

## 5 Diskussion

Das Heuschreckengehirn ist durch seine Größe und die Zugänglichkeit seiner Zellen für die Untersuchung von Entwicklungsprozessen auf der Basis individuell identifizierter Zellen gut geeignet. Bei Vertebraten besteht nur in Ausnahmefällen wie etwa bei der Mauthnerzelle von Fischen eine solche Möglichkeit. Bei *Drosophila* sind die einzelnen Entwicklungsstadien, respektive die Zellen in der Regel zu klein, um während der Entwicklung individuelle Neuronen zu verfolgen. Darüber hinaus ist das embryonale Gehirn von *Drosophila* durch den komplizierten Innvaginationsprozess nur sehr schwer zugänglich. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Entwicklung identifizierter Zellen in der Mittellinie des Heuschreckengehirns von *Schistocerca gregaria* untersucht. Unter Verwendung von histologischen, immunhistochemischen, elektronenmikroskopischen und intrazellulären Methoden sind dabei Aspekte zur Neurogenese, Axogenese und Morphogenese der Mittellinienzellen bearbeitet worden. Es konnte gezeigt werden, dass in der Mittellinie des embryonalen Gehirns ein unpaarer von den beiden Gehirnhemisphären unabhängiger Zellcluster auftritt, dessen Zellen zum Teil noch im adulten Gehirn vorhanden sind. Darüber hinaus beschreibt eine vergleichende anatomische und immunhistochemische Studie Gemeinsamkeiten im Bauplan der Mittellinie im Insektengehirn und Ähnlichkeiten im Expressionsmuster eines bestimmten Antigens.

### 5.1 Die Entwicklung der "median domain" im Gehirn von *Schistocerca gregaria*

#### 5.1.1 Die "median domain", ein neuer proliferierender Zellcluster in der Mittellinie des Gehirns

Die "median domain" befindet sich in der Mittellinie des embryonalen Gehirns zwischen den beiden Loben der embryonalen Pars Intercerebralis. Sie ist von den benachbarten Gehirnregionen durch Gliazellen getrennt und lässt sich so morphologisch eindeutig abgrenzen (Kapitel 4.1, Boyan et al., 1995b). Die Zellen der "median domain" unterscheiden sich soweit dies bisher untersucht wurde in ihrer Entstehung und Entwicklung von denjenigen der Gehirnhemisphären, die vor allem von Neuroblasten gebildet werden. Ein Teil der Neuronen in der "ventral median domain" und der "dorsal median domain" entsteht direkt aus dem Neuroektoderm. Andere Zellen werden durch die einzige Vorläuferzelle, den "median precursor" gebildet. Die "median domain" wird deshalb in dieser Arbeit als neuer proliferierender Zellcluster im Gehirn der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* beschrieben. Ein proliferierender Cluster enthält teilungsaktive Zellen, entwickelt sich aber unabhängig von anderen Regionen, indem er zum Beispiel durch Gliagrenzen getrennt ist und zwischen ihnen keine Zellmigration stattfindet. Ein einzelnes Neuromer des Nervensystems wie das Protocerebrum oder das Deutocerebrum wird so aus einzelnen proliferierenden Clustern aufgebaut. Als eine unabhängige, teilungsaktive Region ist die "median domain" Teil des gesamten Protocerebrums wie auch die embryonale Pars Intercerebralis oder das laterale Protocerebrum (Boyan et al., 1995b).

Die Neurogenese der "dorsal median domain" ist von besonderem Interesse, da sie die Region ist, in der die erste Kommissur entsteht, welche die beiden Gehirnhemisphären miteinander verbindet (Boyan et al., 1995a; Reichert und Boyan, 1997). In einer kürzlich veröffentlichten Studie zur Neurogenese im Gehirn der Taufliege *Drosophila* (Dumstrei et al., 1998) wird der Bereich der Mittellinie dort in eine ventrale und eine dorsale Domäne unterteilt. Die Autoren weisen nach, dass sich die "head midline cells" in diesen beiden Domänen durch Invagination aus dem Mesektoderm

bilden und sie sich in einer zur neuronalen Achse horizontalen Ebene teilen. Das ist typisch für Zellen, die aus dem mesektodermalen Streifen in der Mittellinie des Nervensystems stammen (Goodman und Doe, 1993; Dumstrei et al., 1998). Darüber hinaus wurde von Dumstrei et al. (1998) gezeigt, dass EGF ("epidermal growth factor") für den Erhalt und die Differenzierung der mesektodermalen Zellen in der Mittellinie des Gehirns von *Drosophila* notwendig ist. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen einige Gemeinsamkeiten, z.B. bei der direkten Invagination von Zellen aus dem Ektoderm, im Fehlen von Neuroblasten in der MD oder der Teilungsebenen der Zellen, mit der Entwicklung der Mittellinienregion im Gehirn von *Drosophila*. Bisher gibt es allerdings noch keinen molekularen Marker, mit dem sich mesektodermale Gewebe im Gehirn der Heuschrecke nachweisen läßt. Deshalb wird hier vorerst nur von ektodermalem Gewebe in der Mittellinie des Gehirns gesprochen bis die mesektodermale Identität eindeutig geklärt ist. Ein möglicher Ansatz wäre der Nachweis des *short gastrulation* (*sog*) Transkriptionsprodukts (deRobertis und Sasai, 1996) im Heuschreckenembryo. Der Bereich der Mittellinie im embryonalen Heuschreckengehirn ist ebenfalls in eine ventrale ("ventral median domain", vMD) und eine dorsale ("dorsal median domain", dMD) Domäne unterteilt, die von den benachbarten Gehirnregionen eindeutig durch eine REGA-1 exprimierende Gliazellschicht getrennt wird (Boyan et al., 1995a). Die Unterteilung der "median domain" bei der Heuschrecke kann aber auch über die Orientierung der Längsachsen der Zellen in beiden Bereichen der "median domain" (vgl. Abb. 1B) begründet werden. Die Längsachsen der Zellkörper in der vMD bleiben in ihrer Orientierung senkrecht zur neuronalen Achse, nachdem sie aus dem Ektoderm eingewandert sind. Für den Streifen in der Mittellinie der Ganglien im ventralen Nervensystem haben Mobbs (1976) und Goodman (1981) nachgewiesen, dass die Zellen dort ebenfalls von der Oberfläche her einwandern und die Orientierung der Einwanderung mit der Orientierung der Zellachsen übereinstimmt (Abb. 2). Im Gegensatz dazu entspricht die Orientierung der Zellen in der dMD der neuronalen Achse (Abb. 1B) und der Richtung weiterer Teilungen (Abb. 3, 6). Das bedeutet, die Zellen teilen sich in einer horizontalen Ebene und nicht wie die Neuroblasten im ventralen Nervensystem senkrecht dazu (Doe und Goodman, 1985a).

Da bisher Daten zu den Faktoren fehlen wie die Neurogenese im Mittellinienbereich des Heuschreckengehirns reguliert wird, und ob sie mit der Neurogenese bei *Drosophila* vergleichbar ist (Klämbt et al., 1991; Sonnenfeld und Jacobs, 1994; Dumstrei et al., 1998), kann man nur aufgrund der Ähnlichkeit der Organisation der "median domain" vermuten, dass die Mittellinienzellen auch bei Heuschrecken eine mesektodermale Herkunft wie bei *Drosophila* haben. In der Mittellinie des ventralen Nervensystems von *Drosophila* und Heuschrecke befinden sich ebenfalls Zellen mesektodermaler Herkunft (Klämbt et al., 1991; Goodman und Doe, 1993) wie der unpaare "median neuroblast" (MNB) und verschiedenen "median precursor" Zellen. Der MNB erzeugt in aufeinander folgenden Teilungsphasen sowohl unterschiedliche neuronale Tochterzellen wie auch den größten Teil der Mittelliniengliazellen (Condrón und Zinn, 1994). Allerdings unterscheiden sich der MNB und seine Abkömmlinge durch die Expression von Engrailed von den Zellen der "median domain" im Gehirn, die keine Engrailed-Expression aufweisen (Boyan et al., 1995c). Dagegen exprimieren allerdings die anterior in den segmentalen Ganglien gelegenen "median precursor" Zellen ebenfalls kein engrailed und könnten damit dem "median precursor in der "dorsal median domain" entsprechen. Trotz bestehender Ähnlichkeiten zwischen den Mittellinienzellen im Gehirn und im ventralen Nervensystem kann aber noch keine endgültige Aussage zur mesektodermalen Herkunft der "median domain" im embryonalen Gehirn der Heuschrecke gemacht werden.

### 5.1.2 Abstammung identifizierter Zellen in der "dorsal median domain"

Eine kleine Anzahl von Zellen wurde bereits von Boyan et al. (1995a, b) in der "dorsal median domain" des embryonalen Heuschreckengehirns identifiziert. Dazu gehören z.B. die "primary commissure pioneers" (PCP), die an der Bildung der "primary commissure" beteiligt sind. Allerdings konnte ihre Abstammung bisher nicht eindeutig geklärt werden. Versuche zur Identifikation teilungsaktiver Zellen in der "median domain" mit Hilfe von BrdU-Aufnahme zeigen (Abb. 2), dass es in der dMD nur eine einzige Vorläuferzelle, den "median precursor", gibt, der sich bei etwa 25% der Embryonalentwicklung aus dem Ektoderm entwickelt. Meerrettichperoxidase-Immunhistochemie (Abb. 4), BrdU-Aufnahme (Abb. 2) und Einzelzellfärbungen (Abb. 5, 6, 7, 18) bestätigen, dass sich keine anderen Vorläuferzellen in der weiteren Embryonalentwicklung in der dMD differenzieren. Der "median precursor" bildet bis etwa 45% der Entwicklung 6 Tochterzellen (Abb. 8), die als Nervenzellen zu identifizieren sind (Abb. 4). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, bei denen proliferierende Zellen in der "median domain" von *Schistocerca gregaria* indirekt über die Annulin Expression ihrer Gliahüllen nachgewiesen wurden (Boyan et al., 1995c). Der Zeitraum der Annulin Expression in der "dorsal median domain" stimmt dabei mit der Zeitspanne überein, in der der "median precursor" seine Tochterzellen bildet.

### 5.1.3 Einzelzellfärbungen identifizierter Neuronen

Bei der Untersuchung der einzelnen Zelltypen in der "dorsal median domain" (dMD) und der embryonalen Pars Intercerebralis (PI) durch intrazelluläre Färbung mit Luzifer Yellow stellt sich heraus, dass die verschiedenen gefüllten Zelltypen ("median precursor", "primary commissure pioneers", "lateral cells" und die Neuroblasten 1 - 3 der PI) nicht miteinander gekoppelt sind (Abb. 5, 6, 7, 18). Der Nachweis der Kopplung von Zellen über diffundierende Farbstoffe ist eine Methode, die Abstammung dieser Zellen zu untersuchen. Goodman und Spitzer (1979) beschreiben, dass Zellen über einen bestimmten Zeitraum mit ihren Mutterzellen über das Cytoplasma gekoppelt bleiben. Die Injektion des Farbstoffs in eine Zelle färbt dabei gleichzeitig auch die entsprechenden Mutter- oder Tochterzellen. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen folgt, dass der "median precursor" mit seinen Tochterzellen, die "primary commissure pioneers" (PCP) und die LC ("lateral cells"; siehe auch Graf et al., 2000) eine voneinander unabhängige Entstehung und Entwicklung durchlaufen. Weiter deuten die Ergebnisse für die PCP Neuronen und für die LC darauf hin, dass für sie keine Vorläuferzelle existiert (Abb. 6, 7, 18) und sie sich vor 30% Embryonalentwicklung direkt aus dem Ektoderm bilden. In ihrer Entstehung aus einem Epithelium und der Bildung einer Pionierbahn erinnern die PCP Neuronen an die TiI Pioniere (Bentley und Keshishian, 1982). Die TiI Pioniere entstehen im Ektoderm der Beinknospe und wachsen von dort entlang der Grenze zwischen Ektoderm und Mesoderm in Richtung Mittellinie. Auf diesem Weg faszikulieren sie mit Motoneuronen des zentralen Nervensystems. Auf diese Weise etablieren sie das erste Faszikel des Beinnervs. Ein wichtiger Unterschied ist, dass die TiI Pioniere anschließend absterben (Kutsch und Bentley, 1987), während die PCP Neuronen überleben und auch zur Bildung des adulten Nervensystems beitragen (Abb. 23, 24).

