

Lehrstuhl für Zoologie der Technischen Universität München

Die Entwicklung der Mechanosensorik der Antennenbasis und
antennal-mechanosensorischen Interneurone als Grundlage für
Untersuchungen der Organisation der antennal-
mechanosensorischen Neuropile im Oberschlundganglion von
Grillen (*Gryllus bimaculatus* De Geer)

Fatime Seidl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. (Univ. Kaposvári/Ungarn) J. Bauer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Geoffrey A. Manley, Ph.D. /Princeton, M. J. / USA
2. Univ.-Prof. Dr. Peter Bräunig
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

Die Dissertation wurde am 01.02.2007 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.03.2007
angenommen.

INHALT

1. EINLEITUNG.....	7
2. MATERIAL und METHODEN.....	14
2.1 Neuroachsen.....	14
2.2 Versuchstiere.....	14
2.3 Vorbereitung der Embryonen für die Versuche.....	15
2.3.1 Sammeln der Grilleneier und die Entwicklungsbedingungen der Grillenembryonen.....	15
2.3.2 Bestimmung der gesamten Entwicklungszeit der Grillenembryonen.....	15
2.4 Analyse für die Altersbestimmung der Grillenembryonen.....	16
2.4.1 Morphometrische Analyse	16
2.4.2 Durchführung der quantitativen morphometrischen Messungen.....	17
2.4.3 Bestimmung der äußerlichen morphologischen und der physiologischen Merkmale.....	18
2.5 Präparationen.....	18
2.5.1 Freipräparieren des Grillenembryonen aus dem Ei.....	18
2.5.2 Präparation für die Meerrettich-Peroxidase (HRP) Immunhistochemie.....	19
2.5.3 Präparation für die retrograde Antennen-Füllung.....	20
2.5.4 Präparation für die Dil-Applikation.....	21
2.5.5 Präparation für die retrograde Füllung (backfill) des Halskonnektives.....	22
2.5.6 Präparation für intrazelluläre Färbungen antennaler Mechanosensoren.....	24
2.6 Färbungen.....	25
2.6.1 Meerrettich-Peroxidase (HRP) Immunhistochemie.....	25
2.6.2 Neurobiotin Füllung und die Visualisierung des Neurobiotins.....	26
2.6.3 Nickel- und Kobaltchlorid Füllungen.....	28
2.6.4 Dil-Applikation.....	30
2.7 Intra- und extrazelluläre Färbungen.....	31
2.7.1 Versuchsaufbau.....	31
2.7.2 Elektroden und Färbung.....	31
2.8 Anfertigen von Schnitten.....	33
2.8.1 Vorbereitung der Präparate für Kryostat-Schnitte.....	33
2.8.2 Vorbereitung der Präparate für Paraplast-Schnitte.....	34
2.9 Bilder.....	36
3. ERGEBNISSE.....	38
3.1 Altersbestimmung der Grillenembryonen.....	38
3.1.1 Entwicklungsdauer und Schlupfzeit der Grillenembryonen	38
3.1.2 Morphometrische Analyse.....	41
3.1.2.1 Körperlänge und relative Antennenlänge	42
3.1.2.2 Absolute Antennenlänge als ein Maß für die Altersbestimmung.....	44
3.1.3 Äußerliche morphologische und physiologische Merkmale der Grillenembryonen.....	45
3.1.4 Beschreibung der Entwicklungsstadien durch ihre Merkmale.....	46

3.2 Die Entwicklung der antennalen sensorischen Neurone.....	64
3.2.1 Nomenklatur.....	64
3.2.2 Die Entwicklung der peripheren Bahn in den embryonalen Antennen der Grillen	65
3.2.3 Die Entstehung der antennalen sensorischen Neurone und ihre Anordnung (33%-50%)	75
3.2.4 Das Entstehungsmuster der sensorischen Neurone in der Antennenbasis.....	78
3.2.5 Die Anzahl der sensorischen Neurone in der Antenne (30% - 60%).....	83
3.3 Die Projektion der antennalen Sensorik der Grillenembryonen	88
3.3.1 Die Projektionsareale der antennalen sensorischen Neurone der Grillenembryonen zwischen 65% und 95% der Embryogenese	89
3.3.2 Untersuchungen zu den Projektionsarealen einzelner mechano-sensorischer Neurone der Antennenbasis.....	98
3.3.3 Membranpotenzial der Zellen der Antennenbasis	106
3.4 Entwicklung und Verzweigung absteigender Interneurone	110
3.4.1 Nomenklatur.....	110
3.4.2 Achsensystem	111
3.4.3 Verteilung der Zellkörper im Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen	112
3.4.4 Entwicklung der Zellgruppen zwischen 95% und 60% der Embryogenese.....	116
3.4.4.1 Die Position der Gruppen der Zellkörper (95% - 60%).....	122
3.4.4.2 Anzahl der Zellkörper der absteigenden Interneurone.....	130
3.4.4.3 Verzweigung der absteigenden Interneurone.....	135
4. DISKUSSION.....	144
4.1 Die Entwicklungsdauer der Grillenembryonen.....	144
4.2 Methoden zur Altersbestimmung von Insektenembryonen.....	148
4.3 Die Entwicklung der peripheren Bahn in den Antennen der Grillenembryonen.....	153
4.4 Die Entstehung der antennalen Sensorik der Grillenembryonen	159
4.5 Die Projektionsareale der antennalen Sensorik der Grillenembryonen.....	164
4.6 Die Projektionsareale einzelner mechanosensorischer Neuronen der Antennenbasis.....	173
4.7 Die Verteilung der Zellkörper der absteigenden Interneurone der Grillenembryonen (60% - 95%).....	180
4.8 Die Verzweigung der absteigenden Interneurone der Grillenembryonen (60% - 95%).....	184
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	192
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	194
7. ANHANG.....	196
7.1 Rezepte.....	196
7.1.1 Pufferlösungen.....	196
7.1.2 Grillenringer.....	197
7.1.3 Neurobiotin Visualisierung:.....	197

7.1.4 Die Beschichtung der Objektträger mit Chromalaungelatine.....	198
7.1.5 Rezepte der Gebrauchslösungen.....	199
7.1.6 Silberintensivierung nach Timm.....	199
7.1.7 Mikroskopieren der Präparate.....	200
7.2 Herkunftsnachweis verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	201
7.3 Herkunftsnachweis verwendeter Substanzen	201
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	203
9. DANKSAGUNG.....	219
LEBENS LAUF.....	220

1. EINLEITUNG

Die Analyse verschiedener neuronaler Netzwerke der Insekten, die für die Generierung und Kontrolle unterschiedlicher Verhaltensweisen verantwortlich sind, ist ein zentrales Thema in der Neurobiologie. Bei Insekten wurden vor allem neuronale Netzwerke untersucht, die bei der Kontrolle der Beinbewegungen, bei der Steuerung des Flugverhaltens und bei Fluchtbewegungen eine Rolle spielen (für Übersichten, siehe z.B. Boyan und Ball, 1990; Burrows, 1992; Camhi, 1993; Reichert, 1993). Damit diese komplexe Vorgänge richtig funktionieren können und dafür alle Bestandteile der Netzwerke miteinander interagieren können, müssen sie im Zentralnervensystem embryonal exakt angelegt werden und präzise organisiert werden.

Aus der Untersuchung der Entstehung des Zentralnervensystems, also des Oberschlund-, des Unterschlundganglions und der Thorakal- und Abdominalganglien, der Insekten sind wichtige Prinzipien der Entwicklungsbiologie hervorgegangen (Bate et al., 1981; Bate und Grünewald, 1981; Goodman et al., 1981; Thomas et al., 1984). Die Mechanismen der Neurogenese im peripheren Nervensystem und im Zentralnervensystem der Heuschrecken *Schistocerca gregaria*, *Schistocerca americana* und *Locusta migratoria* wurden detailliert untersucht, die wie die Grillen auch hemimetabole Insekten sind (Bate, 1976; Goodman und Spitzer, 1979; Keshishian, 1980; Bate und Grünewald, 1981; Bentley und Keshishian, 1982; Bentley und Toroian-Raymond, 1986; Siegler und Pousman, 1990a, b; Lakes-Harlan und Pollack, 1993; Zacharias et al., 1993; Boyan et al., 1995a, b und c; Reichert und Boyan, 1997; Ludwig et al., 1999; Boyan und Williams, 2000; Boyan et al., 2003). Die zellulären Mechanismen der embryonalen Neurogenese im Zentralnervensystem der Insekten scheinen in vielen Aspekten im Oberschlundganglion und in den posterioren Ganglien ähnlich zu sein und sie scheinen auch über die verschiedenen Insektentaxa hinweg erhalten geblieben zu sein (*Schistocerca gregaria*: Zacharias et al., 1993; *Drosophila*: Younossi-Hartenstein et al., 1996). Im Oberschlundganglion

sind die ersten Nachkommen der Neuroblasten in verschiedenen Teilen des Oberschlundganglions bei der Konstruktion von Kommissuren, die die zwei Hälften des Oberschlundganglions miteinander verbinden, sowie von Trakten und Konnektiven, die die verschiedenen Teile des Nervensystems untereinander verbinden, beteiligt. Im Gehirn bilden die primären Kommissurpioniere (PCP: primary commissural pioneers) erste axonale Verbindung zwischen den zwei Hälften des Oberschlundganglions (Boyan et al., 1995a). Erste absteigende Bahnen, die das Oberschlundganglion mit den posterioren Ganglien verbindet, wird durch Neurone gebildet, die aus Neuroblasten in der Pars intercerebralis und im Deutocerebrum nach etwa einem Drittel der Entwicklungsdauer entstanden sind. Diese Pionierneurone bilden das erste axonale Gerüst im Oberschlundganglion, mit dem sich später differenzierende Neurone faszikulieren. Bei 40% der Dauer der Embryogenese werden die Konnektive und die Kommissuren des adulten Oberschlundganglions sichtbar. Die Vorgänge, die bei der Bildung des axonalen Gerüsts im Oberschlundganglion auftreten, ähneln in mehreren Aspekten denen, die in den thorakalen Ganglien wirksam sind (Boyan et al., 1995a).

