

**Die neuronale Entwicklung der Mittellinie des  
Heuschreckengehirns bei *Schistocerca gregaria***

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von  
Peter Ludwig**

**München, Oktober 2000**

Dissertation eingereicht am 16.10.2000

1. Gutachter: Prof. Dr. G.S. Boyan
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Smola

Datum der mündlichen Prüfung: 14.02.01

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Modellorganismen in der Entwicklungsneurobiologie.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2</b>	<b>Die Bildung des Gehirns bei Vertebraten und Invertebraten.....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Entwicklung und Funktion identifizierter Zellen.....	
2.2.2	Bildung von axonalen Bahnen im Gehirn.....	
<b>2.3</b>	<b>Die Bildung spezifischer Gewebe in der Mittellinie des Nervensystems von Insekten und Vertebraten.....</b>	<b>8</b>
2.3.1	Entstehung der dorso-ventralen Achse des Nervensystems und der Mittellinienzellen....	8
2.3.2	Die Entwicklung der mesektodermalen Zellen in der Mittellinie des Nervensystems von Insekten.....	9
<b>2.4</b>	<b>Neurogenetische Prozesse in den beiden Gehirnhemisphären.....</b>	<b>10</b>
2.4.1	Die Bildung von Neuroblasten im Neuroektoderm.....	10
2.4.2	Festlegung der Zellidentität durch asymmetrische Teilung von Vorläuferzellen bei Insekten.....	11
<b>2.5</b>	<b>Die Chemoaffinitätshypothese und das Prinzip der identifizierten Neuronen.....</b>	<b>11</b>
2.5.1	Die Chemoaffinitätshypothese.....	11
2.5.2	Das Prinzip der identifizierten Neuronen.....	12
<b>2.6</b>	<b>Die Axogenese im Nervensystem von Insekten.....</b>	<b>12</b>
2.6.1	Die Bildung axonaler Bahnen im Gehirn.....	12
2.6.2	Die Entwicklung von Kommissuren zwischen den beiden Hemisphären des Nervensystems.....	13
2.6.3	Identifizierte Neuronen als Pioniere von Kommissuren.....	14
2.6.4	Die Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn .....	15
<b>2.7</b>	<b>Entwicklungsprozesse im Gehirn von Heuschrecken.....</b>	<b>16</b>
2.7.1	Entwicklung der Region in der Mittellinie des Gehirns von Heuschrecken.....	16
2.7.2	Die Bildung des axonalen Grundgerüsts bei der Heuschrecke.....	17
2.7.3	Lazarillo, ein neuer Marker von Axonen in der frühembryonalen Entwicklung.....	18
2.7.4	Die Entwicklung identifizierter Neuronen im Gehirn.....	18
2.7.5	TERM-1-exprimierende Neuronen im Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i> .....	18
2.7.6	Die Pars Intercerebralis im Gehirn von Insekten.....	19
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiere.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Tierpräparation.....</b>	<b>21</b>
3.2.1	Präparation von Heuschreckenembryonen.....	21
3.2.2	Präparation des Gehirns von Larvenstadien und Imagines.....	21
<b>3.3</b>	<b>Einzelzellfärbungen.....</b>	<b>22</b>
3.3.1	Luzifer Yellow.....	22
3.3.2	DiI.....	22
<b>3.4</b>	<b>Immunhistochemische Färbungen.....</b>	<b>22</b>
3.4.1	Vibratonschnitte.....	23
3.4.2	Standardprotokoll für Immunhistochemie.....	23
3.4.3	Lazarillo Protokoll.....	23

3.4.4	Doppelfärbungen.....	24
3.4.5	Feinstrukturelle immunhistochemische Methoden .....	26
<b>3.5</b>	<b>Bromodeoxyuridin-Aufnahme.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6</b>	<b>Histologie.....</b>	<b>27</b>
3.6.1	Färbungen nach Wigglesworth.....	27
3.6.2	Cobalt-Rückfärbungen.....	27
<b>3.7</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie.....</b>	<b>27</b>
3.7.1	Simultanfixierung und Einbettung (Franke et al., 1969).....	27
3.7.2	LR-Withe Einbettung für Feinstrukturimmunhistochemie.....	28
<b>3.8</b>	<b>Lichtmikroskopie und Bildbearbeitung.....</b>	<b>28</b>
<b>3.9</b>	<b>Definition der neuronalen Achsen und Nomenklatur.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10</b>	<b>Liste der untersuchten Tiere.....</b>	<b>29</b>
<b>3.11</b>	<b>Chemikalien und Lösungen.....</b>	<b>30</b>
<b>3.12</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Die "median domain" in der Mittellinie des embryonalen Heuschreckengehirns.....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Die "median domain" als eigenständiger Cluster im Gehirn.....	33
4.1.2	Zellproliferation in der "median domain".....	34
4.1.3	Identifizierte Zellen in der "dorsal median domain".....	36
4.1.4	Neuronaler Charakter der Zellen in der "dorsal median domain".....	37
4.1.5	Abstammung der Zellen in der "dorsal median domain" .....	38
4.1.6	Morphogenetische Veränderungen der "median domain".....	40
<b>4.2</b>	<b>Die Entwicklung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i>.....</b>	<b>43</b>
4.2.1	Bildung von axonalen Bahnen im Nervensystem.....	43
4.2.2	Lazarillo-Expression in identifizierten Zellclustern.....	43
4.2.3	Vergleich der Lazarillo- und Meerrettichperoxidase-Expression im Gehirn.....	45
4.2.4	Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn.....	46
4.2.4.1	Axogenese in Cluster LaC 1.....	46
4.2.4.2	Axogenese in Cluster LaC 2.....	48
4.2.4.3	Axogenese in den Clustern LaC 3 bis LaC 7 .....	51
<b>4.3</b>	<b>Die Ontogenese der "primary commissure pioneers" (PCP).....</b>	<b>54</b>
4.3.1	Die Identifizierung der "primary commissure pioneers" in der "median domain".....	54
4.3.2	Identifizierung und Entwicklung der PCP Neuronen.....	55
4.3.3	Die embryonale Entwicklung der PCP Neuronen.....	58
4.3.4	Die postembryonale Entwicklung der PCP Neuronen.....	62
<b>4.4</b>	<b>Feinstrukturelle Untersuchung der PCP Neuronen.....</b>	<b>66</b>
4.4.1	Lokalisation des TERM-1 Antigens in den PCP Zellkörpern.....	66
4.4.2	Ultrastrukturimmunhistochemie.....	67
4.4.3	Die Ultrastruktur der PCP Neuronen.....	67
4.4.4	Die Cytoplasma/Nukleus Relationen in den Zellen der Mittellinie.....	68
4.4.5	Ultrastruktureller Vergleich der PCP Neuronen mit den "median neurosecretory cells".....	70
<b>4.5</b>	<b>Identifizierung eines Neuropeptides in den PCP Neuronen.....</b>	<b>72</b>

<b>4.6</b>	<b>Die Pars Intercerebralis im Gehirn von Insekten.....</b>	<b>75</b>
4.6.1	Die Organisation der Pars Intercerebralis im adulten Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i> .....	76
4.6.2	Identifikation einzelner Zelltypen in der Pars Intercerebralis des adulten Gehirns.....	76
4.6.3	Der Bau der Mittellinie im embryonalen Gehirn.....	77
4.6.4	Entstehung der adulten Pars Intercerebralis im anterior-ventralen Bereich der Mittellinie des embryonalen Gehirns.....	80
4.6.5	Vergleichende TERM-1-Immunoreaktivität bei verschiedenen Insekten.....	81
4.6.6	PCP homologe Zellen in der Pars Intercerebralis verschiedener Insekten.....	84
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Entwicklung der "median domain" im Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i>.....</b>	<b>91</b>
5.1.1	Die "median domain", ein neuer proliferierender Zellcluster in der Mittellinie des Gehirns.....	91
5.1.2	Abstammung identifizierter Zellen in der "dorsal median domain".....	93
5.1.3	Einzelzellfärbungen identifizierter Neuronen.....	93
<b>5.2</b>	<b>Die Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i>.....</b>	<b>94</b>
5.2.1	Axogenese im embryonalen Gehirn.....	94
5.2.2	Die Lazarillo-Expression im Gehirn.....	94
5.2.3	Die Entwicklung der "lateral cells" (LC).....	95
5.2.4	Beitrag der Lazarillo-exprimierenden Zellen zur Bildung des axonalen Grundgerüsts.....	95
5.2.5	Vergleich der Lazarillo- und Fasciclin 1-Expression.....	96
5.2.6	Schrittweise Entwicklung des axonalen Grundgerüsts.....	97
<b>5.3</b>	<b>Die Entwicklung der "primary commissure pioneers".....</b>	<b>98</b>
5.3.1	Immunhistochemisch identifizierbare Nervenzellen.....	98
5.3.2	Die Entwicklung der "primary commissure pioneers" im Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i> .....	98
5.3.3	Ultrastruktur der PCP Neuronen.....	100
5.3.4	Coexpression von TERM-1 mit Leukokinin-1 in den "primary commissure pioneers".....	100
<b>5.4</b>	<b>Die Entwicklung der Pars Intercerebralis.....</b>	<b>102</b>
5.4.1	Die Pars Intercerebralis im Gehirn von Insekten.....	102
5.4.2	Die Entwicklung der Pars Intercerebralis.....	102
5.4.3	TERM-1-Expression der "median neurosecretory cells" bei verschiedenen Insekten...	103
5.4.4	Homologie der "median neurosecretory cells".....	104
5.4.5	Homologie identifizierter Zellen auf der Basis immunhistochemischer Untersuchungen.....	104
5.4.6	Homologe Zellen zu den "primary commissure pioneers" (PCP) in der Pars Intercerebralis unterschiedlicher Insekten.....	105
5.4.7	Beschreibung möglicher PCP homologer Neuronen in der Literatur.....	106
5.4.8	Ein einheitlicher Grundbauplan für die Pars Intercerebralis bei Insekten.....	106
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
	Erklärung.....	119
	Dank.....	120
	Lebenslauf.....	121
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	122

## 1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit neuronalen Entwicklungsprozessen in der präoralen Mittellinie des Gehirns von *Schistocerca gregaria*. In dieser Region wird durch Pionierneuronen zum Beispiel die erste interhemispherische Kommissur des Gehirns etabliert. Daneben entstehen hier die "median neurosecretory cells", die das Gehirn mit den neurosekretorischen Organen Corpora cardiaca und Corpora allata verbinden.

In der frühen Embryonalentwicklung besteht die präorale Mittellinie des Gehirns aus der "median domain", die hier zum ersten Mal für hemimetabole Insekten beschrieben wird. Die "median domain", ist mit großer Wahrscheinlichkeit mesektodermaler Herkunft, ebenso wie die Zellen in der Mittellinie des ventralen Nervensystems. Sie wird durch Gliagrenzen von den benachbarten Gehirnregionen getrennt und lässt sich anhand von morphologischen Kriterien in eine "ventral median domain" und eine "dorsal median domain" unterteilen. Aus der "ventral median domain" entsteht im weiteren Verlauf der Entwicklung der mediane Ocellus. Die "dorsal median domain" enthält die individuell identifizierten "primary commissure pioneers", die "lateral cells" und den "median precursor" mit seinen Tochterzellen, die sich zu absteigenden Interneuronen entwickeln und zum Teil auch noch im adulten Gehirn identifiziert werden können. In der späten Embryonalentwicklung lösen sich durch morphogenetische Veränderungen des Gehirns die Gliagrenzen der "median domain" auf und sie fusioniert mit den benachbarten Gehirnbereichen der embryonalen Pars Intercerebralis, in der sich die beiden Cluster der "median neurosecretory cells" entwickeln. Auf diese Weise entsteht in der Mittellinie die Pars Intercerebralis des adulten Heuschreckengehirns und kann auf der Basis ihrer Entwicklung als Fusionsprodukt unabhängiger embryonaler Zellcluster definiert werden.

Die Ontogenese individuell identifizierbarer Zellen in der "dorsal median domain" wird im Detail für die "primary commissure pioneers" und die "lateral cells" beschrieben. Die "primary commissure pioneers" bilden sich bei circa 28% der Embryonalentwicklung direkt aus dem Ektoderm und etablieren die erste axonale Bahn zwischen den beiden Gehirnhemisphären. Ihre weitere embryonale und postembryonale Entwicklung wird anhand ihrer exklusiven TERM-1-Expression verfolgt. TERM-1-immunoreaktive Kollateralen der "primary commissure pioneers" innervieren im Lauf der Entwicklung umfangreiche Neuropilbereiche im Gehirn und im Bauchmark mit Ausnahme der Pilzkörper und lassen sich auch noch im adulten Gehirn eindeutig identifizieren. Damit wird zum ersten Mal die vollständige Ontogenese einer identifizierten Nervenzelle im Gehirn von Insekten beschrieben. Die Ultrastruktur der "primary commissure pioneers" und die Coexpression eines dem Neuropeptid Leukokinin-1 ähnlichen Stoffes geben Hinweise auf eine mögliche Funktion der Zellen. Die Lazarillo-exprimierenden "lateral cells", weitere identifizierte Zellen der "dorsal median domain", entstehen bei 28% der Embryonalentwicklung ebenfalls direkt aus dem Ektoderm und pionieren eine von der Mittellinie ausgehende laterale axonale Bahn. Ihre frühembryonale Entwicklung wird hier beschrieben.

Weitere Neuronen im frühembryonalen Gehirn, die das Anitgen Lazarillo exprimieren und an den Grenzen der großen proliferierenden Gehirnregionen wie Pars Intercerebralis, Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum liegen, sind an der Entstehung des primären axonalen Grundgerüsts beteiligt. Dieses axonale Grundgerüst bildet sich zwischen 27% und 40% der Embryonalentwicklung als Netz von Nervenbahnen, welche die einzelnen proliferierenden Regionen im Gehirn verbinden und später auswachsenden Axonen zur Orientierung dienen. Die bereits bei 27% einsetzende Lazarillo-Expression und die Entwicklung der Neuronen vermitteln Einsichten in die schrittweise Bildung des axonalen Grundgerüsts und beschreiben, wie sich orthogonal zueinander

gerichtete Bahnen im Gehirn bilden können.

Eine vergleichende Studie zur TERM-1-Expression bei Vertretern verschiedener Insektenordnungen zeigt, dass das Antigen mit einer Ausnahme immer von einer Teilpopulation der "median neurosecretory cells" exprimiert wird. Eine Besonderheit bilden die Wanderheuschrecken, bei denen auch die "primary commissure pioneers" TERM-1-immunoreaktiv sind. Gleichzeitig lassen sich über morphologische Merkmale bei allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Insekten vermutlich homologe Zellen zu den "primary commissure pioneers" in der Pars Intercerebralis zeigen. Die hier geschilderten Ergebnisse weisen damit darauf hin, dass die adulte Pars Intercerebralis bei Insekten nach einem einheitlichen Grundbauplan aufgebaut ist beziehungsweise sich von einem gemeinsamen Grundbauplan ableitet.

