

4.4 Feinstrukturelle Untersuchung der PCP Neuronen

4.4.1 Lokalisation des TERM-1 Antigens in den PCP Zellkörpern

Die exakte Lokalisation des TERM-1 Antigens in den Zellkörpern gibt Hinweise auf eine mögliche Funktion für dieses Molekül. Sie wurde in den PCP Neuronen über das schwarze DAB (Diaminobenzidin) Präzipitationsprodukt lokalisiert. Verwendet wurden Embryonen bei 60% Entwicklung und Larven im zweiten Stadium (Abb. 25), die eine intensive Färbung der PCP Neuronen aufwiesen. Neben den TERM-1 Färbungen mit dem Standardprotokoll wurden auch Testfärbungen durchgeführt, bei denen auf die Verwendung von TritonX-100 zur Permeabilisierung der Gewebe verzichtet wurde. Für die unterschiedlichen Larvenstadien konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden wie mit dem Standardprotokoll. Allerdings waren die Färbungen auf den feinen Verzweigungen der Kollateralen deutlich schwächer. Embryonal ließen sich die PCP Neuronen ohne TritonX-100 allerdings nicht anfärben. Die Untersuchung von Semidünnschnitten im Lichtmikroskop zeigt, dass das TERM-1 Antigen im Cytoplasma lokalisiert ist. Das DAB Reaktionsprodukt ist gleichmäßig in Form von distinkten Punkten im Cytoplasma der Zellkörper verteilt. Dagegen beobachtet man im Zellkern und auf der Zelloberfläche keine Expression von TERM-1 (Abb. 25B). Generell ist die Intensität der DAB Färbung in der Larve stärker als im Embryo. Aus den Ergebnissen folgt, dass TERM-1 im Zellkern rein intrazellulär lokalisiert ist.