Die Entwicklung der Thorakalganglien, die im wesentlichen an der Steuerung von Bein- und Flügelbewegungen beteiligt sind, wurde detailliert untersucht (*Locusta*: Tyrer und Gregory, 1982; Pflüger et al., 1988; Schabe: Gregory, 1974, 1984; Grille: Wohler und Huber, 1985). Jedes Thorakalganglion hat die gleiche Basisstruktur und zeigt die gleichen Prinzipien der Organisation. Jedes Thorakalganglion enthält etwa 2000 Zellkörper, die zu den Motoneuronen, den lokalen und intersegmentalen Interneuronen, wenigen sensorischen Neuronen und efferenten, neuromodulatorischen Neuronen gehören. Die Anwesenheit dieser Neurone in jedem Ganglion ist für die Steuerung der Bewegungen der Beine (z.B. Laufbewegungen) oder der Flügel (=Flugverhalten) erforderlich (Burrows, 1992; Reichert, 1993).

In den thorakalen Ganglien bilden die Neurone der Mittellinien-Vorläuferzellen das Grundgerüst eines segmentalen Ganglions. Die ersten Pionierneurone der Mittellinien-Vorläuferzellen (midline precursor cells)

MP1, 2I und 2R bilden die ersten Längstrakte, aus denen die adulten Konnektive hervorgehen (Bate und Grünewald, 1981). Die Axone der Nachkommen von MP4 und MP5 bilden die ersten Fasern der anterioren Kommissuren und die Axone von MP6 bilden die ersten Fasern der posterioren Kommissuren. Jedes der Nachkommen von MP3, die sogenannte H-Zelle, hat je ein Axon in jedem anterioren und posterioren Trakt (Goodman et al., 1981). Die gleichen Zellen teilen sich in jedem Segment und senden ihre Axone aus, die eine Leiter-ähnliche Anordnung der Trakten und Kommissuren entlang der Längsachse des Embryonen bilden. Um diese Grundstruktur herum differenzieren sich dann die später entstehenden Neurone. Diese früh entstandenen Strukturen bilden die Basis für die Entwicklung der adulten Strukturen. Einige der großen Längstrakte der Thorakalganglien können schon bei 42% der Entwicklung und fast alle bei 55% der Entwicklung erkannt werden (Leitch et al., 1995). Die Axone der ersten Interneurone im Zentralnervensystem werden in 35% der Entwicklung gebildet (Bate und Grünewald, 1981; Thomas et al., 1984). Ein intersegmentales Interneuron (DCMD: descending contralateral movement detector) mit Zellkörper im Oberschlundganglion nimmt in 45% der Entwicklung seine Adulstage ein. Dieses Neuron entsteht vermutlich in 40% der Entwicklung (Bentley und Toroian-Raymond, 1981). Nach 40% der Embryogenese entstehen intersegmentale und lokale DUM- Interneurone (dorsal unpaired median neuron) (Condron und Zinn, 1994). Die „spikenden“ lokalen Interneurone im Metathorakalganglion werden in 55% der Entwicklung angelegt (Shepherd und Laurent, 1992). Zwischen 55% und 70% der Entwicklung wird das Grundmuster der primären und sekundären Neuriten gebildet, wobei sich die Bereiche der dorsalen (Hauptort für synaptische Ausgänge) und ventralen (Hauptort für synaptische Eingänge) Neuriten differenzieren (Shepherd und Laurent, 1992). Zwischen 80% und 100% der Entwicklung erreichen die Interneurone ihre adulten Strukturen. Zwischen 70% und 75% der Entwicklung sind die Synapsen mit ihren charakteristischen Merkmalen erkennbar. Die großen Neuropilgebiete im Zentralnervensystem sind bis ca. 65-70% nicht eindeutig (Leitch et al., 1992). Ab etwa 70% der

Entwicklung werden Synapsen erst gebildet und die Anzahl der Fortsätze der lokalen Interneurone erhöht sich. Aktionspotentiale und synaptische Potentiale können ab etwa 70% der Entwicklung in Interneuronen aufgezeichnet werden (Leitch et al., 1992).

Die Zellkörper der Motoneurone, zum Beispiel des FETi (fast extensor tibiae Motoneuron), im Metathorakalganglion, die den tibialen Streckermuskel eines Hinterbeines innervieren, können in 35% der Entwicklung erkannt werden. In 55% der Entwicklung ist ihre adulte Form erkennbar (Whittington et al., 1982).

Die Entwicklung der peripher gelegenen, primären Sinneszellen beginnt etwa zur selben Zeit wie die der zentralen Neurone. Die Pionierneurone aus dem Bein sind die ersten Neurone, die ins Zentralnervensystem in 40% der Entwicklung eintreten (Bate, 1976; Ho und Goodman, 1982). Als erstes wachsen die sensorischen Neurone der Exterozeptoren aus dem Bein in das Zentralnervensystem ein (Kutsch, 1989). Ab 40% der Entwicklung differenzieren sich die ersten Propriozeptoren der Beine (femorales Chordotonalorgan und Subgenualorgan). Die ersten Axone des Subgenualorgans reichen zwischen 43% und 45% der Entwicklung ins Zentralnervensystem. Alle Rezeptortypen der Beine sind in 60% der Entwicklung vorhanden (Burrows, 1996).

Die Bestandteile eines neuronalen Netzwerkes in den Thorakalganglien scheinen in einer Reihenfolge gebildet zu werden (*Locusta*: Pflüger et al., 1988): Die Motoneurone und intersegmentalen Interneurone, die die Ausgangselemente der Verarbeitung von sensorischen Informationen aus den Beinen repräsentieren, werden zuerst gebildet. Dann entstehen die lokalen Interneurone. Die sensorischen Neurone aus den Exterozeptoren tauchen später auf und schließlich reichen die Neurone aus den Propriozeptoren ins Zentralnervensystem und bilden die synaptischen Kontakte mit den „spikenden“ und anderen Interneuronen (Leitch et al., 1995).

Die sensorischen Neurone projizieren in die ventralen, sensorischen Neuropile, wie den VAC (ventral association centre), der Fortsätze von sensorischen Haaren und Chordotonalorganen enthält. Motoneurone

wachsen in dorsale Neuropile (LAC: lateral association centre) ein. Die zentrale Projektion sensorischer Neurone aus Extremitäten sind in diesem Neuropil somatotopisch angeordnet (*Locusta*: Pflüger et al., 1988; *Manduca sexta*; Kent und Levine, 1988; Peterson und Weeks, 1988; *Phormia* und *Drosophila*: Murphey et al., 1989a, b).

In einem anderen System, zum Beispiel in den Antennen verschiedener Insektenarten, zeigt die zentrale Projektion sensorischer Neurone auch vermutlich eine somatotopische Anordnung im Deutocerebrum (im Dorsallobus: Nishino et al., 2005). Bei allen hemimetabolen und holometabolen Insekten projizieren die olfaktorischen Rezeptoren in den Antennallobus in das ventrale, anteriore Deutocerebrum und viele der nicht olfaktorischen Rezeptoren in den Dorsallobus (Suzuki, 1975; Kloppenburg, 1995; AMMC: Rospars, 1988; Homberg et al., 1989; Nishino et al., 2005; Ignell et al., 2005). Einige nicht olfaktorischen Rezeptoren, zum Beispiel Thermo- und Hygrorezeptoren von *Periplaneta americana* projizieren in den dorso-zentralen Teil des Antennallobus (Nishino et al., 2003). Die Axone des Johnstonschen Organs der Mücken projizieren in ein nicht glomeruläres Zentrum innerhalb des Antennallobus (Ignell et al., 2005). Diese Befunde, dass sich zahlreiche sensorische Neurone unterschiedlicher Modalitäten sehr spezifisch im Oberschlundganglion verzweigen, sind wiederum klare Beweise dafür, dass diese Bestandteile des Nervensystems sehr präzise entstanden sind.