## 2 Einleitung

Bei dem größten Teil der Bilateria, wie zum Beispiel den Plathelminthes, den Articulata oder den Vertebraten ist das zentrale Nervensystem bilateral symmetrisch gebaut und besteht aus einem anterior im Körper gelegenen Gehirn und einem daran anschließenden ventralen Nervensystem (Invertebraten) oder Rückenmark (Vertebraten). Die beiden bilateral symmetrischen Hälften des Nervensystems werden durch Kommissuren, aufeinander folgende Bereiche durch Konnektive verbunden. Für die Entwicklung der Kommissuren und Konnektive ist dabei die Mittellinie des Gehirns von besonderem Interesse, da einerseits kommissurale Axone die Mittellinie überqueren müssen um ihre Zielbereiche zu finden, andererseits bei longitudinalen Fasern in den Konnektiven verhindert werden muss, dass sie die Mittellinie überqueren, auch wenn sie über lange Strecken parallel zu ihr wachsen. Bei den meisten Tiergruppen gibt es deshalb in der Mittellinie des Nervensystems besondere Zelltypen und Gewebe, die an der Kontrolle solcher Wegfindungsprozesse beteiligt sind (Tessier-Lavigne et al., 1988; Jessel et al., 1989; Klämbt et al., 1991; Goodman und Doe, 1993; Younossi-Hartenstein et al., 1997; Dumstrei et al., 1998; Zinn und Sun, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit werden am Modellorganismus Heuschrecke Aspekte zur frühembryonalen Bildung des Nervensystems und der Entwicklung identifizierter Nervenzellen im Bereich der präoralen Mittellinie des Gehirns untersucht.

### 2.1 Modellorganismen in der Entwicklungsneurobiologie

Die Entstehung des Nervensystems wird heute vor allem an folgenden Modellorganismen untersucht: *C. elegans*, *D. melanogaster*, Wanderheuschrecke, Zebrafisch, Krallenfrosch, Maus. An Amphibien sind die ersten grundlegenden Arbeiten zur Induktion des Nervensystems durchgeführt worden und aufgrund der Regenerationsfähigkeit ihres Nervensystems fanden eingehende Untersuchungen zur Entwicklung axonaler Bahnen, z. B. zwischen Auge und Gehirn, statt (Holt und Harris, 1993; Nakamoto et al., 1996). *C. elegans*, *D. melanogaster* und Maus sowie in zunehmendem Maße auch Zebrafische eignen sich durch die große Zahl von verfügbaren Mutanten gut zur Analyse genetischer Steuermechanismen der neuronalen Entwicklung. Heuschrecken sind dagegen wegen der Größe ihrer Embryonen, der Geschwindigkeit ihrer Entwicklung und der Zugänglichkeit ihres Nervensystems ideale Modellorganismen zur Analyse von Abstammungslinien neuronaler Vorläuferzellen und der Entwicklung einzelner, identifizierter Neuronen.

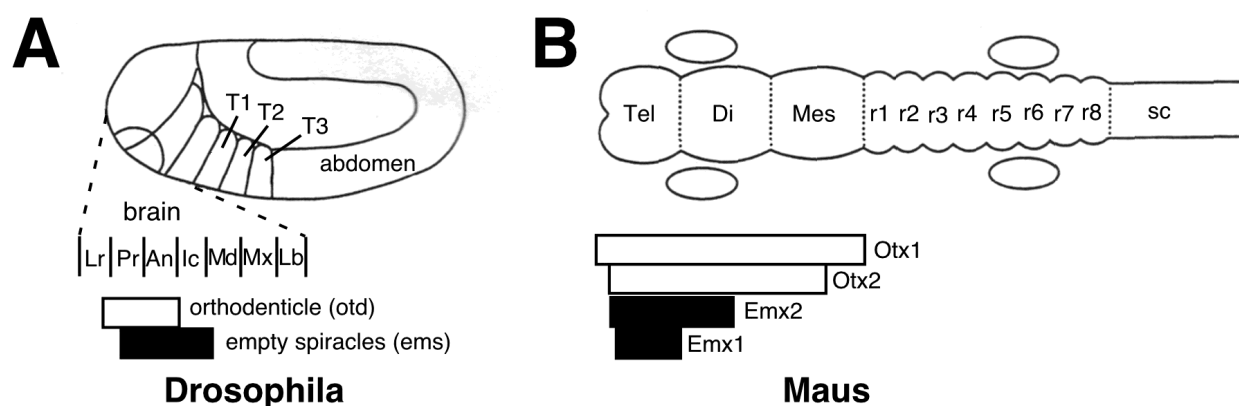
Grundsätzlich finden in allen hier genannten Organismen bei der Entstehung des Nervensystems vergleichbare Entwicklungsprozesse statt. Unter genetischer Kontrolle werden in den ersten Entwicklungsstadien die anterior-posteriore und die dorso-ventrale Achse des Embryo festgelegt und damit auch die Orientierung des Nervensystems (Puelles und Rubinstein et al., 1993; Finkelstein und Boncinelli, 1994; Francois et al., 1994; de Robertis und Sasai, 1996). Im Blastulastadium differenziert sich aus einem Teil des Ektoderms das Neuroektoderm, in dem wiederum aus einem zu Beginn homogenen Gewebe die neuronalen Vorläuferzellen entstehen. Diese neuronalen Vorläuferzellen bilden im weiteren Verlauf der Entwicklung durch differentielle Teilung Nervenzellen und Glia. Die auswachsenden Axone der Nervenzellen bilden dann über synaptische Verbindungen mit anderen Zellen das funktionelle Gerüst des Nervensystems.



## 2.2 Die Bildung des Gehirns bei Vertebraten und Invertebraten

Sowohl morphologische Aspekte der neuronalen Entwicklung wie auch die zugrunde liegenden genetischen Steuermechanismen weisen darauf hin, dass das Nervensystem bei Invertebraten und Vertebraten nach den gleichen Entwicklungsprinzipien entsteht. Ergebnisse, die für eine Tiergruppe erzielt wurden, können damit häufig auf andere Tiergruppen übertragen werden. Das ermöglicht es, Zusammenhänge zu entschlüsseln, die an einem einzelnen Modellorganismus nicht geklärt werden könnten. Ein solches Beispiel für die Übertragbarkeit von Ergebnissen ist die Kontrolle der Bildung des Gehirns von Vertebraten und Invertebraten durch homologe Gensysteme.

Das Gehirn von Insekten besteht aus den 3 Neuromeren, Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum und ist mit dem ventralen Nervensystem über die beiden Schlundkonnektive verbunden. Mutantenanalysen bei *D. melanogaster* zeigen, dass die HOM-C Gene *orthodenticle* (*otd*) und *empty spiracles* (*ems*) an der Kontrolle der Bildung der Gehirnneuromeren beteiligt sind (Holland et al., 1992; Finkelstein und Bonicelli, 1994; Hirth et al., 1995). *Otd* wird im Protocerebrum und im anterioren Bereich des Deutocerebrums exprimiert (Abb. IA), während die *ems*-Expression auf das Deutocerebrum und das Tritocerebrum beschränkt ist. In *otd*-Mutanten fehlen Teile oder das gesamte Protocerebrum, während es bei *ems*-Mutationen zu einem mehr oder minder vollständigen Ausfall von Deuto- und Tritocerebrum kommt (Hirth et al., 1995; Reichert und Boyan, 1997). Zu *otd* und *ems* homologe Gene (*Otx1* und 2; *Emx1* und 2) wurden auch bei verschiedenen Vertebraten, unter anderem bei Zebrafisch, Maus und Mensch, beschrieben (Holland et al., 1992). Ihr Expressionsmuster im embryonalen Gehirn der Maus (Abb. IB) ähnelt in erstaunlicher Weise dem Expressionsmuster bei *Drosophila* (Abb. IA). Weitere homologe HOM-C und Hox Gene zeigen ebenfalls Übereinstimmungen in ihrem Expressionsmuster in den weiter posterior liegenden Segmenten von *Drosophila* bzw. den Rhombomeren bei der Maus (Holland et al., 1992). Darüber hinaus weisen Studien bei Mausmutanten, welche die Gene *Otx1* und *Emx1* und 2 betreffen, darauf hin (Finkelstein und Bonicelli, 1994), dass auch sie an der Kontrolle der Gehirnentwicklung beteiligt sind.



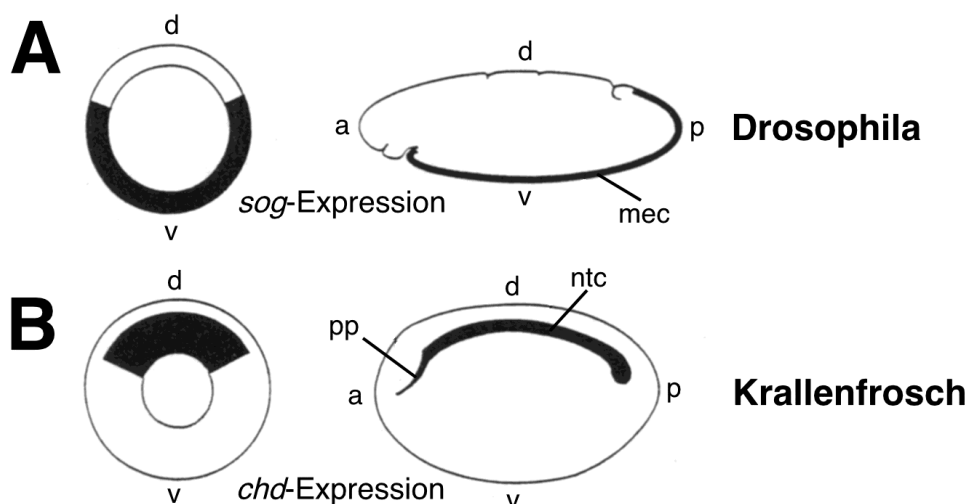
**Abb. I:** Die Bildung des Gehirns wird bei Insekten (**A**, *Drosophila*) und Vertebraten (**B**, Maus) durch homologe Gene reguliert. Die Querschnitte in A und B zeigen jeweils die segmentale Gliederung des frühembryonalen Nervensystems. *Drosophila*: Labrum (Lr), Präantennalsegment (Pr), Antennalsegment (An), Intercalarsegment (Ic), Mandibularsegment (Md), Maxillarsegment (Mx), Labialsegment (Lb), Thorakalsegmente (T1-3). Maus: Telencephalon (Tel), Diencephalon (Di), Mesencephalon (Mes), Rhombomere (r1-8), Rückenmark (sc). Die darunter angeordneten Balken beschreiben die Expression von *otd/ems* und *Otx/Emx* im Gehirn von *Drosophila* und Maus. (Verändert nach Holland et al., 1992).

## 2.3 Die Bildung spezifischer Gewebe in der Mittellinie des Nervensystems von Insekten und Vertebraten

### 2.3.1 Entstehung der dorso-ventralen Achse des Nervensystems und der Mittellinienzellen

Ein weiteres bei Insekten und Vertebraten übereinstimmendes Gensystem mit den homologen Genen *dpp/BMP-4* (Insekten) und *sog/chd* (Vertebraten) ist an der Ausbildung der dorso-ventralen Achse und an der Entstehung des Nervensystems ventral respektive dorsal im Körper beteiligt (Francois et al., 1994, Liem et al., 1995; deRobertis und Sasai, 1996; Tanabe und Jessel, 1996). Diese Beobachtung scheint die bereits 1822 von E. Geoffroy Saint-Hillaire postulierte Hypothese zu bestätigen, dass die Ventralseite von Insekten homolog zur Dorsalseite von Vertebraten ist (deRobertis und Sasai, 1996). Von besonderem Interesse aus neurobiologischer Sicht sind die Gene *sog* (*short gastrulation*) und *chd* (*chordin*), die jeweils die Bildung der Körperseite, in der das Nervensystem entsteht, kontrollieren (Abb. II). *Dpp* (*decapentaplegic*) bei Insekten und *BMP-4* (*bone morphogenic protein 4*) bei Vertebraten werden auf der jeweils gegenüberliegenden Seite exprimiert und sind Antagonisten zu *sog* und *chd*.

*Sog* wird in Embryonen von *Drosophila* zuerst im unteren, ventralen Teil (ca. 60%) der Blastula exprimiert (deRobertis und Sasai, 1996) und kontrolliert dabei die Induktion von Neuroektoderm und Mesoderm (Abb. III). In der weiteren Entwicklung verschwindet dann die Expression im Mesoderm und *sog* wird nur noch im Neuroektoderm exprimiert (vgl. Abb. III). In späteren Embryonalstadien ist die *sog*-Expression ausschließlich auf die mesektodermalen Zellen in der Mittellinie des Nervensystems beschränkt, die sich an der Grenze zwischen Neuroektoderm und Mesoderm gebildet haben (Abb. IIA und III, Francois et al., 1994). Die mesektodermale Mittellinie im Nervensystem von Insekten besteht nun aus zwei parallelen Streifen von Vorläuferzellen (Goodman und Doe, 1993; Dumstrei et al., 1998).

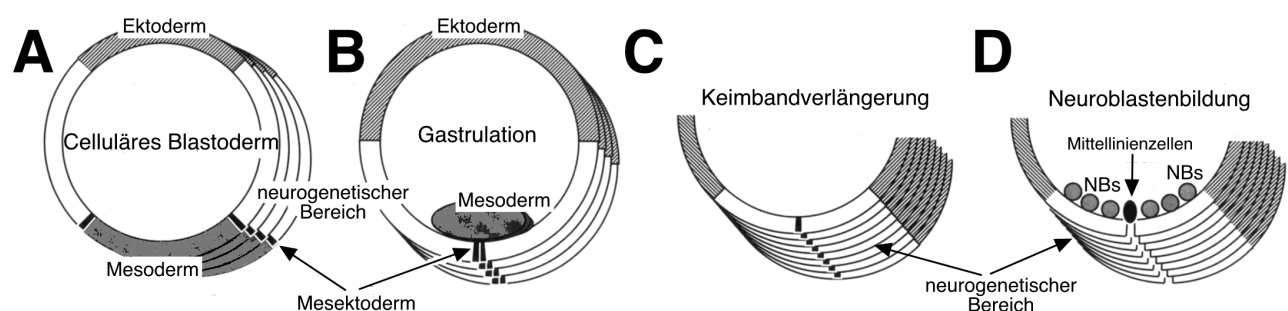


**Abb. II:** Homologe Gene sind an der Bildung des Nervensystems von Insekten und Vertebraten beteiligt. **A:** *Short gastrulation* (*sog*) wird vor der Gastrulation in Embryonen von *Drosophila* in der ventralen Körperhälfte exprimiert (Querschnitt links). In der Neurogenese beschränkt sich die *sog*-Expression dann auf das Mesektoderm (mec) der Mittellinie (Längsschnitt rechts). **B:** Bei *Xenopus* beobachtet man eine dorso-ventral vertauschte Expression des *sog*-homologen Gens *chordin* (*chd*) vor und während der Gastrulation. Mit Beginn der Neurogenese reduziert sich die *chd*-Expression auf das Mesoderm in der Mittellinie des Gehirns (prächordale Platte, pp) und auf das Notochord (ntc). Die angegebenen Achsen sind anterior (a), dorsal (d), posterior (p) und ventral (v). (Nach deRobertis und Sasai, 1996).

