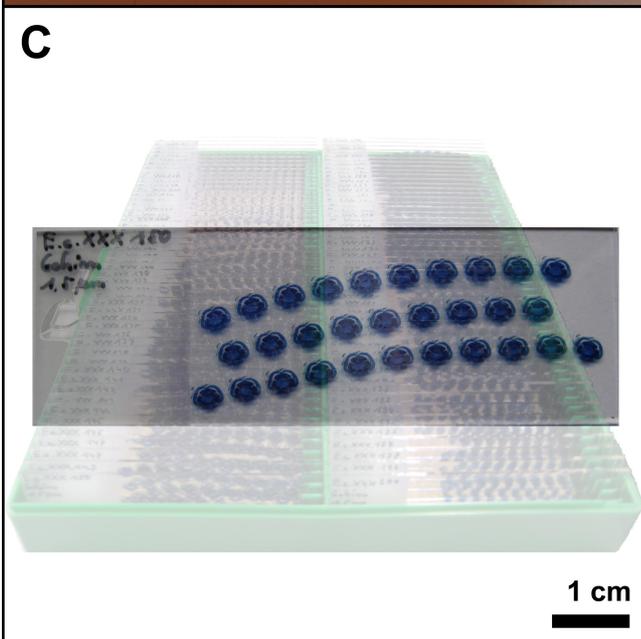
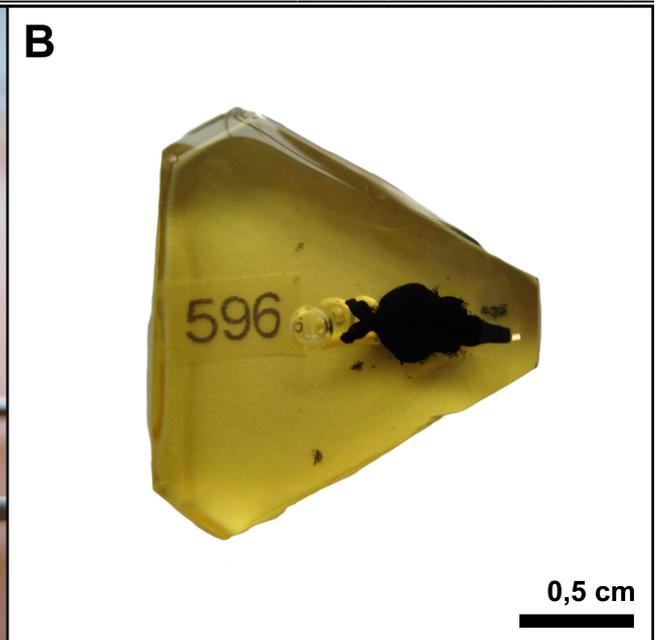
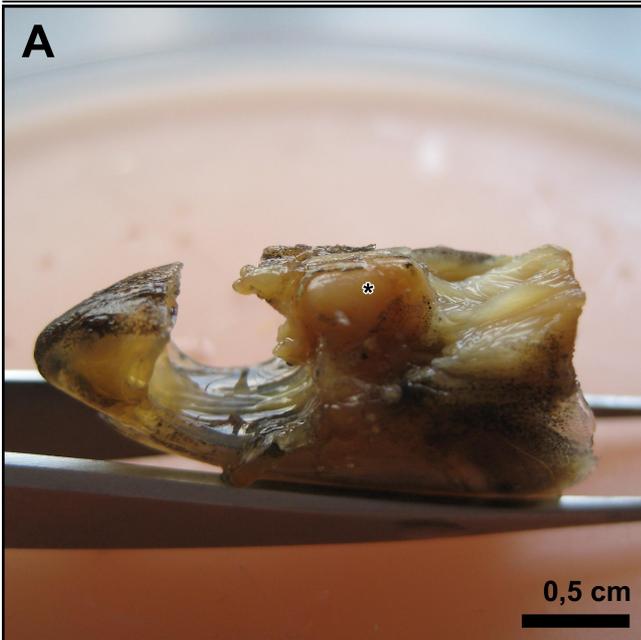


Abbildung 7: Bearbeitung der histologischen Querschnitte unter Amira®. Jedes Gehirnareal wird markiert und dem Labelfield einer Großhirnstrukturen zugeordnet. ►

Die 3D-Übersichtsabbildung oben in der Mitte zeigt die Schnittebenen innerhalb des adulten Sardellengehirns der Abbildungen A - D bzw. A' - D'.

A - D: Ausgewählte histologische Schnitte (Ebene 209, 347, 421 und 571), die für die 3D-Rekonstruktion herangezogen wurden.

A' - D': Die zu A – D gehörigen Labelfields unter Amira® mit Bezeichnungen der jeweiligen Großhirnstrukturen.

BV Blutgefäße (rot), **CB** Cerebellum (grün), **DC** Diencephalon (orange), **MesC** Mesencephalon (türkis), **MetC** Metencephalon (dunkelblau), **MeOb** Medulla oblongata (violett), **oN l** linker Sehnerv (dunkelgrau), **oN r** rechter Sehnerv (hellgrau), **TC** Telencephalon (gelborange), **TO** Tectum opticum (gelb).

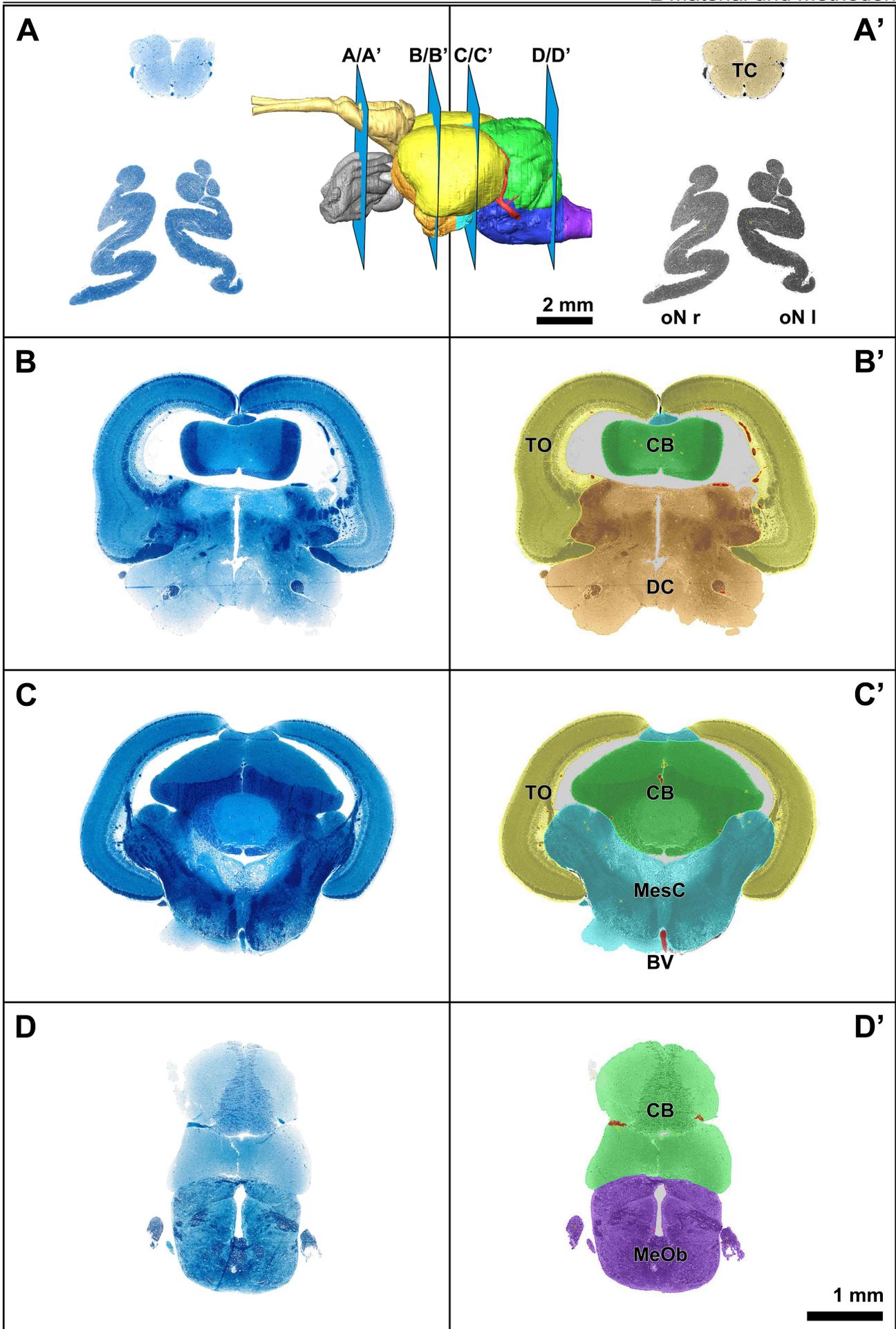
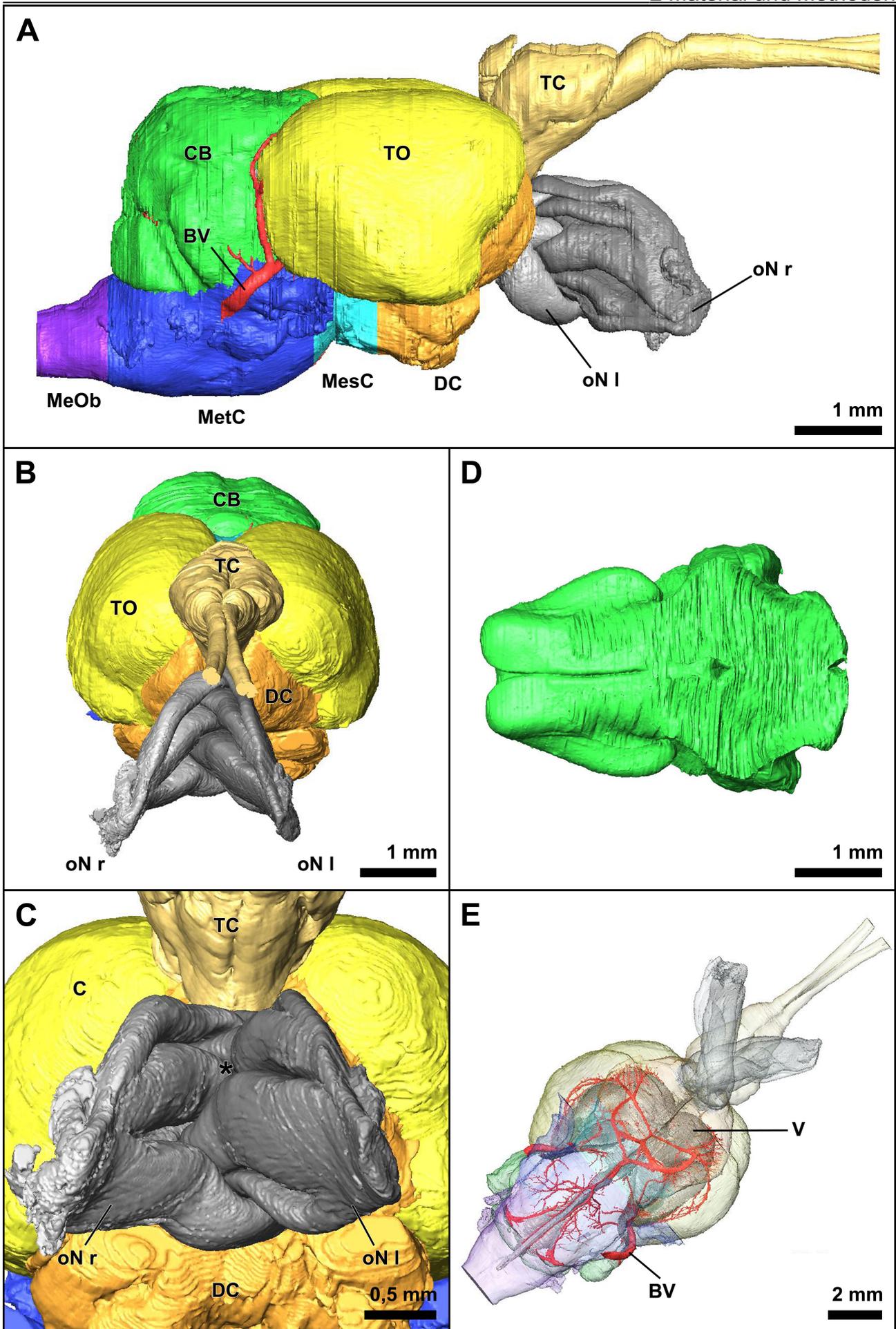


Abbildung 8: 3D-Rekonstruktion des adulten Sardellengehirns. Amira® bietet zahlreiche Untersuchungs- und Darstellungsmöglichkeiten. ►

A: Lateralansicht (rechte Seite) der 3D-Rekonstruktion des adulten Sardellengehirns mit Bezeichnungen der Großhirnstrukturen. Die Kriterien für die Abgrenzung von Di-, Mes-, Metencephalon und Medulla oblongata werden im Ergebnisteil beschrieben. Links liegt caudal. **B:** Variation der Perspektive, dorso-rostrale Ansicht. **C:** Vergrößerung, ventrale Ansicht (vgl. B). Die Sehnerven spalten sich in mehrere Bänder auf und kreuzen kammartig im Chiasma (*; Typ III nach (Mogi et al., 2009)). **D:** Die Auswahl einzelner Strukturen lässt dessen Ausmaße und Form erkennen. Hier: Ventralansicht auf das Cerebellum. Links liegt rostral. **E:** Unter Amira® lässt sich die Transparenz einzelner Label-Dateien variieren. Strukturen und deren Lage im Inneren des Gehirns wie z.B. Blutgefäße und Ventrikel lassen sich dadurch sehr anschaulich darstellen.

BV Blutgefäß (rot), **CB** Cerebellum (grün), **DC** Diencephalon (orange), **MesC** Mesencephalon (türkis), **MetC** Metencephalon (dunkelblau), **MeOb** Medulla oblongata (violett), **oN l** linker Sehnerv (dunkelgrau), **oN r** rechter Sehnerv (hellgrau), **TC** Telencephalon (gelborange), **TO** Tectum opticum (gelb), **V** Ventrikel, * Chiasma Typ III nach (Mogi et al., 2009).



2.6 Fluoreszenzlaufexperimente

2.6.1 Vorexperimente: Die Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe und deren Konfiguration

Das Neurotracing sollte mit lipidgängigen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt werden. Diese Farbstoffe sind in der Lage sich an lipidhaltige Strukturen anzuhängen bzw. sich in ihnen zu lösen und sich dabei per Diffusion auszubreiten. Zellmembranen bestehen hauptsächlich aus Lipiden. Werden Nervenzellen mit dem Farbstoff markiert, können einzelne Zellen oder auch ganze Trakte von Nervenbahnen verfolgt werden.

Im Vorfeld wurde eine Auswahl der zur Verfügung stehender Fluoreszenzfarbstoffen DiA, DiD, Dil und DiO der Firma Invitrogen™ getroffen. Eine Übersicht der Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen kann Tabelle 6 entnommen werden. Die Farbstoffe lagen in dreierlei Konfigurationen vor: Paste, Pulver und große Kristalle. Die Farbstoffe wurden auf in Sörensen-Puffer gewaschene, in Agar eingebettete, frei präparierte Sehnervenquerschnitte (Abschnitt zwischen Augapfel und Chiasma; ca. 4 mm Länge; Vibratom: Schnittdicke 100 µm) aufgebracht und über einen Zeitraum von 10 Tagen auf ihre Anwendungsverträglichkeit geprüft. Während der gesamten Versuchsdauer erfolgte die Lagerung der Sehnervenquerschnitte in einer feuchten Kammer, um das Austrocknen zu verhindern. Der Fortschritt der voranschreitenden Färbung wurde täglich dokumentiert. Zudem wurde der Einfluss des Faktors Temperatur auf die Laufgeschwindigkeit genauer untersucht, indem sämtliche Farbstoffmodulationen jeweils bei Raumtemperatur (22°C), bei 30°C und bei 35°C angesetzt wurden. Weitere Auswahlkriterien waren unterschiedliche Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen der Farbstoffe untereinander, sowie deren Nachweisbarkeit durch vorhandene Fluoreszenzfiltersätze.

Die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten hierbei die Farbstoffe Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) und DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate) bei der Applikation von kleinen, pulverförmigen Kristallen. Im Vergleich zu den Konfigurationen „große Kristalle“ und „Paste“ ist die Kontaktfläche mit dem Versuchsmaterial maximiert, wodurch die laterale Diffusion begünstigt wird.

Es kristallisierte sich heraus, dass sich für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe am besten der am Leica M205 FA Fluoreszenzbino der AG Böttger installierte Filter „mCherry“ für Dil und der Filter „GFP“ für DiO eigneten. Des Weiteren zeigte sich, dass die Diffusion der Fluoreszenzfarbstoffe generell sehr langsam voranschreitet, aber eine höhere Temperatur

eine schnellere Ausbreitung über die Membranen zur Folge hat. Nachdem die eigentlichen Versuche somit über einen längeren Zeitraum anzusetzen waren, musste eine Verunreinigung des Versuchsmaterials durch Bakterien und Pilzen vermieden werden. Eine Zugabe von Azid in den Puffer nach Sörensen brachte das gewünschte Ergebnis.

Gleichermaßen vielversprechend für den Einsatz in Fluoreszenz-Experimenten zeigte sich die Anwendung von Sytox Green auf einen ebenfalls in Agar eingebetteten Sehnervenquerschnitt. Die Färbedauer von $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ h und die Verdünnung der 5 μmol Stammlösung auf 1:1000 führte zu einem recht ansehnlichen Ergebnis. Der Farbstoff bindet an die DNA der Zellen und macht die Zellkerne sichtbar. Stirbt eine Zelle, so ändert sich die Zellmembranstruktur und Sytox Green kann in die Zelle hinein diffundieren. Das macht den Farbstoff zu einem idealen Detektor toter Zellen. Die Anregung liegt bei 504 nm und die Emission bei 523 nm (siehe auch Tabelle 6).

2.6.2 Ansatz Fluoreszenzlaufexperimente

Um die Axone des linken und rechten Sehnervs zu unterscheiden und um diese optisch relevante Verarbeitungsgebiete des Gehirns ipsi- und contralateral zu verfolgen, kamen zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. Für den Versuchsansatz I wurden insgesamt 13 Sardellengehirne wie unter 2.2 beschrieben frei präpariert und die Augäpfel am Sehnervansatz abgetrennt (Abbildung 9 A). Als nächster Schritt wurden die Gehirne in mit Azid versetzten 4% Agar in sogenannte NuncTM Cell-Culture Treated Multidishes der Firma ThermoScientificTM eingebettet und die Gehirne enthaltenden Agarblöcke herausgenommen (Abbildung 9 B). Anschließend wurde jeweils ein separater trichterförmiger Zugang zu der linken und rechten Sehnervenspitze geschaffen und auf die Sehnerven eine kleine Menge Fluoreszenzfarbstoffpulver aufgebracht (linker Sehnerv Dil und rechter Sehnerv DiO; Abbildung 9 C). Daraufhin wurden die Zugänge wieder mit Agar versiegelt. Um das Austrocknen des Materials und das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe über die Versuchsdauer zu vermeiden, wurden die Gehirne in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss gelagert.

Um die Versuchsdauer abschätzen zu können, musste zunächst die von den Fluoreszenzfarbstoffen zurückzulegende Distanz bestimmt werden. Anhand eines freipräparierten Sardellengehirns mittlerer Größe wurden folgende Abschätzungen getroffen:

Abstand Sehnervenansatz am Augapfel bis zum Chiasma (Weg a): 2,6 mm; Abstand Seh-

2 Material und Methoden

nerv Chiasma bis Ende des Sehnervs / Eintritt ins Diencephalon (Weg b): 5,1 mm; Abstand Sehnervenaxone Eintritt Gehirn / Anfang Diencephalon bis optisches Tektum (Weg c): 5,3 mm; Abstand Sehnervenaxone Anfang bis Mitte des optisches Tektums (Weg d): 3,4 mm. In Summe ergab sich daraus eine gesamte Wegstrecke von 16,4 mm (Abbildung 9 G).

Geht man davon aus, dass die verwendeten lipophilen Farbstoffe Neuronen per lateraler Diffusion in der Plasmamembran mit einer Geschwindigkeit von 0,2 – 0,6 mm pro Tag in fixierten Gewebe markieren (Godement et al., 1987; Balice-Gordon et al., 1993), so ergibt sich für die Berechnung der Versuchsdauer:

Maximale Versuchsdauer: $16,4 \text{ mm (Laufstrecke)} / 0,2 \text{ mm (minimale Ausbreitungsgeschwindigkeit pro Tag)} = 82 \text{ Tage} / 7 \text{ Tage} = 11,7 \text{ Wochen}$. Minimale Versuchsdauer: $16,4 \text{ mm (Laufstrecke)} / 0,6 \text{ mm (maximale Ausbreitungsgeschwindigkeit pro Tag)} = 27,3 \text{ Tage} / 7 \text{ Tage} = 3,9 \text{ (Wochen)}$. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Berechnungen entschied ich mich für einen Versuchsdauer von 6 – 12 Wochen. Von den zuvor präparierten Gehirnen wurden sieben bei 22°C Raumtemperatur und sechs im Wärmeschrank bei 35°C über die Versuchsdauer gelagert.

Nach sechs Wochen wurde das erste Gehirn (gelagert bei 22°C) präpariert und auf die zurückgelegte Distanz der Fluoreszenzfarbstoffe untersucht. Die darauf folgenden Wochen wurden jeweils zwei weitere Gehirne untersucht (je ein Versuchsansatz gelagert bei 22°C und bei 35°C), bis nach Woche Zwölf alle Versuchsansätze aufgearbeitet waren.

Zudem gab es einen weiteren, von der bisherigen Standardprozedur abweichenden Versuchsansatz II, um für zukünftige Experimente eine weitere Methodik zu erproben. Hierbei wurden das Gehirn zunächst im Kopf belassen, die Hornhaut beider Augen entfernt und die Glaskörper samt Linse mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die darunter freiliegende Retina wurde mit Filterpapier abgetupft und der Neurotracer direkt auf die optische Furche, auch „optical Cleft“ genannt, der jeweiligen Retina aufgebracht (links DiI und rechts DiO). Bei dieser speziellen Stelle auf der Retina handelt es sich um die Austrittsstelle der Ganglienzellaxone, die als gerade Linie vom ventralen Netzhautrand nach mesiotemporal zieht (Abbildung 9 D, *). Zuvor wurde die optische Furche mit einer Insektennadel mehrfach perforiert, um die Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe in die Plasmamembran der Neuronen zu erleichtern. Die Augenbecher wurden daraufhin mit Azid versetzten 4%igen Agar versiegelt (Abbildung 9 D-F) und für die Versuchslaufzeit von sechs Wochen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur von 22°C unter Lichtausschluss gelagert.

Nach Ablauf der Versuchszeit folgte eine wie unter 2.2 beschriebene Freipräparation des

Gehirns, ein Abtrennen der Augäpfel am Sehnervenansatz und eine für den Schneidevorgang mit dem Vibratom nötige Einbettung in 4%igen Agar.

2.6.3 Anfertigung von Vibratomschnitten und Bildaufnahme

Die Gehirn enthaltenden Agarblöcke wurden zunächst mit einer Rasierklinge trapezförmig zurecht getrimmt, auf der Schneideplattform eines Vibratoms (Leica VT1000 S) zentral fixiert (zunächst wurde eine Streifen Panzertape auf die Schneideplattform aufgebracht und dann das Agarblöckchen mit Sekundenkleber darauf festgeklebt) und von posterior nach anterior, axial geschnitten (Schnittdicke 70 μm). Die Schnitte wurden in ein mit zuvor filtriertem, destilliertem Wasser gefüllten Schneidebecken des Vibratoms aufgefangen und mit einem Pinsel vorsichtig auf Objektträger überführt. Um zu verhindern, dass die Schnitte austrockneten, wurden sie bis zu dem Eindeckeln mit Deckgläschen und dem Versiegeln mit Klarnagellack in einer feuchten Kammer verwahrt.

Für die Bildaufnahme kam das Leica M205 FA Fluoreszenzbinokular mit Kübler Codix Metall-Halogenidlampe und die Leica Typ DFC340 Kamera zum Einsatz. Gearbeitet wurde mit dem Programm Leica Application Suite Advanced Fluorescence Version 2.4.1 (Build 6384) von Leica Microsystems. Die Bilder wurden unter Verwendung einer filterlosen Hellfeldaufnahme und den Filtersätze UV, GFP und mCherry aufgenommen (eine Auflistung der Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen kann Tabelle 6 entnommen werden).

Tabelle 6: Fluoreszenzfarbstoffe von Invitrogen™, und Fluoreszenzfilter des zur Verfügung stehenden Fluoreszenzbinokulars Leica M205 FA mit den jeweiligen Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen.

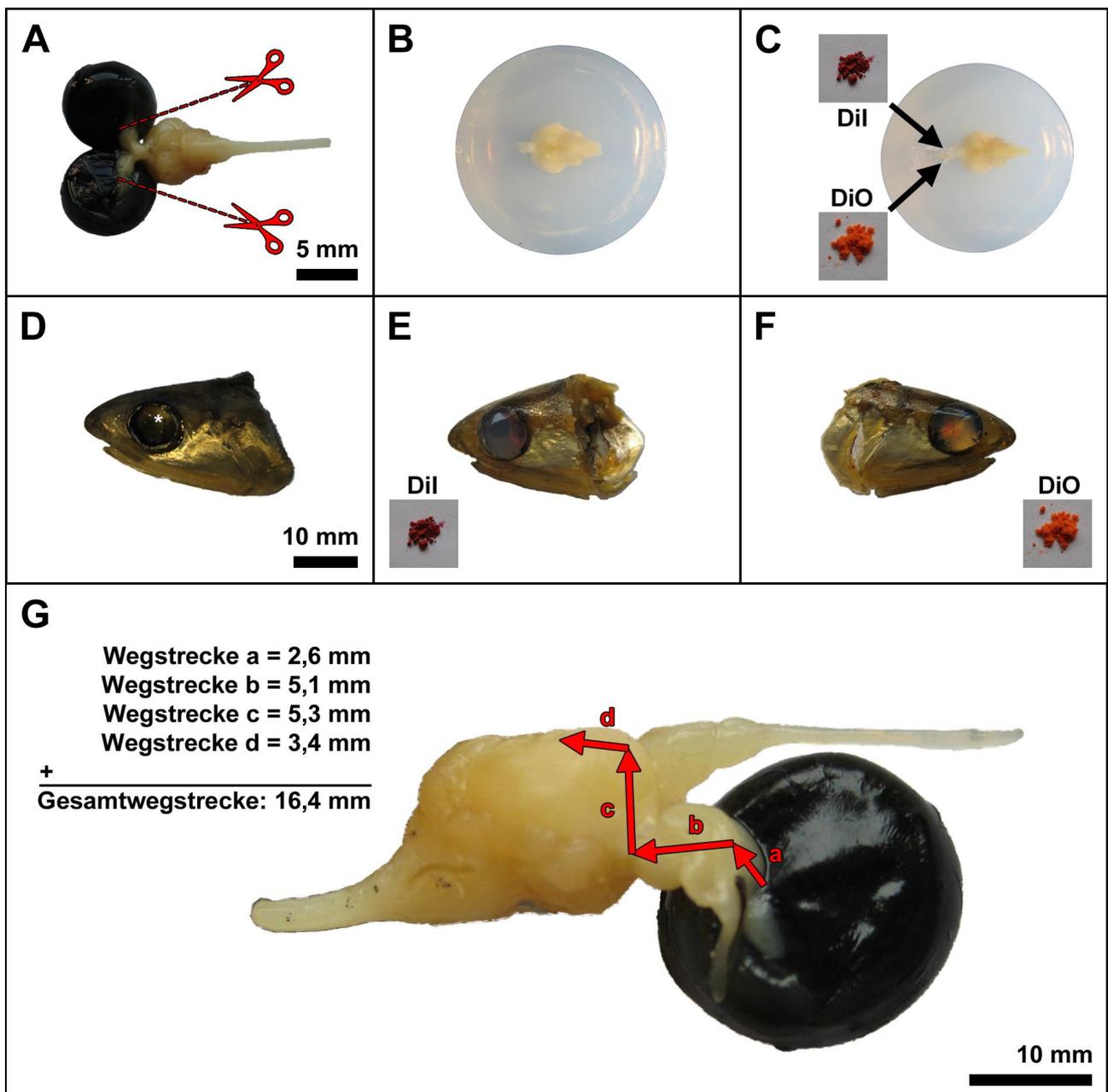
Farbstoffe:	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]
DiA	456	590
DiD	644	665
Dil	549	565
DiO	484	501
Sytox Green	504	523
Filtersätze:	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]
UV	340 -380	420
GFP	450 - 490	500 - 550
mCherry	540 - 580	600 - 610

Abbildung 9: Beschreibung der Versuchsansätze I (A-C) und II (D-E), sowie die Berechnung der zurück zulegenden Laufstrecke der lipidgängigen Fluoreszenzfarbstoffe Dil und DiO.

A-E: links anterior und rechts posterior; F-G: links posterior und recht anterior. ►

A: Ventralansicht auf ein frei präpariertes Sardellengehirn. Die Sehnerven wurden an der Augapfelbasis abgetrennt. **B:** Ventralansicht auf ein in 4%igen Agar eingebettetes Sardellengehirn. Der Agar ist mit Azid versetzt, um das Wachstum von Bakterien und Pilzen zu hemmen. **C:** Ventralansicht auf ein in Agar eingebettetes Gehirn. Ein keilförmiger Zugang ermöglicht die Applikation der pulverförmigen Fluoreszenzfarbstoffe Dil links und DiO rechts. Der Zugang wurde im Anschluss wieder mit Agar versiegelt. **D:** Lateralansicht auf leeren linken Augenbecher. Die Hornhaut wurde zuvor entfernt, der Glaskörper und die Linse mit einer Pasteurpipette abgesaugt. * markiert den Ursprung der optischen Furche der Retina. **E:** Auf die optische Furche des linken Auges wurde Dil Pulver gegeben und der Augenbecher mit Agar versiegelt. **F:** Auf die optische Furche des rechten Auges wurde DiO Pulver gegeben und der Augenbecher mit Agar versiegelt. **G:** Abschätzung der von den Fluoreszenzfarbstoffen zurückzulegenden Strecke per lateraler Diffusion; **a:** Distanz Sehnerv bis vor Chiasma; **b:** Chiasma bis Ende Sehnerv; **c:** Anfang Diencephalon bis Tektum; **d:** Anfang Tektum bis Tektum Mitte.

Für jeden einzelnen Vibratomschnitt wurden Bilder in allen vier Kanälen aufgenommen, die Belichtungszeit, der Gammawert und die Verstärkung der Einzelbilder optimiert und ein Overlay erstellt. Hierbei wurde den einzelnen Farbkanälen die passende mikroskopische Aufnahme zugeordnet und eingesetzt (das UV Bild in den Blau-Kanal, das mCherry Bild in den Rot-Kanal und das GFP Bild in den Grün-Kanal). Der Kontrast und die Helligkeit der jeweiligen Kanäle wurde hierbei so gewählt, dass die Bilder bestmöglich der Realität entsprachen, mit Anlehnung an die Hellfeldaufnahme.



2.7 Manuelle Verfolgung der Sehnerven unter Amira

Um zu verstehen, welchen Weg die Sehnerven innerhalb des Sardellengehirns nehmen, wurde eine separate Rekonstruktion unter Amira[®] durchgeführt. Als Ausgangspunkt diente der zuvor erstellte Bilderstapel der adulten Sardelle und die vorangegangene Zuordnung einzelner Gehirnareale in Labelfields der Großhirnstrukturen (siehe 2.5). Ausgehend vom linken und rechten optischen Nerv wurden die Sehnervenaxone von anterior nach posterior, soweit wie möglich verfolgt, markiert und einem jeweils eigenen Labelfield zugeordnet. Darüber hinaus wurden weitere Detailserien ausgewählter Gehirnregionen bei stärkerer Vergrößerung angefertigt. Die Bilderfassung erfolgte mit der Kamera Olympus[®] DP25 und dem Programm Cell^D Version 3.3 von Olympus[®]. Photoserie II umfasst 60% der rechten Gehirnhälfte um den Eintritt des Nervus opticus ins Gehirn. Mit dem Lichtmikroskop Olympus[®] CX41 und einem 10fach Objektiv (PlanC N 10x/0,25) wurden insgesamt 836 Einzelbilder mit 3606 x 3667 Pixeln aufgenommen, unter Amira[®] zu einem Bilderstapel übereinander gelagert, aligniert und einzelne Sehnervaxonfaserbündel rekonstruiert. Die Voxelgröße unter Amira betrug 0,635 x 0,635 x 1,5 µm.

Photoserie III ist eine weitere Detailserie, die den Eintritt des dorsalen Astes des rechten Nervus opticus in das Gehirn einschließt. Mit dem Lichtmikroskop Olympus[®] CX41 und einem 60fach Objektiv (Japan; UplanSApo 60x/1,20W; ∞/0,13-0,21/FN 26,5) wurden insgesamt 110 Einzelbilder bei einer Abmessung von 2560 x 1920 Pixeln aufgenommen, unter Amira[®] zu einem Bilderstapel übereinander gelagert, aligniert und einzelne Sehnervaxone markiert. Die Voxelgröße unter Amira betrug 56,2 nm. Die Erstellung der 3D-Modelle dieser Rekonstruktionen (s. Abb. 42, 43 und 45) erfolgte ebenfalls wie unter 2.5 beschrieben.

2.8 Abbildungstafelerstellung mit Photoshop

Die Zusammenstellung aller Abbildungstafeln, sowie die Erstellung von Maßstäben und Bildbeschriftungen erfolgte mit Adobe[®] Photoshop CS 5 (PS).

2.8.1 Atlastafeln

Die Atlastafeln setzen sich aus einer 3D-Abbildung (zur Orientierung bzgl. der Schnittebene), einem kleinen (originale Richardson-Färbung) und einem großen, in Anlehnung an das 3D-Modell gefärbten und gelabeltem Histologiebild zusammen.

Für die Histologiebilder wurden zunächst ausgewählte Schnittebenen bei 3,3-facher Vergrößerung unter Olyvia® abfotografiert, in PS eingeladen und gegebenenfalls gestitched. Als nächsten Schritt wurden die Ebenen auf den Hintergrund reduziert, Unreinheiten und Artefakte entfernt und die Gehirnquerschnitte so ausgerichtet, das sich oben dorsal und unten ventral befand. Es folgte die Anwendung der PS-Funktionen „Weißabgleich“, „Auto-contrast“ und „Unschärfe maskieren“. Die Arbeitsfläche wurde quadratisch erweitert (orientiert an größerer Bildseite). Für die kleineren im linken oberen Bereich des Atlanten positionierten Histologiebilder wurde an dieser Stelle die Bildgröße einheitlich auf 945 x 945 Pixel (8 x 8 cm) bei 300 dpi reduziert. Für die großen Histologiebilder wurde eine Bildgröße von 1890 x 1890 Pixel (16 x 16 cm) bei 300 dpi festgelegt. Des weiteren erfolgte eine Umwandlung der großen Histologiebilder in Graustufen, die Bildebene wurde dupliziert und passgenau übereinander gelegt. Einzelne Areale des Duplikats wurden ausgeschnitten, flächenfüllend gefärbt (angelehnt an die Farbkodierung der Gehirngroßgruppen) und die Deckkraft auf 40% reduziert, so das der Kontrast der Ursprungsebene hindurch schien. Daraufhin wurden beide Ebenen auf den Hintergrund reduziert und mit Adobe Illustrator® CS5 Version 15.0.2 die Anschnitte der einzelnen Gehirnareale innerhalb der Querschnitte gestrichelt umrandet.

Für die 3D-Abbildungen wurde die Surface-Datei des 3D-Gehirns in Amira® geladen, „SurfaceView“ aktiviert und das 3D-Model passend ausgerichtet. Danach wurde je eine Schnittebene an den Stellen positioniert (über „SurfaceCut“), an denen die Histologiebilder lokalisiert waren und mit dem „Snapshot-Tool“ von Amira® zum Erfassen von Screenshots abphotographiert. Die entstanden Bilder wurden in PS eingeladen und auf die Bildgröße von 945 x 624 Pixel (8 x 5,28 cm) bei 300 dpi gebracht.

Nach dem Erstellen einer Blankotafel im Satzspiegel 16 x 24 cm bei 300 dpi mit Hilfslinien, wurden für jede Atlastafel die vorbereiteten Bilder eingeladen, ausgerichtet und beschriftet.

2.8.2 Sonstige Abbildungen

Alle weiteren Abbildungstafeln der hier vorliegenden Arbeit wurden unter Anwendung ähnlicher Operationen, wie unter 2.8.1 beschrieben, geplant, zusammengestellt und ausgearbeitet. Einheitliche Richtlinien hierbei waren, falls eine Abbildung einen Rahmen bekam, dann fein (4 Pixel breit), die Höhe der Maßstabsbalken betrug 20 Pixel, die Überschrift von Bildern und deren Beschriftung wurde auf die Schriftart „Arial Bold“, Schriftgröße 16 Pt bzw. 10 Pt und die zusätzliche, spezielle Schrifteigenschaft „Schärfer“ einheitlich festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Das Gehirn der adulten Sardelle

Bei der Sardelle sind alle zu erwartenden Gehirngroßstrukturen vorhanden (siehe interaktiver Atlas im Anhang: iAtlas.pdf). Von anterior nach posterior gliedert sich das Sardellengehirn in das Telencephalon (TC), mit olfaktorischer Nerv und Bulbus olfactorius (BO), ventral liegen der linke (oN l) und rechte optische Nerv (oN r), das Diencephalon (DC), das Mesencephalon (MesC) bestehend aus dem ventral gelegenen Tegmentum (Tg) und dem, das dorsale Dach bildende, optische Tektum (TO), das Metencephalon (MetC) mit dem aufsitzenden Cerebellum (CB) und das Myelencephalon (MyelC) mit der Medulla oblongata (MeOb).

Ein Zusammenfassung der im folgendem zum Einsatz kommenden Abkürzungen kann dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang des Atlanten entnommen werden. Die Atlastafeln, auf die sich die Beschreibungen im folgendem Teil beziehen, sind am Ende von Kap. 3.1. zu finden und mit den Beschriftungen Abbildungen 10-27 versehen. Die zusätzliche Information der Querschnittsnummer einer jeden Atlastafel gibt die Lokalisation des jeweiligen Querschnitts innerhalb der Gesamtschnittfolge von insgesamt 8487 Einzelschnitten an (je niedriger die Schnittnummer, umso weiter anterior befindet man sich im Gehirn).

3.1.1 Telencephalon, olfaktorischer Nerv und Bulbus olfactorius

Vorne an der Fischeschnauze befinden sich zu beiden Seiten lateral die Riechgruben mit den darin enthaltenen Riechlamellen (innerhalb der 3D-Rekonstruktion nicht dargestellt). Deren Ableitung erfolgt über den olfaktorischen Nerv (I. Hirnnerv) in den olfaktorischen Bulbus, eine paarig angelegte, jeweils annähernd kugelige Struktur am anterioren Ende des Telencephalons. Der Bulbus besteht aus einer mit kleinen Zellen dicht gepackten zentralen Region (ICL), die peripher von einer glomerulären Schicht (GL) umgeben ist (Abb. 10; Querschnitt 3904). Paarig mediale (MOT) und laterale olfaktorische Trakte (LOT) ziehen weiter posterior in das sich in seinem Querschnitt herzförmige erweiternde Telencephalon hinein (Abb. 11; Querschnitt 4210). Letzteres endet dorsal abrupt in einer sackförmigen Ausstülpung, dem sogenannten Sacculus dorsalis (SD; Abb. 14; Querschnitt 5005) und geht ventral in das Diencephalon über.

Das Telencephalon lässt sich in zwei vom telencephalen Ventrikel (TCV) geteilte Hemisphären untergliedern. Diese lassen jeweils dorsale (TCd) und ventrale Abschnitte (TCv) erkennen (s. Abb. 12; Querschnitt 4490), die sich jeweils weiter untergliedern lassen (Abb. 11; Querschnitt 4210): Die dorsalen Abschnitte in eine mediale (TCdm), laterale (TCdl), zentrale (TCdc), und posteriore (TCdp) Zone. Die ventralen Abschnitte zeigen markante Kerne auf: Den dorsalen (TCvd), zentralen (TCvc) und ventralen (TCvv) Kern. Die Lage der Kerne innerhalb des Telencephalons wird meist durch deren Bezeichnung innerhalb des Telencephalons passend beschrieben. Der Vollständigkeit halber sei in diesem Zusammenhang der anteriore- (PPa; Abb. 13; Querschnitt 4710) in den posterioren übergehende parvozelluläre präoptische Nucleus des ventralen posterioren Telencephalons (PPp) erwähnt. Beide telencephalen Hälften werden von einer ventralen- (Cantv) und dorsalen Kommissur (Cantd) im anterioren Bereich miteinander verbunden (Abb. 12; Querschnitt 4490). Innerhalb des posterioren Telencephalons entspringen paarig die massiven Fasern der lateralen- (LFB) und medialen Vorderhirnbündel (MFB) und erstrecken sich ventralwärts in das Diencephalon (Abb. 13-16; Querschnitt 4710 bis 5465).

3.1.2 Linker- und rechter optischer Nerv

Ventral des Bulbus olfactorius entspringen der linke und der rechte Sehnerv (II. Hirnnerv, s. Abb. 10; Querschnitt 3904). Hierbei handelt es sich um massive Bündel, bzw. gefaltete Bänder bestehend aus den Ganglienzellaxonen der beiden Retinae. Weiter posterior fächern sich diese fingerförmig auf und überkreuzen im optischen Chiasma (CO; Abb. 12-13; Querschnitt 4490, 4710) mehrfach parallel (wie die Finger gefalteter Hände), bevor sie dann über das Diencephalon contralateral weiter in das optische Tektum ziehen (iAtlas.pdf).

3.1.3 Diencephalon

Den Übergang vom Sehnerv in das Diencephalon beschreibt der optische Trakt (OT; Abb. 13-14; Querschnitt 4710, 5005). Er bildet gleichzeitig die Anbindung des Telencephalons an das Diencephalon. Der Vorderrand des Diencephalons wird hier aufgrund des optischen Traktes um Schnitt 4630 definiert. Die für die visuellen Datenverarbeitung relevanten Kerne innerhalb des Diencephalons sind immer paarig angelegt und werden im weiteren Verlauf der Einfachheit halber nur innerhalb der linken Gehirnhälfte beschrieben.

3 Ergebnisse

Anterior zieht der parvozelluläre Nukleus des superfiziellen Prätektums (Psp; Abb. 13-15; Querschnitt 4710 bis 5212), einem um 45° geneigten Halbmond gleich, nach posterior, geht in den eiförmigen magnozellanulären Nukleus des superfiziellen Prätektums (Psm; Abb. 14; Querschnitt 5005) über und liegt wie in einer Schale ventral benachbart zum posterioren prätektalen Nukleus (PO). Etwas dorsal dieser Zweierkernkonstellation, am Übergang zum optischen Tektum, befindet sich ein kleiner Cluster großkerniger Zellen, der sogenannte Nukleus corticalis (NS; Abb. 14; Querschnitt 5005). Eine Zusammenfassung der Lage der optisch relevanten Kerne zueinander und innerhalb des Sardellengehirns ist in Abbildung 28 F dargestellt.

Der Psp ist im Vergleich zum übrigen optischen Trakt, bei gegebener Kontrastierung, eine hell erscheinende Struktur. Der Kern beinhaltet relativ große Zellen mit hellem Zytoplasma. Diese Zellen umgeben den Kern peripher, gehäuft lateral und mediodorsal, und treten zentral auch vereinzelt eingestreut innerhalb des Kerns auf. Der Psp wird von vielen myelinisierten Fasern umgeben bzw. durchzogen (Abb. 28 A).

Der Psm erscheint auf den ersten Blick heller als die umgebenden Nervenfasern. Er wird von vielen myelinisierten Nervenfasern durchzogen. Im dorsalen Bereich treten verstärkt längs verlaufende Bahnen auf. Charakteristisch für diesen Kern sind sehr große, regelmäßig vorkommende Zellen, mit im Vergleich zum Rest des Kerns auffallend hellem Zytoplasma und sehr deutlich erkennbaren Zellkernen (Abb. 28 B).

Der PO weist im Transversalschnitt mehrere kleine Zellen mit auffällig hellem Zytoplasma und feine Fasern auf, wodurch er im Vergleich zum Psm heller erscheint. Nach medial treten gehäuft längs verlaufende Nervenfasern auf (Abb. 28 C).

Der NS ist eine nicht deutlich abgegrenzte Struktur. Er besteht aus extrem großen Zellen (Durchmesser ca. 20 µm) mit hellem vakuolisierten Zytoplasma, umgeben von einer dunklen Matrix kaum myelinisierter Nervenfasern. Es besteht eine laterale Abgrenzung durch größere längs verlaufende Fasern (Abb. 28 D). Die Anordnung der Zellkerne beschreibt am ehesten die Form eines einseitig, zusammengedrückten Tetraeders (Abb. 28 E).

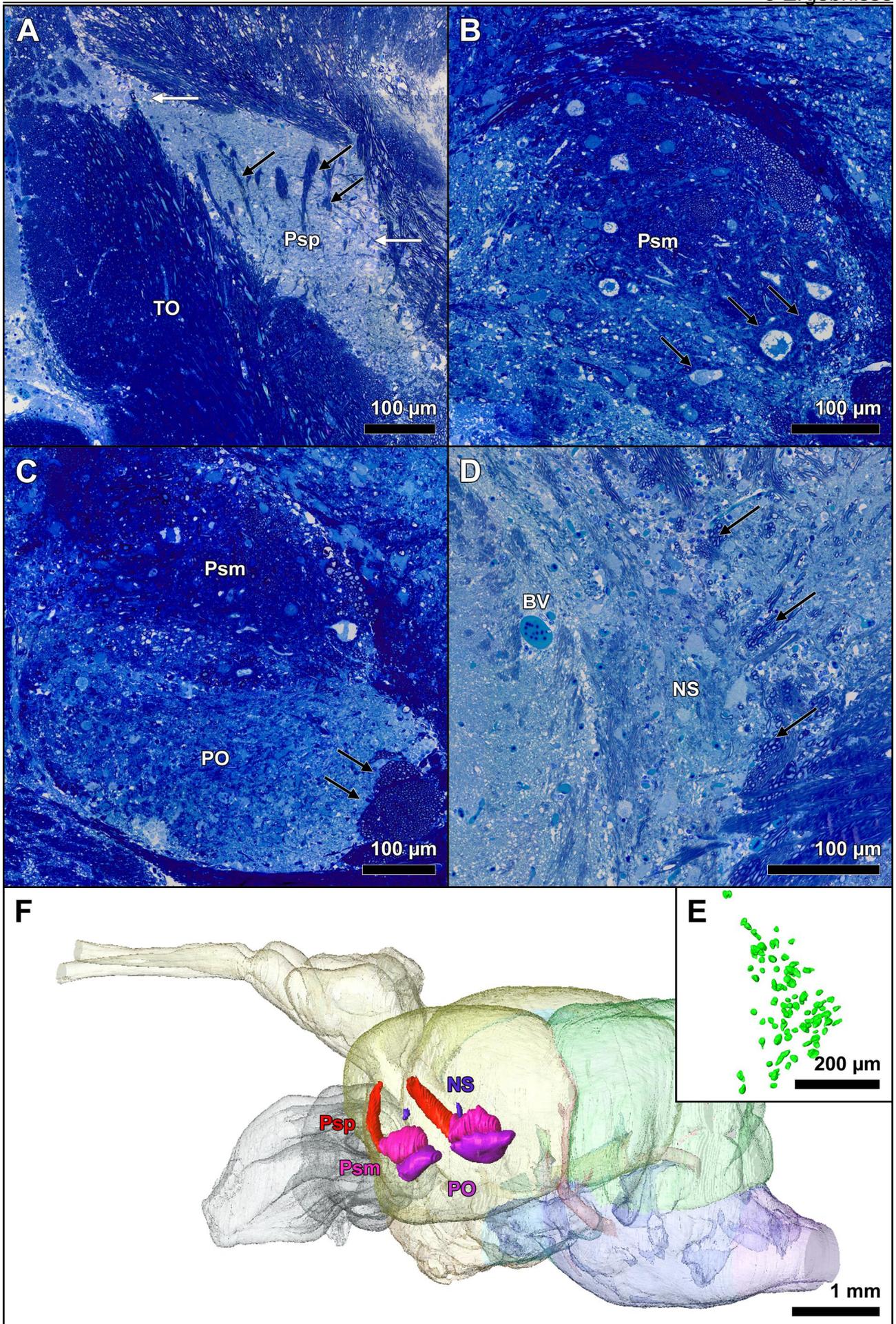


Abbildung 28: Für das Sehen relevante Kernregionen innerhalb der linken Gehirnhälfte der Sardelle.