Es existieren zahlreiche Studien zur Organisation des primären olfaktorischen Neuropils, des Antennallobus, im Oberschlundganglion verschiedener Insekten (Lepidopteren: *Manduca sexta*: Oland et al., 1990; Tolbert und Oland; 1990; in Blattodea: *Periplaneta americana*: Salecker und Boeckh, 1995 und 1996; in Hymenoptera: *Apis mellifera*: Gascuel und Masson, 1991). Die Entstehung des Antennallobus der holometabolen Tabakswärmer der Art *Manduca sexta* wurde besonders detailliert untersucht. Im Antennallobus findet die synaptische Verarbeitung der olfaktorischen Informationen in den Glomeruli genannten Strukturen statt. Die Neurone des Antennallobus lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die lokalen Interneurone und die Projektionsneurone (Hayashi und Hildebrand,

1990; Oland und Hayashi, 1993). Diese Neurone und die olfaktorischen Rezeptorneurone entstehen in ca. 6% der puppalen Entwicklung (Entwicklungsstadium 1). Die dendritischen Verzweigungen der Neurone des Antennallobus sind bereits im Entwicklungsstadium 4 (ca. 22% der puppalen Entwicklung) im Antennallobus zu erkennen. In diesem Stadium haben die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone bereits den Antennallobus erreicht. Die terminalen Endigungen der Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone bilden die Basisstrukturen der Glomeruli (Oland et al., 1990; Tolbert und Oland, 1990). Malun et al. (1994) haben gezeigt, dass die Dendriten der Projektionsneurone in den Basisstrukturen der Glomeruli bereits früh in der Entwicklung vorliegen (ca. 40% der Entwicklung). Aufgrund des Entstehens wenigstens einer glomerulusähnlichen Struktur im Antennallobus der Embryonen, bei dem das Einwachsen der Afferenzen durch die Entfernung der Antennen verhindert wurde, wurde angenommen, dass die Projektionsneurone eine „aktive“ Rolle bei der Bildung des glomerulären Neuropils des Antennallobus spielen. Schließlich senden die multiglomerulären lokalen Interneurone ihre Fortsätze in die Glomeruli und bilden Synapsen (Oland et al., 1990 und 1993; Tolbert und Oland, 1990).

Im Gegensatz zum reichen Wissen über die Entstehung des Antennallobus ist wenig bekannt über die Entstehung der anderen Neuropile des Deutocerebrums, die überwiegend mit der Verarbeitung mechanosensorischer Information befasst sind und die die Motoneurone der Antenne enthalten. Das antennal-mechanosensorische Neuropil der adulten Grillen *Gryllus bimaculatus* ist zweigeteilt, anders als bei anderen Insekten (ventral area of flagellar afferents (vfa) und Dorsallobus (dl): Staudacher und Schildberger, 1999). Die sensorischen Neurone des Flagellums verzweigen sich vermutlich im ventralen Bereich dieses Neuropils (vfa) und die sensorischen Neurone der Antennenbasis vermutlich nur im Dorsallobus (dl) des Deutocerebrums (Suzuki, 1975; AMMC: Rospars, 1988; Homberg et al., 1989; Kloppenburg, 1995; Staudacher und Schildberger, 1999; Nishino et al., 2005; Ignell et al., 2005). Die Antennenbasis der Grillen ist äußerst dicht mit sensorischen

Neuronen besetzt, die in dieses antennal-mechanosensorische Neuropil projizieren (Honegger et al., 1990; Yildiz, 2002, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie, TU München; Yildiz und Gebhardt, 2003).

Das Ziel meiner Arbeit ist es, die Entwicklung der peripheren antennalen Mechanosensorik und der zugehörigen zentralen Neuropile zu untersuchen. Sind hier ähnliche Prinzipien bei der Organisation dieses antennal-mechanosensorischen Neuropils wie bei der der mechanosensorischen Neuropile der Thorakalganglien und wie beim primären olfaktorischen Neuropil wirksam?

Auf der Basis der oben geschilderten Befunde zur Organisation verschiedener Neuropilgebiete der Insekten erschließen sich die Leithypothesen meines Projektes: **(1)** Die sensorischen Neurone aus der Antenne, die sehr spezifisch in das Deutocerebrum projizieren, was in anderen Insekten bekannt ist, könnten zu der Organisation der entsprechenden Neuropile beitragen. **(2)** Absteigende, antennal-mechanosensorische Interneurone mit auffallenden, fächerartigen Eingangsdendriten, die nahezu komplett das nicht-glomeruläre Deutocerebrum überspannen, könnten eine ähnliche „Organisator“-Funktion wie die olfaktorischen Projektionsinterneuronen übernehmen (Staudacher, 1998; Gebhardt und Honegger, 2001) und die Identität der mechano-sensorischen Anteile des Deutocerebrums prägen.

Die Analyse der Organisation des antennal-mechanosensorischen Neuropils trägt zur Klärung bei, ob einheitliche oder unterschiedliche Prinzipien zur Bildung zweier benachbarter, aber strukturell und funktionell unterschiedlicher Neuropile, dem Antennallobus einerseits und andererseits den mechansosensorischen Neuropilen, beitragen.

Mein Promotionsprojekt beinhaltet daher die Aufklärung des raumzeitlichen Entstehungsmuster der mechano-sensorischen Neurone der Antennenbasis und der antennal-mechanosensorischen Interneurone. Damit Voraussetzungen untersucht werden können, die zur spezifischen Organisation der antennal-mechanosensorischen Gehirnbereiche führen.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Form von Posterbeiträgen zu Tagungen veröffentlicht (Seidl und Gebhardt, 2005).

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Neuroachsen

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Beschreibung der neuroanatomischen Analyse im Bezug auf die Neuroachsen nach Boyan et al., 1993. Nach diesem Achsensystem ist die Spitze des Oberschlundganglions neural anterior, die Vorderseite des Oberschlundganglions ist neural ventral, die Hinterseite des Oberschlundganglions ist neural dorsal und die Basis des Oberschlundganglions ist neural posterior. Das sich entwickelnde Oberschlundganglion ändert seine Orientierung bezüglich der Segmentalganglien (Boyan et al., 1995c). Bei adulten Grillen ist das Oberschlundganglion etwa 90° nach dorsal gekippt.

2.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit adulten und embryonalen Grillen der Art *Gryllus bimaculatus* De Geer durchgeführt. Die Grillen stammten aus der Laborzucht des Lehrstuhl für Zoologie der Technischen Universität München. Die weiblichen und männlichen adulten Grillen wurden bei einer Temperatur von etwa 27°C und einem Hell-Dunkel Zyklus von je 12 Stunden gehalten. Als Zuchtbehälter für die adulten Grillen dienten weiße 50 Liter Plastikbehälter, ausgestattet mit handelsüblichen Eierkartons als Versteckmöglichkeit. Der Bodengrund bestand aus Sägespäne (altromin, Weichholzgranulat 8/15, staubfrei, fein). Etwa 30 bis 60 Individuen lebten in gleichen Altersgruppen in je einem Plastikbehälter. Als Futter wurde Kaninchenfutter (Altromin 2021, Haltungsfutter, Mehlform,) mit Beigaben von Hundefutter (Pedigree complete mit Fleisch, Gemüse und Reis, fein gemahlen im Mixer) in 1:1 Mischungsverhältnis verabreicht.

2.3 Vorbereitung der Embryonen für die Versuche

2.3.1 Sammeln der Grilleneier und die Entwicklungsbedingungen der Grillenembryonen

Die befruchteten weiblichen Grillen wurden in mit feuchtem Quarzsand (Auer Baustoffe, 0,6-1,2 mm, N.7) gefüllten Gläsern isoliert und dort entweder zwei Stunden oder 12 Stunden zum Eier ablegen belassen. Wenn die Grillen in zwei Stunden nicht ausreichend Eier abgelegt hatten, erfolgte die nächste Kontrolle der Eierablage nach 12 Stunden. Die Ablagezeit wurde daher verlängert, um eine genügende Anzahl von Eiern für die Versuche zu bekommen.

Die Eier, zusammen mit Sand, wurden in einer, mit Trinkwasser gefüllten, Petrischale aufgenommen und unter mikroskopischer Kontrolle aus dem Sand heraus sortiert und auf einer feuchten Watte in einer Petrischale gesammelt. In einer Petrischale wurden nur die Eier von einem Weibchen gesammelt, die in einem bestimmten Zeitabstand (entweder zwei Stunden oder 12 Stunden) abgelegt worden waren. Dann wurden die Eier in der Petrischale in den Wärmeschrank (memmert) gestellt und bei einer Temperatur von etwa $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ zum Weiterentwickeln belassen. Einmal am Tag wurden die Eier ca. 10 Sekunden belüftet. Dazu wurde der Deckel der Petrischale abgenommen, das verdunstete Wasser abgeschüttelt und mit der Hand die Luft über den Eiern verwedelt. Die Feuchtigkeit der Watte wurde kontrolliert und gegebenenfalls die ausgetrocknete Watte mit Trinkwasser befeuchtet.