## 5.2 Die Bildung des axonalen Grundgerüsts im Gehirn von *Schistocerca gregaria*

### 5.2.1 Axogenese im embryonalen Gehirn

Zwei Schlüsselereignisse bei der Entstehung des Gehirns in der frühen Embryonalentwicklung sind die Einwanderung von Neuroblasten aus dem Ektoderm (Zacharias et al., 1993; Boyan und Williams, 1997) und die gerichtete Axogenese der Nervenzellen, bei der Pionierneuronen ein axonales Grundgerüst aufbauen (Boyan et al., 1995a). In dieser Studie über die Axogenese im embryonalen Gehirn der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* wird beschrieben, dass unabhängig von der Komplexität des adulten Gehirns in der frühen neuronalen Entwicklung einfache Prozesse der Axogenese ablaufen, an denen identifizierte Zellen beteiligt sind.

Immunhistochemische Färbungen gegen Meerrettichperoxidase zeigen eine gerichtete Axogenese, die von spezifischen Zellclustern an stereotypen Stellen im Gehirn ausgeht und die spezifische axonale Bahnen etablieren (Reichert und Boyan, 1997). Bei diesen Zellclustern handelt es sich um Gruppen von wenigen Zellen, die sich zwischen 27% und 30% differenzieren. Sowohl für *Drosophila* (Therianos et al., 1995; Nassif et al., 1998) als auch für *Schistocerca gregaria* (Boyan et al., 1995a) wurden an solchen Stellen Neuronen beschrieben, deren Axone von Zellcluster zu Zellcluster wachsen und diese longitudinal und kommissural verbinden. Diese schrittweise Entwicklung erzeugt ein axonales Gerüst, das in senkrecht zueinander verlaufenden Bahnen rund um das Stomodum angeordnet ist (Reichert und Boyan, 1997). Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, exprimiert ein Teil dieser Zellcluster im frühembryonalen Gehirn von Heuschrecken dabei das Antigen Lazarillo (vgl. Abb.10, 11). Die Lazarillo Expression wurde hier verwendet, um die Entstehung des axonalen Grundgerüsts zu untersuchen.

### 5.2.2 Die Lazarillo-Expression im Gehirn von *Schistocerca gregaria*

Vergleichbar zur Entwicklung im ventralen Nervensystem (Bastiani et al., 1987) exprimiert ein Teil der Neuronen, die im embryonalen Gehirn axonale Bahnen bilden das homophile Zell - Zell Adhäsionsmolekül Fasciclin 1 (Bastiani et al., 1987; Boyan et al., 1995a). Allerdings ist im Gehirn dieses Antigen allein nicht ausreichend, um eindeutig individuelle Neuronen zu identifizieren, die zur Bildung des axonalen Gerüsts beitragen. Ein weiteres Antigen, Lazarillo, wird von einer begrenzten Anzahl von Zellen im frühembryonalen Gehirn der Heuschrecke exprimiert. Lazarillo ist ein Oberflächenprotein aus der Familie der Lipocaline, das über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Rest (GPI) in der Zellmembran verankert ist (Ganforina et al., 1995). Wie Fasciclin 1 wird Lazarillo nur von einem Teil der Neuronen im Nervensystem des Heuschreckenembryos exprimiert (Sanchez et al., 1995), die sich aber eindeutig identifizieren lassen.

Im peripheren Nervensystem wurde für GPI verankerte Proteine bereits von Chang et al. (1992) eine Funktion bei der Bildung von Pionierbahnen gezeigt. Sanchez et al. (1995) beschreiben für das ventrale Nervensystem eine Beteiligung von Lazarillo-exprimierenden Zellen an der Etablierung frühembryonaler axonaler Bahnen. Die "anterior commissure pioneers" (AcP) bilden in den einzelnen Bauchmarkganglien die anteriore Kommissur (Sanchez et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit werden einzelne Zellen und Zellcluster im frühembryonalen Gehirn der Heuschrecke anhand ihrer Lazarillo-Expression identifiziert. In Kombination mit Einzelzellfärbungen durch Farbstoffinjektion in unterschiedlichen Entwicklungsstadien ist es möglich, den Beitrag dieser Zellen zur Bildung des axonalen Grundgerüsts zu bestimmen. Dabei werden die LaC (Lazarillo exprimierenden Cluster) schrittweise durch Lazarillo-exprimierende Axone verknüpft, und bilden dabei ein Netzwerk, das in

seinem Grundmuster dem axonalen Grundgerüst entspricht. Über Antigen-Blockierungsexperimente könnte in einem nächsten Schritt nun gezeigt werden, in welcher Weise Lazarillo-exprimierende Zellen für den Aufbau des axonalen Grundgerüsts notwendig sind.

### 5.2.3 Die Entwicklung der "lateral cells" (LC)

Die Untersuchung des Lazarillo-exprimierenden Zellclusters LaC 2 in der "dorsal median domain" (dMD), der nur aus der "lateral cell" (LC) besteht, zeigt für diese Zelle einen besonderen Entwicklungsverlauf (Abb. 10, 13, 14). Zu keinem Zeitpunkt ihrer Entwicklung ist eine der "lateral cells" weder mit dem "median precursor", der einzigen mitotisch aktiven Zelle in der "dorsal median domain" noch mit einer anderen Zelle in der dMD oder der Pars Intercerebralis gekoppelt (Abb. 5, 6, 7). Trotz der hier verwendeten begrenzten methodischen Möglichkeiten zur Untersuchung der Abstammungsverhältnisse ist anzunehmen, dass die "lateral cells" sich ohne Vorläuferzelle direkt aus dem Ektoderm der dMD differenzieren. Falls diese Vermutung richtig ist, sind sie nicht die einzigen Zellen in der dMD, die eine solche Entwicklung durchlaufen. Die TERM-1-exprimierenden PCP Neuronen differenzieren sich aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls direkt und ohne eine nachweisbare Vorläuferzelle aus dem Neuroektoderm der dMD (Kapitel 4.3, Ludwig et al., 1999). In dieser Beziehung entspricht die Neurogenese der "lateral cells" und der PCP Neuronen der Zellentwicklung, wie sie für die vergleichbaren Regionen in *Drosophila* beschrieben wurde (Dumstrei et al., 1998).

### 5.2.4 Beitrag der Lazarillo-exprimierenden Zellen zur Bildung des axonalen Grundgerüsts

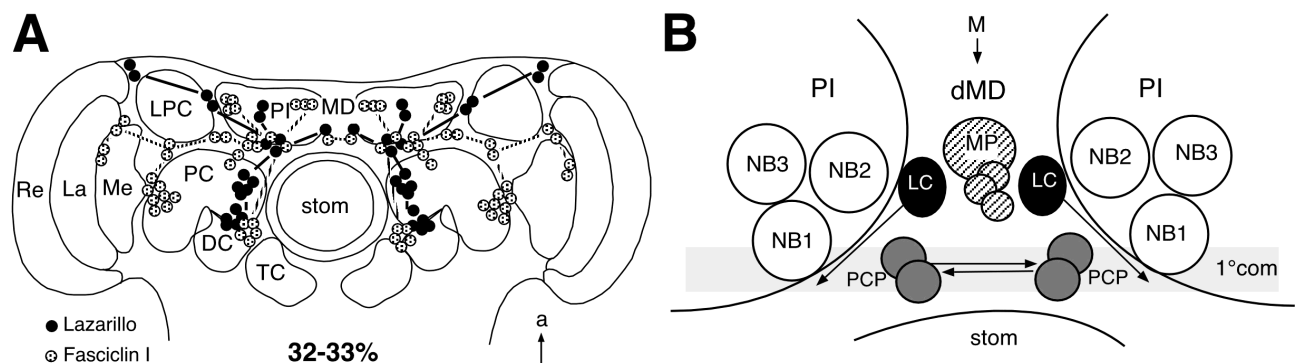
Die Ergebnisse zeigen weiter, dass Zellen aus jedem der beschriebenen Zellcluster (LaC 1 - 7, Abb. 15, 16) das Lazarillo Antigen im frühembryonalen Gehirn der Heuschrecke exprimieren. Die Anzahl dieser Lazarillo-exprimierenden Zellen in den einzelnen Clustern ist auch in unterschiedlichen Präparationen immer konstant (Abb. 10, 16). Darüber hinaus gibt es in den einzelnen Clustern aber noch weitere Nervenzellen, die keine Lazarillo Expression zeigen. Deren Beitrag zum axonalen Grundgerüst im Heuschreckengehirn konnte bisher nicht ermittelt werden, da es bisher noch keine sicheren Methoden gibt, sie wiederholt zu identifizieren. Im Gegensatz dazu gibt es aber eindeutige Hinweise darauf, dass alle Lazarillo exprimierenden Zellen an der Bildung des axonalen Grundgerüsts beteiligt sind. Das zeigt die Analyse der Entwicklung einzelner Zellen durch Farbstoffinjektionen (Abb. 12, 13) und durch die Tatsache, dass die gesamte Zelle Lazarillo exprimiert (Abb. 13). Lazarillo ist als Oberflächenprotein geeignet, als interzellulärer Marker oder Zellerkennungsmolekül zu fungieren. Beispiele dafür sind die Entwicklung der "lateral cells" und die Axogenese in LaC1. Die "lateral cells" etablieren eine laterale Bahn und nützen die Lazarillo-exprimierenden Zellen in den Clustern LaC1 und 3 als Wegweiser für ihre Axogenese (Abb. 14). Zellen aus LaC 1 bilden orthogonal zueinander verlaufende axonale Bahnen an einer Stelle, an der sich Axone aus dem Proto- und Deutocerebrum und der "median domain" treffen (Abb. 12). Daraus folgt, dass die Axogenese einzelner Zellen in einer bestimmten Region des Gehirns immer in der gleichen Art und Weise zur Bildung des axonalen Grundgerüsts beiträgt.

Die Entstehung dieses Grundgerüsts verläuft über eine Reihe von Einzelschritten, wodurch die Lazarillo-exprimierenden Zellen ein Netz von Bahnen aufbauen. Die ersten Lazarillo-exprimierenden Zellen erscheinen anterior des Stomodaeums in der Nähe der Mittellinie (LaC 1, Abb. 16) und bilden anschließend axonale Verbindungen mit weiteren lateral, anterior und posterior liegenden Clustern. Bis 43% der Embryonalentwicklung entsteht dadurch rund um das Stomodaeum ein symmetrisches

Gerüst aus Lazarillo-exprimierenden Axonen.

### 5.2.5 Vergleich der Lazarillo- und Fasciclin 1-Expression

Die Lazarillo-exprimierenden Bahnen liegen medial rund um das Stomodeum und in den anterioren Bereichen der embryonalen Pars Intercerebralis und des Protocerebrums. Weiter lateral liegende Bahnen, z. B. in den optischen Loben oder im lateralen Deuto- und Tritocerebrum werden dagegen nicht gefärbt (vgl. Boyan et al., 1995a). Das ergibt ein Vergleich der Lazarillo-Expression mit der Expression von Fasciclin 1 im embryonalen Heuschreckengehirn (Abb. 39). Die Fasciclin 1-Expression beginnt in den Zellclustern der optischen Loben (Abb. 39) und setzt sich nach medial fort. Dabei bauen die einzelnen Fasciclin 1-exprimierenden Zellen sukzessive axonale Verbindungen auf (Bastiani et al., 1987; Boyan et al., 1995a). Der Vergleich mit Lazarillo zeigt, dass die Fasciclin 1-exprimierenden Zellen in dem Entwicklungszeitraum zwischen 29% und 32% der Embryonalentwicklung von der Peripherie des Gehirns ausgehend axonale Bahnen in Richtung Mittellinie bilden. Gleichzeitig entwickeln Lazarillo-exprimierende Neuronen von der Mittellinie aus laterale, anteriore und posteriore axonale Bahnen. Die Bildung des axonalen Grundgerüsts beruht also auf der gerichteten Axogenese einzelner Neuronen. Einige dieser Bahnen werden durch Lazarillo- und Fasciclin 1-exprimierende Zellen gebildet, wobei die Expression nicht notwendigerweise in den gleichen Zellen oder Zellclustern zu finden ist. Axogenese in unterschiedliche Richtungen findet sich auch innerhalb einzelner Cluster. In Cluster LaC 1 bilden Neuronen senkrecht zueinander verlaufende Bahnen, die dem Axon der "lateral cell" als Orientierung dienen (vgl. Abb. 14).