In ähnlicher Weise verändert sich die Expression des homologen *chd*-Gens in *Xenopus* Embryonen. Beobachtet man sie zuerst in einem breiten Streifen auf der Dorsalseite des Embryos, so ist sie in späteren Stadien auf die mesodermalen Zellen in der Mittellinie des Gehirns und auf das Notocord beschränkt (Abb. IIIB). Wie oben bereits angedeutet wurde, sind die Zellen in der Mittellinie des Nervensystems von besonderer Bedeutung bei der Bildung kommissuraler und longitudinaler Fasern im Nervensystem. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Bildung der Mittellinienzellen bei Insekten und Vertebraten von homologen Genen gesteuert wird.

### 2.3.2 Die Entwicklung der mesektodermalen Zellen in der Mittellinie des Nervensystems von Insekten

Die mesektodermalen Zellen der Mittellinie des Nervensystems, die in einem Streifen vom Gehirn ausgehend das gesamte Nervensystem durchziehen, durchlaufen ein anderes Schicksal als die Neuroblasten der beiden Hemisphären (Klämbt et al., 1991; Nambu et al., 1991; Sonnenfeld und Jacobs, 1994; Bossing und Technau, 1994). Während die Neuroblasten aus einem Gewebeverband heraus ins Innere invaginieren, wandern die mesektodermalen Zellen erst später als einheitliche Gruppe ein und hinterlassen eine Lücke, die von epidermalen Zellen geschlossen wird (Abb III, Goodman und Doe, 1993; Dumstrei et al., 1998). Im Gegensatz zu Neuroblasten, die über Gangliumutterzellen Neuronen bilden, teilen sich mesektodermale Zellen nur einmal mit einer parallel zur Körperoberfläche gerichteten Zellteilungsachse. Man spricht hier deshalb auch nicht von Neuroblasten sondern von Vorläufer- oder Precursorzellen. Während die mesektodermale Mittellinie in den Ganglien des ventralen Nervensystems relativ einfach aus je vier Precursorzellen in zwei Reihen aufgebaut ist (Goodman und Doe, 1993), besteht sie im Gehirn aus deutlich komplexeren Zellgruppen. Untypische neuroektodermale Zellen, die die genannten Kriterien für mesektodermale Zellen erfüllen und von Dumstrei et al. (1998) als "head midline cells" bezeichnet wurden, finden sich im Gehirn von *Drosophila* in der Anlage des stomatogastrischen Nervensystems (vgl. Hartenstein et al., 1994) ebenso wie in der "dorsomedial domain" und "ventromedial domain" in der Mittellinie zwischen den beiden Gehirnhemisphären.



**Abb. III:** Die Entwicklung der neurogenetischen Region und der mesektodermalen Mittellinie. **A:** Während des Blastodermstadiums sind die neurogenetischen Bereiche (weiß) in der Mittellinie durch das Mesoderm (schwarz) und die beiden Streifen des Mesektoderms getrennt. **B:** In der Gastrulation wandert das Mesoderm ins Innere des Embryos und das Mesektoderm bildet nun die ventrale Mittellinie. **C** und **D:** Nach der Verlängerung des Keimstreifens wandern in der Neurogenese zuerst die entstehenden Neuroblasten (NBs), gefolgt von den Mittellinienzellen, ins Innere des Embryos. Das Nervensystem beginnt sich zu formen. (Nach Goodman und Doe, 1993).

Die Entwicklung der Mittellinienzellen steht bei Insekten unter der Kontrolle des Gens *single minded* (*sim*, Crews et al., 1988; Nambu et al., 1990 und 1991). In *sim* Mutanten fehlen z. B. die Mittellinienzellen völlig. Das hat zur Folge, dass kommissurale Fasern nicht mehr in der Lage sind die Mittellinie zu überqueren und gleichzeitig die parallel laufenden Konnektive in der Mittellinie fusionieren (Thomas et al., 1988; Nambu et al., 1991; Reichert und Boyan, 1997). Durch eine Überexpression von *sim* entstehen dagegen zu viele mesektodermale Zellen in der Mittellinie. Weitere Gene wie *slit* und *spitz*, die in der Mittellinie exprimiert werden, sind ebenfalls an der Kontrolle der Bildung von Kommissuren und Konnektiven beteiligt (Golembo et al., 1996; Zinn und Sun, 1999). Auch bei Vertebraten besteht die Mittellinie des Nervensystems aus besonderen Gewebe- und Zelltypen (Jessel et al., 1989; Klämbt et al., 1991). Dazu gehört zum Beispiel die Bodenplatte, die sich auf der Ventralseite des Rückenmarks bildet (Placzek et al., 1991; Tanabe und Jessel, 1996). Einen Einfluss auf die koordinierte Entwicklung des Nervensystems hat auch das mesodermale Notochord, das direkt ventral der Bodenplatte entsteht und, wie oben beschrieben, *chordin* exprimiert. Experimente zur Verpflanzung und Ablation des Notochords zeigen seinen Einfluss auf die Axogenese im Nervensystem (Korzh, 1994). Zwar wird die grundsätzliche Entwicklung der Mittellinie durch homologe Gene reguliert, aber in welcher Form die weitere Entwicklung der Mittellinienzellen bei Vertebraten mit der von Insekten übereinstimmt, ist bisher erst in Ansätzen bearbeitet worden. Erste Hinweise wie die Expression eines zu *Drosophila* homologen *slit* Gens in der Bodenplatte des Rückenmarks, das ebenfalls an der Bildung von Kommissuren und Konnektiven beteiligt ist (Zinn und Sun, 1999), deuten aber auch hier auf Gemeinsamkeiten hin.

## 2.4 Neurogenetische Prozesse in den beiden Gehirnhemisphären

### 2.4.1 Die Bildung von Neuroblasten im Neuroektoderm

Parallel zur Entwicklung der Mittellinienzellen entstehen in den beiden Hemisphären unter der Kontrolle spezifischer Entwicklungsgene die Neuroblasten, die durch differentielle Teilung dann ihre Tochterzellen bilden.

Während der Neurogenese delaminieren aus dem Neuroektoderm die Neuroblasten und bilden im weiteren Verlauf der Entwicklung die beiden Hemiganglien jedes Segments bzw. die Gehirnhemisphären (Abb. III, Campos-Ortega und Hartenstein; 1985, Klämbt et al., 1991; Goodman und Doe, 1993). Die Bildung und Differenzierung der Neuroblasten steht unter der Kontrolle unterschiedlicher Entwicklungsgene. Paar-Regel-Gene und Segment-Polaritätsgene legen in dem zu Beginn der Neurogenese noch einheitlichen Neuroektoderm die Lage und die Identität von Neuroblasten fest. Unter dem Einfluss der proneuralen Gene aus dem Achaete-Scute-Komplex differenzieren sich anschließend die einzelnen Neuroblasten. Segment-Polaritätsgene wie *gooseberry* (*gsb*) und *wingless* (*wg*) definieren dabei die Identität der Neuroblasten, z. B. in den Reihen 4 bis 6 eines jeden Segments (Zhang et al., 1994; Skeath et al., 1995; Doe und Skeath, 1996). Durch laterale Inhibition, vermittelt durch neurogenetische Gene wie *delta* und *notch* (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Chitins et al., 1995; Ma et al., 1996), unterdrücken die entstandenen Neuroblasten die Bildung weitere Vorläuferzellen in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft. Die restlichen vorhandenen Zellen differenzieren sich dann zu epidermalen Zellen. Anschließend beginnen die Neuroblasten mit der Zellteilung und erzeugen in der Regel durch asymmetrische Teilungen über Gangliennutterzellen, die sich wiederum symmetrisch teilen, eine definierte Anzahl von Neuronen und Gliazellen.

### 2.4.2 Festlegung der Zellidentität durch asymmetrische Teilung von Vorläuferzellen bei Insekten

Nachdem sich in der frühen Neurogenese sowohl die mesektodermalen Mittellinienzellen wie auch die Neuroblasten differenziert haben und ihre Identität festgelegt wurde (Goodman und Doe, 1993; Doe und Skeath, 1996), erzeugen sie nach einem vorgegebenen Muster eine definierte Anzahl von Neuronen und Gliazellen. Es handelt sich dabei meist um Zellen, besonders bei den gebildeten Neuronen, mit einer bereits festgelegten Identität. Zerstört man etwa nach einem definierten Entwicklungszeitpunkt einen Neuroblasten, so fehlen in der weiteren Entwicklung auch die von ihm normalerweise gebildeten Neuronen (Goodman et al., 1984; Doe und Goodman, 1985b).

Neuroblasten können während ihrer Entwicklung sowohl Neuronen als auch Gliazellen bilden. Das wurde etwa von Condron und Zinn (1994) für den DUM Neuroblasten ("dorsal unpaired median") in der Mittellinie der segmentalen Ganglien gezeigt. Unter der Kontrolle des *engrailed* Gens entstehen sowohl Gliazellen und Neuronen. Dagegen handelt es sich bei den beiden Tochterzellen der Mittellinien-Precursorzellen entweder um Gliazellen oder Neuronen (Jacobs et al., 1989; Bossing und Technau, 1993; Udolph et al., 1993).

Im Allgemeinen wird die Bildung von Gliazellen durch die beiden gliaspezifischen Gene *repo* (*reversed potential*) und *gcm* (*glia cells missing*) reguliert (Halter et al., 1995; Jones et al., 1995).

Ein Hinweis, wie aus den beiden scheinbar identischen Tochterzellen eines Precursors oder einer Ganglienmutterzelle zwei unterschiedliche Nervenzellen entstehen können, ergibt sich aus der asymmetrischen Verteilung der Genprodukte von *numb* und *prospero* in den beiden Tochterzellen des Vorläufers (Hirata et al., 1995; Doe und Skeath, 1996; Zhong et al., 1996).

Ein weiteres Beispiel beschreibt die Expression von *huckebein* (*hkb*) in den Neuroblasten 4-2 (NB4-2) in den segmentalen Ganglien des zentralen Nervensystems von *Drosophila* (Chu-LaGraff et al., 1995). In *hkb*-Mutanten verändert sich das Expressionsmuster der ersten gebildeten Ganglienmutterzelle (GMC) und der von ihr gebildeten Tochterzellen. Sie exprimieren nicht wie im Wildtyp *even-skipped*. Wird *hkb* überexprimiert, so bildet NB 4-2 nicht mehr den normalen Satz an Tochterzellen, sondern erzeugt in aufeinander folgenden Teilungen nur noch identische GMC und deren Tochterzellen. Es kommt damit zu einer Vervielfachung identischer Zellen.

## 2.5 Die Chemoaffinitätshypothese und das Prinzip der identifizierten Neuronen

Mit der Bildung von Nervenzellen setzt auch der Prozess der Axogenese ein. Die auswachsenden Axone von Nervenzellen müssen sich den Weg zu ihren Zielregionen suchen und erzeugen so ein rasch wachsendes Netzwerk von Faserbündeln und synaptischen Verbindungen, aus dem sich das funktionsfähige Nervensystem entwickelt. Zwei Hypothesen haben das Verständnis dieser Entwicklungsprozesse entscheidend beeinflusst. Das ist zum einen die Chemoaffinitätshypothese von Sperry (1963) und die Idee der individuell identifizierbaren Zelle (Hoyle, 1977; Burrows 1996).

### 2.5.1 Die Chemoaffinitätshypothese

Sperry und seine Mitarbeiter entdeckten, dass Ganglienzellen der Retina nach Läsionen mit hoher Präzision ihre Zielgebiete im optischen Tectum wiederfanden. Auch wenn Teile der Retina entfernt wurden, konnten die verbleibenden, neu auswachsenden Neuronen ebenfalls ihr Ziel wieder erreichen. Diese Beobachtung führte zur Aufstellung der Chemoaffinitätshypothese (Sperry, 1963). Danach sollten sich die auswachsenden Axone an Markermolekülen und chemischen Gradienten

orientieren, um ihr exaktes Zielgebiet zu finden. Bis heute wurden eine große Zahl solcher molekularer Marker und chemischer Gradienten im Nervensystem von Vertebraten und Invertebraten entdeckt und ihr Einfluss auf die Wegfindung von Axonen beschrieben (z. B. Dodd und Jessel, 1988; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Serafini et al., 1996).

### **2.5.2 Das Prinzip der identifizierten Neuronen**

Identifizierte Neuronen sind Zellen, die anhand ihrer charakteristischen morphologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften in unterschiedlichen Präparationen immer wieder erkannt werden können (Hoyle, 1977; Burrows 1996). Das gilt sowohl für ausdifferenzierte Neuronen im imaginalen Nervensystem ebenso wie für embryonale Zellen (Goodman et al., 1979b; Evans und Cournil, 1990). Besonders die Möglichkeit einzelne Zellen über Mikroelektroden mit speziellen Farbstoffen (Luzifer Yellow, DiI) zu füllen (Bacon und Tyrer, 1978; Krauthammer, 1985; Bossing und Technau, 1994; Chu-LaGriff et al., 1995) und die Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen spezifische Moleküle (Raabe, 1989; Nässel et al., 1992; Nässel, 1993; Lundquist et al., 1998) haben viel zum Verständnis der Entwicklung und Funktion individuell identifizierbarer Zellen beigetragen. Eine Voraussetzung für Studien an identifizierten Neuronen ist allerdings die Auswahl eines geeigneten Modellorganismus wie zum Beispiel die Heuschrecke. Sie besitzt große und auch in der Embryonalentwicklung leicht zugängliche Neuronen. Die Taufliege *Drosophila* ist einerseits wegen ihrer genetischen Möglichkeiten bei der Erzeugung von Mutanten, der Klonierung von Genen und spezieller Zellabstammungstechniken (enhancer-trap lines, green fluorescent protein) in idealer Weise geeignet Kontrollmechanismen und die genetische Steuerung der neuronalen Entwicklung zu untersuchen. Ihre geringe Größe und die schlechte Zugänglichkeit des Nervensystems machen es aber oft unmöglich die Entwicklung identifizierter Neuronen zu verfolgen. Besonders das Gehirn von *Drosophila*embryonen entzieht sich aufgrund der komplizierten Invaginationsprozesse (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985) bisher weitgehend einer Untersuchung auf Einzelzellebene. Da in der Evolution des Nervensystems von Insekten aber viele Zellen und Entwicklungsprozesse konserviert sind (Goodman und Doe, 1993), können Erkenntnisse, die am leichter zugänglichen embryonalen Gehirn von Heuschrecken gewonnen wurden, oft auf *Drosophila* übertragen werden. Das ist auch für die genetischen Prozesse in umgekehrter Richtung möglich. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die in der vorliegenden Arbeit für die Entwicklung der präoralen Mittellinie des Heuschreckengehirns beschriebenen Prozesse auch für andere Insekten gültig sind.