A-D: Transversalschnitte; A-E: oben dorsal, unten ventral, links medial und rechts lateral; F: oben dorsal, unten ventral, links anterior und rechts posterior.

A: Der parvozelluläre Nukleus des superfiziellen Prätektums (**Psp**) erscheint im Vergleich zum umgebenden optischen Trakt (**OT**) hell. Lateral und mediodorsal gehäuft, zentral auch vereinzelt eingestreut, treten relativ große Zellen mit hellem Zytoplasma auf (helle Pfeile). Myelinisierte Fasern durchziehen den Kern (dunkle Pfeile) bzw. scheinen diesen zu innervieren.

B: Der magnozellanuläre Nukleus des superfiziellen Prätektums (**Psm**) hebt sich deutlich von den umgebenden, dunklen Nervenfasern ab. Er wird von vielen myelinisierten Nervenfasern durchzogen. Dorsal treten verstärkt längs verlaufende Bahnen auf. Sehr große, regelmäßig verteilte Zellen, mit hellem Zytoplasma und sehr deutlich erkennbaren Zellkernen sind für den Psm charakteristisch (dunkle Pfeile).

C: Der helle posteriore prätektale Nukleus (**PO**) setzt sich (im Schnittbild) aus mehreren kleinen Zellen mit auffällig hellem Zytoplasma und feinen Fasern zusammen. Nach lateral treten gehäuft längs verlaufende Nervenfasern auf (dunkle Pfeile).

D: Der Nukleus corticalis (**NS**) beschreibt eine nicht deutlich abgrenzbare Ansammlung auffällig großer Zellen mit hellem vakuolisiertem Zytoplasma, umgeben von einer dunklen Matrix kaum myelinisierter Nervenfasern. Es besteht eine laterale Abgrenzung durch größere längs verlaufende Fasern (dunkle Pfeile). **BV:** Blutgefäß.

E: 3D-Rekonstruktion der Zellkerne des Nukleus corticalis. Die Zellen sind in Form eines in der Tiefe einseitig, zusammengedrückten Tetraeders angeordnet.

F: Lateralansicht: Lagebeziehung der optisch relevanten Kerne innerhalb der 3D-Rekonstruktion des Sardellengehirns. **Blau:** NS; **lila:** PO; **pink:** Psm; **rot:** Psp.

Die optisch relevanten Kerne des Diencephalons sind vom ventrolateralen (VOT) und dorsomedialen optischen Trakt (DOT) eingebettet (Abb. 14; Querschnitt 5005). Die Trakte selbst ziehen weiter caudal in das optische Tektum hinein (Abb. 15-16; Querschnitt 5212, 5465). Auf gleicher Höhe mit den optischen Kernen besteht eine Verbindung beider Gehirnhälften am ventralen Rand über die postoptische Kommissur (Cpop; Abb. 14; Querschnitt 5005). Weiter dorsal dazu und unterhalb der an den diencephalen Ventrikel ventral anschließenden suprachiasmatischen Region (ScR) besteht eine weitere Kommissur (*; Abb. 14; Querschnitt 5005) mit kreuzenden Fasern von einer Gehirnhälfte zur anderen, die bislang bei anderen Vertretern der Teleostier offenbar nicht beschrieben ist.

Dorsal liegt im anterioren Bereich die Habenula (Hab; Abb. 14; Querschnitt 5005) als Teil des Epithalamus: ein keilförmiges, die tektalen Hälften trennendes Konstrukt, das von anterior nach posterior ventral zieht und in seinem Durchmesser abnimmt. Das Zentrum des Diencephalons wird vom Thalamus, unterteilt in einem dorsalen und ventralen Anteil (DT/VT; Abb. 14-15; Querschnitt 5005, 5212) ausgefüllt. Ventral dazu liegt der Hypothalamus (H), unterteilt in eine caudale, dorsale und ventrale periventriculäre Zone (Hc, Hd, Hv;

Abb. 16-17; Querschnitte 5465, 5648). Bevor sich am posterioren Ende des Diencephalons ventral des Hypothalamus die Hirnanhangsdrüse (Pit; Abb. 17; Querschnitt 5648) anschließt - ein langgezogenes, in seinem Querschnitt mandelförmiges Gebilde - lässt sich der dorsal und ventral vom diencephalen Ventrikel (DCV) eingerahmte posteriore tuberale Nukleus (PTN; Abb. 16; Querschnitt 5465) erkennen. Lateral zu beiden Seiten wird der Hypothalamus anfangs vom Torus lateralis (TLa; Abb. 15; Querschnitt 5212) und weiter posterior zudem vom darunter auftretenden diffusen Nukleus des inferioren Lobus (DIL; Abb. 15; Querschnitt 5212) flankiert. Der Querschnitt des Diencephalons gleicht an diesem Punkt der Silhouette eines Schmetterlings (Abb. 16; Querschnitt 5465). Die obere Hälfte des dorsalen Flügels stellt der in seinem Querschnitt kreisrunde Torus semicircularis (TS). Der ventrale Teil des „Schmetterlingsflügels“ wird vom Einzug des okulomotorischen Nervs (III.) zwischen TLa und DIL eingeschnitten. Der Nerv verläuft posterior gen medial und endet schließlich im anterioren Mesencephalon. Ähnlich der Verlauf des trochlearen Nervs (IV.): Dieser begleitet lateral den TLa über dessen gesamte Länge hinweg und tritt erst auf der Höhe des Metencephalons in das Gehirn ein (Abb. 20; Querschnitt 6455).

Medioventral des paarigen TS ist der rundliche Querschnitt zweier Faserbündel angeschnitten (Abb. 17; Querschnitt 5648). Es handelt sich hierbei um die lateralen longitudinalen Faszikel (LLF). Sie erstrecken sich posterior bis ins Mesencephalon.

Das dorsale Dach der posterioren Hälfte des Diencephalons bildet der Nukleus des medialen longitudinalen Faszikels (NMLF; Abb. 17; Querschnitt 5648). Dieser Kern besteht aus großen verstreuten Zellen, die den Ursprung langer Axone bilden und einen nach posterior absteigenden Pfad formen, den sogenannten medialen longitudinalen Faszikel (MLF). Der Pfad verläuft in zentraler Position vom posterioren Ende des Diencephalons, über Mesencephalon und Metencephalon bis ins Myelencephalon und wandert dabei langsam ventral (Abb. 17-27; Querschnitt 5648 bis 8198).

Noch bevor der okulomotorische Nerv in das Gehirn eintritt, besteht innerhalb der Hypophyse eine Verbindung beider Gehirnhälften durch die horizontale Kommissur (Chor; Abb. 15; Querschnitt 5212). Caudalwärts kommt es hierbei zu einer Aufspaltung zweier Faserbündel, die sich seitlich nach außen von einander entfernen und schließlich im posterioren Diencephalon verlaufen. Parallel dazu wird das ganze Gebilde zu beiden Seiten vom präglomerulären Komplex (PGC) flankiert. Diese wurmförmigen Gehirnkern beginnen auf gleicher Höhe wie die Chor und ziehen posterior nach dorsal. In etwa auf gleicher Höhe mit der Chor liegt ein wenig weiter anterior am dorsalen Diencephalonrand die posteriore Kommissur (Cpost; Abb. 15; Querschnitt 5212).

3.1.4 Mesencephalon

Der Vorderrand des Mesencephalons wird hier aufgrund des optischen Tektums um Schnitt 4710 definiert.

Der ventrale und der dorsale optisch Trakt ziehen anterior in das optische Tektum und sind somit auch Teil des dorsalen Mesencephalons (Abb. 14; Querschnitt 5005). Das optische Tektum ist eine aus zwei nebeneinander gelegen, um 45° seitlich geneigten und zu hakenförmigen Halbkugeln geformte Struktur und zeigt histologisch eine auffällige Schichtung (Abb. 16; Querschnitt 5465). Sie bedeckt die obere Hälfte des Di- und Metencephalons und reicht bis über die anteriore Hälfte des Cerebellums (Abb. 14-21; Querschnitt 5005 bis 6725).

Anterior liegen die dorsalen Hälften sehr nahe zusammen, rücken dann aber nach posterior weiter auseinander. Das Band des Torus longitudinalis (TL) schmiegt sich ventral dem Übergang beider Sphären an und verbindet beide tektalen Hälften über die tektale Kommissur (Ctec) miteinander (Abb. 15; Querschnitt 5212). Der TL spaltet sich posterior in zwei, sich in den tektalen Ventrikel erstreckende Auswüchse auf (Abb. 20; Querschnitt 6455).

Das optische Tektum lässt sich in drei periventrikuläre Zonen (PGZL1-3) untergliedern. PGZL1 grenzt direkt an den tektalen Ventrikel (TeV) an. Die äußerste Schicht ist die PGZL3. Sie beinhaltet dicht gepackte Zellen. Zwischen der PGZL1 und der PGZL3 liegt die PGZL2. PGZL1 und PGZL2 bestehen aus lose angeordneten Zellen und Fasern. Von innen nach außen nimmt der Zellkernanteil zu und der Faseranteil ab (Abb. 15; Querschnitt 5212).

Den ventralen Teil des Mesencephalons stellt das Tegmentum. Im anterioren Drittel endet dorsal der TS und ventral der TLa. Den anterioren ventralen Boden bildet der DIL (Abb. 16; Querschnitt 5465). Zu zwei massiven Paketen angewachsen (Abb. 18; Querschnitt 5971), nimmt er weiter posterior ab und verschwindet innerhalb der ersten tegmentalen Hälfte (Abb. 19; Querschnitt 6184). Ventral des MLF schließt sich der Nukleus interpeduncularis (NIn; Abb. 19; Querschnitt 6184) an, der zugleich der am weitesten caudal liegende Nukleus des ventralen Mesencephalons ist.

Ventrolateral des Tegmentums treten zwei große Faserbündel auf. Es handelt sich hierbei um die Trigeminusnerven (V.; Abb. 19; Querschnitt 6184). Sie verschmelzen weiter caudal mit dem Hirnstamm (Abb. 21-22; Querschnitt 6725, 6996).

3.1.5 Metencephalon

Auf das MesC folgt posterior das ventral gelegene Metencephalon. Im Gehirnquerschnitt nimmt es in etwa die untere Hälfte des Gehirns ein und erscheint rundlich mit einer dorsalen konkaven Eindellung (Abb. 18; Querschnitt 5971). Sein Vorderrand wird hier aufgrund des Cerebellums um Schnitt 5190 definiert.

Am ventralen Rand erstreckt sich beidseitig der gekreuzte L-förmige Tractus tectobulbaris cruciatus (TTBc; Abb. 20; Querschnitt 6455) und weiter lateral der Tractus tectobulbaris rectus (TTBr; Abb. 20; Querschnitt 6455), beides Derivate des tectobulbaren Traktes. Erstere enden im vorderen Drittel des ventralen MetC, der TTBr erstreckt sich über die gesamte vordere Hälfte. In diesem Bereich kommt es auch zum dorsolateralen Eintritt der Trigeminierven (V.) bzw. lateralen Eintritt der motorischen Wurzel der Trigeminierven (V.) in das ventrale MetC (Abb. 21; Querschnitt 6725).

Im anterioren Bereich der zweiten Gehirnhälfte kommt es zu einer Zweiteilung des MLF durch die Commissura ventralis rhombencephali (Cven; Abb. 23; Querschnitt 7267). Der obere, ventral dem rhombencephalen Ventrikel anliegende Aspekt beinhaltet stark myelinisierte riesige Axone, sogenannte Mauthnerzellen (MA). Sie lassen sich bis in die MeOb des MyelC verfolgen (Abb. 24-27; Querschnitt 7488 bis 8198).

Am posterioren Ende des ventralen MetC treten lateral zu beiden Seiten die Oktaval- (VIII.) und Seitenliniennerven in das Gehirn ein (Abb. 25; Querschnitt 7668). Sie sind für das Hören und den Gleichgewichtssinn zuständig.

Das **Cerebellum** ist eine dem ventralen Metencephalon aufsitzende, groß-kugelige Struktur mit einem nach anterior zungenförmigen Ausläufer, der Valvula cerebelli (Va; Abb. 7 D; iAtlas.pdf). Die Va ist am anterioren Pol zweigeteilt. Zentral befindet sich eine „molekulare“, vor allem Fasern enthaltende Schicht (mVa). Sie wird von einer „granulären“ Schicht (gVa) umgeben. Die mVa besteht überwiegend aus Fasern und einigen wenigen Zellkernen. Die gVa ist dagegen dunkler gefärbt und weist dicht gepackte, kleinere Zellkerne auf (Abb. 16; Querschnitt 5465).

Nach posterior spaltet sich die mVa in ein dorsales und ein ventrales Band auf (Vad/Vav; Abb.17; Querschnitt 5648). Das Vad bildet das dorsale Dach der Va und grenzt ventrolateral an die gVa, im Gegensatz zum Vav, das rundum von der gVa umgeben ist. Der Querschnitt der Va gleicht einem untersetzten Pilz. Am Übergang zu der groß-kugeligen Kleinhirnkomponekte spaltet sich das Vad in zwei laterale Ausläufer auf (Abb. 20; Querschnitt

3 Ergebnisse

6455), die weiter posterior verschwinden. Dorsal wird das Vad vom Corpus cerebelli (Cce) ersetzt (Abb. 20; Querschnitt 6455). Dieser steht ventral über eine breite Brücke mit dem Vav in Verbindung und bildet das dorsale Dach der groß-kugeligen Cerebellumstruktur. Weiter posterior verschwindet das mVav und die zuvor ventrolateral umgebende gVa wird hier als granuläre Schicht des Corpus cerebelli (gCce) bezeichnet (Abb. 21; Querschnitt 6725).

Die gCce beschreibt nach posterior eine Art horizontalen Balken, der dorsal den Cce von der ventral darunter liegenden Eminentia granularis (EG) trennt (Abb. 22; Querschnitt 6996). Am posterioren Ende ist die EG nicht länger vorhanden und die gCce wird ganz vom Cce umgeben (Abb. 24-25; Querschnitt 7488, 7668).

Die EG ist in ihrem zellulärem Aufbau ähnlich der gCce. Sie tritt am Übergang der Va zur groß-kugeligen Cerebellumstruktur als Schicht zwischen ventralem Metencephalon und gCce in Erscheinung (Abb. 21; Querschnitt 6725), verschiebt sich posterior weiter dorsal (Abb. 22; Querschnitt 6996), spaltet sich in zwei Loben auf (Abb. 23; Querschnitt 7267) und verschwindet kurz drauf wieder. Zentral umgibt sie dorsolateral den Lobus caudalis cerebelli (Lca; Abb. 22; Querschnitt 6996), eine eher faserige Struktur mit wenigen Zellkernen. Diese entspringt in etwa auf gleicher Höhe wie die EG, in Form zweier kleiner, vertikal orientierter, ovaler Ausläufer, die im posterioren Verlauf fusionieren. Der Lca zieht in seinem glockenförmigen Querschnitt nach dorsal (Abb. 23; Querschnitt 7267), dehnt sich lateral aus und fusioniert weiter posterior mit dem Cce (Abb. 24; Querschnitt 7488). Zunächst dorsal zum rhombencephalen Ventrikel (RV, s.u.) benachbart, wird der Lca im hinteren Drittel des Cerebellums von der Crista cerebellaris (CC) nach dorsal verdrängt (Abb. 22; Querschnitt 6996). Die CC ist somit fortan der ventrale Boden des Cerebellums. Nach posterior bildet die CC zunächst zwei dorsolaterale Ausläufer, die sich gegen Ende des Cerebellums zurückziehen und posterior in zwei kugeligen Ausläufern enden (Abb. 25; Querschnitt 7668). Der dorsale Ast des RV verläuft innerhalb der CC (Abb. 22; Querschnitt 6996). Das dorsale Dach des Ventrikels stellen die ventralen Fasern des Cerebellums (CvF; Abb. 25; Querschnitt 7668). Im Querschnitt als zunächst zwei separate, kleine Pakete dicht gepackter Zellen sichtbar, kommt es posterior zur Fusion. Der Querschnitt gleicht einer sich nach posterior im Ausmaß erweiternden Bischofsmütze (Abb. 23; Querschnitt 7267). Am hinteren Ende der Cerebellumskugel treten die CvF nach dorsal durch, teilen den Cce in zwei Hälften (Abb. 25; Querschnitt 7668), bilden zwei Ausläufer und winden sich dorsal für eine kurze Strecke gen anterior.

3.1.6 Myelencephalon und Übergang ins Rückenmark

Den Übergang des MyelC ins Rückenmark bildet die MeOb. Ihr Vorderrand wird hier durch des Ende der Pons, der Verbindung von Hirnstamm mit Cerebellum, um Schnitt 7930 definiert. Im anterioren Bereich liegt lateral des mächtigen und schlitzförmigen RV der vagale Motornukleus (Nxm; Abb. 26; Querschnitt 7948). Das dorsale Dach bildet der vagale Lobus (LX; Abb. 26; Querschnitt 7948), der weiter caudal vom „Nukleus von Cajal“ (NC; Abb. 27; Querschnitt 8198) ersetzt wird. Ventrolateral treten auf beiden Seiten Fasern in das Gehirn ein. Sie sind Teile der Vagalnerven (X.). Sie überspannen bogenartig den sekundären Geschmackstrakt (SGT) und die darin eingebettete, absteigende trigeminale Wurzel (DV; Abb. 26; Querschnitt 7948).

Weiter caudal ist der rhombencephale Ventrikel zentral nicht länger vorhanden. Er wird durch den mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllten Zentralkanal (C) ersetzt (Abb. 27; Querschnitt 8198). Dieser setzt sich caudalwärts durch das gesamte Rückenmark fort.

3.1.7 Ventrikuläres System

Der schmale Raum zwischen den beiden telencephalen Hälften wird vom telencephalen Ventrikel (TCV) eingenommen (Abb. 11-13; Querschnitt 4210 bis 4710). Dieser umgibt auch dorsal bzw. dorsolateral die beiden telencephalen Hemisphären und wird von einem membranösen Dach begrenzt, welches bei der vorangegangenen Präparation nicht erhalten werden konnte.

Der mit Cerebrospinalflüssigkeit gefüllte Raum geht caudal in den diencephalen Ventrikel (DCV; Abb. 14; Querschnitt 5005) über, welcher sich in seinem Querschnitt zu einer vertikal langezogenen Ellipse weitet und innerhalb des Gehirns nach ventral wandert (Abb. 15; Querschnitt 5212). Auf Höhe des Hypothalamus bildet der Ventrikel am ventralen Rand zu beiden Seiten Ausläufer aus (LR; Abb. 16; Querschnitt 5465), die sich weiter caudal wieder zurückbilden. Der dorsale Anteil des diencephalen Ventrikels geht in den tektalen Ventrikel (TeV) über.

Die periventrikuläre Zone 1 des optischen Tektums bildet das Dach und die Seiten des tektalen Ventrikels (Abb. 15-17; Querschnitt 5212 bis 5648). Ventral wird der tektale Ventrikel vom Diencephalon und Mesencephalon bzw. Tegmentum begrenzt. Der tektale Ventrikel umgibt die Valvula Cerebelli, einen nach anterior gerichteten, zungenförmigen Ausläufer des Cerebellums (Abb. 15-17; Querschnitt 5212 bis 5648). Im weiteren caudalen Verlauf

3 Ergebnisse

bestehen zwei fasrige Verbindungen, die des Cerebellum mit dem Metencephalon verbinden (Abb. 18; Querschnitt 5971). Zusammen mit dem TL oberhalb des Cerebellums wird der tektale Ventrikel dreigeteilt (Abb. 18; Querschnitt 5971). Links und rechts des Cerebellums verlaufen zwei, sich nach hinten hin verkleinernde tektalventrikuläre Ausläufer. Mit dem Ende des an das Cerebellum anliegenden optischen Tektum enden diese blind (Abb. 21; Querschnitt 6725). Der dritte Teil verläuft zwischen den zwei fasrigen Verbindungen des Cerebellums mit dem Metencephalon und ist zugleich die Verbindung zum rhombencephalen Ventrikel (RV; Abb. 20; Querschnitt 6455).

Der rhombencephale Ventrikel spaltet sich nach hinten hin in einen dorsalen und einen ventralen Arm auf (Abb. 22; Querschnitt 6996). Der dorsale Arm verläuft unterhalb der ventralen Fasern des Cerebellums, bildet zu beiden Seiten Ausläufer aus (Abb. 23; Querschnitt 7267), die sich zum Ende des Cerebellum hin zurückbilden. Der ventrale Arm weitet sich vertikal nach caudal auf (Abb. 24-26; Querschnitt 7488 bis 7948). Sein Erscheinungsbild gleicht dem einer Haifischflosse (iAtlas.pdf). In seinem weiteren Verlauf flacht der ventrale Teil des rhombencephalen Ventrikels abrupt ab und geht in den Zentralkanal (C) des Rückenmarks über (Abb. 27; Querschnitt 8198).

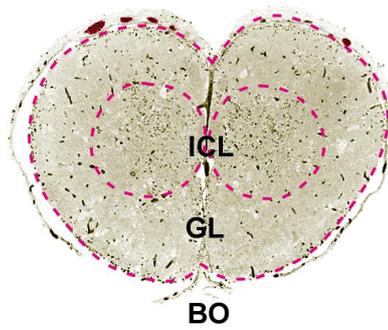
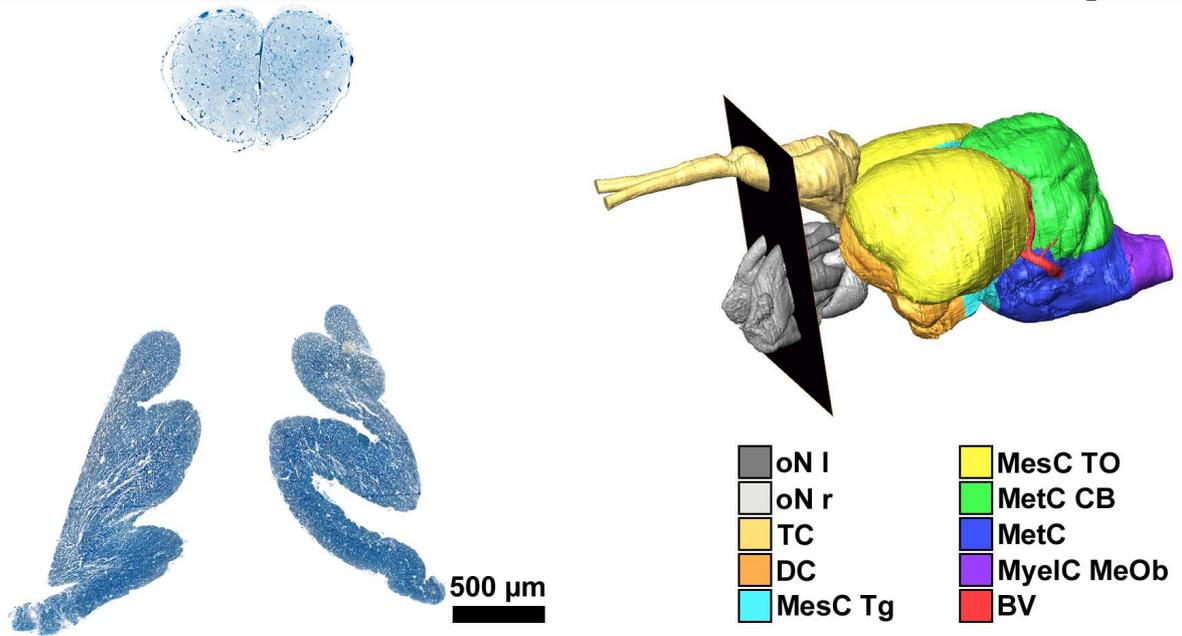
Die Lage und Form der Ventrikel innerhalb des Gehirns ist unter iAtlas.pdf anschaulich zusammengefasst.

Abbildung 10: Querschnitt 3904



Querschnitt 3904 erfolgte im anterioren Teil des Telencephalons inmitten des Bulbus olfactorius (**BO**). Der Bulbus ist aus zwei Schichten aufgebaut. Zentral besteht er aus einer Schicht dicht gepackter Zellen (**ICL**), die von einer äußeren glomerulären Schicht (**GL**) umgeben ist.

Ventral liegen die Sehnerven des linken (**oN l**) und rechten Auges (**oN r**). Sie bestehen überwiegend aus Axonen ableitender (retinofugaler) Ganglienzellen.



500 μm

Abbildung 11: Querschnitt 4210

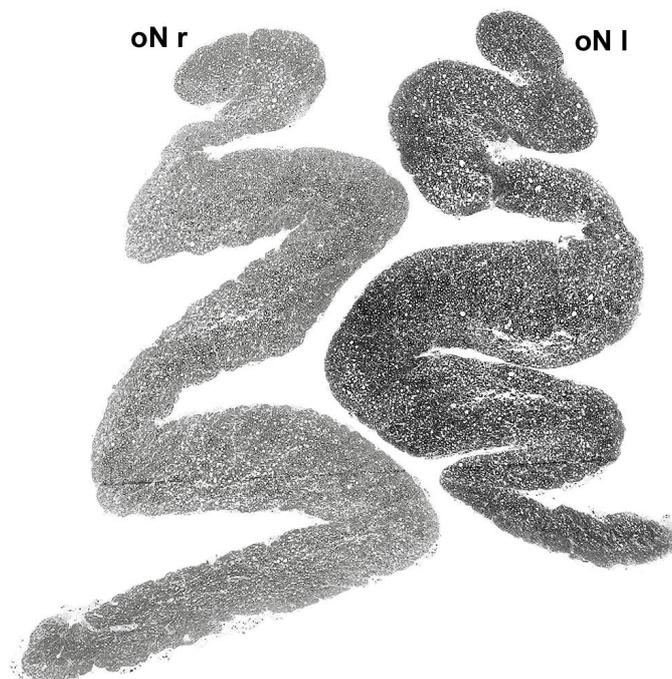
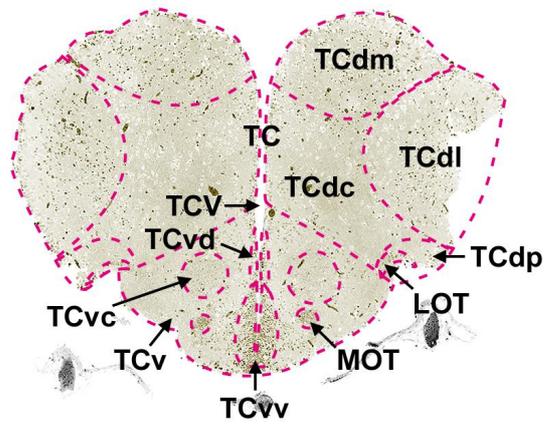
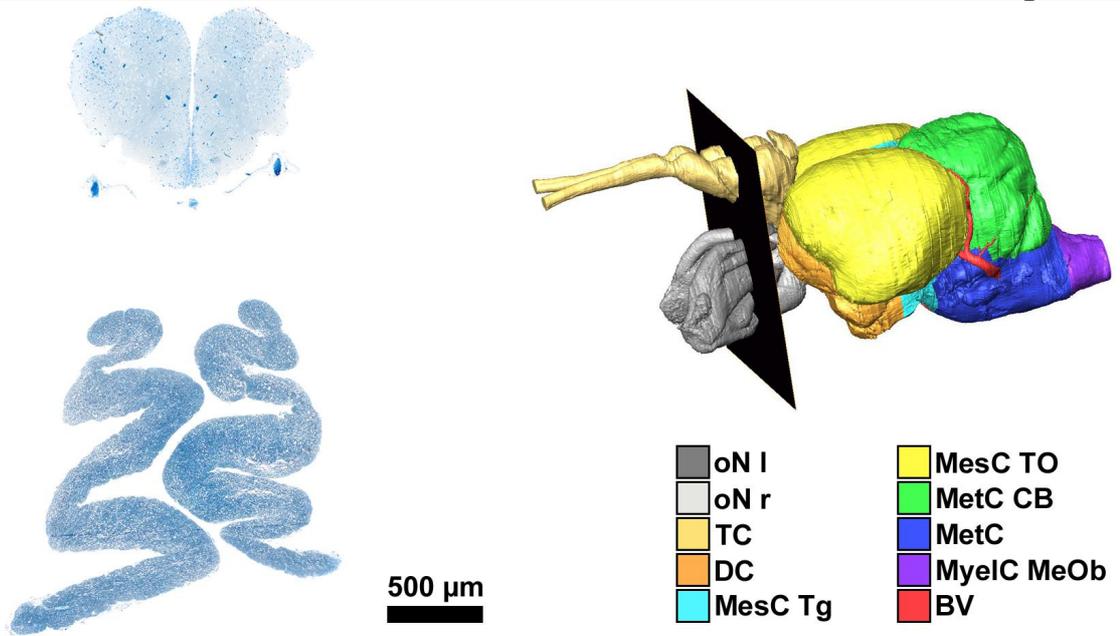


Querschnitt 4210 zeigt die Zweiteilung des Telencephalons in zwei Hemisphären die nur vom telencephalen Ventrikel (**TCV**) getrennt werden. Der Ventrikel erstreckt sich für gewöhnlich über den gesamten dorsalen und dorsolateralen Teil des Telencephalons, allerdings konnte das Dach der dünnen ventrikelumgebenden Membran bei der Präparation nicht erhalten werden, so dass die Ursprungsform des Ventrikels in den Querschnitten nicht mehr wahrgenommen werden kann.

Das Telencephalon lässt sich unterteilen in einen ventralen und dorsalen Bereich. Der ventrale Bereich des Telencephalons (**TCv**) weist neben einem zentralen Bereich (**TCvc**) in periventrikulärer Position einen dorsalen (**TCvd**) und einen ventralen Nukleus (**TCvv**) auf. Der dorsale Bereich des Telencephalons (**TCd**) gliedert sich in eine posteriore (**TCdp**), eine laterale (**TCdl**), eine mediale (**TCdm**) und eine zentrale Zone (**Tcdc**).

Den olfaktorischen Bulben entspringen ein medialer und ein lateraler olfaktorischer Trakt (**MOT/LOT**), die die olfaktorischen Bulben mit den Hemisphären des Telencephalons und weiterer caudaler Gehirnregionen verbinden. Der laterale olfaktorische Trakt befindet sich am lateralen Übergang zwischen dorsalen und ventralen Bereich des Telencephalons, während der mediale olfaktorische Trakt ventral des zentralen ventralen Bereichs des Telencephalons verläuft.

Ventral nähern sich die Sehnerven des linken (**oN l**) und rechten Auges (**oN r**) weiter einander an.



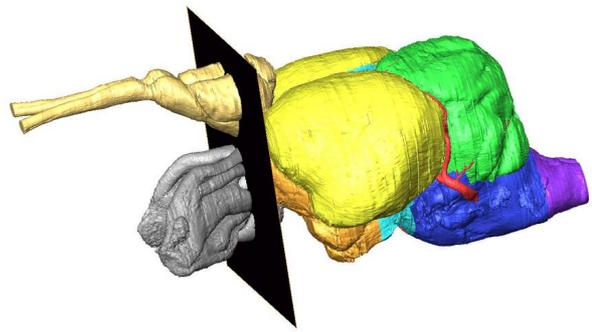
500 µm

Abbildung 12: Querschnitt 4490



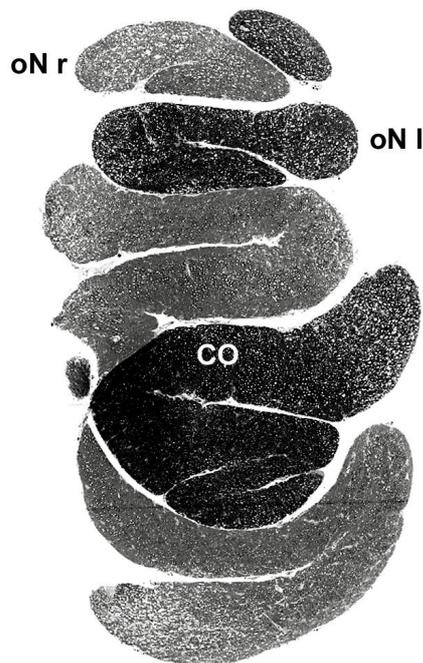
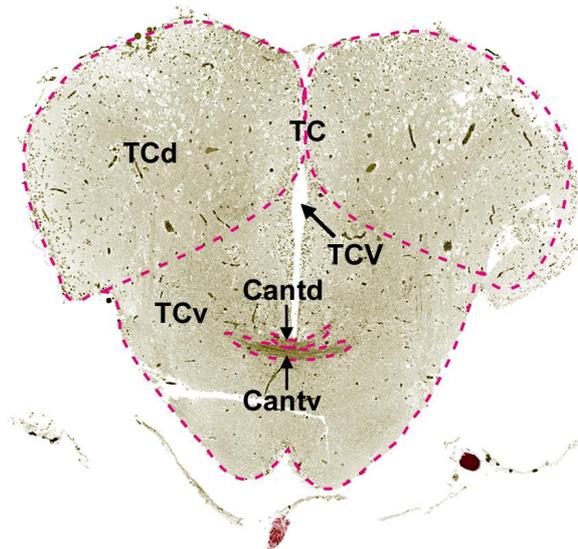
Querschnitt 4490 zeigt die anteriore Kommissur, die sich in einen dorsalen (**Cantd**) und einen ventralen Teil (**Cantv**) unterteilt. Das Telencephalon ist ähnlich wie in Schnitt 4210 in einen dorsalen (**TCd**) bzw. ventralen Bereich (**TCv**) gegliedert. Die telencephalen Hemisphären sind dorsomedial vom telencephalen Ventrikel (**TCV**) getrennt.

Ventral überlagern sich der linke- (**oN l**: dunkelgrau) und der rechte optische Nerv (**oN r**: hellgrau). Beide Sehnerven haben sich zuvor in mehrere Pakete aufgefächert und kreuzen nun fingerförmig im optischen Chiasma (**CO**).



- | | |
|---|--|
|  oN I |  MesC TO |
|  oN r |  MetC CB |
|  TC |  MetC |
|  DC |  MyelC MeOb |
|  MesC Tg |  BV |

500 μ m



500 μ m

Abbildung 13: Querschnitt 4710 ▶

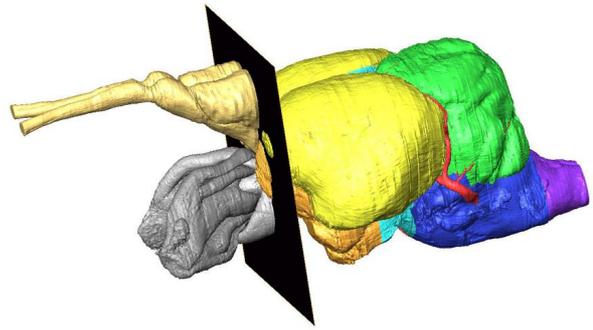
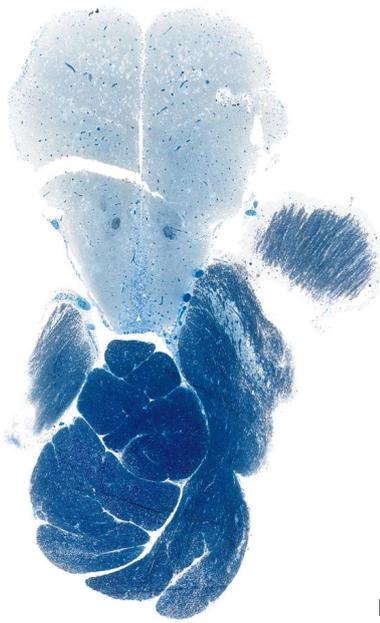
Querschnitt 4710 verläuft durch den caudalen Teil des Telencephalons (**TC**), am Übergang zum Diencephalon (**DC**). Die Gliederung des Telencephalons in zwei Hemisphären, getrennt durch den telencephalen Ventrikel (**TCV**), sowie die Unterteilung in einen dorsalen und ventralen Teil (**TCd/TCv**) entspricht dem bisher beschriebenen Aufbau.

Den diencephalen Ventrikel (**DCV**) umschließend, findet sich der anteriore parvozelluläre Nukleus (**PPa**). Weiter caudal geht dieser Kern in den posterioren parvozellulären Nukleus (**Ppp**, Kern liegt zwischen Schnittebene 4710 und 5005) über. Beide Kerne sind Bestandteil des Diencephalons. Sie werden lateral vom medialen Faserbündel des Vorderhirns (**MFB**) und weiter distal vom lateralen Faserbündel des Vorderhirns (**LFB**) flankiert. Im weiteren Verlauf verbinden diese zwei massiven Faserbündel Telencephalon mit Diencephalon und erreichen auch weiter caudal gelegene Gehirnregionen.

Ebenfalls angeschnitten ist der anteriore Teil des optischen Traktes (**OT**). Auf der rechten Seite lässt sich klar der erste für die visuelle Verschaltung relevante Kern erkennen, der sogenannte parvozelluläre Nukleus des superfiziellen Prätektums (**Psp**).

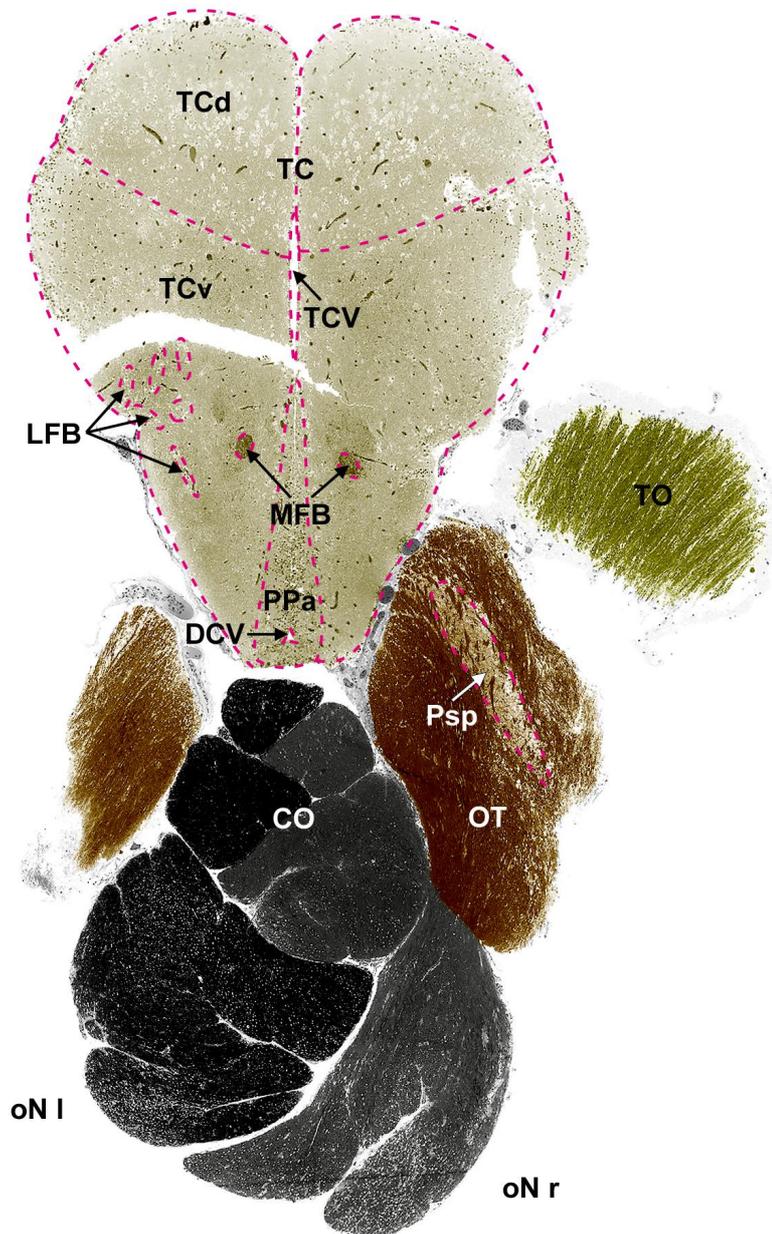
Dorsolateral des optischen Traktes ist der vorderste Ausläufer des optischen Tektums (**TO**) angeschnitten. Man beachte die parallel zur Schnittebene verlaufenden Axone der äußersten tektalen Schicht.

Die optischen Nerven (**oN r** und **oN l**) haben die Rochade im Chiasma opticum (**CO**) durchlaufen und liegen mittlerweile kontralateral entgegen ihrer Ursprungskonformation.



500 µm

- | | |
|---|--|
|  oN l |  MesC TO |
|  oN r |  MetC CB |
|  TC |  MetC |
|  DC |  MyelC MeOb |
|  MesC Tg |  BV |



500 µm

Abbildung 14: Querschnitt 5005 ▶

Der Querschnitt 5005 liegt unmittelbar hinter dem caudalen Ende des Telencephalons. Dorsal des ventralen Thalamus (**VT**) liegt der Epithalamus, der von Habenula (**Hab**) und Sacculus dorsalis (**SD**) repräsentiert wird.

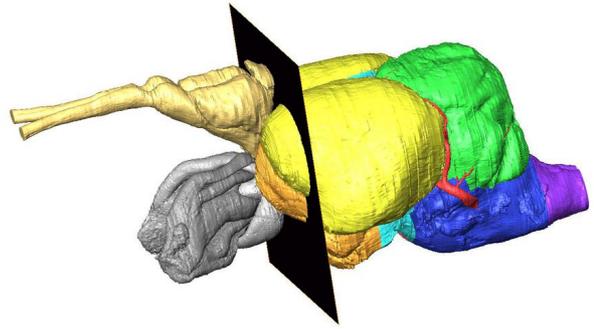
Lateral flankiert das optische Tektum (**TO**) mit - hier angeschnitten - Schicht 2 und 3 des Ventrikel umgebenden Bereiches des optischen Tektums („periventricular gray zone of the optic tectum“; **PGZ_{L2}/PGZ_{L3}**). Der zentral liegende ventrale Thalamus umgibt lateral den diencephalen Ventrikel (**DCV**), welcher dorsal von Habenula (**Hab**) und ventral von der suprachiasmatischen Region (**ScR**) umgeben ist. Innerhalb des Diencephalons kann das mediale longitudinale Faszikelbündel (**MFB**) beobachtet werden.

Lateral des ventralen Thalamus liegt der Nucleus corticalis (**NS**) mit sehr großen Zellkernen. Dorsal der postoptischen Kommissur (**Cpop**) und ventral der suprachiasmatischen Region gibt es eine unbekannte Kommissur (*) mit kreuzenden Fasern von einer Gehirnhälfte zur anderen, die bislang bei anderen Vertretern der Teleostier offenbar nicht beschrieben wurde.

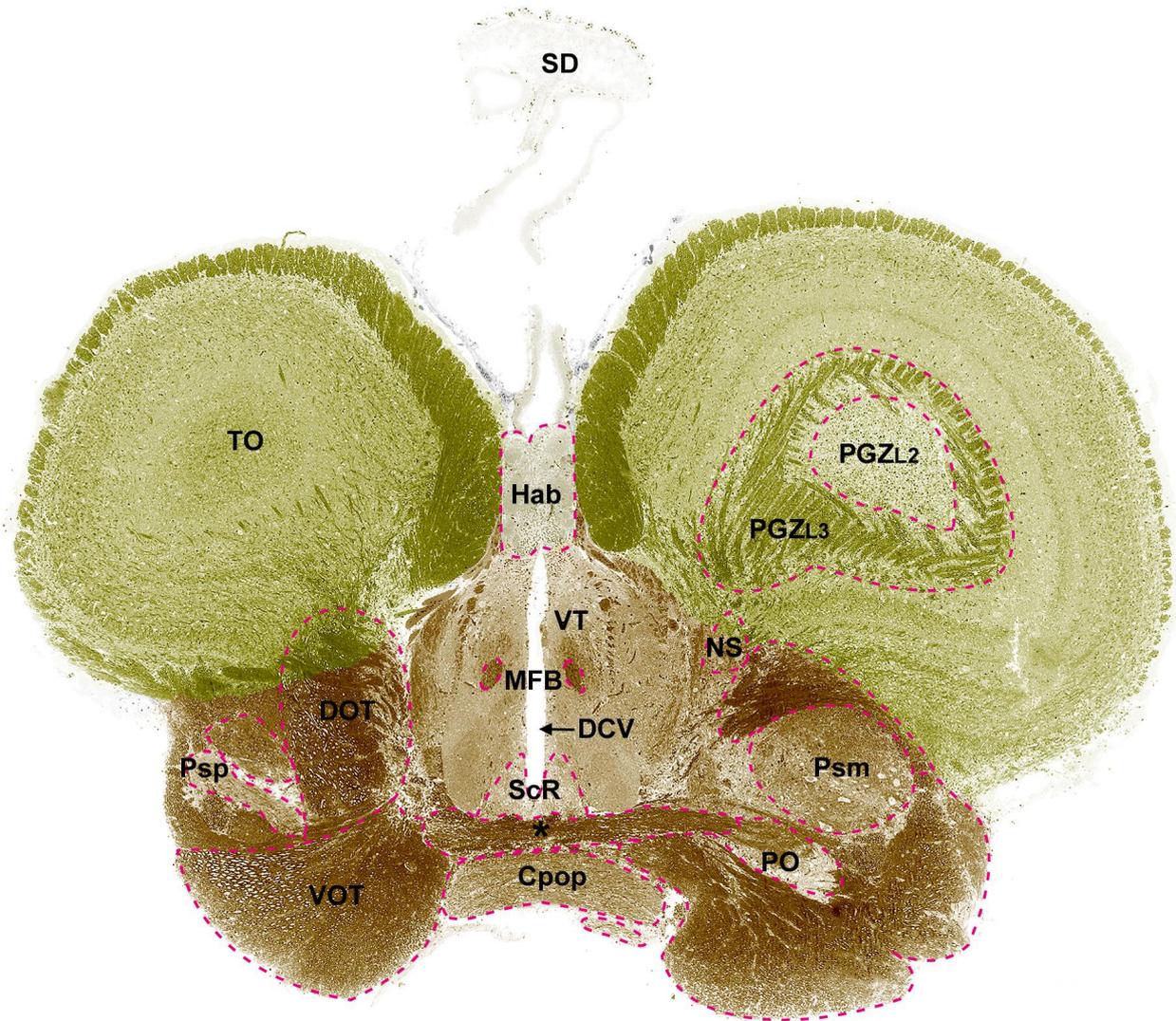
Ventrolateral erstreckt sich der dorsale und ventrale optische Trakt (**DOT/VOT**), an den weiter cranial der parvozelluläre Nucleus des superfiziellen Prätektums (**Psp**) anschließt. Weiter caudal wird der Psp dorsolateral durch den großkernigen (magnozellularen) Nucleus des superfiziellen Prätektums (**Psm**) und ventral durch den posterioren prätektalen Nucleus (**PO**) ersetzt.



500 µm



- | | |
|---------|------------|
| oN l | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |



500 µm

Abbildung 15: Querschnitt 5212



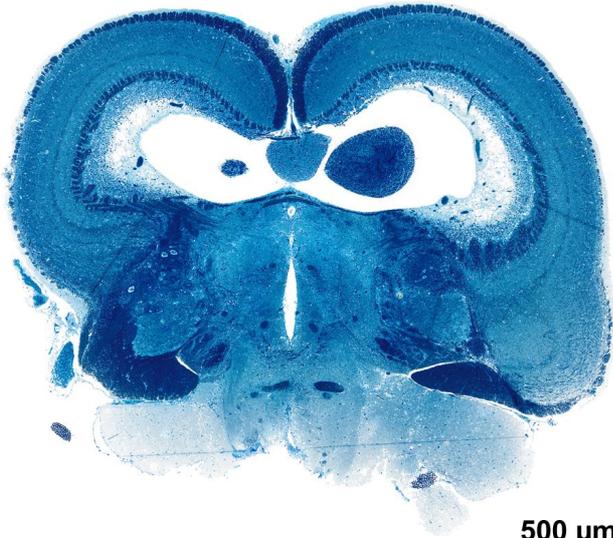
Im Querschnitt 5212 ist der Epithalamus nicht länger sichtbar. Der dorsomediale Bereich wird stattdessen von der tektalen Kommissur (**Ctec**) eingenommen. Sie stellt eine Verbindung zwischen den ipsi- und contralateralen Hälften des Tektums (**TO**) her, das nun in seinem vollem Ausmaß wahrgenommen werden kann. Medioventral schließt sich der Torus longitudinalis (**TL**) an. Er besteht aus zwei verlängerten Auswüchsen, die sich in den tektalen Ventrikel (**TCV**) erstrecken. Weiter rostral liegt der Torus longitudinalis im engen Kontakt mit der großen posterioren Kommissur (**Cpost**). In dieser Schnittebene sind die beiden Strukturen jedoch voneinander gelöst, da sich der telencephale Ventrikel schon weiter aufspannt, um einem Auswuchs des Cerebellums (**CB**) Platz zumachen.