**Abb. 39.** Pionierneuronen im embryonalen Heuschreckengehirn. **A:** Die Schemazeichnung vergleicht, in welcher Weise Lazarillo-exprimierende Cluster (schwarz) und Fasciclin 1-exprimierende Cluster (punktiert) zur Bildung des axonalen Gerüsts im embryonalen Heuschreckengehirn bei 32 - 33% beitragen. Lazarillo-exprimierende Bahnen sind schwarz dargestellt, Fasciclin-1-exprimierende Bahnen gestrichelt. Der Pfeil zeigt nach anterior (a). **B:** Identifizierte Zellen in der "dorsal median domain" (dMD) in der Mittellinie (M) des Gehirns bei 32 - 33%. Der "median precursor" (MP) hat 3 Tochterzellen gebildet (gestrichelt). Beiderseits seiner Abstammungslinie liegen die beiden "lateral cells" (LC, schwarz), deren Axone lateral entlang der Grenzen zur Pars Intercerebralis (PI) wachsen (Pfeile). In der PI (schwarze Linien) befinden sich die identifizierten Neuroblasten 1 - 3 (NB 1 - 3). Weiter posterior liegen die paarigen TERM-1-exprimierenden "primary commissure pioneers" (PCP, grau). Die LC exprimieren Lazarillo, während die PCP in ihren Axonen Fasciclin 1 exprimieren. Posterior der dMD liegt das durch die schwarze Linie angedeutete Stomodeum (stom). Maßstab: A = 200µm, B = 20µm.

### 5.2.6 Schrittweise Entwicklung des axonalen Grundgerüsts

Die Beschreibung der Expressionsmuster von Lazarillo und Fasciclin 1 geben einen Einblick in die schrittweise Entwicklung des axonalen Grundgerüsts (Abb 39). In weiterführenden Experimenten, zum Beispiel durch Blockierung einzelner Antigene wie es für die Lazarillo-Expression in ventralen Nervensystem durchgeführt wurde (Sanchez et al., 1995), muss nun untersucht werden, nach welchen molekularen Markern sich die einzelnen Neuronen orientieren und welche übergeordneten Steuerelemente eingeschaltet sind. Für das ventrale Nervensystem von *Drosophila* sind bereits einige Mutanten beschrieben worden, die zeigen welche Gene bei der Steuerung der Bildung eines axonalen Grundgerüsts beteiligt sind (vgl. Goodman und Doe, 1993). Die Mutation von Genen wie *sim* oder *slit* (Zinn und Sun, 1999; Nambu et al., 1991), welche die Entwicklung der Mittellinienzellen betreffen führen durch das Fehlen dieser Zellen zu einer abnormen Bildung der beiden Kommissuren der ventralen Ganglien und wenig später zu ihrem Verschwinden. Zusätzlich fusionieren die longitudinalen Trakte in der Mittellinie. Die Mutationen in den Genen *comm* (*commissureless*) und *robo* (*roundabout*) führen zu einem zum vollständigen Fehlen aller Kommissuren im ventralen Nervensystem beziehungsweise zum Überqueren der Mittellinie von Zellen, die normalerweise nur ipsilateral wachsen (Goodman und Shatz, 1993; Seeger et al., 1993). Während *comm* vermutlich als positives Signal Wachstumskegel über die Mittellinie leitet, verhindert *robo* durch eine abstoßende Wirkung das Überqueren der Mittellinie durch andere Neuronen.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Lazarillo-Expression ist die Tatsache, dass sie in einigen Clustern weit über den Zeitraum hinaus, in dem sich das axonale Grundgerüst bildet, beibehalten wird. Axonale Bahnen, die das Gehirn mit dem ventralen Nervensystem verbinden und Bahnen im "dorsal tegumentary nerve", sind bis in die späte Embryonalentwicklung hinein Lazarillo-immunreaktiv (Graf et al., 1999). Diese Expression in späteren Entwicklungsstadien sollte auch ein Ziel weiterführender Untersuchungen sein.

### 5. 3 Die Entwicklung der "primary commissure pioneers"

#### 5.3.1 Immunhistochemisch identifizierbare Nervenzellen

Aufgrund der Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern gegen Neurotransmitter und Neuropeptide (vgl. Raabe, 1989; Nässel, 1993) wurden sowohl im zentralen wie auch im peripheren Nervensystem von Insekten eine große Zahl von Neuronen beschrieben, die Antigene wie zum Beispiel Leukokinin-1 (Nässel et al., 1992), Proctolin (Nässel und O'Shea, 1987) oder FMRFamide (White et al., 1986; Homberg et al., 1990) exprimieren. Dabei ist die zellspezifische Expression eines einzelnen Moleküls in nur wenigen Nervenzellen im Nervensystem von Insekten selten (Nässel et al., 1989; Truman und Copenhaver, 1989; Lundquist und Nässel, 1990).

In dieser Arbeit wird die Entwicklung (Kapitel 4.3), die Ultrastruktur (Kapitel 4.4) und das Expressionsmuster (Kapitel 4.5) von identifizierten Interneuronen im Heuschreckengehirn dargestellt. Die "primary commissure pioneers" (PCP) der "dorsal median domain" sind die einzigen Zellen im gesamten Nervensystem von *Schistocerca gregaria*, die das TERM-1 Antigen exprimieren (Meier et al., 1993). Ein ähnlich exklusives Expressionsmuster ist bisher nur für drei andere Antigene bei Insekten beschrieben worden. Zum einen sind das die beiden Vasopressin-exprimierenden VPLI Neuronen im Unterschlundganglion der Heuschrecke (Thompson et al., 1991; Tyrer et al., 1993), zum anderen die vier Eclosionshormon (EH) exprimierenden Zellen (Truman und Copenhaver, 1989) in der Larve und die vier PTTH (prothoracicotropes Hormon) produzierenden Zellen in der Puppe von *Manduca sexta* (Agui et al., 1979 und 1980).

#### 5.3.2 Die Entwicklung der "primary commissure pioneers" im Gehirn von *Schistocerca gregaria*

Die "primary commissure pioneers" (PCP) stammen direkt aus dem Ektoderm der "median domain" des sich entwickelnden Gehirns (Kapitel 4.1 und 4.3) und bilden die erste interhemisphärische Kommissur (Boyan et al. 1995a). Die Expression des TERM-1 Antigens beginnt bei 40% der Embryonalentwicklung und dauert bis ins adulte Gehirn an (Abb. 17, 24). Die permanente Antigen-Expression ermöglicht es, die Entwicklung der PCP Neuronen und ihre Axogenese im Verlauf der gesamten Ontogenese zu verfolgen (Abb. 20, 22, 24). Durch die Kombination von immunhistochemischen Färbungen mit intrazellulären Injektionen und klassischer Histologie wird die gesamte Entwicklung der PCP Neuronen von ihrer Geburt in der "median domain" (vgl. Ludwig et al., 1999) bis in das adulte Stadium (vgl. Ludwig et al., 2000a) im Detail beschrieben. Sie sind damit die ersten Zellen im Gehirn von Insekten, deren komplette Ontogenese bekannt ist. Das ermöglicht es zum Beispiel über Blockierungs- oder Ablationsexperimente zu einem beliebigen Zeitpunkt der Entwicklung den Einfluss der PCP Neuronen auf die Ontogenese zu bestimmen.

#### *Identifizierung der "primary commissure pioneers"*

Die "primary commissure pioneers" (PCP) beginnen bei 40% Embryonalentwicklung mit der Expression von TERM-1. Bisher wurden nur zwei Paare von Zellen beschrieben, die das TERM-1 Antigen exprimieren (Meier et al., 1993). Der Vergleich der Lage und Morphologie der Zellen, die hier als PCP Neuronen beschrieben werden, mit den von Meier et al. (1993) beschriebenen Zellen, läßt zweifelsfrei erkennen, dass es sich um identische Zellen handelt. Die Axone der PCP Neuronen projizieren in den "midline tract" und von dort über den "posterior fascicle XVII" zur kontralateralen Seite. Danach verlaufen sie im "dorsal tract" der Schlundkonnektive zum VNC. Das entspricht



ebenfalls dem Verlauf der Axone, wie sie von Meier et al. (1993) beschrieben wurden.

### ***TERM-1 Expressionsmuster***

Nachdem die PCP Neuronen die "primary commissure" etabliert haben (Boyan et al., 1995a), bilden sie umfangreiche Verzweigungen in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns, wie dem Zentralkörper, der protocerebralen Brücke, den Antennenloben und den optischen Loben (Abb. 20, 24). Außerdem projizieren sie in die thorakalen und abdominalen Ganglien (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999). Dieses umfangreiche Netzwerk von TERM-1-immunoreaktiven Verzweigungen macht es schwierig, Bereiche für synaptischen Input zu identifizieren. Die einzigen bisher beschriebenen Nervenzellen bei Insekten, die ein ähnlich umfangreiches Projektionsmuster im Nervensystem aufweisen, sind die beiden Vasopressin-immunoreaktiven (VPLI) Neuronen im Unterschlundganglion von Insekten (Thompson et al., 1991; Tyrer et al., 1993). Thompson et al. (1991) stellten fest, dass die immunhistochemische Färbung der VPLI Neuronen nicht die gesamten Verzweigungen der Zellen zeigt. Feine Kollateralen im Bereich der Mittellinie nahe den Zellkörpern lassen sich nur mit Hilfe intrazellulärer Füllungen nachweisen. Diese Bereiche interpretieren Thompson et al. (1991) als Abschnitte für synaptischen Input. Nur mit Hilfe von intrazellulären Farbstoffinjektionen im adulten Tier kann nachgewiesen werden, ob vergleichbare, nicht TERM-1-immunoreaktive Bereiche auch für die PCP Neuronen existieren.

### ***Funktionelle Interpretation der TERM-1-Expression***

Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, wo genau TERM-1 in der Zelle lokalisiert ist und ob sich die Expression dynamisch verändert. TERM-1 ist ein 48 kDa schweres Glycoprotein (Meier et al., 1993), das biochemisch nicht weiter charakterisiert wurde. Meier et al. (1993) beobachteten eine hohe Expression von TERM-1 in den Wachstumskegeln und an den Spitzen der Kollateralen während des Wachstums in der frühen Embryonalentwicklung. Im weiteren Verlauf verschwand die Expression in den Axonen. Auf der Basis dieser Beobachtung schlugen Meier et al. (1993) für TERM-1 eine Rolle bei der Wegfindung beziehungsweise der Zielerkennung vor. Die hier präsentierten Ergebnisse bestätigen diese Annahme nicht. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die PCP Neuronen die erste interhemisphärische Kommissur bilden (Boyan et al., 1995). Dieser Prozess findet aber deutlich vor dem Beginn der TERM-1-Expression statt. Weiter wurde in dieser Untersuchung aber keine Reduktion der TERM-1-Expression in den Axonen beobachtet. In den Zellkörpern, Axonen und Kollateralen ist während der gesamten Entwicklung bis zum adulten Tier eine intensive TERM-1-Expression zu beobachten (Abb. 21, 22, 24). Vermutlich sind die von Meier et al. (1993) präsentierten Ergebnisse in diesem Punkt auf Artefakte in den Färbungen zurückzuführen. Außerdem konnte eine TERM-1-Expression nur im Cytoplasma der untersuchten Zellen beobachtet werden, nicht aber in den Zellmembranen oder auf der Zelloberfläche (Abb. 25). Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass TERM-1 Signalfunktionen bei der axonalen Wegfindung und Zielerkennung erfüllt. Die Rolle der TERM-1-Expression für die Entwicklung und Funktion der PCP Neuronen bleibt damit vorerst ungeklärt. Hinweise auf mögliche Funktionen lassen sich aus der Analyse der Ultrastruktur der PCP Neuronen (Kapitel 4.4) und der Coexpression eines Neuropeptids (Kapitel 4.5) ableiten.

### 5.3.3 Ultrastruktur der PCP Neuronen

Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse zeigen, dass die PCP Neuronen einzigartige Zellen in der Mittellinie des Gehirns sind. Sie enthalten umfangreiches endoplasmatisches Reticulum (ER) und eine hohe Dichte an Mitochondrien in ihrem Cytoplasma. Das ist ein Hinweis auf hohe Stoffwechselraten in den PCP Neuronen. Darüber hinaus unterscheiden sie sich von den "klassischen" neurosekretorischen Zellen der Mittellinie ("median neurosecretory cells", Kapitel 4.5) durch ihre Größe, ihr umfangreiches Cytoplasma und den Besitz von multiplen Gliaschichten mit Trophospongia (Abb. 26, 27). Außerdem fehlen ihnen die typischen neurosekretorischen Granulae (Abb. 26, 27, Geldiay and Edwards, 1973). Während die "median neurosecretory cells" über den Corpora cardiaca Nerv 1 zur Corpora cardiaca projizieren und dort ihre Inhaltsstoffe abgeben (Agui et al., 1979; Copenhaver and Truman, 1986), bilden die PCP Neuronen absteigende Axone zum ventralen Nervensystem. Das heißt, beide Zelltypen haben deutlich unterschiedliche axonale Projektionen

Da die PCP Neuronen keine neurosekretorischen Granula enthalten und nicht als klassische neurosekretorische Zellen gelten können erscheint eine neurosekretorische Funktion unwahrscheinlich. Aufgrund des umfangreichen Projektionsmusters im Nervensystem könnten Stoffwechselprodukte der PCP Neuronen allerdings sehr wohl im Nervensystem verteilt werden. Die anatomischen und immunhistochemischen Ergebnisse (Kapitel 4.5) weisen damit auf eine Interpretation der PCP Neuronen als absteigende Nervenzellen mit einem umfangreichen Innervationsmuster hin, die ein Neuropeptid als Neuromodulator verwenden und vermutlich noch einen weiteren bisher nicht identifizierten primären Transmitter besitzen (vgl. Kapitel 5.3.4).