2.3.2 Bestimmung der gesamten Entwicklungszeit der Grillenembryonen

Wie oben beschrieben wurden von neun verschiedenen Grillenweibchen Eier gesammelt, die innerhalb von zwei Stunden abgelegt worden waren. Diese Eier wurden zur Weiterentwicklung in den Wärmeschrank ($29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) gestellt. An diesem Punkt der Entwicklung wurde die Uhrzeit notiert

(t1). Man ließ Grilleneier in der Petrischale schlüpfen, um die Gesamtdauer bis zum Schlupf von jedem Ei bestimmen zu können. Dieser Zeitpunkt wurde als die Schlupfzeit (t2) notiert.

Die Anzahl der geschlüpften Grillenembryonen wurde gegen die Gesamtdauer bis zum Schlupf (Dauer zwischen t1 und t2) in einer Grafik eingetragen, um die gesamte Entwicklungszeit bestimmen zu können (siehe Ergebnisse Kapitel 3.1.1 und Abb. 3.1.1).

2.4 Analyse für die Altersbestimmung der Grillenembryonen

2.4.1 Morphometrische Analyse

Für morphometrische Analyse wurden Eier von fünf verschiedenen adulten Grillen, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, in fünf Petrischalen gesammelt (fünf Datenserien). Jeden Tag wurde eine bestimmte Anzahl von Eiern, je nach der gesamten Anzahl der Eier, bis zum Schlupf von einer Petrischale entnommen, um bei diesen Embryonen morphometrische Analyse durchführen zu können. Die Embryonen wurden aus dem Ei heraus präpariert und in 4%-igem Formaldehyd (siehe Anhang 7.1.5) fixiert. Um das aktuelle Alter (h) dieser Embryonen bestimmen zu können, wurde die Zeit des Fixierens der Grillenembryos notiert (t3). Es wurden weitere Grilleneier zur Weiterentwicklung Weiterentwickeln in der Petrischale belassen, um die Gesamtdauer bis zum Schlupf zu bestimmen. Die Schlupfzeit der Grillenembryonen, von einer Datenserie, wurde gemittelt und der Mittelwert wurde als gesamte Entwicklungszeit (h) für diese Datenserie betrachtet. Dann wurde die prozentuale Entwicklungszeit der Grillenembryonen wie unten berechnet.

-aktuelles Alter (h): Dauer zwischen t1-t3

-Gesamtdauer bis zum Schlupf (h): Dauer zwischen t1-t2

-(aktuelles Alter (h) / Gesamtdauer bis zum Schlupf (h)) x 100

Um eine quantitative Altersbestimmungsmethode zu entwickeln, wurden verschiedene morphometrische Messungen bei den Grillenembryonen

durchgeführt, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden. Die Messungen erfassten die Körperlänge, absolute Antennenlänge und die Länge einer Antenne. Diese Parameter wurden gegen die Entwicklungszeit in einer Grafik eingetragen und mit diesen Daten wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Für die weitere Analyse wurde eine morphometrische Eigenschaft ausgewählt, die den höchsten Korrelationskoeffizient geliefert hat. Die Antennenlänge mit dem höchsten Korrelationskoeffizient ($r = 0,96$; Spearman Rangkorrelation; $N = 107$) wurde für die Erstellung des quantitativen Altersbestimmungsmodells gegen die prozentuale Embryogenesezeit (zwischen 25% und 90%) in einer Grafik eingetragen (siehe Ergebnisse Kapitel 3.1.2.2 und Abb. 3.1.5). Für die statische Analyse und deren grafische Darstellung wurde das Programm „Statist“ (Version 1.0.2) und Grace (Version 5.1.18) verwendet.

2.4.2 Durchführung der quantitativen morphometrischen Messungen

Nachdem die Embryonen aus dem Ei heraus präpariert waren (siehe Material und Methoden Kapitel 2.5.1) und in 4%-igem Formaldehyd fixiert wurden, wurden verschiedene morphometrische Messungen in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt. Um die Antennen- und Körperlänge der Embryonen zu vermessen, wurden die Embryonen auf einem Objektträger mit Vertiefung aufgenommen und in Grillenringer (nach Eibel; Rezept siehe Anhang 7.1.2) eingedeckelt. Dann wurden die Embryonen unter dem Mikroskop (Leitz, Laborlux 11) mit Hilfe eines Zeichentubus (Leitz, Wetzlar 1.25x Germany) gezeichnet. Mit Hilfe eines Objektmikrometers, der mit der gleichen Vergrößerung, wie die dargestellten Embryonen gezeichnet wurde, erfolgte die Vermessung der Antennen- und Körperlänge der Embryonen. Die Antennenlänge der Grillenembryonen ($N = 107$) wurde vom ersten Antennenbasissegment (Scapus) bis zur Antennenspitze gemessen. Die Körperlänge der Grillenembryonen ($N = 93$) wurde vom anterioren Ende bis zum posterioren Ende des Körpers gemessen. Bei den 93 Grillenembryonen

wurde die relative Antennenlänge bestimmt.

2.4.3 Bestimmung der äußerlichen morphologischen und der physiologischen Merkmale

Um die äußerlichen morphologischen und die physiologischen Merkmale der unterschiedlich weit entwickelten Grillenembryonen zu bestimmen, die zusätzlich zum quantitativen Altersbestimmungs-Model auch zur Altersbestimmung dienen, wurden die Grillenembryonen und Grilleneier unter dem Mikroskop (Leitz, Dialux 20) bzw. Binokular (Leica Wild M10) betrachtet. Mit einer Kamera (Nikon, Coolpix 4500), die auf einem Fototubus am Mikroskop bzw. Binokular montiert war, wurden Digitalfotos angefertigt. Die Embryonen wurden in einer mit Grillenringer (Grillenringer nach Eibel, Rezept im Anhang 7.1.2) gefüllten Petrischale unter dem Binokular fotografiert. Die Beleuchtung erfolgte mittels einer zweiarmigen Kaltlichtlampe. Die Zeichnungen wurden mit Hilfe eines Zeichentubus am Mikroskop (Leitz, Laborlux 11) angefertigt. Die Bleistiftzeichnungen wurden dann mit Tusche auf Transparentpapier übertragen. Die äußerlichen morphologischen und physiologischen Merkmale der Grillenembryonen zwischen 25% und 95% wurden beschrieben. Für jedes Stadium wurden ungefähr 10 Embryonen untersucht. Die embryonale Entwicklung wurde in 15 Stadien, je 5% zwischen 25% und 95% der Embryogenese geteilt (siehe Ergebnisse Kapitel 3.1.3, Kapitel 3.1.4 und Tabelle 3.1.2).

2.5 Präparationen

2.5.1 Freipräparieren des Grillenembryonen aus dem Ei

Der Embryo wurde in einer mit Grillenringer gefüllten Sylgardschale aus dem Ei präpariert, indem das Ei je nach Stadium an einem Ende des Eies, mit Hilfe einer Minutiennadel, durchstoßen worden ist. Dann wurde die

Minutiennadel im Sylgard fixiert. Um den Innendruck zu beseitigen wurde das fixierte Ei hin und her bewegt. Nach diesem Vorgang konnte das Ei mit zwei Pinzetten eröffnet werden, indem man die Eihülle an der Präparationsstelle stückweise entfernt. Diese Öffnung sollte so groß sein, dass der Embryo ohne Verletzung durch sie passieren kann, während er mit Hilfe von zwei Pinzetten aus dem Ei herausgedrückt wurde.

Bei dem Stadium 25% der Embryogenese wurde mit der Präparation an einem beliebigen Pol des Eies angefangen, da der Embryo in diesem Stadium tief im Dotter liegt, mittig im Ei positioniert ist und von außen nicht sichtbar ist. Bei den Stadien, zwischen 30% und 40% der Embryogenese wurde mit der Präparation am anterioren Pol des Eies begonnen. Der anteriore Pol des Eies ist in diesen Stadien durch seine Breite und durch die Eihülle-Strukturierung gut erkennbar. Bei den Stadien, zwischen 40% und 45% der Embryogenese wurde die Präparation ebenfalls am anterioren Pol des Eies durchgeführt, da der Embryo während der Umrollung am posterioren Pol des Eies liegt. Bei den Stadien, zwischen 45% und 55% der Embryogenese wurde mit der Präparation ebenso am anterioren Pol des Eies angefangen, wo es noch Dotter gibt. Nachdem man das Dotter aus dem Ei entfernte, ist der Embryo leichter zu präparieren. Bei den Stadien ab 60% bis zum Schlupf wurde die Präparation am posterioren Pol des Eies durchgeführt. Mit einer Minutiennadel wurde das Ei am posterioren Pol so durchstoßen, dass das Ei mit der Minutiennadel zwischen dem Körper und den Cerci durchbohrt wurde. Bei dieser Präparation wird der Raum zwischen dem Körper und den Cerci ausgenutzt, um das Ei, ohne den Embryo zu verletzen, durchstechen zu können. Mit dieser Methode ist die Gefahr der Verletzung des Embryos während des Herauspräparierens ziemlich gering.

