

4 Ergebnisse

4.1 Die "median domain" in der Mittellinie des embryonalen Heuschreckengehirns

4.1.1 Die "median domain" als eigenständiger Cluster im Gehirn

Die "median domain" (MD) repräsentiert einen eigenständigen Cluster von Zellen im Bereich der Mittellinie des embryonalen Gehirns der Heuschrecke, anterior zum Stomodeum und zwischen den beiden Loben der Pars Intercerebralis (Abb. 1).

In der frühen Embryonalentwicklung, vor 25%, durchzieht im Bereich der Mittellinie ein Streifen aus weitgehend undifferenzierten ektodermalen Zellen das Gehirn von anterior nach posterior. Dieser Bereich, die "median domain", ist von den lateral liegenden Gehirnbereichen der beiden Hemisphären durch Gliazellen abgetrennt, die das gliaspezifische Antigen REGA-1 exprimieren (Boyan et al., 1995a). Diese Gliagrenzen verhindern während der frühen Entwicklung die Migration von Zellen aus der MD oder in sie hinein. Ein besonderes Merkmal der MD bei 25% der Embryonalentwicklung ist, dass die Längsachsen der Zellen alle dieselbe dorso-ventrale Orientierung haben, und damit senkrecht zur neuronalen Achse liegen. Bei circa 28% der Embryonalentwicklung beginnen Zellen im posterior-dorsalen Bereich der MD die Orientierung ihrer Zellachse zu verändern. Ab diesem Zeitpunkt kann man die "median domain" in zwei Teilbereiche untergliedern, die "ventral median domain" (vMD) und die "dorsal median domain" (dMD, Abb. 1B). Die Zellen in der vMD behalten dabei die ursprüngliche dorso-ventrale Orientierung ihrer Achsen bei. In dieser Orientierungsrichtung, senkrecht zur neuronalen Achse, findet in der vMD auch die Einwanderung von Zellen aus dem Ektoderm statt (Abb. 2B). In der dMD hat sich dagegen die Orientierung der Zellachsen in anterior-posteriore Richtung gedreht und ist jetzt parallel zur neuronalen Achse.

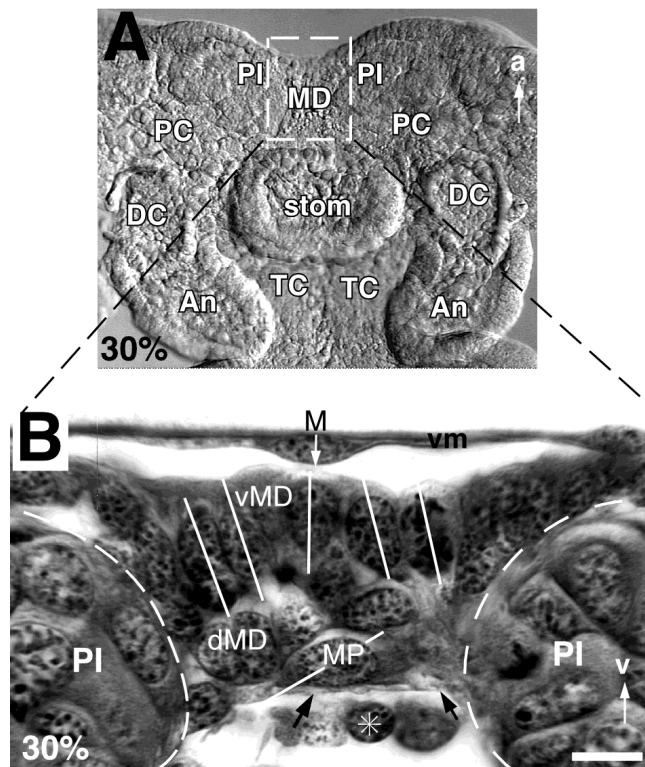


Abb. 1. Die "median domain" (MD) im embryonalen Gehirn der Heuschrecke. **A:** Die Übersicht zeigt den Kopf eines Heuschreckenembryos bei 30% Embryonalentwicklung. Das Gehirn unterteilt sich in die folgenden Regionen: "median domain" (MD), Pars Intercerebralis (PI), Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC). Dazu sind die Antennenanlagen (Ant) und das Stomodeum (stom) zu erkennen. Der Orientierungspfeil zeigt nach anterior (a). **B:** Das Bild zeigt die in A weiß umrandete MD bei höherer Vergrößerung im selben Alter in einem histologischen Schnitt. Die MD gliedert sich in einen ventralen (vMD) und einen dorsalen (dMD) Bereich, deren Zellen sich jeweils durch die Orientierung ihrer Längsachsen unterscheiden (weiße Linien). Die Längsachsen der Zellen in der vMD verlaufen in dorsoventraler Richtung, senkrecht zur neuronalen Achse. Die Achsen der Zellen in der dMD verlaufen anterior-posterior, parallel zur neuronalen Achse (senkrecht zur Bildebene). Die neuronale Achse verläuft senkrecht zur Papierebene. Die weißen, gestrichelten Linien markieren die medianen Grenzen der PI, der Stern zeigt eine Gliazelle, die zur Bildung der Basalmembran (schwarze Pfeile) beiträgt. Das Gehirn bzw. der Embryo ist von einer Vitellinmembran (vn) umgeben. (MP, "median precursor"). Die Orientierungspfeile zeigen die Mittellinie des Gehirns (M) und die Orientierung nach ventral (v) an. Maßstab: A = 100µm, B = 20µm.

Intrazelluläre Färbungen des "median precursors" (MP), der einzigen Vorläuferzelle in der dMD zeigen, dass er seine Tochterzellen in Richtung dieser neuen von anterior nach posterior verlaufenden Achse bildet (vgl. Abb. 6C) und dass in diesem Fall die Zellachse auch der Teilungsachse der Zelle entspricht.

Die Zellen in den beiden Teilen der "median domain" bilden voneinander unabhängige Strukturen aus. Die Zellen in der vMD differenzieren sich zu peripheren sensorischen Organen wie zum Beispiel dem medianen Ocellus oder den medianen Haarfeldern, deren Axone entweder über den Nerv des medianen Ocellus oder den "dorsal tegumentary nerve" mit dem Gehirn verbunden sind (vgl. Abb. 9). Die bisher identifizierten Zellen aus der dMD wie zum Beispiel die "primary commissure pioneers" oder die "lateral cells" entwickeln sich zu Interneuronen, deren Axone zum ventralen Nervensystem absteigen (Abb. 9, 20, Kapitel 4.2 und 4.3). Darüber hinaus gibt es in der dMD weitere Zellen, deren genaue Entwicklung bisher nicht untersucht wurde.