Ventral der posterioren Kommissur befindet sich der Thalamus, in dessen zentraler Region der schlitzförmige diencephale Ventrikel (**DCV**) ruht. Sowohl die medialen als auch die lateralen Faserbündel des Vorderhirns (**MFB/LFB**) sind immer noch präsent in diesem Gehirnabschnitt, jedoch werden sie weiter caudal verschwinden. Am ventralen Ende erstreckt sich der Hypothalamus in dessen Inneren sich die horizontale Kommissur (**Chor**) befindet.

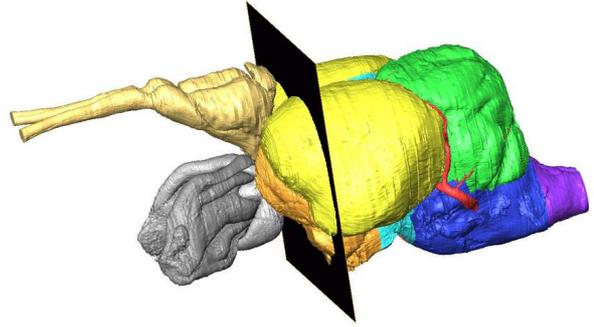
Lateral des Hypothalamus schließt sich der präglomeruläre Komplex (**PGC**) an, der wiederum mediadorsal zum Torus lateralis (**TLa**) liegt. Weiter ventral ist der okulomotorische Nerv (**III.**) vom diffusen Nucleus des inferioren Lobus (**DIL**) dorsal und ventral eingerahmt.

Dorsal des Torus lateralis liegt der ventrale optische Trakt (**VOT**) und ist lateroventral zum posterioren prätektalen Nucleus (**PO**) benachbart. Weiter dorsal befindet sich der magnozellularer Nucleus des superfiziellen Prätektums (**Psm**), gut zu identifizieren aufgrund besonders großer Zellkerne. Lateral schließt sich der dorsale optische Trakt (**DOT**) an, der ventral und dorsolateral an den ventralen optischen Trakt angrenzt.

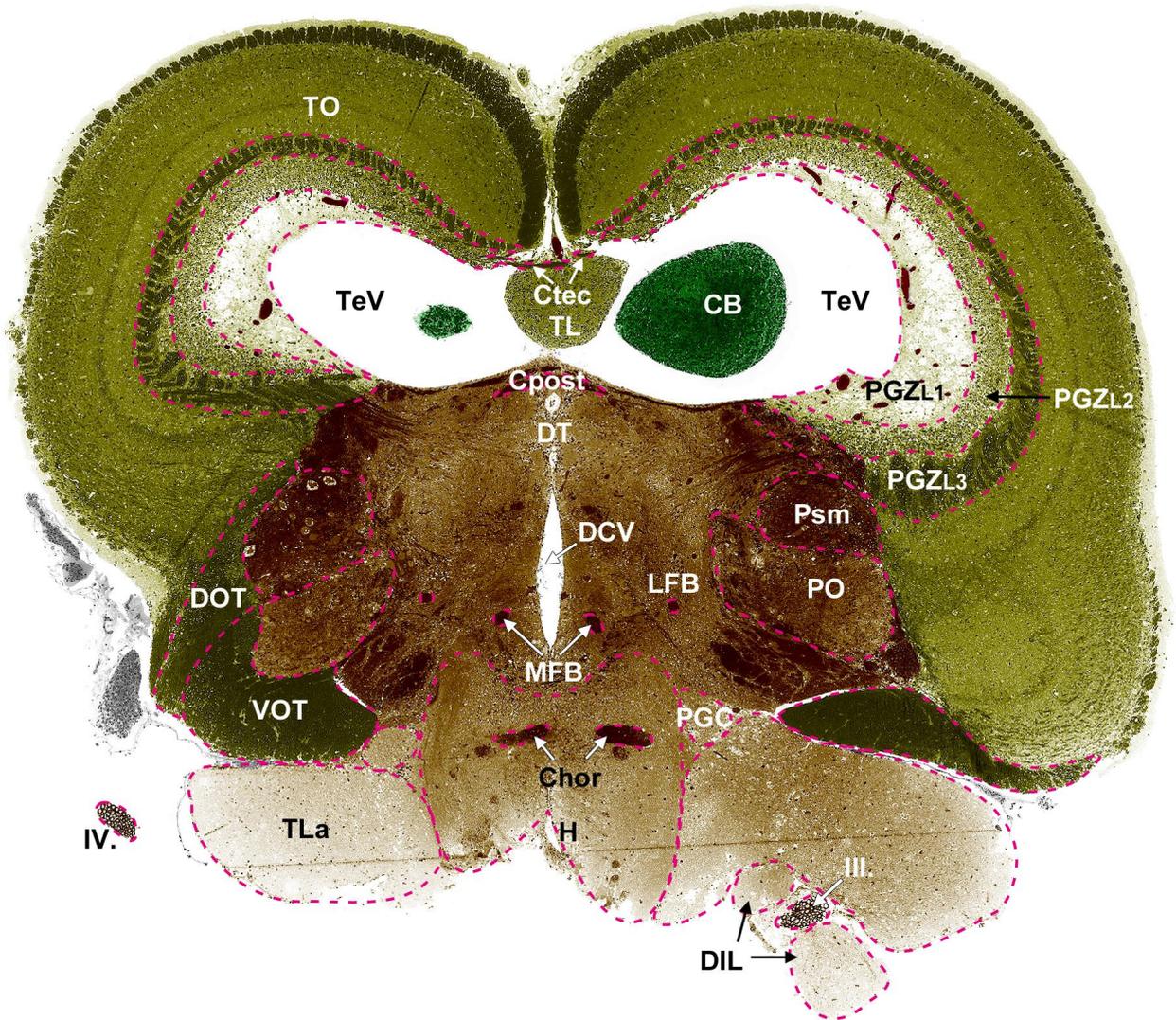
Innerhalb des optischen Tektums (**TO**) lässt sich die periventriculäre graue Zone einfach identifizieren und in drei Schichten untergliedern. Die äußerste Schicht beinhaltet dicht gepackte Zellen (**PGZ_{L3}**), wohingegen die weiter im Inneren befindlichen Schichten zunehmend aus lose angeordneten Zellen und Fasern bestehen (**PGZ_{L2}/PGZ_{L1}**).



500 µm



- | | |
|---------|------------|
| oN I | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |



500 µm

Abbildung 16: Querschnitt 5465 ▶

Querschnitt 5465 zeigt im Grunde genommen die gleichen Strukturen die auch schon im Querschnitt 5212 beschrieben werden, jedoch in veränderten Proportionen und Nachbarschaftsverhältnissen.

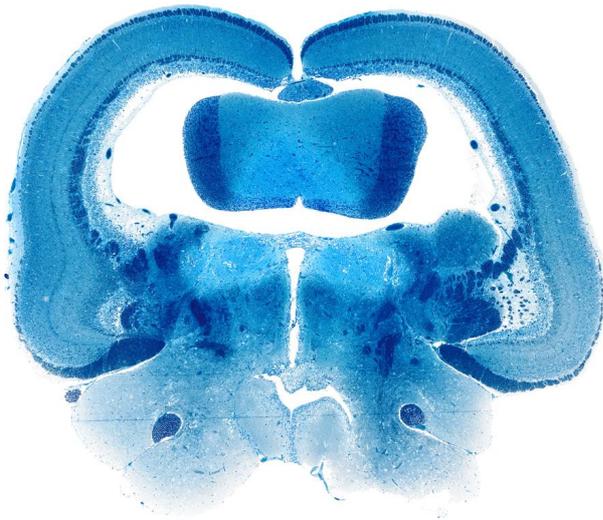
Der Torus longitudinalis (**TL**) ist gut zu erkennen und liegt ventral der tektalen Kommissur (**Ctec**) an. Diese verbindet beide Hälften des optischen Tektums (**TO**) und erstreckt sich über einen Großteil dessen anterior-posterioren Verlaufs.

Weiter ventral liegt die Valvula cerebelli (**Va**), ein Ausläufer des Cerebellums, der sich von posterior nach anterior in den telencephalen Ventrikel (**TeV**) erstreckt. In diesem anterioren Abschnitt lässt sich gut eine Zweiteilung erkennen. Die zentrale „molekulare“ Schicht (**mVa**) beinhaltet vor allem Fasern und einige wenige, stark verteilte Zellkerne und ist ventrolateral von einem granulären Band dunkel gefärbter, dicht gepackter kleiner Zellkerne (**gVa**) umgeben.

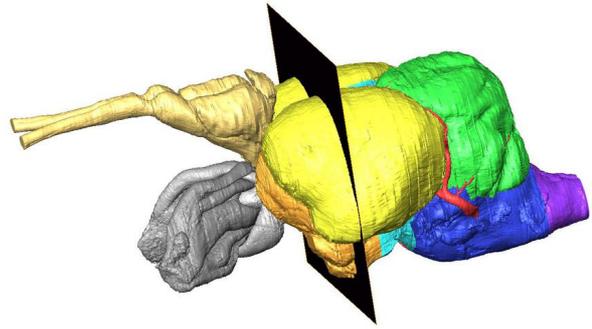
Der tektale Ventrikel wird dorsolateral vom optischen Tektum und ventral, unterhalb der Valvula cerebelli, von der posterioren Kommissur (**Cpost**) begrenzt. Gleichzeitig wird dadurch der diencephale Ventrikel (**DCV**) abgegrenzt, der wiederum durch den posterioren tuberalen Nukleus (**PTN**) in zwei ungleiche Hälften unterteilt wird. Der obere Anteil verläuft zentral im Thalamus und wird zu beiden Seiten von den lateralen Faserbündel des Vorderhirns (**LFB**) flankiert. Unterhalb des posterioren tuberalen Nukleus spannen sich laterale Ausdehnungen des diencephalen Ventrikels (**LR**) zu beiden Seiten auf. Diese Ausläufer werden von der dorsalen bzw. ventralen Zone des Ventrikel umgebenden Hypothalamus (**Hd/Hv**) umhüllt.

Ventrolateral des Hypothalamus (**H**) schließt sich der diffuse Nukleus des inferioren Lobus (**DIL**) an. Dorsal liegt der Torus lateralis (**TLa**) auf. Beide Strukturen werden von den Fasern des okulomotorischen Nervs (**III.**) separiert.

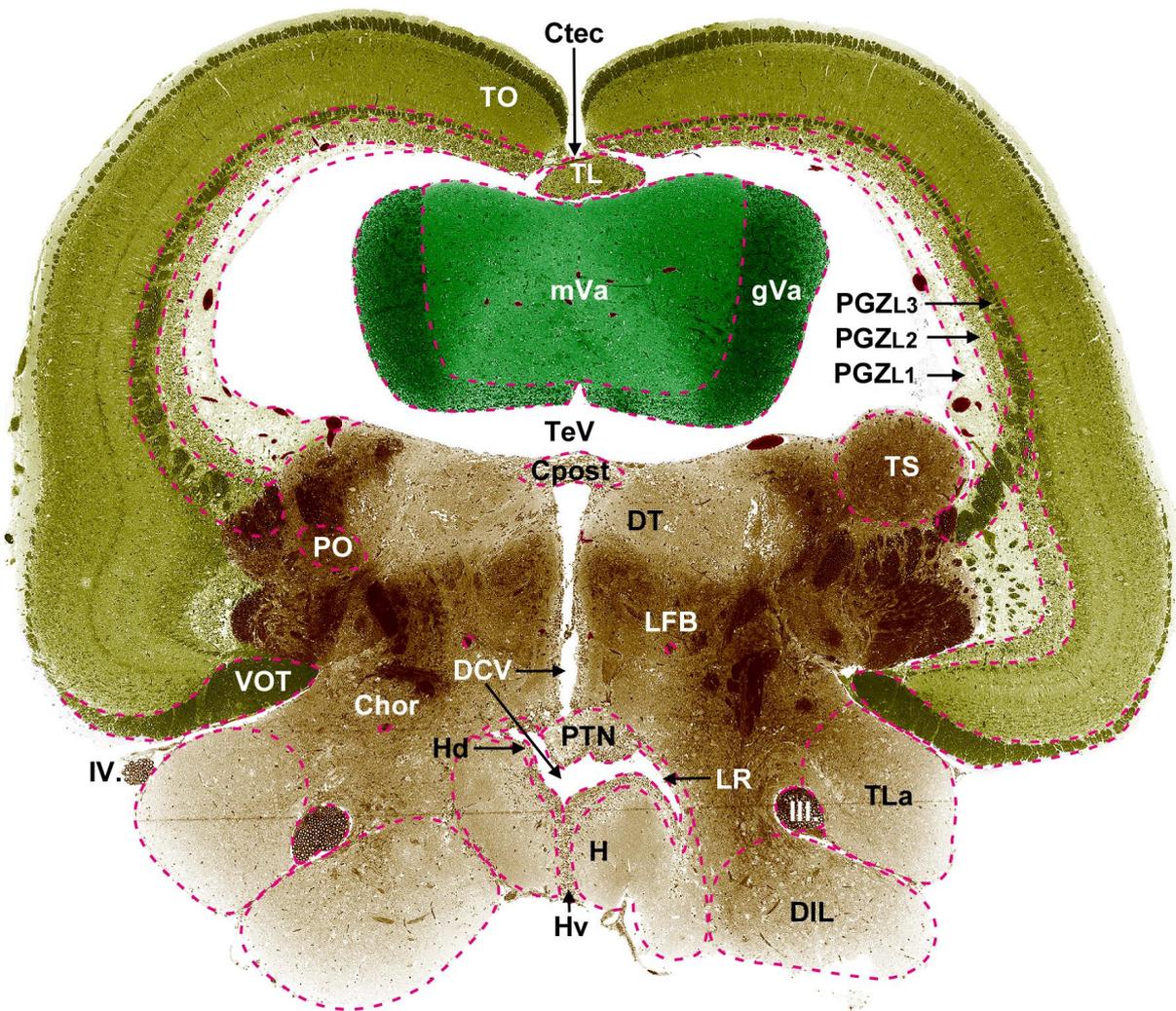
Der dorsale optische Trakt ist nicht länger als separater Trakt wahrzunehmen und bereits in das optische Tektum übergegangen. Die ventromediale Grenze des Tectum opticum wird immer noch vom ventralen optischen Trakt (**VOT**) eingenommen. Diese Fasern lassen sich auch weiter caudal noch im Gehirn verfolgen. Die periventriculäre graue Zone ist in drei Schichten (**PGZ_{L1-3}**) untergliedert. Besonderer Aufmerksamkeit bedarf **PGZ_{L3}** auf der rechten Seite des Schnittes, wie diese die anderen beiden Schichten der periventriculären grauen Zone durchschreitet, ventral des Torus semicircularis (**TS**) aus dem Tektum tritt und den Thalamus innerviert.



500 µm



- | | |
|---------|------------|
| oN I | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |



500 µm

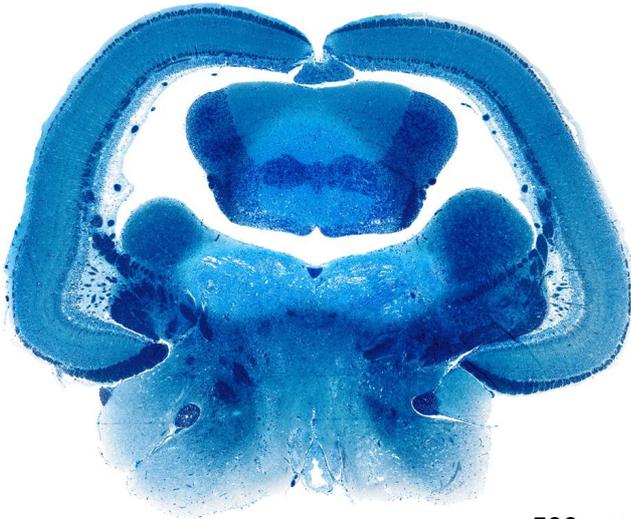
Abbildung 17: Querschnitt 5648 ▶

Querschnitte 5648 verläuft exakt auf der Höhe der Hypophyse (**Pit**). Beide tektalen Hälften sind durch die tektale Kommissur (**Ctec**) verbunden, unter der sich der Torus longitudinalis (**TL**) erstreckt. Ventral wird der tektale Ventrikel (**TeV**) von der Valvula cerebelli (**Va**) ausgefüllt. Dorsale und ventrale Anteile der Valvula cerebelli (**Vad/Vav**) werden von einer mächtigen granulären Schicht (**gVa**) eingerahmt.

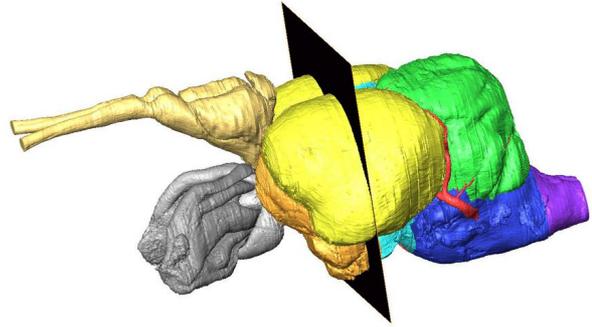
Das dorsale Dach des Diencephalons bildet der Nukleus des medialen longitudinalen Faszikelbündels (**NMLF**). Dieser Kern besteht aus großen verstreuten Zellen, die den Ursprung langer Axone bilden und einen nach posterior absteigenden Pfad formen, das mediale longitudinale Faszikelbündel (**MFL**), der in zentraler Position in den folgenden Querschnitten leicht zu verfolgen ist.

Der dorsale Bereich des Gehirns wird vom Torus semicircularis (**TS**) eingenommen. Medioventral ist der Querschnitt eines Faserbündels angeschnitten, das dem lateralen longitudinalen Faszikelbündel (**LLF**) zugeordnet werden kann.

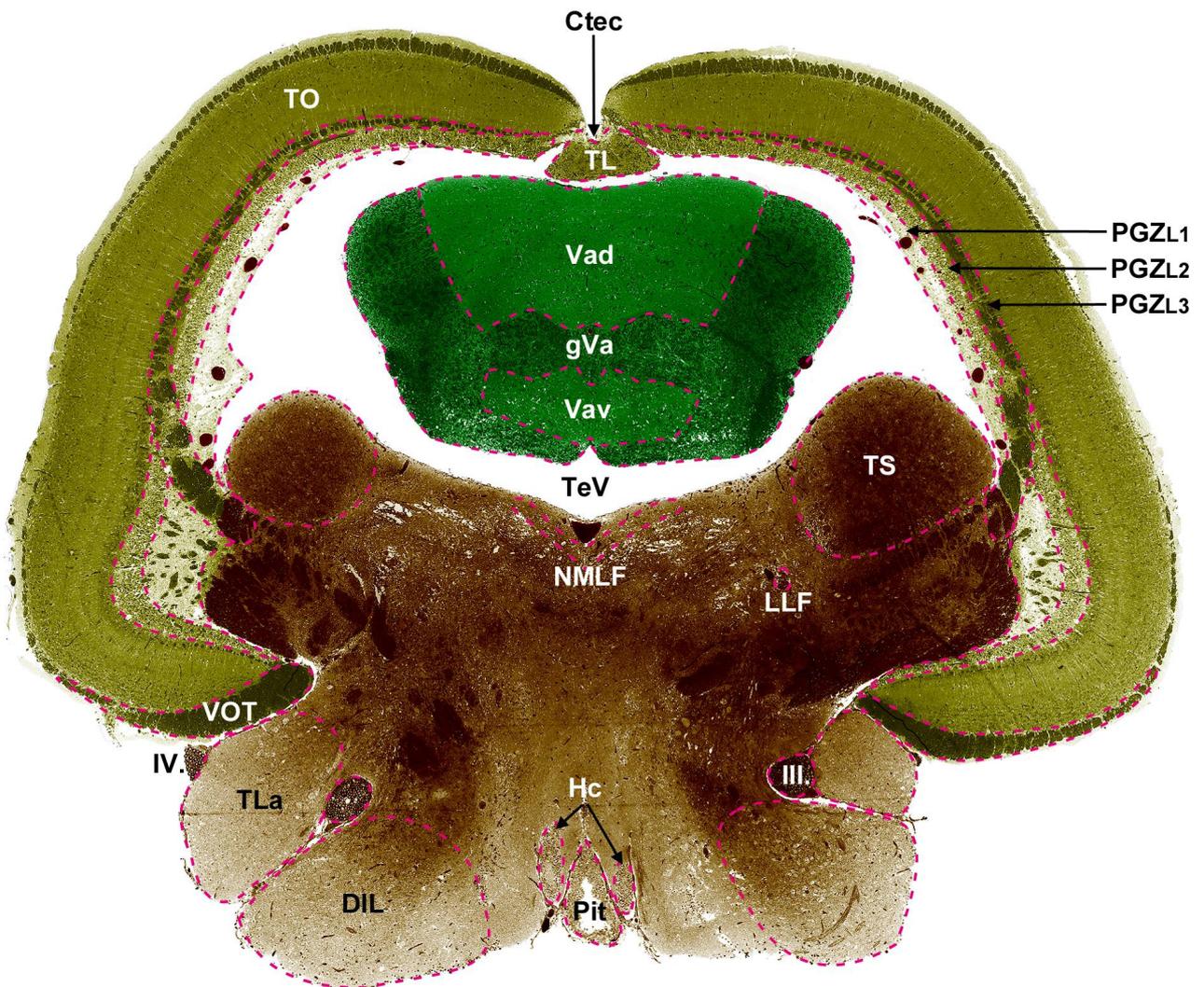
Den ventralen Rand des Gehirns begrenzt die Hypophyse (**Pit**). Zu beiden Seiten schließt sich dorsolateral die caudale Zone des Ventrikel umgebenden Hypothalamus (**Hc**) an. Ventrolateral erstreckt sich der diffuse Nukleus des inferioren Lobus (**DIL**) und der Torus lateralis (**TLa**), benachbart zum okulomotorischen Nerv (**III.**). Oberhalb des Torus lateralis liegt der ventrale optische Trakt (**VOT**), der Übergang zum optischen Tektum (**TO**). Ventral dazu auf der linken Seite kann ein Querschnitt eines Axonbündels dem Trochlearnerv (**IV.**) zugeordnet werden.



500 µm



- | | |
|---------|------------|
| oN I | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |



500 µm

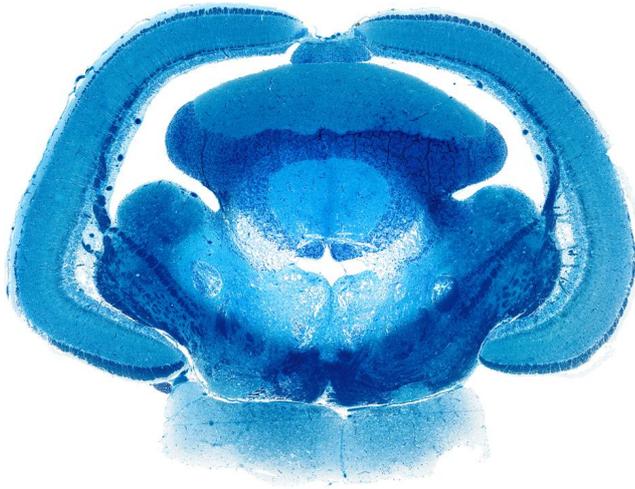
Abbildung 18: Querschnitt 5971 ▶

Im Querschnitt 5971 bildet die Valvula cerebelli (**Va**) zu beiden Seiten ventrolateral eine Verbindung mit dem Tegmentum des Mesencephalons aus und grenzt somit einen Teil des tektalen Ventrikels (**TCV**) ab.

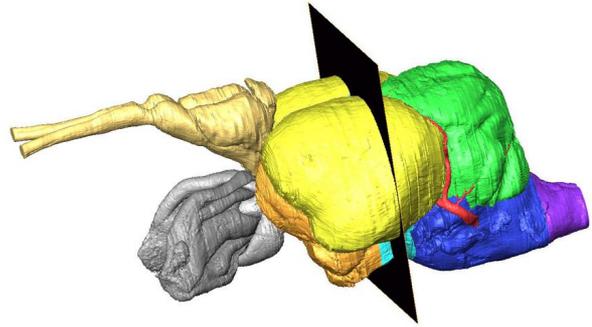
Der dorsale Anteil der Valvula cerebelli (**Vad**) liegt wie ein Dach dorsal der granulären Schicht (**gVa**) auf. Benachbart grenzt dorsal der Torus longitudinalis (**TL**) an und verbindet zusammen mit der tektalen Kommissur (**Ctec**) die beiden Hälften des optischen Tektums (**TO**). Der Querschnitt des ventralen Valvula cerebelli Anteils (**Vav**) gleicht einem Oval und ist vom der granulären Schicht der Valvula cerebelli (**gVa**) umgeben.

Der diese Strukturen peripher umgebende tektale Ventrikel wird auf beiden Seiten ventral vom Torus semicircularis (**TS**) begrenzt. Ventromedial verlaufen die lateralen longitudinalen Faszikelbündel (**LLF**). In etwa auf gleicher Höhe liegen paramedian die medialen longitudinalen Faszikelbündel (**MLF**) und werden dorsal hufeisenförmig vom Nukleus des medialen longitudinalen Faszikelbündels (**NMLF**) umgeben und dadurch gleichzeitig vom tektalen Ventrikel getrennt.

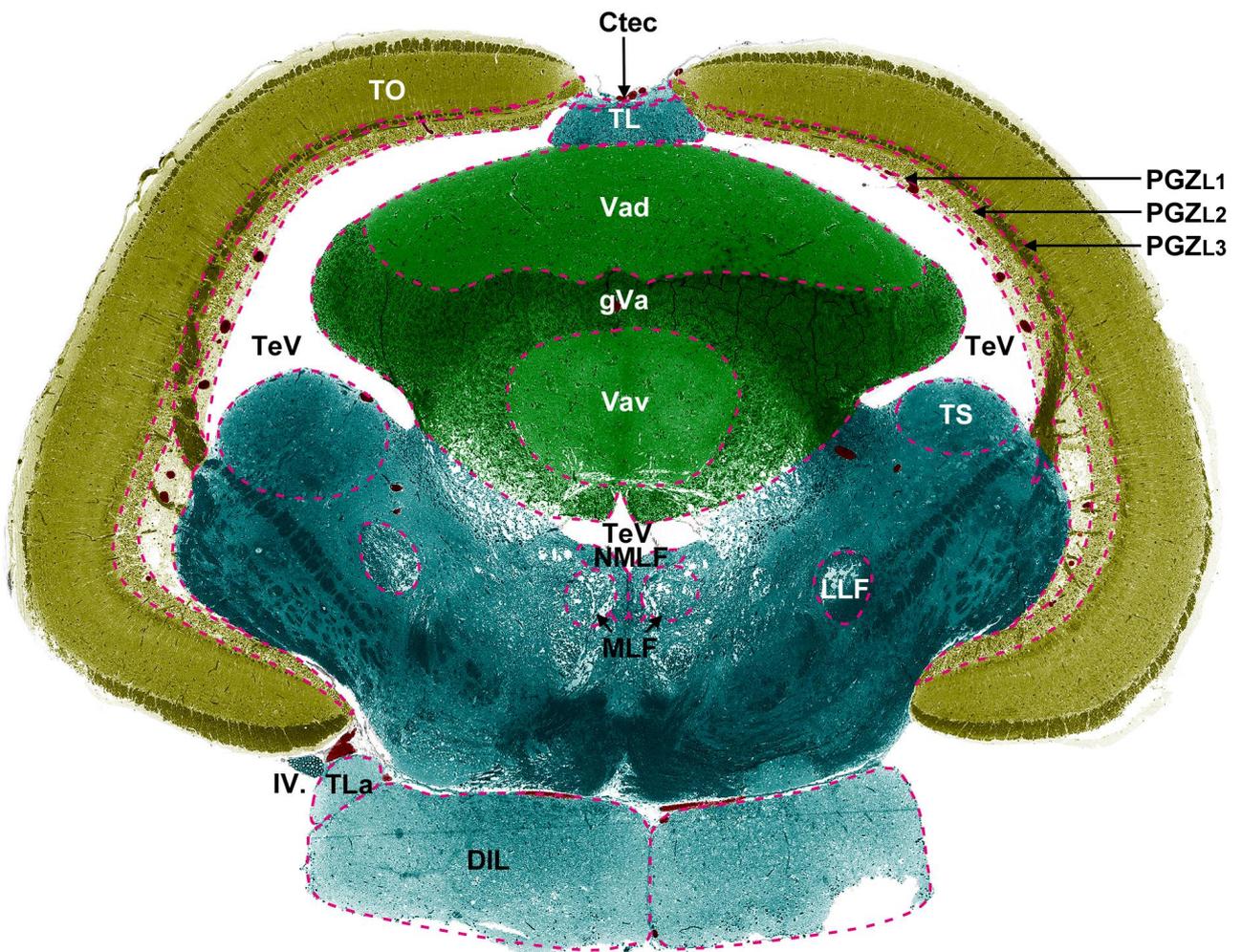
Ventral erstreckt sich zu einem sechstel der Gesamtgehirnhöhe der diffuse Nukleus des inferioren Lobus (**DIL**). Dorsolateral hiervon lässt sich auf der linken Seite des Querschnitts noch der posteriore Ausläufer des Torus lateralis (**TLa**) feststellen, der ebenfalls auf der linken Seite noch lateral vom Trochlearnerv (**IV.**) flankiert wird.



500 µm



- | | |
|---------|------------|
| oN I | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |



500 µm

Abbildung 19: Querschnitt 6184



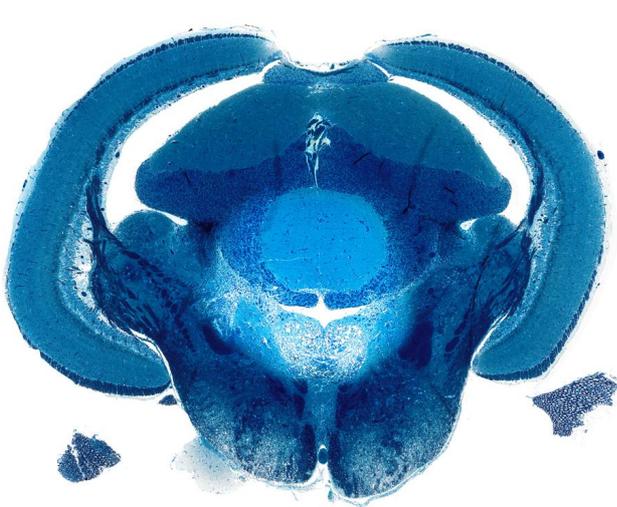
Querschnitt 6184 zeigt wie die zwei Hälften des Tektums (**TO**), verbunden über die tektale Kommissur (**Ctec**), medial beidseitig den Torus longitudinalis (**TL**) peripher überlappen und zusammen die Valvula cerebelli (**Va: Vad/gVa/Vav**), den Torus semicircularis (**TS**) und das Tegmentum (**Tg**) bedecken.

Der telencephale Ventrikel (**TeV**) umgibt die Valvula cerebelli und trennt den Ausläufer des Cerebellums dorsolateral vom optischen Tektum und ventral vom Tegmentum, wobei ventrolateral eine direkte Verbindung mit letzterer Struktur besteht und sich caudalwärts erweitert.

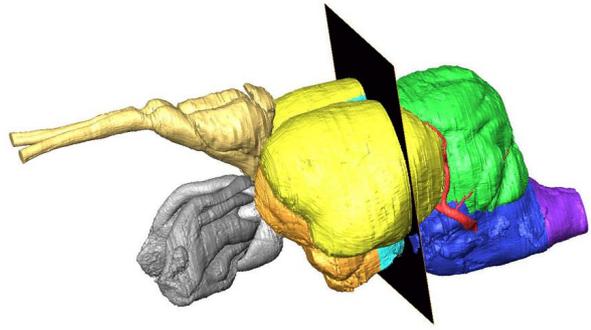
Mediodorsal des Tegmentums und unterhalb des tektalen Ventrikels befindet sich eine sehr ausgeprägte, paarig angelegte Struktur, das mediale longitudinale Faszikelbündel (**MLF**). Es handelt sich hierbei um Faserbahnen, die sich über alle caudal folgende Schnitte hinweg, bis ins verlängerte Rückenmark und darüber hinaus erstrecken. Sie spielen in Hinsicht auf die Koordination der Blickbewegung eine entscheidende Rolle. Lateral der medialen longitudinalen Faszikelbündel liegen beidseitig die lateralen medialen longitudinalen Faszikelbündel (**LMF**) und ventral schließt sich der Nukleus interpediculus (**NIn**) an. Dieser Kern ist der am weitesten caudal liegende Nukleus des ventralen Mesencephalons.

Aufgrund der Tatsache, dass sämtliche Querschnitte nicht perfekt senkrecht zur Längsachse des Fischgehirns verlaufen, sondern leicht schräg geführt sind, lässt sich hier nur noch auf der linken Seite das caudale Ende des diffusen Nukleus des inferioren Lobus (**DIL**) und ein Anschnitt des Trochlearnervs (**IV.**) erkennen.

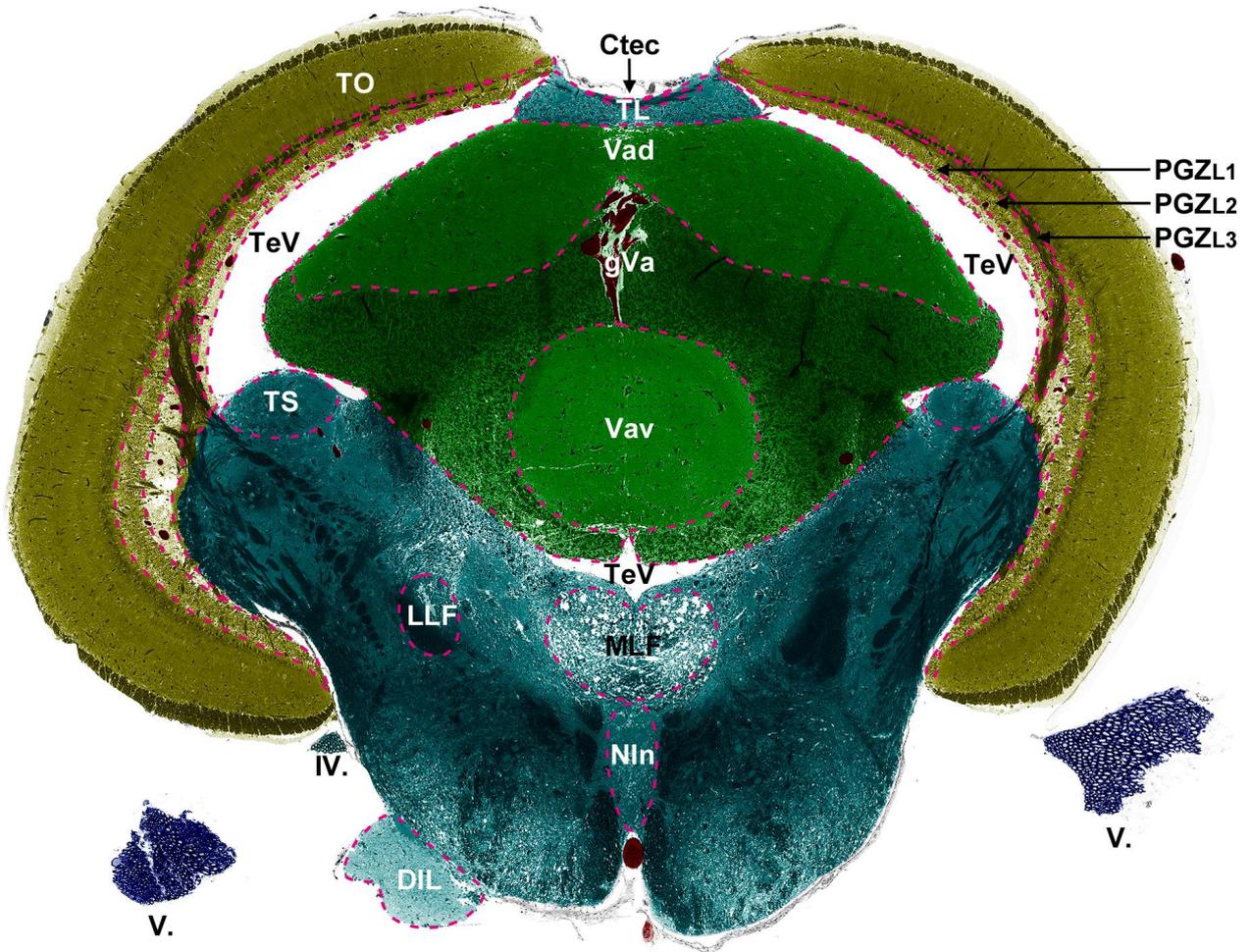
Ventrolateral des Tegmentums tritt ein großes Faserbündel auf. Es handelt sich hierbei um den Trigeminiernerv (**V.**). Er leitet Informationen aus dem Gesichtsbereich zum Gehirn und innerviert die Kaumuskulatur.



500 µm



- | | |
|---------|------------|
| oN l | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |



500 µm

Abbildung 20: Querschnitt 6455

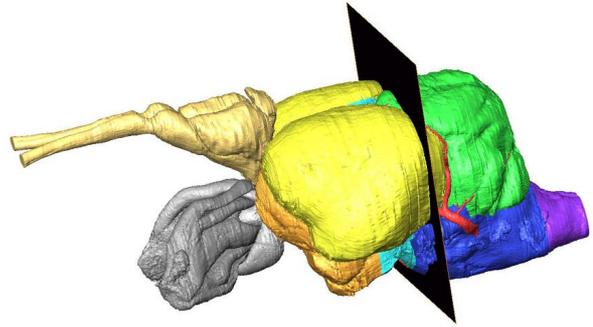
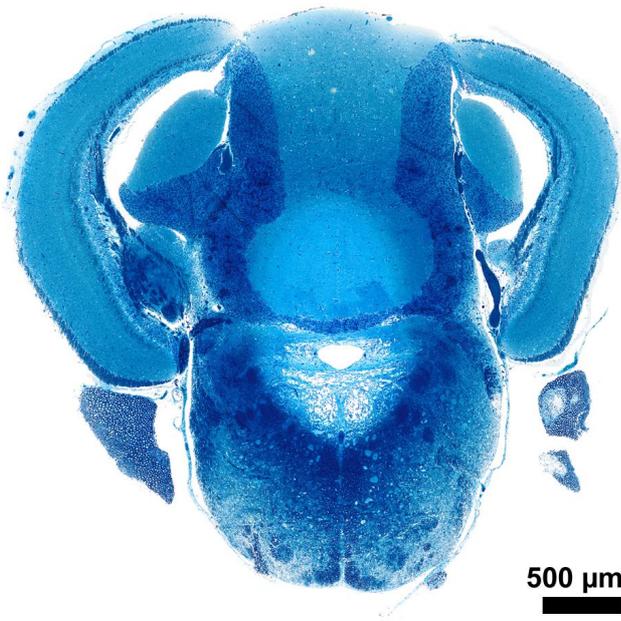


Querschnitt 6455 beschreibt den am weitesten caudal gelegenen Teil des Torus semicircularis (**TS**), des Torus longitudinalis (**TL**) und der dorsalen Unterteilung der Valvula cerebelli (**Vad**). Zugleich zeigt er den am weitesten anterior gelegenen Teil des Corpus cerebelli (**Cce**), eine mit der ventralen Unterteilung der Valvula cerebelli (**Vav**) in Verbindung stehende dorsale, faserreiche Struktur, die zudem die beiden tektalen Hälften (**TO**) spaltet. Sie ist ventrolateral von der granulären Schicht der Valvula cerebelli (**gVa**) umgeben.

Den ventralen Bereich des Querschnittes füllt jetzt der Hirnstamm (**MetC**) mit dem rhombencephalen Ventrikel (**RV**) im dorsomedialen Abschnitt. Ventral dazu verlaufen die medialen longitudinalen Faszikelbündel (**MLF**), die sich kontinuierlich in weiter ventrale Regionen des Hirnstammes verschieben.

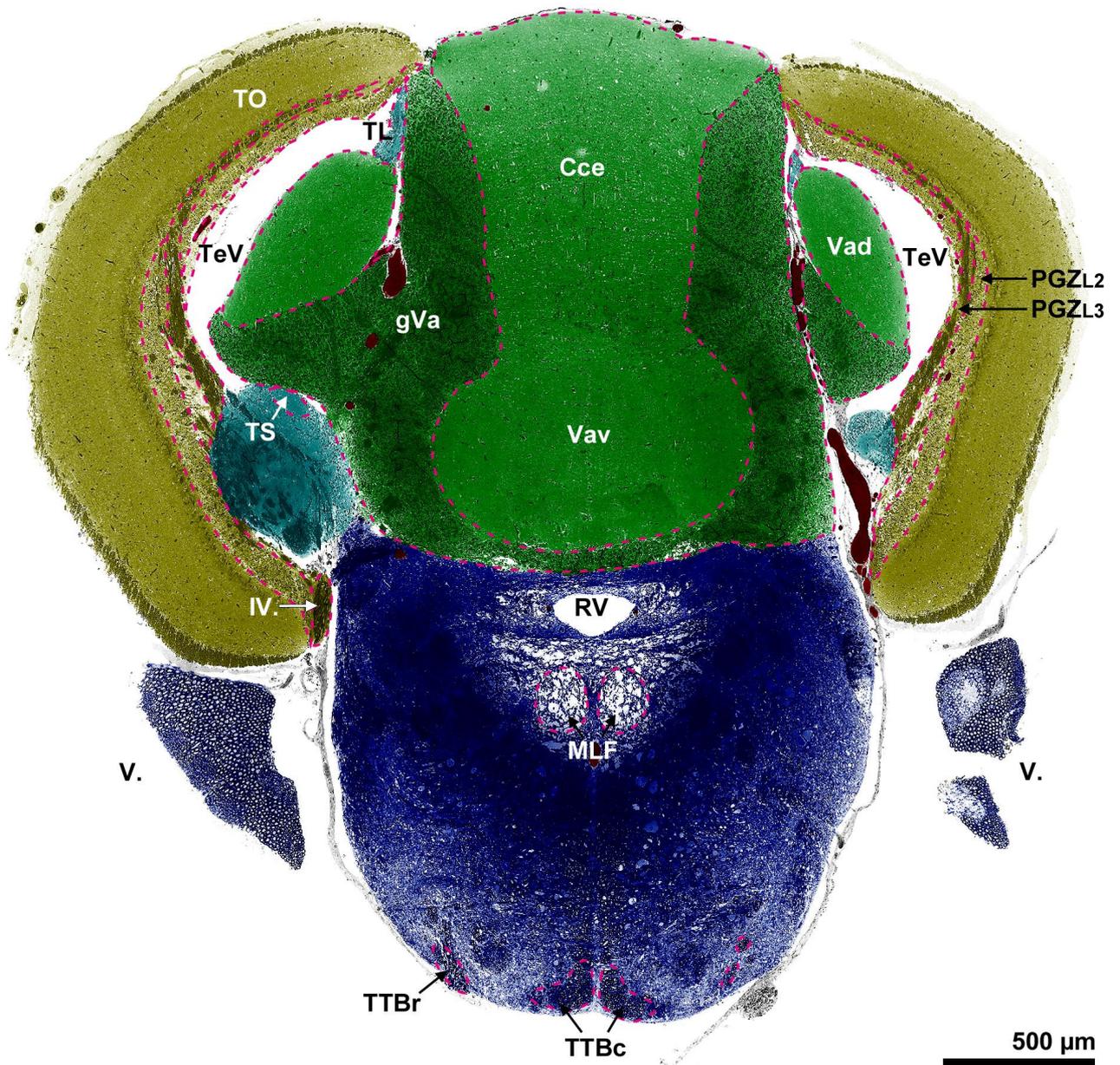
Am ventralen Rand erstreckt sich beidseitig der gekreuzte L-förmigen Tractus tectobulbaris cruciatus (**TTBc**) und weiter lateral der Tractus tectobulbaris rectus (**TTBr**), beides Derivate des tectobulbaren Traktes (**TTB**), der bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte, aber wie bei Vertretern verwandter Arten vorhanden sein muss.

Beidseitig verlaufen die mächtigen Trigeminierven (**V.**), die weiter caudal mit dem Hirnstamm verschmelzen.



- | | |
|---------|------------|
| oN I | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |

500 µm



500 µm

Abbildung 21: Querschnitt 6725

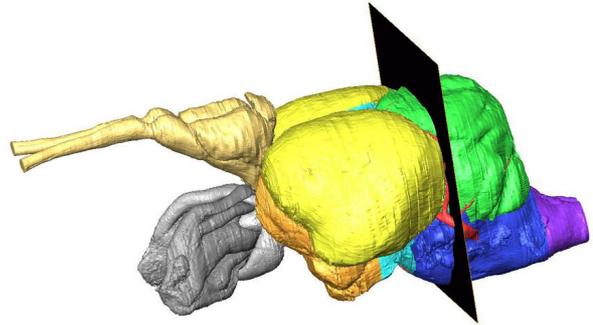
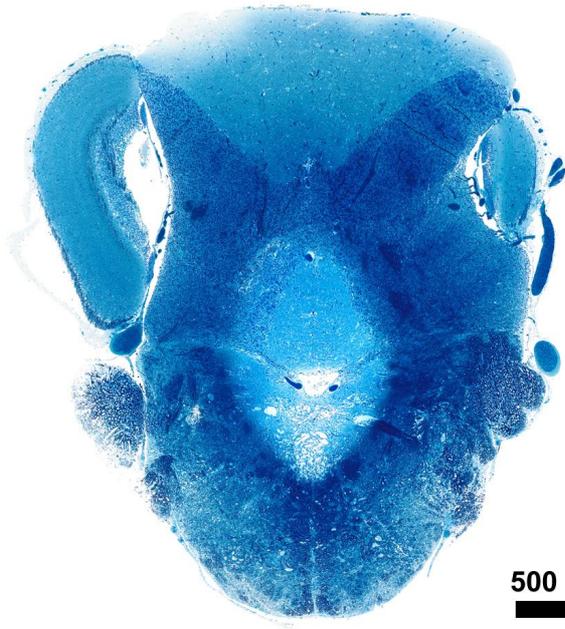


Querschnitt 6725 zeigt das caudale Ende des optischen Tektums (**TO**). Es liegt dorsolateral zur Eminentia granularis (**EG**), die den Lobus caudalis cerebelli (**Cca**) umgibt und dorsal an die granuläre Schicht der Valvula cerebelli (**gCce**) angrenzt, welche dorsal vom Corpus cerebelli (**Cce**) eingerahmt ist.

Unterhalb der Eminentia granularis und dem Lobus caudalis cerebelli schließt sich das Metencephalon (**MetC**) an, medioventral mit dem rhombencephalen Ventrikel (**RV**).

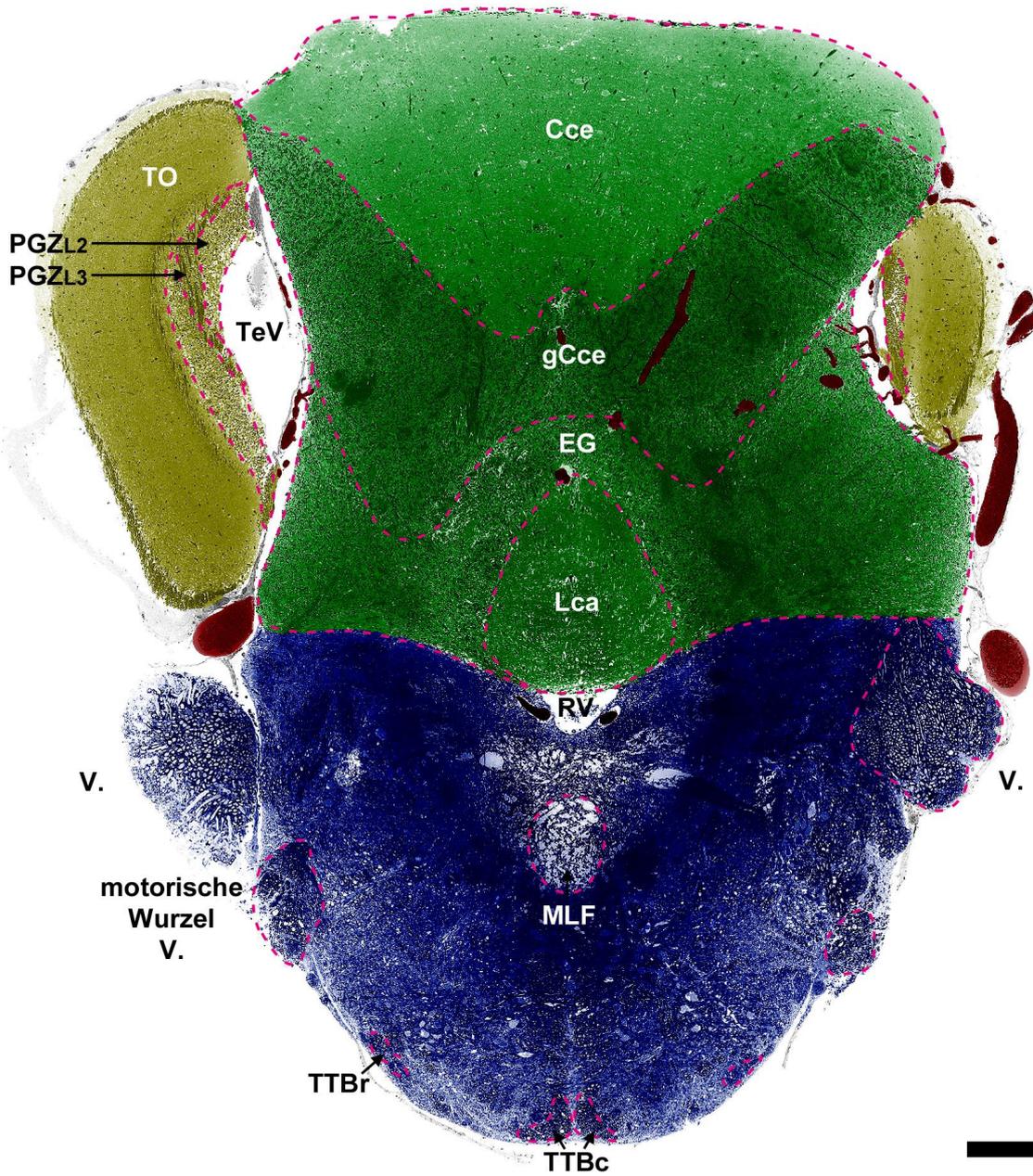
Gekreuzte und gerade tektobulbare Trakte (**TTBc/TTBr**) sind im ventralen Teil des Hirnstammes ebenso vorhanden, wie zentral die medialen longitudinalen Faszikelbündel (**MLF**).