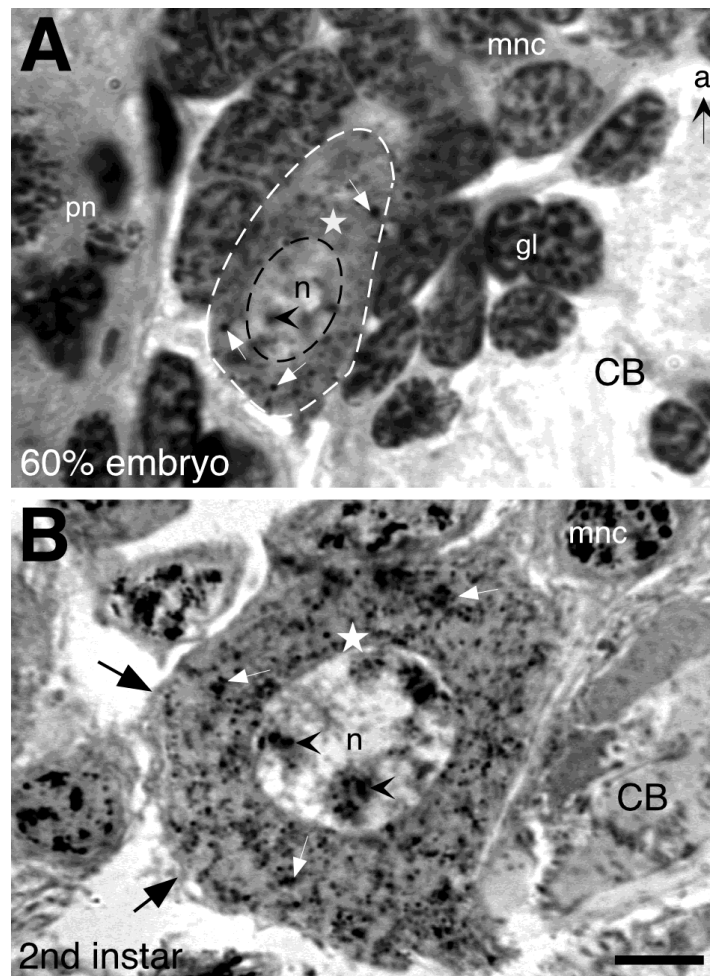


Abb. 25 Lokalisation des TERM-1 Antigens im Cytoplasma der PCP Zellkörper. Die Semidünnschnitte in sagittaler Ebene durch die Mittellinie des Gehirns in einem Embryo bei 60% Embryonalentwicklung (**A**) und einem 2. Larvenstadium (**B**) zeigen einzelne PCP Zellkörper (weiße Sterne). Vom Embryo bis zur 2. Larve vergrößern sich die Zellkörperdurchmesser deutlich. Die TERM-1 Expression ist als schwarzes DAB-Reaktionsprodukt (weiße Pfeile) im Cytoplasma der PCP Zellkörper (weißer Umriß in A) in beiden Altersstadien zu erkennen. Dabei ist die Intensität der Expression in der 2. Larve deutlich höher als im Embryo. Dagegen beobachtet man keine TERM-1 Expression auf der Zelloberfläche (schwarze Pfeile in B) oder in den Zellkernen (n, schwarzer Umriß in A). Die schwarzen Pfeilspitzen markieren kondensiertes Chromatin in den Zellkernen. Es handelt sich dabei nicht um TERM-1-Expression. Kondensiertes Chromatin ist ebenfalls in den Kernen der umgebenden "median neurosecretory cells" (mnc) und in den Gliazellen (gl) des Zentralkörpers vorhanden. pn, Perineurium. Der Orientierungspfeil zeigt für beide Abbildungen nach anterior (a). Maßstab: 10µm.

4.4.2 Ultrastrukturimmunhistochemie

Experimente zur ultrastrukturellen immunhistochemischen Lokalisierung des TERM-1 Antigens an Ultradünnschnitten über Kolloidal-Gold markierte Zweitantikörper erbrachten bisher keine positiven Resultate. Immunhistochemische Färbungen an Ultradünnschnitten sind methodisch sehr aufwendig und können aus den unterschiedlichsten Gründen misslingen. Eine erste mögliche Fehlerquelle liegt in der für eine ausreichende Strukturhaltung erforderlichen stärkeren Fixierung. Sowohl Glutaraldehyd als auch Osmiumtetroxid zerstören häufig die Antigenizität. Die größten Schwierigkeiten resultieren aber aus der Notwendigkeit, die Gewebe in Kustharz einzubetten. Als Einbettmedien eignen sich prinzipiell alle in der Elektronenmikroskopie verwendeten Kunstharze. Durch Wechselwirkungen mit dem Kunstharz und durch die zum Teil notwendige Polymerisation bei 60°C kann das Antigen denaturieren oder so maskiert werden, dass es vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Hydrophobe Harze wie Epon müssen zusätzlich vor der immunhistochemischen Färbung angeätzt werden. Besser geeignet sind die hydrophilen Kunstharze wie Lowicryl oder LR-White und LR-Gold. Das hier verwendete Protokoll mit einer reinen Formalinfixierung und der Einbettung in LR-White direkt aus 70% Ethanol ist eines der schonendsten Protokolle die möglich sind. Da trotzdem kein positives Ergebniss erreicht werden konnte, wurde wegen der aufwendigen Methodik vorerst darauf verzichtet, diesen Aspekt weiter zu verfolgen.

So ist es bisher nicht möglich festzustellen, in welcher Form und in welchen Organellen TERM-1 auf ultrastruktureller Ebene lokalisiert ist.

4.4.3 Die Ultrastruktur der PCP Neuronen

Bisher wurde gezeigt, dass sich die PCP Neuronen aufgrund ihrer Größe (Abb. 23) und der TERM-1 Expression (Abb. 21, 22) eindeutig von den benachbarten Zellen in der "dorsal median domain" (dMD) unterscheiden lassen. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die PCP Neuronen auch auf ultrastruktureller Ebene von den benachbarten Zellen unterscheiden lassen. Darüber hinaus war zu klären, welche spezifischen Besonderheiten die PCP Neuronen charakterisieren. Der Bereich der Mittellinie enthält wie in Kapitel 4.1 und 4.6 bereits beschrieben neben den PCP Neuronen unter anderem auch die "median neurosecretory cells" (mnc; Rowell, 1976; Panov, 1980; Raabe, 1989). Zur Untersuchung der Ultrastruktur wurden Standardmethoden der Elektronenmikroskopie verwendet.

Die PCP Neuronen lassen sich sowohl embryonal als auch adult von den benachbarten Zellen eindeutig unterscheiden. Die elektronenoptische Aufnahme bei geringerer Vergrößerung zeigt in einem 60% Embryo die PCP Neuronen zusammen mit einer Anzahl nicht identifizierter neurosekretorischer Zellen in der "dorsal median domain" (Abb. 26A). Im Vergleich mit den benachbarten Zellen besitzen die PCP ein umfangreiches Cytoplasma und ihre Zellkerne zeigen eine homogene Matrix ohne kondensiertes Chromatin (Abb. 26A). Eine vergleichbare Ultrastruktur findet sich im Imago (Abb. 27A). Die "median neurosecretory cells", die Gliazellen des Zentralkörpers und andere Zellen der "dorsal median domain" sind im Vergleich mit den PCP Neuronen bedeutend kleiner. Im Gegensatz zu ihnen besitzen sie embryonal nur ein dünnes Band aus Cytoplasma, das den Kern umgibt. Zumeist beobachtet man in ihren Kernen auch ein stark kondensiertes Chromatin. Das ist ein Hinweis darauf, dass diese Zellen noch mitotisch aktiv sind (Abb. 26A). Die embryonalen PCP Neuronen besitzen in ihrem umfangreichen Cytoplasma eine große Anzahl von Mitochondrien unterschiedlicher Länge und Durchmesser (Abb. 26B, C). Die große Anzahl von Mitochondrien findet sich auch in den adulten PCP Neuronen wieder (Abb. 26E). Das umfangreiche ER, das in den embryonalen PCP Neuronen zu beobachten ist, fehlt in den imaginalen Zellen. Ebenso finden sich in