4.1.2 Zellproliferation in der "median domain"

Die Aufnahme von Bromodeoxyuridin (BrdU) in die Zelle ist eine Möglichkeit, um mitotisch aktive Zellen in Geweben nachzuweisen. BrdU ist ein Basenanalogen, das von mitotisch aktiven Zellen bei der Teilung in die DNA eingebaut wird und das sich immunhistochemisch nachweisen lässt. Embryonen unterschiedlicher Altersstadien wurden in BrdU inkubiert und anschließend mit einem anti-BrdU-Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Mitotisch aktive Zellen finden sich im peripheren Bereich der vMD (Abb. 2A, B) an der Oberfläche des Gehirns. Aus dieser Region delaminieren Zellen entlang von filopodienartigen Zellfortsätzen nach innen (dorsal). Ein vergleichbarer Prozess wird von Locke und Huie (1981) für epidermale Zellen beschrieben. Die Einwanderungsrichtung der Zellen entspricht auch ihrer Teilungsrichtung (vgl. Kapitel 4.1.1, Abb.1). Diese einwandernden Zellen bilden einen Zellcluster zwischen den beiden Gehirnhemisphären und formen später periphere sensorische Bestandteile wie den medianen Ocellus. Die Entwicklung der "ventral median domain" soll hier aber nicht weiter verfolgt werden (vgl. Mobbs, 1976; Goodman, 1981).

In der "dorsal median domain" zeigt die BrdU-Aufnahme bei 25% und 30% der Embryonalentwicklung eine einzige proliferierende Zelle, den "median precursor" (MP), der sich aus dem umgebenden ektodermalen Gewebe heraus entwickelt hat (Abb. 2A, C). In der dMD zeigt die BrdU-Aufnahme im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung keine weitere Vorläuferzelle.

Bis zu 33% der Embryonalentwicklung hat der MP drei Abkömmlinge in posteriorer Richtung entlang der neuronalen Achse gebildet (Abb. 2D). Die Tochterzellen werden durch inequale Teilung direkt vom MP gebildet und entstehen nicht über eine Gangliengliemutterzelle wie bei den Neuroblasten der Gehirnhemisphären. Die Teilungsrichtung des MP entspricht dabei seiner Längsachse und steht nicht senkrecht zu ihr wie es für die Neuroblasten der Ventralganglien typisch ist (Abb. 1). Posterior zum MP und symmetrisch auf beiden Seiten der Mittellinie angeordnet liegen die beiden Paare der bereits früher identifizierten "primary commissure pioneers" (PCP, Boyan et al., 1995a). Da sich zwischen 25% und 35% der Embryonalentwicklung in der dMD keine anderen Vorläuferzellen außer dem MP nachweisen lassen (Abb. 2C, D) und die PCP Neuronen zu keinem Zeitpunkt mit einer anderen Zelle gekoppelt sind (Abb. 5, 6, 7, 18) wird angenommen, dass sie sich direkt aus dem Ektoderm entwickeln. Gleiches gilt für die in den Abbildungen 3 und 7 gezeigten "lateral cells" (LC), die ebenfalls bereits von Boyan et al. (1995a) in der Mittellinie des Gehirns identifiziert wurden. Es lässt sich auch für sie weder eine Vorläuferzelle in der dMD nachweisen noch sind sie zu irgendeinem Zeitpunkt mit einer anderen Zelle gekoppelt (Abb. 7). Ein vergleichbarer Entwicklungsmodus wurde

von Dumstrei et al. (1998) für Zellen mit mesektodermaler Herkunft in der Mittellinie des Gehirns von *Drosophila* beschrieben.

Die Experimente zur Kopplung von Zellen im Bereich der Mittellinie (Abb. 5, 6, 7, 18) weisen darauf hin, dass sich die Entwicklung der Zellen in der dMD und auch der dMD selbst unabhängig von der Entwicklung in der vMD und den beiden Gehirnhemisphären vollzieht.