In der Literatur wurden vergleichbare Zellen zu den PCP Neuronen schon früher bei anderen Insekten beschrieben: *Calliphora erythrocephala*, PIOL: Ohlsson et al., 1989; *Achaeta domesticus*, "type 4": Geldiay and Edwards, 1973; *Periplaneta americana*, "type 2": Krauthammer, 1985. Diese Zellen weisen gemeinsame Merkmale in der Zahl ihrer Zellkörper, der Zellgröße und ihrer Lage in der Pars Intercerebralis auf (vgl. auch Kapitel 5.4.8) und besitzen, soweit dies untersucht wurde eine vergleichbare Ultrastruktur wie zum Beispiel einen Mantel aus Gliazellen mit Trophospongia oder ein umfangreiches ER. Die für *A. domesticus* beschriebenen Zellen enthalten neurosekretorische Granula und wurden von Geldiay und Edwards (1973) als Teil der neurosekretorischen Zellen definiert. Die für *P. americana* beschriebenen Zellen enthalten keine Granula und wurden von Krauthammer (1985) deshalb als nicht neurosekretorisch eingestuft.

### 5.3.4 Coexpression von TERM-1 mit Leukokinin-1 in den "primary commissure pioneers"

Ab dem zweiten Larvenstadium läßt sich in den Zellkörpern der PCP Neuronen mit Hilfe eines gegen das Neuropeptid Leukokinin-1 gerichteten Antikörpers eine Färbung nachweisen. Für die weiteren getesteten Antikörper (vgl. Tabelle 3.1) konnte keine Expression beobachtet werden. Leukokinin-1 (LK-1) ist ein myotropes Octapeptid bei Insekten, das zum ersten Mal aus der Schabe *Leucophaea maderae* isoliert wurde (Holman et al., 1986). Für LK-1 wurden Funktionen als Neuromodulator oder Neurotransmitter vorgeschlagen (Nässel et al., 1992). Nachgewiesen werden konnte eine Funktion bei der Kontrolle der Enddarmkontraktionen bei Schaben (Holman et al., 1986) und bei der Wasserregulation in den Malpighi Gefäßen von Mücken (Cook et al., 1989; Hayes et al., 1989; Torfs et al., 2000). Eine Leukokinin-1-ähnliche Expression in den PCP Neuronen konnte in keinem Embryonalstadium nachgewiesen werden. Sie findet sich erst während der Larvalentwicklung und ist

dann bis zur Imago konstant (Abb. 28). Dieses erst larvale Auftreten der LK-1-ähnlichen Expression könnte mit der Veränderung der Nahrung von Dotter auf pflanzliche Stoffe nach dem Schlüpfen zusammenhängen, da LK-1 wie bereits angesprochen unter anderem an der Kontrolle der Enddarmkontraktion beteiligt ist. Allerdings müßte über die Isolierung der immunoreaktiven Substanz noch nachgewiesen werden, dass es sich bei dem Expressionsmuster tatsächlich um das Peptid LK-1 handelt.

Die Ultrastruktur der PCP Neuronen (Kapitel 4.4)) bietet bisher keine sicheren Hinweise darauf, dass die PCP Neuronen eine neurosekretorische Funktion haben könnten. Die leukokininartigen Peptide haben vermutlich eher Funktionen als Neuromodulatoren im Nervensystem von Insekten (Nässel et al., 1992; Nässel, 1993; Torfs et al., 2000). Möglicherweise besitzen auch die PCP Neuronen eine solche neuromodulatorische Funktion im Nervensystem von Heuschrecken.

## 5.4 Die Entwicklung der Pars Intercerebralis

### 5.4.1 Die Pars Intercerebralis im Gehirn von Insekten

Die Pars Intercerebralis ist eine Region von protocerebralen Zellkörpern in der Mittellinie des Gehirns von Insekten. Sie liegt zwischen den beiden Pilzkörpern und anterior zum Zentralkörper. Im Gegensatz zu der großen Zahl an Arbeiten über die Struktur und Funktion der "median neurosecretory cells" (z.B. Geldiay und Edwards, 1973; Zaretsky und Loher 1983; Raabe, 1989; Homberg et al., 1991a,b; Nässel, 1993) in der Pars Intercerebralis ist bisher nur wenig über ihre Entwicklung oder über andere Zellen in diesem Bereich des Gehirns bekannt. Außerdem wurde die Pars Intercerebralis bisher nicht in einer zufriedenstellenden und praktisch anwendbaren Weise definiert. In den meisten Arbeiten wird die Pars Intercerebralis als Region in der Mittellinie des Gehirns beschrieben, die neurosekretorische Zellen enthält (Weyer, 1935; Geldiay und Edwards, 1973; Schooneveld et al., 1974; Homberg et al., 1991b). Einige Arbeiten verwenden den Begriff Pars Intercerebralis sogar als Synonym für die "median neurosecretory cells" (Carrow et al., 1984; Chiang et al., 1999) ohne zu berücksichtigen, dass sich in diesem Gehirnbereich auch noch andere identifizierbare Zelltypen befinden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Pars Intercerebralis auf der Basis ihrer Entwicklungsursprünge im embryonalen Gehirn definiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die bisher verwendeten Interpretationen der Pars Intercerebralis nicht angemessen waren und die Definition auf Basis ontogenetische Erkenntnisse auch die funktionelle Entwicklung von Strukturen miteinbezieht.

Vergleichbare Studien zur Entwicklung komplexer Strukturen des Gehirns wie den Antennenloben bei Schaben (Salecker und Boeck, 1997) oder dem Zentralkörper bei Heuschrecken (Boyan und Williams, 1997) zeigen, dass Strukturen des adulten Gehirns bereits während der Embryonalentwicklung von hemimetabolen Insekten angelegt werden. In der späten Embryogenese sind die generellen strukturellen Merkmale bei Hemimetabola bereits identisch mit denen im adulten Gehirn. Das ist ein entscheidender Vorteil gegenüber holometabolen Insekten wie auch *Drosophila*, bei denen Strukturen des adulten Gehirns wie die Pilzkörper oder der Zentralkörper zwar embryonal bereits angelegt werden (Ito und Hotta, 1992; Renn et al., 1999; Noveen et al., 2000), sich aber während der Metamorphose erst endgültig differenzieren oder auch um- und abgebaut werden. Aus diesem Grund wurde hier die Entwicklung der Region in der Mittellinie des embryonalen Gehirns untersucht, der Region, in der die Ursprünge der adulten Pars Intercerebralis aller Wahrscheinlichkeit nach zu finden sind. Anschließend wurden diese Ergebnisse mit dem Bau der Pars Intercerebralis im adulten Gehirn bei Heuschrecken verglichen. Darüber hinaus wurde die zelluläre Zusammensetzung der Pars Intercerebralis bei verschiedenen Insekten verglichen. Dieser Vergleich zeigt, dass die Pars Intercerebralis offensichtlich bei allen Insekten nach einem einheitlichen Bauplan aufgebaut ist.

### 5.4.2 Die Entwicklung der Pars Intercerebralis

Wie im Ergebnissteil gezeigt wurde (Kapitel 4.6) bildet die Pars Intercerebralis im antero-medialen Bereich des Gehirns ein Fusionsprodukt aus voneinander unabhängigen embryonalen Komponenten wie den beiden Loben der embryonalen Pars Intercerebralis (Boyan und Williams, 1997) und der "dorsal median domain" (Ludwig et al., 1999). Die embryonale Pars Intercerebralis, so wie sie von Boyan und Williams (1997) beschrieben wurde, besteht aus zwei Gruppen von Neuroblasten am anterior-medialen Rand des Protocerebrums in jeder Gehirnhemisphäre, die durch Gliazellen vom Rest des Protocerebrums abgegrenzt werden. Nur einige dieser Neuroblasten, nämlich die Neuroblasten 9-11 (Abb. 1, 2), sind Vorläuferzellen der "median neurosecretory cells". Das wurde so

bereits von Boyan und Williams (1997) vermutet und konnte hier bestätigt werden. Boyan und Williams (1997) haben darüber hinaus gezeigt, dass Neuroblasten der embryonalen Pars Intercerebralis mit ihren Tochterzellen auch an der Bildung des Zentralkörpers beteiligt sind. Nach dem momentanen Stand der Untersuchung ist deshalb nicht auszuschließen, dass sich noch weitere Neuroblasten des embryonalen Protocerebrums oder der embryonalen Pars Intercerebralis an der Bildung der "median neurosecretory cells" beteiligen könnten.

Die "dorsal median domain" ist eine unpaare Gruppe von Zellen in der Mittellinie des Gehirns zwischen den beiden Loben der embryonalen Pars Intercerebralis. Identifizierte Zellen aus der "dorsal median domain", die "primary commissure pioneers" und die Tochterzellen des "median precursors" (Abb. 30, 31, Boyan et al., 1995a), sind ebenfalls an der Bildung der adulten Pars Intercerebralis beteiligt. Die Zellen der "dorsal median domain" unterscheiden sich in ihrer Entstehung und ihrer axonalen Projektion eindeutig von den "median neurosecretory cells". Die "primary commissure pioneers" differenzieren sich ohne identifizierbare Vorläuferzelle direkt aus dem Ektoderm, während der "median precursor" seine Tochterzellen direkt und ohne Gangliumutterzelle bildet wie dies bei Neuroblasten üblich ist (Kapitel 4.1; Ludwig et al., 1999).

Aus den Ergebnissen folgt wie oben bereits erwähnt, dass die adulte Pars Intercerebralis als Fusionsprodukt unabhängiger embryonaler Komponenten entsteht. Das bedeutet auch, dass die Begriffe "embryonale" und "adulte" Pars Intercerebralis in dieser Arbeit in unterschiedlicher Weise verwendet werden, da sie ontogenetisch unterschiedliche Strukturen definieren.

#### **5.4.3 TERM-1-Expression der "median neurosecretory cells" bei verschiedenen Insekten**

Die Expression des TERM-1 Antigens im Gehirn verschiedener Insekten (Tafel 4.1) zeigt, dass es möglich ist, vergleichbare zelluläre Komponenten in der adulten Pars Intercerebralis von Insekten zu identifizieren. TERM-1 ist ein 48 kDa schweres Glycoprotein, das zum ersten Mal von Meier et al. (1993) im Nervensystem vom *Schistocerca gregaria* identifiziert wurde. Es wird dort ausschließlich von den "primary commissure pioneers" exprimiert (Boyan et al., 1995; Ludwig et al., 1999, 2000a). Nur in wenigen Färbungen im adulten Gehirn von *Schistocerca gregaria* sind auch Teile der "median neurosecretory cells" TERM-1-immunoreaktiv (Kapitel 4.6.1). TERM-1 wird bei den hier untersuchten Insekten fast immer von einem Teil der "median neurosecretory cells" in der Pars Intercerebralis exprimiert. Sonderfälle sind, wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, die beiden Wanderheuschrecken *Locusta migratoria* und *Schistocerca gregaria*. Bei ihnen wird TERM-1 auch in den "primary commissure pioneers" (PCP) exprimiert. Diese Zellen sind ebenfalls Teil der adulten Pars Intercerebralis (Ludwig et al., 1999, 2000b), aber nicht Teil der "median neurosecretory cells". Der Grund für diese Expression in Zellen mit einer ganz anderen Abstammung ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise hängt das veränderte Expressionsmuster mit einer gleichzeitigen Änderung der Funktion der TERM-1-Expression in den PCP Neuronen zusammen (vgl. Kapitel 4.3, 4.6.1, 5.3.2). Die einzige Ausnahme stellt *Platymerus bipunctatus* (Heteroptera) dar. Dort findet sich die TERM-1-Expression in Zellen des Protocerebrums und der optischen Loben. Ein Grund für dieses außergewöhnliche Expressionsmuster konnte bisher noch nicht gefunden werden.