den PCP Neuronen weder im Embryo noch im Adult typische neurosekretorische Granula, die zur Speicherung des TERM-1 Antigens dienen könnten (Abb. 27A, Ausschnitt). Dagegen sind die PCP Neuronen im Imago inzwischen durch eine vielschichtige Gliahülle umgeben, die Trophospongia ins Innere der PCP Neuronen bildet. Die Trophospongia stehen, soweit es in der Literatur beschrieben ist, im Dienst der Ernährung von Zellen (Abb. 26D, 27A).

4.4.4 Die Cytoplasma / Nukleus Relationen in den Zellen der Mittellinie des Gehirns

Die Unterschiede im Ausmaß von Cytoplasma und Kern der PCP Neuronen und der "median neurosecretory cells", die man in den Ultradünnschnitten in beiden Zelltypen beobachtet, wurden quantitativ bestimmt. Für jeweils 10 Zellen desselben Typs ist anhand der gemessenen Zellradien das Volumen von Cytoplasma und Kern bestimmt und ihr Verhältnis aus den jeweiligen Mittelwerten errechnet worden. Die Messungen wurden sowohl an 60% Embryonen als auch an adulten Tieren durchgeführt. Sie orientieren sich an den Messungen, die Goodman et al. (1979b) am Dumeti Neuron vorgenommen haben. Dumeti ist ein unpaares Neuron in der Mittellinie des Metathorakalganglions und innerviert die Streckmuskeln der Tibiae des dritten Beinpaars. Daher resultiert auch der Name des Neurons: Dum steht für "dorsal unpaired median" und eti für "extensor tibia".

Da hier nur relative und keine absoluten Werte auf der Basis von TEM-Negativen gemessen wurden, sind diese hier nicht angegeben.

Embryonale Zellen

- Das Verhältnis Cytoplasma zu Nukleus für die embryonalen PCP Neuronen liegt bei 3,34.
- Das Verhältnis Cytoplasma zu Nukleus für die embryonalen "median neurosecretory cells" liegt bei 1,05.

Imaginale Zellen

- Das Verhältnis Cytoplasma zu Nukleus für die imaginalen PCP Neuronen liegt bei 7,60.
- Das Verhältnis Cytoplasma zu Nukleus für die imaginalen "median neurosecretory cells" liegt bei 5,1.

Das heißt, die PCP Neuronen verfügen bereits embryonal über einen deutlich höheren Anteil an Cytoplasma in Relation zum Zellkern als die "median neurosecretory cells" (mnc). Bis zur Imago reduziert sich dieser Unterschied zwar, liegt aber nach wie vor auf der Seite der PCP Neuronen. Unabhängig davon verfügen sie natürlich aufgrund der größeren Zelldurchmesser auch in absoluten Werten gerechnet über mehr Cytoplasma. Über die absoluten Werte der Volumina kann hier aber keine Aussage getroffen werden, da dazu die genauen Zellformen durch aufwendige Schnittserien rekonstruiert werden müssten. Die Unterschiede im Cytoplasma werden als Hinweis darauf gewertet, dass sich die PCP Neuronen deutlich früher als die umgebenden Zellen differenzieren. Die hier gewonnenen Ergebnisse stimmen dabei prinzipiell mit denen von Goodman et al. (1979b) überein.