2.5.2 Präparation für die Meerrettich-Peroxidase (HRP) Immunhistochemie

Nachdem die Grillenembryonen in einer mit Grillenringer gefüllten Sylgardschale, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, aus dem Ei heraus

präpariert wurden, wurde das Alter der Embryonen bestimmt. Dann wurde der Kopf der Embryonen abgetrennt und die Antennen wurden gerade ausgerichtet, bevor sie fixiert wurden. Bei den älteren Embryonen ab 60% der Embryogenese wurden die Antennen in der Nähe der Basis am Flagellum abgeschnitten, damit die Lösungen durch diese Öffnung das Gewebe eindringen konnten. Ab ca. 50% der Embryogenese bildet sich eine impermeable embryonale Kutikula (Shankland und Bentley, 1983), die eine Diffusion der Antikörper in den Embryo verhindert. Ältere Stadien können daher nur durch die Öffnung der Kutikula angefärbt werden, da die Lösungen die Kutikula nicht durchdringen können. Anschließend wurden die Embryonen in eine Blockschale überführt, in der die immunhistochemische Färbung durchgeführt wurde (siehe Material und Methoden Kapitel 2.6.1). Die HRP (horse raddish peroxidase) Immunhistochemie wurde bei 110 Embryonen durchgeführt, die sich zwischen 30% -95% der Embryogenese befanden.

2.5.3 Präparation für die retrograde Antennen-Füllung

Der Embryo wurde wie oben beschrieben aus dem Ei heraus präpariert. Hierbei wurde besonders auf Unversehrtheit des Embryo geachtet, da durch eine Verletzung eine unspezifische Aufnahme des Farbstoffes erfolgt. In die Sylgardfläche in der Petrischale wurde mit einer feinen Rasierklinge eine schmale Rinne geschnitten, in die der Embryo genau hineinpasste. Der Embryo wurde mit der dorsalen Seite nach unten in der Rinne platziert und mit Hilfe von Kaktusnadeln (*Opuntia microdasys*: Teddybärkaktus) fixiert. Anschließend wurde ein Vaselintopf um den Embryo gebaut und die Antennen mit einer Mikroschere oder mit Hilfe einer Pinzette und Rasierklinge an den nachfolgend beschriebenen Stellen abgeschnitten.

Um die Projektionen sensorischer Neurone zu färben, die sich im Flagellum befinden, wurden die Antennen so abgeschnitten, dass zusätzlich zu den ersten beiden Antennensegmenten, Scapus und Pedicellus, wenigstens

drei Flagellumsegmente am Pedicellus verblieben. Um die Projektionen sensorischer Neurone, die im Pedicellus lokalisiert sind, mit zu färben, wurden die Antennen zwischen dem Pedicellus und dem ersten Antennensegment, Scapus durchgeschnitten. Bei manchen Präparaten wurde der Scapus durchgeschnitten, wo es nicht möglich war, den Schnitt zwischen dem Pedicellus und dem Scapus durchzuführen. Die retrograden Füllungen der Antennen wurden immer beidseitig entweder mit NiCl_2 oder CoCl_2 , wie im Kapitel 2.6.3 beschrieben, durchgeführt. Die retrograden Antennen-Füllungen wurden bei 35 Grillenembryonen durchgeführt, die sich zwischen 75% - 95% der Embryogenese befanden. Die Präparate wurden zum Teil als Ganzpräparate betrachtet. Es wurden aber auch Schnittserien (Paraplastschnitte; horizontal; 5 μm bzw. 10 μm) angefertigt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.8.2).

2.5.4 Präparation für die Dil-Applikation

Die Dil (Dialkylcarbocyan; Neuro Trace™ Tissue labeling Paste) Applikationen wurden bei fixierten Präparaten beidseitig durchgeführt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.6.4). Die ganze Präparation erfolgte auf einer Wärmeplatte (38°C) unter einem Binokular (Wild M5A). Alle benötigten Geräte und Lösungen wurden auf 38°C erwärmt, weil es wichtig ist, dass die Dil-Paste zähflüssig bleibt, damit sie an den angeschnittenen Antennenenden mit Hilfe einer Minutiennadel verteilt werden konnte. Der Embryo wurde im Fixierer (4% Formaldehyd in PBS; Rezepte siehe Anhang 7.1.1 und 7.1.5) aus dem Ei heraus präpariert. Danach wurde der Embryo in einer Sylgardschale mit Minutiennadel festgesteckt und so platziert, dass die angeschnittenen Antennenenden mit der Dil-Paste eingeschmiert werden konnten bzw. in die Paste eingetaucht werden konnten.

Nach der Färbung (siehe Kapitel 2.6.4) wurden die beiden Antennen abgeschnitten, nachdem zusätzlich zu den ersten beiden Antennensegmenten, Scapus und Pedicellus, wenigstens deri Flagellumsegmente am Pedicellus hängen gelassen wurden. Die

embryonale Kutikula, die die Betrachtung der Färbung im Oberschlundganglion im Deutocerebrum verhindert, wurde auf der ventralen Seite des Kopfes, ohne das Oberschlundganglion zu verletzen, mit Hilfe einer Pinzette und einer Minutiennadel entfernt. Die Dil-Applikationen wurden bei 24 Grillenembryonen durchgeführt, die sich zwischen 40%- 95% der Embryogenese befanden.

2.5.5 Präparation für die retrograde Füllung (backfill) des Halskonnektives

Für die Färbung der embryonalen Gehirninterneurone wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen die retrograde Füllung (backfill) am Halskonnektiv (siehe Kapitel 2.6.2) und Injektion eines Farbstoffes in das Halskonnektiv (extrazelluläre Färbung). Bei der zweiten Methode wurde ein Farbstoff (Neurobiotin) in ein Halskonnektiv mit Hilfe einer Glaselektrode injiziert, nachdem das Halskonnektiv wie unten beschrieben freipräpariert worden war. Die Durchführung der Färbung ist im Material und Methoden Kapitel 2.7.2 beschrieben.

Um die absteigenden Gehirninterneurone mit Hilfe von retrograder Füllung am Halskonnektiv zu färben, wurde die folgende Präparation durchgeführt. Nachdem der Embryo in einer mit Grillenringer gefüllten Sylgardschale wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben aus dem Ei heraus präpariert wurde, wurde das Alter des Embryos bestimmt. In der mit Sylgard ausgegossenen Petrischale wurde eine Rinne für den Embryo angefertigt, indem man ein Stück Sylgard herausschnitt. Dann wurde der Embryo mit der Ventralseite in diese Rinne gelegt und mit Minutiennadeln fixiert. Für die Freilegung des Nervensystems wurde die Dorsalseite des Embryos vom posterioren Ende des Abdomens mit einer Mikroschere bis zum Kopf aufgeschnitten. Von diesem anterioren Schnittpunkt aus erfolgte ein Schnitt nach rechts und links bis zum Rand des Körpers. Die rechte und linke Körperwand wurde mit Minutiennadeln seitlich auf dem festgesteckt. Dann wurde der Darm in der Nähe des Embryokopfes mit einer Pinzette angehoben und entfernt, indem der Darm am posterioren Ende des Abdomens

abgeschnitten wurde. Nach dieser Präparation lag das Nervensystem von dorsal frei und die Ganglien waren zu sehen. Das Prothorakalganglion und die Konnektive wurden vom restlichen Gewebe freipräpariert, dabei wurden die Seitennerven durchgeschnitten. Die Konnektive zwischen dem Prothorakalganglion und Mesothorakalganglion wurden durchtrennt und dann das Prothorakalganglion mit Hilfe einer Rasierklinge und Pinzette der Länge nach durchgeschnitten. Danach wurde entweder die rechte oder die linke Ganglionhälfte in der Nähe vom Halskonnektiv quer durchgeschnitten. Um das Halskonnektiv, an dem ungefähr $\frac{1}{4}$ vom Ganglion hängt, wurde ein Vaselinetopf gebaut, der mit einem Farbstoff (Neurobiotin) gefüllt wurde (siehe Material und Methoden Kapitel 2.6.2).

Nach der Färbung wurde das Zentralnervensystem heraus präpariert, damit das Präparat für die Visualisierung der Färbung weiter behandelt werden konnte. Um das Nervensystem herauszupräparieren, wurde erst die Kopfkapsel von der dorsalen Seite mit einer Längsschnitt nach anterior eröffnet und dann das Tentorium mit besonderer Vorsicht, um die Schlundkonnektive nicht zu verletzen, entfernt. Danach wurden die Ganglien vom Prothorakalganglion beginnend nach anterior mit Hilfe von einer Pinzette und einer Mikroschere freipräpariert. Dabei wurden alle Seitennerven der Ganglien durchtrennt. Dann wurden die Antennen an der Basis abgeschnitten und das Oberschlundganglion vorsichtig von dem restlichen Gewebe befreit. Die Embryonen wurden während des Präparierens und des gesamten Versuchs in Ringerlösung gehalten.