Die TERM-1-Expression in den verschiedenen Insektenordnungen ist nicht auf eine einzelne monophyletische Gruppe wie die Neoptera oder die Holometabola beschränkt (Tafel 4.1; Kristensen, 1981; Krauss, 1996), sondern verteilt sich mehr oder minder gleichmäßig innerhalb der Insekten. Daraus läßt sich schließen, dass es sich bei der TERM-1-Expression um ein plesiomorphes Merkmal

der Insekten handelt. Eine konvergente Entwicklung scheint aufgrund der spezifischen Expression in immer demselben Zelltyp unwahrscheinlich. Ob es einzelne Schwerpunkte der TERM-1-Expression in bestimmten Insektenordnungen gibt, wie es für Caelifera und Ensifera den Anschein hat, müsste in einer weit umfangreicheren vergleichenden Studie als dieser noch getestet werden. Das Fehlen von TERM-1-Expression in einigen Insektenordnungen wie den Dermaptera oder Diptera ist sehr wahrscheinlich auf Mutationen der Bindungsstelle des Antigens zurückzuführen. Ein Austausch von Basenpaaren und damit die Veränderung von Gen- beziehungsweise Proteinsequenzen (Doolittle, 1981; Zhang und Nei, 1996) ist ein natürlicher Evolutionsprozess. Eindeutig nachweisen lässt sich diese Annahme aber erst durch die Sequenzierung des TERM-1 Gens und den Sequenzvergleich mit den homologen Genen bei anderen Arthropoden. Die Annahme, dass die TERM-1-Expression ein plesiomorphes Merkmal bei Insekten ist wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sogar innerhalb einzelner Ordnungen TERM-1-Expression in manchen Familien auftritt, in anderen aber nicht (Tafel 4.1, z.B. Caelifera, Coleoptera). Das heißt, auch dort hat sich die Bindungsstelle vermutlich so geändert, dass sie vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Bei den Tetrigiden ist eine TERM-1-Expression immer vorhanden, während sie bei den Acrididae und den Gryllidae nur in einem Teil der untersuchten Arten auftaucht. Ein weiteres Argument für den plesiomorphen Charakter der TERM-1-Expression lässt sich aus der Beobachtung von TERM-1-Expression in anderen Arthropoden wie *Limulus polyphemus* (Chelicerata), *Triops cancriformis* (Crustacea) und *Lithobius forficatus* (Chilopoda) ableiten (Unveröffentlichte Ergebnisse). Vermutlich ist die TERM-1-Expression ein für Arthropoden insgesamt ursprüngliches Merkmal.

#### 5.4.4 Homologie der "median neurosecretory cells"

In früheren Arbeiten (Rowell, 1976) wurde bereits angenommen, dass es sich bei den "median neurosecretory cells" von Insekten um homologe Zellen handeln könnte. Da die TERM-1-Expression fast ausschließlich innerhalb der "median neurosecretory cells" auftritt (Abb. 32, 33), scheint sie diese Annahme zu stützen. Außerdem wird TERM-1 bei *Lithobius forficatus* von zwei Paaren von Zellen im lateralen Protocerebrum exprimiert (Ergebnisse werden hier nicht gezeigt), die zum neurosekretorischen System von Chilopoden gehören (Joly und Descamps, 1987; Palm, 1955). Die TERM-1-Expression in *Triops cancriformis* (Crustacea) befindet sich in den optischen Loben und im lateralen Protocerebrum. Beides sind ebenfalls Gehirnbereiche, an denen sich neurosekretorische Zellen befinden (Bullock and Horridge, 1965). Das entspricht der Beobachtung der TERM-1-Expression im neurosekretorischen System bei Insekten. Bisher wurden die immunhistochemischen Färbungen bei Chilopoden, Crustaceen und Cheliceraten aber nicht weiter untersucht, um die Frage zu klären, ob sich auch hier um vergleichbare Zellen handelt.

#### 5.4.5 Homologie identifizierter Zellen auf der Basis immunhistochemischer Untersuchungen

Die Homologie von identifizierten Zellen in verschiedenen Insekten an sich ist noch kein außergewöhnliches Ergebnis. Da alle Insekten und auch alle Arthropoden von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen ist es sogar zu erwarten, dass sich auch auf Einzelzelebene Homologien nachweisen lassen. Ein besonderer Vorteil identifizierter homologer Zellen liegt in der Möglichkeit Erkenntnisse zu Entwicklungsprozessen auf Organismen zu übertragen, die einer direkten Untersuchung in einem bestimmten Zusammenhang nicht zugänglich sind. Die Mutante *commissureless* bei *Drosophila* bildet beispielsweise nur eine rudimentäre präorale Kommissur aus

(Reichert und Boyan, 1997). Allerdings ist nicht bekannt welche Zellen diese Bahn bilden. Bei Heuschrecken wird die präorale Kommissur durch die PCP Neuronen etabliert (Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999). Da auch Dipteren über PCP homologe Neuronen verfügen (vgl. Kapitel 4.6 und 5.4.6), liegt der Schluß nahe, dass die präorale Kommissur in *commissureless* Mutanten von PCP homologen Zellen gebildet wird und einem übergeordneten Steuermechanismus unterliegt.

Aber auch das Verständnis genereller evolutiver Tendenzen wird durch Homologieuntersuchungen erleichtert. Eine grundlegende Tendenz in der Verwendung von spezifischen Molekülen im Nervensystem scheint es zu sein, für notwendige neue Funktionen nicht ständig neue Moleküle zu entwickeln, sondern vorhandene Stoffe in neue Funktionskreise zu integrieren und sie dabei zu modifizieren (Arbas et al., 1991; Agricola und Bräunig, 1995). In dieser Weise läßt sich etwa das meist unterschiedliche Expressionsmuster vieler Antigen bei verschiedenen Organismen interpretieren. Variationen in den Gen- und Proteinsequenzen lassen sich des weiteren auch zur Erstellung von evolutiven Stammbäumen verwenden (Doolittle, 1981).

Vergleichende immunocytochemische Untersuchungen wurden auch schon für andere Antigene durchgeführt, die nur eine begrenzte Zahl von Zellen anfärben, zum Beispiel Leukokinin-1 (Chen et al., 1994a, b) und Pigment Dispersing Hormone (Homberg et al., 1991). Vasopressin (Tyrer et al., 1993) oder Perisulfakinin (Agricola und Bräunig, 1995) färben sogar nur einzelne Zellen. Es zeigte sich, dass interspezifische Vergleiche auf der Basis der Antigenexpression um so schwieriger werden, je weiter die Arten phylogenetisch voneinander entfernt sind. Während die Vasopressin-exprimierenden Neuronen unterschiedlicher Heuschreckenarten in ihrer Morphologie noch weitgehend identisch sind und als homologe Zellen interpretiert werden (Tyrer et al., 1993), sind die Perisulfakinin-exprimierenden Zellen bei verschiedenen Articulaten bereits so unterschiedlich, dass sich Homologien nicht mehr sicher ableiten lassen (Agricola und Bräunig, 1995). Trotzdem gibt es bei den bisher untersuchten Beispielen auch deutliche Übereinstimmungen wie die einheitliche TERM-1-Expression in den "median neurosecretory cells" von Insekten (Ludwig et al., 2000b), die neben den Lagebeziehungen und dem Projektionsmuster der Zellen auf mögliche Homologien hinweisen (Kapitel 5.4.5). Die Verwendung weiterer Methoden wie intrazelluläre Injektionen oder histologische Färbungen sind geeignete Instrumente, um die Homologie einzelner Zellen zu untersuchen wie es in dieser Arbeit für die "primary commissure pioneers" durchgeführt wurde (Kapitel 4.6.6).

#### **5.4.6 Homologe Zellen zu den "primary commissure pioneers" (PCP) in der Pars Intercerebralis unterschiedlicher Insekten**

Es bestehen kaum noch Zweifel daran, dass so komplexe Strukturen im Gehirn von Arthropoden wie die Pilzkörper oder der Zentralkörper homolog sind (vgl. Gupta, 1987; Breidbach and Kutsch, 1995; Strausfeld 1998; Strausfeld et al., 1998). Dagegen gibt es in der Literatur bisher nur wenige Beispiele, welche die Homologie einzelner identifizierter Zellen im Gehirn von Insekten zeigen. Eine Ausnahme ist das TCG Neuron, das von Bacon (1980) in Heimchen, Wanderheuschrecken und Gottesanbeterinnen beschrieben wurde. Wie oben bereits erwähnt (Kapitel 5.4.6) ist es schwierig, die Homologie von Zellen ausschließlich aufgrund ihrer Antigenexpression zu etablieren. Breidbach und Kutsch (1995) stellen daher noch weitere Merkmale für die Homologisierung von identifizierten Zellen auf.

Für die "primary commissure pioneers" sind sowohl Ursprung, Entwicklung als auch die komplette Morphologie bereits im Detail beschrieben worden (Kapitel 4.3, Ludwig et al., 1999; 2000a). In dieser Arbeit wurde nun mit Hilfe von histologischen Färbungen gezeigt, dass bei allen bisher

untersuchten Insekten (Tafel 4.1) Zellen existieren, die mit den "primary commissure pioneers" vergleichbar sind. Die PCP Homologen wurden anhand morphologischer Merkmale identifiziert (Kapitel 4.6.6), die alle gefundenen Zellen eindeutig erfüllen (Abb. 35, 36, 37, 38). Die Übereinstimmungen wie die einheitliche Anzahl von 4 Zellen, ihre Größe und identische axonale Projektion weisen auf eine Homologie dieser Zellen hin. Die hier angewendeten Merkmale für die Homologie der "primary commissure pioneers" in verschiedenen Insekten entsprechen weitgehend denen von Breidbach und Kutsch (1995). Allerdings beobachtet man auch leichte Unterschiede der Lage der Zellkörper oder der Position des Chiasmas der Axone. Solche Unterschiede, vor allem was die Lage der Zellkörper oder die Morphologie von axonalen Verzweigungen betrifft, sind aber typisch für intra- oder interspezifisch identifizierte Zellen im Gehirn von Insekten (Goodman et al., 1979a, Wilson et al., 1982; Breidbach and Kutsch, 1990).

Weitere Hinweise zur Homologie der "primary commissure pioneers" könnte zum Beispiel über intrazelluläre Füllungen, elektrophysiologische Messungen oder über den Nachweis einer gemeinsamen Genexpression geführt werden. Das sind auch weitere Merkmale, die von Kutsch und Breidbach (1994) für die Homologie individueller Zellen gefordert werden.

#### 5.4.7 Beschreibung möglicher PCP homologer Neuronen in der Literatur

Ein Überblick über die Literatur zeigt, dass die möglichen "primary commissure pioneer" homologen Zellen bereits früher bei anderen Insekten beschrieben wurden (*Calliphora erythrocephala*, PIOL: Ohlsson et al., 1989; *Achaeta domesticus*, type 4: Geldiay and Edwards, 1973; *Periplaneta americana*, type 2: Krauthammer, 1985). Alle diese Zellen haben folgende Merkmale gemeinsam: Zellkörper in der Pars Intercerebralis nahe den "median neurosecretory cells", große Zellkörperdurchmesser, identische Zahl von 4 Zellen, und soweit beschrieben (Geldiay and Edwards, 1973; Krauthammer, 1985) eine übereinstimmende Ultrastruktur (Kapitel 4.4.3, Ludwig et al., 2000a). Geldiay und Edwards (1973) und Krauthammer (1985) nahmen an, dass die von ihnen beschriebenen Zellen in die Corpora cardiaca Nerven 1 projizieren. Ohlsson et al. (1989) beobachteten für ihre PIOL Neuronen keine Axone, die das Gehirn verlassen. Vergleicht man die einzelnen Beschreibungen mit den hier gefundenen Ergebnissen (Abb. 37, 38), ist anzunehmen, dass die Zellen in *C. erythrocephala*, *A. domesticus* und *P. americana* "primary commissure pioneer" Homologe sind und in den "midline tract" projizieren.

Die 10 Zellen, die Thomsen (1965) in der Mittellinie der Pars Intercerebralis von *C. erythrocephala* beschreibt, entsprechen dagegen vermutlich den Tochterzellen des "median precursors".