An den dorsolateralen Rändern des Metencephalons treten die Trigeminierven (**V.**) in das Gehirn ein. Ventromedian dazu sind die motorischen Wurzeln des V. Gehirnnerven zu beobachten.



500 µm

- | | |
|---|--|
|  oN I |  MesC TO |
|  oN r |  MetC CB |
|  TC |  MetC |
|  DC |  MyelC MeOb |
|  MesC Tg |  BV |



500 µm

Abbildung 22: Querschnitt 6996

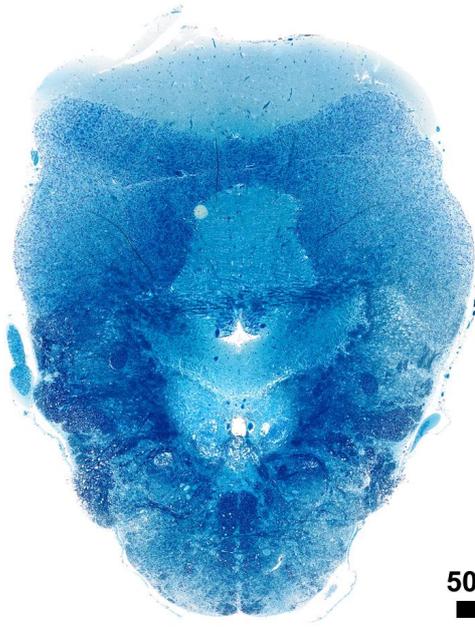


Im Querschnitt 6996 füllt das Cerebellum die oberen 2/3 aus. Ganz zentral liegt der Lobus caudalis cerebelli (**Lca**). Er ist ventral von der Crista cerebellaris (**CC**) und dorsal von der Eminentia granularis (**EG**) umgeben. Das dorsale Dach bildet immer noch der Corpus cerebelli (**Cce**), ventral schließt sich die kernreiche Struktur der granulären Schicht des Corpus cerebelli (**gCce**) an, die oberhalb zur Eminentia granularis benachbart ist.

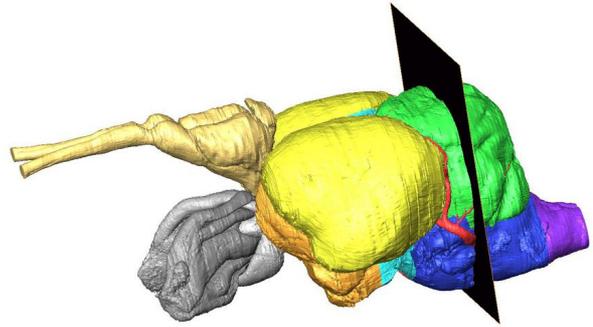
Auffällig ist der rhombencephale Ventrikel (**RV**), der sich weiter caudal kurz zuvor in einen ventralen und dorsalen Anteil aufgespalten hat. Der dorsale Anteil liegt innerhalb der Crista cerebellaris und grenzt ventral an die ventralen Fasern des Cerebellums (**CvF**). Der ventrale Ventrikelanteil verläuft innerhalb des Metencephalons (**MetC**) und liegt dorsal zum medialen longitudinalen Faszi-
kelbündel (**MLF**).

Die Trigeminierven (**V.**) innervieren die laterale Peripherie und ziehen weiter in mediodorsale Areale des Metencephalons.

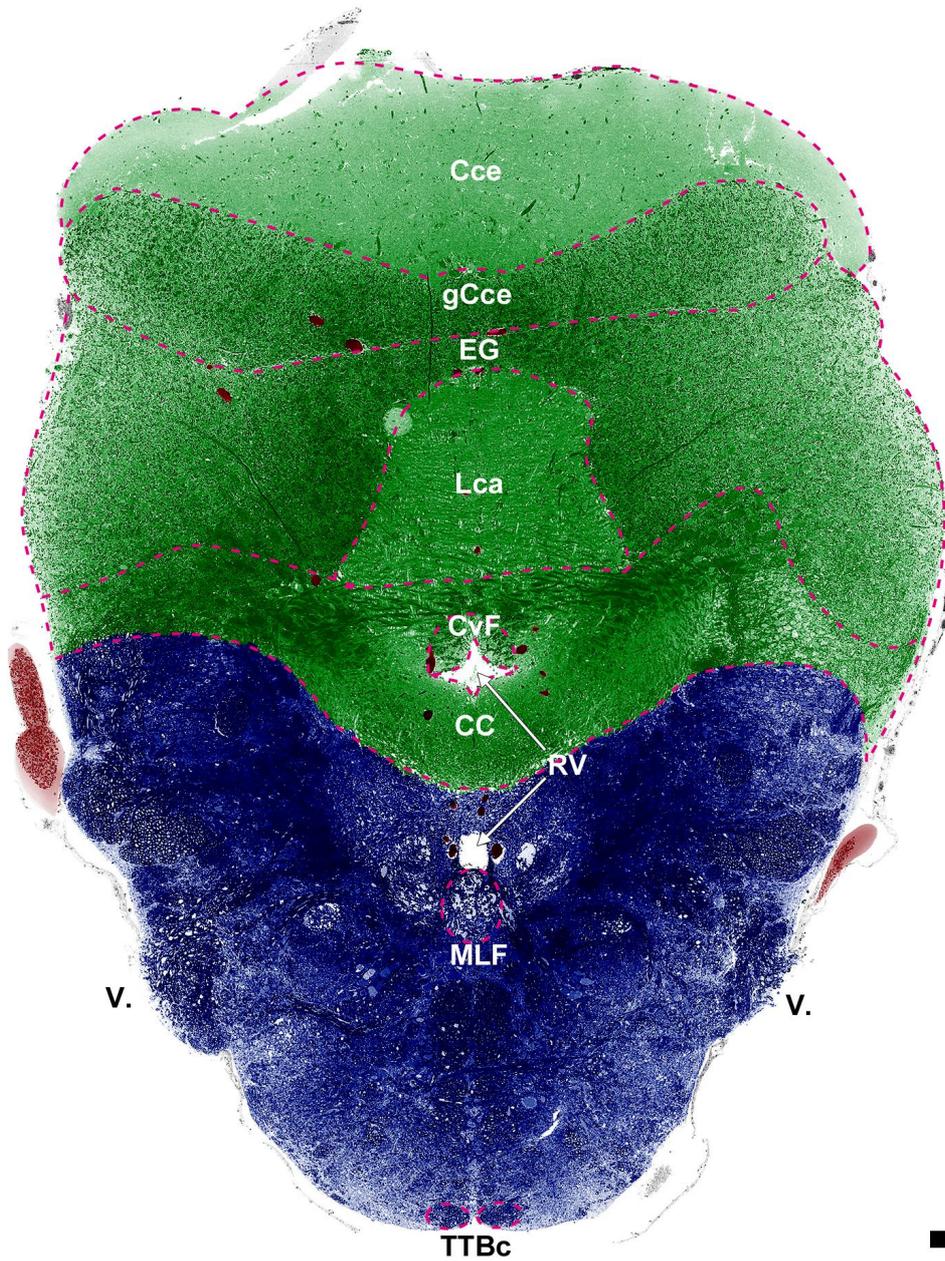
Von den tektalen Efferenzen am ventralen Rand ist nur mehr der Traktus tectobulbaris cruciatus (**TTBc**) verblieben, der Traktus tectobulbaris rectus (**TTBr**) endete bereits weiter cranial.



500 µm



- | | |
|---|--|
|  oN I |  MesC TO |
|  oN r |  MetC CB |
|  TC |  MetC |
|  DC |  MyelC MeOb |
|  MesC Tg |  BV |



500 µm

Abbildung 23: Querschnitt 7267

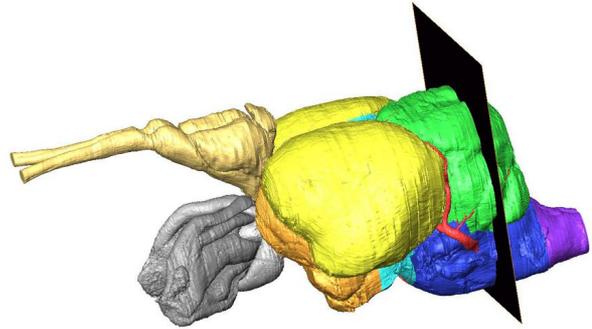


Innerhalb des Gehirnquerschnitts 7267 setzt sich der cerebellare Komplex - von dorsal nach ventral - aus dem Corpus cerebelli (**Cce**), der granulären Schicht des Corpus cerebelli (**gCce**), der Eminentia granularis (**EG**) auf gleicher Höhe mit dem Lobus caudalis cerebelli (**Lca**) und darunter der Crista cerebellaris (**CC**) zusammen.

Zudem enthalten sind zentral ein Verbund ventraler Fasern des Cerebellums (**CvF**), der einer Bischofsmütze gleich, dem medialen Teil des oberen rhombencephalen Ventrikels (**RV**) aufsitzt.

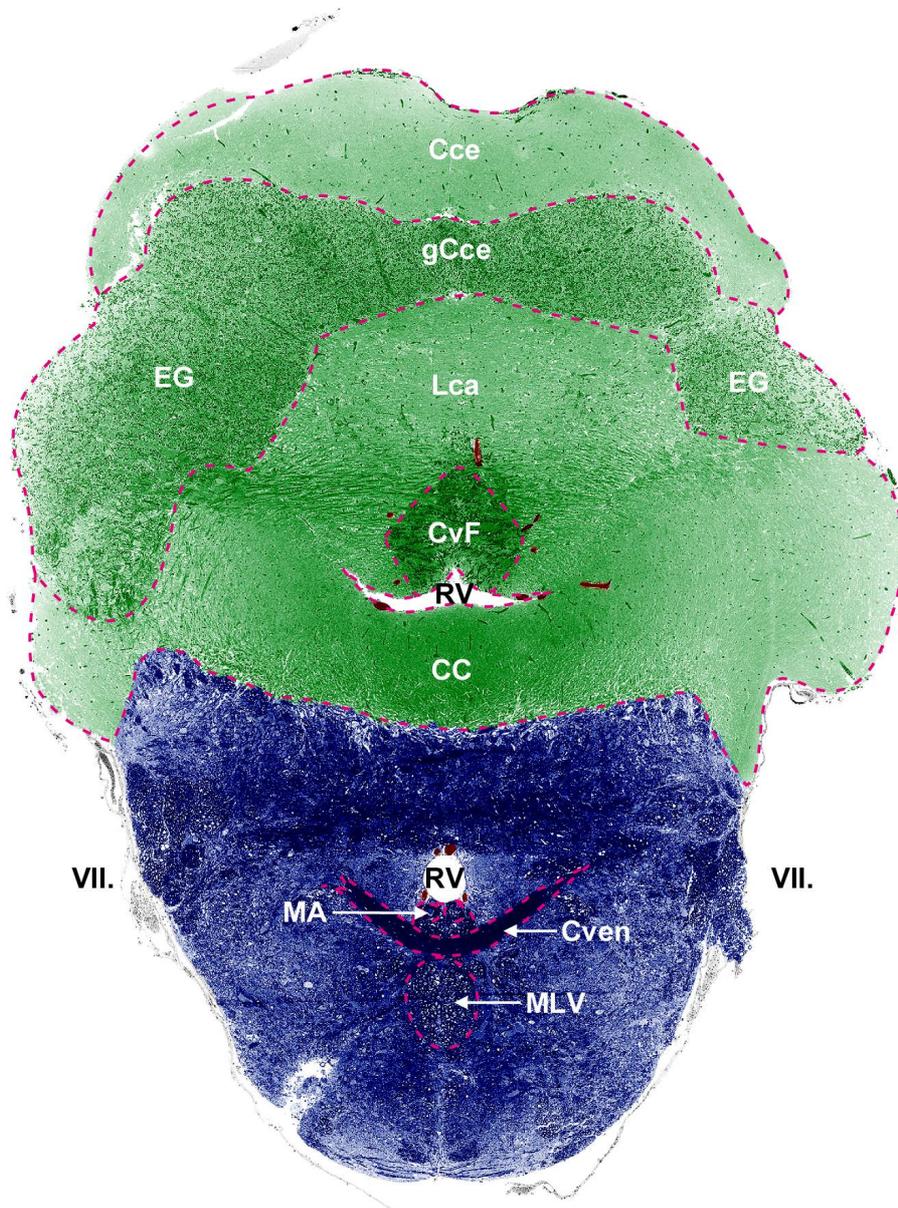
Das mediale longitudinale Faszikelbündel (**MLF**) verläuft immer noch in medialer Position. Es wird durch die Fasern der ventrale Kommissur des Rhombencephalons (**Cven**) eingeschnitten und in einen dorsalen und ventralen Aspekt geteilt. Der obere, ventral dem rhombencephalen Ventrikel anliegende Teil beinhaltet zusätzlich Mauthner-Axone (**MA**), stark myelinisierte riesige Axone.

Auf beiden Seiten des ventralen Metencephalons sind die Seitenliniennerven (**VII.**) in das Gehirn eingetreten und ziehen in tiefer gelegene Regionen.



500 µm

- | | | | |
|---|---------|---|------------|
|  | oN I |  | MesC TO |
|  | oN r |  | MetC CB |
|  | TC |  | MetC |
|  | DC |  | MyelC MeOb |
|  | MesC Tg |  | BV |



500 µm

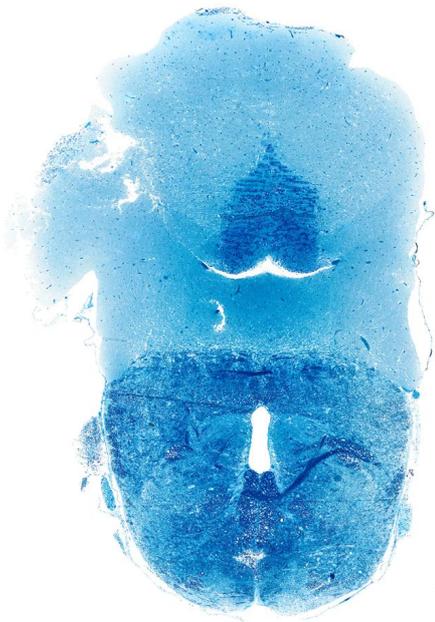
Abbildung 24: Querschnitt 7488



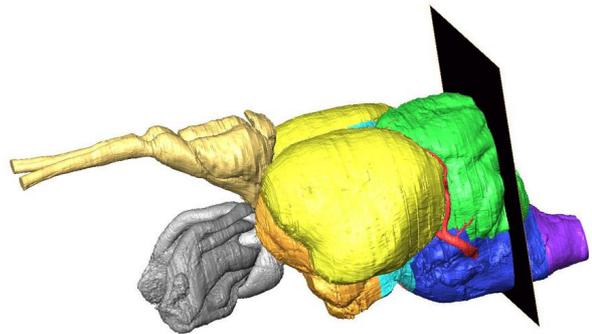
Im Querschnitt 7488 ist die Eminentia granularis (**EG**) auf der rechten Seite nicht länger vorhanden, links ist nur noch der am weitesten caudal gelegene Ausläufer angeschnitten.

Der cerebellare Anteil des Querschnittes gliedert sich von dorsal nach ventral nur mehr in Corpus cerebelli (**Cce**) und ventrale Fasern des Cerebellums (**CvF**), die durch den rhombencephalen Ventrikel (**RV**) von der Crista cerebelli (**CC**) separiert werden.

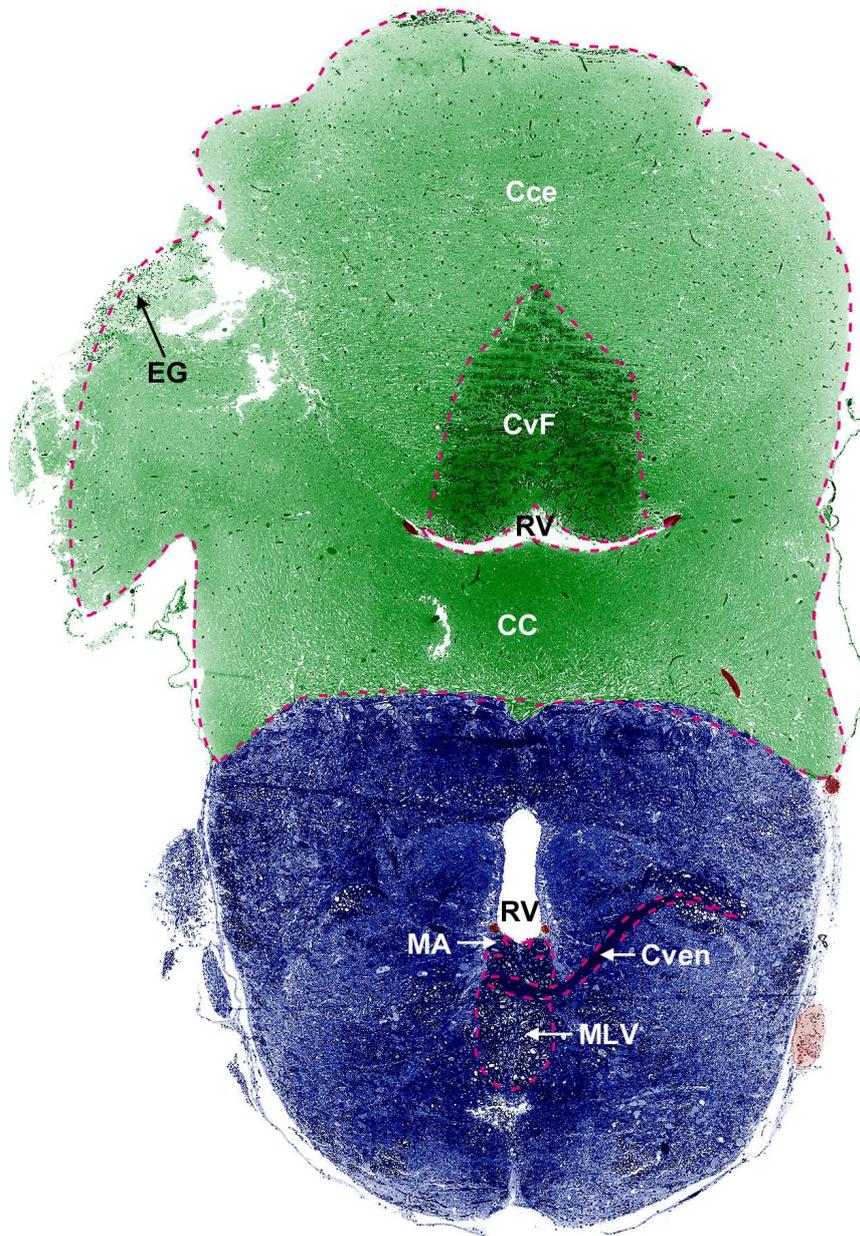
Die ventralen metencephalen Aspekte entsprechen weitestgehend denen des vorangegangenen Querschnittes des vorliegenden Atlanten. Der ventrale Ast des rhombencephalen Ventrikels spannt sich caudal horizontal weiter auf.



500 µm



- | | | | |
|---|---------|---|------------|
|  | oN l |  | MesC TO |
|  | oN r |  | MetC CB |
|  | TC |  | MetC |
|  | DC |  | MyelC MeOb |
|  | MesC Tg |  | BV |



500 µm

Abbildung 25: Querschnitt 7668



In Querschnitt 7668 ist die Eminentia granularis (**EG**) lateral nicht länger vorhanden und der caudale Abschnitt des Cerebellums beinhaltet nur noch dorsozentral die ventrale Kommissur des Rhombencephalons (**CvF**), beidseitig flankiert vom Corpus cerebelli (**Cce**) und, vom dorsalen Anteil des rhombencephalen Ventrikels (**RV**) getrennt, ventral die Crista cerebellaris (**CC**).

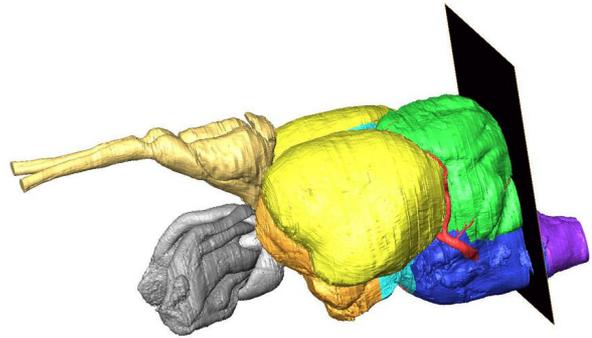
Der mediale Bereich des Hirnstammes wird vom ventralen Ast des rhombencephalen Ventrikels und von dem dorsalen und ventralen Anteil des medialen longitudinalen Faszikelbündels (**MLF**) eingenommen. Letztere Beide werden von der ventralen rhombencephalen Kommissur (**Cven**) geteilt.

Der dorsale Teil des medialen longitudinalen Faszikelbündels umgibt die zwei riesigen Mauthner-Axone (**MA**).

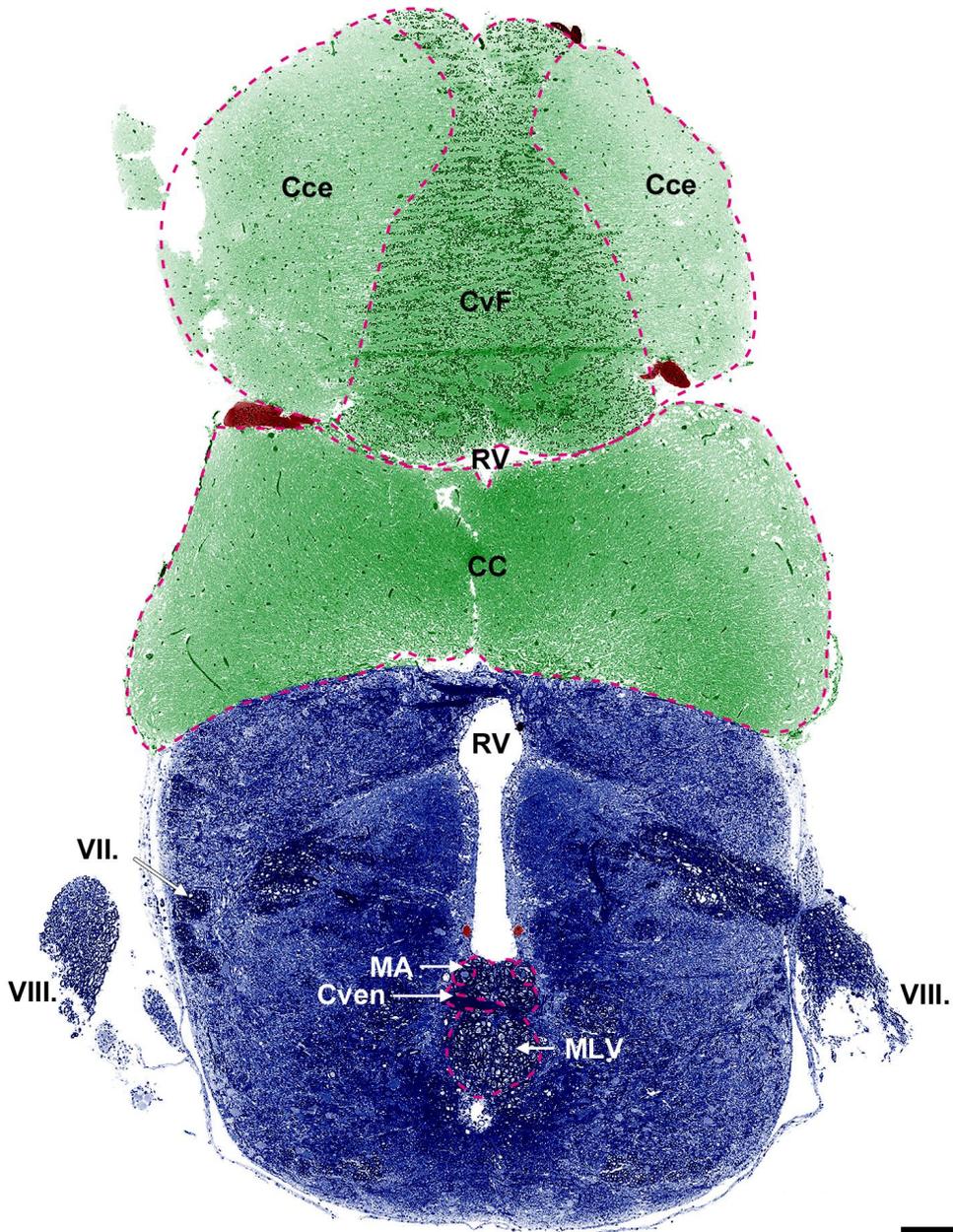
Zu beiden Seiten des Metencephalons (**MetC**) sind die Nervi vestibulocochlearis (**VIII.**) quer angeschnitten. Ihre Aufgaben umfassen das Hören und den Gleichgewichtssinn.



500 μ m



- | | |
|---|--|
|  oN I |  MesC TO |
|  oN r |  MetC CB |
|  TC |  MetC |
|  DC |  MyelC MeOb |
|  MesC Tg |  BV |



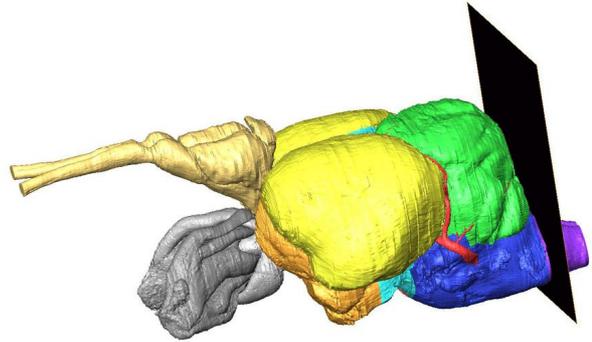
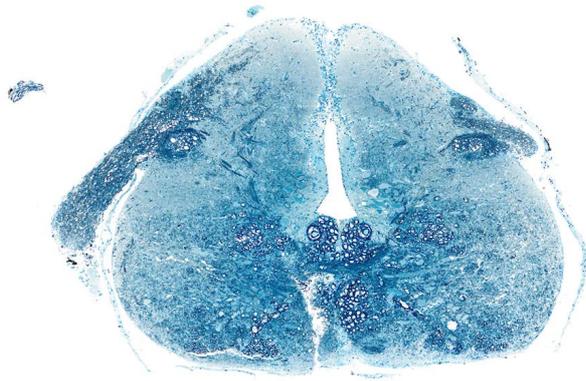
500 μ m

Abbildung 26: Querschnitt 7948 ▶

Querschnitt 7948 beschreibt den Übergang des Hirnstammes zur Medulla oblongata (**MeOb**), die das Myelencephalon (**MyeIC**) bildet.

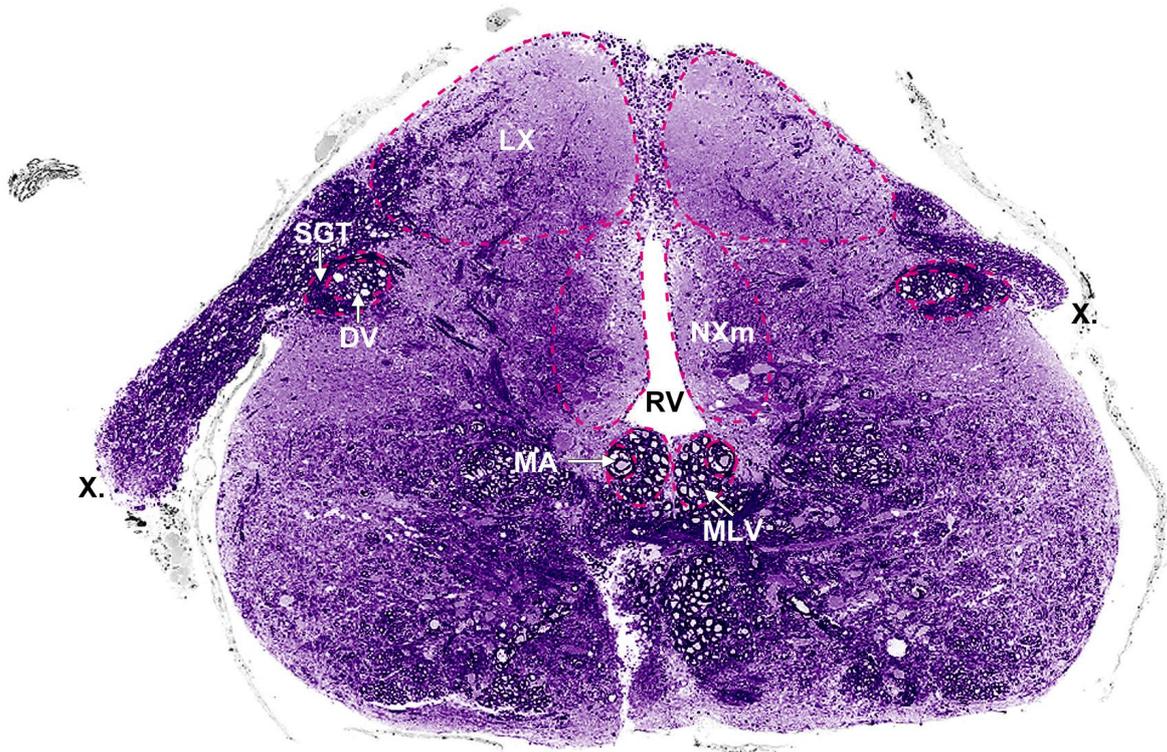
Der caudale Teil des vagalen Lobus (**LX**) liegt dorsal des rhombencephalen Ventrikels (**RV**). An den Ventrikel grenzen zu beiden Seiten lateral der vagale Motornukleus (**Nxm**) und ventral die medialen longitudinalen Faszikelbündel (**MLF**) mit den enthaltenen Mauthner-Axonon (**MA**) an.

Ventrolateral des vagalen Lobus treten den Vagusnerven (**X.**) zugehörige Fasern in das Gehirn ein und überspannen bogenartig den sekundären Geschmackstrakt (**SGT**) und die absteigende trigeminale Wurzel (**DV**). Die Vagusnerven sind bei der Regulation der Tätigkeiten fast aller inneren Organe beteiligt.



300 µm

- | | |
|---------|------------|
| oN I | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |

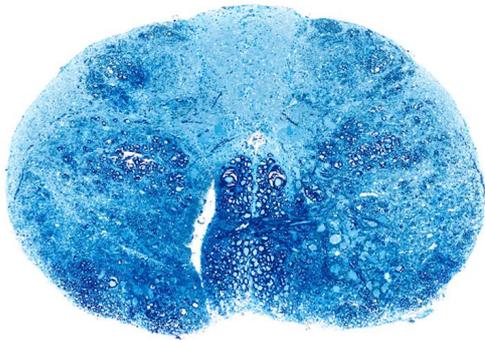


300 µm

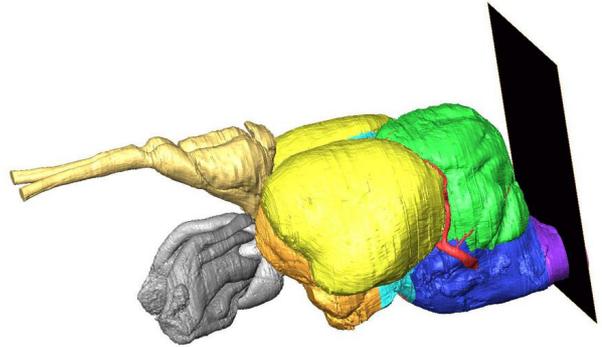
Abbildung 27: Querschnitt 8198 ▶

Mit Querschnitt 8198 sind wir endgültig im verlängertem Rückenmark (**MeOb**) angelangt. Zentral ist der rhombencephale Ventrikel nicht länger vorhanden. Er wurde durch den mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllten Zentralkanal (**C**) ersetzt. Dieser setzt sich caudal durch das gesamte Rückenmark fort.

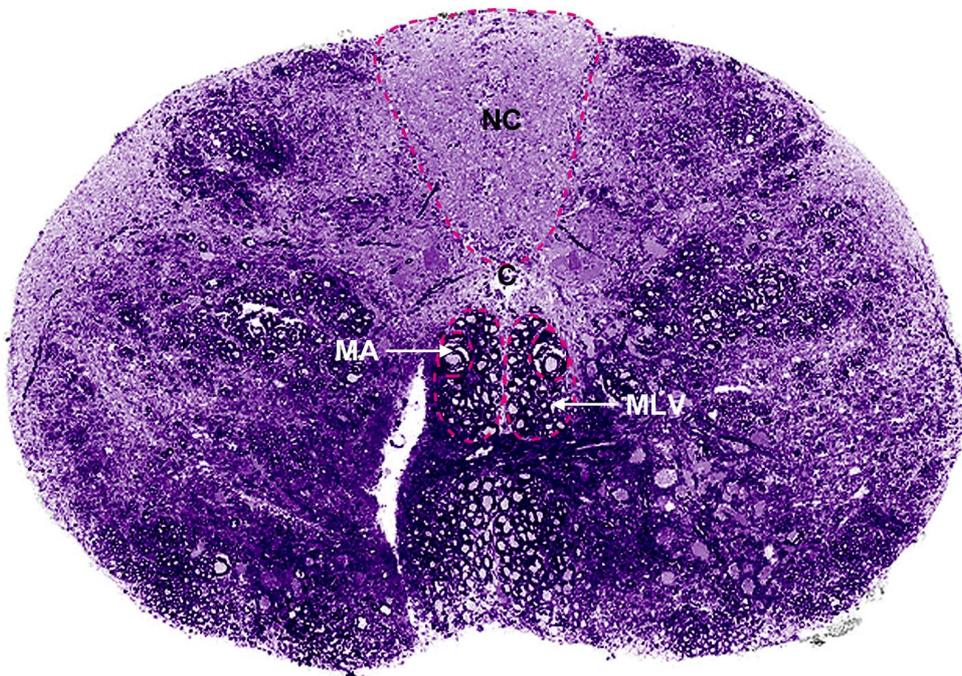
Dorsal schließt sich der Nukleus von Cajal (**NC**) an. Ventral verläuft das mediale longitudinale Faszikelbündel (**MLF**). Darin gut zu erkennen die paarigen Querschnitte der Mauthner'schen Riesenaxone (**MA**).



300 µm



- | | |
|---------|------------|
| oN l | MesC TO |
| oN r | MetC CB |
| TC | MetC |
| DC | MyelC MeOb |
| MesC Tg | BV |



300 µm

3 Ergebnisse

Abkürzungsverzeichnis:

*	unbekannte Kommissur
BO	<u>B</u> ulbus <u>o</u> lfactorius
BV	Blutgefäß (<u>b</u> lood <u>v</u> essels)
C	Zentralkanal (<u>c</u> entral canal)
Cantd	dorsaler Anteil der anterioren Kommissur (<u>c</u> ommissura <u>a</u> nterior, pars <u>d</u> orsalis)
Cantv	ventraler Anteil der anterioren Kommissur (<u>c</u> ommissura <u>a</u> nterior, pars <u>v</u> entralis)
CB	<u>C</u> erebellum
CC	<u>C</u> rista <u>c</u> erebellaris
Cca	<u>c</u> audaler Lobus des <u>C</u> erebellums
Cce	<u>C</u> orpus <u>c</u> erebelli
Chor	horizontale Kommissur (<u>c</u> ommissura <u>h</u> orizontalis)
CO	optisches Chiasma (<u>c</u> hiasma <u>o</u> pticum)
Cpop	postoptische Kommissur (<u>c</u> ommissura <u>p</u> ostoptica)
Cpost	posteriore Kommissur (<u>c</u> ommissura <u>p</u> osterior)
Ctec	tektale Kommissur (<u>c</u> ommissura <u>t</u> ecti)
Cven	ventrale Kommissur des Rhombencephalon (<u>c</u> ommissura <u>v</u> entralis rhombencephali)
CvF	<u>v</u> entrale <u>F</u> asern des <u>C</u> erebellums
DC	<u>D</u> iencephalon
DCV	<u>d</u> iencephaler <u>V</u> entrikel
DIL	diffuser Nukleus des <u>i</u> nferioren <u>L</u> obus
DOT	<u>d</u> orsomedialer <u>o</u> ptischer <u>T</u> rakt
DT	<u>d</u> orsaler <u>T</u> halamus
DV	absteigende trigeminale Wurzel (<u>V</u> . Gehirnnerv; <u>d</u> ecending trigeminal root)
EG	<u>E</u> minentia granularis
gCce	granuläre Schicht des <u>C</u> orpus <u>c</u> erebelli
GL	glomerulären Schicht des olfaktorischen Bulbus (glomerular layer of olfactory bulb)
gVa	granuläre Schicht der <u>V</u> alvula cerebelli
H	<u>H</u> ypothalamus
Hab	<u>H</u> abenula
Hc	<u>c</u> audale Zone des Ventrikel umgebenden <u>H</u> ypothalamus
Hd	<u>d</u> orsale Zone des Ventrikel umgebenden <u>H</u> ypothalamus
Hv	<u>v</u> entrale Zone des Ventrikel umgebenden <u>H</u> ypothalamus
ICL	mit kleinen Zellen dicht gepackte innere zentrale Region des olfaktorischen Bulbus (<u>i</u> nternal <u>c</u> ellular layer of olfactory bulb)
Lca	<u>L</u> obus <u>c</u> audalis cerebelli
LFB	<u>l</u> aterale <u>F</u> aserbündel des Vorderhirns
LLF	<u>l</u> aterale <u>l</u> ongitudinale <u>F</u> aszikelbündel
LOT	<u>l</u> ateraler <u>o</u> lfaktorischer <u>T</u> rakt
LR	llaterale Ausdehnung des diencephalen Ventrikels (lateral recess of diencephalic ventricle)
LX	<u>L</u> obus des Vagusnerven (<u>X</u> . Gehirnnerv)
MA	Mauthnerzellen (<u>M</u> authner <u>a</u> xon)
MeOb	<u>M</u> edulla <u>o</u> blongata
MesC	<u>M</u> esencephalon
MetC	<u>M</u> etencephalon
MFB	<u>m</u> ediale <u>F</u> aserbündel des Vorderhirns
MLF	<u>m</u> ediale <u>l</u> ongitudinale <u>F</u> aszikelbündel
MOT	<u>m</u> edialer <u>o</u> lfaktorischer <u>T</u> rakt
mVa	<u>m</u> olekulare Schicht der <u>V</u> alvula cerebelli
MyelC	<u>M</u> yelencephalon
NC	<u>N</u> ukleus von <u>C</u> ajal
NMLF	<u>N</u> ukleus des <u>m</u> edialen <u>l</u> ongitudinalen <u>F</u> aszikelbündels
NIn	<u>N</u> ukleus <u>i</u> nterpendiculus
NS	<u>N</u> ukleus corticalis

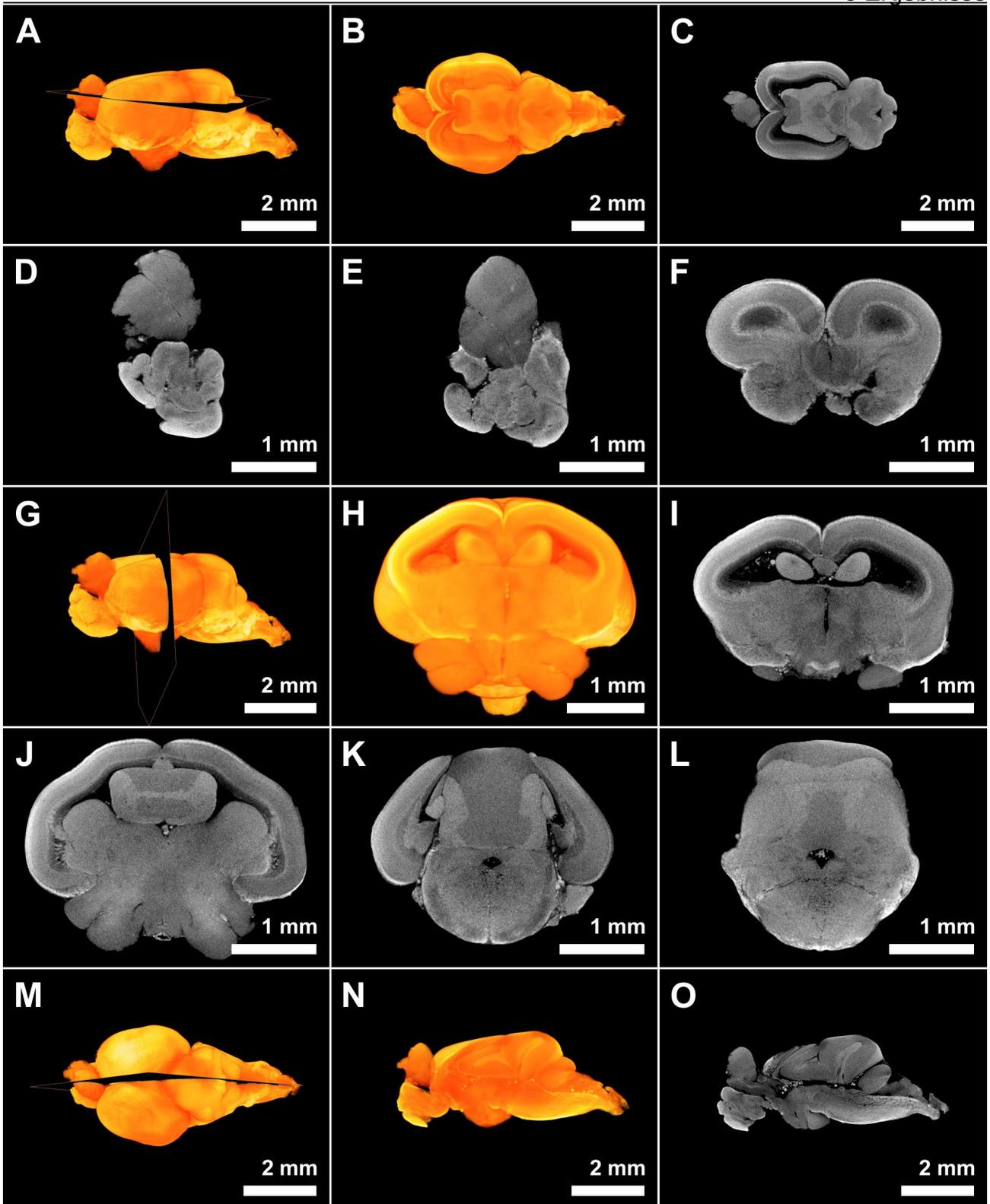
Nxm	vagaler <u>M</u> otorn <u>u</u> k <u>e</u> us (Vagusnerv <u>X</u> . Gehirnnerv)
oN l	<u>l</u> inker <u>o</u> ptischer <u>N</u> erv (II. Gehirnnerv)
oN r	<u>r</u> echter <u>o</u> ptischer <u>N</u> erv (II. Gehirnnerv)
OT	<u>o</u> ptischer <u>T</u> rakt
PGC	präglomerulärer Komplex (<u>p</u> reglomerular <u>c</u> omplex)
PGZ _{L1-L3}	periventrikuläre Zone 1-3 des optischen Tektums (1: Fasern; 2: vereinzelt lose Zellen; 3: dichte Zellschicht; <u>p</u> eriventricular <u>g</u> rey <u>z</u> one of optic tectum layer 1-3)
Pit	Hirnanhangsdrüse (<u>p</u> ituitary gland)
PO	<u>p</u> osteriorer prätektaler Nukleus
PPa	anteriorer parvozellulärer präoptischer Nukleus des ventralen posterioren Telencephalons (<u>p</u> arvocellular <u>p</u> reoptic nucleus, <u>a</u> nterior part)
Ppp	posteriore parvozellulärer präoptischer Nukleus des ventralen posterioren Telencephalons (<u>p</u> arvocellular <u>p</u> reoptic nucleus, <u>p</u> osterior part)
Psm	magnozöllulärer Nukleus des superfiziellen Prätektums (<u>m</u> agno <u>c</u> ellular nucleus of the <u>s</u> uperficial <u>p</u> retectum)
Psp	parvozelluläre Nukleus des superfiziellen Prätektums (<u>p</u> arvocellular nucleus of the <u>s</u> uperficial <u>p</u> retectum)
PTN	<u>p</u> osteriorer <u>t</u> uberaler <u>N</u> ukleus
RV	<u>r</u> hombencephaler <u>V</u> entrikel
SD	<u>S</u> acculus <u>d</u> orsalis
ScR	<u>s</u> uprachiasmatische <u>R</u> egion
SGT	<u>s</u> ekundärer <u>G</u> eschmackstrakt
TC	<u>T</u> elencephalon
TCd	<u>d</u> orsaler Abschnitt des <u>T</u> elencephalons
TCdc	zentrale Zone des TCd (<u>c</u> entral zone of <u>TCd</u>)
TCdl	<u>l</u> aterale Zone des <u>TCd</u>
TCdm	<u>m</u> ediale Zone des <u>TCd</u>
TCdp	<u>p</u> osteriore Zone des <u>TCd</u>
TCv	<u>v</u> entraler Abschnitt des <u>T</u> elencephalons
TCvc	zentraler Nukleus des TCv (<u>c</u> entral nucleus of <u>TCv</u>)
TCvd	<u>d</u> orsaler Nukleus des <u>TCv</u>
TCvv	<u>v</u> entraler Nukleus des <u>TCv</u>
TCV	<u>t</u> elencephaler <u>V</u> entrikel
Tg	<u>T</u> egmentum
TeV	<u>t</u> ektaler <u>V</u> entrikel
TL	<u>T</u> orus <u>l</u> ongitudinalis
TLa	<u>T</u> orus <u>l</u> ateralis
TO	optisches Tektum (<u>t</u> ectum <u>o</u> pticum)
TS	<u>T</u> orus <u>s</u> emicircularis
TTB	tektobulbarer Trakt (<u>T</u> ractus <u>t</u> ektobulbaris)
TTBc	überkreuzter tektobulbarer Trakt (<u>T</u> ractus <u>t</u> ektobulbaris <u>c</u> ruciatus)
TTBr	gerader tektobulbarer Trakt (<u>T</u> ractus <u>t</u> ektobulbaris <u>r</u> ectus)
Va	<u>V</u> alvula cerebelli
Vad	<u>d</u> orsaler Anteil / dorsales Band der <u>V</u> alvula Cerebelli
Vav	<u>v</u> entraler Anteil / ventrales Band der <u>V</u> alvula Cerebelli
VOT	ventrolateraler optischer Trakt
VT	ventraler <u>T</u> halamus
III.	<u>III.</u> Gehirnnerv (Nervus oculomotorius)
IV.	<u>IV.</u> Gehirnnerv (Nervus trochlearis)
V.	<u>V.</u> Gehirnnerv / Trigeminusnerv (Nervus trigeminus)
VII.	<u>VII.</u> Gehirnnerv / Seitenliniennerv (Nervus fascialis)
VIII.	<u>VIII.</u> Gehirnnerv (Nervus vestibulocochlearis)
X.	<u>X.</u> Gehirnnerv / Vagusnerv (Nervus vagus)

3.1.8 μ CT-Aufnahmen

Mit Volren unter Amira[®] ist es möglich, allein anhand des μ CT-Bilderstapels, sich das Gehirn der Sardelle in 3D anzeigen zu lassen. Die Funktion „Ortho Slicer“ ermöglicht es bei entsprechender Ausrichtung des μ CT-Bilderstapels horizontale, vertikale und sagittale Schnittebenen zu erhalten (siehe Abbildung 29: A-C; G-I; M-O). Gehirngroßstrukturen und einige ihrer Substrukturen lassen sich aufgrund des unterschiedlichen Kontrastes bereits gut erkennen. Die granulären und fasrigen Komponenten des Cerebellums sind klar und deutlich voneinander zu unterscheiden (Abb. 29: J-L). Feinere Strukturen, wie z.B. Kerne und feinste Nervenstränge sind nicht zu erkennen. Die Auflösung der μ CT-Bilder ist im Vergleich zu den Histologiebildern deutlich geringer (Vergleiche Abb. 29 D E F H I J K L mit Atlas Abb. 12-15, 17, 20 und 22).