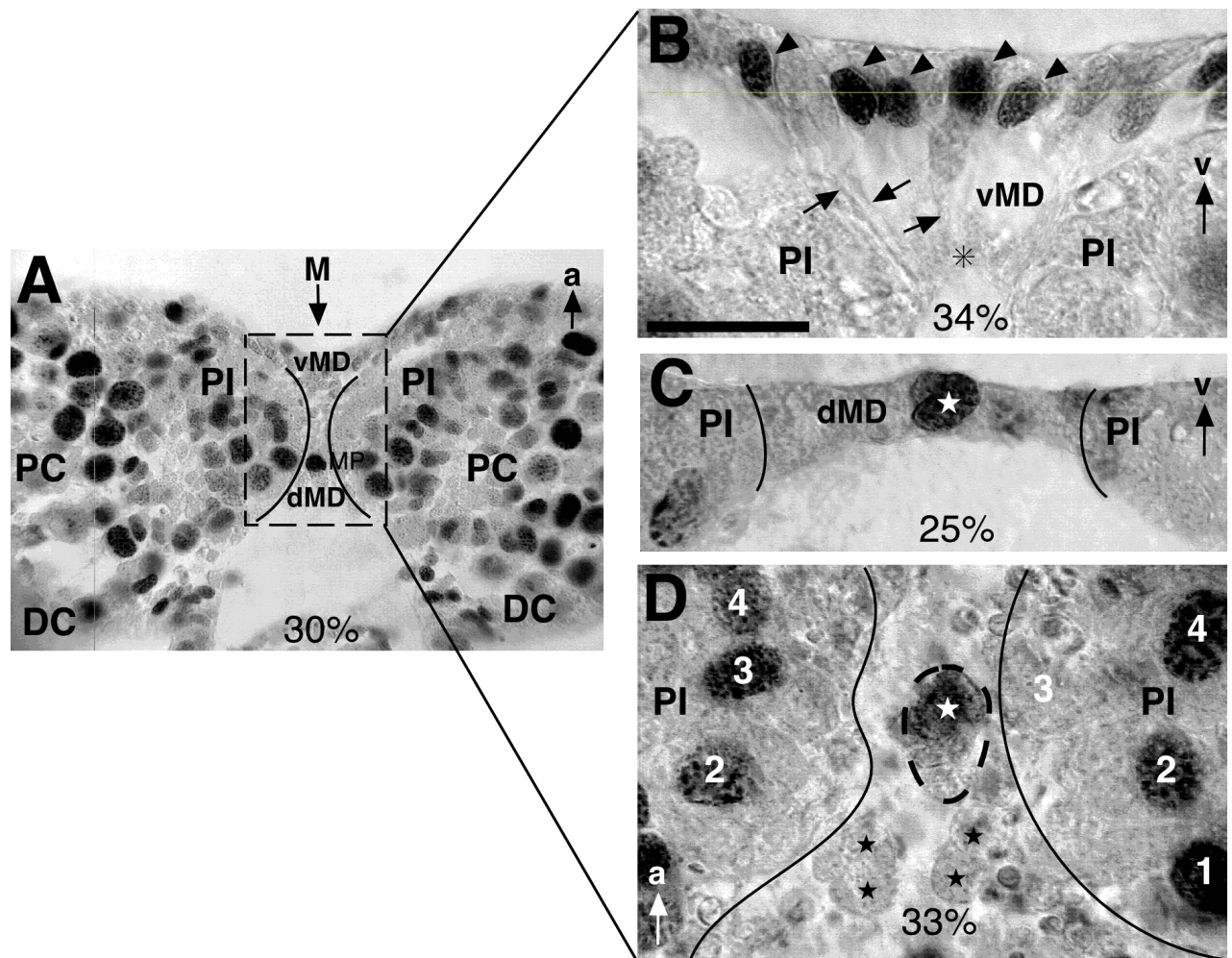


Abb. 2. Zellproliferation in der "median domain". **A:** Horizontalschnitt durch das Gehirn eines Embryos bei 30% Embryonalentwicklung. Die dunkel gefärbten Zellen haben bei Mitosen Bromodeoxyuridin (BrdU) aufgenommen wie z.B. der "median precursor" (MP) in der "dorsal median domain". Die schwarz umrandete Region wird in den Bildern C - D bei höherer Vergrößerung und für unterschiedliche Altersstadien gezeigt. Die medianen Grenzen der Pars Intercerebralis (PI) sind jeweils durch schwarze Linien markiert. (M) zeigt die Mittellinie, die Pfeile die Orientierungen nach anterior (a) und ventral (v). **B:** Bei 34% Embryonalentwicklung finden sich BrdU markierte ektodermale Zellen in der vMD (Pfeilspitzen), die mitotisch aktiv sind. Im Verlauf der Embryonalentwicklung lösen sich Zellen aus dem Ektoderm und wandern entlang von Zellfortsätzen (schwarze Pfeile) nach posterior (Stern) ins Innere. Später bilden Zellen aus dieser Region den medianen Ocellus. **C:** Bei 25% Embryonalentwicklung findet sich in der dMD als einzige proliferierende Zelle (markiert durch die BrdU Aufnahme) der "median precursor" (Stern). **D:** Ein Vertikalschnitt durch das Gehirn bei 33% zeigt den nach wie vor mitotisch aktiven "median precursor" (weißer Stern) mit seinen Abkömmlingen (gestrichelte Linie) sowie die beiden bilateral der Mittellinie liegenden ungefärbten Paare der "primary commissure pioneers" (PCP, schwarze Sterne). Mitotisch aktiv sind auch die Neuroblasten 1, 2, 3 und 4 der beiden Loben der Pars Intercerebralis. Maßstab: A = 100µm, B, C, D = 50µm.

4.1.3 Identifizierte Zellen in der "dorsal median domain"

In der "dorsal median domain" sind bisher folgende Zellen identifiziert worden (Abb. 3; Boyan et al., 1995a): Der "median precursor" (MP) und seine Abkömmlinge, die "primary commissure pioneers" (PCP) und die "lateral cells" (LC). Ob die "secondary commissure pioneers" (SCN) zur dMD zählen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Abbildung 3 zeigt die genannten Zellen und ihre Lage zueinander bei 34% Embryonalentwicklung in der dMD in einem histologischen Präparat. Der MP und seine Abkömmlinge liegen exakt in der Mittellinie des Gehirns. Lateral vom MP befinden sich die beiden "lateral cells" (LC) direkt an der Gliagrenze zur Pars Intercerebralis (PI) und bilden ein nach lateral auswachsendes Axon. Weiter posterior liegen die paarigen PCP Neuronen, welche die "primary commissure" (1°com) im Gehirn etablieren (Boyan et al., 1995a). Das bedeutet, diese Zellen bauen durch ihre Axone die erste Verbindung zwischen den beiden Gehirnhemisphären auf. Da die dMD von den beiden Loben der Pars Intercerebralis durch eine Schicht von Gliazellen getrennt ist, findet keine Migration von Zellen zwischen diesen beiden Bereichen des Gehirns statt.

Die vMD besteht bei 34% Embryonalentwicklung nach wie vor aus undifferenzierten ektodermalen Zellen, während sich in der dMD wie beschrieben bereits identifizierbare differenzierte Zelltypen entwickelt haben.

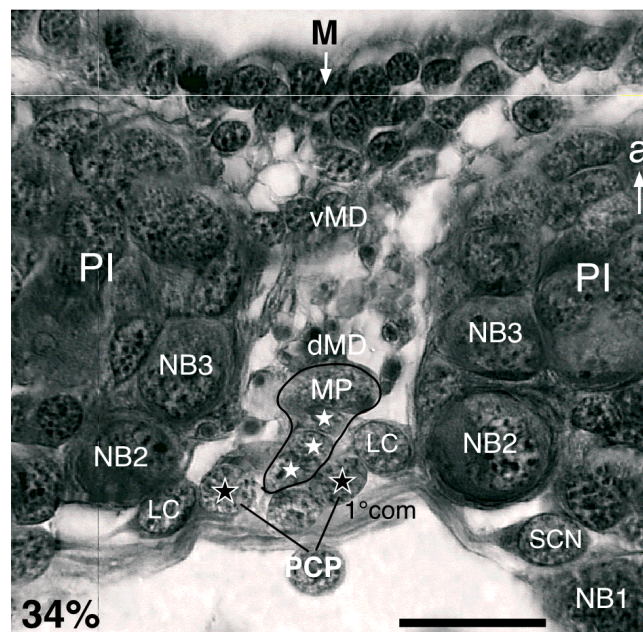


Abb. 3. Identifizierte Zellen in der "dorsal median domain" (dMD). Die Montage aus mehreren histologischen Schnitten zeigt, dass die "median domain" in die ventrale und die dorsale MD unterteilt ist. Auf beiden Seiten der MD liegen die Loben der Pars Intercerebralis. Die dMD setzt sich aus folgenden identifizierten Zellen zusammen: Der "median precursor" (MP) und seine Abkömmlinge (schwarze Linie und weiße Sterne) finden sich in der Mittellinie (M) des Gehirns. Lateral von ihm liegen an der Grenze zur PI die "lateral cells" (LC) und weiter posterior nahe der "primary commissure" (1°com) die beiden Paare der "primary commissure pioneers" (PCP, schwarze Sterne). Weiter lateral zwischen den Neuroblasten 1 und 2 der PI entwickeln sich die paarigen "secondary commissure pioneers" (SCN), deren Abstammung noch nicht genau geklärt ist. Der Orientierungspfeil markiert anterior (a). Maßstab: 30µm.