#### 5.4.8 Ein einheitlicher Grundbauplan für die Pars Intercerebralis bei Insekten

Fasst man die in Kapitel 4.6 gezeigten Ergebnisse zur Entwicklung der Pars Intercerebralis, der TERM-1-Immunoreaktivität der "median neurosecretory cells" und zur Homologie der "primary commissure pioneers" zusammen, so weisen sie auf einen einheitlichen Grundbauplan der Pars Intercerebralis bei Insekten hin. Das leitet sich aus der Tatsache ab, dass alle hier untersuchten Vertreter der verschiedenen Insektenordnungen "median neurosecretory cells" besitzen (vgl. Rowell, 1976), die zum Teil auch TERM-1-immunoreaktiv sind (Tab. 4.1). Daneben finden sich auf der Ebene identifizierter Zellen in allen untersuchten Tieren sowohl homologe Zellen zu den PCP Neuronen wie auch zu den Tochterzellen des "median precursors". Es erscheint damit sehr wahrscheinlich, dass die "primary commissure pioneers" und die Tochterzellen des "median precursors" bei anderen Insekten ebenfalls von einer "dorsal median domain" (vgl. Dumstrei et al.,





- Agricola HJ, Bräunig P. 1995. Comparative aspects of peptidergic signaling pathways in the nervous system of arthropods. In: Breidbach O, Kutsch W, editors. The nervous system of invertebrates: an evolutionary and comparative approach. Basel: Birkhäuser. pp. 303-328.
- Agui N, Granger NA, Gilbert LI, Bollenbacher WE. 1979. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: In vitro assay of a single neurosecretory cell. Proc Natl Acad Sci USA 76:5694-5698.
- Agui N, Bollenbacher WE, Granger NA, Gilbert LI. 1980. Corpus allatum is the release site of insect prothoracicotropic hormone. Nature 285:669-670.
- Altman JS, Tyrer NM. 1980. Filling selected neurons with cobalt through cut axons. In: Strausfeld NJ, Miller TA, editors. Neuroanatomical techniques. New York. Springer. pp. 377-405.
- Arbas EA, Meinertzhagen IA, Shaw SR. 1991. Evolution in nervous systems. Ann Rev Neurosci 14:9-38.
- Arendt D, Nübler-Jung K. 1996. Common ground plans in early brain development in mice and flies. BioEssays 18:255-259.
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. 1995. Notch signaling. Science 268:225-232.
- Bacon J. 1980. An homologous interneurone in a locust, a cricket and a mantid. Verh Dtsch Zool Ges 1980:300.
- Bacon J, Tyrer M. 1978. The tritocerebral commissure giant (TCG): A bimodal interneurone in the locust, *Schistocerca gregaria*. J Comp Physiol A 126:317-325.
- Bastiani MJ, du Lac S, Goodman CS. 1986. Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. I. Recognition of a specific axonal pathway by the pCC neuron. J Neurosci 6:3518-3531.
- Bastiani MJ, Harrelson AL, Snow PM, Goodman CS. 1987. Expression of Fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. Cell 48:745-755.
- Bentley DR, Keshishian H. 1982. Pathfinding by peripheral pioneer neurons in grasshoppers. Science 218:1081-1088.
- Bentley D, Keshishian H, Shankland M, Toroian-Raymond A. 1979. Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, *Schistocerca nitens*. J Embryol Exp Morph 54:47-74.
- Bossing T, Technau GM. 1993. An identified *Drosophila* neural precursor generates both neurons and glia. Development 120:1895-1906.
- Bossing T, Technau GM. 1994. The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. Development 120:1895-1906.
- Boyan GS, Williams JLD, Meier T. 1993. Organization of the commissural fibers in the adult brain of the locust. J Comp Neurol 332:358-377.
- Boyan GS, Therianos S, Williams JLD, Reichert H. 1995a. Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: An identified cell analysis of early brain development. Development 121:75-86.
- Boyan GS, Williams JLD, Reichert H. 1995b. Organization of a midline proliferative cluster in the embryonic brain of the grasshopper. Roux's Arch Dev Biol 205:45-53.

- Boyan GS, Williams JLD, Reichert H. 1995c. Morphogenetic reorganization of the brain during embryogenesis in the grasshopper. *J Comp Neurol* 361:429-440.
- Boyan GS, Williams JLD. 1997. Embryonic development of the pars intercerebralis/central complex of the grasshopper. *Dev Genes Evol* 207:317-329.
- Breidbach O, Kutsch W. 1990. Structural homology of identified motoneurons in larval and adult stages of hemi- and holometabolous insects. *J Comp Neurol* 297:392-409.
- Breidbach O, Kutsch W. 1995. The nervous system of invertebrates: an evolutionary and comparative approach. Basel: Birkhäuser.
- Bullock TH, Horridge GA. 1965. Structure and function in the nervous system of invertebrates. London: Freeman and Company.
- Burrows M. 1996. The neurobiology of an insect brain. Oxford: Oxford University press.
- Campos-Ortega JA, Hartenstein V. 1985. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin. Springer Verlag.
- Carrow GM, Calabrese RL, Williams CM. 1984. Architecture and physiology of insect cerebral neurosecretory cells. *J Neurosci* 4:1034-1044.
- Chang WS, Serikawa K, Allen K, Bentley D. 1992. Disruption of pioneer growth cone guidance in vivo by removal of glycosylphosphatidylinositol anchored cell surface proteins. *Development* 114:507-519.
- Chen Y, Veenstra JA, Davis NT, Hagedorn HH. 1994a. A comparative study of leukokinin-immunoreactive neurons in insects. *Cell Tissue Res* 276:69-83.
- Chen Y, Veenstra JA, Hagedorn HH, Davis NT. 1994b. Leukokinin and diuretic hormone immunoreactivity of neurons in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and co-localisation of this immunoreactivity in lateral neurosecretory cells of abdominal ganglia. *Cell Tissue Res* 278:493-507.
- Chiang AS, Pszczolkowski MA, Lee CM, Wei TW. 1999. Protocerebral neurons inhibiting proliferation of corpus allatum cells in the cockroach, *Diploptera punctata*. *J Comp Neurol* 413:593-602.
- Chien CB. 1998. Why does the growth cone cross the road? *Neuron* 20:3-6.
- Chitins A, Henrique D, Lewis J, Ish-Horowitz D, Kintner C. 1995. Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homolog of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta*. *Nature* 375:761-766.
- Chu-LaGraff Q, Schmid A, Leidel J, Brönnner G, Jäckle H, Doe CQ. 1995. *Huckebein* specifies aspects of CNS precursor identity required for motoneuron axon pathfinding. *Neuron* 15:1041-1051.
- Condrón BG, Zinn K. 1994. The grasshopper median neuroblast is a multipotent progenitor cell that generates glia and neurons in distinct temporal phases. *J Neurosci* 14:5766-5777.
- Cook BJ, Holman GM, Wagner RM, Nachman RJ. 1989. Pharmacological actions of a new class of neuropeptides, the leucokinins I-IV, on the visceral muscles of *Leucophaea maderae*. *Comp Biochem Physiol* 93:257-262.
- Copenhaver PF, Truman JW. 1986. Identification of the cerebral neurosecretory cells that contain eclosion hormone in the moth *Manduca sexta*. *J Neurosci* 6:1738-1747.

- Crews ST, Thomas JB, Goodman CS. 1988. The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell* 52:143-151.
- Cross GAM. 1990. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Ann Rev Cell Biol* 6:1-39.
- De Robertis EM, Sasai Y. 1996. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380:37-40.
- Dodd J, Jessel TM. 1988. Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science* 242:692-698.
- Doe CQ, Goodman CS. 1985a. Early events in insect neurogenesis: I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev Biol* 111:193-205.
- Doe CQ, Goodman CS. 1985b. Early events in insect neurogenesis: II. The role of cell interaction and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Dev Biol* 111:206-219.
- Doe CQ, Goodman CS. 1993. Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In M. Bate and A. Martinez-Arias (eds): *The Development of Drosophila*. Vol 1. New York: Cold Spring Harbor, pp 1131-1206.
- Doe CQ, Skeath JB. 1996. Neurogenesis in the insect central nervous system. *Curr Opinion Neurobiol* 6:18-24.
- Doolittle RF. 1981. Similar amino acid sequences: Chance or common ancestry. *Science*. 214:149-157.
- du Lac S, Bastiani MJ, Goodman CS. 1986. Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. II. Recognition of a specific axonal pathway by the aCC neuron. *J Neurosci*. 6:3532-3541.
- Dumstrei K, Nassif C, Abboud G, Aryi A, Aryai A, Hartenstein V. 1998. EGFR signaling is required for the differentiation and maintenance of neural progenitors along the dorsal midline of the *Drosophila* embryonic head. *Development* 125:3417-3426.
- Easter SS, Ross LS, Frankfurter A. 1993. Initial tract formation in the mouse brain. *J Neurosci* 13:285-299.
- Evans P, Cournil I. 1990. Co-localization of FLRF- and vasopressin-like immunoreactivity in a single pair of sexually dimorphic neurones in the nervous system of the locust. *J Comp Neurol* 292:331-348.
- Finkelstein R, Perrimon N. 1991. The molecular genetics of head development in *Drosophila melanogaster*. *Development* 112:899-912.
- Finkelstein R, Boncinelli E. 1994. From fly head to mammalian forebrain: the story of *otd* and *otx*. *Trends in Genetics* 10:310-315.
- Francois V, Solloway M, O'Neill JW, Emery J, Bier E. 1994. Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the *short gastrulation* gene. *Genes Development* 8:2602-2616.
- Franke WW, Krien S, Brown RM Jr. 1969. Simultaneous glutaraldehyde-osmium tetroxide fixation with postosmication. *Histochemie* 19:162-164.
- Ganformina MD, Sánchez D, Bastiani, MJ. 1995. Lazarillo, a new GPI-linked surface lipocalin, is restricted to a subset of neurons in the grasshopper embryo. *Development* 121:123-134.

- Geldiay S, Edwards JS. 1973. The protocerebral neurosecretory system and associated cerebral neurohemal area of *Achaeta domesticus*. *Z Zellforsch* 145:1-22.
- Golembo M, Raz E, Shilo BZ. 1996. The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development* 122:3363-3370.
- Goodman CS, Spitzer NC. 1979. Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. *Nature* 280:208-214.
- Goodman CS, Doe C. 1993. Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In: Bate M, Martinez Arias A, editors: *The development of Drosophila melanogaster*. Salem. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1131-1206.
- Goodman CS, Shatz CJ. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Neuron* 10:77-98.
- Goodman CS, Pearson KG, Heitler WJ. 1979a. Variability of identified neurons in grasshoppers. *Comp Biochem Physiol* 64:455-462.
- Goodman CS, O'Shea M, McCaman R, Spitzer NC. 1979b. Embryonic development of identified neurons: Temporal pattern of morphological and biochemical differentiation. *Science* 204:1219-1222.
- Goodman CS, Bastiani MJ, Doe CQ, duLac S, Helfand SL, Kuwada JY and Thomas JB. 1984. Cell recognition during development. *Science* 225:1271-1279.
- Goodman LJ. 1981. Organisation and physiology of the insect dorsal ocellar system. In: H. Autrum, editor. *Handbook of Sensory Physiology*, vol. VII 6C. Berlin: Springer-Verlag. pp. 201-286.
- Graf S, Ludwig P, Boyan GS. 1999. Lazarillo as a marker for neurons pioneering the primary axon scaffold of the embryonic grasshopper brain. In: Elsner N, Eysel U, editors: *From molecular neurobiology to clinical neuroscience. Proceedings of the 27th Göttingen Neurobiology Conference*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 794.
- Graf S, Ludwig P, Boyan GS. 2000. Lazarillo reveals a subset of neurons contributing to the primary axon scaffold of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol* 419:394-405.
- Grenningloh G, Rehm EJ, Goodman CS. 1991. Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: Fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* 67:45-57.
- Gupta AP. 1987. *Arthropod brain*. New York: Wiley and Sons.
- Haller B. 1905. Über den allgemeinen Bauplan des Tracheatensyncerebrums. *Arch f mikroskop Anat* 65:181-279.
- Halter DA, Urban J, Rickert C, Ner SS, Ito K, Travers AA, Technau GM. 1995. The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* 121:317-332.
- Hartenstein V, Tepass U, Gruszynski FE. 1994. The development of the *Drosophila* stomatogastric nervous system. *J Comp Neurol* 350:367-381.
- Hartmann B, Reichert H. 1998. The genetics of embryonic brain development in *Drosophila*. *Mol Cell Neurosci* 12:194-205.