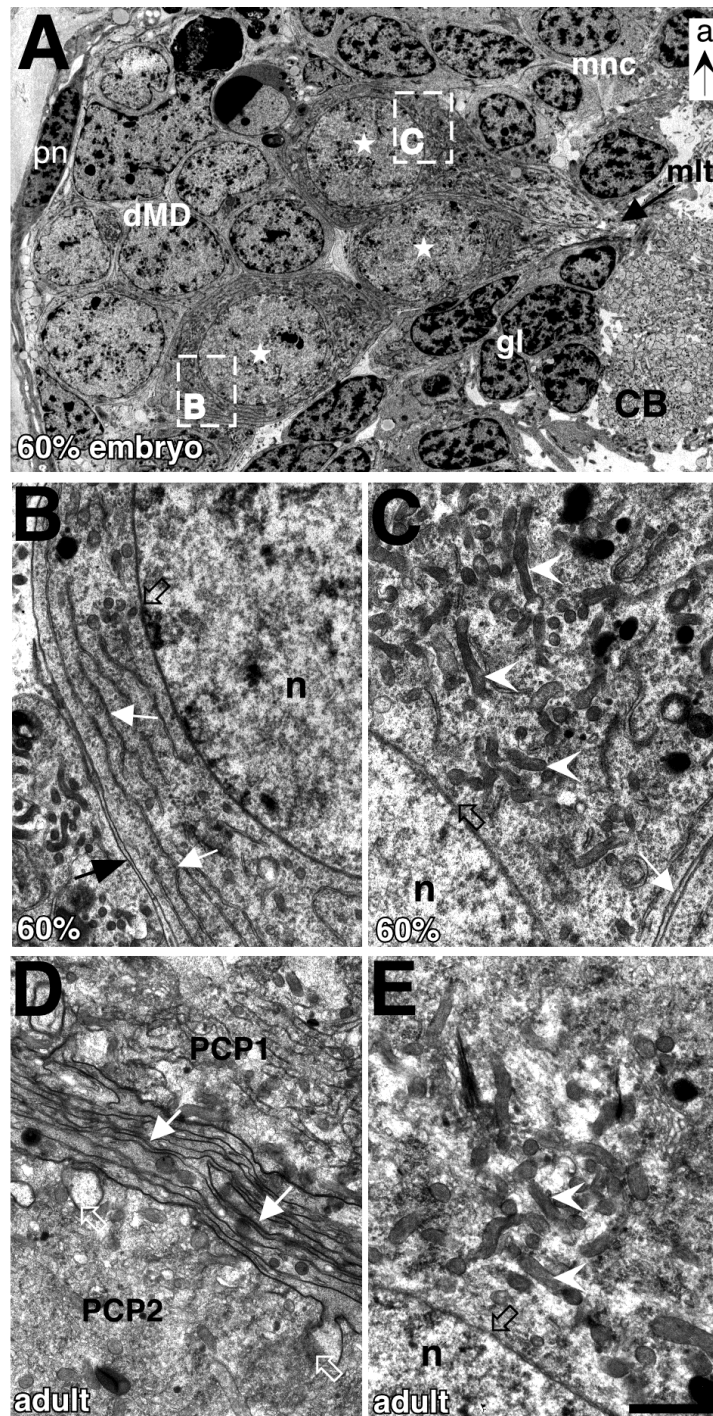


Abb. 26. Ultrastruktur der PCP Neuronen im Gehirn eines Embryos (60% Embryonalentwicklung) und einer Imago. **A** Die Abbildung zeigt die "dorsal median domain" (dMD) mit den PCP Neuronen (Sterne), dem benachbarten Zentralkörper (CB), den "median neurosecretory cells" (mnc) und Gliazellen (gl). Bereits im Embryo haben die PCP Neuronen deutlich größere Zellkörper und Nuclei als die benachbarten Zellen. Die durch gestrichelte Rechtecke gekennzeichneten Bereiche werden bei stärkerer Vergrößerung in B und C für den Embryo und vergleichbare Stellen in D und E für die Imago wiedergegeben. Der Orientierungspfeil weist nach anterior (a). **B:** Umfangreiches endoplasmatisches Reticulum (ER, weiße Pfeile) ist ein typisches Merkmal für die embryonalen PCP Zellkörper. Der schwarze Pfeil deutet auf die Zellmembran, der offene schwarze Pfeil auf die Doppelmembran des Zellkerns (n). **C:** Die große Zahl von Mitochondrien (Pfeilspitzen) unterschiedlicher Länge und Form ist ebenfalls ein charakteristisches Merkmal (vgl. Abb. E). Der weiße Pfeil markiert ER in der Zelle. **D:** Im adulten Tier umhüllen Gliazellen die Zellkörper der PCP Neuronen mit Schichten von Membranen (weiße Pfeile). Die offenen weißen Pfeile zeigen auf die von den Gliazellen gebildeten Trophospongia im Cytoplasma der PCP Neuronen. Ähnlich umfangreiches endoplasmatisches Reticulum wie im Embryo findet sich in der Imago nicht mehr. **E:** Allerdings enthalten die PCP Neuronen nach wie vor eine große Zahl von Mitochondrien (Pfeilspitzen), wie sie für den Embryo in C bereits beschrieben wurden. Der offene schwarze Pfeil markiert die Kernmembran. Abkürzungen: gl, Glia; mlt, "midline tract"; n, Nucleus; pn, Perineurium. Maßstab: A = 12µm, B und C = 1,25µm, C und D = 1µm.