## **2.6 Die Axogenese im Nervensystem von Insekten**

Die erste Hälfte der Einleitung beschreibt allgemeine Prozesse der neuronalen Entwicklung und die zugehörigen genetischen Kontrollmechanismen, die bei *Drosophila* entdeckt wurden. In den folgenden Kapiteln sollen nun ausgewählte Aspekte zur Axogenese bei Insekten und Vertebraten vorgestellt werden. Es wird gezeigt, in welcher Weise Untersuchungen an Heuschreckenembryonen zum Verständnis der neuronalen Entwicklung beitragen können.

### **2.6.1 Die Bildung axonaler Bahnen im Gehirn**

Eine Voraussetzung für angepasstes Verhalten bei Tieren mit einem bilateralsymmetrischen Nervensystem ist die richtige Koordination der neuronalen Aktivität in beiden Hälften des Gehirns. Diese Koordination wird durch Axone vermittelt, die über Kommissuren zur kontralateralen Seite des Nervensystems wachsen und dort synaptische Verbindungen knüpfen. Die zellulären und

molekularen Mechanismen, die es Axonen ermöglichen die Mittellinie zu überqueren, bzw. die dies verhindern, sind deshalb Inhalt intensiver Forschung über die Entwicklung des Gehirns bei Invertebraten und Vertebraten (Silver et al. 1982; Rothberg et al., 1990; Klämbt et al., 1991; Nambu et al., 1991; Goodman und Shatz, 1993; Seeger et al., 1993; Kennedy et al., 1994; Therianos et al., 1995; Tear et al., 1996; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Hartmann und Reichert, 1998).

Daneben ist die Bildung eines ersten axonalen Gerüsts ein Schlüsselereignis in der Entwicklung des frühen embryonalen Gehirns sowohl bei Insekten (Boyan et al., 1995a; Therianos et al., 1995; Younossi-Hartenstein et al., 1996; Reichert und Boyan 1997; Nassif et al., 1998) als auch bei Vertebraten (Silver et al., 1982; Wilson et al., 1990; Easter et al., 1993; Goodman und Shatz, 1993). Wie oben beschrieben ist bereits einiges über die Neurogenese (Zacharias et al., 1993; Goodman und Doe, 1993; Younossi-Hartenstein et al., 1996; Boyan und Williams, 1997; Dumstrei et al., 1998) und über molekulargenetische Prozesse (Finkelstein und Perrimon, 1991; Schmidt-Ott und Technau, 1992; Goodman und Doe, 1993; Finkelstein und Boncinelli, 1994; Schmidt-Ott et al., 1994; Hirth et al., 1995; Younossi-Hartenstein et al., 1997; Leuzinger et al., 1998; Hartmann und Reichert, 1998; Hirth et al., 1998) im Insektengehirn bekannt. Dagegen gibt es noch relativ wenige Erkenntnisse darüber, nach welchen Mechanismen die Abkömmlinge der Vorläuferzellen im Gehirn das komplexe System der axonalen Bahnen erzeugen (Boyan et al., 1993, 1995a; Therianos et al., 1995; Boyan und Williams, 1997; Nassif et al., 1998).

### 2.6.2 Die Entwicklung von Kommissuren zwischen den beiden Hemisphären des Nervensystems

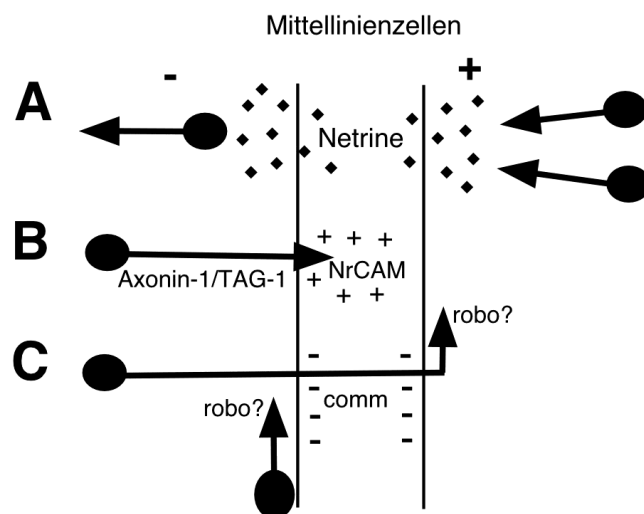
Die Bildung der Mittellinie des Nervensystems wird, wie bereits gezeigt wurde, bei Insekten und Vertebraten von homologen Genen (*sog* und *chd*) kontrolliert und besteht bei Insekten aus mesektodermalen Zellen. Die entstehenden Mittellinienzellen fungieren als Wegweiserzellen für Axone aus den beiden Gehirnhemisphären. Sowohl bei *C. elegans*, *Drosophila* und Maus exprimieren sie jeweils mindestens ein Gen aus der Familie der Netrine (Serafini et al., 1994 und 1996; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Das Expressionsprodukt bildet einen chemischen Gradienten, der Wachstumskegel von auswachsenden Axonen zur Mittellinie leitet (Abb. IV). Diese Beobachtung bestätigt die Chemoaffinitätshypothese von Sperry (1963). Welche Faktoren später darüber entscheiden, welche der vorhandenen Fasern die Mittellinie tatsächlich überqueren dürfen um Kommissuren zu bilden und welche nicht, scheint bei den einzelnen Arten nach unterschiedlichen Mechanismen reguliert zu werden.

Für *Drosophila* sind zwei Mutanten bekannt, die Defekte bei der Bildung von Kommissuren aufweisen. Bei *commissureless*-Mutanten (*comm*) entstehen überhaupt keine Kommissuren, während Mutationen des *roundabout*-Gens (*robo*) dazu führen, dass viele Axone die Mittellinie überqueren, die eigentlich longitudinale Fasern bilden sollten (Goodman und Shatz, 1993; Hirth et al., 1995; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Da *robo* für ein Transmembranprotein kodiert, könnte es Teil eines Abstoßungsmechanismus für Axone an der Mittellinie sein (Abb. IV, Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

Ähnliche Phänotypen wie *robo*-Mutanten kennt man auch von Zebrafisch (*cyclops*-Mutanten) und Maus (*Danforth short tail*-Mutanten), bei denen Teile oder das gesamte Notochord fehlen und damit der Aufbau von Nervenfasern gestört ist. Interessanterweise exprimiert das Notochord das Vertebratenhomologon *chd* zum Gen *sog* aus den mesektodermalen Zellen der Mittellinie von Insekten (Goodman und Shatz, 1993).

Versuche an Hühnerembryonen zeigen, wie einzelne Axone über die Mittellinie geleitet werden können (Stoeckli, 1997; Chien, 1998). Zellen, die die Gene *Axogenin-1* und *TAG-1* in ihren Wachstumskegeln exprimieren, interagieren mit NrCAM exprimierenden Zellen der Bodenplatte in der Mittellinie und überqueren dieselbe. Blockt man NrCAM, so wachsen circa 50% der Axogenin-1-exprimierenden Axone ipsilateral entlang der Mittellinie.

Ein weiteres interessantes Beispiel bei Hamsterembryonen zeigt, wie sich das Expressionsmuster verschiedener molekularer Marker in der extrazellulären Matrix der präoralen Mittellinie des Gehirns verändert, während sich die anteriore Kommissur bildet (Pires-Neto et al., 1998). Die Autoren beschreiben dieses Phänomen als Bildung eines molekularen Tunnels für die auswachsenden Axone der beiden Hemisphären. Allerdings müssen experimentelle Manipulationen noch zeigen, in welcher Weise einzelne Moleküle der extrazellulären Matrix mit den Axonen interagieren und diese leiten.



**Abb IV:** Axonale Wegfindung an der Mittellinie des Nervensystems. **A:** Von den Mittellinienzellen des Nervensystems von *C. elegans*, *Drosophila* und Maus werden Netrine exprimiert, die als diffundierende Moleküle einen chemischen Gradienten erzeugen und eine sowohl anziehende als auch abstoßende Wirkung auf auswachsende Axone haben können. **B:** Neuronen von Hühnerembryonen, die in ihren Axonen *Axogenin-1* und *TAG-1* exprimieren, dürfen, vermittelt durch NrCAM (Nr-Zelladhensionsmolekül), die Mittellinie überqueren. Fehlt eines dieser Gene, dann biegen die Wachstumskegel bereits vor der Mittellinie ab. **C:** Im Zusammenspiel der Gene *robo* (*roundabout*) und *comm* (*commisureless*) ist es einigen Axonen erlaubt, die Mittellinie zu überqueren, während andere abgestoßen werden. Welche weitere Substanz (markiert durch das Fragezeichen) beteiligt ist, konnte bisher nicht geklärt werden. (Verändert nach Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

### 2.6.3 Identifizierte Neuronen als Pioniere von Kommissuren

In keiner der in den vorangegangenen Kapiteln genannten Arbeiten konnte gezeigt werden, in welcher Weise einzelne, nach Möglichkeit identifizierbare Neuronen an der Bildung einer Kommissur beteiligt sind. Zwei solcher Beispiele sind von der Heuschrecke bekannt. Boyan et al. (1995a) beschreiben Pioniere ("primary commissure pioneers"), welche in der frühen Embryonalentwicklung die erste präorale Kommissur im Heuschreckengehirn etablieren. Interessanterweise bleiben einige wenige Fasern in der präoralen Kommissur von *commisureless*-Mutanten bei *Drosophila* bestehen (Reichert und Boyan, 1997). Vermutlich handelt es sich dabei unter anderem um *Drosophila* Homologe der "primary commissure pioneers" (Boyan, pers. Mitteilung). Durch welche Mechanismen die "primary commissure pioneers" den Weg über die Mittellinie finden ist allerdings noch nicht bekannt.

Daneben gibt es die von Sanchez et al. (1995) untersuchten "anterior commissure pioneers" in den

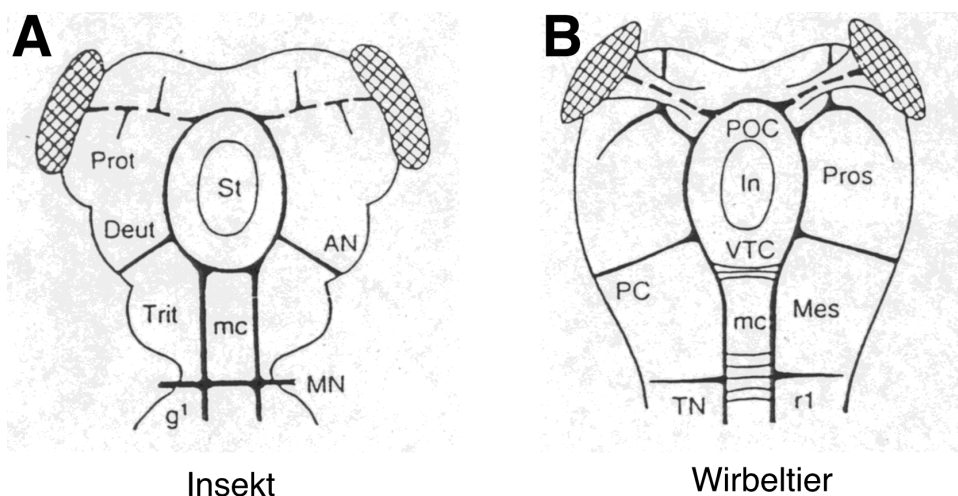


segmentalen Ganglien, die wie der Name sagt, die anteriore Kommissur etablieren. Blockierungsversuche mit dem von ihnen exprimierten Oberflächenmolekül Lazarillo (Ganfornia et al., 1995) führten zu einer gestörten Wegfindung der "anterior commissure pioneers".

Solche identifizierten Neuronen sind einer gezielten Manipulation bei der Untersuchung von Steuerungsmechanismen wesentlich besser zugänglich als die Gruppen von Zellen, die sich in *Drosophila*-Mutanten zumeist nur identifizieren lassen.

#### 2.6.4 Die Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn

Die Überquerung der Mittellinie ist nur ein Teil der frühen Axogenese, bei der sowohl bei Insekten wie auch bei Vertebraten ein erstes axonales Grundgerüst im Nervensystem entsteht (Bullock und Horridge, 1965; Wilson et al., 1990; Boyan et al., 1995a; Therianos et al., 1995; Arendt und Nübler-Jung, 1996), bevor sich daraus Strukturen höherer Ordnung wie die Pilzkörper von Insekten oder die Vesikel im Telencephalon von Wirbeltieren ausbilden. Das axonale Grundgerüst entwickelt sich aus einzelnen kommissuralen und longitudinalen Axonen, die miteinander verknüpft werden und dient den später auswachsenden Axonen als Orientierungssystem (Steindler, 1993; Boyan et al., 1995a; Therianos et al., 1995). Arendt und Nübler-Jung (1996) zeigen in einer vergleichenden Arbeit anhand der Ähnlichkeit des axonalen Grundgerüsts bei Insekten und Vertebraten (Abb. V), dass das Gehirn bei beiden Gruppen vermutlich von einem gemeinsamen Vorfahren abstammt. Auch die zum Teil weiter oben ausgeführten genetischen Mechanismen legen einen solchen Schluss nahe.



**Abb. V:** Schematischer Vergleich des axonalen Grundgerüsts im frühembryonalen Gehirn der Heuschrecke (A) und des Zebrafisches (B). Das axonale Grundgerüst entsteht jeweils rund um das Stomodäum (St) beziehungsweise das Infundibulum (In) und spiegelt die segmentale Aufteilung des Gehirns wieder. Die optischen Fasern sind gestrichelt dargestellt, die Augenanlagen straffiert. Die durchgezogenen Linien geben die axonalen Trakte wieder. Abkürzungen: An, Antennennerv; Deut, Deutocerebrum; gl, Subösophagealganglion; Mes, Mesencephalon; MN, Mandibularnerv; mc, Mittellinienzellen; PC, posteriore Kommissur; POC, postoptische Kommissur; Pros, Prosencephalon; Prot, Protocerebrum; r1, Rhombomer 1; TN, Trochlearnerv; Trit, Tritocerebrum; VTC, tegmentale Kommissur. (Nach Arendt und Nübler-Jung, 1996).

