

## 4.2 Die Entwicklung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn von *Schistocerca gregaria*

### 4.2.1 Bildung von axonalen Bahnen im Nervensystem

Die Axogenese individueller Zellen im Gehirn (vgl. Kapitel 4.1 und 4.3) kann Aufschlüsse über die Bildung eines funktionsfähigen Gehirns vermitteln. Allerdings kann die Axogenese einzelner Zellen im Nervensystem nicht isoliert betrachtet werden. Damit Axone im sich entwickelnden Gehirn ihren Weg finden, müssen durch Pionierneurone axonale Bahnen etabliert werden, welche die unterschiedlichen Bereiche des Nervensystems verbinden. In der frühembryonalen Entwicklung des Nervensystems wird durch Pionierneuronen ein axonales Grundgerüst aufgebaut, das als Orientierung für später auswachsende Neuronen dient. Solche Pionierneuronen wurden z. B. bereits für die Beinanlagen (Bentley und Keshishian, 1982) sowie für die Ganglien im ventralen Nervensystem von Raper et al. (1983a und b) beschrieben. Die Analyse des Expressionsmusters von Lazarillo (Sanchez et al., 1995) in frühen Stadien der Embryonalentwicklung zeigt, dass Lazarillo-exprimierende Zellen am Aufbau eines solchen axonalen Grundgerüsts im ventralen Nervensystem beteiligt sind. Die "anterior commissure pioneers" sind dabei die ersten Zellen, die die Mittellinie der ventralen Ganglien überqueren und dabei die anteriore Kommissure etablieren. Im frühembryonalen Gehirn von Heuschrecken wird ebenfalls eine Lazarillo-Expression beobachtet. Im Folgenden soll geklärt werden, in welcher Form diese Lazarillo-exprimierenden Zellen zur Bildung eines axonalen Grundgerüsts beitragen.

### 4.2.2 Lazarillo-Expression in identifizierten Zellclustern

Zwischen 26% und 45% der Embryonalentwicklung erzeugen Lazarillo-exprimierende Zellen ein axonales Gerüst im Gehirn, das einen Teil des gesamten axonalen Gerüsts darstellt wie es sich über Meerrettichperoxidase-Färbungen im embryonalen Heuschreckengehirn nachweisen lässt. Bis 45 % der Embryonalentwicklung sind alle Verbindungen dieses "Lazarillo-Gerüsts" vollständig gebildet worden. Die Axogenese, die nach 45% stattfindet und die Veränderungen in der Lazarillo-Expression werden deshalb hier nicht weiter untersucht.

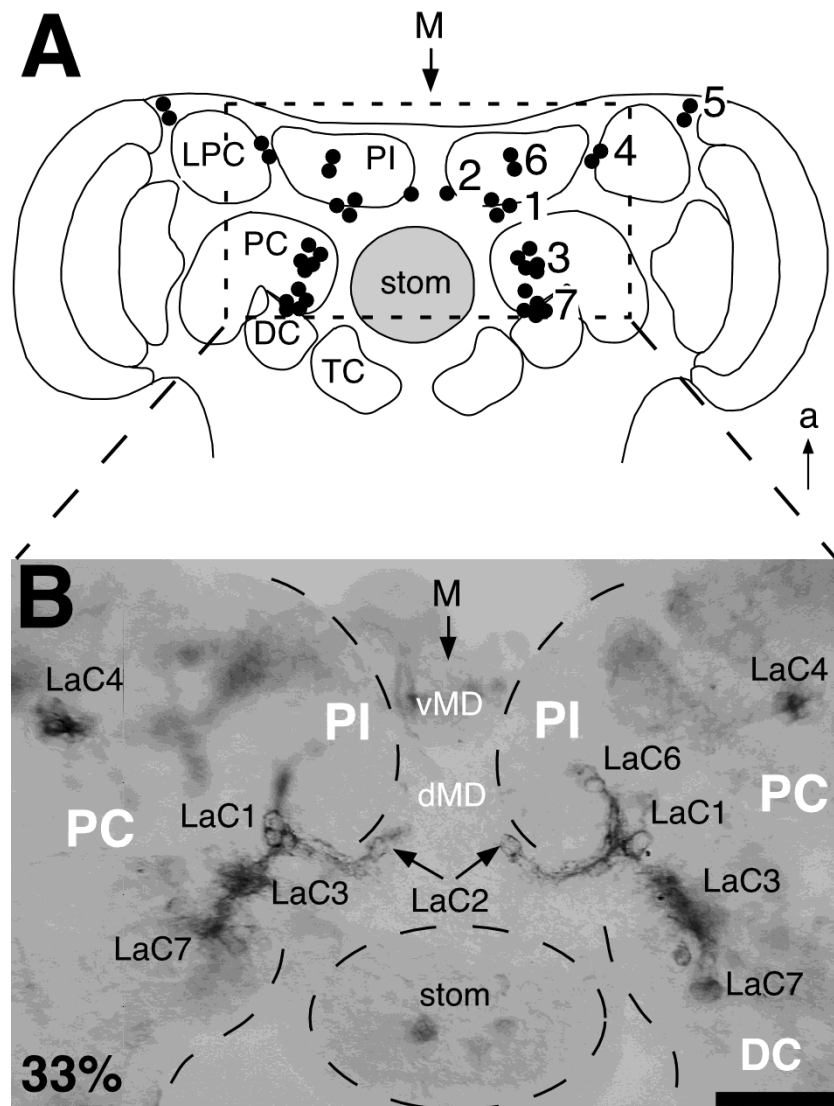
#### *Die Lazarillo-exprimierenden Cluster (LaC)*

Eine Übersicht über das Heuschreckengehirn bei 33% der Embryonalentwicklung zeigt einzelne Cluster von Lazarillo-exprimierenden Zellen, die sich an eindeutig zu bestimmenden Stellen in der "dorsal median domain" (dMD), der embryonalen Pars Intercerebralis (PI), dem Protocerebrum (PC) und Deutocerebrum (DC) befinden (Abb. 10A, B). Im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung zwischen 27% und 36% entstehen 7 Lazarillo-exprimierende Zellcluster (LaC) im Gehirn von *Schistocerca gregaria*. Die Cluster befinden sich zumeist, wenn auch nicht ausschließlich, an den Grenzen der großen Teilbereiche des Gehirns wie dem Protocerebrum, Deutocerebrum oder Tritocerebrum. Sie können aber keinem dieser Gehirnbereiche eindeutig und ausschließlich zugeordnet werden. Jeder einzelne dieser Cluster ist aufgrund seiner Lage und der Anzahl der Lazarillo-exprimierenden Zellen, die er enthält, eindeutig identifizierbar (Abb. 10). LaC 1 setzt sich aus drei Zellen zusammen, LaC 2 besteht ursprünglich nur aus einer Zelle, später entstehen aber weiter ventral noch zwei weitere Zellen, LaC 3 enthält 5 bis 6 Zellen, LaC 4 zwei Zellen und LaC 5 zunächst 2 Zellen. In einem späteren Differenzierungsschub werden in LaC 5 weitere 5 Zellen gebildet. LaC 6 enthält 2 Zellen, LaC 7 besitzt 5 Zellen. Mit Ausnahme von LaC 2 und 5 bleibt die

Zahl der Zellen in den einzelnen Clustern bis 45% der Embryonalentwicklung konstant.