Abbildung 29: Mit der „Volren-Funktion“ unter Amira[®] lässt sich anhand des μ CT-Bilderstapels das Gehirn der Sardelle in 3D anzeigen. Mit dem „Ortho Slicer“ können beliebige Schnittebenen erzeugt werden. ►

A: Laterale Ansicht des 3D-Gehirnmodells; Horizontale Schnittebene durch den μ CT-Bilderstapel. **B:** Unter A angeschnittene Ebene innerhalb des μ CT-Bilderstapels. **C:** Die unter B angeschnittene Ebene der μ CT-Aufnahme. **D:** Vertikale μ CT-Schnittebene im Bereich um Schnitt 4490 der Histoserie (vgl. Abb. 12). **E:** Vertikale μ CT-Schnittebene im Bereich um Schnitt 4710 der Histoserie (vgl. Abb. 13). **F:** Vertikale μ CT-Schnittebene im Bereich um Schnitt 5005 der Histoserie (vgl. Abb. 14). **G:** Laterale Ansicht des 3D-Gehirnmodells; Vertikale Schnittebene durch den μ CT-Bilderstapel. **H:** Unter G angeschnittene Ebene innerhalb des μ CT-Bilderstapels um Schnitt 5212 der Histoserie. **I:** Die unter H angeschnittene Ebene der μ CT-Aufnahme (vgl. Abb. 15). **J:** Vertikale μ CT-Schnittebene im Bereich um Schnitt 5648 der Histoserie (vgl. Abb. 17). **K:** Vertikale μ CT-Schnittebene im Bereich um Schnitt 6455 der Histoserie (vgl. Abb. 20). **L:** Vertikale μ CT-Schnittebene im Bereich um Schnitt 6996 der Histoserie (vgl. Abb. 22). **M:** Dorsale Ansicht des 3D-Gehirnmodells; Sagittale Schnittebene durch den μ CT-Bilderstapel. **N:** Unter M angeschnittene Ebene innerhalb des μ CT-Bilderstapels. **O:** Die unter N angeschnittene Ebene der μ CT-Aufnahme. A-C, G und M-O: Links ist anterior, rechts posterior. D-F und H-L: Oben dorsal und unten ventral.



3.2 Die Gehirne der Entwicklungsstadien

3.2.1 Histologie

Der Vergleich ausgewählter histologischer Querschnitte in den von anterior nach posterior angeordneten Gehirnbereichen Telencephalon, Chiasma, optisch relevanter Kerne, Tectum optikum, Cerebellum und Medulla oblongata zwischen Gehirnstadien unterschiedlichen Alters 5d, 10d, 20d, 31d, 36d und 45d erbringt die Erkenntnis, dass mit zunehmendem Alter die Anzahl der Zellen, die Gehirngröße im allgemeinen und die Gehirnkplexität zunimmt (vergl. Abb. 30-36).

Bei der **5 Tage** alten Larve sind die Ventrikelräume sehr deutlich erkennbar und dominant (Abb. 31). Die Untergliederung des Gehirns in fünf Hauptabschnitte ist bereits bei diesem sehr frühen Stadium möglich und somit folglich auch bei allen noch folgenden. Mit Ausnahme der Sehnerven, der anterioren Kommissur und der Grobuntergliederung des Diencephalons in dorsalen Thalamus, posteriores Tuberculum und Hypophyse, sind spezielle Substrukturen, d.h. benennbare Nervenbahnen oder Kerne, innerhalb des Nervengewebes auf dem gegebenen lichtmikroskopischen Auflösungs- und Beschreibungsniveau nicht klar zu identifizieren. In diesem frühen Stadium lässt sich lediglich kernhaltiges Nervenzell- von kernlosem Nervenfasergewebe unterscheiden, wobei die Anzahl der Nervenzellen überschaubar ist und den größeren Anteil des Gehirns ausmacht. Eine Gliederung in zwei Hemisphären ist schon früh vorhanden (Abb. 31).

Das **10 Tage** alte Larvenstadium weist im gegebenen Präparat zum Teil relativ große Ventrikelräume auf, die im Vergleich zum 5 Tage Larvenstadium allerdings - relativ - deutlich kleiner sind (vergl. Abb. 31 mit Abb. 32). Spezifische Substrukturen sind auch bei diesem Stadium noch nicht klar abgegrenzt, beziehungsweise nicht erkennbar. Das Verhältnis Nervenzell- zu Nervenfasergewebe entspricht im Querschnitt durch alle Hirnregionen circa einem 50/50-Verhältnis (Abb. 32). Auf Höhe des optischen Tektums kann ein deutlicher Wachstumsprozess ausgemacht werden. Das Gehirn geht an dieser Stelle deutlich in die Breite (Abb. 32 D).

Die Ventrikel erscheinen bei Sardellenlarven, die **20 Tage** oder älter sind, ähnlich ausgeprägt zu sein, wie bei einem adulten Individuum (vergl. Abb. 33-36 mit Abb. 10-27). Bei dem 20 Tage alten Larvenstadium lassen sich erstmals größere Blutgefäße eindeutig iden-

tifizieren (Abb. 33 D-F) und eine beginnende innere Organisation von Nervenzellverbänden bzw. Nervenfasern erkennen (Abb. 33 C, D). Vor allem im Vergleich mit jüngeren Stadien wird dies besonders deutlich in den Bereichen Telencephalon, optisches Tektum und Medulla oblongata (vergl. Abb. 31-33 A, D, F). Erstmals treten Kernansammlungen in Form von Clustern oder peripheren Ansammlungen gewisser Gehirnareale auf (Abb. 33 C, D). Insgesamt überwiegt der Faseranteil mittlerweile den Zellkernanteil des Gehirns (Abb. 33 A-F).

Obwohl das **31 Tage** alte Larvenstadium ganze 11 Tage älter ist als das nächst jüngere, ist die Histologie beider Larvenstadien einander sehr ähnlich (vergl. Abb. 33 mit Abb. 34). Lediglich die Gesamtgröße des Gehirns hat deutlich zugenommen (vergl. Abb. 30, 33 und 34). Nach 31 Tagen der Entwicklung können erstmals einem optischen Trakt entsprechend, von den Sehnerven ausgehende, nach dorsal ziehende Nervenfasern ausgemacht werden (Abb. 34 C). Blutgefäße sind erkennbar. Allerdings erscheint das Blutgefäßsystem im gegebenen Präparat im Vergleich zu dem 20 Tage alten Larvenstadium weniger deutlich (vergl. Abb. 33 mit Abb. 34 D-F).

Im allgemeinen fällt auf, das direkt an Ventrikel angrenzendes Nervengewebe Zellkerne enthält, d.h. eher Perikarya als Neuropil. Bei Sardellenlarven mit zunehmenden Alter, **36 Tage** und älter, kristallisiert sich dieser Zusammenhang zunehmend heraus (vergl. Abb. 31-34 mit Abb. 35 und 36). Spezielle Gehirnsstrukturen sind bei dem 36 Tage alten Larvenstadium bereits erkennbar und nach Kriterien der Lage eindeutig zu identifizieren und zu benennen (Abb. 35 C-E).

In diesem weit vorangeschrittenen Stadium scheint es als ob das Gehirn mittlerweile zu einem großen Teil aus Nervenfasern und nicht mehr hauptsächlich aus kernhaltigem Nervenzellgewebe besteht (Abb. 35 A-F). Im Vergleich zum 31 Tage alten Sardellenlarvenstadium, bei einem Altersunterschied von nur 5 Tagen, fällt ein enormer Größenunterschied auf. Anhand der histologischen Querschnitte ist dieser Unterschied vor allem in der großen Breitendifferenz ersichtlich (s. Abb. 31 und Abb. 34-35 im Detail). Das Blutgefäßsystem ist ab diesem Stadium sehr gut ausgeprägt und klar zu erkennen (Abb. 35 B-F). Das Cerebellum ist im Vergleich zu früheren Larvenstadien deutlich weiter entwickelt (vergl. Abb. 31-35 E).

3 Ergebnisse

Das Gehirn des **45 Tage** alten Larvenstadiums weist primär einen deutlichen Größenunterschied im Vergleich zum nächst jüngerem Larvenstadium auf (Abb. 30 und Abb. 35-36 im Detail). Die Anzahl klar zu erkennender Substrukturen des Gehirns nimmt zu (vgl. Abb. 35 C-E mit Abb. 36 C-F). Im Einzelnen sind das: ventrale rhombencephale Kommissur (CvF), Mauthner-Axon (MA) und der okulomotorische Nerv (III). Sie erscheinen in diesem Entwicklungsstadium in der auch für das ausgereifte Tier typischen räumlichen Anordnung: Das CvF oberhalb des aufgespaltenen rhombencephalen Ventrikels, der III zu beiden Seiten der Hypophyse innerhalb des Mesencephalons und die MAs an zentraler Position innerhalb der Medulla oblongata (s. auch Kap 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6; Abb. 14, 15, 20-25).

Wie bei dem Gehirn einer adulten Sardelle deutet sich eine Stratifizierung des optischen Tektums an (Abb. 36 D). Das Verhältnis Nervenzell- zu Nervenfasergewebeanteilen liegt zunehmend auf der Seite der Fasern (Abb. 36). Am deutlichsten zeigt sich dieser Sachverhalt, sobald man die Sehnervenentwicklung der unterschiedlich alten Larvalstadien gegenüber stellt (Abb. 30 und Abb. 31-36 B).

Abbildung 30: Vergleich ausgewählter histologischer Querschnitte spezifischer Gehirnbereiche von Sardellenlarvenstadien unterschiedlichen Alters. ►

Die Querschnitte der von anterior nach posterior anzutreffenden Gehirnbereiche Telencephalon, Chiasma, optisch relevanter Kerne, Tektum optikum, Cerebellum und Medulla oblongata sind von oben nach unten angeordnet. Die Larvenstadien 5d, 10d, 20d, 31d, 36d und 45d sind mit aufsteigendem Alter von links nach rechts angeordnet. Oben ist dorsal und unten ventral.

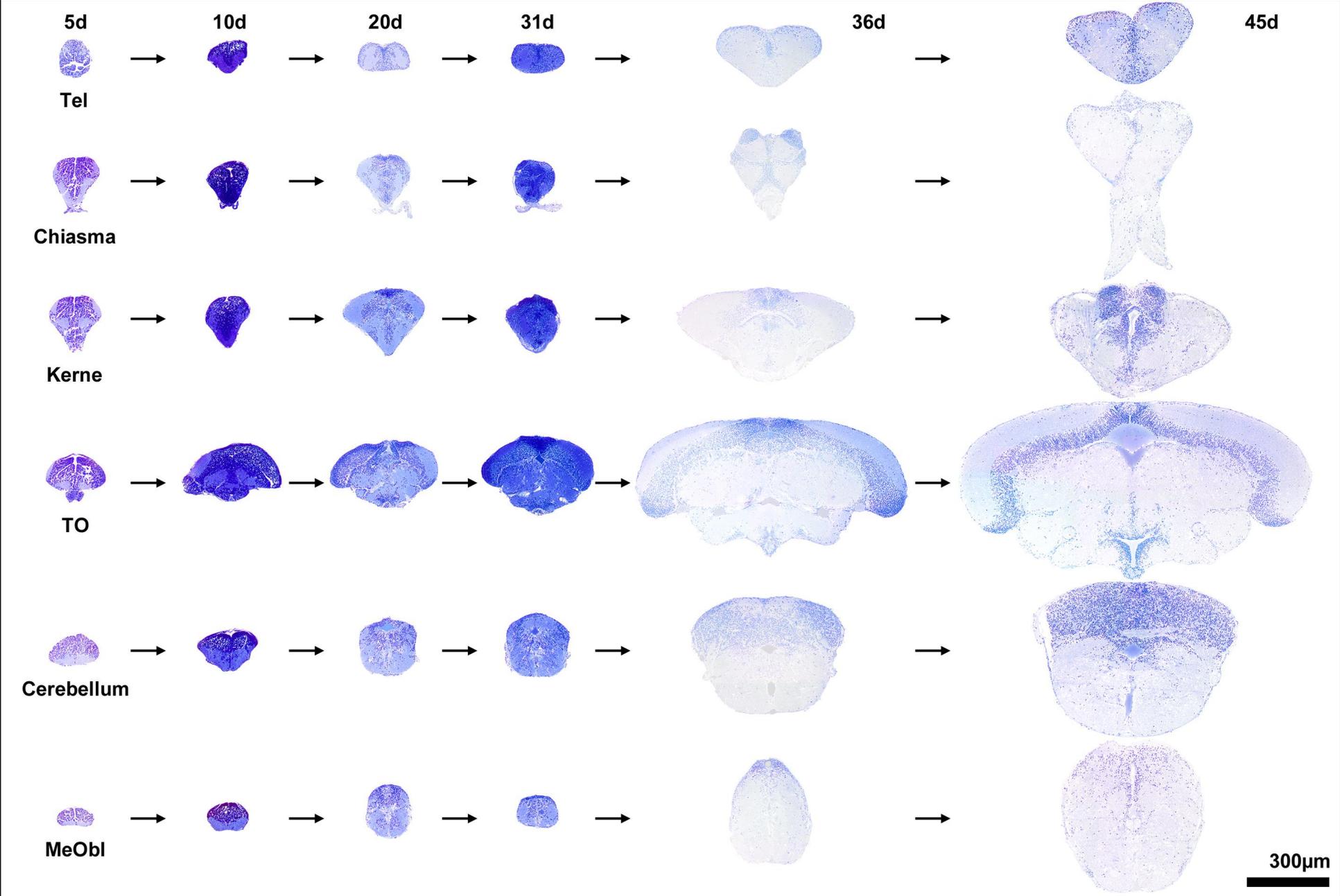


Abbildung 31: Histologische Querschnitte ausgewählter spezifischer Gehirnbereiche einer 5 Tage alten Sardellenlarve. ►

A: Telencephalon. **B:** Chiasma. **C:** Kerne. **D:** Tektum optikum. **E:** Cerebellum. **F:** Medulla oblongata.

Cant: anteriore Kommissur, **CO:** optisches Chiasma, **DCV:** diencephaler Ventrikel, **dThal:** dorsaler Thalamus, **FB:** Faserbündel des Vorderhirns, **GS:** graue Substanz (Zellkerne), **H:** Hypothalamus, **LFB:** laterale Faserbündel des Vorderhirns, **oN l:** linker optischer Nerv, **oN r:** rechter optischer Nerv, **postTu:** posteriores Tuberculum, **RV:** rhombencephaler Ventrikel, **TCV:** telencephaler Ventrikel, **Tg:** Tegmentum, **TeV:** tektaler Ventrikel, **TO:** optisches Tektum, **WS:** weiße Substanz (Fasern). Oben ist dorsal und unten ventral.

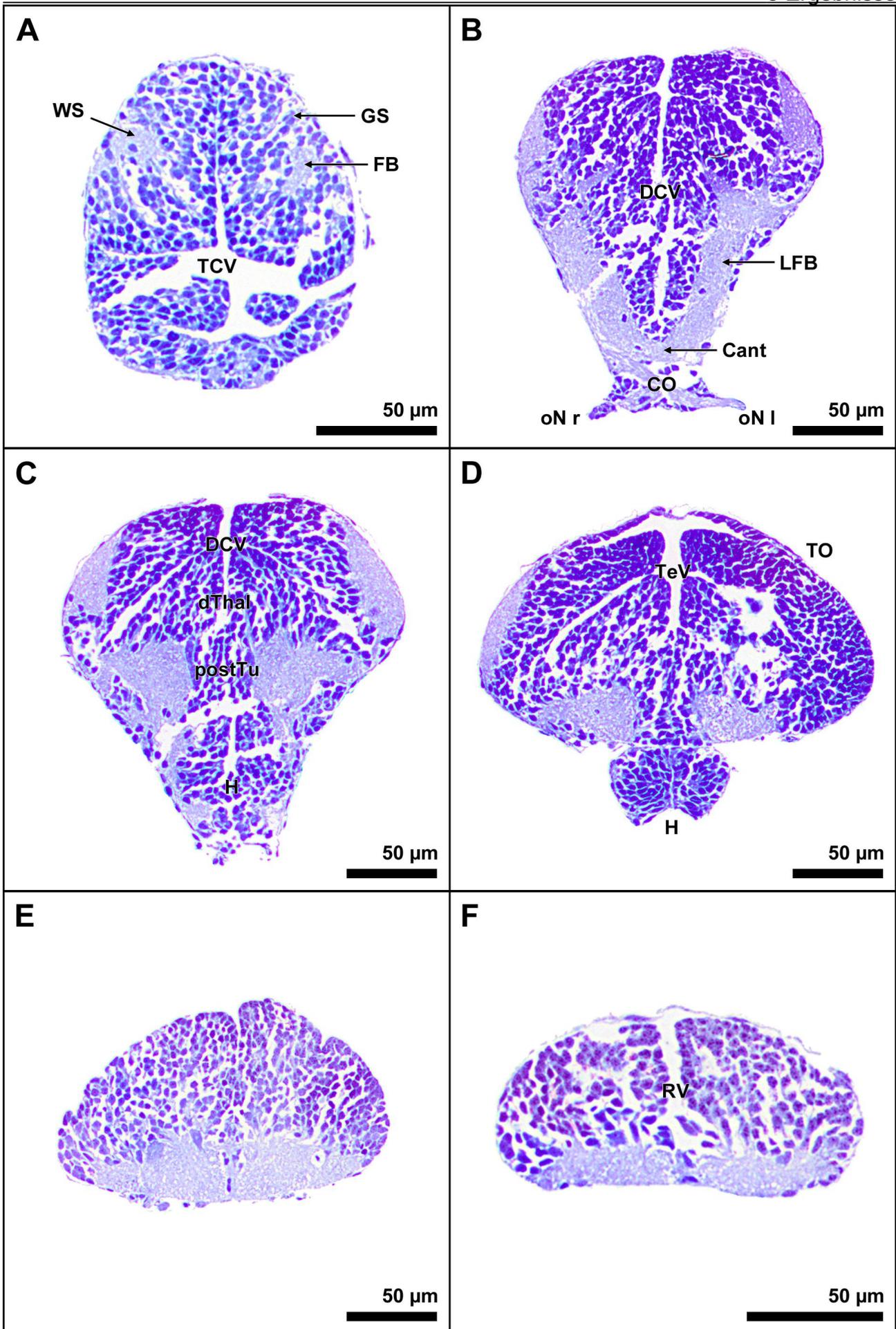


Abbildung 32: Histologische Querschnitte ausgewählter spezifischer Gehirnbereiche einer 10 Tage alten Sardellenlarve. ►

A: Telencephalon. **B:** Chiasma. **C:** Kerne. **D:** Tektum optikum. **E:** Cerebellum. **F:** Medulla oblongata.

CO: optisches Chiasma, **DCV:** diencephaler Ventrikel, **FB:** Faserbündel des Vorderhirns, **GS:** graue Substanz (Zellkerne), **H:** Hypothalamus, **oN l:** linker optischer Nerv, **oN r:** rechter optischer Nerv, **RV:** rhombencephaler Ventrikel, **TCV:** telencephaler Ventrikel, **Tg:** Tegmentum, **TeV:** tektales Ventrikel, **TO:** optisches Tektum, **WS:** weiße Substanz (Fasern). Oben ist dorsal und unten ventral.

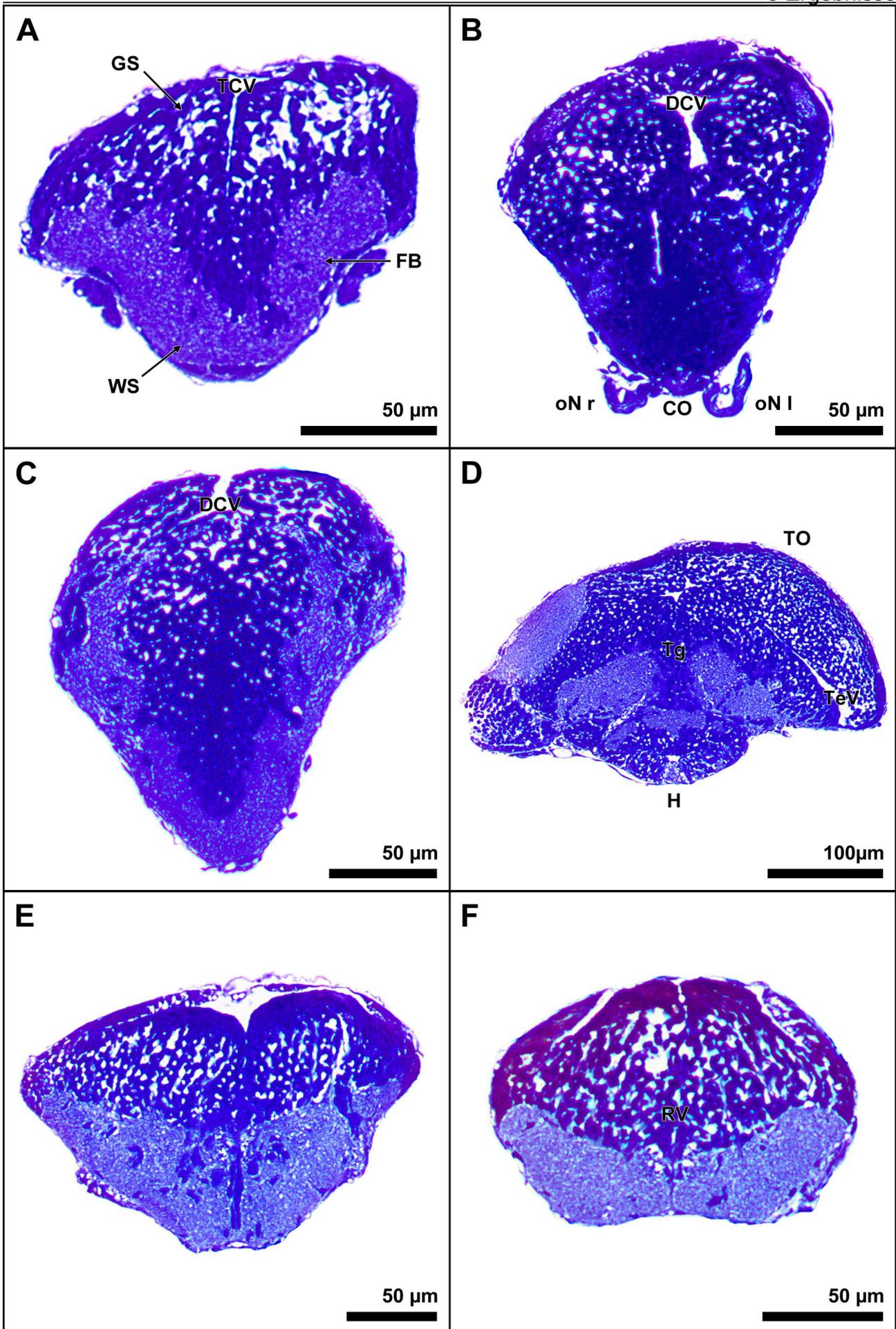


Abbildung 33: Histologische Querschnitte ausgewählter spezifischer Gehirnbereiche einer 20 Tage alten Sardellenlarve. ►

A: Telencephalon. **B:** Chiasma. **C:** Kerne. **D:** Tektum optikum. **E:** Cerebellum. **F:** Medulla oblongata.

BV: Blutgefäß, **CO:** optisches Chiasma, **Cpop:** postoptische Kommissur, **DCV:** diencephaler Ventrikel, **DIL:** diffuser Nukleus des inferioren Lobus, **dThal:** dorsaler Thalamus, **GS:** graue Substanz (Zellkerne), **H:** Hypothalamus, **oN l:** linker optischer Nerv, **oN r:** rechter optischer Nerv, **PGR:** präglomeruläre Region, **Pit:** Hypophyse, **postTu:** posteriores Tuberculum, **RV:** rhombencephaler Ventrikel, **TCV:** telencephaler Ventrikel, **Tg:** Tegmentum, **TeV:** tektaler Ventrikel, **TLa:** Torus lateralis, **TO:** optisches Tektum, **Val:** Valvula, **WS:** weiße Substanz (Fasern), **+**: Nervenfasern. Oben ist dorsal und unten ventral.

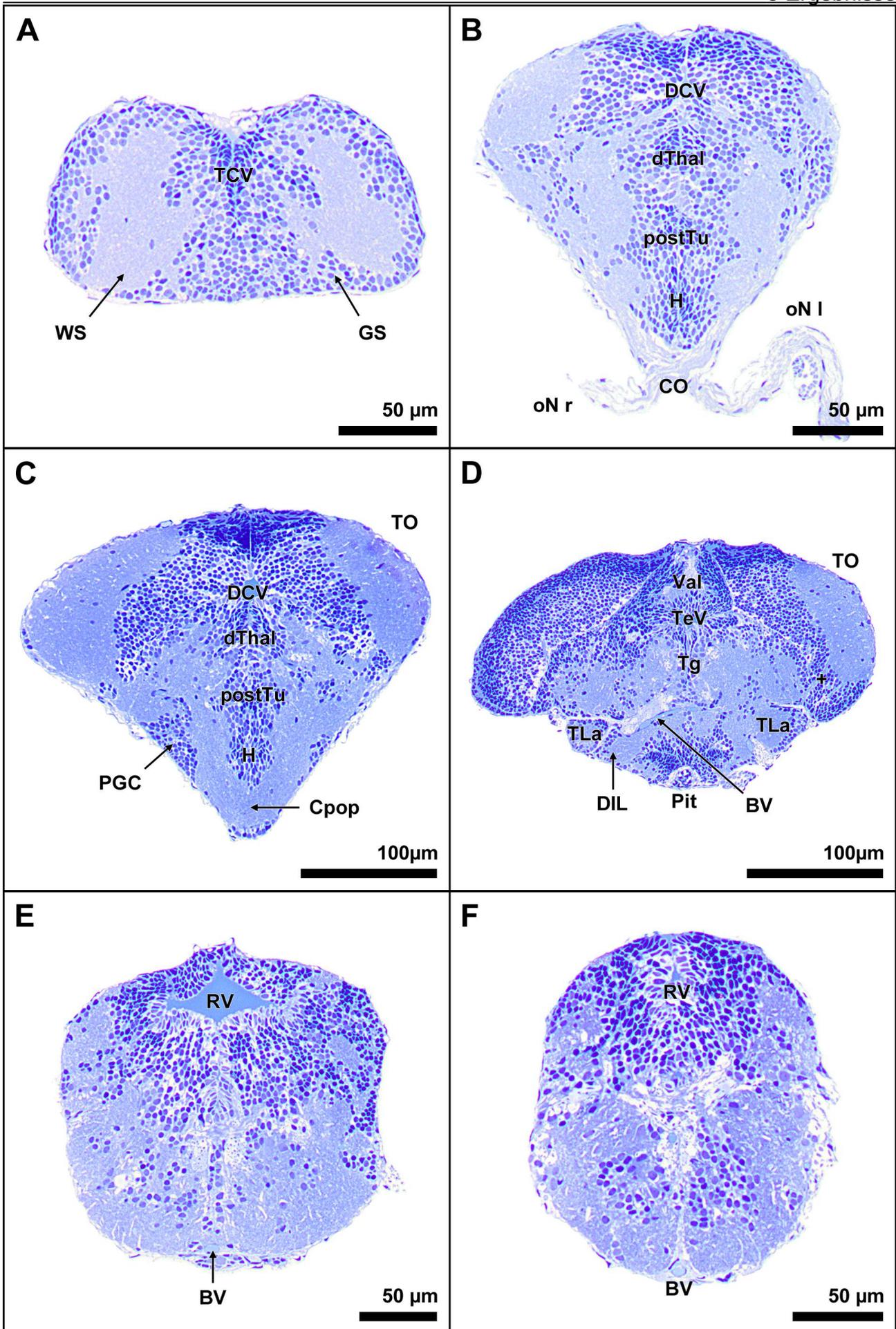


Abbildung 34: Histologische Querschnitte ausgewählter spezifischer Gehirnbereiche einer 31 Tage alten Sardellenlarve. ►

A: Telencephalon. **B:** Chiasma. **C:** Kerne. **D:** Tektum optikum. **E:** Cerebellum. **F:** Medulla oblongata.

BV: Blutgefäß, **CO:** optisches Chiasma, **DCV:** diencephaler Ventrikel, **dThal:** dorsaler Thalamus, **GS:** graue Substanz (Zellkerne), **H:** Hypothalamus, **oN l:** linker optischer Nerv, **oN r:** rechter optischer Nerv, **OT:** optischer Trakt, **postTu:** posteriores Tuberculum, **RV:** rhombencephaler Ventrikel, **TCV:** telencephaler Ventrikel, **TeV:** tektaler Ventrikel, **TLa:** Torus lateralis **TO:** optisches Tektum, **WS:** weiße Substanz (Fasern). Oben ist dorsal und unten ventral.

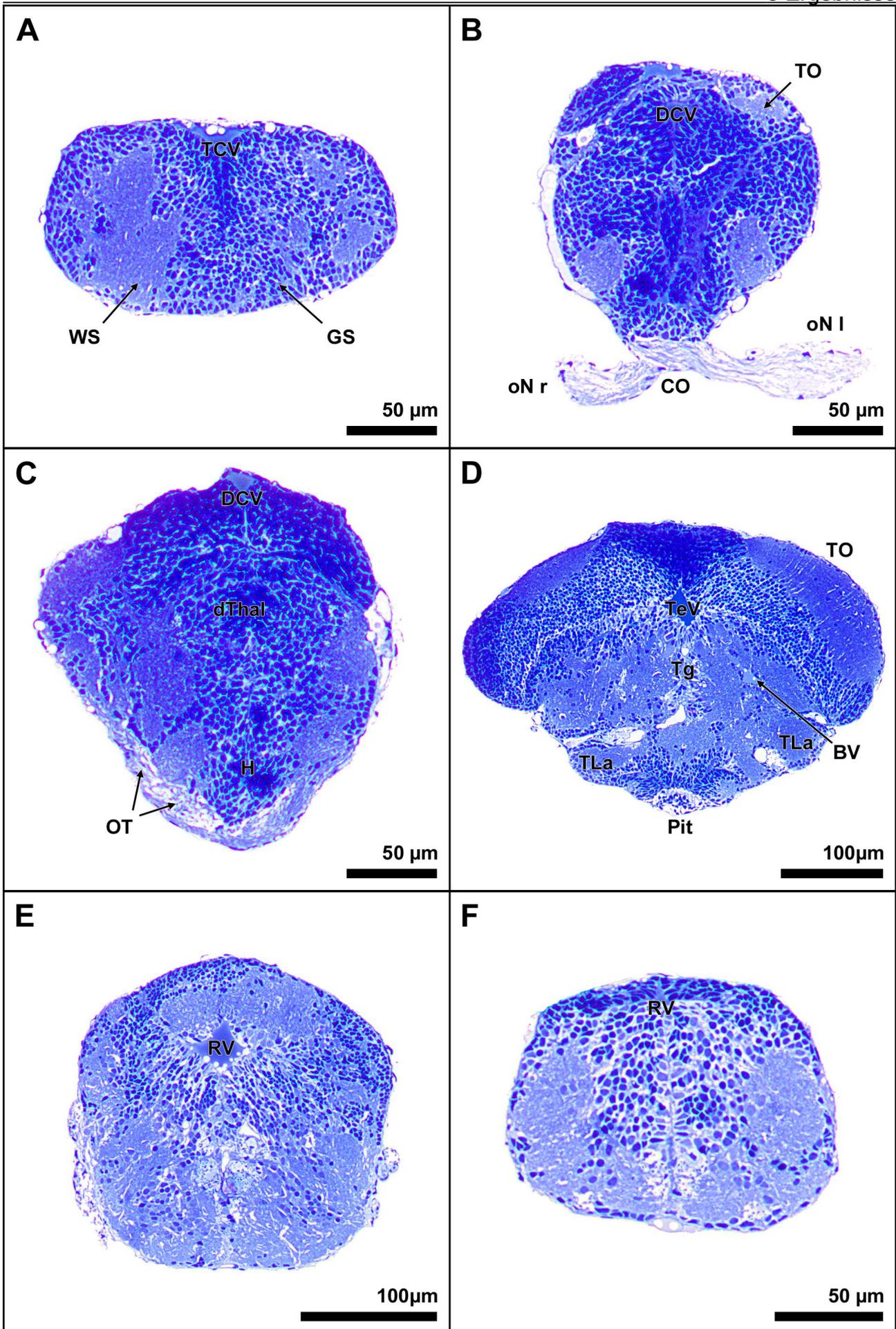


Abbildung 35: Histologische Querschnitte ausgewählter spezifischer Gehirnbereiche einer 36 Tage alten Sardellenlarve. ►

A: Telencephalon. **B:** Chiasma. **C:** Kerne. **D:** Tektum optikum. **E:** Cerebellum. **F:** Medulla oblongata.

BV: Blutgefäß, **CBP:** cerebellare Platte, **Cpost:** posteriore Kommissur, **DCV:** diencephaler Ventrikel, **DIL:** diffuser Nukleus des inferioren Lobus, **dThal:** dorsaler Thalamus, **Ethal:** Eminentia Thalami, **GS:** graue Substanz (Zellkerne), **H:** Hypothalamus, **MLV:** mediales longitudinales Fasikel, **oN l:** linker optischer Nerv, **oN r:** rechter optischer Nerv, **OT:** optischer Trakt, **P:** Pallium, **postTu:** posteriores Tuberculum, **präOR:** präoptische Region, **RV:** rhombencephaler Ventrikel, **sP:** Subpallium, **TCV:** telencephaler Ventrikel, **Tg:** Tegmentum, **TO:** optisches Tektum, **TL:** Torus longitudinalis, **TLa:** Torus lateralis, **Val:** Valvula, **WS:** weiße Substanz (Fasern). Oben ist dorsal und unten ventral.

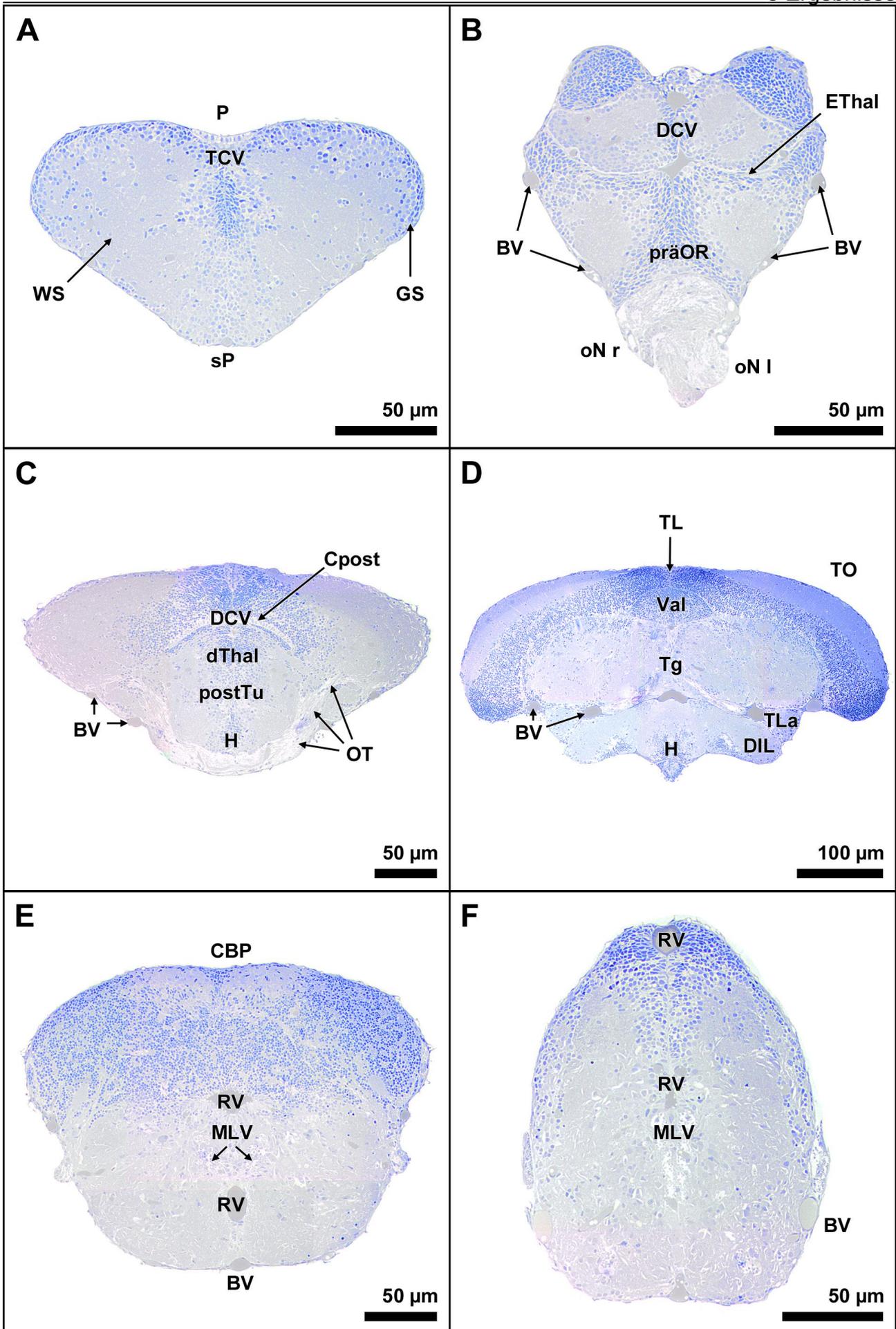
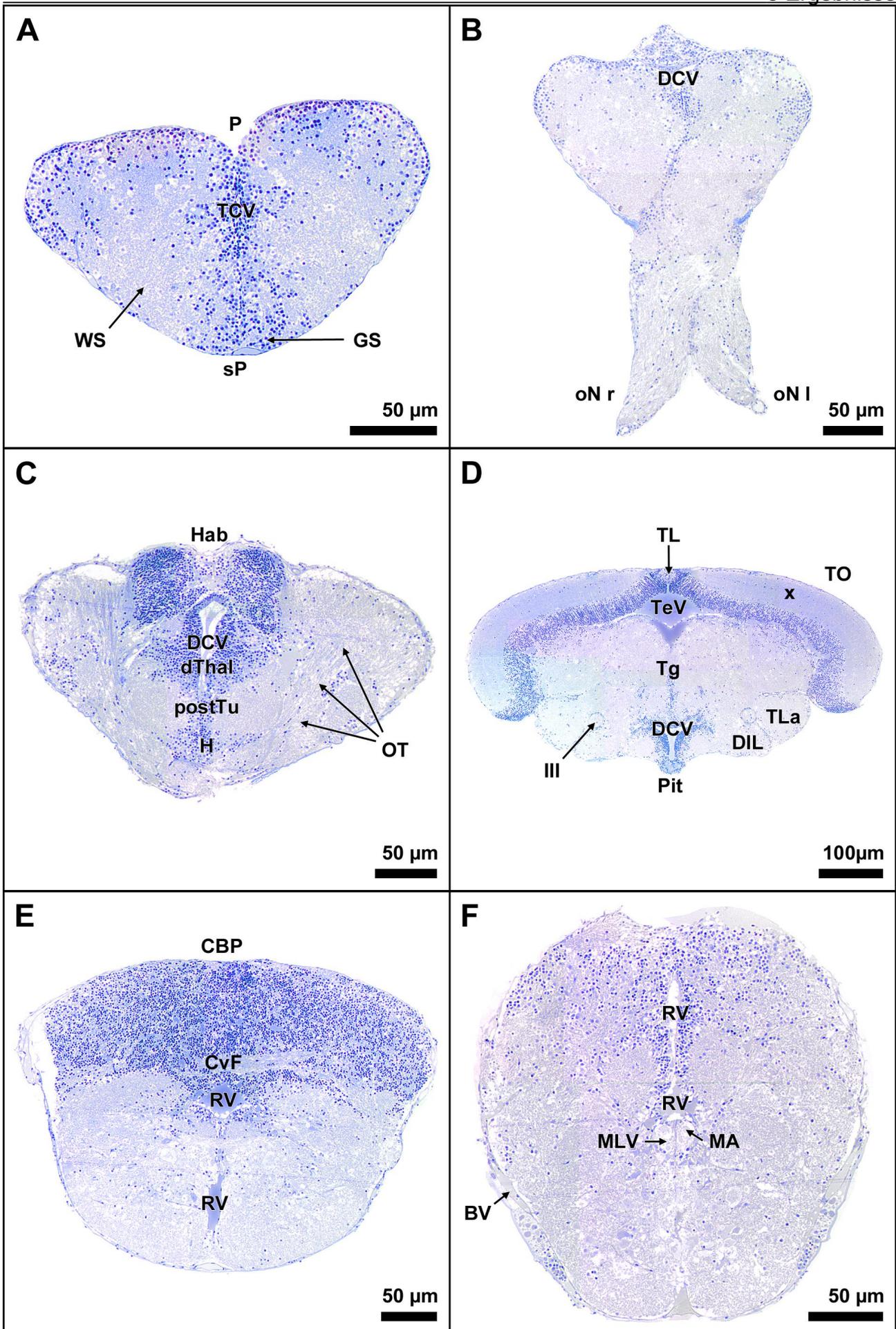


Abbildung 36: Histologische Querschnitte ausgewählter spezifischer Gehirnbereiche einer 45 Tage alten Sardellenlarve. ►

A: Telencephalon. **B:** Chiasma. **C:** Kerne. **D:** Tektum optikum. **E:** Cerebellum. **F:** Medulla oblongata.

BV: Blutgefäß, **CBP:** cerebellare Platte, **CvF:** ventrale rhombencephale Kommissur, **DCV:** diencephaler Ventrikel, **DIL:** diffuser Nukleus des inferioren Lobus, **dThal:** dorsaler Thalamus, **GS:** graue Substanz (Zellkerne), **H:** Hypothalamus, **Hab:** Habenula; **MA:** Mauthner Axon, **MLV:** mediales longitudinales Fasikel, **oN l:** linker optischer Nerv, **oN r:** rechter optischer Nerv, **OT:** optischer Trakt, **P:** Pallium, **Pit:** Hypophyse, **postTu:** posteriores Tuberculum, **RV:** rhombencephaler Ventrikel, **sP:** Subpallium, **TCV:** telencephaler Ventrikel, **TeV:** tektaler Ventrikel, **Tg:** Tegmentum, **TO:** optisches Tektum, **TL:** Torus longitudinalis, **TLa:** Torus lateralis, **WS:** weiße Substanz (Fasern), **x:** angedeutete Stratifizierung des optischen Tektums, **III:** okulomotorischer Nerv. Oben ist dorsal und unten ventral.



3.2.2 3D-Mikroanatomie und Volumetrie

Vergleicht man die in 3D rekonstruierten Gehirne der Larvenstadien unterschiedlichen Alters 5d, 10d, 20d, 31d, 36d und 45d miteinander, so zeigt sich, dass mit zunehmenden Alter die Gehirngröße generell zunimmt (Abb. 38). Eine Vermessung der Larvalstadien unter Amira® kann diesen Befund zusätzlich bestätigen. Die Parameter Länge (von der vordersten Spitze bis zum hintersten Punkt des Gehirns), Breite (gemessen auf Höhe des optischen Tektums), Höhe (auf Höhe der Hypophyse) und Gesamtvolumen nehmen mit zunehmenden Alter kontinuierlich zu (Tab. 7, Abb. 37). Die Breiten- und Höhenmessungen erfolgten bei frontaler Ansicht. Als maximale Breite bzw. Höhe wurde der Messwert herangezogen, der bei horizontalen- bzw. vertikalen Anlegens des Messbalkens, den größten Wert ergab.

Die Form des Gehirns ändert sich von anfänglich wurmförmig mit voran schreitendem Alter (innerhalb der ersten 10 Tage) zunächst sehr stark, danach ähnelt das Larvalgehirn zunehmend dem eines adulten Fisches. Die Anpassung an die Form des adulten Gehirns erfolgt kontinuierlich mit zunehmendem Alter (Abb. 38). Ein wesentlicher Unterschied des 45 Tage alten Sardellengehirns gegenüber dem eines zwei bis drei Jahre alten Adultus ist die noch deutlich geringere dorsoventrale Ausdehnung („Höhe“) des Metencephalons mit Cerebellum.

Tabelle 7: Zusammenfassung der unter Amira® ermittelten Gehirn-Parameter Länge, Breite, Höhe und Volumen der Sardellenlarvenstadien unterschiedlichen Alters.

Alter Larve [d]	Länge [µm]	Breite [µm]	Höhe [µm]	Volumen [mm ³]
5	490	226	219	0,008
10	507	370	221	0,011
20	660	412	254	0,020
31	1081	510	350	0,054
36	1882	1015	557	0,303
45	2294	1313	701	0,633

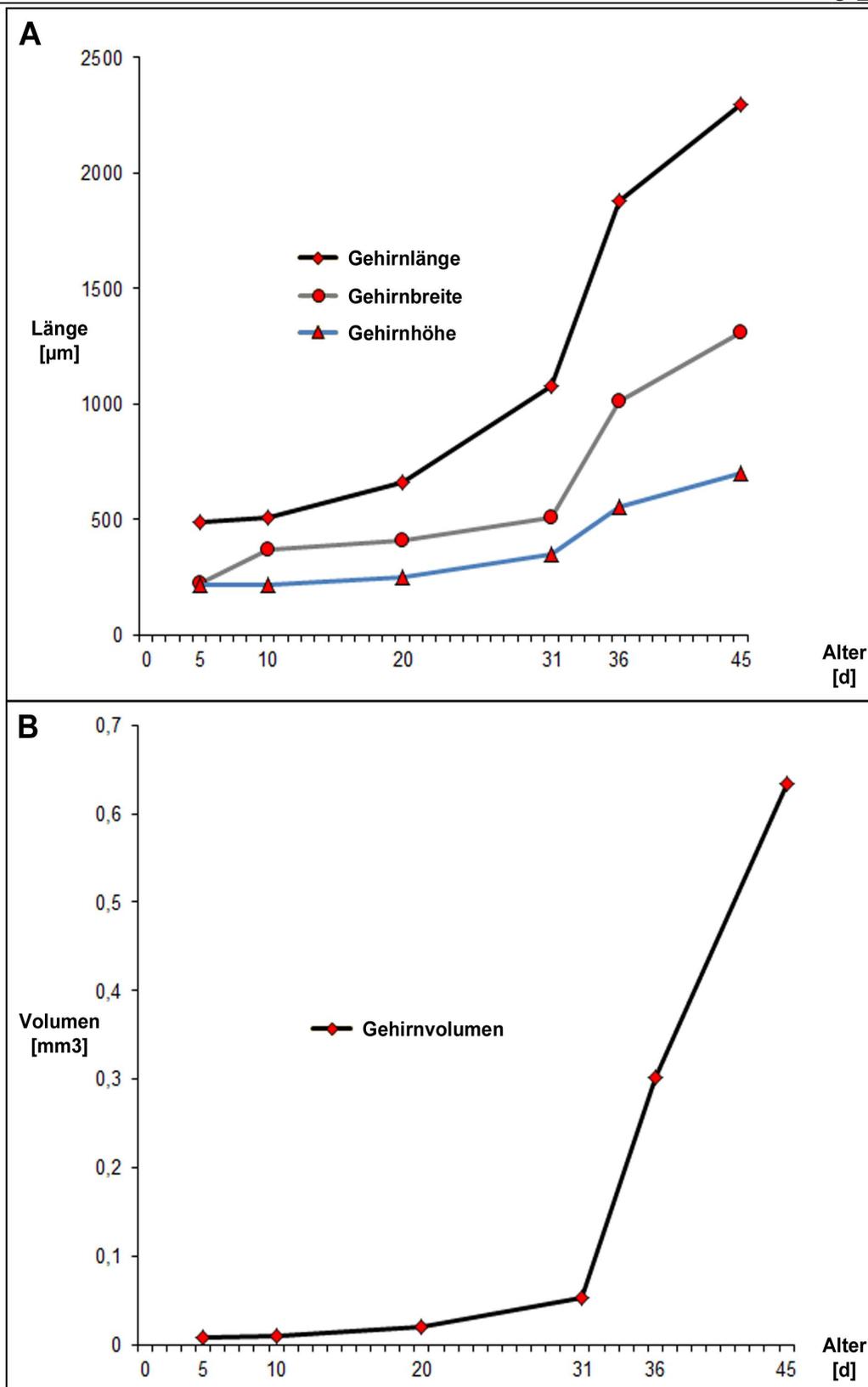


Abbildung 37: Grafische Darstellung der unter Amira[®] ermittelten Messwerte (Länge/Breite/Höhe/Volumen des Gehirns gegen die Zeit) der Sardellenlarvenstadien unterschiedlichen Alters.