Zum Teil konnten für Vertebraten einzelne Neuronen, die an der Bildung des axonalen Grundgerüsts beteiligt sind, auch individuell identifiziert werden. Beim Zebrafisch sind unter anderem die Mauthner Zellen an der Bildung des axonalen Grundgerüsts beteiligt (Kimmel et al., 1991). Bei *cyclops*-

Mutanten, bei denen das Notochord fehlt, sind sie nicht mehr in der Lage, in koordinierter Weise die Mittellinie zu überqueren (Kimmel et al., 1991).

Eine Reihe von Arbeiten beschreiben die Entwicklung des ersten axonalen Grundgerüsts in den segmentalen Ganglien von Heuschrecke und *Drosophila* (Bastiani et al., 1986; du Lac et al., 1986; Grenningloh et al., 1991; Easter et al., 1993; Goodman und Doe, 1993; Goodman und Shatz, 1993). Einige der daran beteiligten Neuronen konnten dabei individuell identifiziert werden. Für *Drosophila* wurden darüber hinaus Gene wie die oben bereits beschriebenen *robo* und *comm* sowie *extradenticle* (*exd*) und *homothorax* (*hth*) (Reichert und Boyan, 1997; Hirth et al., 1998; Nagao et al., 2000) entdeckt, die einen Einfluss auf die Bildung des axonalen Grundgerüsts haben.

Allerdings sind für das axonale Grundgerüst im Gehirn von *Drosophila* und Heuschrecke bisher nur wenige Daten bekannt (Boyan et al., 1995a und b; Hirth et al., 1998; Nassif et al., 1998). Weiterführende Erkenntnisse sind hier vor allem für die Heuschrecke zu erwarten (siehe unten), da die geringe Größe des Drosophilagehirns gezielte Untersuchungsmöglichkeiten stark einschränkt. Einen Ansatz bildet das in dieser Arbeit beschriebene Expressionsmuster des von Ganfornia et al. (1995) erzeugten Antikörpers 10E6 gegen das Antigen Lazarillo im embryonalen Gehirn der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* (vgl. Graf et al., 2000).

## 2.7 Entwicklungsprozesse im Gehirn von Heuschrecken

### 2.7.1 Entwicklung der Region in der Mittellinie des Gehirns von Heuschrecken

Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit richtet sich auf die Entwicklung des Bereichs in der Mittellinie und der dort vorhandenen Zellen im Gehirn der Heuschrecke. Diese Gehirnregion wurde im adulten Tier als Pars Intercerebralis (Haller, 1905; Weyer, 1935) beschrieben und enthält eine große Zahl an neurosekretorischen Zellen, die mit der Corpora cardiaca verbunden sind. Die Pars Intercerebralis war deshalb Inhalt vieler Untersuchungen über die Struktur und Funktion der in ihr enthaltenen Zellen (Rowell, 1976; ; Zaretsky und Loher 1983; Raabe, 1989; Nässel, 1993). Die embryonalen Entwicklungsprozesse in der Mittellinie des Gehirns von Heuschrecken wurden dagegen bisher kaum untersucht (Boyan et al., 1995a). So ist im Vergleich zu dem umfangreichen Wissen über die Zellen im Bereich der Mittellinie in den ventralen Ganglien (zusammengefaßt bei Goodman und Doe, 1993) noch sehr wenig über die Mittellinienzellen im Insektengehirn bekannt. Für *Drosophila melanogaster* wurde beschrieben, dass sich der Bereich der Mittellinie des embryonalen Gehirns, die "median domain", aus Zellen mesektodermaler Herkunft zusammensetzt (Dumstrei et al., 1998). Die Differenzierung und der Erhalt von Vorläuferzellen wird dabei durch "epidermal growth factors" reguliert. Eine mit *Drosophila* vergleichbare "median domain" wird in dieser Arbeit auch für die Heuschrecke *Schistocerca gregaria* beschrieben (vgl. Ludwig et al., 1999). Sie befindet sich als eine von den Gehirnhemisphären unabhängige Region in der Mittellinie des Gehirns und wird aus zum Teil identifizierten Neuronen gebildet (Boyan et al., 1995a,b; Ludwig et al., 1999, 2000a). Die vollständige Organisation der Zellen im Bereich der "median domain" sowie ihre Abstammung und Entwicklung ist aber nach wie vor sowohl für *Drosophila* wie auch für Heuschrecken ungeklärt.

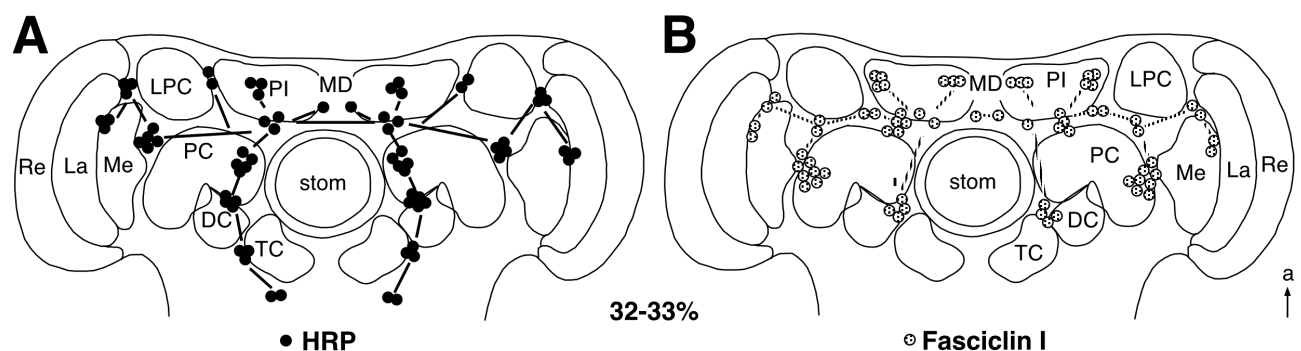
Im Bereich der präoralen Mittellinie bildet sich ein Teil der über 70 Kommissuren, die für das adulte Gehirn von *Schistocerca gregaria* beschrieben worden sind und die beiden Gehirnhemisphären verbinden. Sie werden zum größten Teil bereits im Lauf der Embryonalentwicklung in der Mittellinie des Gehirns angelegt (Boyan et al., 1993, 1995a). Dazu gibt es einzelne Arbeiten die zeigen, in

welcher Weise Zellen in der Mittellinie des Gehirns zur Bildung von axonalen Bahnen beitragen. Zu diesen Zellen gehören zum Beispiel die "primary commissure pioneers", die die erste Kommissur zwischen den beiden Gehirnhemisphären pionieren (Boyan et al., 1995a, b; Reichert und Boyan, 1997) oder die "lateral cells", die vermutlich eine von der Mittellinie ausgehende Bahn nach lateral etablieren (Boyan et al., 1995a, b; Graf et al., 2000).

### 2.7.2 Die Bildung des axonalen Grundgerüsts bei der Heuschrecke

Aus den Vorläuferzellen in der Mittellinie und den beiden Hemisphären des Nervensystems differenzieren sich eine große Zahl unterschiedlicher Neuronen und Gliazellen. Ein Teil dieser Zellen bildet bereits in der frühen Embryogenese Kommissuren und longitudinale Trakte, die das axonale Grundgerüst des Nervensystems erzeugen (Jacobs und Goodman, 1989; Klämbt et al., 1991; Klämbt, 1993; Condrón und Zinn 1994; Tear et al., 1996).

Im embryonalen Gehirn von *Schistocerca gregaria* wird das erste axonale Gerüst bereits Ende des ersten Drittels der Embryonalentwicklung gebildet, noch bevor sich alle Neuroblasten in den beiden Gehirnhemisphären vollständig differenziert haben und mit der Zellteilung beginnen. Diese frühe Axogenese im embryonalen Gehirn wurde bisher mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen gegen zwei verschiedene Antigene untersucht. Die Meerrettichperoxidase (HRP)-Expression im Gehirn (Boyan et al., 1995a; Reichert und Boyan, 1997) zeigt die Entwicklung von Neuronen in frühen Embryonalstadien (Abb. VI). In der Literatur wird HRP als allgemeiner neuronaler Marker gewertet (Jan und Jan, 1982; Snow et al., 1987). Im Gegensatz dazu exprimieren nur ein Teil der vorhandenen Neuronen in vergleichbaren Altersstadien das Antigen Fasciclin I (Abb. VI, Bastiani et al., 1987; Boyan et al., 1995a). Die Expressionsmuster dieser beiden Antigene zeigen Pionierneuronen in spezifischen Regionen des embryonalen Gehirns, deren Axone in bestimmte Richtungen auswachsen und deren Wachstumskegel sich entlang der Gliagrenzen von proliferativen Clustern orientieren. Auf diese Weise entsteht durch die Pionierneuronen ein Grundgerüst von Axonen rund um das Stomodäum (vgl. Abb. V und VI).



**Abb. VI:** Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn der Heuschrecke. Die Abbildungen **A** (HRP) und **B** (Fas 1) zeigen, dass das axonale Grundgerüst von Pionierneuronen aufgebaut wird, die an bestimmten Stellen im sich entwickelnden Gehirn lokalisiert sind. Zur besseren Übersichtlichkeit wird in Abb. A nur ein Teil der insgesamt HRP-exprimierenden Zellen gezeigt. Die schwarzen und gepunkteten Kreise repräsentieren die Antigen-exprimierenden Neuronen, die schwarzen bzw. quergestreiften Linien die entstandenen axonalen Bahnen. Trotz der auffälligen Ähnlichkeit der beiden Gerüste sind sie nicht vollständig identisch. Anzumerken ist, dass sich das Auftreten der Fas 1-Expression von den optischen Loben ausgehend zur Mittellinie hin entwickelt. Der Pfeil weist für A und B nach anterior (a). Abkürzungen: DC, Deutocerebrum; La, Lamina; LPC, laterales Protocerebrum; MD, "median domain"; Me, Medulla; PI, Pars Intercerebralis; PC, Protocerebrum; Re, Retina; stom, Stomodäum; TC, Tritocerebrum. (Nach Boyan et al., 1995a und Graf et al., 2000).

### 2.7.3 Lazarillo, ein neuer Marker von Axonen in der frühembryonalen Entwicklung

Abgesehen von wenigen Zellen wie den "primary commissure pioneers" (PCP) und den "lateral cells" (Boyan et al., 1995a, b; Ludwig et al., 1999; Graf et al., 2000) war es bisher nicht möglich, einzelne Neuronen individuell zu identifizieren, die zum axonalen Grundgerüst des Insektengehirns beitragen. In einer Studie zur Axogenese im ventralen Nervensystem von *Schistocerca gregaria* verwendeten Sanchez et al. (1995) das Expressionmuster des Antigens Lazarillo, um Neuronen wie die "anterior commissure pioneers" zu identifizieren, die spezifische axonale Bahnen, zum Beispiel die anterioren Kommissuren, in den segmentalen Ganglien pionieren. Lazarillo ist ein hoch glycosyliertes Glycoprotein mit Disulfidbrücken, das auf der extrazellulären Seite der Zellmembranen über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) befestigt ist (Cross, 1990). Eine Lazarillo Expression war auch in spezifischen Regionen im Gehirn beobachtet worden, allerdings haben Sanchez et al. (1995) diesen Aspekt nicht weiter untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wird beschrieben, in welcher Form Lazarillo exprimierende Neuronen zur Bildung des axonalen Grundgerüsts in embryonalen Gehirn der Heuschrecke beitragen.

### 2.7.4 Die Entwicklung identifizierter Neuronen im Gehirn

Die Identifikation individueller Zellen hat viel zum Verständnis von Bau und Funktion des Nervensystems beigetragen. Als ausgesprochen nützliche Methoden erwiesen sich dabei die Verwendung intrazellulärer Ableitungen und Färbungen sowie spezifische Antikörper gegen Neuropeptide oder Neurotransmitter. So konnte die Funktion vieler Neuronen im Nervensystem, die an der motorischen oder sensorischen Informationsverarbeitung im adulten Insekt beteiligt sind, geklärt werden. Die Verwendung spezifischer Antikörper bietet darüber hinaus die Möglichkeit, zusammen mit elektrophysiologischen Methoden sowohl die Funktion als auch die Entwicklung identifizierter Neuronen zu klären. Geeignet dazu sind Antigene, die nur von wenigen Neuronen im Gehirn exprimiert werden. Beispiele dafür sind die beiden VPLI-Neuronen im Unterschlundganglion von Heuschrecken ("vasopressin-like immunoreactive neurons", Thompson et al., 1991; Tyrer et al., 1993), die vier Eclosionshormon-exprimierenden Zellen des Gehirns von *Manduca* (Truman und Copenhaver, 1989; Thompson et al., 1991) oder die vier TERM-1-exprimierenden Neuronen bei *Schistocerca gregaria* (Meier et al., 1993). Für die "eclosion hormone releasing neurons" (Copenhaver und Truman, 1986) konnte bereits die Funktion bestimmt werden. Sie induzieren in der Corpora cardiaca die Bildung von Eclosionshormon und leiten damit die Imaginalhäutung ein. Dagegen wurde bisher für kein identifiziertes Neuron im Gehirn von Insekten die Abstammung und die komplette Ontogenese beschrieben. Als dazu geeignet erwiesen sich, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, die TERM-1-exprimierenden Neuronen von *Schistocerca gregaria*.