### ***Zeitliche Abfolge der Lazarillo-Expression***

Die LaC Cluster wurden im Gehirn in der Reihenfolge nummeriert, in der sie Lazarillo zu exprimieren beginnen (Abb. 10). Die Lazarillo-Expression startet in Cluster LaC 1 bei 27% Embryonalentwicklung, zu einem Zeitpunkt, an dem die Axongenese im Nervensystem gerade einsetzt. Anschließend erscheint sie in LaC 2 bei 28 - 29% und in Lac 3 bei 30%.



**Abb. 10.** Organisation der Lazarillo exprimierenden Cluster (LaC) im embryonalen Gehirn der Heuschrecke. **A:** Die Schemazeichnung zeigt eine Übersicht der Lage und Zusammensetzung der Lazarillo-exprimierenden Cluster zwischen 26% und 42% der Embryonalentwicklung. Die Zellcluster sind mit 1 - 7 in der Reihenfolge des Auftretens der Lazarillo-Expression in den einzelnen Clustern im Gehirn nummeriert. Die schwarzen Punkte repräsentieren die Zahl der Zellen in den einzelnen Clustern. Das Stomodaeum ist grau unterlegt. Die Grenzen der wichtigsten proliferativen Cluster im Gehirn, Pars Intercerebralis (PI), laterales Protocerebrum (LPC), Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC) sind durch Linien gekennzeichnet. Der Orientierungspfeil zeigt für beide Abbildungen nach anterior (a). **B:** Lazarillo Expression bei 33% Embryonalentwicklung. Das Bild zeigt den in A gestrichelten Bereich mit den Lazarillo-exprimierenden Clustern 1 - 4, 6 und 7. Die gestrichelten Linien geben die Grenzen der Gehirnhemisphären und des Stomodaeums (stom) wieder. Der Pfeil markiert die Mittellinie (M) des Gehirns. Maßstab: A = 200µm, B = 75µm.

Die Lazarillo-Expression in Cluster LaC 4 und 5 beobachtet man nahezu gleichzeitig bei 30%, in LaC 6 bei 33% und in LaC 7 bei 36% Embryonalentwicklung. Sowohl in LaC 2 als auch in LaC 5 tritt eine zweite Welle der Lazarillo-Expression auf. In LaC 2 entstehen bei 35% zwei weitere Lazarillo-exprimierende Zellen, die aber im Untersuchungszeitraum bis 45% keine Axone bilden. Sie werden hier nicht weiter untersucht. Die Zellen, die in LaC 5 bei 30% entstehen, bilden sensorische affare Fasern, die sich an der Entstehung des axonalen Grundgerüsts beteiligen. Dagegen differenziert sich die zweite Gruppe von Zellen in LaC 5 bei 36% zu spät, um noch eine Funktion in der Axogenese zu erfüllen. Es handelt sich bei ihnen vermutlich um Interneurone, die eine andere bisher nicht untersuchte Funktion erfüllen. Die Cluster LaC 3, 4 und 5, in denen die Lazarillo-Expression gleichzeitig erscheint, wurden ausgehend von der Mittellinie nach lateral nummeriert.

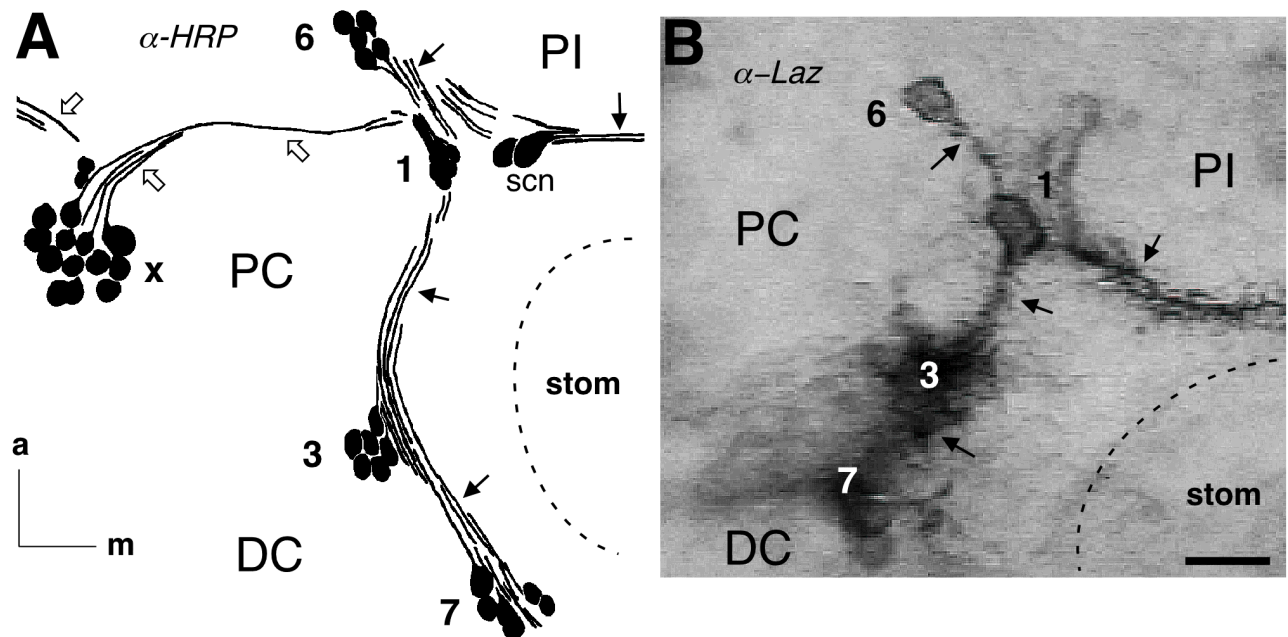
Alle hier beschriebenen Zellen exprimieren Lazarillo bis mindestens 45% Embryonalentwicklung. Eine Ausnahme bilden nur die Zellen in LaC 6, in denen nach 33% keine Lazarillo-Expression mehr zu beobachten ist.