Die retrograde Färbungen wurden bei 90 Grillenembryonen durchgeführt, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien (zwischen 60% und 95% der Embryogenese) befanden. Bei 60 Präparaten wurden die retrograde Füllungen (backfill) an einem ganzen Halskonnektiv durchgeführt. Bei 30 Präparaten wurde der Farbstoff in ein Halskonnektiv mit Hilfe von einer Glaselektrode mit Strom (N =15) und ohne Strom (N =15) injiziert (siehe Kapitel 2.7.2). Die Präparate wurden zum Teil als Ganzpräparate betrachtet. Es wurden aber auch Schnittserien (Kryostat-Schnitte; horizontal; 10 μ m) angefertigt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.8.1).

2.5.6 Präparation für intrazelluläre Färbungen antennaler Mechanosensoren

Um die Projektionen antennaler Mechanosensoren zu zeigen, die in der Basis der Antenne vorkommen (besonders campaniforme Sensillen und Chordotonalorgane), wurden einzelne sensorische Neuronen durch die Injektion verschiedener Farbstoffe (Lucifer Yellow oder Neurobiotin) intrazellulär gefärbt. Um die Embryonen für diese intrazelluläre Färbung vorzubereiten, wurde folgende Präparation durchgeführt.

Die Grillenembryonen, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden, wurden in einer mit Grillenringer gefüllten Sylgardschale, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, aus dem Ei heraus präpariert. Anschließend erfolgte die Altersbestimmung anhand der schon beschriebenen Merkmale. Dann wurden die Embryonen vorsichtig mit einer Pipette, in einem Tropfen Grillenringer, auf einem mit Sylgard beschichteten Objektträger überführt. Die Grillenembryonen, besonders unter 50% der Embryogenese, sind klebrig, nachdem sie aus dem Ei heraus präpariert wurden und sehr empfindlich. Es besteht die Gefahr, dass sie zum Beispiel an der Pipette oder auf dem Sylgard kleben bleiben. Deswegen erfordert die Präparation besondere Aufmerksamkeit. Nachdem eine Rinne in das Sylgard geschnitten worden ist, wurden die Embryonen mit der Lateralseite in diese Rinne gelegt und mit Kaktusnadeln festgesteckt. Wenn man die Injektion in die rechte Antenne machen wollte, musste der Embryo mit der linken Seite nach unten in die Rinne platziert werden. Anschließend wurde die Antenne seitlich nach links auf dem Sylgard ausgestreckt und fixiert, ohne die Antennen zu verletzen. Wenn man in beide Antennen oder von einem anderen Winkel Farbstoff injizieren wollte, musste der Embryo mit der Ventralseite in der Rinne platziert werden. Die Rinnentiefe sollte dabei dem halben Körperdurchmesser des Embryos entsprechen, damit der Embryo geschützt ist. Danach wurde der Objektträger mit dem Präparat auf einen kleinen Präparatetisch unter einem elektrophysiologischen Setup angebracht, an dem die Färbung erfolgte (siehe Material und Methoden Kapitel 2.7). Die intrazellulären Färbungen wurden bei 100 Embryonen durchgeführt, die sich zwischen

40% und 60% der Embryogenese befanden.

2.6 Färbungen

2.6.1 Meerrettich-Peroxidase (HRP) Immunhistochemie

Um die sensorischen Neuronen zu färben, die sich in der Antenne der Grillenembryonen befinden, wurde eine immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen neuron-spezifische Epitope durchgeführt. Hierbei wurde ein der Meerrettich-Peroxidase ähnliches Epitop gewählt, das von den membran-ständigen Zellen exprimiert wird. Die Meerrettich-Peroxidase ist ein neuronaler Marker bei Arthropoden (Jan und Jan, 1982). Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann man die Antigenkomponente einer Zelle nachweisen und so sollten die sensorischen Neuronen durch Antikörper gegen HRP darstellbar sein. Bei der immunhistochemischen Färbung in dieser Arbeit wurde ein unkonjugierter primärer Antikörper (rabbit anti-HRP) verwendet, der spezifisch gegen HPR gerichtet ist. Dieser primäre Antikörper wurde über einen fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (goat anti rabbit IgG-CY3; GAR-CY3) oder über einen biotynilierten Sekundärantikörper (anti rabbit IgG) und anschließend mit der DAB-Reaktion detektiert.

Die Präparate wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur in 4% Formaldehyd in PBS (0,01 M) mit 0,03% TX-100 fixiert, eine Stunde in PBS mit 0,03% TX-100 gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% NGS in PBS mit 0,03% TX-100 (Blocklösung) blockiert. Die Inkubation im primären Antikörper (rabbit anti-HRP; 1:2000 verdünnt in der Blocklösung) erfolgte entweder 24 Stunden oder über das Wochenende bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Präparate mindestens einen halben Tag in in PBS mit 0,03% TX-100 gewaschen. Die Lösung wurde alle halbe Stunde gewechselt. Der Sekundärantikörper (GAR-CY3) wurde 1:1000 in der Blocklösung verdünnt und die Inkubation in dieser Lösung erfolgte über Nacht bei 4°C.

Anschließend wurden die Präparate mindestens einen halben Tag in in PBS mit 0,03% TX-100 gewaschen. Die Präparate wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 7 Minuten) entwässert und in Methylsalicylat geklärt. CY3 ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Absorbtion = 550 nm; Emission = 570 nm) und die Färbung wurde mit einem Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskop betrachtet (siehe Kapitel 2.9).

Für die Lokalisation des primären Antikörpers in einer DAB Reaktion wurde der primäre Antikörper mit einem biotynilierten Sekundärantikörper (anti rabbit IgG; 1:1000) markiert, nachdem die Anfangsschritte bis zum Sekundärantikörperschritt wie oben durchgeführt worden sind. Dann musste ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (ABC) an das Biotin gebunden werden (Rezept siehe Anhang 7.1.5). Das Enzym Peroxidase katalysiert die farbgebende Reaktion in der Anwesenheit des Chromogens DAB. Nach einem halben Tag Inkubationszeit bei Raumtemperatur, wurden die Präparate mit PBS und Tris-HCl (Rezept im Anhang 7.1.1) gewaschen, um das überschüssige und ungebundene ABC auszuwaschen. Dann wurde das Präparat eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur in 0,01% DAB in Tris-HCl vorinkubiert. Die Entwicklung erfolgte in einer DAB Lösung bestehend aus 1 ml DAB-Tris Lösung (0,01% DAB in Tris-HCl) und 1 µl 0,3% H₂O₂-Lösung. Um die Reaktion zu stoppen, wurde das Präparat zwei mal 10 min bei Raumtemperatur mit Tris-HCl gewaschen. Das Präparat wurde dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 7 Minuten) entwässert und in Methylsalicylat überführt (siehe Anhang 7.1.7).

2.6.2 Neurobiotin Füllung und die Visualisierung des Neurobiotins

Die retrograde Füllung (backfill) des Halskonnektivs wurde mit Neurobiotin, 4,5% in destiliertem Wasser, durchgeführt, wie bereits im Kapitel 2.5.5 beschrieben wurde. Die Laufzeit dieser Füllung betrug ca. 20 Stunden bei 4°C. Die überschüssige Lösung wurde abgesaugt und das Präparat zwei mal fünf Minuten mit der Ringerlösung gewaschen, um die

überschüssige Färbelösung auszuwaschen. Nach der Färbung wurde das Zentralnervensystem heraus präpariert (siehe Kapitel 2.5.5), wodurch das Präparat für die Visualisierung der Färbung weiter behandelt werden konnte. Die Detektion des Neurobiotins wurde entweder mit CY3-Avidin oder mit DAB gemacht (siehe Anhang 7.1.3).

Das Präparat wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur in 4% Formaldehyd in 0,01 M PBS mit 0,1% TX-100 fixiert. Dann wurde das Präparat eine Stunde in PBS mit 0,1% TX-100 und eine Stunde in PBS ohne TX-100 gewaschen.

Um das Neurobiotin zu lokalisieren, wurde ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (ABC) (Rezept siehe Anhang 7.1.5) verwendet. Das Enzym Peroxidase und damit das Neurobiotin wurde mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht. Es gibt verschiedene Chromogene, die als Elektronendonoren bei den Enzymreaktionen dienen können. Das in dieser Arbeit verwendete Chromogen war 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Das frisch angesetzte ABC lässt man vor dem Benutzen eine Stunde bei Raumtemperatur und abgedunkelt stehen, damit sich das Biotin an das Avidin binden kann. Die Präparate wurden ca. 12 Stunden bei Raumtemperatur im ABC belassen. Dabei binden sich die Neurobiotin-Moleküle an die freien Bindungsstellen von Avidin. Im Anschluss wurden die Präparate mit PBS und Tris-HCl gewaschen, um das überschüssige und ungebundene ABC auszuwaschen.