4.4.5 Ultrastruktureller Vergleich der PCP Neuronen mit den "median neurosecretory cells"

Neurosekretorische Zellen sind in ihrem ultrastrukturellen Bau oft durch den Besitz von elektronendichten Granula charakterisiert (Geldiay und Edwards, 1973; Schooneveld, 1974). Ein Vergleich der PCP Neuronen mit den "median neurosecretory cells" zeigt (Abb 26A, 27), dass die PCP Neuronen keine elektronenoptisch dichten Granula besitzen. Sie verfügen dagegen über Gliahüllen mit Trophospongia, eine große Zahl von Mitochondrien und umfangreiches endoplasmatisches Reticulum in ihrem Cytoplasma (Abb 26, 27). Während sich die "median neurosecretory cells" embryonal noch nicht unterscheiden lassen, kann man sie im Imago in drei Typen einteilen die sich in der Art ihrer neurosekretorischen Granula unterscheiden (Abb 27 B - D). Die "median neurosecretory cells" vom Typ 1 besitzen eine große Zahl kleiner Granula leicht variierender Größe (Abb. 27B, C). Typ 2 Zellen beinhalten einerseits kleine Granula wie Typ 1, wenn auch nicht in so großer Zahl, andererseits noch deutlich größere Granula in nur geringer Anzahl (Abb. 27B, D). Typ 3 wird durch eine große Zahl von elektronendurchlässigen "Vesikeln" charakterisiert, die vermutlich ebenfalls neurosekretorisches Material enthalten. Elektronendichte Granula sind in Typ 3 Zellen nicht vorhanden. Im Unterschied zu den PCP Neuronen werden diese Zelltypen nicht von Gliamembranen umhüllt.