A: Länge/Breite/Höhe [μm] gegen die Zeit [d]. Rauten stehen für Längen-, Kreise für Breiten- und Dreiecke für Höhenmessungen. **B:** Volumen [mm^3] gegen die Zeit [d].

Abbildung 38: 3D-Rekonstruktion des Sardellengehirns unterschiedlichen Alters:

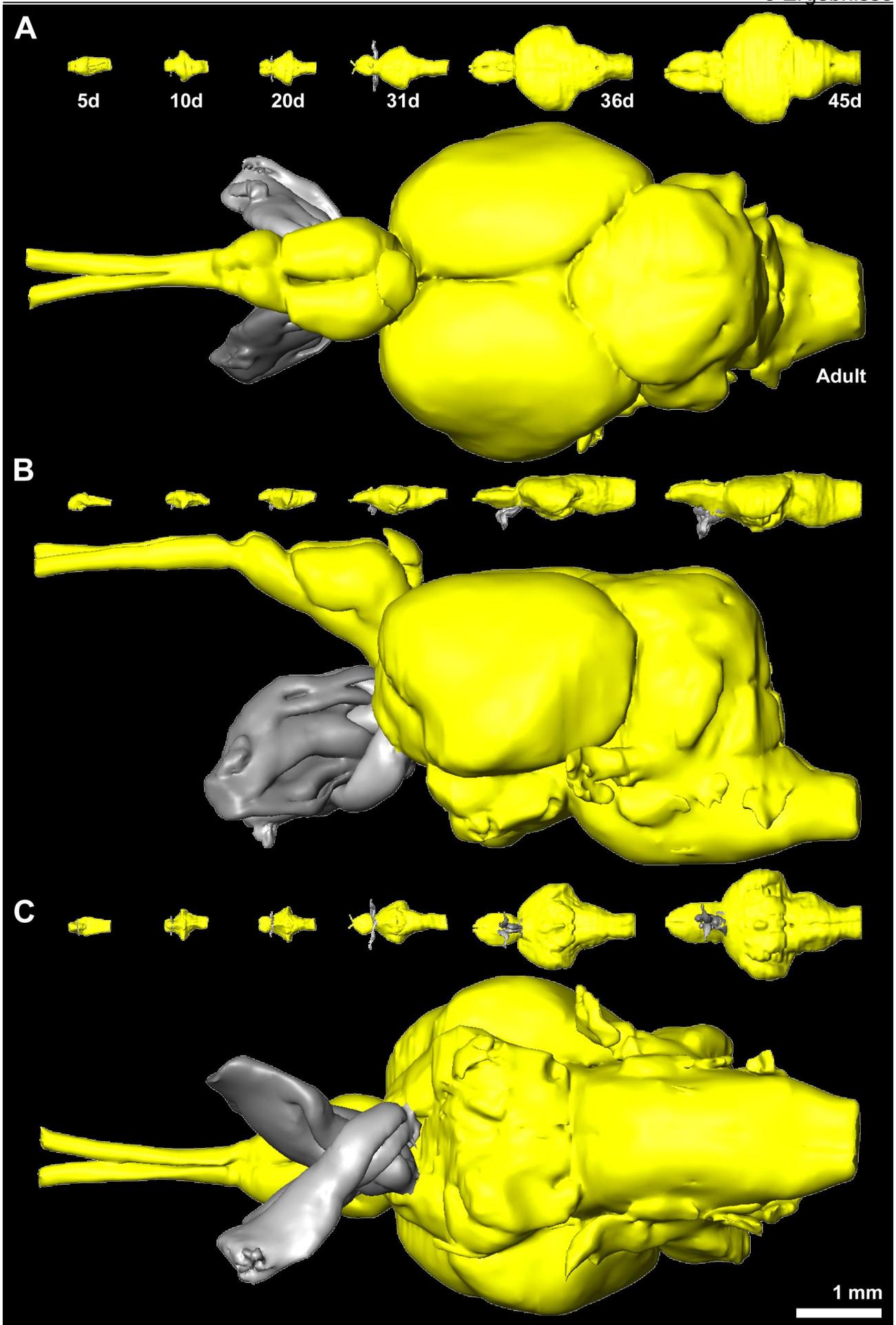
5d, 10d, 20d, 31d, 36d, 45d und Adult.



A: Dorsalansicht der unter Amira[®] in 3D rekonstruierten Sardellengehirne. Im oberen Bereich sind die Gehirne der Larvalstadien von links nach rechts, von jung nach alt angeordnet. Zum Vergleich ist darunter das Gehirn einer adulten Sardelle abgebildet. **B:** Lateralansicht der unter Amira[®] in 3D rekonstruierten Sardellengehirne. Anordnung wie bei A. **C:** Ventralansicht der unter Amira[®] in 3D rekonstruierten Sardellengehirne. Anordnung wie bei A.

Der Maßstabsbalken ist für alle drei Teilaspekte der Abbildung gültig.

dunkelgrau: linker Sehnerv, **hellgrau:** rechter Sehnerv; **gelb:** Gehirn.



3 Ergebnisse

Mit Amira® ist es möglich einzelne 3D-Strukturen transparent darzustellen. Dadurch ist es möglich Details, wie die Kreuzungsmuster der Sehnerven bei den Sardellenlarven zu untersuchen. Bei den Sardellenlarven kommen Typ I und II nach (Mogi et al., 2009) vor: Der linke Sehnerv kreuzt vor dem rechten (Typ I bei 20d, 31d) und der rechte Sehnerv kreuzt vor dem linken (Typ II bei 5d, 36d, 45d). Für das 10d Sardellenlarvenstadium kann anhand der 3D-Rekonstruktion keine eindeutige Aussage bezüglich des Kreuzungsmusters getroffen werden (Abb. 39 und 40).

Abbildung 39: Frontalansicht der 3D-Rekonstruktion von Sardellengehirnen unterschiedlichen Alters mit Fokus auf die Kreuzungsmuster der Sehnerven. ►

A: 3D-Rekonstruktion des Gehirns einer 5 Tagen alten Sardellenlarve. **A':** Wie A, Gehirn transparent dargestellt; rechter Sehnerv kreuzt vor linkem. **B:** 3D-Rekonstruktion des Gehirns einer 10 Tagen alten Sardellenlarve. **B':** Wie B, Gehirn transparent dargestellt; Kreuzungsmuster ist in der 3D-Rekonstruktion nicht klar erkennbar. **C:** 3D-Rekonstruktion des Gehirns einer 20 Tagen alten Sardellenlarve. **C':** Wie C, Gehirn transparent dargestellt; linker Sehnerv kreuzt vor rechtem.
dunkelgrau: linker Sehnerv, **hellgrau:** rechter Sehnerv; **gelb:** Gehirn.

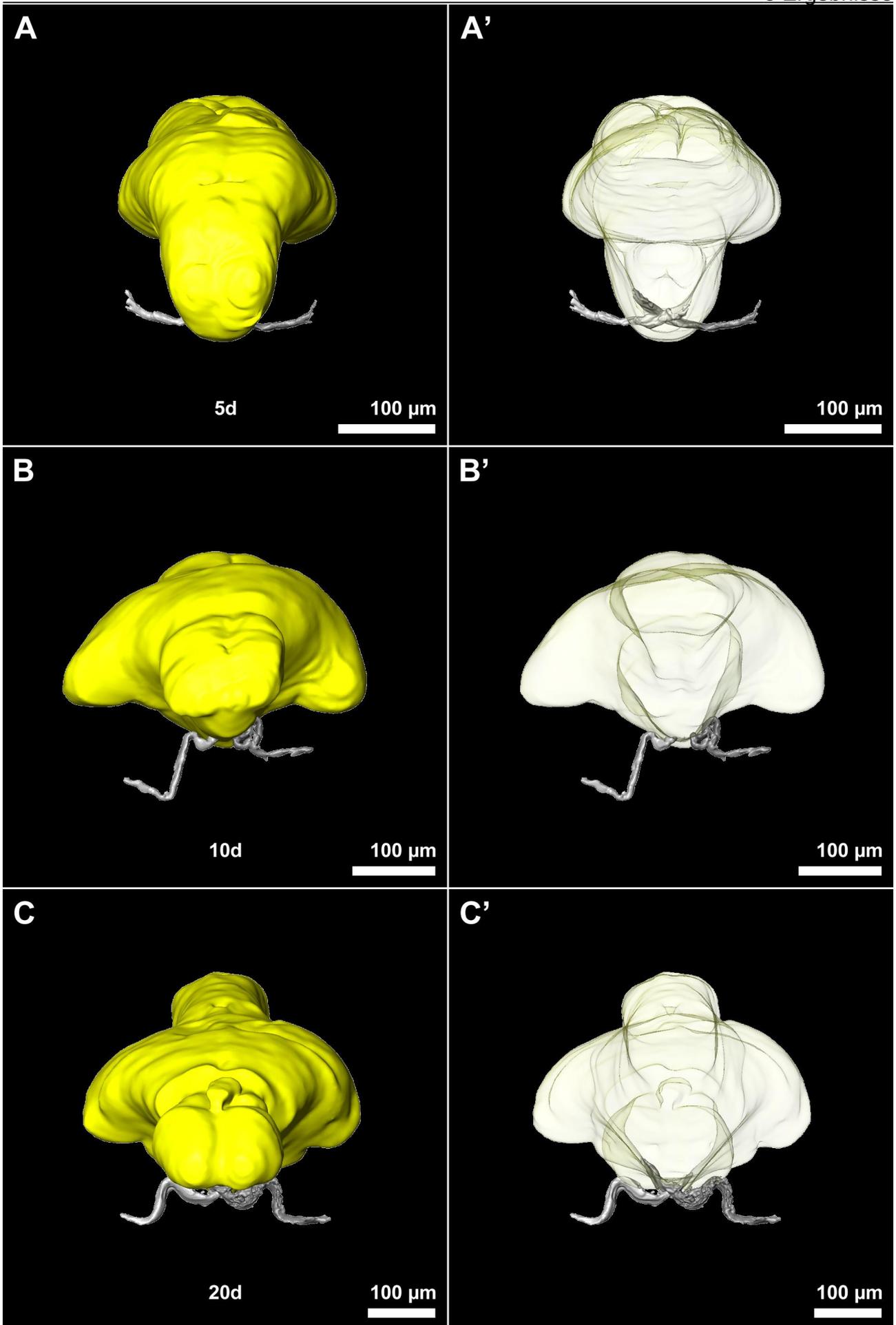
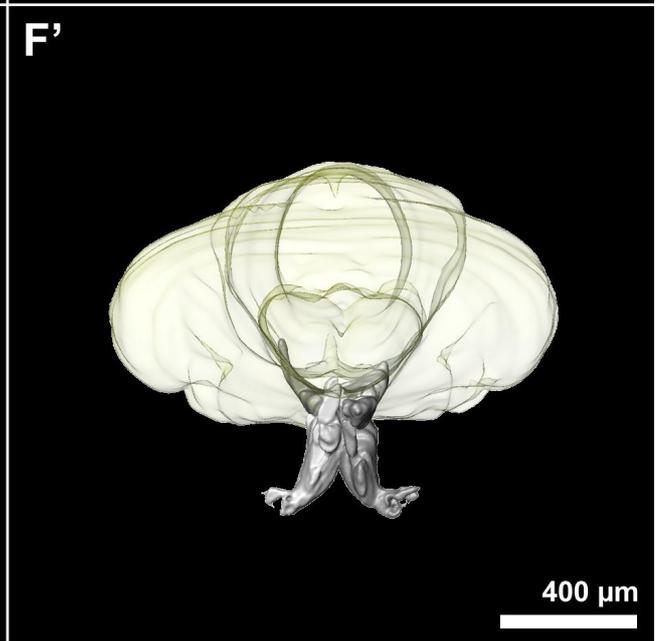
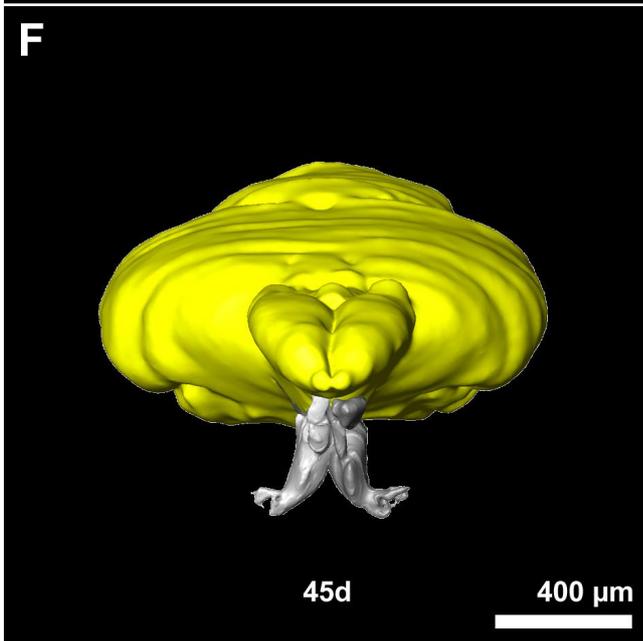
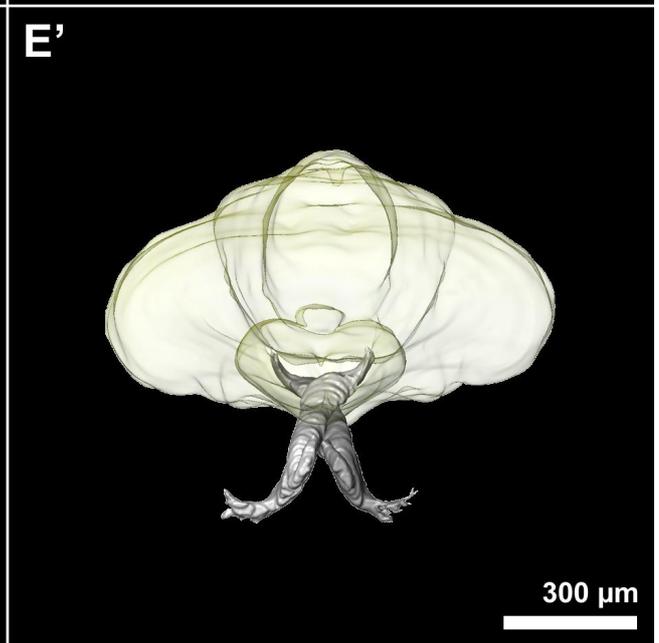
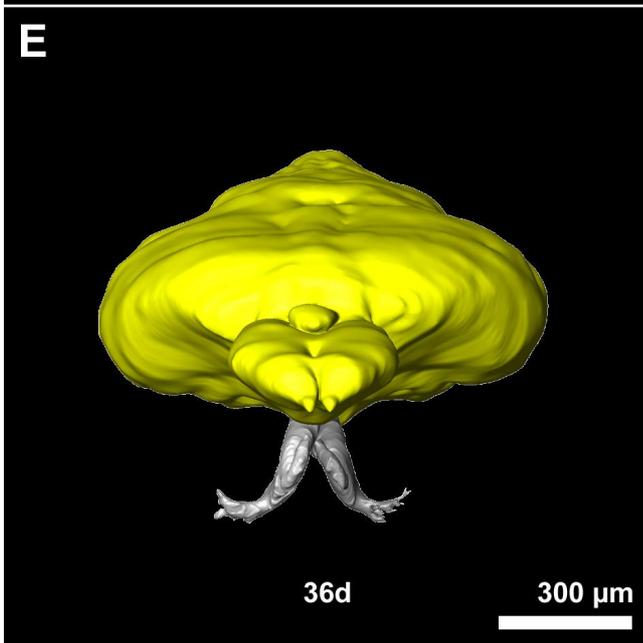
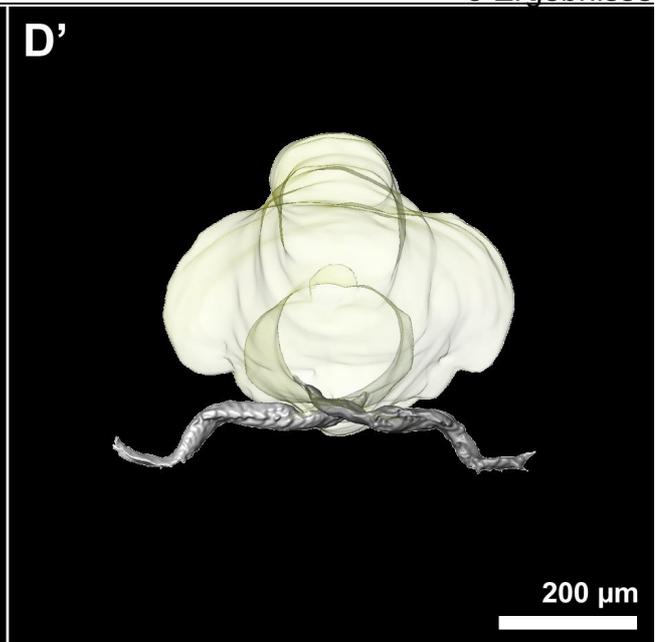
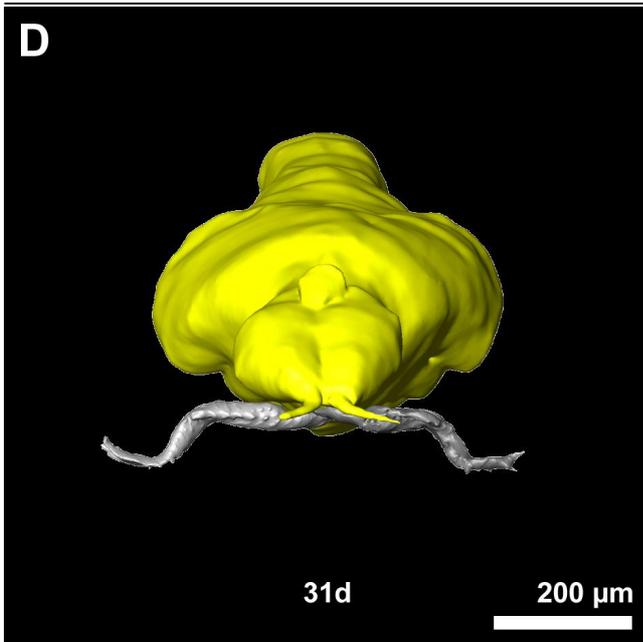


Abbildung 40: Frontalansicht der 3D-Rekonstruktion von Sardellengehirnen unterschiedlichen Alters mit Fokus auf die Kreuzungsmuster der Sehnerven (Fortsetzung). ▶

D: 3D-Rekonstruktion des Gehirns einer 31 Tagen alten Sardellenlarve. **D':** Wie D, Gehirn transparent dargestellt; linker Sehnerv kreuzt vor rechtem. **E:** 3D-Rekonstruktion des Gehirns einer 36 Tagen alten Sardellenlarve. **E':** Wie E, Gehirn transparent dargestellt; rechter Sehnerv kreuzt vor linkem. **F:** 3D-Rekonstruktion des Gehirns einer 45 Tagen alten Sardellenlarve. **F':** Wie F, Gehirn transparent dargestellt; rechter Sehnerv kreuzt vor linkem.

dunkelgrau: linker Sehnerv, **hellgrau:** rechter Sehnerv; **gelb:** Gehirn.



3.3.1 Fluoreszenzlaufexperimente

Welche Gehirnareale bei der Verarbeitung visueller Informationen eine Rolle spielen, sollte unter anderem durch den Einsatz lipophiler Marker herausgefunden werden.

Die Versuche mit den lipidgängigen Fluoreszenzfarbstoffen Dil und DiO erbrachten nur in zwei Fällen des Versuchsansatzes I eine Färbung der Sehnerven über das Chiasma hinaus, bis in den ventralen optischen Trakt (Abb. 41 C). Bei allen anderen Ansätzen konnten die Fluoreszenzfarbstoffe nicht bis ins Gehirn verfolgt werden. Versuchsansatz II erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse.

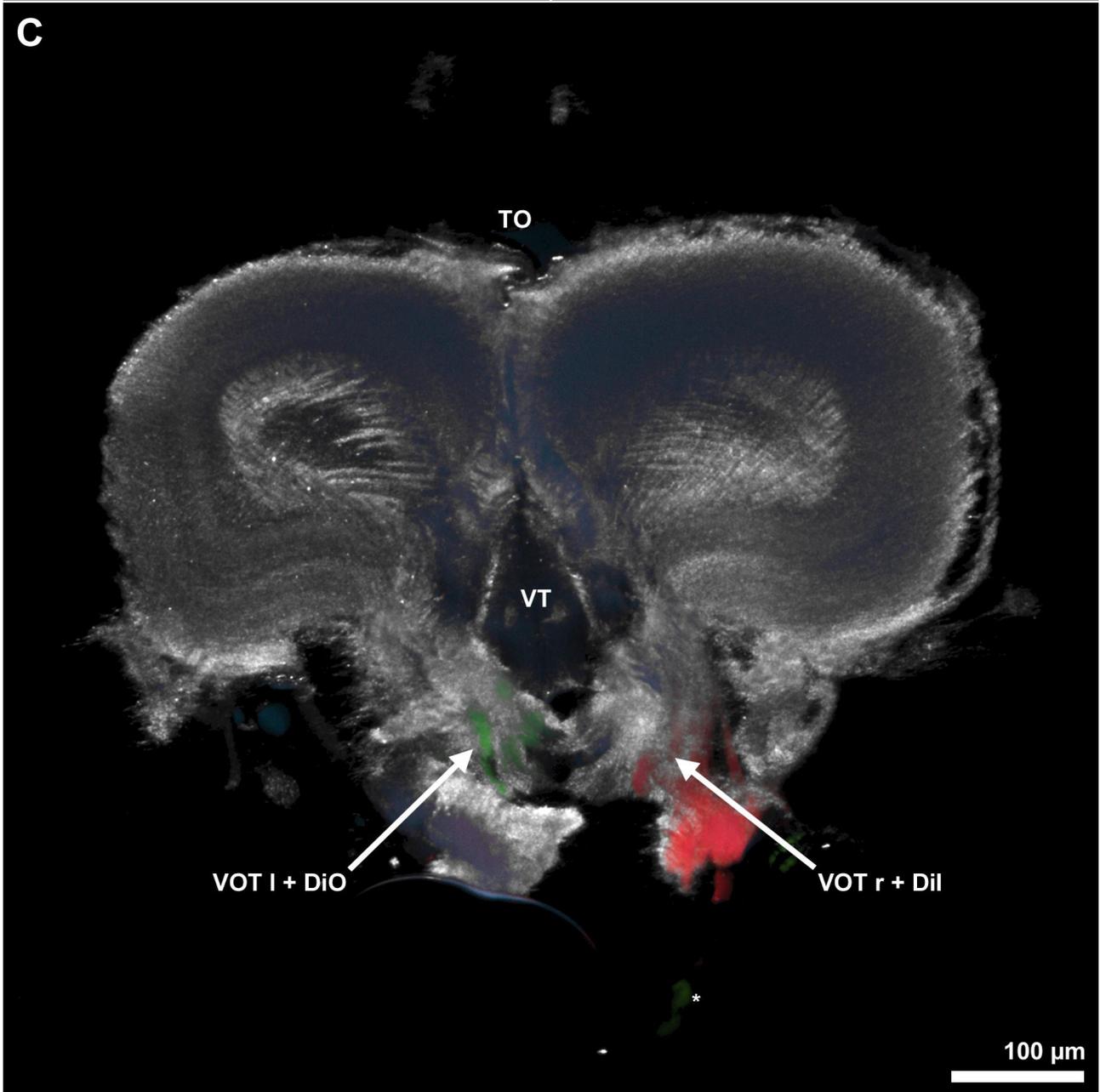
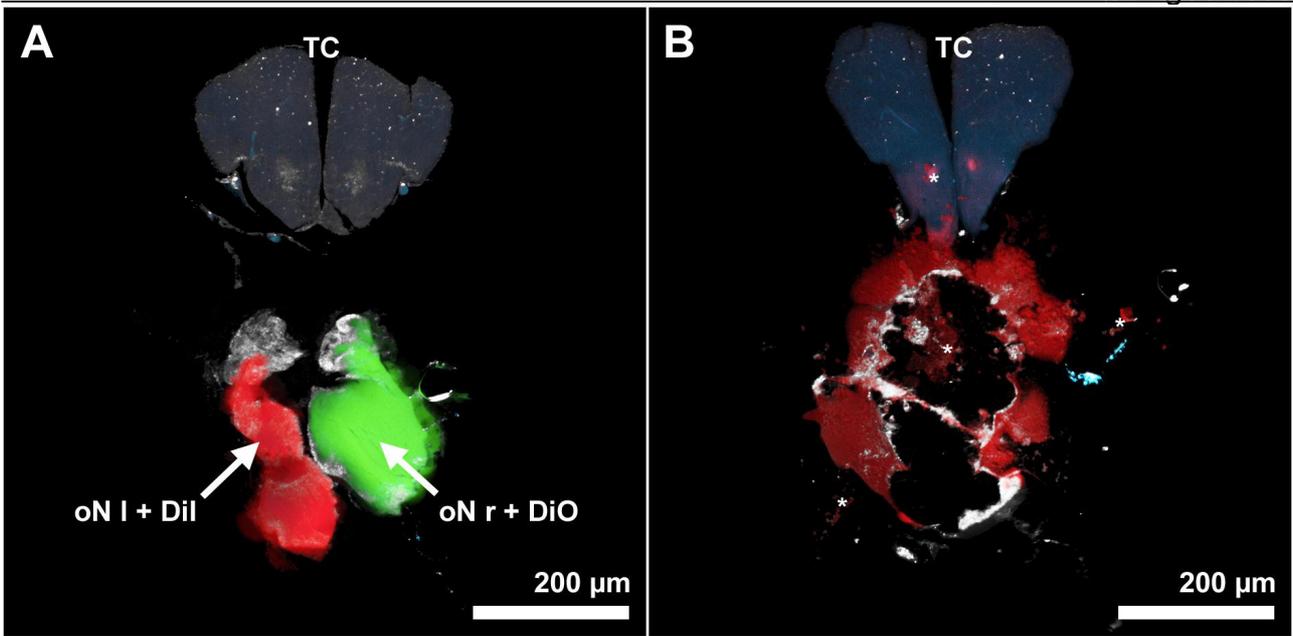
Sobald die Fluoreszenzfarbstoffe in die Membranen der Nervenaxone aufgenommen wurden, waren ihre Signale deutlich zu erkennen und gut von einander zu unterscheiden (Dil mit dem mCherry- und DiO mit dem GFP Detektionsfilter). Die Farbstoffe scheinen sich annähernd gleich schnell auszubreiten (Abb. 41 A). Das Schneiden mit dem Vibratom auf Höhe der Sehnerven führte meist dazu, dass die Sehnervenaxone während dem Schneidevorgang auseinander gerissen wurden und es kam des öfteren zu einer Verunreinigung durch angefärbte Axonstücke auf den übrigen Schnitten (Abb. 41 B).

Es konnten keine ipsilateral verlaufenden Nervenbahnen über das Chiasma hinaus beobachtet werden. Ebenso wenig konnten Projektionen in das optische Tektum hinein oder weitere an der Verarbeitung optischer Informationen beteiligte Gehirnregionen bzw. Kerne nachgewiesen werden.

Abbildung 41: Axiale Vibratomschnitte durch in Agar eingebettete Sardellengehirne nach der Applikation der Fluoreszenzfarbstoffen Dil auf den linken- und DiO auf den rechten Sehnerv; Orientierung: oben dorsal und unten ventral. ►

A: Axialschnitt durch das Telencephalon und die Sehnerven vor dem Chiasma. Die Fluoreszenzfarbstoffe Dil und DiO breiten sich mit annähernd gleicher Geschwindigkeit über die Sehnervenaxone aus. **B:** Axialschnitt durch das Telencephalon und das Chiasma. Die Sehnerven sind während des Schneidevorgangs mit dem Vibratom zerrissen und haben zu zahlreichen, mit * markierten Verunreinigungen geführt. **C:** Axialschnitt durch den ventralen Thalamus und den anterioren Teil des Tektums. Das Bild zeigt die am weitesten zurückgelegte Strecke der Fluoreszenzfarbstoffe. Weiter posterior gelegene Querschnitte weisen keine Anfärbungen der Neurotracer mehr auf.

BO: Bulbus olfactoris; **oN l:** linker Sehnerv; **oN r:** rechter Sehnerv; **TC:** Telencephalon; **TO:** Tektum opticum; **VOT l:** linker ventraler optischer Trakt; **VOT r:** rechter ventraler optischer Trakt; **VT:** ventraler Thalamus; *: Verunreinigungen.



3.3.2 3D-Rekonstruktion der Ganglienzellaxone des linken- und rechten optischen Nerven

Bei den Sehnerven handelt es sich um Axonbündel. Sie entspringen den Ganglienzellen der Retinae des rechten und des linken Auges. Sie verlaufen von anterior nach posterior bis zum optischen Chiasma und fächern sich dann fingerförmig in je drei unterschiedlich dicke Einzelstränge auf, bis sie sich dann im optischen Chiasma abwechselnd überkreuzen (Abb. 42 C), ähnlich zweier Hände gefaltet zum Gebet. Nach (Mogi et al., 2009) entspricht dieses Kreuzungsmuster der Sehnerven dem Typus Nummer III, charakterisiert durch sich aufspaltende Sehnerven, die sich abwechselnd überkreuzen. Die Dicke der Stränge nimmt von ventral nach dorsal ab. Der am weitesten ventral gelegene Strang ist Teil des rechten Sehnervs (Abb. 42 D).

Weiter posterior kommt es zum Eintritt der Nervenstränge in das Diencephalon. Die Axonbündel bilden fortan den ventralen- und dorsalen optischen Trakt (VOT; DOT; Abb. 14-17; Querschnitt 5005 bis 5648). Weiter caudal gehen sie letztendlich in das optische Tektum, Teil des dorsalen Mesencephalons, über und stellen dort die zweit äußerste Schicht (Abb.14-21; Querschnitt 5005 bis 6725). In der Literatur wird diese Schicht auch als Stratum optikum bezeichnet (SO). Innerhalb der optischen Tecti beschreiben die Ganglienzellaxone die Form zweier nebeneinander gelegener hohler Halbkugeln. Sie sind um 45° zur Körperlängsachse seitlich geneigt, liegen anterior sehr nahe zusammen und rücken dann aber posterior weiter auseinander (Abb. 42 C). Die Halbkugeln weisen je eine leicht vertikal geneigte, horizontale Aussparung auf (Abb. 42 B).

Die optisch relevanten Kerne des Gehirns sind Teile des Diencephalons und paarig angelegt. Ihre Form und Lagebeziehung zueinander wurde bereits unter 3.1.3 ausführlich beschrieben.

Auf beiden Seiten werden die parvozellulären Nuklei des superfiziellen Prätektums (Psp) von den Ganglienzellaxonen umschlossen (Abb. 43). Die magnozellanulären Nuklei des superfiziellen Prätektums (Psm) und die posterioren prätektalen Nuklei (PO) sind nur anterolateral von den Axonfasern umgeben (Abb. 43). Die contralateralen Sehnervaxone stehen nachweislich mit den Psp's (Abb. 44 A), den Psm's (Abb. 44 B) und den PO's (Abb. 44 C) in Verbindung. Basierend nur auf den histologischen Querschnitten, kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die Ganglienzellaxone in den Kernen enden.

An diese Kernkomplexe grenzen auf beiden Seiten die Nuklei corticalis (NS) dorsomedial an (Abb. 43). Diese diffusen Gehirnkernkerne werden allerdings nur von einigen Axonen durchzogen (Abb. 44 D). Eine direkte Verbindung, d.h. eine Termination bzw. Innervierung von Sehnervenaxonen, konnte im Vergleich zu den anderen optisch relevanten Kernen nicht beobachtet werden.

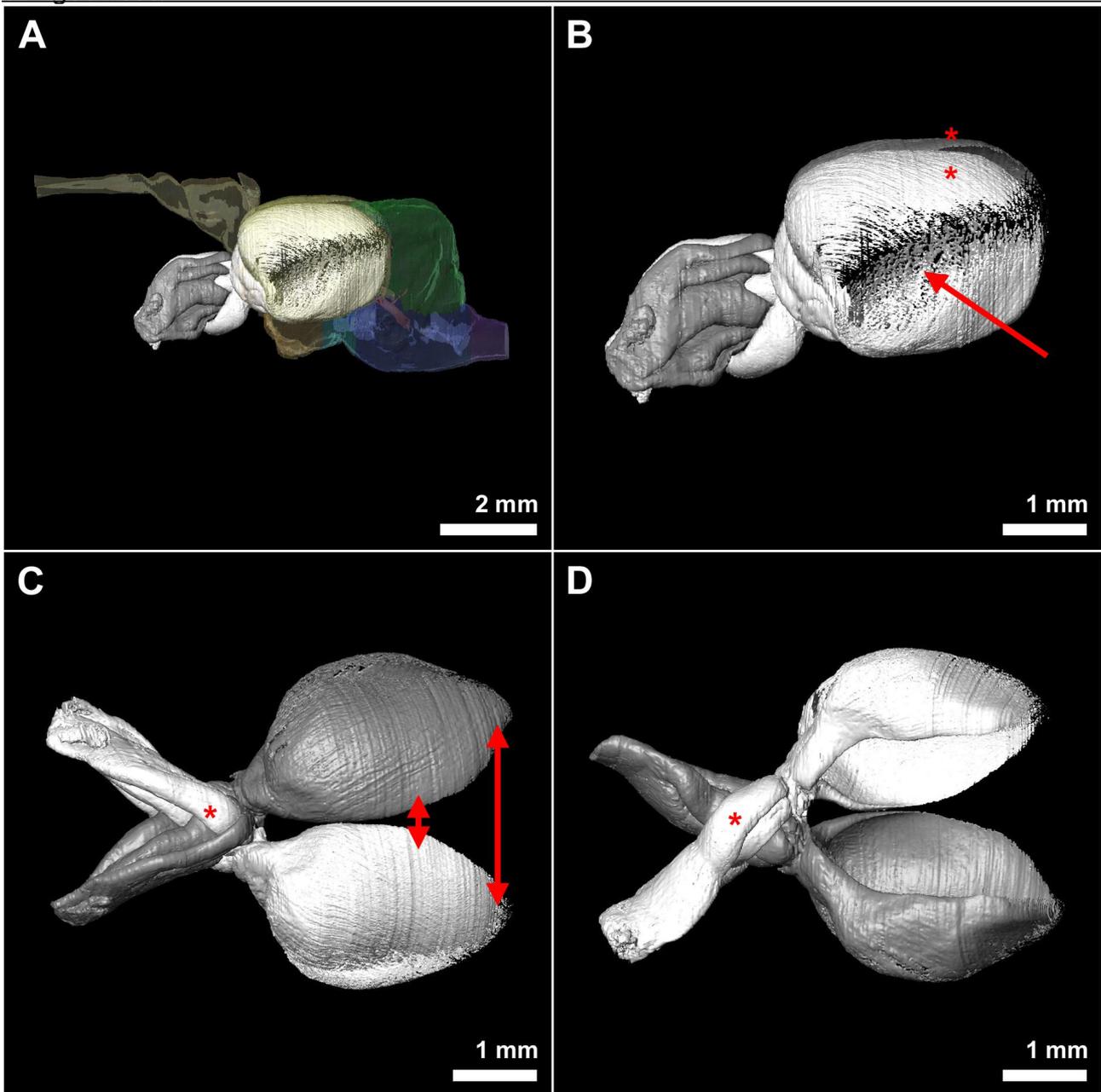


Abbildung 42: Form und Verlauf der Sehnervenaxone im Sardellengehirn.

Orientierung A-D: Links anterior und rechts posterior.

A: Übersichtsabbildung des Sardellengehirns (transparent) und der Verlauf der Sehnervenaxone des linken- (dunkelgrau) bzw. rechten Sehnervs (hellgrau) von der Retina bis ins optische Tektum. Orientierung: Oben dorsal und unten ventral. **B:** Lateralansicht: Das von den Ganglienzellaxonen gebildete Stratum optikum innerhalb des optischen Tektums beschreibt die Form zweier nebeneinander gelegener hohler Halbkugeln (*). Seitlich weisen sie je eine leicht vertikal geneigte, horizontale Aussparung auf (Pfeil). **C:** Dorsalansicht: Die hohlen Halbkugeln liegen anterior sehr nahe zusammen und rücken posterior weiter auseinander (vergleiche die Länge der Doppelpfeile). * markiert die fächerartige Aufteilung der Sehnerven auf der Höhe des optischen Chiasmus. **D:** Ventralansicht: Die Strangdicke nimmt von ventral nach dorsal ab. Der unterste Strang (*) ist Teil des rechten Sehnervs (hellgrau).

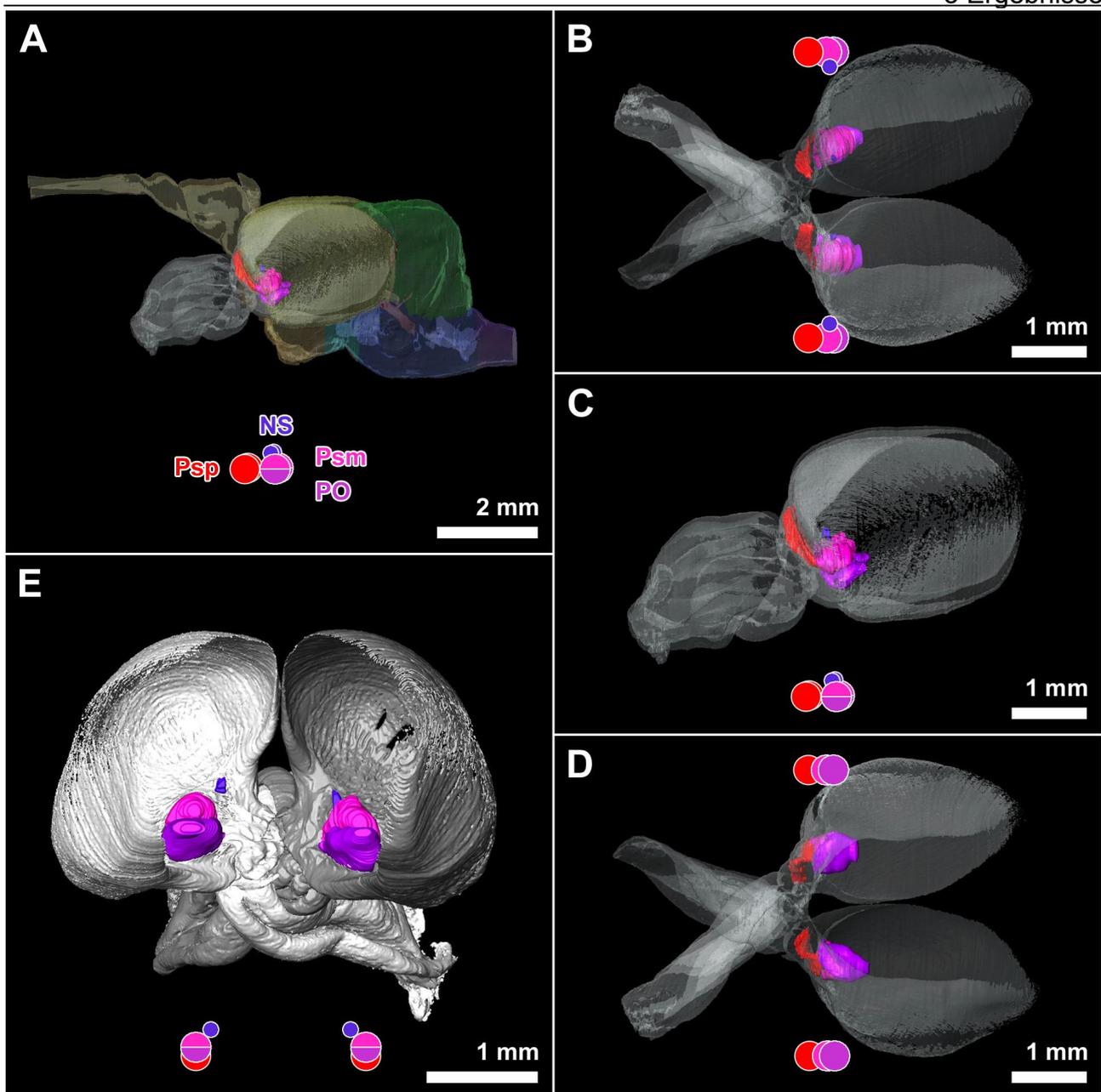


Abbildung 43: Optisch relevante Kerne innerhalb des Sardellengehirns und die Lagebeziehung zu den Ganglienzellaxonen.

Orientierung: A-D: Links anterior und rechts posterior: E: Hinten anterior und vorne posterior.

A: Übersichtsabbildung des Sardellengehirns und die Lage der optisch relevanten Kerne innerhalb. Gehirn und Ganglienzellen sind transparent dargestellt. Ganz vorne liegt der Psp eingebettet in den Ganglienzellaxonen. Er geht über in den Psm (dorsal) und PO (ventral). Der NS schließt sich lateromedial an den Kernkomplex an. **B:** Dorsalansicht auf die optisch relevanten Kerne und das Ganglienzellaxongeflecht. **C:** Lateralansicht auf die optisch relevanten Kerne und das Ganglienzellaxongeflecht. **D:** Ventralansicht auf die optisch relevanten Kerne und das Ganglienzellaxongeflecht. Der NS wird in dieser Ansicht vom PO und Psm verdeckt. **E:** Caudalansicht: Der Psp ist nicht sichtbar. Er ist vollständig von den Ganglienzellaxonen umgeben. Der anteriore Teil des Psm, PO und NS werden jeweils von den Ganglienzellaxonen umschlossen.

NS: Nukleus corticalis (blau); **PO:** Posteriorer prätektaler Nukleus (violett); **Psm:** Magnozellularer Nukleus des superfiziellen Prätektums (rosa); **Psp:** Parvozellularer Nukleus des superfiziellen Prätektums (rot).

3 Ergebnisse

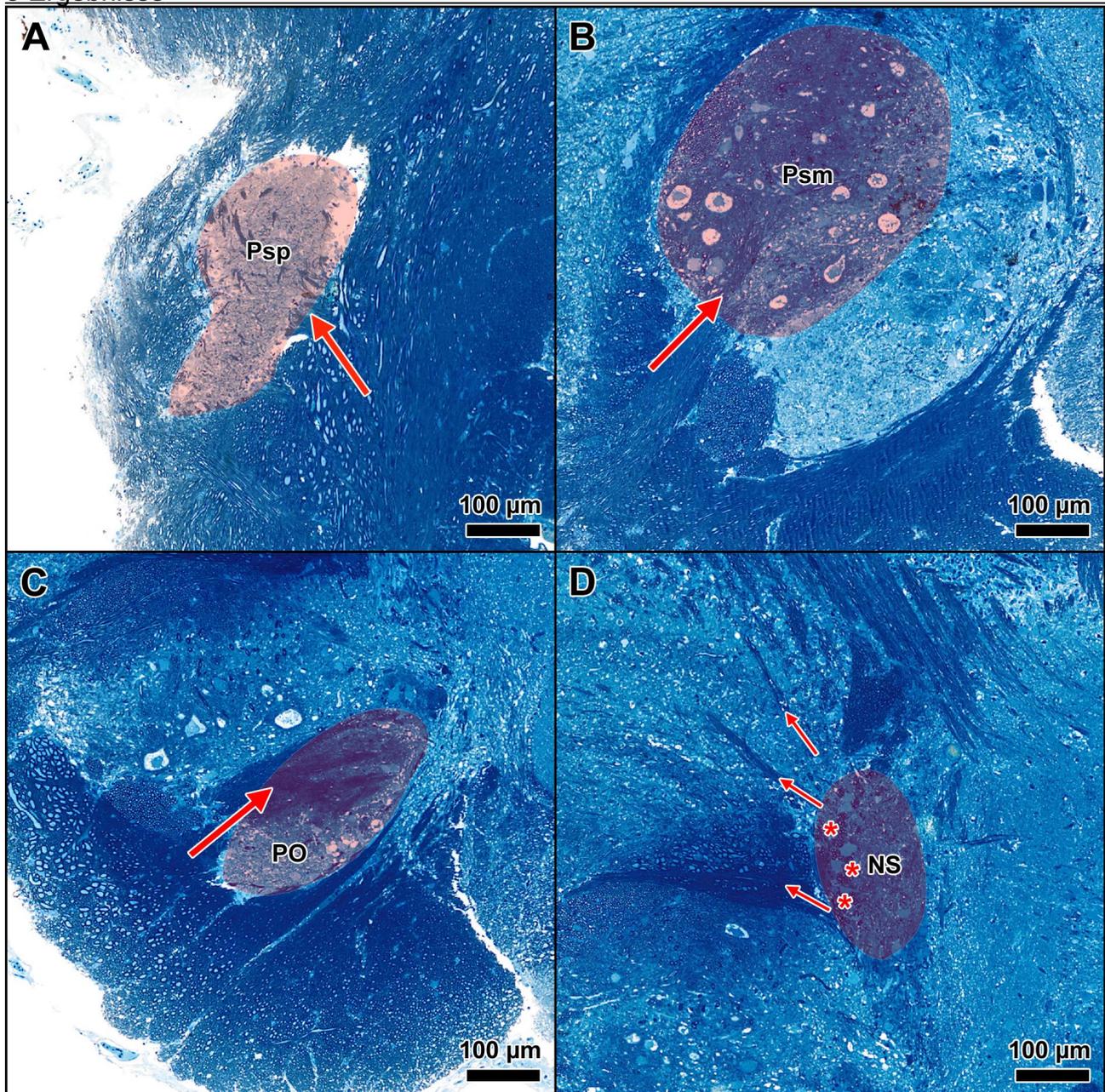


Abbildung 44: Verbindung der optisch relevanten Kerne mit den Ganglienzellaxonen. Die Kerne sind durch Schraffur hervor gehoben.

Orientierung: Oben dorsal, unten ventral, links lateral und rechts medial.

A: Der Psp wird durch Ganglienzellaxone medioventral innerviert (Pfeil). **B:** Der Psm wird durch Ganglienzellaxone lateroventral innerviert (Pfeil). **C:** Der PO wird durch Ganglienzellaxone lateroventral innerviert (Pfeil). **D:** Ganglienzellaxone liegen zwischen den Zellen des NS (*) und ziehen hindurch (Pfeile).

NS: Nukleus corticalis; **PO:** Posteriorer prätektaler Nukleus; **Psm:** Magnozellularer Nukleus des superfiziellen Prätektums; **Psp:** Parvozellularer Nukleus des superfiziellen Prätektums.

3.3.3 3D-Rekonstruktion der Ganglienzellaxone bei 10- bzw. 60-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung

Nachdem sich die Sehnerven im optischen Chiasma aufspalten und kreuzen, wurde bei 10-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung der Verlauf der am weitesten dorsal gelegenen Äste der optischen Nerven rekonstruiert (Abb. 45 A-G). Dabei fielen seitlich gelegene, dickere myelinisierte Fasertrakte auf. Beide Faserbündel projizieren kontralateral Richtung Mitte. Auf dem Weg dorthin lässt sich ein im Vergleich zueinander abweichenden Verlauf beobachten. Während das kleine Faserbündel des linken Axonfaserpakets seine laterale Position beibehält, umwandert das Faserbündel des rechten Axonfaserpakets das gesamte linke Faserpaket und kommt daraufhin, wie der kontralaterale Gegenpart, lateral medial zum liegen (Abb. 45 A-J).

Die Aufnahme der histologischen Bilder bei 60-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung beweist, dass es möglich ist mit dieser Methode auch einzelne Nervenfasern zu verfolgen (Abb. 45 K).