4.1.4 Neuronaler Charakter der Zellen in der "dorsal median domain"

Um zu bestimmen, ob es sich bei den identifizierten Zellen in der dMD um Neuronen handelt, wurden Färbungen mit einem Antikörper gegen Meerrettichperoxidase (HRP; Jan und Jan, 1982; Snow et al., 1987) durchgeführt. Meerrettichperoxidase wird ausschließlich von Neuronen exprimiert und dient damit als neuronaler Marker. Abbildung 4A zeigt bei 35% Embryonalentwicklung eine Expression von Meerrettichperoxidase sowohl in den Zellkörpern als auch in den Axonen der "primary commissure pioneers" (PCP) und der "lateral cells" (LC). Dieses Ergebnis bestätigt die durch Boyan et al. (1995a) beschriebene HRP-Expression durch die "primary commissure pioneers". In diesem Alter ist der "median precursor" (MP) mit seinen Abkömmlingen zwar schon vorhanden (vgl. Abb. 3), zeigt aber noch keine Meerrettichperoxidase-Expression. Bei 42% Embryonalentwicklung (Abb. 4B) exprimieren dann auch die Abkömmlinge des MP Meerrettichperoxidase ebenso wie die PCP. Diese Expression weist sie damit, zusammen mit den PCP und LC, ebenfalls als Nervenzellen aus. Bis 42% sind die PCP Neuronen bereits deutlich gewachsen und senden ihre Axone nach dorsal und posterior, bevor sie die Mittellinie zur contralateralen Seite überqueren (vgl. Abb. 18, 19).

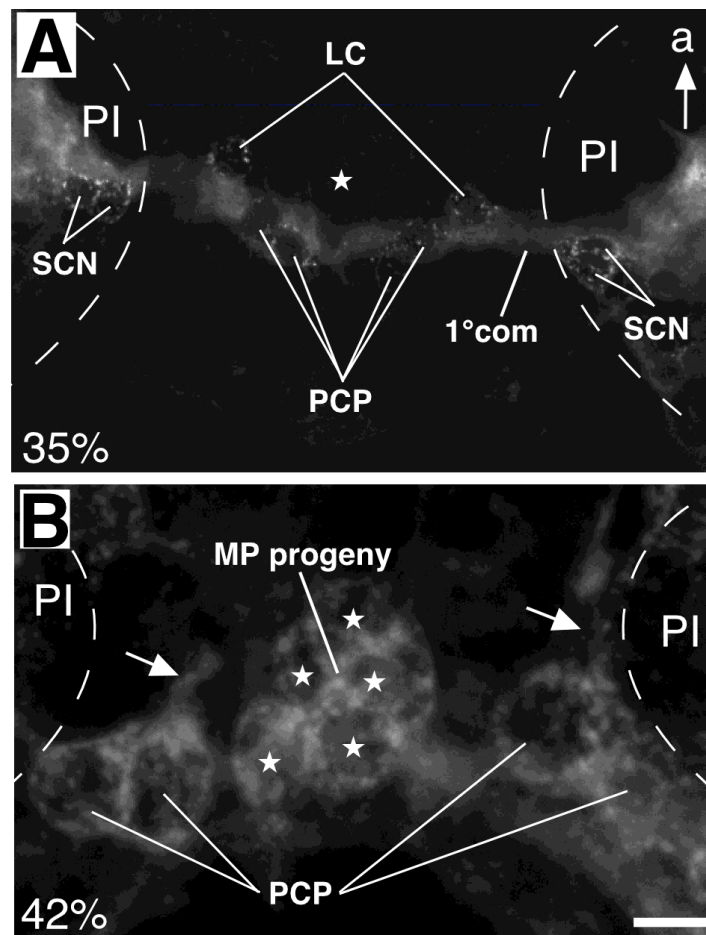


Abb. 4. Färbungen gegen Meerrettichperoxidase (HRP) zeigen die neuronale Identität der Zellen in der dMD. **A:** Bei 35% Embryonalentwicklung sind die "lateral cells" (LC), die "primary commissure pioneers" (PCP) und die "secondary commissure pioneers" (SCN) innerhalb der dMD HRP-immunoreaktiv. Der "midline precursor" und ein Teil seiner Abkömmlinge sind in diesem Alter zwar schon vorhanden, zeigen aber keine HRP-Immunoreaktivität. Die Axone in der "primary commissure" (1°com) sind als feines helles Band zu erkennen und exprimieren ebenfalls HRP. Die Grenzen der Pars Intercerebralis sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Der Orientierungspfeil markiert anterior (a) in beiden Abbildungen. **B:** Bei 42% Embryonalentwicklung exprimieren nun auch die Abkömmlinge des "midline precursors" (Sterne) HRP. Lateral von ihnen, an den Grenzen zur PI (gestrichelte Linien), liegen die nun größeren und nach wie vor HRP-immunoreaktiven PCP Neuronen, deren Axone nach anterior wachsen (Pfeile). Maßstab: A = 30µm, B = 20µm.

4.1.5 Abstammung der Zellen in der "dorsal median domain"

Goodman und Spitzer (1979) konnten nachweisen, dass Zellen die von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen, über einen gewissen Zeitraum miteinander und mit ihrer Vorläuferzelle gekoppelt sind. Das bedeutet, dass ihr Cytoplasma nach wie vor noch in Kontakt steht. Eine solche Kopplung von Zellen lässt sich unter anderem über die intrazelluläre Füllung der Zellen mit diffundierenden Farbstoffen nachweisen. Um zu zeigen, welche der Zellen in der dMD einen gemeinsamen Ursprung haben (vgl. Kapitel 4.1.2) und ob es zelluläre Verbindungen zu den benachbarten Regionen gibt, wurden der "median precursor" (Abb. 6), die "primary commissure pioneers" (Abb. 18), die "lateral cells" (Abb. 7) und verschiedene Neuroblasten in der Pars Intercerebralis (Abb. 5) mit Luzifer Yellow gefüllt oder DiI auf ihre Zellmembranen appliziert. Beide Methoden ergaben vergleichbare Resultate. Aus diesem Grund werden hier nur die Ergebnisse mit Luzifer Yellow dargestellt.