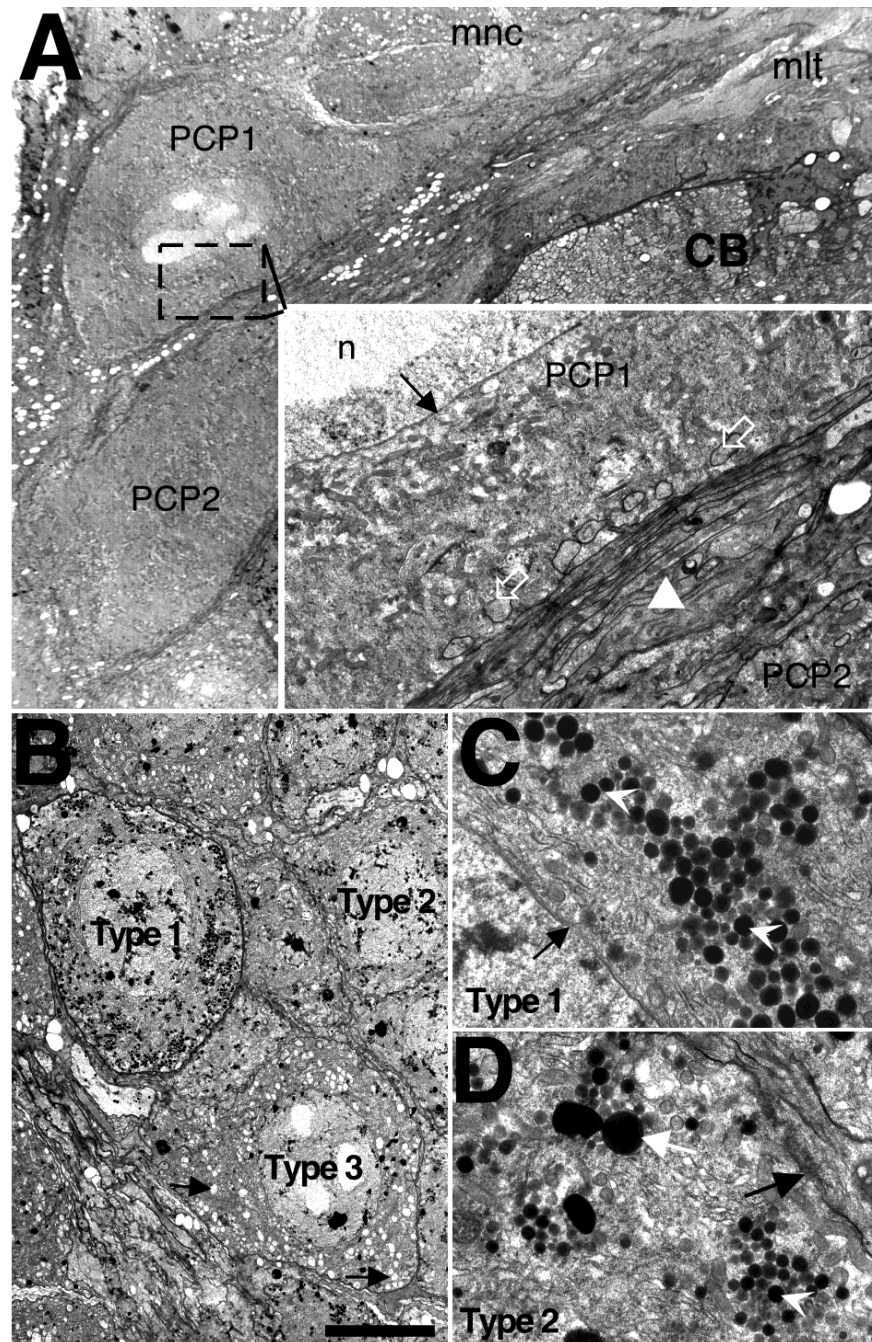


Abb. 27. Ultrastruktureller Vergleich der PCP Neuronen mit den "median neurosecretory cells" (mnc). **A:** Die beiden PCP Neuronen (PCP 1 und 2) senden ihre Axone in den "midline tract" (mlt), der dorsal des Zentralkörpers verläuft. Benachbart dazu liegen einige der "median neurosecretory cells" (mnc). Der Ausschnitt zeigt eine stärkere Vergrößerung des gestrichelten Rechtecks. Die beiden PCP Neuronen sind durch Schichten von Gliamembranen (weißes Dreieck) voneinander getrennt. Im angrenzenden Cytoplasma von PCP 1 finden sich in Abständen angeordnete Trophospongia (offene weiße Pfeile). Dagegen sind keine elektronendichten Granula vorhanden. Der schwarze Pfeil markiert die Kernmembran (n, Nucleus) von PCP 1. **B:** Innerhalb der "median neurosecretory cells" (mnc) können drei verschiedene Typen unterschieden werden. Typ 1 und 2 enthalten elektronendichte Granula unterschiedlicher Größe, während Typ 3 eine große Zahl elektronendurchlässiger Vesikel enthält (Pfeile). **C:** Typ 1 Zellen sind durch den Besitz einer großen Zahl kleiner, elektronendichter Granula leicht variierender Größe gekennzeichnet (Pfeilspitzen). Solche Granula sind typisch für neurosekretorische Zellen und es wird angenommen, dass sie Neuropeptide oder Transmitter enthalten. Der schwarze Pfeil markiert die Doppelmembran des Zellkerns. **D:** Die Zellen von Typ 2 enthalten zwei verschiedene Sorten von Granula. Auf der einen Seite findet man ebenfalls kleine Granula (Pfeilspitze), wenn auch in geringerer Zahl als Typ 1. Daneben gibt es noch wenige, deutlich größere Granula (weißer Pfeil). Der schwarze Pfeil markiert die Zellmembran. Maßstab: A = 20µm (Ausschnitt 2µm), B = 8µm, C und D = 1,25µm.