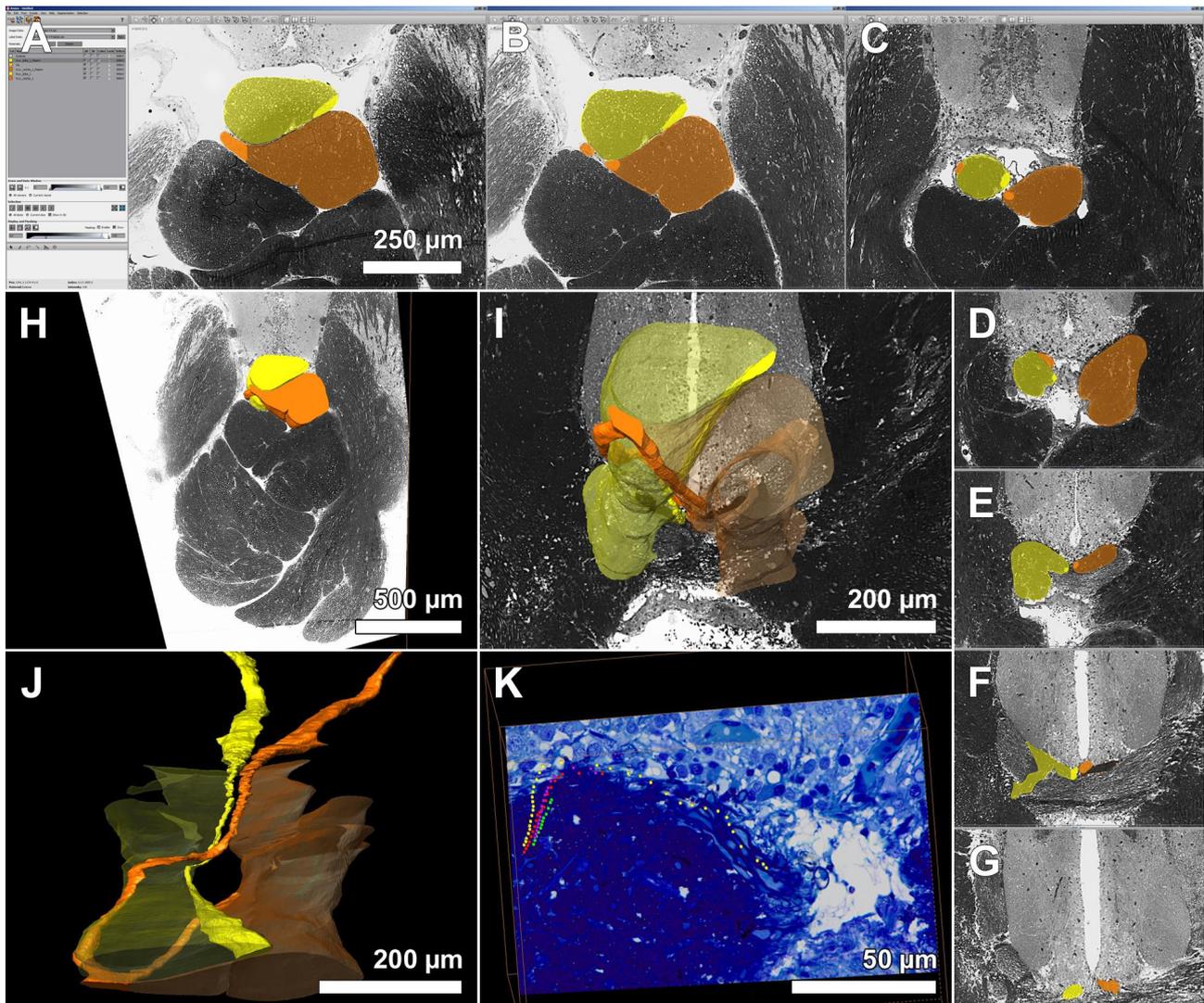


Abbildung 45: 3D-Rekonstruktion einzelner Faserbündel und Nervenfasern bei 10- bzw. 60-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung.

Oben dorsal und unten ventral. **A-G:** Von anterior nach posterior: Rekonstruktion zweier Faserbündel der Sehnerven unter Amira®. Seitlich gelegene dicke Axone des rechten Axonfaserpaketes (orange) umwandert den Nervenstrang des linken Axonfaserpaketes (gelb). **H, I, J:** 3D-Rekonstruktion des unter A-G rekonstruierten Faserverlaufs. Orange- und gelbe kleine Faserbündel projizieren kontralateral Richtung Mitte. **K:** Bei 60-facher Vergrößerung lässt sich der Verlauf einzelner Nervenfasern verfolgen (gelbe, rote & grüne Punkte stehen jeweils für die Verfolgung eines einzelnen Nervenaxons).

4 Diskussion

4.1 Histologie, Atlas und 3D-Model des adulten Sardellengehirns

4.1.1. Neue Datenlage und Erklärungspotential

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine lückenlose mechanische Kunstharz-Schnittserie des Gehirns einer adulten Sardelle, aus 8487 Einzelschnitten bei einer Schnittdicke von 1,5 μm angefertigt, mit Richardson-Reagenz gefärbt und ein Atlas des Sardellengehirns erstellt. Dieser Atlas umfasst 18 beschriftete Bildtafeln, die ausgewählte Kerne und Regionen des Gehirns in lichtmikroskopischer Auflösung zeigen. Darüber hinaus wurde ein alignierter, digitaler 3D-Datensatz in 8 bit Graustufen aus 650 Ebenen mit einer Auflösung von 2,56 μm x 2,56 μm x 15 μm und ein Interaktives 3D-Oberflächenmodell des adulten Sardellengehirns erzeugt.

Darauf basierend war es möglich, erstmals eine eingehende morphologische Untersuchung und korrekte Beschreibung des adulten Sardellengehirns und seines dreidimensionalen inneren Aufbaus durchzuführen. Der Atlas und das 3D-Modell sind zudem von elementarer Bedeutung, um die retinalen Projektionen strukturell erforschen zu können. Sie dienen als Orientierungskarten und 3D-Bezugssystem gleichermaßen und erweitern die Strukturdatenbasis der AG Heß zum Sehsystem der Sardellen um wesentliche Befunde zum zentralen visuellen System.

Ein 3D-Gehirnmodell eignet sich in besonderer Weise, um einzelne Komponenten im dreidimensionalen Raum zu analysieren und zu vermessen, insbesondere Gehirnstrukturen mit komplexem Verlauf, wie z.B. Axonfaserbündel oder Gehirnnerven. Es liefert außerdem quantitative Informationen (Entfernungen, Winkel, Volumina), ermöglicht die Navigation durch das gesamte Gehirn und veranschaulicht die Form und Lagebeziehung neuronaler Strukturen zu einander. Neueinsteigern kann der Aufbau des Gehirns im dreidimensionalen Raum auf besonders anschauliche Art und Weise visualisiert werden und die Einarbeitung in die Thematik Gehirn somit erleichtern.

Durch die Schaffung eines 3D-Modells kann zudem ein präzises stereotaktisches Koordinatensystem erstellt werden, dass die gezielte Manipulation einer anatomisch definierten Hirnregion (z.B. für künftige elektrophysiologische Ableitungen, induzierte Gehirnverletzungen oder Herstellung ausgewählter Gehirnschnitte) bzw. im Idealfall die Manipulation eines bestimmten Zelltyps (z.B. Mikroinjektionen, eventuell in Verbindung mit Mikro CT) erlaubt.

4.1.2 Fischgehirn mit spezifischen Adaptationen

Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, dass der Bauplan des Sardellengehirns prinzipiell dem zu erwartenden Grundaufbau des Gehirns bei Fischen entspricht (Hildebrand & Goslow, 2004).

Das Gesamtgehirn setzt sich aus der Summe einzelner Gehirnabschnitte zusammen. Je nachdem, wie sich eine Art mit ihrer Umwelt auseinandersetzt, können als Folge dessen einzelne Gehirnabschnitte verschieden stark bzw. dominant ausgeprägt sein. Das Erscheinungsbild des Gehirns vermag Rückschlüsse auf die Lebensweise einzelner Fischarten schließen und umgekehrt spiegelt sich im Aufbau des Gehirns oft die Gewichtung einzelner Aspekte mancher Lebensweisen wieder (Geiger, 1956). Die Gewichtung dieser einzelnen Aspekte kann sich im Laufe der Entwicklung verändern. So unterscheiden sich zum Beispiel die Rahmenbedingungen des Lebens als Larve meist stark von denen eines adulten Individuums. So muss innerhalb einer Art das Wachstum einzelner Gehirnabschnitte nicht immer isometrisch verlaufen.

Die Europäische Sardelle ist ein stark optisch orientierter, aktiv schwimmender Fisch. Infolgedessen ist das Cerebellum groß und das optische Tektum sehr gut ausgeprägt. Das Telencephalon ist im Vergleich dazu eher klein, was auf eine untergeordnete Rolle des Geruchssinnes schließen lässt (Geiger, 1956).

4.1.3 Unerwartete Kommissur

Neben dem für die europäische Sardelle charakteristischen Gehirnhabitus (Form, Proportionen), zeigte die Untersuchung zudem eine bemerkenswerte Besonderheit auf: Durch eine Kommissur werden die posterioren pretektalen Nuklei beider Gehirnhälften miteinander verbunden. Eine vergleichbare Kommissur ist bei Fischen bislang nicht bekannt. Aufgrund der speziellen Lage ist eine Verwechslung mit ähnlichen, bereits beschriebenen Strukturen ausgeschlossen. Die Sardelle ist in der Lage linear polarisiertes Licht aufgrund des speziellen Aufbaus zweier Zapfentypen und deren besonderer Anordnung innerhalb der Retina wahrzunehmen (Fineran & Nicol, 1976, 1978). Es ist denkbar, dass sich neben den speziellen Zapfen als Voraussetzung für die Detektion von polarisiertem Licht auch innerhalb des Gehirns eine besondere Art der Verarbeitung visueller Information, was das Polarisationssehen anbelangt, ausgebildet hat. Die Frage, ob die neu entdeckte Kommissur für

das Polarisationssehen der Sardelle eine Rolle spielt oder eine andere Aufgabe erfüllt (oder etwa bei der Sardelle besonders stark entwickelt und daher besonders gut erkennbar ist), kann zu diesem Zeitpunkt freilich nicht beantwortet werden. Entsprechend ist es unklar, ob es sich bei diesem Merkmal um eine Autapomorphie von *Engraulis encrasicolus* oder um eine Synapomorphie der Familie der Engraulididae handelt. Erst weitere Untersuchungen naher verwandter Arten bzw. (Unter)Familien (z.B. Coiliinae) könnten bezüglich der Evolution Ergebnisse liefern und in Sachen Funktionalität dieser morphologischen Besonderheit womöglich Aufschluss geben.

4.1.4 Verfügbarkeit digitaler 3D Strukturdaten

Auf aktuellem Stand der Technik (Einbettung, Schneiden, Digitalisieren, Segmentieren, Rendern) war es möglich, die Richardson-Histologie des adulten Sardellengehirns vollständig digital zu erfassen und die Schnittserie (@ Biozentrum LMU München, AG Heß), sowie die Digitaldaten (ibid.) prinzipiell frei zugänglich zu machen. Auch zukünftigen Interessenten ist dadurch die Möglichkeit gegeben, selbst Einblick in die Rohdaten zu erhalten, diese zu nutzen und bei Bedarf am Lichtmikroskop oder bei bis zu 40-facher virtueller Objektivvergrößerung zu evaluieren. Der Informationsgehalt und die sich hieraus ergebenden Möglichkeiten übersteigen die von Atlanten im Buchformat bei weitem. Die Datenerhebung ist ein bzgl. Zeit und Ressourcen aufwendiger Prozess. Es ist daher wissenschaftlich wie ökonomisch vorteilhaft, wenn ein Datensatz mehrfach Verwendung finden kann. Zum Beispiel können weitere Bilderstapel schnell und einfach generiert werden, z.B. um spezielle Regionen der Versuchsobjekte nachträglich mit erhöhter Auflösung und gegebenenfalls in dichter Schnittfolge genauer zu untersuchen.

Das Hinterlegen und freie Verfügbarkeit solcher Datensätze und 3D-Modelle eröffnet einen neuen Ansatz für das vergleichend-morphologische Arbeiten an Gehirnen von Fischen und anderer Vertebraten (sowohl auf mikro- als auch auf makroskopischer Ebene; s.u.). Forschung und Lehre profitieren hierbei gleichermaßen. Zugleich wird es einfacher Ergebnisse zu überprüfen und Versuche nachzustellen. Die Forschung wird somit zunehmend transparenter. Auch ist die Fehlererkennungsrate deutlich größer, wenn sich mehrere Personen mit einem Datensatz befassen, als nur einige wenige. Mehrere vergleichbare Datensätze wären in diesem Zusammenhang wünschenswert.

4.1.5 Gehirnatlanten

Gehirnatlanten für Wirbeltiere sind weit verbreitet, zunächst solche in gedruckter Form, z.B. bei *Columba Livia* (Karten & Hodos, 1967), *Rana pipiens* (Llinas & Precht, 1976) und *Gekko gecko* (Smeets et al., 1986). Das Hauptaugenmerk digitaler Atlanten galt anfänglich dem Menschen (z.B. Roland et al. (1994) und Schmahmann et al., (1999)). Später kam es dann zur Ausweitung auf andere Arten mit Fokus auf Säugetiere wie z.B. Maus (Natt et al., 2002), Ratte (Schwarz et al., 2006) und Affe (McLaren et al., 2009). Die Anzahl wissenschaftlicher Publikationen zu Atlanten über Fischgehirne ist bislang eher übersichtlich. Tabelle 8 gibt einen chronologischen Überblick über die Entstehung und Existenz von Fischgehirnatlanten oder wissenschaftlichen Publikation, die dem Atlasformat nahe kommen. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass Umfang, Methodik und auch Qualität sich im Laufe der Zeit gewandelt haben.

Früher setzte man vor allem auf die klassische Histologie und auf stereotaktische Atlanten aus selbstgefertigten Schemazeichnungen. Heute liegt das Augenmerk aufgrund neuer technischer Möglichkeiten vor allem auf der Darstellung umfangreicher, digitaler Datensätze bei hohem Auflösungsvermögen und der anschaulichen Darstellung dreidimensionaler Strukturen.

Tabelle 8: Zusammenstellung der Fischgehirnatlanten von 1975 bis heute.

Autor/Jahr	Art/ Familie	Atlas Gehirn	Färbemethode/ Schnittdicke/ ggf. Auflösung	Qualität
(Peter & Gill, 1975)	<i>Carassius auratus</i> /Cyprinidae	Stereotaktischer Atlas 42 Tafeln: Zeichnungen Querschnitte; linke Hälfte in Orientierungsraster eingebettet 3 Tafeln: Zeichnungen Sagittalschnitte	Paraldehyd Fuchsin/Ponceau Xylidine/8 µm	Nur Vorderhirn mit Kernen; keine Histologie
(Peter et al., 1975)	<i>Fundulus heteroclitus</i> /Fundulidae	Stereotaktischer Atlas 34 Tafeln: Zeichnungen Querschnitte; linke Hälfte in Orientierungsraster eingebettet 4 Tafeln: Zeichnungen Sagittalschnitte	Paraldehyd Fuchsin/Ponceau Xylidine/8 µm	Nur Vorderhirn mit Kernen; keine Histologie
(Billard & Peter, 1982)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> /Salmonidae	Stereotaktischer Atlas Übersichtszeichnung + 39 Tafeln: Zeichnungen Querschnitte; linke Hälfte in Orientierungsraster eingebettet	Epple´s Technik/8 µm	Nur Diencephalon mit Kernen; keine Histologie
(Maler et al., 1991)	<i>Apteronotus leptorhynchus</i> /Apteronotidae	54 Querschnitttafeln (Abstand 150 µm): rechte Hälfte Histologie; linke Hälfte Zeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten; 6 Makroaufnahmen des Gehirns von außen	HRP Injektion /Cresylviolett-färbung /Antikörperfärbung /25 µm (Cryotom)	Gesamtes Gehirn; Identifikation von trigeminal- und fascial- Sensorik, Cranialnerven und Motornuclei
(Peter et al., 1991)	<i>Salmo salar</i> /Salmonidae	Stereotaktischer Atlas 31 Tafeln: Zeichnungen Querschnitte; linke Hälfte in Orientierungsraster eingebettet	Paraldehyd Fuchsin/Ponceau Xylidine/8 µm	Nur Diencephalon mit Kernen; keine Histologie
(Arevalo et al., 1992)	<i>Tinca tinca</i> /Cyprinidae	21 Tafeln: Zeichnungen Querschnitte; 12 Ausschnitte Histologie	Paraffin/Cresylviolett-färbung/1 5 µm	Gesamtes Gehirn
(Anken & Rahmann, 1994)	<i>Xiphophorus hellerii</i> /Poeciliidae	Übersichtszeichnung + 39 Querschnitttafeln (Abstand 96 µm); linke Hälfte Histologie, rechte Hälfte Linienzeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten; Atlas von Entwicklungsstadien 15/19/26 Tage mit 3/11/11 Querschnitten	War nicht zu ermitteln/8 µm /Auflösung variiert zwischen 11-15 mm/200 µm	Gesamtes Gehirn

(Wullmann et al., 1996)	<i>Danio rerio</i> /Cyprinidae	Übersichtszeichnung + 42 Querschnitt-, 7 Sagittal- & 7 Horizontaltafeln, rechte Hälfte Histologie, linke Hälfte Linienzeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten	Paraffin /Nisslfärbung/12 µm	Gesamtes Gehirn
(Anken & Bourrat, 1998)	<i>Oryzias latipes</i> /Adrianichthyidae	Übersichtszeichnung + 55 Querschnitt-, 7 Sagittal- & 7 Horizontaltafeln (Abstand 48 µm/72 µm/96 µm), linke Hälfte Histologie, rechte Hälfte Linienzeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten	Paraffin /Cresylviolettffärbung/8 µm	Gesamtes Gehirn
(Correa et al., 1998)	<i>Gymnotus carapo</i> /Gymnotidae	8 Querschnitttafeln (Abstand 500-600 µm): linke Hälfte Histologie, rechte Hälfte Linienzeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten	Acetylcholinesterase- & Cresylviolettffärbung/50 µm (Vibratom)	Nur Telencephalon, mit stereotaktischen Parametern
(Cerde-Reverter et al., 2001a)	<i>Dicentrarchus labrax</i> /Maronidae	Übersichtszeichnung + 9 Querschnitttafeln; rechte Hälfte Histologie, linke Hälfte Linienzeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten; + 10 Histologiebilder ausgewählter Bereiche	Paraffin /Cresylviolettffärbung/10 µm	Nur Telencephalon
(Cerde-Reverter et al., 2001b)	<i>Dicentrarchus labrax</i> /Maronidae	Übersichtszeichnung + 16 Querschnitttafeln; 21 Histologiebilder ausgewählter Bereiche	Paraffin /Cresylviolettffärbung/10 µm	Nur Diencephalon
(Cerde-Reverter et al., 2008)	<i>Dicentrarchus labrax</i> /Moronidae	Übersichtszeichnung + 20 Querschnitttafeln; 20 Histologiebilder ausgewählter Bereiche	Paraffin /Nisslfärbung/10 µm	Nur Mes- & Rhombencephalon
(Ullmann et al., 2010)	<i>Danio rerio</i> /Cyprinidae	3D-Modelrekonstruktion mit Amira aus 1000 Einzelbildern; inklusive der Volumen-, Oberflächen- & Graustufenbestimmung der einzelnen Strukturen; Stereotaktisches Koordinatensystem	MRH (magnetic resonance histology); 16,4 T Magnet /10 µm (isotrope Auflösung); Fasertrakte erkennbar ab Durchmesser von 40 µm	Gesamtes Gehirn; keine Histologie im eigentlichen Sinne; 3D-Model

(Simoes et al., 2012)	<i>Oreochromis mossambicus</i> /Cichlidae	24 Querschnitttafeln einer Gehirnhälfte; 30 Coronal-, 20 Sagittal- & 18 Horizontalbilder aus Scanserien; 3D-Modelrekonstruktion mit Amira; Volumenbestimmung einzelnen Strukturen; stereotaktisches Koordinatensystem	MRI (magnetic resonance imaging); 9,4T Magnet; Paraffin /Nisslfärbung/50 µm (isotrope Auflösung); Histologie: 10 µm	Gesamtes Gehirn; 3D-Model, Atlas und Rohdaten sind online frei zugänglich
(D'Angelo, 2013)	<i>Nothobranchius furzeri</i> /Notobranchiidae	Übersichtszeichnung + 25 Querschnitttafeln (Abstand 50 µm); linke Hälfte Histologie, rechte Hälfte Linienzeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten	Paraffin /Laxol Fast-Bleu- & Cresylviolett-färbung/7 µm	Gesamtes Gehirn
(Randlett et al., 2015)	<i>Danio rerio</i> /Cyprinidae	Z-Brain: 29 Labels und 294 segmented regions; MAP(Mitogen Activated Proteinkinase)-Mapping: Eine Technik, die es ermöglicht die neurale Aktivität von freischwimmenden Fischen zu erfassen	Immunhistochemische Detektion von pERK (phosphorylated-Extra-cellular signal-regulated Kinase) als Sensor neuraler Aktivität/Genauigkeit von ca. einem Zelldurchmesser	Gesamtes Gehirn; keine Histologie im eigentlichen Sinne; 3D-Model basierend auf neuraler Gehirnaktivität
(Karoubi et al., 2016)	<i>Toxotes chatareus</i> /Toxotidea	27 Querschnitttafeln (Abstand 70 µm); rechte Hälfte Histologie, linke Hälfte Linienzeichnung der kontralateralen Hälfte mit beschrifteten Einzelkomponenten	Paraffin /Nissl- & Cresylviolett-färbung /7 µm/30 µm (Cryotom)	Gesamtes Gehirn

4.1.6 Tomographische Bildgebung

Neben dem klassisch histologischen Ansatz kommt immer mehr die Magnetic resonance histology (MRH) zum Einsatz. Beide Methoden eignen sich für die Untersuchung der Entwicklung und des Aufbaus von Geweben, sie unterscheiden sich aber grundlegend in ihrer Herangehensweise.

Die klassische Histologie und 3D-Mikranatomie, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit für die Erstellung eines Gehirnatlanten zum Einsatz kam, zeichnet sich durch ein hohes Auflösungsvermögen aus (z.B. ca. 290 nm lateral mit einem 40x/NA0.95 Objektiv) und durch (farbstoffabhängig) meist sehr gute Kontraste, ist jedoch mit einem sehr hohen Zeitaufwand gekoppelt. Die Präparation, Fixierung, Einbettung, das Schneiden, Färben, die Bildfassung und Bildbearbeitung sind Arbeitsschritte, die sich über Wochen oder Monate hinweg ziehen können und zudem Artefakte, Verunreinigungen, Verformungen bzw. Verzerrungen zur Folge haben können. Ein einheitliches Anfärben einer umfangreichen Schnittserie ist sehr schwer zu bewerkstelligen (s. auch Simoes et al., (2012)).

Im Gegensatz dazu ist die Methode der MRH minimal invasiv und kann innerhalb eines sehr geringen Zeitfensters, je nach Objektgröße und Auflösung, bereits nach wenigen Stunden bis Tagen (Kabli et al., 2006; Ullmann et al., 2010) komplette und perfekt alignierte Bilderstapel liefern. Strukturen können in ihrem ganzheitlichen Umgebungskomplex erfasst werden, ohne dass durch vorangegangene invasive Arbeitsschritte, wie z.B. der Präparation, der Einbettung oder des Schneidens, Informationen verloren gegangen sind oder verfälscht wurden. Bei dieser Technik werden die magnetischen Eigenschaften von Wasserstoffkernen genutzt. Sie werden mit Radiofrequenzstrahlung angeregt und geben darauf selbst ein Signal ab, dass wiederum von einer das Versuchsobjekt umgebenden Detektorspule empfangen wird und von Computern analysiert und zu einem Bild umgewandelt wird (Hildebrand & Goslow, 2004). Der Kontrast und die Auflösung (z.B. 1-5 μm / px) innerhalb der einzelnen Schnittebenen ist deutlich schlechter, als bei der konventionellen Histologie, wodurch die Unterscheidungsmöglichkeit kleinerer Strukturen deutlich eingeschränkt wird. Der Kontrast kann für nicht kalkhaltige Weichstrukturen wie das Gehirn durch die Infiltration mit Jod deutlich verbessert werden. Die MRH-Technik wird ständig verbessert und wird sicherlich in Zukunft immer besserer Ergebnisse liefern.

Wenngleich wir nicht die Möglichkeit zur Anwendung der MRH hatten, so wurde im Rah-

men der vorliegenden Dissertation die Computertomographie (μ CT) als weitere Methode der dreidimensionalen Datenerfassung angewandt bzw. erprobt.

Der Einsatz von Jod als Kontrastmittel hat zur Folge, dass nicht-kalkhaltiges Weichgewebe durch die Aufnahme von Jod die Röntgenstrahlung stärker schwächt, als z. B. nur Wasser, und das Gewebe somit einen höheren Kontrast aufweist. In diesem Zusammenhang wurde die Computertomographie schon mehrfach auf verschiedenste Arten von Weichgewebe erfolgreich angewandt (Gignac & Kley, 2014), einschließlich der Gehirne von Fischen (Metscher, 2009).

Innerhalb von nur wenigen Tagen ließ sich mit dieser Methode ein vollständiger Datensatz eines adulten Sardellengehirns erstellen. Im Gegensatz zur klassischen Histologie lässt sich bei dieser Methode die Schnittebene frei wählen und mehrfach parallel darstellen. Vertikale, horizontale und sagittale Schnittserien können aus ein und demselben Datensatz generiert werden. Auch wenn sich kleinere Strukturen oft nicht unterscheiden lassen und die Auflösung im Gegensatz zur konventioneller Histologie deutlich geringer ist, so lässt sich doch der grobe Aufbau des Gehirns anhand des interaktiv explorierbaren Datenstapels leicht und schnell darstellen. Rückwirkend wäre es sicherlich interessant gewesen das μ CT am gleichen Gehirn durchzuführen, das für die histologische Verarbeitung herangezogen wurde, zum einen um einen direkten Vergleich des Auflösungsvermögens an gleichen Schnittebenen durchzuführen (auf vergleichbare Ebenen wird in Abb. 29 jedoch hingewiesen) und zum anderen um die Auswirkungen der Einbettung in Epoxidharz in Bezug auf Verformung und Schrumpfung genauestens dokumentieren zu können.

4.2 Larvenstadien

4.2.1 Neue Datenlage

Von insgesamt sechs Larven der Europäischen Sardelle unterschiedlichen Alters (5d, 10d, 20d, 31d, 36d & 45d) wurden erstmals histologische Querschnittserien der Gehirne erstellt und anhand sorgfältig ausgewählter Querschnitte soweit möglich miteinander verglichen. Kern- und Strukturvergleiche basieren hauptsächlich auf dem Kriterium der Lage; eine genauere Identifikation, wie z.B. durch Antikörperfärbungen etc. (Karoubi et al., 2016), bleibt schuldig. Aus diesen Serien wurden zudem 3D-Oberflächenrekonstruktionen erstellt.

Die untersuchten Gehirne stellen Momentaufnahmen in der Entwicklung der europäischen Sardelle dar, die zum Zeitpunkt der Fixierung vorlagen. Anhand dieser Datensätze und der angewandten Methodik lässt sich erkennen, wann sich ein spezieller Gehirnbereich ausdifferenziert hat bzw. im Vergleich untereinander ein verstärktes Wachstum erfuhr, eine exakte zeitliche Auflösung ist jedoch nicht gegeben. Es kann aber ein Zeitrahmen bestimmt werden, in dem gewisse Ereignisse in der Gehirnentwicklung der europäischen Sardelle stattfinden bzw. stattgefunden haben. Unklar bleibt naturgemäß, ob eine festgestellte Veränderung zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Lavalentwicklung gerade erst aufgetreten ist oder schon etwas früher zu beobachten gewesen wäre. Man berücksichtige hier das Alter der jeweiligen Sardellenlarven und die dazwischen liegenden unregelmäßige Zeitabstände: 5d/10d = 5d; 10d/20d = 10d; 20d/31d = 11d; 31d/36d = 5d; 31d/45d = 11d. Fünfbeziehungsweise elf Tage sind für die Entwicklung einer Sardellenlarve durchaus eine lange bzw. ereignisreiche Zeit (Regner, 1985).

4.2.2 Wachstum und Differenzierung, kritische Betrachtung

Im allgemeinen gilt, dass das relative Wachstum des Gehirns und seiner Bestandteile bei Knochenfischen nach dem Gesetz der einfachen Allometrie verläuft, d.h. in einem doppelt logarithmiertem Koordinatensystem mit Körpergewicht auf der Abszisse und Gehirngewicht auf der Ordinate, ändert die Wachstumsgerade ihren Anstieg nicht. Zudem scheint das Gehirngewicht mit den ökologischen Bedingungen und dem Aktivitätsgrad der einzelnen Arten in Zusammenhang zu stehen. Benthisch, inaktive Formen besitzen ein niedrigeres relatives Gehirngewicht als nektonische, aktive Formen (Geiger, 1956).

Eine Differenzierung des Gehirns in somadominierte Bereiche mit dicht gepackten Zellkernen und in Neuropile lässt sich bereits bei der 5 Tage alten Larve beobachten (s. Abb. 31). Innerhalb der ersten 10 Tage sind weitere Differenzierungen v.a. auf Höhe des TO festzustellen, nach 20 Tagen zeigt sich eine deutliche Komplexifizierung in allen Bereichen des Sardellengehirns, die auch danach stetig voranschreitet (s. Kap. 3.2.1). Bei 10 Tage alten Sardellenlarven lässt sich erstmals eine Maulspaltenöffnung und eine verstärkte Einlagerung von Augenpigmenten beobachten (siehe Abb. 5), bei einer im Vergleich zu den älteren Larven geringen Gehirnkplexität (siehe Abb. 30). Mit zunehmenden Alter entwickeln sich die Augen immer weiter, lagern mehr Pigmente ein und das optische Tektum differenziert sich immer weiter aus, bis sich bei dem 45 Tage alten Larvenstadium bereits eine deutliche Stratifizierung innerhalb des Tektums erkennen lässt (siehe Abb. 36 D). Beides deutet darauf hin, dass der Sehsinn für die jungen Larven schon früh eine wichtige Rolle spielt (s. z.B. Schwassmann (1963) und Bagariano & Hunter (1983)). Neben der Wahrnehmung der äußeren Umgebung und der Orientierung, scheinen die Navigation und die aktive, zielgerichtete Bewegung in Bezug auf damit verbundenem Jagdverhalten immer wichtiger zu werden. Letzteres spiegelt sich vor allem in der Entwicklung des Cerebellums, dem Steuerzentrum der Motorik im Gehirn wider. Das Cerebellum ist ab 36 Tagen dem Cerebellum einer adulten Sardelle sehr ähnlich und schon recht weit entwickelt.

Die Beobachtungen der beiden jüngsten Larvenstadien sind jedoch mit Vorsicht zu behandeln. Bei 21°C aufgezogene Sardellenlarven haben nach Tag zwei die Absorption ihres Eidottervorrats abgeschlossen und weisen eine Körperlänge von 3,4 mm auf (Regner, 1985). Im Vergleich dazu beträgt die Schlupfgröße bei *Engraulis japonicus*, einer sehr nahe verwandten Art, 2,7 mm und die Wachstumsrate beträgt 0,49 – 0,71 mm pro Tag (Takahashi & Watanabe, 2005). Bei dieser Art ist der Dotter ebenso bereits 2 Tagen nach dem Schlupf verbraucht und die Larven weisen erste Augenpigmente und die Mundspaltenöffnung für die aktive Nahrungsaufnahme auf (Fukuhara, 1983). Für die 5 und 10 Tage alten Larven wurde das Alter bestimmt, indem es aus dem Alter der Älteren Stadien zurückgerechnet wurde, da bei letzteren das exakte Alter bekannt war (De Motte, 2013) (Kap 2.1 Tab. 1). Unsere 5 Tage alte Larve ist 3 mm lang und weist eindeutig noch einen Eidottervorrat auf (siehe Abbildung 5 A). Des Weiteren sind Temperatur und Nahrungsverfügbarkeit die Hauptfaktoren, welche die Wachstumsrate beeinflussen, wobei die Temperatur wohl den größeren Einfluss zu haben scheint (Takahashi & Watanabe, 2005). Nachdem nichts genaueres über die exakten Aufzuchtbedingungen der beiden jüngsten Larvenstadien bekannt ist, beides sind Wildfänge (s. Tab. 1), kann der Einfluss externer Faktoren nicht quantifiziert werden, was ein zurückrechnen des Alters aufgrund von Larvenstadien,

4 Diskussion

dessen Alter bekannt ist, problematisch macht. Aufgrund der Angaben in der Literatur bezüglich Schlupfgröße, Wachstumsrate und des Vorhandenseins eines Dottervorrates bei der 5 Tage alten Larve, ist zu vermuten, dass das errechnete Alter der beiden jüngsten Larven nicht dem tatsächlichen Alter entspricht und die Larven unter Umständen jünger sind, als das errechnete Alter. Trotzdem ist sicher, dass für beide Stadien die Einteilung in das jüngste und zweitjüngste Stadium nach wie vor gilt. Eine sehr genaue und etablierte Methode der Altersbestimmung bei Fischen funktioniert über die Zählung der Wachstumsringe sagittaler Otolithen. Die Wachstumsringe werden ab dem Zeitpunkt der aktiven Nahrungsaufnahme, sprich nach dem zweiten Tag, täglich angelegt. Die Anzahl der Ringe plus zwei ergibt somit das exakte Alter einer Larve in Tagen (Palomera et al., 1988; Dulcic, 1997). Bedauerlicherweise lässt sich diese Methode für die beiden jüngsten Altersstadien nicht mehr rückwirkend durchführen, aber sollte für zukünftige Untersuchungen unbedingt berücksichtigt werden, wenn bezüglich des genauen Alters Unsicherheiten bestehen.

Bemerkenswert ist auch der Größenunterschied der untersuchten Gehirne in Bezug zum Alter bzw. zur Entwicklungszeit (s. Tab. 7). Bei den 10- und 20 Tage alten Larvenstadien sind die Gehirne annähernd gleich groß, bei einem Altersunterschied von 10 Tagen. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Gehirne der 31- und 36 Tage alten Larven in Bezug auf Größe enorm, obwohl der Altersunterschied in diesem Fall lediglich fünf Tage beträgt. Beide Befunde scheinen nicht miteinander vereinbar und bedürfen einer Erklärung. Ein denkbarer Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei den Beobachtung um eine ontogenetische Eigenheit bei Sardellenlarven handelt, bei der ein junges Gehirn in seiner Entwicklung Phasen unterschiedlich schnellen Größenwachstums durchläuft. Allerdings darf nicht außer acht gelassen werden, dass es sich bei den vorliegenden Sardellenlarvendatensätzen um Momentaufnahmen im Leben verschiedener (!) Individuen handelt. Geht man davon aus, dass ein Fisch im Laufe seiner Entwicklung eher kontinuierlich wächst (ebenso das Gehirn: s. z.B. Zupanc & Horschke (1995)), so erscheint es weitaus plausibler, dass sich die besonders großen oder kleinen Größenunterschiede der ausgewählten Larvalgehirne auf sich unterscheidende Rahmenbedingungen während der Individualentwicklung zurückführen lassen. Externe Faktoren können auf die Embryogenese einwirken: neben Salinität und pH-Wert, sind es vor allem Temperatur und Nahrungsvfügbarkeit, die das Wachstum bei jungen Fischen beeinflussen (Takahashi & Watanabe, 2005). Bedauerlicherweise sind bezüglich der externen Aufwuchsbedingungen der Sardellenlarven keine genaueren Informationen vorhanden, ebenso bzgl. des genauen Larvenalters (siehe oben).

4.2.3 Chiasma opticum

Bei der vergleichenden 3D-Rekonstruktion der Gehirne der larvalen und einer adulten Sardelle fiel auf, dass meist der rechte Sehnerv vor dem linken kreuzt, bei zwei Larvalgehirnen jedoch der rechte oberhalb des linken (bei Gehirn 10d ist das Kreuzungsmuster der Sehnerven aufgrund der schlechten Qualität der histologischen Bilder nicht klar erkennbar, s. Abb. 39B).

Innerhalb der Ordnung der Clupeiformes findet man bei *Spratelloides gracilis*, dass der linke optische Nerv fast immer oberhalb des rechten verläuft und umgekehrt bei *Etrumeus teres*, dass der linke Sehnerv immer oberhalb des rechten kreuzt. Andere Arten innerhalb der gleichen Ordnung der Knochenfische zeigen keine so deutliche links-rechts Präferenzen bezüglich des Kreuzungsmusters (Mogi et al., 2009). In unserem Fall ist die Stichprobenanzahl zu gering, um stochastisch verwertbare Aussagen bezüglich der Häufigkeit von Kreuzungsmustern zu treffen. Festhalten lässt sich jedoch, dass beide einfache Kreuzungsmuster bei Sardellenlarven vorkommen. Prinzipiell sollte es egal sein, welcher Sehnerv vor welchem kreuzt, solange die Funktionalität erhalten bleibt. Auf das Merkmal Kreuzungsmuster sollte bei Larven und adulten Fischen im allgemeinen generell mehr geachtet werden und diese Beobachtungen auch dokumentiert werden.

4.2.4 Die Histologie der Larvengehirne im Vergleich

Die histologischen Tafeln der Sardellenlarven zeigen ausgewählte Gehirnbereiche im Leben unterschiedlich alter Sardellenlarven. Es handelt sich hierbei um Momentaufnahmen verschiedener Tiere. Aufgrund dessen war es möglich den Aufbau der einzelnen Gehirne histologisch zu beschreiben, Veränderungen bzw. Differenzierung spezifischer Gehirnareale im Laufe der Zeit zu erkennen und funktionell-morphologisch zu interpretieren. Ein erster Grundstein in Bezug auf den Aufbau und die Entwicklung von Sardellenlarvengehirnen ist somit geschaffen.

Andere Forschungen an Fischlarven gehen jedoch weiter, vor allem was den Umfang der Untersuchungen anbelangt. Der wohl bekannteste und umfangreichste Forschungsansatz ist der Mueller und Wulliman Atlas von *Danio rerio* Larven (Mueller & Wullimann, 2015). Hierbei wurden 3 Tage und 5 Tage alte Zebrafischlarven daraufhin untersucht, wann und wo im Gehirn sich Zellen proliferieren, wandern und ausdifferenzieren, mit Hilfe von Antikörperfärbungen. Der Atlas umfasst 24 Querschnittsebenen für das 3d und 30 bzw. 48

4 Diskussion

Querschnittsebenen für das 5d Larvenstadium. Die Schnittdicke von in Paraffin eingebetteten Larven beträgt 7-10 μm , bei der Behandlung mit dem Cryotom erreicht man Schnittdicken von 10-12 μm . Dieses Werk ist der einzige neuroanatomische Atlas wichtiger genetischer und immunhistochemischer Marker bei Larvenstadien des Modellsystems eines Vertebraten und gilt als Meilenstein dieses Forschungsgebietes.

Im Vergleich dazu sind die entwicklungsgeschichtlichen Ereignisse bei der Sardelle nach wie vor noch sehr ungenau beschrieben, aufgrund der relativ großen zeitlichen Abständen zwischen den Larvenstadien und macht es auch schwierig einen Vergleich zum Zebrafisch anzustellen, vor allem auch auf Grund der Altersunsicherheiten der beiden jüngsten Larvenstadien von *Engraulis encrasicolus* (siehe oben). Die Untersuchung an weiteren dazwischen liegende Sardellenlarvenstadien in Verbindung mit Antikörperfärbungen wären für die Zukunft ein wünschenswerter und erfolgversprechender Ansatz.

4.3 Retinale Projektionen

4.3.1 Neurotracing mit lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen

Ziel der Neurotracingversuche war es, contra- und ggf. ipsilaterale Projektionen beider Sehnerven aufzuzeigen, sowie die Identifikation der an der Verarbeitung optischer Informationen beteiligten Gehirnregionen bei der Europäischen Sardelle. Der Nachweis weitreichender Projektionen retinofugaler Bahnen in das optische Tektum mit lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen scheiterte. Die Nervenaxone konnten nicht weiter als bis kurz posterior des optischen Chiasmas in den ventralen optischen Trakt verfolgt werden.

Die Ursache hierfür könnte in erster Linie an der vergleichsweise sehr langen Laufstrecke liegen. Wenngleich die Fluoreszenzfarbstoffe Dil und DiO in der Vergangenheit bei zahlreichen anderen Studien mannigfaltig erfolgreich eingesetzt wurden (Vidal-Sanz et al., 1988; Zill et al., 1993; Baier et al., 1996; Karlstrom et al., 1996; Trowe et al., 1996; Blank et al., 1997; Hevner, 2000; Chen et al., 2003), so unterscheiden sich diese Ansätze vor allem in Bezug auf die von den Fluoreszenzmarkern zurückzulegenden Strecke, sowie die Fixierdauer des Materials vor Versuchsbeginn.

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde bereits mit Dil gearbeitet. Es gelang Axone und komplettes neuronales Gewebe über kurze Strecken zu färben, wie z. B. den Querschnitt eines Sehnerven. Ansätze der Mikroinjektion und der Applikation Dil-beladener Wolframpartikel mittels Gene Gun waren allerdings nicht von Erfolg gekrönt (Koch, 2011). Ein ähnlicher Ansatz wie der hier beschriebene bei einer nahen verwandten Art, *Sardina pilchardus* (Europäische Sardine; Clupeidae), zeigte ähnlich Probleme bei verhältnismäßig langer Laufstrecke und Inkubationszeit. Auch hier war es nicht möglich den Sehnerv in optisch relevante Zielregionen des Gehirns zu verfolgen (Scheungrab, 2011).

Die Laufgeschwindigkeit der lipidgängigen Fluoreszenzmarker kann je nach Ansatz und Rahmenbedingungen variieren. Innerhalb der Literatur finden sich Werte von 0,2-0,6 mm pro Tag in fixiertem Gewebe (Godement et al., 1987; Balice-Gordon et al., 1993) und bei lebenden Organismen deutlich schneller, z.B. 6 mm pro Tag aufgrund aktiver Transportprozesse des Farbstoffs (Honig & Hume, 1986; Godement et al., 1987). An anderer Stelle gibt es Angaben von 10 mm in 2 Wochen vom Sehnerv bis ins Tektum beim Goldfisch (Hofmann & Bleckmann, 1999), aber es wird auch darauf hingewiesen, dass eine gleiche Distanz bei anderen Fasersystemen mehr Zeit erfordern kann (z.B. Efferenzen des Telencephalons). Generell gilt, die Temperatur hat einen Effekt auf die Laufgeschwindigkeit der lipidgängigen Fluoreszenzfarbstoffe. Im Vergleich zu einem Ansatz bei Raumtemperatur

4 Diskussion

führt eine Erhöhung auf 37°C zu einer Zunahme von 10-20% der Diffusionsgeschwindigkeit (v. Bartheld et al., 1990).

Die im Rahmen der Vorversuche ermittelten Laufeigenschaften von DiI und DiO haben letzteren Zusammenhang bestätigt und auch gezeigt, dass die Neurotracer sich zügig über die Sehnervenaxone ausbreiten und sich als solches für den Versuchsansatz eignen. Die theoretisch großzügig abgeschätzte, zurück zu legenden Strecke von 16,4 mm (Abstand anteriore Sehnervenspitze bis in die Mitte des optischen Tektums) hätte innerhalb der angesetzten Versuchsdauer von 5 bis 12 Wochen, im Wärmeschrank bei 35°C, rein rechnerisch problemlos durchlaufen werden können. Selbst bei minimaler Laufgeschwindigkeit von 0,2 mm pro Tag: 5 bzw. 12 (Wochen) x 7 d x 0,2 mm/d (minimale Laufgeschwindigkeit pro Tag) = 7 bzw. 17,4 mm). Praktisch führte der Versuchsansatz aber nicht zum gewünschten Ergebnis.

Wie sich im Rahmen der Vorversuche bereits herausstellte, lassen sich in Agar eingebettete Sehnerven problemlos längs, nicht immer aber quer mit dem Vibratom schneiden, nachdem die Fluoreszenzmarker appliziert wurden und sich entlang der Nervenfasern ausgebreitet haben (s. 2.6.1). Es scheint, als ob die lipidgängigen Marker zu einer Änderung der physikalischen Membraneigenschaften führen. Dadurch ließe sich eine Herabsetzung der Laufgeschwindigkeit erklären, ebenso das Auseinanderfallen der Axonfasern während des Schneidens mit dem Vibratom. Eine mögliche Lösung für dieses Problem könnte darin bestehen, dass Versuchssetup auf den Schneidevorgang mit einem Cryotom anzupassen, da hierbei das Gehirn und vor allem die Sehnerven in einem starren Freezing Medium eingebettet und dadurch verstärkt mechanisch fixiert sind. Die Vibratom-bedingte Verformung des Versuchsmaterials während des Schneidevorgangs würde entfallen und ein Lösen bzw. Herausfallen des Gewebes aus dem Einbettungsmedium wäre dadurch erschwert. Eine andere Überlegung wäre der Einsatz einer geringeren Menge der DiX-Kristalle während des Färbeporgangs oder die Kontaktzeit Kristall/Zellmembran zu begrenzen, bei unveränderter Versuchsdauer, indem die Kristalle bereits 1 bis 2 Wochen nach Applikation entfernt würden. Dadurch wäre die Anzahl gelöster Farbstoffmoleküle innerhalb der Membran reduziert und die Ursprungsconfiguration und Stabilität evtl. weniger beeinflusst. Eine Beeinträchtigung durch die lange Lagerung des Versuchsmaterials im Fixativ (mehr als ein Jahr) oder die erhöhte Temperatur während des Versuchs sind weitere denkbare Ursachen, die sich negativ auf die Membranstabilität ausgewirkt haben könnten.

Ein optimaler neuer Versuchsansatz sollte daher möglichst mit frischen, kurz zuvor fixiertem Versuchsmaterial (im Idealfall perfundiert), bei Raumtemperatur und einer geringen

Menge von DiX-Kristallen durchgeführt werden. Zusätzlich kann man die zurückzulegende Strecke der lipidgängigen Fluoreszenzmarker verkürzen, indem man die Kristalle bereits kurz vor dem Chiasma in den Sehnerv aufbringen würde. Ein zusätzliches Hinzufügen von 0,1 % EDTA in die Fixierlösung (4% Paraformaldehyd) soll außerdem die „Schärfe“ der Färbung begünstigen und transneurales Labeling eliminieren (Hofmann & Bleckmann, 1999).

Nachdem die Fluoreszenzfarbstoffe zum anterograden- und retrograden Labeling eingesetzt werden können, wäre das Aufbringen von Kristallen direkt auf das optische Tektum ebenfalls ein vielversprechender Ansatz. Kombiniert mit einer Sytox-Green Färbung ließen sich mit minimalem Aufwand die kernreichen Regionen des Gehirns darstellen und somit leichter identifizieren.

Ebenfalls in Erwägung zu ziehen sind Farbstoff-Applikationen an lebenden Versuchstieren. Die Versuchsdauer würde sich dadurch erheblich reduzieren, jedoch ist das Halten von lebenden Europäischen Sardellen nur innerhalb sehr großer Tanks möglich und gestaltet sich als extrem schwierig, abgesehen von den Formalitäten bei der Genehmigung von Tierversuchen.

4.3.2 3D-Rekonstruktion der Ganglienzellaxone

Projektionsgebiete: Um bei der Sardelle retinofugale Projektionsgebiete im ZNS zu lokalisieren, also die zentralnervösen Zielgebiete der optischen Nerven zu finden, kam in diesem Zusammenhang eine neue Methode zum Einsatz: Die Nervenbahnen der Ganglienzellaxone wurden über lückenlose alignierte Bilderserien (Semidünnschnitte, Richardson-Färbung) mit histologischem Auflösungs niveau manuell verfolgt. Große dominante Bahnen, d.h. dicke Axonbündel, sind hierbei leicht zu verfolgen. Sobald sich diese jedoch verzweigen und immer feiner werden, ist eine eindeutige Zuweisung bzw. Lokalisation des Projektionsgebietes bei 5 facher Vergrößerung oft nicht mehr zu 100% möglich. Generell ist es allerdings durchaus möglich, einzelne Nervenfasern bei entsprechender Vergrößerung zu verfolgen (s. Abb. 45 K). Je höher die Auflösungsstufe, umso mehr Details lassen sich letzten Endes erkennen, umso aufwendiger gestaltet sich aber auch das Erfassen großer Flächen.

Wie zu erwarten (Butler et al., 1991; Butler & Saidel, 1993) stellte sich heraus, dass neben dem Hauptprojektionsgebiet, dem optischen Tektum, auch der Psp (parvozelluläre Nukleus des superfiziellen Prätektums) und der PO (posteriore prätektale Nukleus) mit retinalen Ganglienzellen eindeutig in direktem Kontakt stehen und bei der Verarbeitung optischer Informationen eine Rolle spielen dürften. Lediglich für den NS (Nukleus corticalis) konnte keine eindeutige Verschaltung (ein Ende von Sehnervaxonen) nachgewiesen werden, auch wenn Ganglienzellaxone diesen Kern offensichtlich durchziehen. Die Literatur beschreibt den NC durchaus als einen an der Verarbeitung von optisch relevanter Information beteiligten Kern innerhalb der Gruppe der Clupeiformes (Butler & Saidel, 1993). Eine Detailrekonstruktion des NC unter Einbeziehung mehrerer/aller Einzelschnitte bei besserer Auflösung könnte eben diesen Nachweis erbringen.