#### 4.2.3 Vergleich der Lazarillo- und Meerrettichperoxidase-Expression im Gehirn

In früheren Arbeiten haben Ganfornia et al. (1995) und Sanchez et al. (1995) gezeigt, dass Lazarillo nur von einem Teil der Neuronen exprimiert wird, die sich an der Bildung der axonalen Bahnen in den Thorakalganglien beteiligen. Um zu bestimmen, ob die Lazarillo-exprimierenden Zellen nur einen Teil der gesamten sich bildenden Neuronen im Gehirn darstellen, wurde das Expressionsmuster von Meerrettichperoxidase mit dem von Lazarillo in einem 33%igen Embryo verglichen (Abb. 2). Meerrettichperoxidase (HRP) wird in der Literatur (Jan und Jan 1982; Snow et al., 1987) als allgemeiner neuronaler Marker beschrieben. Gleichzeitig kann damit überprüft werden, ob es sich bei den Lazarillo-exprimierenden Zellen auch um Nervenzellen handelt. Es zeigt sich, dass alle Lazarillo-exprimierenden Zellen in den entsprechenden Clustern gleichzeitig auch Meerrettichperoxidase exprimieren. Das identifiziert sie eindeutig als Nervenzellen. Es handelt sich dabei aber nur um eine Teilmenge aller in den jeweiligen Zellgruppen vorkommenden Neuronen. Bei 33% der Embryonalentwicklung finden sich in dem Bereich, in dem PI, PC und DC zusammentreffen, 5 Cluster von Zellen, die Meerrettichperoxidase exprimieren (Abb. 11A). Vier von diesen Clustern (Abb. 11A, Cluster 1, 3, 6, 7) befinden sich eindeutig an denselben Positionen wie die Cluster LaC 1, 3, 6, 7 (Abb. 11B). Es wird daher angenommen, dass es sich um identische Cluster handelt.

Die Cluster LaC 1, 3, 6 und 7 aus Abb. 11B (Lazarillo) bzw. 1, 3, 6 und 7 aus Abb. 11A (HRP) werden durch Lazarillo-exprimierende Axone verbunden. Dagegen zeigen der große, lateral liegende HRP immunoreaktive Cluster X (Abb. 11A) und seine nach medial zu LaC 1 gerichteten Axone keine Lazarillo-Expression. Die "secondary commissure neurons" (SCN) im Cluster 1 (vgl. Abb. 3, Boyan et al., 1995a), deren Axone in der "primary commissure" verlaufen, exprimieren ebenfalls nur HRP, nicht aber Lazarillo.

Vergleichbar zum ventralen Nervensystem (Sachez et al., 1995) zeigt die Lazarillo-Expression im Gehirn also nur einen Teil der Axone, die zur Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn beitragen. Sie entwickeln sich aber zu einem so frühen Zeitpunkt und sind am Aufbau einzelner Nervenzellcluster so umfangreich beteiligt, dass aus der Entwicklung der Lazarillo-exprimierenden Zellen Erkenntnisse über die Bildung der ersten axonalen Bahnen im Gehirn gewonnen werden können.



**Abb. 11.** Immunhistochemische Färbungen des Gehirns mit Meerrettichperoxidase (A: Zeichnung) und Lazarillo (B: Videoaufnahme) zeigen die Lage neuronaler Zellcluster und den Verlauf ihrer Axone im Gehirn bei 33%. **A:** Lateral des Stomodaeums (stom), an der Grenze zwischen PI, PC und DC lassen sich die Meerrettichperoxidase-immunoreaktiven ( $\alpha$ -HRP) Cluster 1, 3, 6 und 7 identifizieren. Durch axonale Bahnen (schwarze Pfeile) sind diese Zellcluster verbunden. Die Zahlen entsprechen der Nomenklatur, die für die Lazarillo-exprimierenden Cluster verwendet wurde. Unter den Zellen dieser Cluster befinden sich auch die paarigen "secondary commissure pioneers" (scn), deren Axone in die "primary commissure" projizieren. Der Cluster X und die Bahn zu Cluster 1 (offene Pfeile) haben keine Entsprechung zu einem der Lazarillo-exprimierenden Cluster (vgl. B). **B:** Die Färbung gegen das Lazarillo Antigen ( $\alpha$ -Laz) zeigt den gleichen Ausschnitt wie in A im selben Alter. Es besteht ein vergleichbares Muster der Zellcluster 1, 3, 6 und 7 wie bei A. Auch die axonalen Bahnen (Pfeile) entsprechen sich. Allerdings ist Cluster X im Protocerebrum und die mit ihm verbundenen Axone nicht Lazarillo immunoreaktiv. Die angegebenen neuronalen Axen sind anterior (a) und medial (m). Maßstab: A = 35 $\mu$ m, B = 20 $\mu$ m.

#### 4.2.4 Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn

Die folgenden Beispiele zeigen, in welcher Form Lazarillo-exprimierende Zellen an der Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn beteiligt sind. Es ist anzunehmen, dass diese Beispiele auch exemplarisch für die Prozesse sind, die an anderen Stellen im Gehirn ablaufen. Als erstes werden für Cluster LaC 1 Entwicklungen beschrieben, bei denen durch das Auswachsen von Axonen in verschiedene Richtungen ein orthogonales Gerüst gebildet wird (Abb. 12). Zweitens wird die Entwicklung des LaC 2 Clusters, der nur eine Zelle enthält, untersucht (Abb. 13, 14). Als drittes Beispiel wird gezeigt wie die Verknüpfung der einzelnen Lazarillo-exprimierenden Cluster im Gehirn zur Bildung eines zusammenhängenden Grundgerüsts führen (Abb. 15, 16).