Einzelzellfärbungen von Neuroblasten (NB) in der Pars Intercerebralis (PI)

Die intrazelluläre Füllung von Neuroblast 1 (NB 1) in der PI bei 35% färbt den Neuroblasten zusammen mit seinen nach lateral gerichteten Abkömmlingen (Abb. 5A). Jedoch ist keine andere Zelle in der Pars Intercerebralis (PI) oder in der "dorsal median domain" (dMD) mit NB1 gekoppelt. Die Füllung von NB 2 im gleichen Alter (Abb. 5B) zeigt nur den Neuroblasten selbst, der bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Tochterzellen gebildet hat. Außerdem gibt es keine Kopplung mit anderen Zellen in der PI oder der dMD. Eine vergleichbare Situation ergibt sich für NB 3 (Abb. 5C), der bei 37% bereits 4 Abkömmlinge gebildet hat, aber mit keiner weiteren Zelle oder einem Neuroblasten in der PI oder der dMD gekoppelt ist. Dieses Fehlen von Kopplungen zwischen Zellen der PI und der dMD wurde in verschiedenen Präparationen zwischen 32% und 38% der Embryonalentwicklung sowohl mit Luzifer Yellow als auch mit DiI bestätigt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zellen in der dMD eine von den Gehirnhemisphären unabhängige Entwicklung durchlaufen.

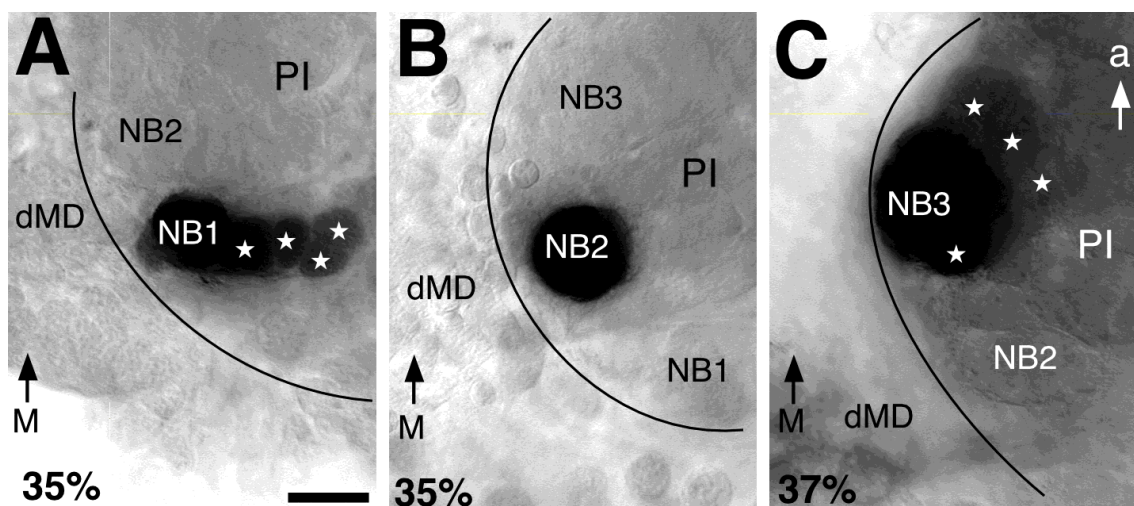


Abb. 5. Einzelzellfärbungen mit Luzifer Yellow von Zellen in der Pars Intercerebralis (PI). Die Bilder A bis C zeigen Teile der dMD und der benachbarten rechten Hemisphäre der PI. Ausgewählte Zellen wurden jeweils mit Luzifer Yellow gefüllt und anschließend mit einem anti-Luzifer Yellow-Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen. **A:** 35% Embryo. Die Färbung von Neuroblast 1 der PI zeigt diese Zelle selbst sowie die Reihe ihrer Tochterzellen (Sterne) nach lateral. Keine anderen Zellen, weder in der PI noch in der dMD wurden mit angefärbt. **B:** Die Füllung von Neuroblast 2 der PI zeigt nur die Zelle selbst. Keine weiteren Zellen sind mit ihr gekoppelt. NB 2 hat bei 35% Embryonalentwicklung noch keine Abkömmlinge gebildet. **C:** 37% Embryo. Die Füllung von NB3 mit Luzifer Yellow zeigt auch nur den Neuroblasten, diesmal zusammen mit seinen nach lateral gebildeten Tochterzellen (Sterne) in der PI. Keine weiteren Zellen in der PI oder dMD sind mit ihm gekoppelt. Der Orientierungspfeil zeigt für alle Bilder nach anterior (a), (M) markiert die Mittellinie. Maßstab: 20µm.

Einzelzellfärbungen des "median precursors" (MP)

Die Entwicklung von Zellen in der dMD wurde durch die Füllung von identifizierten Zellen mit Luzifer Yellow sowie durch die Analyse von histologischen Präparaten verfolgt. Abbildung 6A zeigt den "median precursor" (MP) mit einem Teil seiner Abkömmlinge in einer histologischen Färbung in der Mittellinie des Gehirns. Die kondensierten Chromosomen im MP weisen darauf hin, dass er bei 37% nach wie vor mitotisch aktiv ist. Intrazelluläre Füllungen des MP bei 35% (Abb. 6B) und 40% (Abb. 6C) zeigen die Kopplung des MP mit seinen Tochterzellen. Bis 35% bildet er 3 Tochterzellen, bis 40% sind mindestens 4 entstanden. Der "median precursor" ist aber nie mit den "primary commissure pioneers" (PCP) oder den "lateral cells" über Luzifer Yellow gekoppelt.