4.5 Identifizierung eines Neuropeptides in den PCP Neuronen

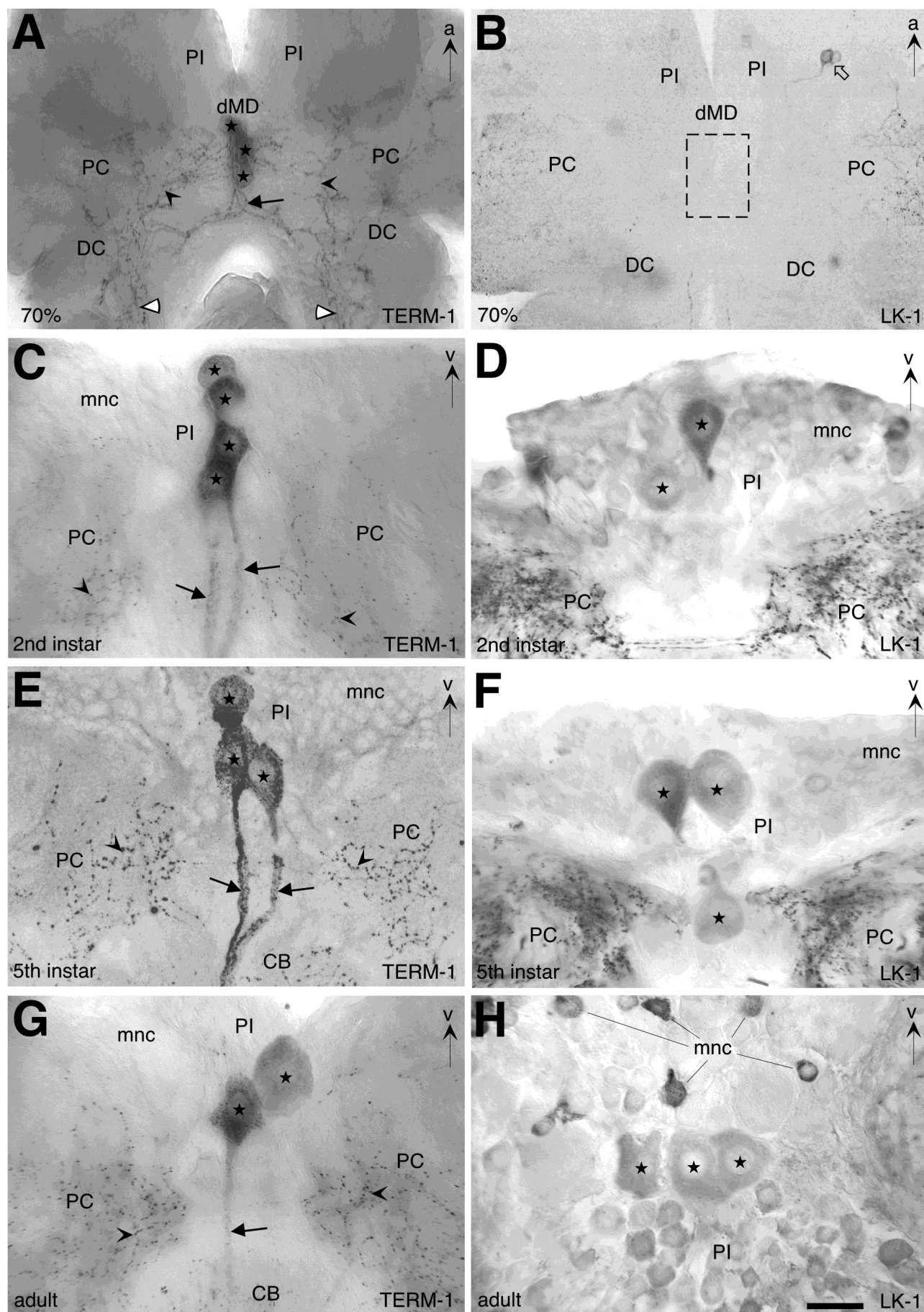
Zur genaueren Charakterisierung der PCP Neuronen wurde in einer Serie von immunhistochemischen Färbungen getestet ob die PCP neben TERM-1 noch andere spezifische Moleküle exprimieren. Getestet wurde vor allem auf Stoffe, deren Expressionsmuster Zellen im Bereich der Mittellinie im Bauchmark oder im Gehirn unterschiedlicher Insekten zeigt. Gegen folgende Moleküle wurde getestet: Allatostatin, Engrailed, Even-skipped, Fasciclin 1, Fasciclin 2, Glial fibrillary acid protein (GFAP), I-5, Lazarillo, Leukokinin-1, Meerrettichperoxidase, Perisulfakinin, Repo (siehe auch Tab. 3.1).

Die Ergebnisse für Lazarillo und Meerrettichperoxidase wurden in den Kapiteln 4.1 und 4.2 ausführlich beschrieben. Bereits früher wurde von Boyan et al. (1995a) festgestellt, dass die PCP in ihren Wachstumskegeln Fasciclin 1 exprimieren.

Drei der in dieser Untersuchung getestete Antikörper richten sich gegen Neuropeptide, die von Zellen im Bereich der Mittellinie des Heuschreckengehirns exprimiert werden (Allatostatin, Perisulfakinin, Leukokinin-1). Es erwies sich, dass von diesen Peptiden nur Leukokinin-1 in den PCP Neuronen exprimiert wird (Abb 28). Leukokinin-1 (LK-1) ist ein myotropes Octapeptid von Insekten, das ursprünglich aus Schaben isoliert wurde (Holman et al., 1986) und zur Familie der Cephalotropine gehört. Nachgewiesene Funktionen von LK-1 sind die hormonelle Kontrolle der Flüssigkeitsregulation über den Enddarm und die Malpighischen Gefäße (Cook et al., 1989; Hayes et al., 1989). LK-1 wird zusammen mit TERM-1 in den PCP Neuronen exprimiert, tritt aber im Gegensatz zu TERM-1 nur in bestimmten Entwicklungsstadien auf und unterscheidet sich von diesem zusätzlich in Intensität und Umfang des Expressionsmusters (Abb. 28).