Zum Nachweis der gebundenen Neurobiotin-Moleküle wurde das Präparat eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur in 0,01% DAB in 0,05 M Tris-HCl (mit 1% NiCl₂ oder ohne NiCl₂) vorinkubiert. Die Entwicklung erfolgte in einer DAB-Lösung bestehend aus 500 µl und 2 µl 0,3% H₂O₂-Lösung. Das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) des gebundenen Avidin-Biotin-Komplexes bildet mit dem Substrat Wasserstoffperoxid (H₂O₂) einen neuen Komplex aus. Dieser Komplex reagiert zusammen mit DAB (Elektronendonator) und wird am ABC durch Anfärbung sichtbar. Die Entstehung von Luftblasen deutet darauf hin, dass die Reaktion stattfindet. Die Entwicklungszeit ist u.a. vom Präparat abhängig und wird bei der gewünschten Färbungsintensität abgebrochen. Um die Reaktion zu

stoppen, wurde das Präparat zwei mal 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Tris-HCl gewaschen. Das Präparat wurde dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 7 Minuten) entwässert und in Methylsalicylat überführt. Es wurden auch 10 µm dicke Kryostatschnittserien angefertigt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.8.1).

Für die Visualisierung des Neurobiotins alternativ zum DAB wurde auch der Avidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff (CY3) verwendet. CY3 wurde 1:4000 in PBS (0,01 M) verdünnt. Die Inkubation in CY3 erfolgte über Nacht bei 4°C im Dunkeln. Um die unerwünschte Hintergrundfärbung zu minimieren, wurde das Präparat eine Stunde mit PBS gewaschen. Das Präparat wurde dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 7 Minuten) entwässert und in Methylsalicylat geklärt (siehe Anhang 7.1.7).

2.6.3 Nickel- und Kobaltchlorid Füllungen

Bevor man das Vaselinetöpfchen mit den Färbelösungen Kobaltchlorid (0,5% in H₂O_{dest.}) oder Nickelchlorid (0,5% oder 0,75% in H₂O_{dest.}) füllte, wurde der Grillenringer abgesaugt und das angeschnittene Antennenende für eine Minute mit destilliertem Wasser benetzt. Dies bedingt, dass das Nervenende aufquillt und die Färbelösungen dadurch besser eindringen können. Der mit Nickel- oder Kobaltchlorid gefüllte Vaselinetopf wurde verschlossen.

Die Petrischale wurde geschlossen, nachdem ein feuchtes Tuch neben dem Vaselintopf plaziert wurde, damit das Präparat nicht austrocknet und die Färbelösung nicht abdampft. Zur Inkubation wurde das Präparat für 12 Stunden in den Kühlschrank überführt. Die Aufnahme von Kobaltionen bis zum Zelltod, durch Vergiftung, scheint ein aktiver Transport zu sein (Altman und Tyrer, 1980). Am nächsten Tag wurde die überschüssige Lösung abgesaugt. Das Präparat wurde mehrmals mit Grillenringer gewaschen um überschüssige Färbelösung aus zu waschen. Dann überführte man das Präparat in eine andere, mit frischem Grillenringer gefüllte Petrischale, indem das Nervensystem heraus präpariert wurde (siehe Kapitel 2.5.5).

Um die vom Antennennerv aufgenommene Kobaltchloridlösung sichtbar zu machen, muss die Ausfällung der Kobaltchloridlösung mit Ammoniumsulfid-Lösung, 1 ml Grillenringer + 4-5 Tropfen Ammoniumsulfid, erfolgen. Die Dauer der Ausfällung des Kobaltsalzes in schwarzes Kobaltsulfid (CoS) betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Ausfällung wurden die Präparate zwei mal je fünf Minuten mit Grillenringer gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Als Fixierer wurde 4% Formaldehyd in 0,01M PBS verwendet. Nach dem Fixieren wurden die Präparate vier mal jeweils 10 Minuten mit Grillenringer gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 80, 90, 96, 2 x 100% Isopropanol je 7 Minuten) entwässert, in Methylsalicylat geklärt und eingedeckelt.

Zur Visualisierung der vom Antennennerv aufgenommene Nickelchloridlösung erfolgte deren Ausfällung mit gesättigter Rubeansäure (eine gesättigte Lösung wird mit Dithiooxamid in 100% Ethanol oder Isopropanol hergestellt). Die Rubeansäure mit Grillenringer wird verdünnt (1 ml Grillenringer + 3 Tropfen Rubeansäure). Nach der Ausfällung wurden die Präparate kurz (zwei mal fünf Minuten) mit Grillenringer gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Als Fixiermittel wurde AAF-Fixierer verwendet (Rezept siehe Anhang 7.1.5). Nach dem Fixieren wurden die Präparate vier mal jeweils 10 Minuten mit Grillenringer gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 80, 90, 96, 2 x 100% Isopropanol je 10 Minuten) entwässert. Zum Mikroskopieren der Ganzpräparate wurden diese mit Methylsalicylat auf einen Objektträger mit Vertiefung eingedeckelt. Das Methylsalicylat diente zur Aufklärung der Präparate. Um das Präparat mit einem Konfokalmikroskop darstellen zu können, wurde es auf einem Objektträger mit zwei Minutiennadeln (Durchmesser = 0,2 mm), als Abstandhalter zwischen dem Objektträger und Deckglas, eingedeckelt, da die Objektive in einem bestimmten Arbeitsabstand funktionieren (für Objektive siehe Kapitel 2.9). Bei den Präparaten, an denen Nickelchlorid-Füllungen angewendet wurden, erfolgte eine Silberintensivierung (siehe Anhang 7.1.6), zur Verstärkung der Färbung. Die Silberintensivierung

erfolgt durch Versilberung von mit CoS gefärbten Neuron-Profilen und hat einen Verstärkungseffekt durch den katalytischen Prozess. Die Schwermetalle katalysieren in Anwesenheit von Reduktionsmitteln die Reduktion von Ag-Ionen zu elementarem Silber. Dann wurden die Präparate entweder als Ganzpräparate betrachtet oder es wurden Paraplastschnittserien angefertigt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.8.2).

2.6.4 Dil-Applikation

Nachdem die angeschnittenen Antennenenden mit der Dil- Paste wie in 2.5.4 beschrieben behandelt wurden, erfolgte eine Inkubation des Präparates, in der mit EDTA Lösung (Ethylen-diamin-tetra-acetat; 0,5 M in PBS) gefüllten Petrischale, im Wärmeschrank bei 40°C. Der EDTA ist ein Komplexbildner. Er bildet stabile Komplexe mit Kationen mit einer Ladungszahl von mindestens +2, beispielsweise Kalzium, das äußerst geringe Tendenz zur Bildung von Komplexen hat. Bei der Dil Färbung ist die Entfernung des Kalziums vom Medium wichtig, damit der Farbstoff Dil besser diffundiert wird (Michael Hofmann, mündliche Mitteilung). Die Präparate verblieben dort für 36 Stunden bis acht Tage, damit der Farbstoff diffundierte. Bei den fixierten Geweben färbt der lipophile Fluoreszenzfarbstoff Dil Neurone über laterale Diffusion in die Plasmamembran.

Das Präparat wurde 15 min in Formaldehyd (4% in PBS) postfixiert und in PBS gewaschen. Der Dil ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Absorbtion = 549 nm; Fluoreszenz Emission = 565 nm). Die Färbung wurde mit einem Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskop mit einem geeigneten Filter (mit Standard Fluorescein und Rhodamin Filter) betrachtet. Zum Mikroskopieren wurden die Präparate in Vectashield auf einen Objektträger eingedeckelt, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben.

2.7 Intra- und extrazelluläre Färbungen

2.7.1 Versuchsaufbau

Um die absteigenden Interneurone zu färben, wurde das Neurobiotin in ein Halskonnektiv, nahe dem Unterschlundganglion, mit einer Elektrode extrazellulär injiziert, nachdem das Zentralnervensystem, wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben, freipräpariert worden ist.

Um die Projektionen antennaler Mechanosensoren zu zeigen, die in der Basis der Antenne vorkommen, wurden einzelne sensorische Neurone durch die Injektion verschiedener Farbstoffe (Neurobiotin oder Lucifer Yellow) intrazellulär gefärbt, nachdem die im Kapitel 2.5.6 beschriebenen Präparation durchgeführt worden ist.