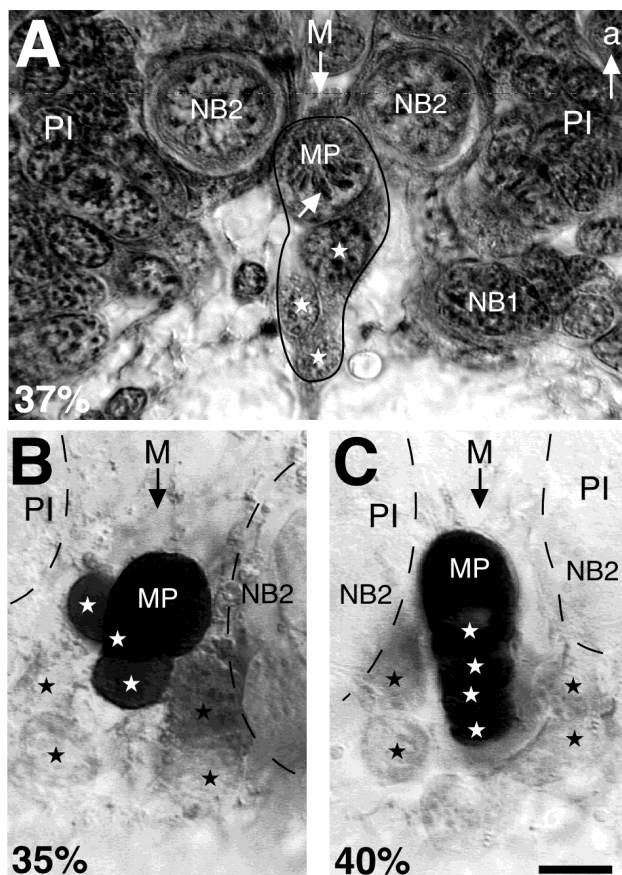


Abb. 6. Einzelzellfärbungen mit Luzifer Yellow von Zellen in der dMD. **A:** Der histologische Schnitt durch das Gehirn bei 37% Embryonalentwicklung zeigt den "median precursor" und seine Tochterzellen (Sterne und schwarze Linie). Beiderseits liegen die identifizierten Neuroblasten 1 und 2 der PI. Das kondensierte Chromatin im Kern des "median precursors" zeigt, dass er noch teilungsaktiv ist. Der Orientierungspfeil weist für alle Bilder nach anterior (a). **B:** Der "median precursor" und seine Tochterzellen bei 35% Embryonalentwicklung nach der Injektion von Luzifer Yellow in den "median precursor". Die Färbung wurde anschließend mit einem anti-Luzifer Yellow-Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen. Der "median precursor" (MP) ist nur mit seinen 3 Abkömmlingen (weiße Sterne) gekoppelt, nicht jedoch mit anderen Zellen in der dMD wie den benachbarten PCP Neuronen (schwarze Sterne) oder Zellen in der PI. Die mediane Grenze der PI ist in den Bildern B und C mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. **C:** Die Färbung des "median precursors" und seiner Abkömmlinge bei 40% entspricht der Beschreibung im Bild B bei 35% Embryonalentwicklung. Der MP hat inzwischen eine vierte Tochterzelle (weiße Sterne) gebildet, ist aber auch hier nicht mit anderen Zellen in der dMD, wie den PCP Neuronen (schwarze Sterne), oder Zellen der PI gekoppelt. Maßstab: 20µm.

Einzelzellfärbungen der "primary commissure pioneers" (PCP)

Die Luzifer Yellow Färbungen der PCP Neuronen werden in Abbildung 18 zusammen mit der weiteren Entwicklung der PCP Neuronen dargestellt (vgl. Kapitel 4.3). Sowohl bei 30% als auch bei 39% der Embryonalentwicklung sind die beiden PCP Schwesterzellen miteinander gekoppelt (Abb. 18), aber zu keinem Zeitpunkt mit dem "median precursor" (Abb. 6). Darüber hinaus konnte zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung nach 30%, wenn sich die PCP Neuronen eindeutig identifizieren lassen, eine für sie spezifische Vorläuferzelle gefärbt werden. Das weist darauf hin, dass sich die PCP Neuronen und der MP unabhängig voneinander entwickeln. Außerdem kann man daraus folgern, dass die PCP Neuronen direkt aus dem Ektoderm der dMD entstehen.

Einzelzellfärbungen der "lateral cells" (LC)

In verschiedenen Altersstadien wurden die "lateral cells" (LC) mit Luzifer Yellow gefüllt, um eine mögliche Vorläuferzelle für sie zu identifizieren (Abb. 7). Die Farbstoffinjektion bei 28% Embryonalentwicklung kurz nach der Entstehung der LC (vgl. Kapitel 4.2.4.2) zeigt nur die LC selbst, ihr Axon und den Wachstumskegel (Abb. 7A). Keine anderen Zellen in der dMD oder in der benachbarten PI waren mit der LC gekoppelt. Eine wichtige Beobachtung ist, dass weder der MP in diesem Altersstadium schon Abkömmlinge gebildet hat noch die "primary commissure" gebildet wurde (Boyan et al., 1995b). Die Füllung der LC bei 33% Embryonalentwicklung zeigt erneut nur die Zelle selbst und ihr Axon, das entlang der Gliagrenze zur PI nach lateral auswächst. Wiederum gibt es keine Kopplung zu anderen Zellen in der PI oder der dMD. Ein vergleichbares Bild ergibt die Färbung der LC bei 37% Embryonalentwicklung. Inzwischen hat sich der Wachstumskegel nach posterior gewendet.

Die Ergebnisse zeigen auch für die "lateral cells" keine über Zellkopplung identifizierbare Vorläuferzellen. Es wird daher angenommen, dass auch sie sich ohne eine Vorläuferzelle direkt aus dem Ektoderm differenzieren. Weiter zeigt das Fehlen von Kopplung mit anderen Zellen ein für die LC von den anderen Zellen unabhängiges Entwicklungsprogramm an.