Im Gegensatz zur TERM-1 Expression (Abb. 28A) gibt es während der Embryonalentwicklung noch keine LK-1-Expression in den PCP Neuronen (Abb. 28B). Allerdings exprimieren bereits andere, bisher nicht identifizierte Zellen im Gehirn zu diesem Zeitpunkt LK-1 (Abb. 28B). Postembryonal beobachtet man dann eine eindeutige Expression von LK-1 in den PCP Neuronen ab dem zweiten Larvenstadium (Abb. 28D). Die LK-1-Expression ist allerdings nur auf die Zellkörper beschränkt, während TERM-1 von der gesamten Zelle exprimiert wird (Abb. 28C). Darüber hinaus ist die Intensität der Färbung der LK-1-Expression in den PCP Neuronen deutlich geringer als in den kleineren, nicht identifizierten LK-1-exprimierenden Zellen im Protocerebrum. In späteren Entwicklungsstadien ist die Co-expression von TERM-1 (Abb. 28E) und LK-1 (Abb. 28F) weiter zu beobachten, beschränkt sich aber für LK-1 wieder nur auf die PCP Zellkörper. LK-1-Expression wird nie in den Neuriten oder Axonen beobachtet. Das Expressionmuster in dieser Form wiederholt sich auch im adulten Gehirn (Abb. 28G, H). Auch hier sind andere LK-1-exprimierende Zellen vorhanden, die zum Teil zu den "median neurosecretory cells" gehören.

Versuche zur simultanen Färbung mit Antikörpern gegen LK-1 und TERM-1 im selben Präparat waren bisher nicht erfolgreich. Das könnte einerseits an der insgesamt sehr niedrigen LK-1-Expression in den PCP Neuronen liegen. Es erscheint andererseits aber ebenfalls möglich, dass es zu einer gegenseitigen Störung der Färbungen kommt, falls sich die Bindungsstellen für die Antikörper überschneiden.



(Abbildungstext siehe S. 74)

Abb. 28. Coexpression von Leukokinin-1 (LK-1) in den TERM-1-exprimierenden PCP Neuronen. A und B sind Videoaufnahmen des Gehirns, C bis H Videomontagen aus unterschiedlichen Focusebenen. **A:** Bei 70% Embryonalentwicklung exprimieren die PCP Neuronen eindeutig TERM-1 in ihren Zellkörpern (Sterne), Axonen (Pfeil und weiße Pfeilspitzen) und Kollateralen (schwarze Pfeilspitzen). **B:** In dem Bereich des Gehirns, in dem die PCP liegen (gestricheltes Rechteck), ist in diesem Alter noch keine LK-1-Expression nachzuweisen. Allerdings sind andere LK-1-exprimierende Neuronen in der Pars Intercerebralis (PI) vorhanden (offene Pfeile). Der Orientierungspfeil markiert für A und B anterior (a). **C:** 2. Larve. Die TERM-1-Expression der PCP Neuronen ist nach wie vor auf den Zellkörpern (Sterne), Axonen (Pfeile) und Kollateralen in der PI (Pfeilspitzen) zu beobachten. Der Orientierungspfeil weist für diese und alle folgenden Abbildungen nach ventral (v). **D:** Die LK-1-Expression im zweiten Larvenstadium zeigt eine auf die Zellkörper der PCP Neuronen beschränkte Färbung. Auf den Axonen und Kollateralen der PCP Neuronen findet sich dagegen keine LK-1-Expression. Die Expression von LK-1 im Protocerebrum gehört nicht zu den PCP Neuronen sondern zu anderen, nicht identifizierten Zellen. **E und F:** 5.Larve. Wie oben beschrieben exprimieren die PCP Neuronen in der Larvalentwicklung weiter kontinuierlich TERM-1 und LK-1. Während TERM-1 von den Zellkörpern (Sterne), Axonen (Pfeile) und Kollateralen (Pfeilspitzen) exprimiert wird, ist die LK-1 Expression auf die Zellkörper (Sterne) beschränkt. **G und H:** Adult. Das Expressionsmuster, wie es für jüngere Entwicklungsstadien beschrieben wurde, ist auch im adulten Tier konstant. Allerdings exprimieren nun auch einige der "median neurosecretory cells" (mnc) LK-1 (**H**). Maßstab: A und B = 100µm, C, D, E und F = 45µm, G und H = 40µm.