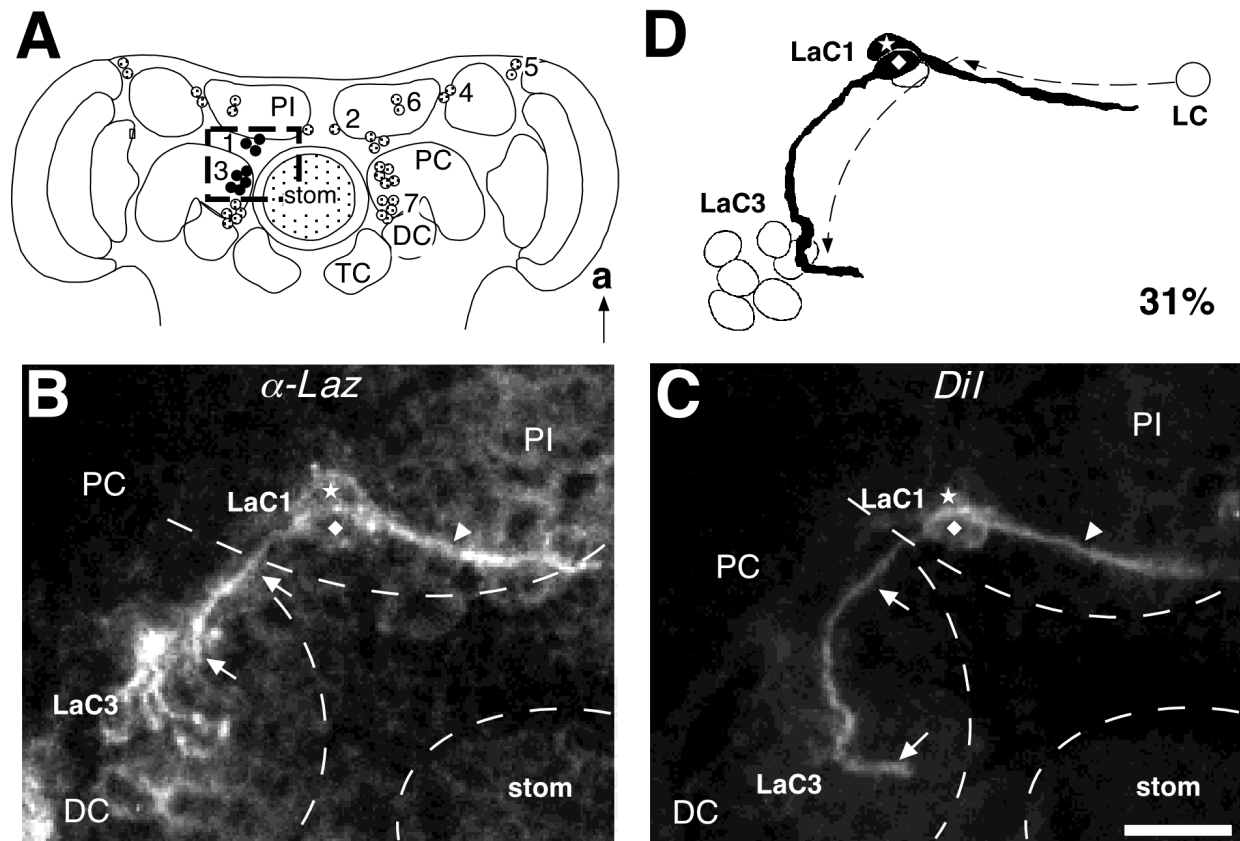
#### 4.2.4.1 Axogenese im Cluster LaC 1

Der Bau des axonalen Grundgerüsts im embryonalen Gehirn zeigt, dass sich Nervenbahnen in unterschiedlichen Orientierungen zur neuronalen Achse entwickeln. Zum einen müssen sich Axone aus der Peripherie des Gehirns nach medial entwickeln und die Mittellinie zur kontralateralen Seite überqueren, d.h. senkrecht zur neuronalen Achse ("horizontal") wachsen, und zum anderen müssen Axone z.B. aus der Pars Intercerebralis (PI) parallel zur neuronalen Achse ("vertikal") in Richtung auf das ventrale Nervensystem auswachsen (vgl. Boyan et al., 1995a). Bestimmte Stellen im Gehirn sind dabei Schnittpunkte, an denen sich horizontale und vertikale Trakte kreuzen.

Eine solche Stelle findet sich an der medialen Grenze zwischen der PI und dem Protocerebrum auf Höhe des Vorderrands des Stomodeums. Genau dort befindet sich der Lazarillo-exprimierende Cluster LaC 1 mit 3 Zellen. Aufgrund ihrer frühen Axogenese ab 27% und ihrer besonderen Lage ist anzunehmen, dass Zellen aus LaC 1 an der Bildung von orthogonalen Bahnen im Gehirn beteiligt sein müssen (Abb. 12).

Gleichzeitig mit der Axogenese beginnen alle Zellen in LaC 1 mit der Expression von Lazarillo. Lazarillo-Färbungen bei 31% zeigen (Abb. 12B), dass von den drei in LaC 1 vorhandenen Neuronen eine Zelle nach lateral in Richtung Mittellinie projiziert (senkrecht zur neuronalen Achse). Ein anderes Neuron in LaC 1 schickt sein Axon nach posterior und damit parallel zur neuronalen Achse in Richtung auf LaC 3. Die Färbungen geben leider keine Hinweise auf die Richtung der Axogenese des dritten Neurons aus LaC1.

Eine unterschiedliche Projektionsrichtung der Zellen in LaC 1 wird durch Einzelzellfärbungen mit DiI bestätigt (Abb. 12C). Die Applikation von DiI erfolgte gezielt auf Neuronen aus LaC 1, die vorher gegen das Lazarillo Antigen immunhistochemisch gefärbt wurden. Wieder zeigte sich, dass die Axone der Neuronen in LaC 1 senkrecht zueinander verlaufen. Ein Axon wächst nach medial in Richtung Mittellinie, das andere nach posterior zu LaC 3. Auf diese Weise werden zwei zueinander senkrecht stehende Bahnen, die vom selben Punkt ausgehen, gebildet. Ferner stellte sich heraus (Abb. 14), dass diese Bahnen vom Axon der "lateral cell" benützt werden, um über LaC 1 zu LaC 3 zu wachsen (Abb. 12D, vgl. Kapitel 4.2.4.2).



**Abb. 12.** Bildung orthogonal gerichteter Bahnen im Gehirn. **A:** Die Schemazeichnung zeigt die Lage der 7 Lazarillo-exprimierenden Cluster (punktiert) im embryonalen Gehirn. Die Axogenese zwischen den Clustern LaC 1 (schwarz) im gestrichelten Bereich wird in den folgenden Präparationen genauer untersucht. Der Pfeil gibt für alle Bilder die Orientierung nach anterior (a) an. **B:** Anti-Lazarillo-Immunhistochemie. Die Lazarillo-exprimierenden Neuronen in LaC 1 projizieren mit ihren Axonen in verschiedene Richtungen. Ein Axon (Stern) wächst in Richtung Mittellinie (Pfeilspitzen) entlang der Grenze der PI. Ein anderes Neuron (Raute) verläuft nach posterior (Pfeile) zum Cluster LaC 3. Die Wachstumsrichtung des dritten Neurons in LaC 1 konnte nicht ermittelt werden. Die ungefähren Grenzen der Pars Intercerebralis (PI), des Proto- (PC) und Deutocerebrums (DC) sowie des Stomodaeums (stom) sind gestrichelt eingezeichnet. **C:** Die Injektion von Dil im selben Präparat wie in B bestätigt über Einzelzellsfärbungen die Projektionsrichtung der Zellen, die in B beschrieben werden. Eine der beiden gefärbten Zellen (Stern) schickt ihr Axon in Richtung Mittellinie (Pfeilspitze), die andere Zelle (Raute) nach posterior zu LaC 3 (Pfeile). **D:** Die Zeichnung fasst die orthogonale Projektion der beiden Zellen in LaC 1 zusammen. Sie bilden vermutlich das Gerüst, an dem sich das auswachsende Axon der "lateral cell" bei seinem Wachstum nach lateral und posterior orientiert. Die Projektion der dritten Zelle in LaC 1 konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Maßstab: A = 200µm, B - D = 20µm.