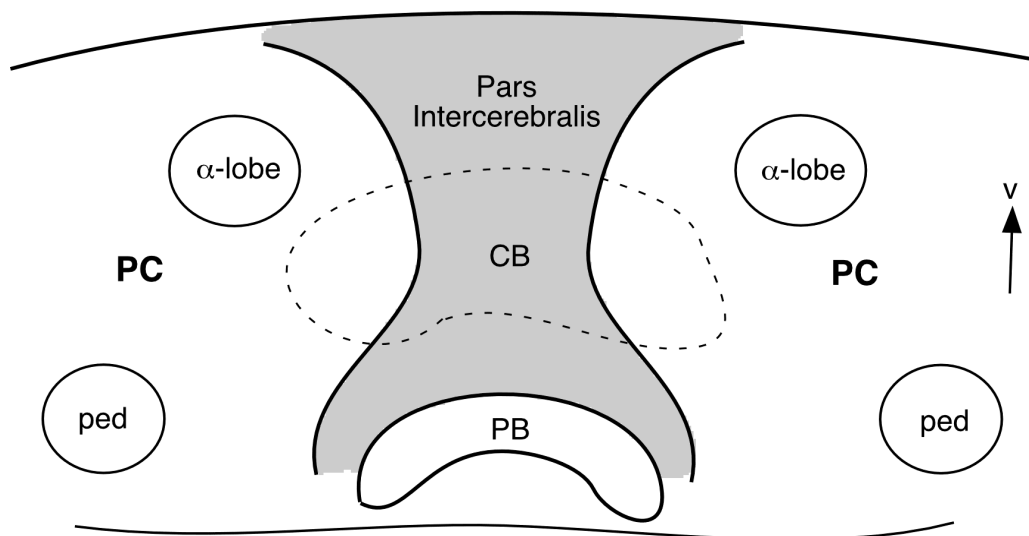
### 2.7.5 TERM-1-exprimierende Neuronen im Gehirn von *Schistocerca gregaria*

Das TERM-1 Antigen wurde von Meier et al. (1993) zum ersten Mal im Gehirn der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* beschrieben. TERM-1 ist ein 48 kDa schweres Glycoprotein, das von ausschließlich vier Neuronen im gesamten Nervensystem dieser Heuschrecke exprimiert wird. Diese Zellen beginnen bei circa 40% der Embryonalentwicklung mit der Antigenexpression und befinden sich im Bereich der Mittellinie des embryonalen Gehirns, ventral der "primary commissure". Die auswachsenden Axone projizieren kontralateral in die circumösophagealen Konnektive und steigen dann zum ventralen Nervensystem ab, wo sie im letzten Abdominalganglion fein verzweigte Terminalen bilden. Aufgrund der intensiven TERM-1-Expression in den Axonterminalen vermuteten

Meier et al. (1993) eine Funktion von TERM-1 in der Wegfindung der Axone im Nervensystem. In der vorliegenden Arbeit wird das Antigen verwendet, um die Ontogenese der TERM-1-exprimierenden Zellen im Detail zu untersuchen. Darüber hinaus wird verglichen, ob TERM-1 auch bei anderen Insekten exprimiert wird und ob sich aus den verschiedenen Expressionsmustern Rückschlüsse auf die Entwicklung einzelner Gehirnbereiche wie der Pars Intercerebralis ziehen lassen.

### 2.7.5 Die Pars Intercerebralis im Gehirn von Insekten

Die Pars Intercerebralis (PI) befindet sich im anterior-ventralen Bereich der Mittellinie des adulten Insektengehirns zwischen den beiden Pilzkörpern und anterior-ventral des Zentralkörpers. Sie ist eine heterogene Ansammlung von protocerebralen Zellen unterschiedlicher Herkunft und Funktion (Bullock und Horridge, 1965; Rowell, 1976; Raabe, 1989). Zum ersten Mal beschrieben wurde die Pars Intercerebralis von Haller (1905) bei Schaben und Hornissen als Region zwischen den Pilzkörpern und später von Weyer (1935) im Gehirn der Honigbiene als Region die "drüsenartige Zellen" enthält. Diese "drüsenartigen Zellen" werden in der englischsprachigen Literatur als "median neurosecretory cells" bezeichnet. Die PI ist kein morphologisch klar definierbarer Bereich, da sie anterior, lateral und ventral kontinuierlich in andere Bereiche der Zellkörperhülle übergeht. Vergleichbare Gehirnregionen finden sich in allen bisher untersuchten Insekten (vgl. Rowell, 1976) und die Pars Intercerebralis ist heute zu einem allgemein akzeptierten Begriff geworden, der einen Teil der Zellkörperhülle des Protocerebrums beschreibt (Bullock und Horridge, 1965; Raabe, 1989).



**Abb. VII:** Stark schematisierte Darstellung eines Horizontalschnitts durch das Insektengehirn auf der Höhe der Pars Intercerebralis (PI, grau). Die Pars Intercerebralis besteht aus protocerebralen Zellkörpern und liegt zwischen den beiden Neuropilbereichen des Protocerebrums (PC) und der protocerebralen Brücke (PB) und anterior des Zentralkörpers (CB, gestrichelte Linie). Die PI ist kein morphologisch klar definierbarer Bereich, da sie anterior, lateral und ventral kontinuierlich in andere Bereiche der Zellkörperhülle übergeht. Im PC sind die Querschnitte der  $\alpha$ -Loben und der Pedunculi (ped) der Pilzkörper gekennzeichnet. Der Pfeil zeigt nach ventral (v).

Die Pars Intercerebralis enthält die größte Ansammlung neurosekretorischer Zellen ("median neurosecretory cells") im gesamten Nervensystem von Insekten. Die "median neurosecretory cells" projizieren über die Corpora cardiaca Nerven 1 zur Corpora cardiaca (Rowell, 1976; Raabe, 1989).

Obwohl die Zahl der "median neurosecretory cells" bei unterschiedlichen Insekten sehr stark schwankt, wird davon ausgegangen, dass es sich um vergleichbare, vermutlich homologe Zellen handelt (Rowell, 1976). Außer den "median neurosecretory cells" befinden sich noch andere identifizierte Zellen in der Pars Intercerebralis adulter Insekten. Dazu gehören zum Beispiel große Ocellusinterneuronen (Bullock und Horridge, 1965) oder die "primary commissure pioneers" (Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999, 2000b) und die Tochterzellen des "median precursors" im Heuschreckengehirn (Ludwig et al., 1999).

Der Begriff Pars Intercerebralis wird in der Literatur allerdings nicht einheitlich verwendet. Zum einen haben bereits frühere Autoren auf morphologischer Ebene unterschiedliche Definitionen vorgelegt (Haller, 1905; Weyer, 1935; Bullock und Horridge, 1965; Williams, 1975), zum anderen wird der Begriff von manchen Autoren unzulässigerweise mit den "median neurosecretory cells" synonymisiert (Carrow et al., 1984; Chiang et al., 1999). Es erscheint daher sinnvoll die Pars Intercerebralis als Gehirnregion auf der Basis der Entwicklung des embryonalen Heuschreckengehirns neu zu definieren.

Im Gegensatz zu dem umfangreichen Wissen über histologische und pharmakologische Aspekte der "median neurosecretory cells" (Mason, 1973; Schooneveld, 1974; Zaretsky und Loher 1983; Copenhaver and Truman, 1986; Raabe, 1989; Truman and Copenhaver, 1989; Homberg et al., 1991a,b; Nässel, 1993; Chen et al., 1994b) ist bisher allerdings nur wenig über die anderen Zellen in der Pars Intercerebralis und die Entstehung dieser Region im embryonalen Gehirn bekannt. Insgesamt gibt es bis heute nur wenige Studien, die die embryonale Entwicklung einer komplexen Struktur innerhalb des Insektengehirns beschreiben. Beispiele sind Salecker und Boeck (1991), die embryonale Aspekte der Entwicklung der Antennenloben im Gehirn von Schaben untersucht haben und Boyan und Williams (1997), die zeigen, wie Neuronen aus der embryonalen Pars Intercerebralis zur Bildung des Zentralkörpers im Heuschreckengehirn beitragen.

Arbeiten über die Entwicklung der Region in der Mittellinie des embryonalen Gehirns (Boyan et al., 1993; Boyan et al., 1995a; Boyan und Williams, 1997; Ludwig et al., 1999) vermitteln bereits einige Erkenntnisse über Zellen, die vermutlich an der Bildung der adulten Pars Intercerebralis beteiligt sind. Boyan und Williams (1997) beschreiben beispielsweise zwei bilateral symmetrische Streifen von Neuroblasten am ventro-medialen Rand des Protocerebrums als embryonale Pars Intercerebralis. Für einige dieser Neuroblasten vermuten sie, dass sie an der Bildung der "median neurosecretory cells" beteiligt sind. Die "median domain" (Ludwig et al., 1999), die sich zwischen den Loben der embryonalen Pars Intercerebralis befindet, ist eine weitere Region, die im adulten Gehirn nicht mehr vorhanden ist, aber zur Bildung der Pars Intercerebralis im adulten Gehirn beitragen könnte.

Diese Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Region in der Mittellinie des embryonalen Gehirns ist die Basis für die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der zellulären Komponenten, die zur Bildung der Pars Intercerebralis im adulten Gehirn beitragen. Darüber hinaus wird die TERM-1-Expression in verschiedenen Insektenordnungen verglichen, um zu klären ob die Pars Intercerebralis bei Insekten nach einem gemeinsamen Organisationsmuster aufgebaut ist. Diese Fragestellung wird durch einen histologischen Vergleich ergänzt, der zeigt, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit bei anderen Insekten homologe Zellen zu den "primary commissure pioneers" von Heuschrecken gibt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Tiere

Eier, Larven und Imagines von *Schistocerca gregaria* stammen aus einer eigenen Laborzucht am Zoologischen Institut der LMU München. Die anderen verwendeten Arten stammen entweder aus Laborzuchten und wurden von Kollegen freundlicherweise für diese Arbeit zu Verfügung gestellt oder im Freiland gesammelt (vgl. Kapitel 3.10).

#### ***Tierhaltung (Schistocerca gregaria)***

Die in dieser Untersuchung vor allem verwendeten Wanderheuschrecken, *Schistocerca gregaria*, stammen aus einer Laborzucht. Die Tiere wurden getrennt nach Altersstadien in Käfigen mit hoher Populationsdichte bei einem Tag-Nachtzyklus von jeweils 12 Stunden gehalten. Die Temperatur in den Käfigen betrug circa 28 - 30°C und die relative Luftfeuchtigkeit lag je nach Jahreszeit und Wetterbedingungen zwischen 30% und 55%. Gefüttert wurden die Tiere mit Keimweizen. Die Eigelege wurden in regelmäßigen Abständen abgesammelt und in gut belüfteten Boxen in feuchtem Vermiculit (Kramer Protega) bei 30°C bebrütet.

Die Embryonalentwicklung dauerte unter diesen Bedingungen etwa 18 Tage, die Larvalentwicklung bis zur Imaginalhäutung circa 5 Wochen.

### 3.2 Tierpräparation

Alle Experimente wurden unter Einhaltung der geltenden Tier- und Artenschutzbestimmungen durchgeführt. Die Tiere wurden, soweit möglich, vor der Präparation mit CO<sub>2</sub> betäubt oder auf 4°C abgekühlt.

#### **3.2.1 Präparation von Heuschreckenembryonen**

Die Altersbestimmung der Embryonen von *Schistocerca gregaria* richtet sich nach Bentley et al. (1979) und wird in Prozent der gesamten Embryonalentwicklung angegeben und auf ein Prozent genau durchgeführt. 1% der Embryonalentwicklung entspricht bei 30°C etwa 6 Stunden.

Die Präparation der Embryonen erfolgte in einfachem Phosphatpuffer (PBS). Eihülle und Dotter wurden entfernt, ebenso wie die Membranen, welche die Embryonen umhüllen. Bei älteren Embryonen (>45% Embryonalentwicklung) musste zusätzlich das ventrale Diaphragma entfernt werden, um eine ausreichende Penetration der Antikörper im Nervensystem zu ermöglichen. Bei Embryonen über 75% Embryonalentwicklung wurde das zentrale Nervensystem zum Teil vollständig freigelegt. Die auf diese Weise präparierten Embryonen wurden für immunhistochemische Färbungen und Einzelzellfärbungen verwendet.

#### **3.2.2 Präparation des Gehirns von Larvenstadien und Imagines**

Den betäubten Tieren wurde mit einer Rasierklinge der Kopf abgetrennt und in PBS überführt. Die Kutikula der Ventralseite wurde entfernt, das Gehirn aus dem Kopf freipräpariert und anschließend mit feinen Pinzetten die Scheide, die das Gehirn umgibt, entfernt.

### 3.3 Einzelzellfärbungen

Embryonen unterschiedlicher Altersstadien wurden in PBS wie oben beschrieben aus den Eiern freipräpariert und im selben Medium auf silikonbeschichtete Objektträger überführt. In einem freigeschnittenen Fenster der Silikonschicht kann man die Embryonen orientieren und an den optischen Loben so mit Minutien fixieren, dass das Gehirn für Einstiche mit Glaselektroden frei zugänglich ist.

#### 3.3.1 Luzifer Yellow

Unter optischer Kontrolle (50x Wasserimmersionsobjektiv mit 1mm Arbeitsabstand) wurden ausgewählte Zellen mit dünnwandigen Glaselektroden (Clark Instruments, Reading, UK) mit einem niedrigen Widerstand (10 - 20 M $\Omega$ ) angestochen und mit Hilfe eines konstanten, depolarisierenden Stroms mit einer 2%igen Lösung von Luzifer Yellow in 2M Lithiumacetat gefüllt. Die Präparate wurden sofort danach in 3,7% Pipes-FA (100mM Pipes, 2mM EGTA, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 3.7% Formalin; pH 7.0) für 30 Minuten fixiert und in PBT (PBS + 0,5% Triton-X100 + 0,5% bovine serum albumin (BSA)) 1 Stunde gewaschen. Nach 12 stündiger Inkubation in einem peroxidasegekoppelten anti-Luzifer Antikörper (Verdünnung 1:50 in PBT; Molecular Probes) bei Raumtemperatur und nach ausreichendem Waschen wurden die Präparate mit Sigma Fast DAB Tabletten (Fa. Sigma) entwickelt und in 90%iges Glycerol eingebettet um das Gewebe zu klären.

#### 3.3.2 DiI

Die Embryonen wurden wie oben beschrieben präpariert und montiert. Dünnwandige Glaselektroden mit einem niedrigen Widerstand (10 - 20 M $\Omega$ ) wurden mit einer Lösung von 0,5% DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes) gelöst in Dimethylformamid (DMF) gefüllt. Die Elektrodenspitze wurde unter optischer Kontrolle in Kontakt mit der Zellmembran ausgewählter Zellen gebracht und DiI durch einen schwachen depolarisierenden Strom kontinuierlich auf die Zelle appliziert, bis eine deutliche Färbung zu beobachten war. DiI fließt als lipophiler Farbstoff in den Zellmembranen und lässt sich in Öl gelöst auch als Nativfarbstoff verwenden. Sofort nach der Färbung wurden die Embryonen mit 3,7% Formalin in PBS für 1 Stunde fixiert, gründlich gewaschen und in 90%iges Glycerol eingebettet.

### 3.4 Immunhistochemische Färbungen

Die Tabellen 3.1 und 3.2 geben Aufschluss über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, die jeweilige Bezugsquelle und die verwendeten Konzentrationen.

Die Embryonen bzw. die Gehirne gewünschter Altersstadien wurden wie oben beschrieben präpariert. Alle Präparate wurden je nach Dicke des Gewebes für 30 - 60 Minuten in Pipes-FA fixiert und für 6 mal 10 Minuten in PBT gewaschen.

Embryonen unter 75% Embryonalentwicklung wurden als Komplettpräparate gefärbt, von älteren Embryonen und den Gehirnen der Larven und Imagines wurden Vibratomschnitte angefertigt, um eine ausreichende Penetration der Antikörper zu gewährleisten.