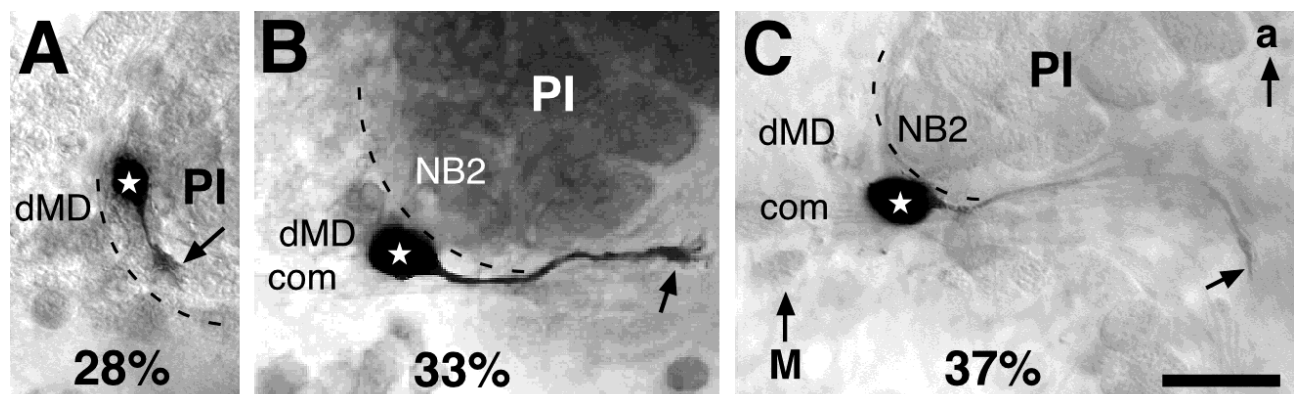


Abb. 7. Einzelzellfärbungen der "lateral cells" (LC) mit Luzifer Yellow. **A:** Luzifer Yellow Injektion bei 28% Embryonalentwicklung in die "lateral cell" (weißer Stern) zeigt die Zelle und ihren Wachstumskegel (Pfeil), der an der Grenze zur Pars Intercerebralis (gestrichelte Linie) entlang wächst. Keine anderen Zellen in der PI oder der "dorsal median domain" dMD sind mit der LC gekoppelt. **B:** Bei 33% Embryonalentwicklung ist das Axon (Pfeil) der LC (weißer Stern) entlang der Grenze zur PI (gestrichelte Linie) weiter nach lateral gewachsen, befindet sich aber noch in der "primary commissure" (com). Wiederum zeigt die Farbstoffinjektion keine Kopplung zu anderen Zellen. **C:** In einer weiteren Präparation bei 37% Embryonalentwicklung hat der Wachstumskegel (Pfeil) der LC (weißer Stern) die "primary commissure" bereits verlassen und wächst in posteriorer Richtung zum Deutocerebrum. Wieder sind keine anderen Zellen mit der LC gekoppelt. Der Orientierungspfeil gibt für alle Bilder anterior (a) an. Maßstab: 20µm.

4.1.6 Morphogenetische Veränderungen der "median domain"

Entwicklung identifizierter Zellen

In einem nächsten Schritt wurde die Entwicklung ausgewählter identifizierter Zellen in der "dorsal median domain" (dMD) zwischen 34% und 67% Embryonalentwicklung verfolgt (Abb. 9). Die Ergebnisse stammen aus der Analyse von histologischen Präparaten in Kombination mit der Färbung einzelner Zellen durch Injektion von Luzifer Yellow (Abb. 6, 7, 18). Obwohl der "median precursor" sich bei 25% Embryogenese bereits sehr früh in der Entwicklung differenziert (vgl. Abb. 2C),

erzeugt er danach nur insgesamt 6 Tochterzellen (Abb. 8) von denen bei 34% bereits 3 entstanden sind. Seine Tochterzellen und die beiden Paare der PCP Neuronen lassen sich bei 47% nach wie vor eindeutig identifizieren. Bemerkenswert ist, dass die PCP Neuronen inzwischen deutlich größer geworden sind (von 20µm bei 30% auf mehr als 30µm bei 47%) und ab circa 40% das TERM-1-Antigen exprimieren (Abb. 8). Der MP selbst kann mit den angewandten Methoden bei 47% nicht mehr mit Sicherheit identifiziert werden und es ist anzunehmen, dass er degeneriert ist (Abb. 9). Bis 67% Embryonalentwicklung haben die PCP im Vergleich zu den anderen Zellen in der dMD weiter an Größe zugenommen. Die grundsätzlichen Lagebeziehungen der Zellkörper zueinander haben sich dagegen im Lauf der Entwicklung nicht mehr verändert.

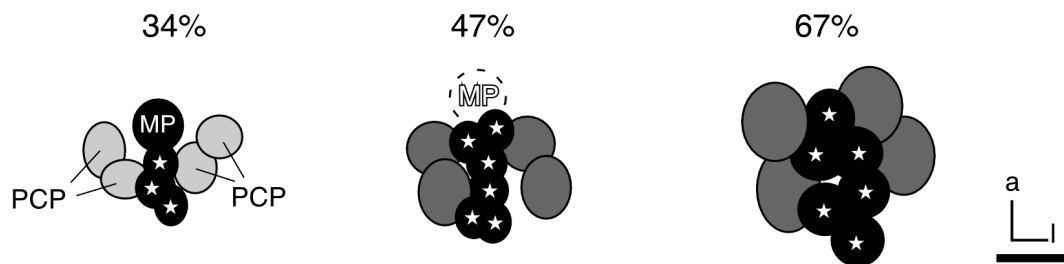


Abb. 8. Entwicklung ausgewählter Zellen der "dorsal median domain". Die Schemazeichnungen sind Rekonstruktionen histologischer Serienschritte und zeigen die PCP Neuronen (grau) und den "median precursor" (MP) mit seinen Abkömmlingen (schwarz und Sterne). Bei 34% existieren bereits 3 Tochterzellen des MP. Bis 47% hat er die vollständige Anzahl von 6 Tochterzellen (weiße Sterne) gebildet. Er selbst kann aber nicht mehr mit eindeutiger Sicherheit bestimmt werden (gestrichelter Kreis). Vermutlich ist er zu diesem Zeitpunkt bereits degeneriert. Die PCP Neuronen haben in der Zwischenzeit deutlich an Größe gewonnen und exprimieren das TERM-1 Antigen (dunkelgrau). Bis 67% sind sie weiter gewachsen, haben aber ihre Position in Relation zu den 6 Tochterzellen des "median precursors" (weiße Sterne) behalten. Die neuronalen Achsen sind anterior (a) und lateral (l). Maßstab: 30µm.