- Hayes TK, Pannabecker TL, Hinckley DJ, Holman GM, Nachman RJ, Petzel DH, Beyenbach KW. 1989. Leukokininins, a new family of ion stimulators and inhibitors in insect malphigian tubules. *Life Sci* 44:1259-1266.
- Hirata J, Nakagoshi H, Nabeshima Y, Matzuzaki F. 1995. Asymmetric segregation of the homoeodomain protein prospero during *Drosophila* development. *Nature* 377:627-630.
- Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K. 1995. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* 15:769-778.
- Hirth F, Hartmann B, Reichert H. 1998. Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125:1579-1589.
- Holman GM, Cook BJ, Nachman RJ. 1986. Isolation, primary structure and synthesis of two neuropeptides from *Leucophaea maderae*: Members of a new family of cephalotropins. *Comp Biochem Physiol* 84C:205-211.
- Holland P, Ingham P, Krauss S. 1992. Mice and flies head to head. *Nature* 358:627-628.
- Holt CE, Harris WA. 1993. Position, guidance and mapping in the developing visual system. *J Neurobiol* 24:1400-1422.
- Homberg U, Kingan TG, Hildebrand JG. 1990. Distribution of the FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the sphinx moth *Manduca sexta* and colocalization with SCPB-, BPP- and GABA-like immunoreactivity. *Cell Tissue Res* 259:401-419.
- Homberg U, Davis NT, Hildebrand JG. 1991a. Peptide-immunocytochemistry of neurosecretory cells in the brain and retrocerebral complex of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J comp Neurol* 303:35-52.
- Homberg U, Würden S, Dirksen H, Rao KR. 1991b. Comparative anatomy of pigment dispersing hormone-immunoreactive neurons in the brain of orthopteroid insects. *Cell Tissue Res* 266:343-357.
- Hoyle G. 1977. Identified neurons and behavior of arthropods. Plenum Press. New York.
- Ito K, Hotta Y. 1992. Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 149:134-148.
- Jacobs JR, Goodman CS. 1989. Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J Neurosci* 9:2402-2411.
- Jacobs JR, Hiromi J, Patel N, Goodman CS. 1989. Lineage, migration, and morphogenesis of longitudinal glia in the *Drosophila* CNS as revealed by a molecular lineage marker. *Neuron* 2:1625-1631.
- Jan LY, Jan YN. 1982. Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2700-2704.
- Jessel TM, Bovolenta M, Placzek M, Tessier-Lavigne M, Dodd J. 1989. Polarity and patterning in the neural tube: The origin and function of the floorplate. *Ciba Found. Symp.* 144:255-280.
- Joly R, Descamps M. 1987. Histology and ultrastructure of the myriapod brain. In: Gupta AP, editor. *Arthropod brain*. New York: Wiley and Sons. pp. 135-158.
- Jones BW, Fetter RD, Tear G, Goodman CS. 1995. *glial cells missing*: A genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82:1013-1023.

- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Kimmel CB, Hatta K, Eisen J. 1991. Genetic control of primary neuronal development in zebrafish. *Development Suppl* 2:47-57.
- Klämbt C. 1993. The *Drosophila* gene *pointed* encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* 117:163-176.
- Klämbt C, Jacobs JR, Goodman CS. 1991. The midline of the *Drosophila* central nervous system: A model for the genetic analysis of cell fate, cell migration and growth cone guidance. *Cell* 64:801-815.
- Korzh VP. 1994. Genetic control of early neuronal development in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 4:21-28.
- Kutsch W, Bentley D. 1987. Programmed death of peripheral pioneer neurons in the grasshopper embryo. *Dev Biol* 123:517-525.
- Kutsch W, Breidbach O. 1994. Homologous structures in the nervous system of arthropoda. *Adv Insect Physiol* 24:1-113.
- Kraus O. 1996. Das System der Insekten. *NachrBl bayer Ent* 45:38-45.
- Krauthammer V. 1985. Morphology of identified neurosecretory and non-neurosecretory cells in the cockroach pars intercerebralis. *J Exp Zool* 234:221-230.
- Kristensen NP. 1981. Phylogeny of insect orders. *Ann Rev Entomol* 26:135-157.
- Leuzinger S, Hirth F, Gerlich D, Acampora D, Simeone A, Gehring WJ, Finkelstein R, Furukubo-Tokunaga K, Reichert H. 1998. Equivalence of the fly *orthodenticle* gene and the human OTX genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125:1703-1710.
- Liem KF, Tremml G, Roelink H, Jessel TM. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82:969-979.
- Locke M, Huie P. 1981. Epidermal feet in insect morphogenesis. *Nature* 293:733-735.
- Ludwig P, Williams JLD, Lodde E, Reichert H, Boyan GS. 1999. Neurogenesis in the median domain of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol* 414:379-390.
- Ludwig P, Williams JLD, Nässel D, Reichert R, Boyan GS. 2000a. The primary commissure pioneers in the brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: development, ultrastructure and peptide expression. *J Comp Neurol* (eingereicht).
- Ludwig P, Williams JLD, Boyan GS. 2000b. The pars intercerebralis of the locust brain: a developmental and comparative study. *Microsc Res Tech* (eingereicht)
- Lundquist T, Nässel DR. 1990. Substance P-, FMRFamide-, and gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the thoraco-abdominal ganglia of the flies *Drosophila* and *Calliphora*. *J Comp Neurol* 294:161-178.
- Lundquist CT, Baines RA, Thompson KSJ, Bacon JP. 1998. Differential regulation of a homologous peptidergic neuron in grasshoppers: evolution of a neural circuit. *J Comp Physiol A* 182:755-765.

- Ma Q, Kintner C, Anderson DJ. 1996. Identification of *neurogenin*, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87:43-52.
- Mason AC. 1973. New features of the brain retrocerebral neuroendocrine complex of the locust *Schistocerca gregaria* (Scudder). *Z Zellforsch* 141:19-32.
- Meier T, Therianos S, Zacharias D, Reichert H. 1993. Developmental expression of the TERM-1 glycoprotein on growth cones and terminal arbors of individual identified neurons in the grasshopper. *J Neurosci* 13:1498-1510.
- Mobbs PG. 1976. Development of the locust ocellus. *Nature* 264:269-271.
- Nagao T, Endo K, Kawauchi H, Walldorf U, Furukubo-Tokunaga K. 2000. Patterning defects in the primary axonal scaffolds caused by the mutations of the *extradenticle* and *homothorax* genes in the embryonic *Drosophila* brain. *Dev Genes Evol* 210:289-299.
- Nakamoto M, Cheng HJ, Friedman GC, McLaughlin T, Hansen MJ, Yoon CH, O'Leary DD, Flanagan JG. 1996. Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance *in vitro* and retinal axon mapping *in vivo*. *Cell* 86: 755-766.
- Nambu JR, Franks RG, Hu S, Crews ST. 1990. The *single-minded* gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* 63:63-75.
- Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA, Crews ST. 1991. The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67:1157-1167.
- Nässel DR. 1993. Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tissue Res* 273:1-29.
- Nässel DR, O'Shea M. 1987. Proctolin-like immunoreactive neurons in the blowfly central nervous system. *J Comp Neurol* 265:437-454.
- Nässel DR, Holmquist BI, Movérus BJA. 1989. Vasopressin- and proctolin-like immunoreactive efferent neurons in blowfly abdominal ganglia: development and ultrastructure. *J Comp Neurol* 283:450-463.
- Nässel DR, Cantera R, Karlsson A. 1992. Neurons in the cockroach nervous system reacting with antisera to the neuropeptide Leukokinin-1. *J Comp Neurol* 322:45-67.
- Nassif C, Noveen A, Hartenstein V. 1998. Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. *J Comp Neurol* 402:10-31.
- Noveen A, Daniel A, Hartenstein V. 2000. Early development of *Drosophila* mushroom body: the roles of *eyeless* und *dachshund*. *Development* 127:3475-3488.
- Ohlsson LG, Johansson KUI, Nässel DR. 1989. Postembryonic development of Arg-Phe-amide-like and cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the blowfly optic lobe. *Cell Tissue Res* 256:199-211.
- Palm NB. 1955. Neurosecretory cells and associated structures in *Lithobius forficatus* L. *Ark Zool* 9:115-129.
- Patel N. 1994a. Developmental evolution: Insights from studies of insect segmentation. *Science* 266:581-590.
- Patel N. 1994b. Imaging neuronal subsets and other cell types in whole mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. In: Goldstein LSB, Fyrberg E, editors. *Methods in cell biology*, Vol44. *Drosophila melanogaster*: Practical uses in cell biology. New York: Academic Press.



- Pires-Neto MA, Braga-de-Souza S, Lent R. 1998. Molecular Tunnels and boundaries for growing axons in the anterior commissure of hamster embryos. *J Comp Neurol* 399:176-180.
- Placzek M, Yamada T, Tessier-Lavigne M, Jessell T, Dodd J. 1991. Control of dorsoventral pattern in vertebrate neural development: Induction and polarizing properties of the floor plate. *Development Supplement* 2: 105-122.
- Puelles L, Rubenstein JLR. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organisation. *Trends Neurosci* 16:472-479.
- Raabe M. 1989. Recent development in insect neurohormones. New York. Plenum Press.
- Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS. 1983a. Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. I. Divergent choices made by the growth cones of sibling neurons. *J Neurosci* 3:20-30.
- Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS. 1983b. Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. II. Selective fasciculation onto specific axonal pathways. *J Neurosci* 3:31-41.
- Reichert H, Boyan GS. 1997. Building a brain: Developmental insights in insects. *Trends in Neuroscience* 20:258-264.
- Renn SCP, Armstrong JD, Yang M, Wang Z, An X, Kaiser K, Taghert PH. 1999. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: Organization and development of the central complex. *J Neurobiol* 41:189-207.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S. 1990. slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Development* 4:2169-2187.
- Rowell HF. 1976. The cells of the insect neurosecretory system: Constancy, variability, and the concept of the unique identifiable neuron. *Adv Ins Physiol* 12:63-123.
- Salecker I, Boeck J. 1995. Embryonic development of the antennal lobes of a hemimetabolous insect, the cockroach *Periplaneta americana*: Light and electron microscopical observations. *J Comp Neurol* 352:33-54.
- Sallee CJ, Russel DF. 1993. Embedding of neural tissue in agarose or glyoxyl agarose for vibratome sectioning. *Biotech Histochem* 68:360-368.
- Sánchez D, Ganfornina MD, Bastiani MJ. 1995. Developmental expression of the lipocalin Lazarillo and its role in axonal pathfinding in the grasshopper embryo. *Development* 121:135-147.
- Schmidt-Ott U, Technau GM. 1992. Expression of *en* and *wg* in the embryonic head and brain of *Drosophila* indicates a refolded band of seven segment remnants. *Development* 116:111-125.
- Schmidt-Ott U, González-Gaitán M, Jäckle H, Technau GM. 1994. Number, identity, and sequence of the *Drosophila* head segments as revealed by neural elements and their deletion patterns in mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8363-8367.
- Schooneveld H. 1974. Ultrastructure of the neurosecretory system of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Cell Tissue Res* 154:275-288.
- Seeger MA, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS. 1993. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: Genes necessary for guidance towards or away from the midline. *Neuron* 10:409-426.

- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessel TM, Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- Serafini T, Colamarina SA, Leonarda ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001-1014.
- Silver J, Lorenz SE, Wahlstein D, Coughlin J. 1982. Axonal guidance during development of the great cerebral commissure: Descriptive and experimental studies in vivo on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 210:10-29.
- Skeath JB, Zhang Y, Holmgren R, Carroll SB, Doe CQ. 1995. Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by *gooseberry-distal*. *Nature* 376:427-430.
- Snow P, Patel NH, Harrelson AL, Goodman CS. 1987. Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos. *J Neurosci* 7:4137-4144.
- Sonnenfeld MJ, Jacobs JR. 1994. Mesectodermal cell fate analysis in *Drosophila* midline mutants. *Mech Dev* 46:3-13.
- Sperry RW. 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 50:703-710.
- Steindler DA. 1993. Glial boundaries in the developing nervous system. *Ann Rev Neurosci* 16:445-470.
- Stoeckli ET. 1997. Molecular mechanisms of growth cone guidance: Stop and go? *Cell Tissue Res* 290:441-449.
- Strausfeld NJ. 1998. Crustaceans-insect relationships: The use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain Behav Evol* 52:186-206.
- Strausfeld NJ, Hansen L, Li Y, Gomez RS, Ito K. 1998. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learning Memory* 5:11-37.
- Tear G, Harris R, Sutaria S, Kilomanski K, Goodman CS, Seeger MA. 1996. *Commissureless* controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. *Neuron* 16:501-514.
- Tanabe Y, Jessel TM. 1996. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274:1115-1123.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden J, Dodd J, Jessell T. 1988. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336: 775-778.
- Therianos S, Leuzinger S, Hirth F, Goodman CS, Reichert H. 1995. Embryonic development of the *Drosophila* brain: Formation of commissural and descending pathways. *Development* 121:3849-3860.
- Thomas JB, Crews ST, Goodman CS. 1988. Molecular genetics of the *single-minded* locus: A gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52:133-141.
- Thompson KSJ, Tyrer NM, May ST, Bacon JP. 1991. The vasopressin-like immunoreactive (VPLI) neurons of the locust, *Locusta migratoria*. I. Anatomy. *J Comp Physiol A* 168:605-617.