### 3.4.1 Vibratomschnitte

Zur Herstellung von Vibratomschnitten ist die Einbettung in ein geeignetes Medium zur Stabilisierung der Gewebe notwendig. Dazu diente 4%ige in PBS gelöste Agarose (Sigma, A 0169, Typ I-A), die durch Erhitzen in der Mikrowelle verflüssigt wird. Die Gehirne und Embryonen wurden in 50°C warme, flüssige Agarose überführt und rasch orientiert. Anschließend wurde die Agarose abgekühlt, bis sie vollständig geliert war, und es wurden Blöckchen von 3 bis 5 mm Kantenlänge welche die Proben enthielten getrimmt. 100 µm dicke Schnitte wurden an einem Vibratom (Technical Products International, Series 1000, St. Louis, MO) hergestellt und in PBT gepuffert. Die hier verwendete Einbettung in Agarose wurde nach Sallee und Russell (1993) modifiziert.

### 3.4.2 Standardprotokoll für Immunhistochemie

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle immunhistochemischen Färbungen mit dem folgenden Standardprotokoll ausgeführt (modifiziert nach Patel, 1994b).

Nach dem Fixieren und Waschen wurden die Präparate 1 Stunde lang in 5% NGS Blocker (PBT + 5% "normal goat serum" (NGS)) inkubiert. Die Inkubation im ersten Antikörper mit den entsprechenden Konzentrationen (vgl. Tabelle 3.1) erfolgte ebenfalls in 5% Blocker für 24 Stunden bei 4°C. Nach erneutem Waschen für 6 mal 10 Minuten in PBT wurden die Präparate für 5 Stunden bei Raumtemperatur oder 24 Stunden lang bei 4°C im entsprechenden sekundären Antikörper (vgl. Tabelle 3.2) inkubiert. Verwendung fanden FITC-, TRITC- und Peroxidase (PO)-gekoppelte sekundäre Antikörper. Die Präparate wurden erneut 6 mal 10 Minuten in PBT gewaschen. Fluoreszenzpräparate wurden sofort in 90%iges Glycerol überführt und auf Objektträgern eingebettet. Bei der Verwendung von PO-gekoppelten sekundären Antikörpern wurden die immunhistochemischen Färbungen mit Sigma Fast DAB Tabletten nach Angaben des Herstellers entwickelt und die Präparate anschließend in Glycerol eingebettet.

Alternativ wurde das Standardprotokoll auch ohne Triton-X 100 für Färbungen gegen das TERM-1-Antigen verwendet, um zu testen ob Unterschiede in den Färbungen mit und ohne Triton auftreten.

### 3.4.3 Lazarillo-Protokoll

Das Antigen Lazarillo ist membrangebunden und wird durch Detergentien ausgewaschen. Daher musste im Färbeprotokoll auf eine Permeabilisierung der Membranen durch Triton-X100 verzichtet werden.

Nach der Fixierung wurden die Präparate 6 mal 10 Minuten lang in PBS gewaschen und in 5% FCS-Blocker (PBS + 5% "fetal calf serum" (FCS)) 1 Stunde inkubiert. Die Inkubation im ersten Antikörper (10E6; 1:1 in 5% FCS-Blocker) erfolgte für 12 Stunden bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschen in PBS. Zur Visualisierung fanden FITC- und PO-gekoppelte sekundäre Antikörper (GAM-FITC und GAM-PO von Dianova; 1:400 in 5% FCS-Blocker) über einen Zeitraum von 5 Stunden bei Raumtemperatur Verwendung. Die Entwicklung von Präparaten mit PO-gekoppelten Zweitantikörpern erfolgte mit Hilfe von Sigma Fast DAB Tabletten. Eingebettet wurden alle Präparationen in 90%igem Glycerol.

### 3.4.4 Doppelfärbungen

#### ***Lazarillo und Meerrettichperoxidase***

Für die immunhistochemische Doppelfärbung von Lazarillo und Meerrettichperoxidase wurde zuerst das oben angegebene Protokoll für Lazarillo mit einem peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper durchgeführt, ohne die Färbung zu entwickeln. Anschließend fand die Färbung für Meerrettichperoxidase (HRP) nach dem Standardprotokoll statt, wobei in den Lösungen auf Triton-X100 zur Permeabilisierung verzichtet wurde. Der verwendete sekundäre Antikörper für die HRP-Färbung war FITC-gekoppelt. Zum Abschluss wurde die Lazarillo-Färbung mit Sigma Fast DAB Tabletten entwickelt und die Präparate in 90%igem Glycerol eingebettet.

#### ***TERM-1 und Leukokinin-1***

Diese Doppelfärbung wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt, wobei sowohl die beiden primären als auch die beiden sekundären Antikörper (FITC- und TRITC-gekoppelt) parallel appliziert wurden. Als Kontrolle wurden die beiden Färbungen auch in unterschiedlicher Reihenfolge jeweils separat mit dem Standardprotokoll durchgeführt.

#### ***Lazarillo und DiI***

Wie oben beschrieben (Kapitel 3.4.3) wurde eine Lazarillo-Färbung mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper durchgeführt. Nach der Montierung der Präparate auf silikonbeschichteten Objektträgern erfolgte unter optischer Kontrolle die Einzelzellfärbung immunhistochemisch markierter Zellen mit DiI (Kapitel 3.3).

**Tabelle 3.1: Primäre Antikörper**

Antigen	1. Ak	Quelle	Wirt	Verd.	2. Ak
Allatostatin	Ast	H. Agricola	K	1:5000	GAR-PO/FITC
5-Bromodeoxyuridine	anti-BrdU	Sigma	M	1:250	GAM-PO
Engrailed	4D9	C. S. Goodman	M	1:1	GAM-PO
Even-skipped	eve	M. Klingler	M	1.200	GAM-PO
Fasciclin 1	3B11	C. S. Goodman	M	1:1	GAM-PO
Fasciclin 2	8C6	C. S. Goodman	M	1:1	GAM-PO
Glial fibrillary acid protein	GFAP	DAKO	K	1:500	GAR-PO
I-5	-	C. S. Goodman	M	1:1	GAM-PO
Lazarillo	10 E 6	D. Sanchez	M	1:1	GAM-PO/FITC
Leukokinin-1	Lk-1	D. Nässel	K	1:2500	GAR-PO/FITC/ TRITC
Luzifer Yellow	anti-Lu-PO	Molecular Probes	K	1:100	/
Meerrettichperoxidase	anti-HRP	Sigma	K	1:500	GAR-PO/FITC
Perisulfakinin	PSK	H. Agricola	K	1:5000	GAR-PO/FITC
Repo	4a3	U. Technau	K	1:400	GAR-PO/FITC
TERM-1	4G5	T. Meier	M	1:10/1:20	GAM-Cy3/PO/ FITC/6nm gold
-	7D2	D. Sanchez	M	1:1	GAM-PO
-	8B7	D. Sanchez	M	1:1	GAM-PO

Abkürzungen:

Ak = Antikörper; K = Kaninchen; M = Maus ;Verd. = Verdünnung; 2. Ak = sekundärer Antikörper.

**Tabelle 3.2: Sekundäre Antikörper**

2. Ak	gegen	Quelle	Verd.	Emission
GAM-Cy3	Maus	Dianova (115-165-044)	1:500	575 nm
GAM-FITC	Maus	Dianova (115-095-044)	1:500	520 nm
GAM-PO	Maus	Dianova (115-035-044)	1:500	-
GAM-6nm gold	Maus	Dianova (115-195-068)	1:30	-
GAR-FITC	Kaninchen	Dianova (111-095-003)	1:500	520 nm
GAR-PO	Kaninchen	Dianova (111-035-003)	1:500	-
GAR-TRITC	Kaninchen	Sigma (T-5268)	1:500	570 nm

Abkürzungen:

Cy3 = "Indocarbocyanin"; FITC = "Fluorescein isothiocyanate"; GAM = "goat-anti-mouse"; GAR = "goat-anti-rabbit"; PO = peroxidase-gekoppelt; TRITC = "Tetramethyl-Rhodamin".

### 3.4.5 Feinstrukturelle immunhistochemische Methoden

#### ***Kunstharzeinbettung immunhistochemisch gefärbter Präparate***

Zur exakten Lokalisierung des TERM-1 Antigens in den Zellen wurden Präparate mit intensiver DAB-Färbung in Kunstharz (Epon) eingebettet. Zu diesem Zweck wurde aus den bereits fotografierten Präparaten das Glycerol mit PBS wieder ausgewaschen und diese wurden in 2% Osmiumtetroxid in PBS postfixiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 95% je 20 Minuten; 100% getrocknet 3 mal 20 Minuten). Zur Einbettung der Präparate diente hartes Epon (siehe Elektronenmikroskopie, Kapitel 3.7.1). Anschließend wurden 1,5 µm dicke Semidünnschnitte mit Hilfe von Glasmessern an einem RMC Series 7000 Ultramikrotom angefertigt und mit Toluidin gefärbt.

#### ***Immunogoldfärbungen an Ultradünnschnitten***

Die Einbettung der Präparate und die Herstellung von Ultradünnschnitten wird in Kapitel 3.7.2 beschrieben.

Ausgewählte Ultradünnschnitte wurden für 30 Minuten in 5% Blocker (5% Fischgelatine in PBS) inkubiert. Die anschließende Inkubation im anti-TERM-1 Antikörper (1:15 in Blocker) fand bei 4°C über 12 Stunden hinweg statt, gefolgt von 10 mal 2 Minuten Waschen in PBS und der Inkubation im sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus gekoppelt mit 6 nm Gold, 1:30 in Blocker) über 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden wieder in Puffer 10 mal 2 Minuten gewaschen, für 3 Stunden bei 60°C getrocknet und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Untersucht wurden die Schnitte mit einem Philips CM 10 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV.

### 3.5 Bromodeoxyuridin-Aufnahme

5-Bromodeoxyuridin wird als Basenanalogon von teilungsaktiven Zellen in die DNA eingebaut. Mit Hilfe eines gegen 5-Bromodeoxyuridin gerichteten Antikörpers kann man bestimmen, welche Zellen sich im Untersuchungszeitraum geteilt haben. Diese Methode ermöglicht es, Zellabstammungen zu analysieren.

Eier von *Schistocerca gregaria* im gewünschten Alter wurden 60 Sekunden in Natriumhypochlorid sterilisiert, die Embryonen in Insektenzellkulturmedium (Mitsubishi und Maramorosch insect medium; Sigma) von Eihülle und Dotter freipräpariert und das Alter exakt bestimmt. Nach der Präparation wurden die Embryonen 16 Stunden lang bei 30°C in 0,01M 5-Bromodeoxyuridin (in Medium) in sterilen Zellkulturschalen inkubiert. Dieser Zeitraum entspricht in etwa 2% der Embryonalentwicklung. Anschließend wurde erneut das Alter der Embryonen bestimmt und die Präparate über 1 Stunde in Pipes-Fa fixiert und 6 mal 10 Minuten in Puffer gewaschen. Nach der Denaturierung der DNA für 20 Minuten in 2N HCl und erneutem Waschen erfolgte die Inkubation im anti-BrdU-Antikörper (1:200; Sigma) 24 Stunden lang bei 4°C in 5% NGS-Blocker. Die Präparate wurden gewaschen und in peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper (GAM-PO, Dianova) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Abschließend wurden die Präparate mit Sigma Fast DAB Tabletten entwickelt und in 90%iges Glycerol eingebettet.

## 3.6 Histologie

### 3.6.1 Färbungen nach Wigglesworth

Die histologischen Präparate wurden in Anlehnung an die Osmiumtetroxide - Ethylgallate-Methode nach Wigglesworth (1959) angefertigt. Dazu wurden die entsprechenden Altersstadien wie oben angegeben präpariert (Kapitel 3.1), in 2,5% Glutardialdehyd in PBS bei pH 7,4 eine Stunde lang fixiert, 6 mal 10 Minuten in PBS gewaschen und 6 Stunden in einer 2%igen Osmiumtetroxidlösung osmiert. Nach erneutem einstündigem Waschen erfolgte die Verstärkung der Färbung in einer gesättigten Ethylgallatlösung in PBS für 16 Stunden, gefolgt von gründlichem Waschen, bis kein dunkler Niederschlag mehr auftrat. Die Präparate wurden dann in einer aufsteigenden Acetonreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 95% je 20 Minuten; 100% getrocknet 3 mal 20 Minuten) entwässert, in weiches Epon (Fa. Roth) eingebettet und an einem Rotationsmikrotom 14 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Die Schnittserien wurden auf Objektträger aufgezogen und in Depex eingebettet.

### 3.6.2 Cobalt-Rückfärbungen

Mit Hilfe von Cobalt-Rückfärbungen läßt sich die Morphologie und das Projektionsmuster von einzelnen Neuronen im Nervensystem darstellen. Über durchtrennte Axone läuft Cobaltlösung in die entsprechende Zelle und verteilt sich bis in feinste Verzweigungen. Durch Sulfidfällung wird die Färbung dann entwickelt. Die Cobalt-Rückfärbungen wurden nach den in der Literatur beschriebenen Standardmethoden durchgeführt (Altman und Tyrer, 1980) und nach Timm (1958) intensiviert. Die Rückfärbungen wurden einseitig von den Konnektiven zwischen dem Unterschlundganglion und dem Prothorakalganglion aus durchgeführt. Cobaltlösungen verschiedener Konzentrationen (0,5 - 1,5%) wurden jeweils 6, 12 und 15 Stunden lang appliziert. Anschließend wurden die Gehirne fixiert (4% Formalin in PBS) und freipräpariert, bevor sie wie oben angegeben intensiviert wurden. Die in Methylsalicylat geklärten Gehirne sind entweder direkt mikroskopiert worden oder wurden, nach der Einbettung in weiches Epon, 20µm dick geschnitten und die Schnitte auf Objektträger aufgezogen.

## 3.7 Transmissionselektronenmikroskopie

### 3.7.1 Simultanfixierung und Einbettung (Franke et al., 1969)

Embryonen und Gehirne der Imagos wurden wie oben beschrieben präpariert. Allerdings erfolgte die Präparation direkt im Fixierungsmittel (2% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer, pH 7,3), um eine möglichst gute Strukturhaltung zu gewährleisten. Präparation, Fixierung und Entwässerung erfolgten bei 4°C auf Eis. Die Gewebe wurden nach der Präparation sofort in ein Simultanfixans, bestehend aus 1% Osmiumtetroxid und 2% Glutardialdehyd in 0,1M Cacodylatpuffer übertragen und 1 Stunde lang weiter fixiert, gefolgt von einer Postfixierung in 1% Osmiumtetroxide in Cacodylatpuffer. Im Anschluss an ein sorgfältiges Waschen (8 - 10 mal in Cacodylatpuffer) der Präparate wurden diese in einer aufsteigenden Acetonreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 95% je 20 Minuten; 100% getrocknet 3 mal 20 Minuten) entwässert, für 4 Stunden in einem Aceton/Epon-Gemisch (1:1) infiltriert und in reines Epon (Fa. Roth) für 24 Stunden bei Raumtemperatur übertragen. Die Einbettung erfolgte in hartes Epon, das bei 60°C auspolymerisiert wurde. Nach dem Trimmen der Blöcke wurden Ultradünnschnitte (100 - 120 nm) an einem RMC Series 7000 mit Glasmessern angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte an einem Philips CM 10 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV.