Der Psm (magnozellanuläre Nukleus des superfiziellen Prätektums) erhält laut Literatur in der Regel keinen direkten retinalen Input, sondern wird vom optischen Tektum innerviert (Butler & Saidel, 1993). Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation angestellten Untersuchungen belegen, dass der Kern mit Nervenfasern in Verbindung steht. Ob diese Fasern retinalen oder tektalen Ursprungs sind, konnte auch bei genauerer Betrachtung nicht eindeutig festgestellt werden und bleibt somit Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Trotz der Möglichkeiten, die die Methodik des manuellen Verfolgens von Sehnervaxo-

nen anhand von alignierten histologischen Bildern birgt, sind ihr Grenzen gesetzt. Kontralateral projizierende Fasern zu verfolgen war möglich, nicht aber in unserem Fall diese bei 5 facher Vergrößerung von ipsilateralen Projektionen (s. z.B. Butler & Saidel (1993)) zu unterscheiden. Es konnten lediglich bei 10 facher Vergrößerung zwei kleine Nervenstränge verfolgt werden, die kontralateral Richtung Mitte verlaufen (s. Abb. 45). Außerdem kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob Axone zentrifugal (afferenter Faserverlauf) oder zentripetal (efferente Axonorientierung) verlaufen.

Chiasma: Wenn zwei Sehnerven einander kreuzen, kommt naturgemäß einer von beiden Nervensträngen oben und der andere unten zu liegen. Eine Typisierung der Sehnervenkreuzungsmuster in Typ I (gesamter linker Sehnerv überkreuzt dorsal den rechten) und Typ II (gesamter rechter Sehnerv kreuzt dorsal den linken) nach Mogi (Mogi et al., 2009) erscheint daher zunächst recht trivial. In diesem Zusammenhang sei aber erwähnt, dass durchaus auch kompliziertere Kreuzungsmuster vorkommen können. Die Aufspaltung der Sehnerven in je drei Einzelstränge und die charakteristische Überlagerung im Chiasma, ähnlich zweier „Hände gefaltet zum Gebet“, lassen bei *E. encrasicolus* zweifelsohne eine Kategorisierung der Überlagerung von Sehnerven in einen weiteren Kreuzungstypus III (jeder optische Nerv spaltet sich in mehrere Axonbündel auf und diese überkreuzen sich abwechselnd im optischen Chiasma) zu. Dieser spezielle Typus III ist nicht auf die Familie der Engraulididae beschränkt (Schwassmann (1963), *ibid.* Abb. 3), sondern weiter verbreitet (Mogi et al., 2009). Vor allem in Anbetracht der Phylogenie innerhalb der Clupeiformes und dem Sehen bei Fischen im allgemeinen, sollte diesem speziellen morphologischen Merkmal fortan mehr Aufmerksamkeit geschenkt und es bei zukünftigen Untersuchungen besser dokumentiert werden.

Die Beobachtungen am hier vorliegenden Material haben ergeben, dass es dem Anschein nach keine Präferenz dafür gibt, welcher Teilstrang auf der ventralen bzw. dorsalen Seite zu liegen kommt. Die Verteilung entspricht einem 50 / 50 Verhältnis bei einer Probenanzahl von acht Tieren (Adulti) und die Anzahl der Stränge pro Sehnerv beträgt stets drei bei diesbezüglich, nachträglich untersuchten Tieren (einjährig, aus dem selben Fang). Die Probenanzahl ist aber aus statistischer Sicht noch als sehr gering zu bewerten.

Sardellen wachsen (wie die meisten Knochenfische) ein Leben lang (Dutta, 1994), ebenso ihre Augen und damit verbunden, werden auch immer neue Sehnerven-Axone angelegt. Es wäre also durchaus denkbar, dass mit zunehmendem Alter auch die Anzahl der Einzelstränge pro Sehnerv zunimmt, vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass die Sardellenlarven mit je einem Einzelstrang pro Sehnerv beginnen (s. 3.2). Um eine sichere Aussage

4 Diskussion

darüber treffen zu können, wie dieses mit der Zeit auftretende Platzproblem innerhalb des Sardellenkopfes gelöst wird, müssen folglich auch besonders alte bzw. große Exemplare mit einbezogen werden (z.B. dreijährige Sardellen, ca. 15 cm SL).

Über die Ursachen der Aufspaltung von Einzelsträngen der Sehnervenaxone und die Entstehung des Kreuzungsmuster im Detail weiß man noch nicht allzu viel. Bei *Danio rerio* ließen sich Signalproteine finden, die bei der Wegfindung der Sehnerven während der Entwicklung eine entscheidende Rolle spielen (Samuel et al., 2016). Daneben weiß man, dass auch der mechanische Kontakt zu Nachbarfasern der Zielfindung der Sehnervenaxonen dient (Scholes, 1979; Raper & Mason, 2010). Ob es ähnliche Mechanismen auch bei der Europäischen Sardelle gibt ist anzunehmen, der Nachweis steht aber noch aus. In diesem Zusammenhang soll folgende Hypothese erklären, wie es zu der Aufspaltung der Sehnerven im Chiasma kommen kann:

Fische wachsen ein Leben lang (Dutta, 1994). Auch ihre Augen werden größer, indem sie sich peripher erweitern. Es werden reihum neue Sehnervenfasern gebildet, deren Axone über die Retina bis zum äußeren Rand der optischen Furche wandern (Scholes, 1979). Die optische Furche befindet sich im ventro-temporalen Quadranten des Augapfels und verläuft vertikal bei *Engraulis engrasicolus* (Koch, 2011). Mit zunehmendem Radius werden somit immer mehr neue Nervenfasern angelegt, sie treten durch die optische Furche hindurch und wandern weiter zu den Orten der visuellen Datenverarbeitung, größtenteils zum optischen Tektum (Vanegas & Ito, 1983). Das Ganze hat zur Folge, dass auf der ventralen Seite der Sehnerven immer wieder neue Nervenfasern angelagert werden (Scholes, 1979). Je weiter ventral ein Nervenstrang, umso jünger und dicker ist er. Für die Verarbeitung der optischen Informationen ist es wichtig, dass die Nachbarschaftsverhältnisse der Sehzellen und deren Axone bestehen bleiben, sowohl in der Retina, als auch innerhalb des Sehnerven und dem optischen Tektum. Im optischen Chiasma überkreuzen die Sehnerven und ein Strang kommt dorsal, der andere ventral zu liegen. Nachdem sich die Sehnerven fortwährend auf der ventralen Seite erweitern, gibt es irgendwann ein Platzproblem im Chiasma: An der Stelle, wo Sehnerv auf Sehnerv liegt, wird es irgendwann so eng, dass nicht mehr alle Nervenfasern an bereits vorhandenen Faserbändern entlang wachsen können. Es muss daher irgendwann zu einer Aufspaltung der Nervenfasern kommen. Die neu angelegten ventralen Nervenfasern des dorsal gelegenen Sehnerven umwandern den Nervenstrang der Gegenseite und es entsteht ein neuer Sehnervenast. Für den umwanderten Sehnervenstrang stellt sich im Laufe der Zeit ein ähnliches Platzproblem, da dieser fortan ventral eingeeengt wird und es muss zwangsläufig auch hier zu einer Umwanderung des ventral gelegenen Sehnervenastes der Gegenseite kommen. Folglich sollte es

mit zunehmendem Alter bzw. damit verbundenen Wachstum, zu einer vermehrten Aufspaltung der Sehnerven im Chiasma kommen.

Eine besondere Situation stellt sich in diesem Zusammenhang dar für ein kleines Teilbündel des obersten rechten Sehnervenastes, der im Wesentlichen unter dem obersten linken liegt (Abb. 45). Diese besonders dicken, median gelegenen Fasern bzw. ein Teil dieser Fasern umrundet letzteren, d.h. sie werden dadurch letztlich die am weitesten dorsal liegenden Axone, um sich dann kontralateral wieder mit den übrigen dicken Fasern zu vereinen. Die entsprechenden Fasern des obersten linken Sehnervenastes zeigen keine Abweichung vom Verlauf der Nachbarfasern. Über Herkunft, Funktion und chiasmatischen Verlauf dieser besonderen Fasern kann hier nur spekuliert werden – sie könnten zu den am frühesten angelegten larvalen Retinaaxonen gehören.

Retinotopie Im allgemeinen muss man davon ausgehen, dass auch bei der Europäischen Sardelle die Topographie der Sehzellen der Retina, über den optischen Nerv, bis ins optische Tektum erhalten bleibt. Das heißt konkret, alle Bezugspunkte bzw. Nachbarschaftsverhältnisse auf der Retina finden sich auch in geordneter Weise innerhalb des optischen Tektums wieder (Schwassmann, 1975; Scholes, 1979; Butler & Saidel, 1993; Sanes, 1993; Cioni et al., 2018).

Die Sehnerven überkreuzen im Chiasma und ziehen dann in das contralaterale optische Tektum, bilden dort das Stratum optikum (SO), das in seiner dreidimensionalen Form in etwa der eines Augenbechers entspricht, der aber um 45° zur Sagittalachse geneigt ist und dessen offene Hälfte nach medioventral weist. Aufgrund dieser Baueigentümlichkeiten sind die Lagebeziehungen daher wie folgt: Bildpunkte im nasalen Retina Bereich werden auf das posteriore Tektum abgebildet, ventrale nach dorsal, dorsale nach ventral und temporale nach anterior (Schwassmann, 1975; Sanes, 1993).

Nach dem Chiasma muss also eine Sortierung der Sehnervaxone in alle Tektumsregionen erfolgen und somit entlang des Sehnervenquerschnittes von jeder Stelle Fasern in verschiedene Regionen des Tektums ausstrahlen (da ja wie oben ausgeführt Ganglienzellaxone aus allen Bereichen des Retinarandes immer ventral ergänzt werden) und damit ein insgesamt recht komplexes wenn auch regelhaftes Projektionsmuster bilden.

Der Ort des schärfsten Sehens bei *Engraulis encrasicolus*, die area centralis, befindet sich im ventro-temporalen Quadranten (Heß, 2009). Hier ist die Dichte der Sehzellen und Ganglienzellen am größten (Koch, 2011). Lässt sich anhand der Dicke des SO Rückschlüsse auf die Dichteverteilung von Stäbchen bzw. Zapfen auf der Retina ziehen? Wenn dem so

4 Diskussion

wäre, müsste sich dementsprechend im dorso-anterioren Bereichen des SO auch die dicksten Stellen der Axonfasern in unserem 3D-Modell befinden. Diese Annahme lässt sich nicht bestätigen. Die dorso-anterioren Bereiche der nebeneinanderliegenden hohlen Halbkugeln rekonstruierter Sehnervenaxonen innerhalb des optischen Tektums unterscheiden sich in ihrer Dicke nicht vom übrigen SO.

Entweder liegen daher die unmittelbar nachgeschalteten Zellen im dorso-anterioren Tektum dichter als in anderen Regionen, oder die die area centralis repräsentierende Region nimmt eine relativ gesehen vergrößerte Fläche ein.

Injektion von Meerrettichperoxidase (Rusoff & Easter, 1980), Antikörperfärbungen von Wachstumskegeln bei Ganglienzellaxonen (Simpson et al., 2013) bzw. Tracingversuche an lebenden Tieren (Vidal-Sanz et al., 1988) sind altbewährte Ansätze, um die Frage des Axonverlaufs bei *Engraulis encrasicolus* in Zukunft in weiteren Details zu klären, und damit erfolgversprechend die hier geschaffenen ersten Erkenntnisse zu ergänzen.

4.4 Ausblick

Zu 4.1: Klassische Histologie und μ CT haben beide Vor- und Nachteile. Eine Kombination mit MRH wäre zwar aufwändig, bei einem anfänglichen Scan und der darauf folgenden histologischen Aufarbeitung eines Versuchsobjektes, würde aber aus wissenschaftlicher Sicht die besten Ergebnisse liefern.

Die Kenntnis der Anatomie des Gehirns einer adulten Sardellen könnte für die weitere Erforschung und das Verständnis des Polarisationskontrastsehens bei Wirbeltieren hilfreich sein. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Gehirnatlas mit vergleichsweise hoher Auflösung erfüllt diese Voraussetzung und ist ein erster wichtiger Schritt.

Für die Zukunft und der Vollständigkeit halber, wäre eine Ergänzung um eine sagittale- bzw. horizontale Schnittserie von Interesse. Eine Erweiterung um einen histochemischen Atlas oder Zellkartierungsatlas in 3D, basierend auf Vibratomschnitten, DAPI-Färbung und Zweiphotonenmikroskopie, aber auch die Aufnahme ausgewählter Kerne/Gehirnareale bei noch höherer Auflösung (z.B. durch FIB oder andere Varianten der 3D-Elektronenmikroskopie) können neue Erkenntnisse bringen, um das hier geschaffene Wissen zu erweitern und voranzutreiben.

Die freie Skalier- und Drehbarkeit, sowie Volumen- und Streckenmessungen dieser 3D-Modelle ermöglichen ein vergleichendes Arbeiten und die Untersuchung der Wachstumsvorgänge des ganzen Gehirns und einzelner Gehirnabschnitte während des Wachstums der Sardelle.

Zu 4.2: MRH ist eine zeitsparende, schonende und strukturell „nicht-invasive“ Untersuchungsmethode, wenn auch mit begrenztem Auflösungsvermögen (Ullmann et al., 2010; Simoes et al., 2012). Ähnliches gilt für μ CT mit geringerem Kontrast und höherer Auflösung. Daten von der Embryonalentwicklung, über Larvenstadien bis hin zum adulten Individuum ließen sich tomografisch mit gegenüber der Histologie weit geringerem Aufwand und mit zeitlich feinerer Abstufung sammeln. Wachstums- und Entwicklungsprozesse könnten in einem ganz neuen Licht betrachtet werden und in Zukunft für das Verständnis dieser Prozesse einen entscheidenden Teil beitragen.

Optimal für die Untersuchung des Aufbaus von Gehirnen wäre auch eine Kombination aus beiden Methoden. Die MRH- oder Röntgen-Tomografie könnte somit zunächst minimalinvasiv das Gehirn in seiner unmittelbaren Umgebung erfassen und zeitsparend einen per-

4 Diskussion

fekt alignierten Bilderstapel mit einer groben Auflösung einzelner Gehirnstrukturen generieren. Folglich können aus dem Gehirn ein und des selben Individuums auch die klassisch histologischen Bilder erstellt werden. Der Bilderstapel dient gleichzeitig als Matrix für die Histologiebilder. Diese weisen durch die Einbettung und das Schneiden gewisse Verzerrungsartefakte auf. Bei Verwendung entsprechender Landmarks sollte es möglich sein, die histologischen Aufnahmen zu korrigieren und in die Matrix einzusetzen. Die entscheidenden Vorteile beider Methoden ließen sich auf die Art und Weise kombinieren.

Aufgrund der hier bereits angesprochenen Probleme, die Larvenschnittserien betreffend, sei an dieser Stelle auf zukünftige Datenerhebungen und Untersuchungen ähnlichen Umfangs eingegangen. Um optimale aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen, müssen zunächst die Rahmenbedingungen der Larvenaufzucht vereinheitlicht werden, um den Einfluss externer Faktoren während der Embryogenese möglichst gleich zu halten.

Am besten erfolgt die Materialentnahme innerhalb ein und der selben aufwachsenden Generation. Des weiteren sollten möglichst viele Arbeitsschritte, von der Probenentnahme, über die Weiterverarbeitung der Versuchstiere, bis hin zur Datenerhebung, eine möglichst einheitliche Handhabung erfahren. Falls der Umfang der Untersuchung es zulässt, wird ein Arbeitsschritt nur von genau einer Person durchgeführt. Die Vorteile bestünden darin, dass nebst einer einheitlichen Handhabung, mögliche Fehlerquellen minimiert werden und es es folglich zu einer verbesserten Vergleichbarkeit der Larvendatensätze kommt.

Die Probennahme der Larven sollte möglichst in festen einheitlichen Zeitintervallen (z.B. alle 24 Stunden) durchgeführt werden, um den Zeitpunkt von Veränderungen besser dokumentieren und analysieren zu können. Um annähernd gleiche Zeitabstände der hier durchgeführte Untersuchung nachträglich zu erreichen, wäre eine histologische Aufarbeitung von Larvenstadien im Alter von 15, 25 und 40 Tagen als Ergänzung wünschenswert. Allerdings übersteigt die Anfertigung weiterer Larvenstadien den zeitlichen Rahmen dieser Dissertation und bleibt somit Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

Das Gehirn einer 45 Tagen alten Sardellenlarven entspricht zwar weitestgehend dem einer adulten Sardelle, jedoch befinden sich gewisse Gehirnregionen, wie das optische Tektum, noch im Aufbau. Von großer Interesse wäre es, den genauen Zeitpunkt zu kennen, ab dem das Gehirn als adult angesehen werden kann.

Dieses Wissen würde es ermöglichen, Fluoreszenz-Laufexperimente (s. Kap. 3.3) an Gehirnen möglichst geringer Größe durchzuführen. Folglich würden sich die Laufstrecken und Laufzeiten der Fluoreszenzmarker verringern. In diesem Zusammenhang erscheint

der Ansatz von Mikroinjektionen an lebenden Organismen ein erfolgversprechender Ansatz zu sein, wodurch der Identitätsnachweis gewisser Kerne bzw. Gehirnstrukturen nicht nur aufgrund deren Lage innerhalb des Gehirns und der Lokalisation zueinander, sondern zusätzlich durch deren Verschaltungen untereinander beschrieben werden könnte. Dadurch ließen sich weitere Erkenntnisse darüber gewinnen, wie die visuelle Informationsverarbeitung im Gehirn der europäischen Sardellen abläuft - ein weiterer Schritt um das Polarisationskontrastsehen besser verstehen zu können.

Zu 4.3: Für die Zukunft ist eine genauere Untersuchung der Verschaltung der optisch relevanten Kerne unabdingbar und für das Verständnis des Polarisationskontrastsehens bei der Europäischen Sardelle der nächste logische Schritt. Golgifärbung, sowie Tracingexperimente an lebenden oder zumindest mit Formaldehyd perfundierten Versuchstieren wären hierbei denkbare und erfolgversprechende Ansätze.

5. Literaturverzeichnis

- Altevogt, R., & Hagen, H.-O. V. (1964).** Über die Orientierung von *Uca tangeri eydoux* im Freiland. *Z Morphol Ökol Tiere*, 53(6), 636-656.
- Anken, R. H., & Bourrat, F. (1998).** Brain atlas of the medakafish *Oryzias latipes*. Paris: INRA Editions, 92 pp.
- Anken, R. H., & Rahmann, H. (1994).** Brain atlas of the adult swordtail fish *Xiphophorus helleri* and of certain developmental stages. Stuttgart: Gustav Fischer, 96 pp.
- Arevalo, R., Alonso, J. R., Brinon, J. G., Garcia-Ojeda, E., Velasco, A., Lara, J., & Aijon, J. (1992).** An atlas of the brain of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; Cyprinidae, Teleostei). *J Hirnforsch*, 33(4-5), 487-497.
- Awaiwanont, K., Gunarso, W., Sameshima, M., Hayashi, S., & Kawamura, G. (2001).** Grouped, stacked rods and tapeta lucida in the retina of Japanese anchovy *Engraulis japonicus*. *Fisheries Sci*, 67(5), 804-810.
- Bagarinao, T., & Hunter, J. R. (1983).** The visual feeding threshold and action spectrum of northern anchovy (*Engraulis mordax*) larvae. *CalCOFI Rep*, 24, 245-254.
- Baier, H., Klostermann, S., Trowe, T., Karlstrom, R. O., Nusslein-Volhard, C., & Bonhoeffer, F. (1996).** Genetic dissection of the retinotectal projection. *Development*, 123(1), 415-425.
- Balice-Gordon, R. J., Chua, C. K., Nelson, C. C., & Lichtman, J. W. (1993).** Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. *Neuron*, 11(5), 801-815.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007).** Neuroscience: Exploring the brain (3. Auflage ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 857 pp.
- Bernard, G. D., & Wehner, R. (1977).** Functional similarities between polarization vision and color vision. *Vision Res*, 17(9), 1019-1028.
- Billard, R., & Peter, R. E. (1982).** A stereotaxic atlas and technique for nuclei of the diencephalon of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Reprod Nutr Dev*, 22(1a), 1-25.
- Blank, H.-M., Müller, B., & Korf, H.-W. (1997).** Comparative investigations of the neuronal apparatus in the pineal organ and retina of the rainbow trout: immunocytochemical demonstration of neurofilament 200-kDa and neuropeptide Y, and tracing with Dil. *Cell Tissue Res*, 288(3), 417-425.
- Brownell, P., & Weber, T. (1995).** Polarization vision in nocturnal sand scorpions. Stuttgart: G Thieme, 281 pp.
- Burrill, J. D., & Easter, S. S., Jr. (1994).** Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol*, 346(4), 583-600.
- Butler, A. B. (1992).** Variation of tectal morphology in teleost fishes. *Brain Behav Evol*, 40(5), 256-272.
- Butler, A. B. (2000).** Chordate evolution and the origin of craniates: an old brain in a new head. *Anat Rec*, 261(3), 111-125.
- Butler, A. B., & Northcutt, R. G. (1993).** The diencephalon of the pacific herring, *Clupea harengus*: Cytoarchitectonic analysis. *J Comp Neurol*, 328(4), 527-546.

- Butler, A. B., & Saidel, W. M. (1993).** Retinal projections in teleost fishes: Patterns, variations, and questions. *Comp Biochem Physiol*, 104(3), 431-442.
- Butler, A. B., Wullimann, M. F., & Northcutt, R. G. (1991).** Comparative cytoarchitectonic analysis of some visual pretectal nuclei in teleosts (part 1 of 2). *Brain Behav Evol*, 38(2-3), 92-104.
- Cameron, D. A., & Pugh, E. N., Jr. (1991).** Double cones as a basis for a new type of polarization vision in vertebrates. *Nature*, 353(6340), 161-164.
- Cerda-Reverter, J. M., Muriach, B., Zanuy, S., & Muñoz-Cueto, J. A. (2008).** A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): The midbrain and hindbrain. *Acta Histochemica*, 110(6), 433-450.
- Cerda-Reverter, J. M., Zanuy, S., & Munoz-Cueto, J. A. (2001a).** Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *J Morphol*, 247(3), 217-228.
- Cerda-Reverter, J. M., Zanuy, S., & Munoz-Cueto, J. A. (2001b).** Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). II. The diencephalon. *J Morphol*, 247(3), 229-251.
- Chen, Y., Hu, M., Shibata, H., & Naito, J. (2003).** Changes in the distribution of labeled retinal ganglion cells after an implant of Dil into the optic nerve in the chick embryos. *J Vet Med Sci*, 65(2), 279-281.
- Cioni, J. M., Wong, H. H., Bressan, D., Kodama, L., Harris, W. A., & Holt, C. E. (2018).** Axon-axon interactions regulate topographic optic tract sorting via CYFIP2-dependent WAVE complex function. *Neuron*, 97(5), 1078-1093.
- Corfield, J. (2009).** Evolution of the brain and sensory systems of the kiwi. University of Auckland, Thesis.
- Correa, S. A., Correa, F. M., & Hoffmann, A. (1998).** Stereotaxic atlas of the telencephalon of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J Neurosci Methods*, 84(1-2), 93-100.
- D'Angelo, L. (2013).** Brain atlas of an emerging teleostean model: *Nothobranchius furzeri*. *Anat Rec*, 296(4), 681-691.
- Dacke, M., Doan, T. A., & O'Carroll, D. C. (2001).** Polarized light detection in spiders. *J Exp Biol*, 204(14), 2481-2490.
- De Motte, A. S. (2013).** Pseudo 4D-Rekonstruktion der Kopfregeion der Sardellenlarve *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758). Ludwig-Maximilians-Universität München, Masterarbeit.
- Dulcic, J. (1997).** Growth of anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), larvae in the Northern Adriatic Sea. *Fish Res*, 31(3), 189-195.
- Dutta, H. (1994).** Growth in Fishes. *Gerontology*, 40(2-4), 97-112.
- Fineran, B. A., & Nicol, J. A. C. (1976).** Novel cones in the retina of the anchovy (*Anchoa*). *J Ultra Mol Struct R*, 54(2), 296-303.
- Fineran, B. A., & Nicol, J. A. C. (1977).** Studies on the eyes of anchovies *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the pigment epithelium. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 276(947), 321-350.

5. Literaturverzeichnis

- Fineran, B. A., & Nicol, J. A. C. (1978).** Studies on the photoreceptors of *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the cones. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 283(994), 25-60.
- Frantsevich, L., Govardovski, V., Gribakin, F., Nikolajev, G., Pichka, V., Polanovsky, A., Shevchenko, V., & Zolotov, V. (1977).** Astroorientation in *Lethrus* (Coleoptera, Scarabaeidae). *J Comp Physiol*, 121(2), 253-271.
- Fukuhara, O. (1983).** Development and growth of laboratory reared *Engraulis japonica* (Houttuyn) larvae. *J Fish Biol*, 23(6), 641-652.
- Geiger, W. (1956).** Quantitative Untersuchungen über das Gehirn der Knochenfische, mit besonderer Berücksichtigung seines relativen Wachstums. *Acta Anat*, 27(4), 324-350.
- Gignac, P. M., & Kley, N. J. (2014).** Iodine-enhanced micro-CT imaging: methodological refinements for the study of the soft-tissue anatomy of post-embryonic vertebrates. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 322(3), 166-176.
- Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., & Bonhoeffer, F. (1987).** A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*, 101(4), 697-713.
- Hawryshyn, C. W., Arnold, M. G., Bowering, E., & Cole, R. L. (1990).** Spatial orientation of rainbow trout to plane-polarized light: The ontogeny of E-vector discrimination and spectral sensitivity characteristics. *J Comp Physiol*, 166(4), 565-574.
- Hawryshyn, C. W., & Bolger, A. E. (1990).** Spatial orientation of trout to partially polarized light. *J Comp Physiol*, 167(5), 691-697.
- Heß, M. (2000).** Vergleichend feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulididae) und den Retinae anderer Clupeiformes. LMU München, Dissertation.
- Heß, M. (2009).** Triple cones in the retinae of three anchovy species: *Engraulis encrasicolus*, *Cetengraulis mysticetus* and *Anchovia macrolepidota* (Engraulididae, Teleostei). *Vision Res*, 49(12), 1569-1582.
- Heß, M., Melzer, R. R., Eser, R., & Smola, U. (2006).** The structure of anchovy outer retinae (Engraulididae, Clupeiformes) - a comparative light- and electron-microscopic study using museum-stored material. *J Morphol*, 267(11), 1356-1380.
- Heß, M., Melzer, R. R., & Smola, U. (2002).** The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulididae, Clupeiformes). *J Submicrosc Cytol Pathol*, 34(4), 355-365.
- Hevner, R. F. (2000).** Development of connections in the human visual system during fetal mid-gestation: a Dil-tracing study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(5), 385-392.
- Hildebrand, M., & Goslow, G. E. (2004).** Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere. (5. Auflage ed.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 713 pp.
- Hofmann, M. H., & Bleckmann, H. (1999).** Effect of temperature and calcium on transneuronal diffusion of Dil in fixed brain preparations. *J Neurosci Methods*, 88(1), 27-31.
- Honig, M. G., & Hume, R. I. (1986).** Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol*, 103(1), 171-187.
- Honig, M. G., & Hume, R. I. (1989).** Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends Neurosci*, 12(9), 333-341.

- Horvath, G., & Varju, D. (2004).** Polarized light in animal vision: Polarization patterns in nature. Berlin Heidelberg: Springer, 472 pp.
- Jarvis, E. D., Gunturkun, O., Bruce, L., Csillag, A., Karten, H., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Perkel, D. J., Shimizu, T., Striedter, G., Wild, J. M., Ball, G. F., Dugas-Ford, J., Durand, S. E., Hough, G. E., Husband, S., Kubikova, L., Lee, D. W., Mello, C. V., Powers, A., Siang, C., Smulders, T. V., Wada, K., White, S. A., Yamamoto, K., Yu, J., Reiner, A., & Butler, A. B. (2005).** Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat Rev Neurosci*, 6(2), 151-159.
- Kabli, S., Alia, A., Spaink, H. P., Verbeek, F. J., & De Groot, H. J. (2006).** Magnetic resonance microscopy of the adult zebrafish. *Zebrafish*, 3(4), 431-439.
- Kamermans, M., & Hawryshyn, C. (2011).** Teleost polarization vision: how it might work and what it might be good for. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366(1565), 742-756.
- Karlstrom, R. O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A. D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S. U., Muller, B. K., Richter, S., van Eeden, F. J., Nusslein-Volhard, C., & Bonhoeffer, F. (1996).** Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development*, 123, 427-438.
- Karoubi, N., Segev, R., & Wullimann, M. F. (2016).** The brain of the archerfish *Toxotes chatareus*: A nissl-based neuroanatomical atlas and catecholaminergic/cholinergic systems. *Front Neuroanat*, 10(106), 1-20.
- Karten, H. J., & Hodos, W. A. (1967).** Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (*Columba Livia*). Baltimore: Johns Hopkins University Press, 206 pp.
- Koch, P. C. (2011).** Neuroanatomie der Sardellenretina – Ein Beitrag zum Verständnis des Polarisationssehens bei Wirbeltieren. Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation.
- Koch, P. C., & Heß, M. (2011).** Durchblick im Dendritengewirr der Sardellenretina: FIB-FESEM basierte 3D Rekonstruktion eines neuronalen Netzwerkes. 4. *Graduiertenforum der Fachgruppe Morphologie der DZG, München*(19).
- Koch, P. C., Seebacher, C., & Hess, M. (2010).** 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina - A confocal and two-photon microscopic study. *J Neurosci Methods*, 188(1), 127-140.
- Kondrashev, S. L., Gnyubkina, V. P., & Zueva, L. V. (2012).** Structure and spectral sensitivity of photoreceptors of two anchovy species: *Engraulis japonicus* and *Engraulis encrasicolus*. *Vision Res*, 68, 19-27.
- Kondrashev, S. L., Kornienko, M. S., Gnyubkina, V. P., & Frolova, L. T. (2016).** Intraretinal variability and specialization of cones in Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*, Engraulidae). *J Morphol*, 277(4), 472-481.
- Kondrashev, S. L., Miyazaki, T., Lamash, N. E., & Tsuchiya, T. (2013).** Three cone opsin genes determine the properties of the visual spectra in the Japanese anchovy, *Engraulis japonicus* (Engraulidae, Teleostei). *J Exp Biol*, 216(Pt 6), 1041-1052.
- Kuratani, S., & Ota, K. G. (2008).** Hagfish (cyclostomata, vertebrata): Searching for the ancestral developmental plan of vertebrates. *BioEssays*, 30(2), 167-172.
- Llinas, R., & Precht, W. (1976).** Frog neurobiology: A handbook. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1048 pp.

5. Literaturverzeichnis

- Maler, L., Sas, E., Johnston, S., & Ellis, W. (1991).** An atlas of the brain of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J Chem Neuroanat*, 4(1), 1-38.
- McLaren, D. G., Kosmatka, K. J., Oakes, T. R., Kroenke, C. D., Kohama, S. G., Matochik, J. A., Ingram, D. K., & Johnson, S. C. (2009).** A population-average MRI-based atlas collection of the rhesus macaque. *Neuroimage*, 45(1), 52-59.
- Metscher, B. D. (2009).** MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology*, 9(11), 1-14.
- Mogi, K., Misawa, K., Utsunomiya, K., Kawada, Y., Yamazaki, T., Takeuchi, S., & Toyozumi, R. (2009).** Optic chiasm in the species of order Clupeiformes, family Clupeidae: optic chiasm of *Spratelloides gracilis* shows an opposite laterality to that of *Etrumeus teres*. *Laterality*, 14(5), 495-514.
- Mueller, T., & Wullimann, M. F. (2015).** Atlas of early zebrafish brain development: A tool for molecular neurogenetics (Second Edition ed. Vol. 1). Heidelberg: Elsevier, 258 pp.
- Mulisch, M., & Welsch, U. (2010).** Romeis - Mikroskopische Technik (Vol. 18). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 556 pp.
- Natt, O., Watanabe, T., Boretius, S., Radulovic, J., Frahm, J., & Michaelis, T. (2002).** High-resolution 3D MRI of mouse brain reveals small cerebral structures in vivo. *J Neurosci Methods*, 120(2), 203-209.
- Northcutt, R. G. (2002).** Understanding vertebrate brain evolution. *Integr Comp Biol*, 42(4), 743-756.
- Northcutt, R. G., & Butler, A. B. (1993).** The diencephalon of the Pacific herring, *Clupea harengus*: retinofugal projections to the diencephalon and optic tectum. *J Comp Neurol*, 328(4), 547-561.
- Novales Flamarique, I. (2011).** Unique photoreceptor arrangements in a fish with polarized light discrimination. *J Comp Neurol*, 519(4), 714-737.
- Novales Flamarique, I. (2013).** Opsin switch reveals function of the ultraviolet cone in fish foraging. *Proc Biol Sci*, 280(1752), 20122490.
- Novales Flamarique, I. (2017).** A vertebrate retina with segregated colour and polarization sensitivity. *Proc Biol Sci*, 284(1862), 20170759.
- Novales Flamarique, I., & Harosi, F. I. (2002).** Visual pigments and dichroism of anchovy cones: A model system for polarization detection. *Visual Neurosci*, 19(4), 467-473.
- Novales Flamarique, I., & Hawryshyn, C. W. (1998).** Photoreceptor types and their relation to the spectral and polarization sensitivities of clupeid fishes. *Journal of Comparative Physiology A*, 182(6), 793-803.
- O'Connell, L. A. (2013).** Evolutionary development of neural systems in vertebrates and beyond. *J Neurogenet*, 27(3), 69-85.
- Palomera, I., Morales-Nin, B., & Lleó, J. (1988).** Larval growth of anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the Western Mediterranean Sea. *Mar. Biol.*, 99, 283-291.
- Paulin, M. G. (1993).** The role of the cerebellum in motor control and perception. *Brain Behav Evol*, 41(1), 39-50.

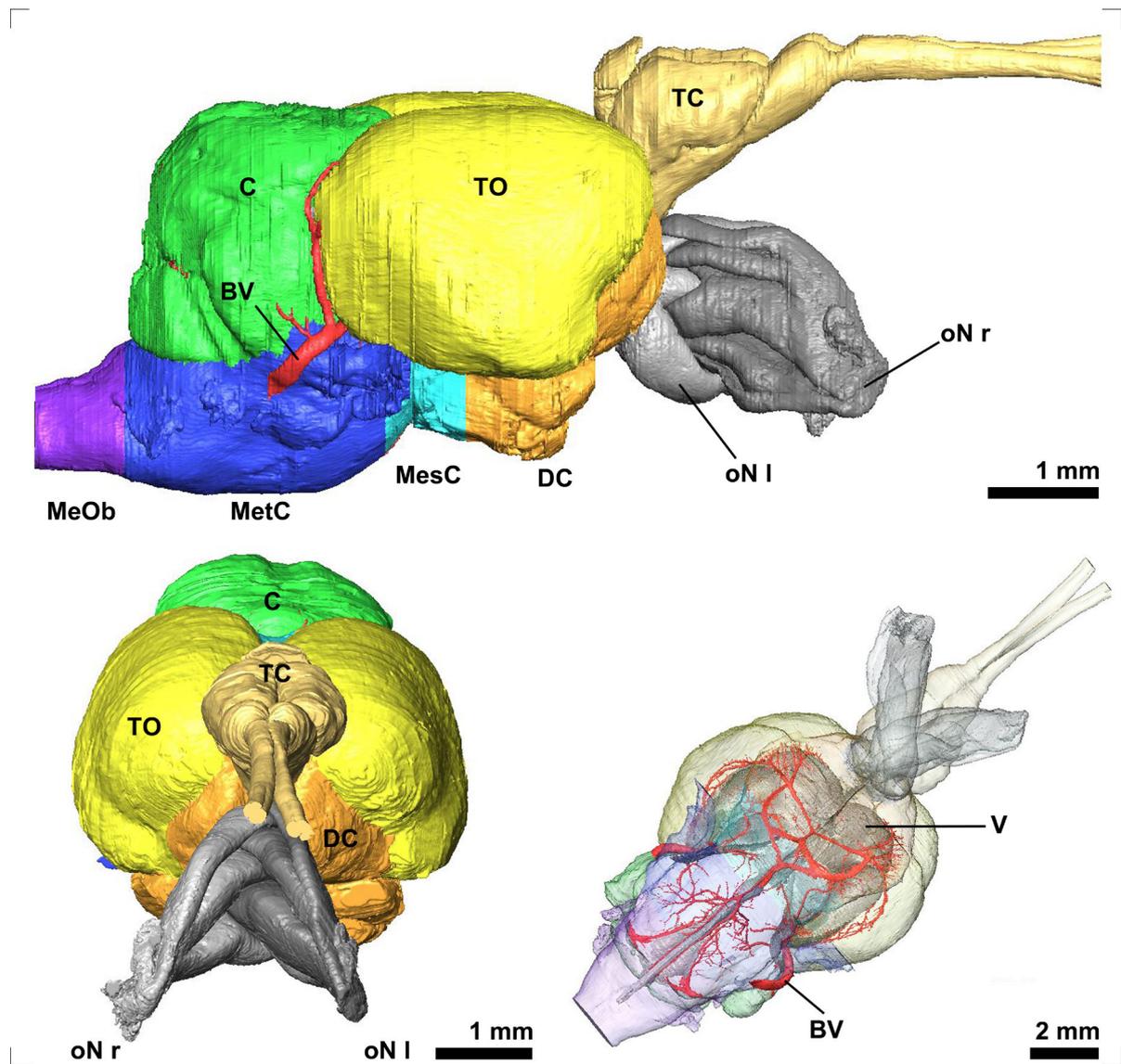
- Peter, R. E., Crim, L. W., & Billard, R. (1991).** A stereotaxic atlas and implantation technique for nuclei of the diencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Reprod Nutr Dev*, 31(2), 167-186.
- Peter, R. E., & Gill, V. E. (1975).** A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol*, 159(1), 69-101.
- Peter, R. E., Macey, M. J., & Gill, V. E. (1975).** A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the killfish, *Fundulus heteroclitus*. *J Comp Neurol*, 159(1), 103-127.
- Randlett, O., Wee, C. L., Naumann, E. A., Nnaemeka, O., Schoppik, D., Fitzgerald, J. E., Portugues, R., Lacoste, A. M., Riegler, C., Engert, F., & Schier, A. F. (2015).** Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. *Nat Methods*, 12(11), 1039-1046.
- Raper, J., & Mason, C. (2010).** Cellular strategies of axonal pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(9), 1-21.
- Regner, S. (1985).** Ecology of planktonic stages of the anchovy, *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758), in the central Adriatic. *Acta Adriat*, 26(1), 1-113.
- Richardson, K. C., Jarett, L., & Finke, E. H. (1960).** Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol*, 35, 313-323.
- Roland, P. E., Graufelds, C. J., J, W. H., Ingelman, L., Andersson, M., Ledberg, A., Pedersen, J., Akerman, S., Dabringhaus, A., & Zilles, K. (1994).** Human brain atlas: For high-resolution functional and anatomical mapping. *Hum Brain Mapp*, 1(3), 173-184.
- Rost, R., & Honegger, H. W. (1987).** The timing of premating and mating behavior in a field population of the cricket *Gryllus campestris* L. *Behav Ecol Sociobiol*, 21(5), 279-289.
- Roth, G., Nishikawa, K. C., Naujoks-Manteuffel, C., Schmidt, A., & Wake, D. B. (1993).** Paedomorphosis and simplification in the nervous system of salamanders. *Brain Behav Evol*, 42(3), 137-170.
- Rusoff, A. C., & Easter, S. S., Jr. (1980).** Order in the optic nerve of goldfish. *Science*, 208(4441), 311-312.
- Ruthensteiner, B. (2008).** Soft Part 3D visualization by serial sectioning and computer reconstruction. *Zoosymposia*, 1, 63-100.
- Samuel, A., Rubinstein, A. M., Azar, T. T., Ben-Moshe Livne, Z., Kim, S. H., & Inbal, A. (2016).** Six3 regulates optic nerve development via multiple mechanisms. *Sci Rep*, 6, 20267.
- Sanes, J. R. (1993).** Topographic maps and molecular gradients. *Curr Opin Neurobiol*, 3(1), 67-74.
- Scheungrab, M. W. (2011).** Histologie und 3D-Mikroanatomie des Gehirns von *Sardina pilchardus* (Clupeiformes, Teleostei). Ludwig-Maximilians-Universität München, Diplomarbeit.
- Schmahmann, J. D., Doyon, J., McDonald, D., Holmes, C., Lavoie, K., Hurwitz, A. S., Kabani, N., Toga, A., Evans, A., & Petrides, M. (1999).** Three-dimensional MRI atlas of the human cerebellum in proportional stereotaxic space. *Neuroimage*, 10(3 Pt 1), 233-260.

5. Literaturverzeichnis

- Scholes, J. H. (1979).** Nerve fibre topography in the retinal projection to the tectum. *Nature*, 278(5705), 620-624.
- Schwarz, A. J., Danckaert, A., Reese, T., Gozzi, A., Paxinos, G., Watson, C., Merlo-Pich, E. V., & Bifone, A. (2006).** A stereotaxic MRI template set for the rat brain with tissue class distribution maps and co-registered anatomical atlas: application to pharmacological MRI. *Neuroimage*, 32(2), 538-550.
- Schwassmann, H. O. (1963).** Functional development of visual pathways in larval sardines and anchovies. *Calif. Coop. Oceanic Fish Invest Rep*, 10(10), 64-70.
- Schwassmann, H. O. (1975).** Central projections of the retina and vision. In M. A. Ali (Ed.), *Vision in Fishes: New Approaches in Research* (pp. 113-126). Boston, MA: Springer US.
- Shashar, N., & Cronin, T. W. (1996).** Polarization contrast vision in *Octopus*. *J Exp Biol*, 199(4), 999-1004.
- Simoës, J. M., Teles, M. C., Oliveira, R. F., Van der Linden, A., & Verhoye, M. (2012).** A three-dimensional stereotaxic MRI brain atlas of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *PLoS One*, 7(9), 1-8.
- Simpson, H. D., Kita, E. M., Scott, E. K., & Goodhill, G. J. (2013).** A quantitative analysis of branching, growth cone turning, and directed growth in zebrafish retinotectal axon guidance. *J Comp Neurol*, 521(6), 1409-1429.
- Smeets, W. J., Hoogland, P. V., & Lohman, A. H. (1986).** A forebrain atlas of the lizard *Gekko gekko*. *J Comp Neurol*, 254(1), 1-19.
- Spector, R., & Johanson, C. E. (1989).** The mammalian choroid plexus. *Sci Am*, 261(5), 68-74.
- Takahashi, M., & Watanabe, Y. (2005).** Effects of temperature and food availability on growth rate during late larval stage of Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) in the Kuroshio–Oyashio transition region. *Fish. Oceanogr.*, 14(3), 223-235.
- Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Granato, M., Crawford, A. D., Grunewald, B., Hoffmann, H., Karlstrom, R. O., Meyer, S. U., Muller, B., Richter, S., Nusslein-Volhard, C., & Bonhoeffer, F. (1996).** Mutations disrupting the ordering and topographic mapping of axons in the retinotectal projection of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123(1), 439-450.
- Ullmann, J. F., Cowin, G., Kurniawan, N. D., & Collin, S. P. (2010).** A three-dimensional digital atlas of the zebrafish brain. *Neuroimage*, 51(1), 76-82.
- v. Bartheld, C. S., Cunningham, D. E., & Rubel, E. W. (1990).** Neuronal tracing with Dil: decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis. *J Histochem Cytochem*, 38(5), 725-733.
- v. Frisch, K. (1949).** Die Polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzen der Bienen. *Experientia*, 5(4), 142-148.
- v. Helversen, O., & Edrich, W. (1974).** Der Polarisationsempfänger im Bienenaugenauge: ein Ultraviolett-rezeptor. *J Comp Physiol*, 94(1), 33-47.
- Vanegas, H., & Ito, H. (1983).** Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res*, 287(2), 117-137.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, M. P., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1988).** Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol*, 102(1), 92-101.

- Waterman, T. H. (1954).** Polarization patterns in submarine illumination. *Science*, 120(3127), 927-932.
- Wehner, R. (1982).** Himmelsnavigation bei Insekten: Neurophysiologie und Verhalten. Zürich: Orell Füssli, 132 pp.
- Wellington, W. G. (1953).** Motor responses evoked by the dorsal ocelli of *Sarcophaga Aldrichi* Parker, and the orientation of the fly to plane polarized light. *Nature*, 172(4391), 1177-1179.
- Westheide, W., & Rieger, R. (2010).** Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere (W. Westheide & R. Rieger Eds. 2. Auflage ed. Vol. 2). München: Spektrum Akademischer Verlag, 713 pp.
- Whitehead, P. J. P., Nelson, G. J., & Wongratana, T. (1985).** Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei): Chirocentridae, Clupeidae, and Pristigasteridae (Vol. 7, Part 1): United Nations Development Programme, 579 pp.
- Wullimann, M. F., Rupp, B., & Reichert, H. (1996).** Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topological atlas. Basel: Birkhäuser Verlag, 143 pp.
- Yopak, K. E., Galinsky, V. L., Berquist, R. M., & Frank, L. R. (2016).** Quantitative classification of cerebellar foliation in cartilaginous fishes (class: Chondrichthyes) using three-dimensional shape analysis and its implications for evolutionary biology. *Brain Behav Evol*, 87(4), 252-264.
- Zill, S. N., Frazier, S. F., Macfarland, D. L., & Fish, S. E. (1993).** Characterization of insect sense organs and optical clearing of whole-mount preparations using dil in fixed tissues. *J. Exp. Biol.*, 175(1), 299-303.
- Zueva, L. V. (1982).** Retinal cones of the Black Sea anchovy *Engraulis encrasicolus* - an analyzer of polarized light in vertebrates. *J Evol Biochem Physiol*, 17(6), 602-605.
- Zupanc, G. K., & Horschke, I. (1995).** Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J Comp Neurol*, 353(2), 213-233.

6 Anhang



Interactive figure 1: Gross morphology of the anchovy brain

Surface rendering of olfactory nerves, telencephalon, diencephalon, left and right optic nerves, mesencephalon, tectum opticum, metencephalon, cerebellum, myelencephalon and ventricles (blood vessels not included).

The **interactive 3D model** can be activated by clicking onto the figure (Adobe Reader Version 7 or higher). Rotate: drag + press left mouse button; shift: same action + ctrl; zoom: use mouse wheel (or change default action for left mouse button). Use model tree for selecting components, switch between prefab views or change surface visualization (e.g. lighting, render mode, transparency, crop etc.). Deactivate 3D content via right mouse click (context menu).

Poster und Vorträge

Sieber, M., Scheungrab, M., Wullimann, M., Heß, M. (2012).

Das Fischgehirn in 3D – ein neuer Ansatz des funktionsmorphologischen Arbeitens.

104. Annual meeting of the German Zoological Society, Abstract Book: 137

Scheungrab, M., Sieber, M., Wullimann, M., Heß, M. (2011).

3D-histology and microanatomy of the teleost brain - a new approach of an interactive digital atlas.

4. Graduiertenforum der Fachgruppe Morphologie der DZG, Abstract: 38

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Martin Heß für die Gestaltung der Thematik, die Unterstützung und die wertvollen Tipps während der Anfertigung meiner Doktorarbeit. Er stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr für Probleme jeder Art.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Gerhard Haszprunar. Erst durch ihn war es mir möglich die Doktorarbeit in der AG Haszprunar / Heß der systematischen Zoologie an der LMU München anzufertigen.

Mein Dank gilt auch unserer TA Heidemarie Gensler für die exzellente technische Unterstützung. Danke auch vor allem für die netten, motivierenden und aufbauenden Gespräche und Lebensweisheiten.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Mario Wullimann, der sich die Zeit nahm, um sich meine Schnittserien anzusehen und mich in Sachen Anatomie und Histologie von Fischgehirnen sehr gut beraten und maßgeblich vorangebracht hat.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Roland Melzer, der sich bereit erklärt hat als Zweitgutachter zu fungieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Katharina Jörger, Dr. Timea Neusser, Dr. Petra Koch, Franziska Bergmeier, Katja Schulze und Maximilian Scheungrab für die Hilfe und Unterstützung bedanken. Ebenso danke ich Florian Kretzler, Dr. Andreas Hawe, Dr. Thomas Kunze und Dr. Elvira Wild, meinen treuen Mitstreitern und Weggefährten während dieser langen Zeit.

Außerdem bin ich auch sehr dankbar darüber, dass ich während meiner Zeit in der AG Haszprunar / Heß zahlreiche Praktikanten, Bacheloranden und Diplomanden kennenlernen durfte.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, großen Dank aussprechen für die Unterstützung während meines Studiums und während der Anfertigung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 07.06.2018

Marc Sieber