- Thomsen M. 1965. The neurosecretory system of the adult *Calliphora erythrocephala*. Z Zellforsch 67:693-717.
- Timm F. 1958. Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfid-Silber-Verfahren. Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med 46:706-711.
- Torfs H, Shariatmadari R, Guerrero F, Parmentier M, Poels J, van Payer W, Swinnen E, deLoof A, Akermann K, Broeck J. 2000. Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable *Drosophila* Schneider 2 cell line. J Neurochem 74:2182-2189.
- Truman JW, Copenhaver PF. 1989. The larval eclosion hormone neurones in *Manduca sexta*: identification of the brain-proctodeal neurosecretory system. J Exp Biol 147:457-470.
- Tyrer NM, Davis NT, Arbas EA, Thompson KSJ, Bacon JP. 1993. Morphology of the vasopressin-like immunoreactive (VPLI) neurons in many species of grasshopper. J Comp Neurol 329:385-401.
- Udolph G, Prokop A, Bossing T, Technau GM. 1993. A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. Development 118:765-775.
- Weyer F. 1935. Über drüsenartige Nervenzellen im Gehirn der Honigbiene, *Apis mellifica* L. Zool Anz 112:137-141.
- White K, Hurteau T, Punsal P. 1986. Neuropeptide FMRFamide-like immunoreactivity in *Drosophila*: Development and distribution. J Comp Neurol 247:430-438.
- Wigglesworth VB. 1959. The histology of the nervous system of an insect *Rhodinus prolixus* (Hemiptera). II The central ganglia. Quart J microsc Sci 101:381-388.
- Williams JLD. 1975. Anatomical studies of the insect nervous system: A ground-plan of the midbrain and an introduction to the central complex in the locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera). J Zool Lond 176:67-86.
- Wilson JA, Phillips CE, Adams ME, Huber F. 1982. Structural comparison of a homologous neuron in gryllid and acridid insects. J Neurobiol 13:459-467.
- Wilson SW, Ross LS, Parrett T, Easter SS. 1990. The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. Development 108:121-145.
- Younossi-Hartenstein A, Nassif C., Green P, Hartenstein V. 1996. Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. J Comp Neurol 370:313-329.
- Younossi-Hartenstein A, Green P, Liaw GJ, Rudolph K, Lengyel J, Hartenstein V. 1997. Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tll*, *otd*, *ems* and *btd*. Dev Biol 182:270-283.
- Zacharias D, Williams JLD, Meier T, Reichert H. 1993. Neurogenesis in the insect brain: Cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. Development 118:941-955.
- Zaretsky M, Loher W. 1983. Anatomy and electrophysiology of individual neurosecretory cells of an insect brain. J Comp Neurol 216:253-263.
- Zhang J, Nei M. 1996. Evolution of antennapedia-class homeobox genes. Genetics. 142:295-303.

---

Zhang Y, Ungar A, Fresques C, Holmgren A. 1994. Ectopic expression of either the *Drosophila* *gooseberry-distal* or *-proximal* gene causes alterations of cell fate in the epidermis and central nervous system. *Development* 120:1151-1161.

Zhong W, Feder JN, Jiang MM, Jan LJ, Jan YN. 1996. Asymmetric localisation of a mammalian *numb* homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* 17:43-53.

Zinn K, Sun Q. 1999. Slit branches out: A secreted protein mediates both attractive and repulsive axon guidance. *Cell* 97:1-4.

**Erklärung:**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

München, den 16.10.2000

Peter Ludwig

**Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits vorab veröffentlicht:**

Graf S, Ludwig P, Boyan GS. 2000. Lazarillo reveals a subset of neurons contributing to the primary axon scaffold of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. J Comp Neurol 419:394-405.

Ludwig P, Williams JLD, Lodde E, Reichert H, Boyan GS. 1999. Neurogenesis in the median domain of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. J Comp Neurol 414:379-390.

Ludwig P, Williams JLD, Nässel D, Reichert R, Boyan GS. 2000a. The primary commissure pioneers in the brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: development, ultrastructure and neuropeptide expression. J Comp Neurol (im Druck).

Ludwig P, Williams JLD, Boyan GS. 2000b. The pars intercerebralis of the locust brain: a developmental and comparative study. Microsc Res Tech (eingereicht).

---

**Dank**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. G.S. Boyan für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit bedanken, dass ich die vorliegende Arbeit unter sehr guten technischen Bedingungen in seinem Labor durchführen konnte. Ich konnte durch ihn viel über Wissenschaft und wissenschaftliches Arbeiten lernen und freue mich, dass die Zusammenarbeit so produktiv war. Weiter bedanke ich mich bei den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, Eva Lodde, Simone Graf, Karin Fischer und Dr. Les Williams für anregende Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Roland Melzer der mich während der Diplomarbeit mit der Wissenschaft vertraut gemacht hat und auch bei der Erstellung dieser Arbeit immer ein hilfsbereiter Ansprechpartner bei allen Problemen war. In seinem Labor in der Arbeitsgruppe von Prof. U. Smola wurden die feinstrukturellen Untersuchungen dieser Doktorarbeit angefertigt. Darüber hinaus war es mir immer eine große Freude, während meiner Zeit am Zoologischen Institut auch andere wissenschaftliche Projekte mit ihm gemeinsam durchzuführen.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Doris Rupp, Dr. Daniela Nicastro, Dr. Timo Zimmermann, Dr. Andreas Zahn, Jenny Holzhaider und Martina Reiter für die spannenden und fruchtbaren Diskussionen, technischen Tipps und die schönen Stunden in München und am Meer bedanken und für die interessanten Projekte, die wir gemeinsam neben der "ernsten Wissenschaft" durchgeführt haben. Sie gaben mir immer Kraft und Antrieb und unterstützten mich auch in schwierigen Phasen meiner Doktorarbeit. Vielen Dank noch einmal an Daniela Nicastro für das einzigartig genaue und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Gedankt sei auch allen, die mir Tiere oder Antikörper zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt haben. Sie sind an anderer Stelle in dieser Arbeit namentlich erwähnt.

Ein sehr persönlicher Dank gilt meiner Freundin Manuela Olbrich. Sie hat die Entstehung dieser Arbeit von Anfang bis Ende miterlebt und mich nach Kräften unterstützt. Sei es beim Fangen von Insekten oder durch schöne gemeinsame Abende zu zweit und mit Freunden, die mich immer wieder aus der Alltagsroutine herausgerissen haben.

Auch meine Eltern haben direkt und indirekt entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Ihre gründlichen Korrekturen des Texts und ihre stilistischen Anregungen waren mir ein große Hilfe. Durch ihre Förderung, ihr Interesse und indem sie mir die Freiheit ließen, die Dinge zu tun, die mich interessierten, ermöglichten sie mir ein wundervolles Studium. Ich hoffe ich kann ihnen all die gute Zeit irgendwann zurückgeben.

## Lebenslauf

Peter Ludwig  
Pfarrer-Kneipp Str. 13  
84478 Waldkraiburg

13.11.1969 geboren in Wasserburg am Inn als Sohn der Oberstudienrätin Erika Ludwig und des Studiendirektors Rudolf Ludwig

### Schulbildung

1976-1980 Besuch der Grundschule an der Dieselstraße in Waldkraiburg  
1980-1989 Besuch des Ruperti-Gymnasiums Mühldorf  
05.1989 Abiturprüfung mit sehr gutem Erfolg

### Bundeswehr

06.1989-09.1990 Grundwehrdienst im Flugkörpergeschwader 1 in Landsberg am Lech

### Studium

Nov.1990 Beginn des Studiums der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Studienziel Diplom; Hauptfach Zoologie  
Okt.1992 Erweiterung des Studiums um den Studiengang Biologie/Chemie für das Lehramt an Gymnasien  
Hilfskraft und Assistent verschiedener zoologischer Praktika und mehrerer meeresbiologischer Exkursionen nach Giglio/Italien und Rovinj/Kroatien  
Mai.1995-Jan.1996 Anfertigung einer Diplom- und Zulassungsarbeit über das Sehsystem der Florfliege *Chrysoperla carnea* in der Abteilung für Funktionsmorphologie und Feinstrukturforschung von Herrn Prof. U. Smola am Zoologischen Institut der LMU München  
Mai.1996-Nov.1996 Abschluß des Studiengangs Biologie mit dem Diplom in den Fächern Zoologie, Botanik, Anthropologie und organische Chemie mit sehr gutem Erfolg  
Mär.1997-Jul.97 1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie mit gutem Erfolg

### Promotion

1997-2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe für Neuronale Entwicklung von Herrn Prof. G.S. Boyan am Zoologischen Institut der LMU München. Erstellung einer Doktorarbeit über die Gehirnentwicklung von Heuschrecken  
Mitbetreuung einer Zulassungsarbeit über die Fotografie von Meerestieren und einer Diplomarbeit über die Ektoparasiten einheimischer Fledermäuse in Bayern

### Ehrenamtliche Tätigkeiten

1982-1987 Mitglied im Bund der Pfadfinderinnen und Pfadfinder (BdP) mit Gruppenleitertätigkeit  
seit 1989 Mitglied der DJO-Deutsche Jugend in Europa als Gruppenleiter und Leiter von Kinder- und Jugendfreizeiten sowie Auslandsfahrten  
seit 1991 Mitglied im Bund Naturschutz; Teilnahme an mehreren Pflanzaktionen und Durchführung einer Gewässergütekartierung

**Wissenschaftliche Veröffentlichungen:**

Graf S, Ludwig P, Boyan GS. 2000. Lazarillo reveals a subset of neurons contributing to the primary axon scaffold of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. J Comp Neurol 419:394-405.

Ludwig P, Smola U, Melzer RR. 1996. Die Mundwerkzeuge des Wurmlöwen *Vermileo vermileo* L. und ihre Funktion. NachrBl bayer Ent 45:9-14.

Ludwig P, Melzer RR. 1998. Fangtrichter und Tellereisen: Jäger des Sandes. BIUZ 28:22-27.

Ludwig P, Williams JLD, Lodde E, Reichert H, Boyan GS. 1999. Neurogenesis in the median domain of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. J Comp Neurol 414:379-390.

Ludwig P, Williams JLD, Nässel D, Reichert R, Boyan GS. 2000a. The primary commissure pioneers in the brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: development ultrastructure and neuropeptide expression. J Comp Neurol (im Druck).

Ludwig P, Williams JLD, Boyan GS. 2000b. The pars intercerebralis of the locust brain: a developmental and comparative study. Microsc Res Tech (eingereicht).

Melzer RR, Heß M, Dunkel C, Ludwig P, Smola U. 1996. Fine structure of the `slit organs` of the pycnogonid *Anoplodactylus petiolatus* (Anoplodactylidae). Acta Zoologica. 77:167-171.

Rupp D, Ludwig P. 2000. First record of *Steatonyssus noctulus* Rybin, 1992 in Central Europe (Acari, Mesostigmata, Macronyssidae). Spixiana. 23:283-286.

**Posterpräsentationen**

Graf S, Ludwig P, Boyan GS. 1999 Lazarillo as a marker for neurons pioneering the primary axon scaffold of the embryonic grasshopper brain. In: Elsner N, Eysel U, editors: From molecular neurobiology to clinical neuroscience. Proceedings of the 27th Göttingen Neurobiology Conference. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 794.

Ludwig P, Williams L, Lodde E, Boyan GS. 1998. Embryonic brain slices reveal patterns of development among midline cells and pars intercerebralis of the locust. In: Elsner N, Wehner R, editors: Proceedings of the 26th Göttingen Neurobiology Conference. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p.686.

Ludwig P, Williams L, Graf S, Lodde E, Boyan GS. 1999. Neurogenesis of identified cells in the median domain (MD) of the embryonic grasshopper brain. In: Elsner N, Eysel U, editors: From molecular neurobiology to clinical neuroscience. Proceedings of the 27th Göttingen Neurobiology Conference. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 794.