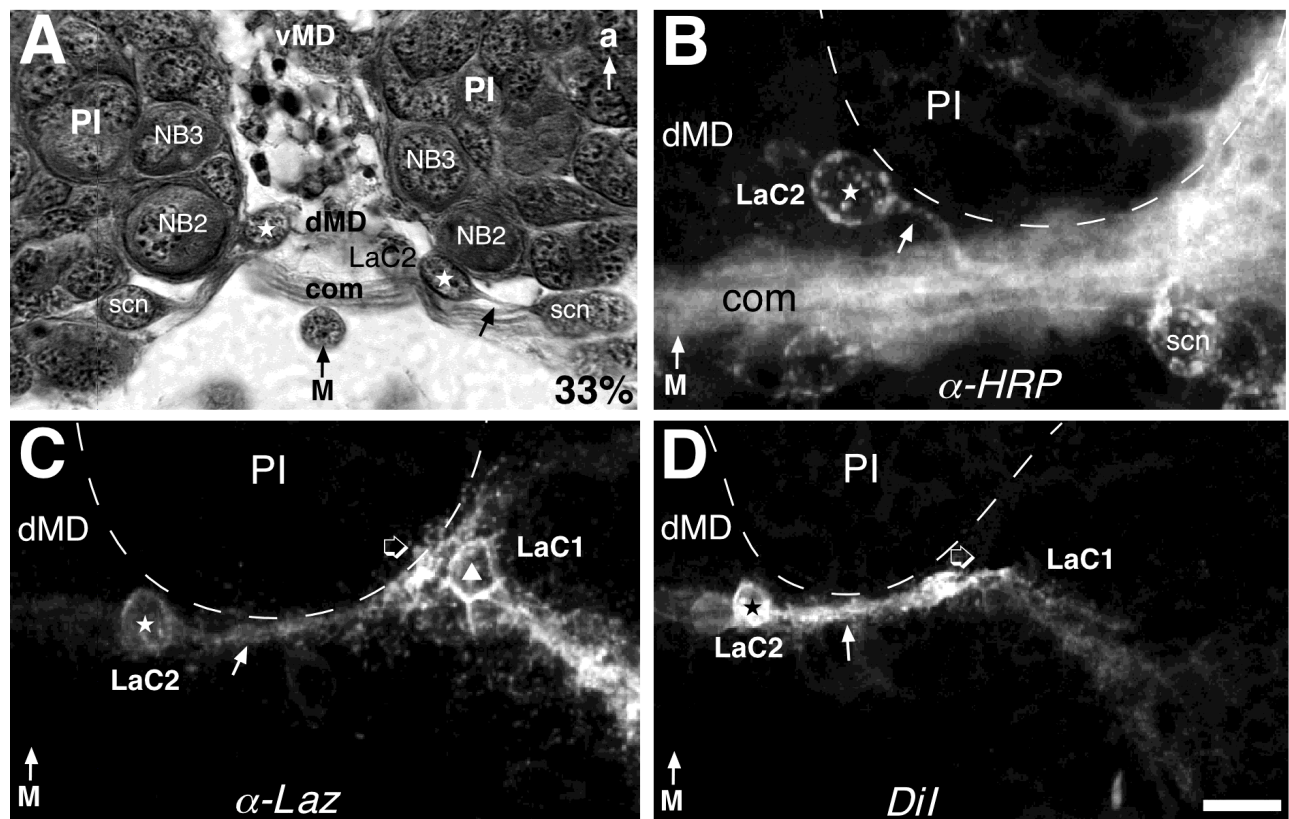
#### 4.2.4.2 Axogenese in Cluster LaC 2

##### *Immunhistochemische Identifizierung der "lateral cells" (LC)*

Die "lateral cells" (LC) entstehen ohne erkennbare Mutterzelle (Kapitel 4.1) zwischen 26% und 27% Embryonalentwicklung in der dMD und bilden bei 28% jeweils ein Axon, dessen Wachstumskegel nach posterior und lateral entlang der Gliagrenze zur Pars Intercerebralis gerichtet ist (vgl. Abb 3, 7). Das Axon entsteht bereits bevor die "primary commissure" (1°com) bei 30% Embryonalentwicklung als erste interhemispherische Verbindung durch die "primary commissure pioneers" etabliert wird (Abb. 18). Ein histologisches Präparat (Abb. 13A) bei 33% zeigt die beiden einzelnen bilateral symmetrisch angeordneten LC in der "dorsal median domain" mit ihren Axonen in der 1°com. Die immunhistochemische Färbung gegen Meerrettichperoxidase bestätigt die Morphologie der LC und zeigt, dass es sich um Nervenzellen handelt (Abb. 13B, vgl. Kapitel 4.1.4). Die LC beginnen kurz

vor 28% mit der Expression von Lazarillo (Abb. 15A), gleichzeitig mit ihrer Axogenese. Die Expression zusammen mit der Bildung der Axone ist typisch für alle Lazarillo-exprimierenden Zellen (vgl. Kapitel 4.2.4.1). Zu keinem Zeitpunkt in der Entwicklung konnte eine Lazarillo-Expression in einem Neuroblasten im Gehirn beobachtet werden. Sie ist ausschließlich auf differenzierte Nervenzellen beschränkt. Darüber hinaus findet sich auch keine Lazarillo-Expression im "median precursor", der erst nach der Entstehung der LC Tochterzellen bildet (vgl. Kapitel 4.1.2).

Die Färbung gegen Lazarillo (Abb. 13C) zeigt eine einzige Zelle in LaC 2 in der dMD, deren Lage und deren axonale Projektion mit der Morphologie der Zellen übereinstimmt, die als LC in histologischen Präparaten (Abb. 13A) und durch die Färbung gegen Meerrettichperoxidase (Abb. 13B) gezeigt wurden. Diese einzelne Zelle wird als "lateral cell" interpretiert. Die Färbung dieser Zelle mit DiI, welche die Ergebnisse der bisher beschriebenen Methoden wiederholt, liefert eine weitere Bestätigung für diese Annahme (Abb. 13D). Das bedeutet, dass eine einzelne, identifizierte Lazarillo exprimierende Zelle sich in der dMD an der Grenze zur PI entwickelt, deren Axon bereits vor der Bildung der 1° com nach lateral in Richtung LaC 1 auswächst.



**Abb. 13.** Identifizierung der "lateral cells" in LaC 2 bei 33% Embryonalentwicklung. **A:** Die histologische Färbung zeigt den Bereich der präoralen Mittellinie im Gehirn mit den beiden "lateral cells" (LC, weiße Sterne). Die LC sind die einzigen Lazarillo-exprimierenden Zellen in LaC 2 in der "dorsal median domain" (dMD) in diesem Alter. Der schwarze Pfeil markiert das nach lateral ziehende Axon der rechten LC. Die beiden Gehirnhemisphären sind durch die "primary commissure" (1°com) verbunden. Andere identifizierte Zellen in der PI sind die Neuroblasten NB 2 und 3. Der Pfeil zeigt für alle Bilder nach anterior (a). **B:** Immunhistochemische Färbung gegen Meerrettichperoxidase ( $\alpha$ -HRP). Die LC (Stern) in der rechten Hälfte der dMD exprimiert HRP in ihrem Zellkörper und dem Axon (Pfeil), das in die 1°com projiziert. Die Grenze der PI ist in B - D durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. **C:** Die immunhistochemische Färbung gegen Lazarillo ( $\alpha$ -Laz) bei 33% färbt die Zelle (Stern), das Axon (Pfeil) und den Wachstumskegel (offener Pfeil) der LC an der Grenze zur PI. Der Wachstumskegel der LC hat bereits Cluster LaC 1 (weißes Dreieck) erreicht. Keine Lazarillo-Expression findet sich in den "secondary commissure pioneers" (vgl. Abb. A). **D:** Die Applikation von DiI, einem membrangängigen Farbstoff, färbt die komplette LC mit ihrem Axon (weißer Pfeil) und dem Wachstumskegel (offener Pfeil) nahe LaC 1. Die Färbung mit DiI bestätigt die beobachtete Morphologie der "lateral cell" aus den Färbungen mit  $\alpha$ -HRP und  $\alpha$ -Lazarillo in B und C. Maßstab: A, C, D = 15  $\mu$ m; B = 20  $\mu$ m.