Morphogenetische Veränderungen der "median domain"

Obwohl sich die Lagebeziehungen der Zellen und ihre Zusammensetzung in der dMD nur unwesentlich verändern, kommt es in der Embryonalentwicklung zu deutlichen morphogenetischen Veränderungen der gesamten "median domain" im Gehirn (Abb. 9). Bei 34% liegt die "dorsal median domain" (dMD) posterior und dorsal in der Mittellinie des sich entwickelnden Gehirns (Abb. 9, 34%) und bildet noch eine Einheit mit der "ventral median domain" (vMD). Im Verlauf der weiteren Entwicklung trennt sich die vMD dann fast vollständig von der dMD (Abb. 9, 47%). Dabei werden die Zellen in der dMD umgruppiert und liegen nun in einer von anterior nach posterior verlaufenden Kette. Dorsal der dMD entwickelt sich die "primary commissure" (1°com), die rasch an Größe gewinnt. Aus der vMD bildet sich unter anderem der mediane Ocellus. In der weiteren Entwicklung bis ca. 70% werden die Zellen in der dMD nun in eine dorso-ventrale Achse geschoben und ihre Axone verlaufen im "midline tract" rund um den Zentralkörper (CB, Abb. 9, 67%). Bei 67% Embryonalentwicklung sind auch die vMD und die dMD nur noch über den Nerv des medianen Ocellus verbunden. Die ursprüngliche "primary commissure" hat sich enorm entwickelt und kann nun in unterschiedliche Bereiche wie die ventralen, dorsalen und posterioren Faszikel, den Zentralkörper und die protocerebrale Brücke (PB) unterteilt werden. Die Zellkörper der dMD liegen nun ventral im Gehirn, anterior des ventralen Faszikeln und ventral vom Nerv des medianen Ocellus (Abb. 9, 67%). Die Axone der PCP Neuronen und der Abkömmlinge des "median precursors" in der dMD haben eine gemeinsame Projektion im "midline tract" (mlt), der dorsal des Zentralkörpers verläuft (Abb. 10).

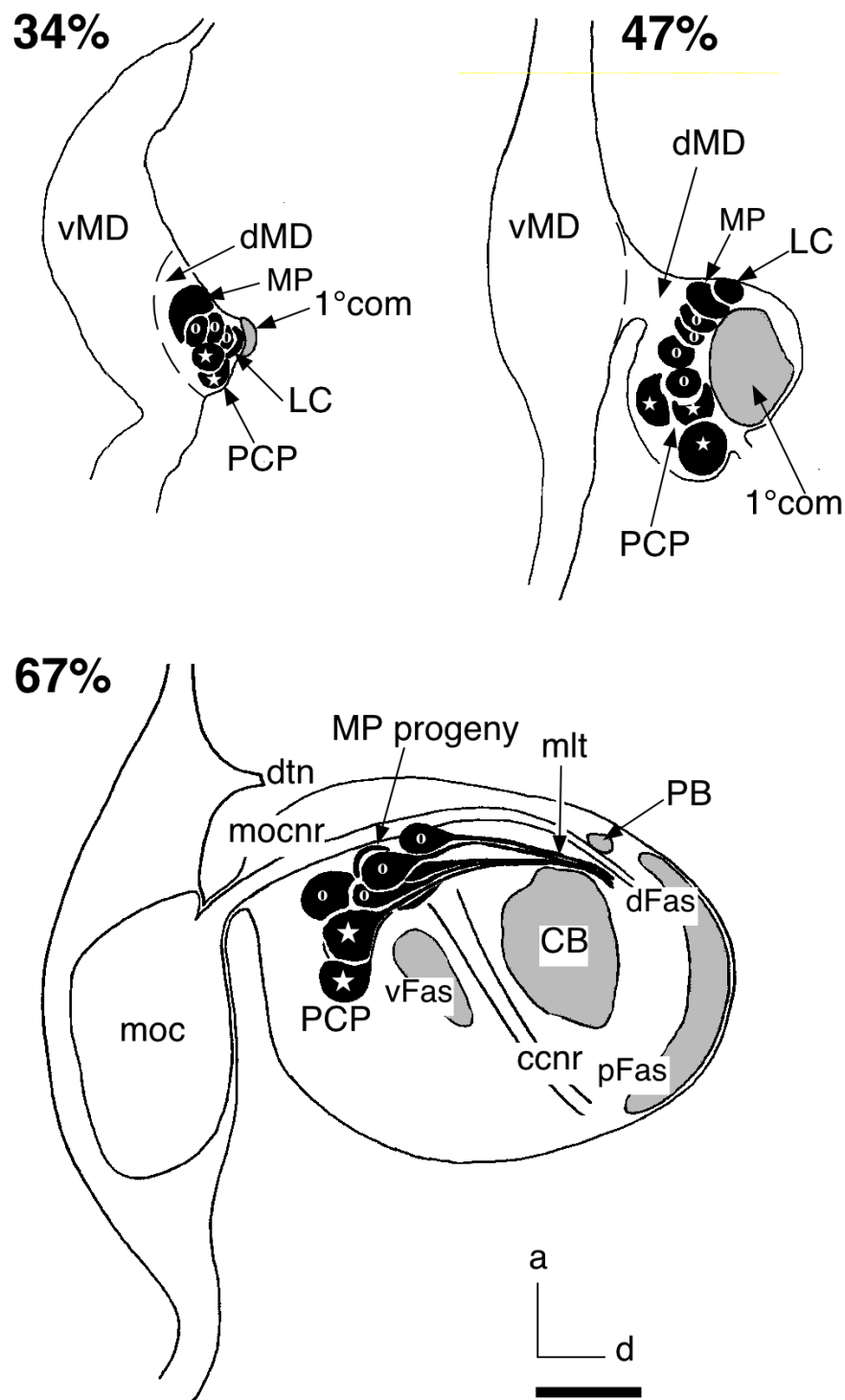


Abb. 9. Embryonale Entwicklung der "median domain". Die Zeichnungen sind Rekonstruktionen von Sagittalschnitten bei 34%, 47% und 67% Embryonalentwicklung. Die vMD und die dMD trennen sich im Verlauf der Embryonalentwicklung und sind bei 67% nur noch durch den Nerv des medianen Ocellus (mocnr) verbunden. Aus der vMD entwickeln sich der mediane Ocellus (moc) und Sinneszellfelder, die über den "dorsal tegumentary nerve" (dtn) ins Gehirn projizieren. Die Axone der "median precursor"-Tochterzellen ("MP-progeny", weiße Ringe) und die der PCP Neuronen (weiße Sterne) projizieren im "midline tract" (mlt) dorsal um die 1°com. Zwischen 47% und 67% entwickelt sich die 1°com sehr stark und teilt sich in unterschiedliche Faszikel (ventrales Faszikel, vFas; dorsales Faszikel, dFas; posteriores Faszikel, pFas). Ebenso bildet sich der Zentralkörper (CB) aus der 1°com. LC, "lateral cells". Die neuronalen Achsen sind anterior (a) und dorsal (d). Maßstab: 40µm.