### 3.7.2 LR-White Einbettung für Feinstrukturimmunohistochemie

Embryonen und Gehirne von Imagines der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben präpariert, ohne die Membranen bei den Embryonen oder die Hirnhaut der Imagines zu entfernen. Die Gewebe wurden sofort in frisch hergestelltem 4%igem Formalin 1 Stunde lang fixiert und in PBS 6 mal 10 Minuten gewaschen. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit unvergälltem Ethanol bis 70% (30%, 50%, 70% je 20 Minuten). Die Präparate wurden danach direkt in LR-White/Ethanol 1:1 überführt (1 Stunde) und in reinem LR-White 24 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Die Polymerisation des Kunstharzes erfolgte in Gelatinekapseln unter Luftabschluss bei 60°C im Wärmeschrank. Die Blöckchen wurden getrimmt und Ultradünnschnitte (100 nm) an einem RMC Series 7000 mit Hilfe von Glasmessern angefertigt. Die Schnitte wurden auf befilmten Ni-Grids aufgefangen und für immunhistochemische Färbungen weiter verwendet (vgl. Kapitel 3.4.5).

### 3.8 Lichtmikroskopie und Bildbearbeitung

Die immunhistochemischen und histologischen Präparate wurden mit verschiedenen lichtmikroskopischen Techniken untersucht. Immunhistochemische Präparate, die mit DAB entwickelt wurden sowie histologische Färbungen nach Wigglesworth wurden mit Hellfeld und Nomarski-Optik mikroskopiert, mit einer CCD-Camera aufgenommen und mit einer Scion VG-5 "frame grabber" Karte digitalisiert. Fluoreszenzpräparate wurden unter Verwendung der entsprechenden Filter (FITC, 480nm; TRITC, 580nm) mit einem Leica TCS SP2 Photonen Laser Scanning Microscop untersucht und fotografiert. Fotonegative der elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Durchlichtscanner digitalisiert. Die so erhaltenen digitalen Daten wurden mit den folgenden Programmen zur Erstellung von Bildtafeln am Computer weiter bearbeitet: SXM-Image 1.62, Graphic Converter 3.8, Adobe Photoshop 3.5, Canvas 6.0.

### 3.9 Definition der neuronalen Achsen und Nomenklatur

Die Orientierungen, die in dieser Studie für das Nervensystem angewendet werden, entsprechen den neuronalen Achsen, nicht den Körperachsen (Boyan et al., 1993). Daraus ergibt sich, dass die Oberseite des Gehirns (entsprechend der Dorsalseite des Kopfes) aus neuronaler Sicht anterior ist, die Vorderseite des Gehirns (entsprechend der anterioren Seite des Kopfes) aus neuronaler Sicht ventral ist. Entsprechendes gilt für die Unterseite (posterior) des Gehirns (ventral im Kopf), respektive die Hinterseite (dorsal) des Gehirns (posterior im Kopf).

Viele der in dieser Arbeit verwendeten Begriffe stammen aus der englischsprachigen Literatur und haben nicht immer eine Entsprechung im Deutschen. Nur da, wo es möglich und sinnvoll war, wurden diese Begriffe ins Deutsche übersetzt. In den anderen Fällen wurden die Begriffe in ihrer englischen Version in Anführungszeichen in dieser Arbeit verwendet (z. B. "primary commissure pioneers").

### 3.10 Liste der untersuchten Tiere

In dieser Untersuchung wurden Vertreter wichtiger Insektenordnungen bearbeitet, vor allem der Ordnungen, aus denen die allgemein gängigen, häufig verwendeten Laborarten stammen. Viele Insektenordnungen konnten nicht untersucht werden, da die geringe Größe ihrer Vertreter eine Präparation mit der nötigen Präzision des Gehirns nicht zuließ (z. B. Collembola, Siphonaptera, Strepsiptera). Des weiteren wurden Ordnungen nicht untersucht, deren Vertreter entweder sehr selten sind, nur wenige Arten umfassen oder eng verwandt sind mit Vertretern untersuchter Ordnungen (z. B. Trichoptera, Mecoptera, Plecoptera). Die systematische Einordnung der untersuchten Ordnungen richtet sich nach Kristensen (1981) und Kraus (1996).

Soweit möglich wurden Tiere aus Laborzuchten verwendet. Bei Tieren die im Freiland gesammelt wurden, fanden vor allem häufige und ausschließlich nicht geschützte Arten Verwendung. Neben den Insekten wurden auch einige Vertreter anderer Arthropodenklassen zum Vergleich herangezogen. Solange die phylogenetische Stellung der untersuchten Taxa aus der vermutlich polyphyletischen Gruppe der Myriapoda noch nicht endgültig geklärt ist, werden sie hier aus praktischen Gründen noch als einheitliche Gruppe geführt.

Die im Freiland gesammelten Arten stammen aus folgenden Regionen: Südbayern (Deutschland), Istrien (Kroatien) und von der Algarve (Portugal).

Folgenden Personen sei herzlich für die Bereitstellung von Tieren gedankt: Dr. H. Merzendörfer (Uni Osnabrück), T. Saks und Prof. H. Bohn (LMU München), Prof. H. Cruse (Uni Bielefeld), Prof. P. Schlegel (LMU München), Dr. A. Zahn (LfU Bayern), M. Olbrich (MPI Martinsried) Dr. L. Williams (LMU München), M. Müller (Tiergarten Hellabrunn München), Dr. A. Büschges (Uni Köln), A. Gross (LMU München), Dr. J.T. Franz (Uni Paderborn), Dr. M. Schmidt (Uni Hamburg), Dr. K-E Kaissling (MPI Seewiesen).

#### Chelicerata

**Xiphosura:** *Limulus polyphemus*

**Scorpiones:** *Buthus occitanus*

**Araneae:** *Tegenaria gigantea*

#### "Myriapoda"

**Chilopoda:** *Lithobius forficatus*, *Scolopendra* sp., *Scutigera coleoptrata*

**Diplopoda:** *Tachypodoilus* sp.

#### Insecta

**Zygentoma:** *Ctenolepisma lineata*

**Ephemeroptera:** *Cloeon dipterum*

**Odonata:** *Lestes* sp., *Sympetrum* sp.

**Dermaptera:** *Forficula* sp.

**Blattaria:** *Archimandrita* sp., *Periplaneta americana*

**Isoptera:** *Shedorthinotermes lamanianus*

**Mantodea:** *Mantis religiosa*

**Ensifera:** Tettigoniidae: 1. Tettigoniinae: *Tettigonia viridissima*, 2. Decticinae: *Pholidoptera griseoptera*,

*Metrioptera roeseli*, 3. Conocephalinae: *Conocephalus discolor*, *Ruspolia nitidula*, 4. Eppihippigerinae:

*Eppihippiger discoidalis*

Phaneropteridae: *Barbitistes* sp.

Gryllidae: *Acheta domesticus*

**Caelifera:** Acrididae: 1. Locustinae: *Locusta migratoria*, *Oedipoda caerulescens*, *Sphingonotus sphaerulans*, *Locustinae sp.* 2. Gomphocerinae: *Corthippus montanus*, *C. parallelus*, *C. ventralis*, *C. mollis*, *C. albomarginatus*, *C. brunneus*, *Chrysocharon brachyptera*, *Gomphocerus rufus*, *Omocestus viridulus*, 3. Catantopinae: *Calliptamus sp.*, *Calliptamus italicus*, 4. Cyrtacanthacridinae: *Schistocerca gregaria*  
Tetrigidae: *Tetrix subulata*, *Tetrix undulata*  
Pamphagidae: *Prionotropis hystrix*

**Phasmida:** *Carausius morosus*

**Homoptera** (Auchenorrhyncha): *Pezzotettix sp.*

**Heteroptera:** *Gerris lacustris*, *Platyerus bipunctatus*

**Planipennia:** *Chrysoperla sp.*

**Coleoptera:** *Tenebrio molitor*, *Tribolium confusum*, *Cetonia sp.*, *Pachynoda marginata*

**Hymenoptera:** *Camponotus vagus*, *Apis mellifera*

**Lepidoptera:** *Manduca sexta*, *Antheraea polyphemus*, *Antheraea pernyi*

**Diptera:** *Calliphora vomitoria*, *Musca sp.*, *Drosophila melanogaster*

## Crustacea

**Decapoda:** (Natantia): *Palaemon serratus*

**Notostraca:** (Branchiopoda): *Triops cancriformis*

**Isopoda:** (Malacostraca): *Oniscus asellus*

**Amphipoda:** *Gammarus sp.*

## 3.11 Chemikalien und Lösungen

### Einzelzellfärbungen

- DMF (Dimethylformamid)
- Lithiumacetat 2M
- Luzifer Yellow CH (Sigma)
- DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorat, Molecular Probes)

### Immunhistochemie

- Agarose Type 1-A (Sigma)
- BSA (bovine serum albumin; Sigma)
- FCS (fetal calf serum; Sigma)
- FCS-Blocker: 5% FCS in PBT
- Fischgelatine (Roth)
- Formaldehyd p.a. (Roth)
- Formalin 37% (Roth)
- Glycerol (Roth)
- NGS (normal goat serum; Sigma)
- NGS-Blocker: 5% NGS in PBT
- Pipes (Piperazine-N,N'-bis-2-ethanesulfonic acid; Sigma)
- Pipes-FA: 100mM Pipes, 2mM EGTA, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 3,7% Formalin; pH 7,0
- PBS: 1,86mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 8,41mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 175mM Natriumchlorid (NaCl), Aqua dest., pH 7,4
- PBT: PBS, 0,1% Triton-X 100, 0,1% BSA
- Sigma FAST DAB Tabletten (Sigma)
- Triton-X100 (Sigma)



### Bromodeoxyuridin Aufnahme

- BSA (bovine serum albumin; Sigma),
- 5-Bromodeoxyuridin (BrdU; Sigma)
- HCl 2N (Sigma)
- 20-Hydroxyecdysen (Sigma)
- Insektenmedium:
  - Mitsubishi and Marmarosch insect medium, 10% NGS, 5 µl/ ml Penicillin-Streptomycin, 150 µl/l 20-Hydroxyecdysen
- Mitsubishi and Marmarosch Insect Medium (Sigma)
- NGS (normal goat serum; Sigma)
- NGS-Blocker 5% (siehe Immunhistochemie 3.11.1)
- Penicillin-Streptomycin (Sigma)
- Pipes-FA (siehe Immunhistochemie 3.11.1)
- Sigma Fast DAB Tabletten (Sigma)
- Triton-X100 (Sigma)
- PBS (siehe Immunhistochemie 3.11.1)

### Histologie

- Aceton p.a. (Roth)
- Cobaltchlorid (Sigma)
- Epon 812 (siehe Elektronenmikroskopie 3.11.5)
- Ethylgallat (Ethyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, Merck)
- Glutardialdehyd 25% (Sigma)
- Osmiumtetroxid 2% in PBS (Sigma)
- PBS (siehe Immunhistochemie 3.11.1)

### Elektronenmikroskopie

- Aceton p.a. (Roth)
- Cacodylat-Stammpuffer 0,2M, pH 7,3
- Cacodylsäure-dinatriumsalz (Sigma)
- Epon 812(Roth):
  - Stammlösung A: Glycidether 100, 62ml + DBA, 100ml
  - Stammlösung B: Glycidether 100, 100ml + MNA 89ml
  - hart: A:B = 3:2
  - weich: A:B = 7:1
- Ethanol p.a. (Roth)
- Glutaraldehyd 25% (Sigma)
- LR-White hart (Plano R1280)
- Osmiumtetroxid 2% (Sigma)

### 3.12 Abkürzungen

1°com	"primary commissure"	PC	Protocerebrum
a	anterior	pCC	"posterior corner cell"
aCC	"anterior corner cell"	pCom	"posterior commissure"
aCom	"anterior commissure"	PCP	"primary commissure pioneers"
AcP	"anterior commissure pioneer"	ped	Pedunculus der Pilzkörper
act	"accessory tract"	pFas	posteriorer Faszikel
agt	"antennal glomeruli tract"	pFas XVII	posteriorer Faszikel XVII
Al	Antennenlobus	PI	Pars Intercerebralis
α-lobe	α-Lobus der Pilzkörper	pn	Perineurium
An	Antenne	SCN	"secondary commissure neurons"
aCom II, V	"anterior commissures II, V"	S1	"first subesophageal neuromere"
β-lobe	β-Lobus der Pilzkörper	STG	stomatogastrisches Ganglion
BrdU	5-Bromodeoxyuridin	stom	Stomodeum
CB	Zentralkörper ("central body")	TC	Tritocerebrum
CC	Corpora cardiaca	TRITC	Tetramethyl rhodamine isothiocyanate
ccnr	"corpora cardiaca nerve root"	Typ1-3	"cell types 1 - 3 of the median neurosecretory cells"
coc	circumösophageale Konnektive	vCom VI	"ventral commissure VI"
com	Kommissur ("commissure")	vMD	"ventral median domain"
d	dorsal	vFas	ventrale Faszikel
DC	Deutocerebrum	v	ventral
dcom XVII	"dorsal commissure XVII"	vcom	"ventral commissures"
dFas	dorsales Faszikel	vm	Vitellinmembran
dMD	"dorsal median domain"	VNC	ventrales Nervensystem
dt	"dorsal tract"	X	zweites optisches Chiasma
dtm	"dorsal tegumentary nerve"		
fg	Frontalganglion		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat		
gl	Gliazelle		
HRP	Meerrettichperoxidase ("horseradishperoxidase")		
l	lateral		
La	Lamina		
LaC1-7	"Lazarillo expressing clusters 1-7"		
LC	"lateral cell"		
Lnc	"lateral neurosecretory cells"		
LPC	laterales Protocerebrum		
Lo	Lobula		
M	Mittellinie		
Me	Medulla		
MD	"median domain"		
mlt	"midline tract"		
MNB	"median neuroblast"		
mnc	"median neurosecretory cells"		
moc	medianer Ocellus		
mocnr	Nerv des medianen Ocellus		
MP	"median precursor"		
n	Nukleus		
ncc 1	Corpora cardiaca Nerv 1		
ncc 2	Corpora cardiaca Nerv 2		
NB1-3	Neuroblasten 1-3 der Pars Intercerebralis"		
ocg	"ocellar giant neurons"		
ocn	"ocellar nerve"		
OL	Lobus opticus		
ot	"oblique tract"		
PB	protocerebrale Brücke		