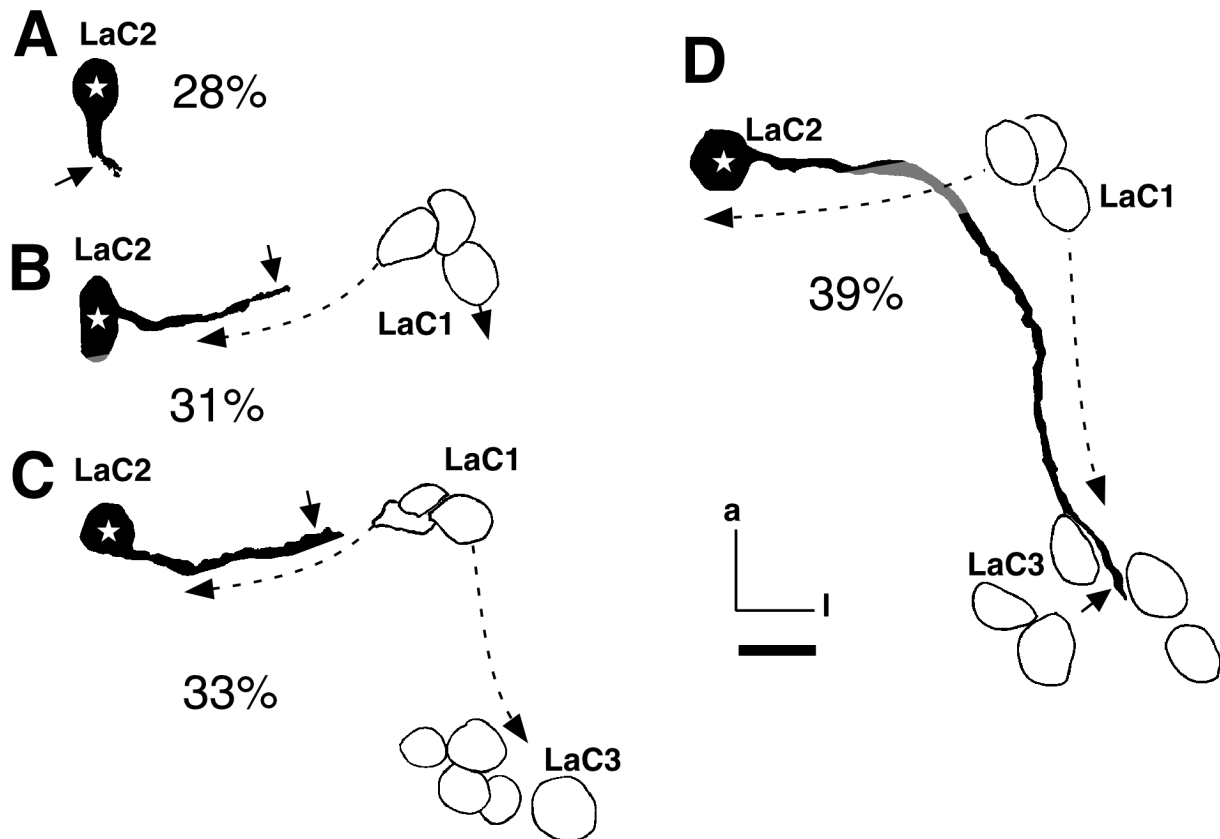
***Die LaC Cluster als Wegweiser für die Axogenese der "lateral cells"***

Wie bereits beschrieben, besteht der Cluster LaC 2 in jeder Hemisphäre aus einer einzigen identifizierten Zelle, der "lateral cell" (LC), die sich zwischen 26% und 27% Embryonalentwicklung differenziert. Die Lazarillo-Expression beginnt bei etwa 28%, gleichzeitig mit der Axogenese. Der Wachstumskegel der LC wächst zunächst lateral in Richtung auf den nächsten Lazarillo-exprimierenden Cluster LaC 1 (Abb. 14A, B). Bei 31% faszikulieren die Axone der LC und eines Neurons aus LaC 1 auf halbem Weg zwischen den beiden Clustern (Abb. 14B). Dieser Kontakt zwischen den beiden Axonen etabliert eine Bahn, die später von Axonen aus der "primary commissure" für das laterale Wachstum verwendet wird (Abb. 13B, C, 15C). Zwischen 31% und 33% wächst das Axon der LC weiter nach lateral (Abb. 14C) und biegt direkt bevor es LaC 1 erreicht nach posterior ab. Anschließend kontaktiert es ein Axon aus LaC 1, das bereits eine Verbindung zu LaC 3 hergestellt hat (Abb. 12), und erreicht bei 39% Embryonalentwicklung selbst LaC 3 (Abb. 14D). Im weiteren Verlauf wächst das LC Axon dann über die Schlundkonnektive in Richtung ventrales Nervensystem. Diese Entwicklung wird hier nicht weiter verfolgt.

Der beschriebene Prozess, dass das Axon der LC nacheinander mit anderen Axonen aus Lazarillo-exprimierenden Clustern in Kontakt tritt und sie als Wegweiser für das weitere Wachstum verwendet, ist typisch für die Art und Weise, wie orthogonale Bahnen im Gehirn entstehen (vgl. Kapitel 4.2.1.4) und auch für Prozesse, bei denen sich Axone bei ihrer Axogenese an spezifischen Strukturen orientieren (Bentley und Keshishian, 1982).

Diese Daten unterstützen die These, dass die Lazarillo-exprimierenden Zellen an der Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn der Heuschrecke beteiligt sind.



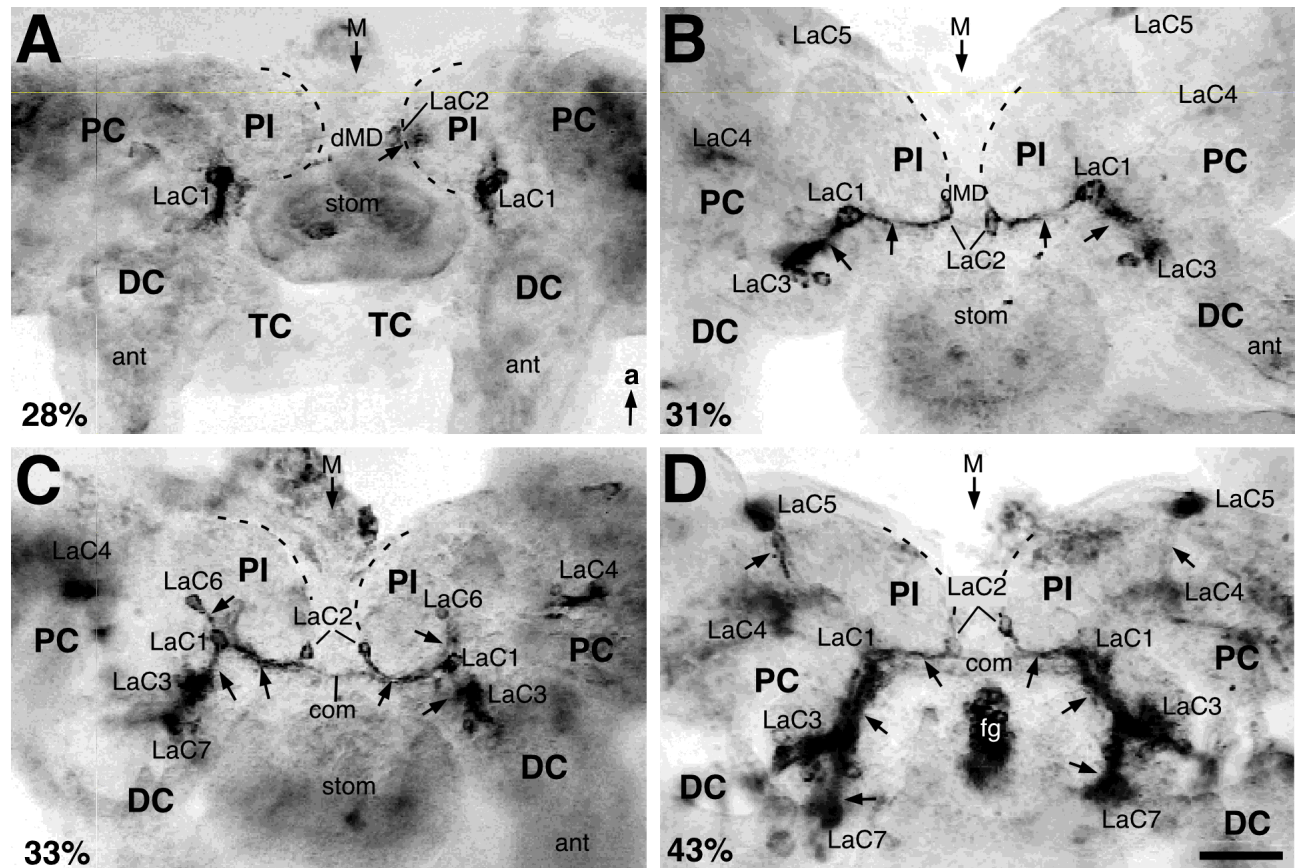


**Abb. 14.** Axogenese der "lateral cell" (LC, Stern) in LaC 2. Die Zeichnungen nach immunhistochemischen Färbungen gegen Lazarillo zeigen schrittweise die Entwicklung des Axons zwischen 28% und 39% der Embryonalentwicklung. **A:** Bei 28% bildet die LC einen Wachstumskegel (Pfeil), der nach posterior gerichtet ist. **B:** Bei 31% hat sich der Wachstumskegel nach lateral weiterentwickelt und ist circa die halbe Strecke zum nächsten Lazarillo exprimierenden Cluster (LaC 1) gewachsen und trifft mit nach medial gerichteten Axonen aus LaC 1 zusammen (gestrichelter Pfeil, vgl. Abb. 12) und wächst an ihnen entlang (Pfeil). **C:** Der Wachstumskegel entwickelt sich weiter nach lateral in der 1°com (grau) und erreicht bei 33% LaC 1. **D:** Anschließend ändert das Axon seine Wachstumsrichtung nach posterior und projiziert zusammen mit Axonen aus LaC 1 in Richtung LaC 3. Der Wachstumskegel erreicht bei circa 40% (Pfeil) LaC 3. Das Axon der LC wächst also entlang von orthogonal zueinander gerichteten axonalen Bahnen, die von Lazarillo-exprimierenden Zellen aus LaC 1 gebildet werden (vgl. Abb. 12). Die angegebenen neuronalen Achsen sind anterior (a) und lateral (l). Maßstab: 20µm.

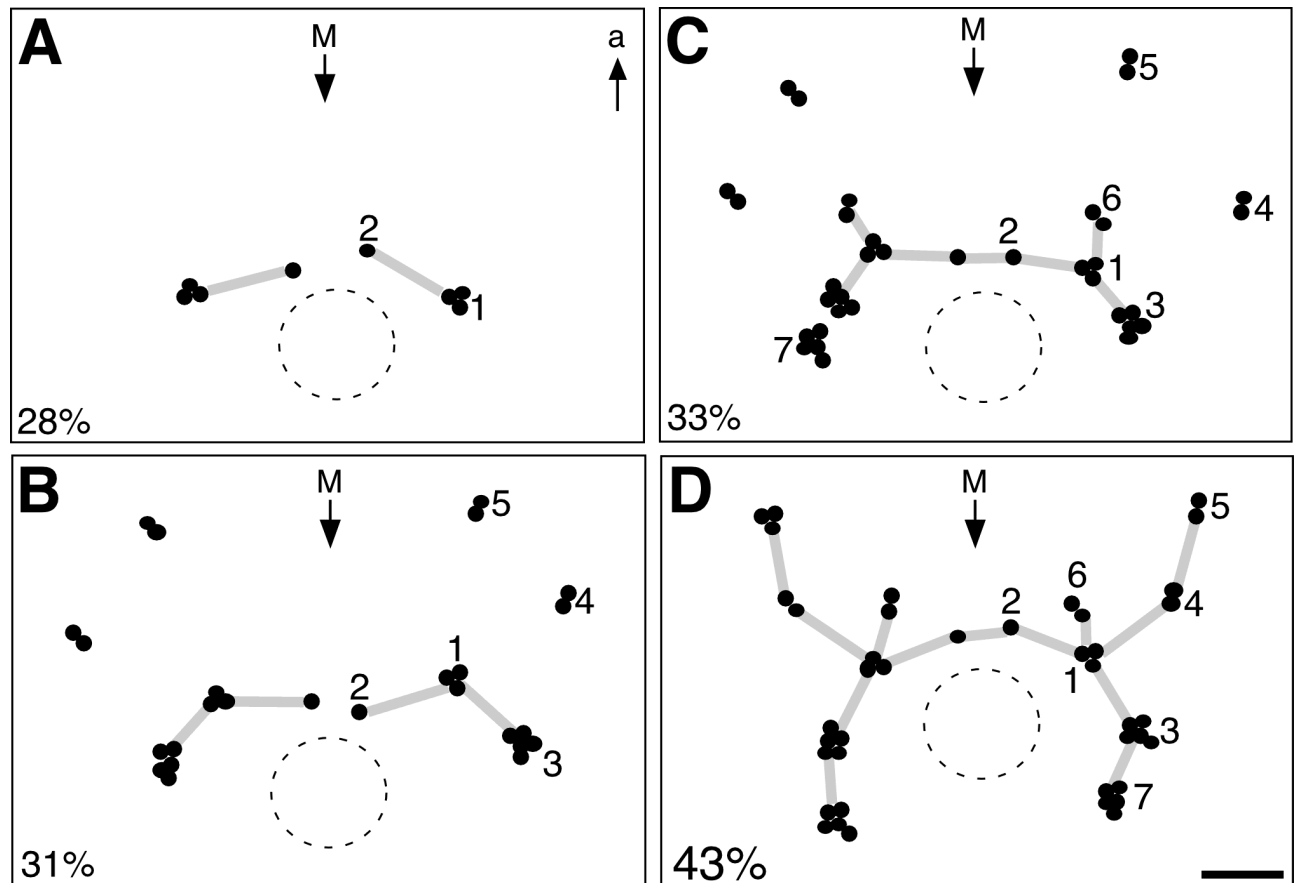
#### 4.2.4.3 Axogenese in den Clustern LaC 3 bis LaC 7

Verfolgt man die Axogenese der Zellen aus den unterschiedlichen Lazarillo-exprimierenden Clustern während der frühen Embryonalentwicklung, so entsteht schrittweise ein Muster, das bei circa 40% ein zusammenhängendes axonales Gerüst bildet (Abb. 15, 16). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dieses axonale Gerüst schrittweise gebildet wird, indem Axone benachbarter Zellcluster aneinander vorbei zum nächsten Cluster wachsen und so die entsprechenden Verbindungen erzeugen (vgl. Abb. 12, 14). Die erste Lazarillo-Expression erscheint bei 28% in LaC 1 beiderseits des Stomodaeums (Abb. 15A). Zwischen 28% und 31% verbinden Axone diesen Cluster mit dem medial liegenden Cluster LaC 2 und dem posterior liegenden Cluster LaC 3 (Abb. 15B, 16A,B). Es wurde bereits gezeigt, dass das Axon der "lateral cells" diese Bahnen nützt um zu LaC 1 und LaC 3 zu wachsen (Abb. 14). Bei 33% Embryonalentwicklung funktioniert LaC 1 als eine Art Verteilerzentrum, das über Axone mit den Clustern LaC 2, 3, 6 und 7 verbunden ist (Abb. 15C). Axone aus LaC 1 und vermutlich auch LaC 6 überqueren die Mittellinie in der "primary commissure" zur kontralateralen Seite. Die Cluster LaC 4 und 5, die inzwischen auch mit der Lazarillo-Expression

begonnen haben, werden erst zwischen 33% und 43% Embryonalentwicklung mit den anderen Clustern verbunden (Abb. 15D, 16D). Das heißt, die Verbindungen zwischen den Clustern werden ausgehend von Regionen nahe der Mittellinie zuerst nach lateral, dann nach posterior und schließlich nach anterior im Gehirn gebildet. Dieser Prozess der Bildung des axonalen Gerüsts verläuft in den beiden Gehirnhemisphären weitgehend symmetrisch.



**Abb. 15.** Bildung des axonalen Grundgerüsts von Lazarillo-exprimierenden Zellen in der frühen Embryonalentwicklung. **A:** Bei 28% der Embryonalentwicklung wird Lazarillo von den Clustern LaC 1 an der Grenze zwischen Pars Intercerebralis (PI), Proto- (PC) und Deutocerebrum (DC) sowie in LaC 2 an den medialen Grenzen der PI exprimiert. Beide Cluster sind bilateralsymmetrisch in den zwei Gehirnhemisphären vorhanden. Der schwarze Pfeil zeigt auf den bereits vorhandenen Wachstumskegel der "lateral cell" (LC) in LaC 2. (ant, Antenne; TC, Tritocerebrum). Der Orientierungspfeil zeigt nach anterior (a). **B:** Bis 31% der Embryonalentwicklung haben die Cluster LaC 3, 4 und 5 mit der Lazarillo-Expression begonnen. Lazarillo-immunoreaktive Axone verbinden bereits die Cluster LaC 1, LaC 2 und LaC 3 (Pfeile). **C:** Die Cluster LaC 6 und 7 zeigen bei 33% eine deutliche Lazarillo-Expression und werden über Axone mit dem bereits vorhandenen Gerüst verbunden (Pfeile). Axone von LaC 1 und vermutlich auch LaC 6 überqueren die Mittellinie in der "primary commissure" (com). **D:** Als letzte Cluster werden bis 43% der Embryonalentwicklung LaC 4 und 5 über Lazarillo-exprimierende Axone mit dem bereits vorhandenen Gerüst verbunden (Pfeile), das rund um das Stomodaeum entstanden ist. Eine deutliche Lazarillo-Expression findet sich auch in dem mit dem Stomodaeum assoziierten Frontalganglion (fg). Maßstab: 75µm.



**Abb. 16.** Die schrittweise Entwicklung des Grundgerüsts Lazarillo-exprimierender Zellen in der frühen Embryonalentwicklung. Die Abbildungen basieren auf der Analyse immunhistochemischer Färbungen (vgl. Abb. 15). Die schwarzen Punkte entsprechen den einzelnen Neuronen in den Lazarillo-exprimierenden Clustern. Die Zahlen entsprechen der Reihenfolge des Auftretens der Lazarillo-Expression in den Clustern. Axonale Bahnen sind als graue Balken dargestellt. Der gestrichelte Kreis zeigt die Lage des Stomodeums. Das axonale Grundgerüst bildet sich schrittweise durch Verknüpfung der Cluster mit axonalen Bahnen. Die Pfeile geben die Mittellinie (M) und anterior (a) an. **A:** Die Axogenese beginnt bei 28% Embryonalentwicklung in den Clustern LaC 1 und 2 und ihrer Verbindung durch Axone. **B:** Bei 31% sind inzwischen auch die Cluster 1 und 3 durch Axone verbunden worden. **C:** Bis 33% wird Cluster 6 an die bestehenden Bahnen angeschlossen. Daneben überqueren Lazarillo-exprimierende Fasern die Mittellinie und verbinden die beiden LaC 2 Cluster und die beiden Gehirnhemisphären. **D:** Bis 43% sind die axonalen Verbindungen zwischen den Lazarillo-exprimierenden Clustern vervollständigt worden. Nervenfasern binden die Cluster 4, 5 und 7 an das bestehende bilateralsymmetrische, axonale Gerüst an. Maßstab: 75µm.