Die Versuche wurden in einem Faraday-Käfig durchgeführt, in dem sich das Präparat auf einem Sylgard beschichteten Objektträger (bei der Färbung antennaler Mechanosensoren), bzw. in einer Petrischale (bei der Injektion des Halskonnektives), ein Präparattisch, ein Binokular, ein Mikromanipulator, eine Elektrode, ein Vorverstärker und ein Strommessgerät befanden. Der Verstärker, Oszilloskop, Audiomonitor und ein Stimulator wurden außerhalb des Käfigs platziert (Geräte und Hersteller siehe Anhang 7.2). Alle Geräte waren über die Labor-Masse geerdet. Als Referenzelektrode wurde ein Silberdraht verwendet, der ebenfalls mit der Erde verbunden war, wodurch sich der Stromkreis schloss. Der Ausgang des Verstärkers ging auf die Analogeingänge des Analog-Digitalwandlers (CED). Dort wurden die analogen Daten digitalisiert und auf den Computer eingespielt.

2.7.2 Elektroden und Färbung

Die Elektroden, die für die extrazelluläre Farbstoffinjektionen benutzt wurden, wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Innendurchmesser = 0,78 mm, Außendurchmesser = 1,0 mm) hergestellt. Die Elektroden wurden mit

einem Puller gezogen, dann wurden die Spitze der Elektroden abgebrochen. Zwei Methoden der Elektrodenbefüllung wurden angewandt. Zum einen wurden die Elektroden (5-30 M Ω) Neurobiotin (4% in 1M Kaliumchlorid) gefüllt. Der Farbstoff wurde mit einer Stromstärke von 0,3 nA- 0,8 nA, eine bis vier Stunden oder über Nacht injiziert und die Präparate wurden entweder gleich fixiert oder der Farbstoff konnte eine-zwei Stunden oder über Nacht bei 4°C diffundieren. Zum anderen wurden die Elektroden mit Neurobiotin (4% in destiliertem Wasser) gefüllt. Der Farbstoff wurde ohne Strom eine bis zwei Stunden injiziert und die Präparate wurden entweder gleich fixiert oder der Farbstoff wurde über Nacht bei 4°C belassen.

Die Elektroden, die für die intrazelluläre Farbstoffinjektionen benutzt wurden, wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Innendurchmesser = 0,75 mm, Außendurchmesser = 1,0 mm) hergestellt. Die Elektroden wurden mit einem Puller gezogen, so dass man Elektrodenwiderstände von 30 bis 40 M Ω erhielt, nachdem man die Elektrode mit 4%-iger Neurobiotinlösung in 1 M Kaliumchlorid (KCl) befüllt hat. Das Neurobiotin wurde durch Depolarisation und Lucifer Yellow durch Hyperpolarisation mit einem „duty cycle“ von 50% (100 ms = Pulsdauer) mit verschiedenen Stromstärken in Zellen gebracht. Für Stromstärke, Injektionsdauer und Diffusionsdauer siehe Tabelle 3.3.1 im Ergebnisskapitel. Nach einer bestimmten Diffusionsdauer des Farbstoffes wurde das Präparat zwei Stunden bei Raumtemperatur in 4% Formaldehyd fixiert und in PBS 0,1%-TX-100 (0,01M; pH = 7,4) gewaschen.

Die Neurobiotinlösung wird durch Kapillarkräfte in die Spitze der Elektrode gezogen. Es befindet sich an einer Seite der Innenwand der Elektrode ein angeschmolzener Glasfaden, durch den die Kapillarkräfte verstärkt werden. In den Elektrodenhalter wurde mit einer Spritze Trägersalzlösung (bei Neurobiotin 1 M KCl) gespritzt. Als Färbelösung wurde auch Lucifer Yellow (ca. 4%) verwendet, die ebenfalls mittels Kapillarkräfte in die Elektrode gezogen wurde. Die Trägerlösung im Elektrodenhalter ist Lithiumchlorid (1 M).

Die Detektion von Neurobiotin wurde mit Avidin gekoppelte CY3

durchgeführt. Wie im Anhang 7.1.3 beschrieben, wurde das Neurobiotin visualisiert und das Präparat wurde eingedeckelt (siehe Anhang 7.1.7).

Um zu testen, ob die Elektrode intrazellulär ist, wurden Rechteckpulse von 100 ms Dauer in unregelmäßigen Abständen während der Injektion der Zellen gegeben. Dabei wurde überprüft, ob sich die Form der Pulse nach der Penetration der Zelle geändert hat.

2.8 Anfertigen von Schnitten

2.8.1 Vorbereitung der Präparate für Kryostat-Schnitte

Die Präparate wurden in 4% Formaldehyd zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Fixieren wurden sie in PBS (0,01M; PH:7,4) mit 0,1% TX-100 eine Stunde gewaschen, um das Fixiermittel zu entfernen. Dabei wurde die PBS-Lösung 3 mal ausgewechselt. Um eine mögliche Eiskristallbildung im Gewebe während des Einfrierens zu verhindern (Kryoprotektion), wurden die Präparate in 20% Saccharose-Lösung (Rezept siehe Anhang 7.1.5) 12 Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Als Einbettmedium wurde Tissue Tek (Sakura) verwendet. Die zu schneidende Präparate wurden aus der Saccharose-Lösung in ein kleines Schälchen mit kaltem Tissue Tek gelegt und einige Minuten vorsichtig verrührt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Dabei muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen am Präparat verbleiben. Die zum Einbetten verwendeten Kupferblöcke wurden mit Tesafilm umwickelt, so dass eine kleine Wanne entstand, und mit Tissue Tek aufgefüllt. Die Präparate wurden in dieses Wännchen gegeben und unter dem Binokular nach der gewünschten Schnittebene ausgerichtet. Das Präparat wurde dann in Aceton eingefroren, wobei darauf geachtet werden musste, dass kein Aceton in die Wanne geriet. Um sicher sein zu können, dass das Aceton die Temperatur des Trockeneises erreicht hat, wurde in das Aceton solange Trockeneis gegeben, bis kein Sprudeln mehr zu sehen war. Der Kupferblock mit dem Präparat musste

schnell in den mit Aceton gefüllten Behälter eingetaucht werden, um so ein schnelles Einfrieren des Präparates inklusive des Einbettmediums zu erzielen und eine Ablösung des Präparates vom Einbettmedium während des Schneidens zu verhindern. Das eingefrorene Präparat wurde einige Zeit im Trockeneis belassen. Bevor das Präparat geschnitten werden konnte, musste es mindestens eine halbe Stunde im kalten Kryostat (Model Leitz 1720) belassen werden, damit sich die Präparat–Temperatur angleichen konnte. Um das Präparat zu fixieren, wird der Objekthalter großflächig mit Tissue Tek beschichtet und das Präparat nach dem Abtrennen vom Kupferblock auf dem Halter so platziert und leicht angedrückt, dass nachher die gewünschte Schnittebene erreicht wurde. Die Temperatur der Kühlkammer betrug -17°C , die des Objekthalters -13°C . Um diese Temperaturen stabil einzustellen, wurde der Kryostat zwei Stunden vor dem Schneiden aktiviert. Alle benötigten Geräte (Pinsel, Pinzette, Rasierklinge) wurden nach dem Einschalten zur Adaptation der Temperatur in den Kryostat gebracht. Um das Aufrollen der Schnitte auf dem Messer zu verhindern, wurde eine Schnittstreckerplatte verwendet. Die Schnittdicke betragen $5\ \mu\text{m}$ und $10\ \mu\text{m}$ für verschiedene Schnittserien. Die Schnitte wurden auf die mit Chromalaungelatin beschichteten Objektträgern aufgenommen (zur Beschichtung der Objektträger siehe Anhang 7.1.4). Der auf Raumtemperatur temperierte Objektträger wurde so nahe an den Schnitt herangebracht, dass der Schnitt an den Objektträger anheftete. Die Objektträger mit den Schnitten wurden staubgeschützt bei Raumtemperatur einige Stunden oder über Nacht getrocknet. Dann wurden Dauerpräparate angefertigt (siehe Anhang 7.1.3).

2.8.2 Vorbereitung der Präparate für Paraplast-Schnitte

Die für die Einbettung der Präparate in Paraplast benötigten Pinzetten oder andere Hilfsmittel (Blockschale und Glaspipetten), die man zum Umsetzen der Präparate während den Paraplaststufen brauchte, wurden in den Trockenschrank bei 60°C gelegt. Die Butanol-Paraplast Mischung (1:1)

wurde eine Stunde vor der Benutzung im Trockenschrank bei 60°C angesetzt.

Die fixierten Präparate wurden eine Stunde in Grillenringer bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 80, 90, 96, 2 x 100% Isopropanol je 10 min) dehydriert. Wenn das Präparat in Methylsalicylat liegt, überführt man das Präparat in 100% Isopropanol für zwei mal 15 min. Erst ließ man die Präparate 30 min in der Butanol-Paraplast Mischung (1:1), die eine Stunde vor der Benutzung angesetzt wurde, dann zwei mal 45 min in Paraplast im Trockenschrank. Das Ausblocken der Präparate erfolgte unter dem Binokular in auf 60°C erwärmten Blockschalen, die kurz vor der Verwendung mit Vaseline beschichtet wurden, damit der Präparatenblock am nächsten Tag leichter heraus zu lösen war. Während des Ausblockens wurden die Präparate, mittels Pinzetten, nach der gewünschten Ebene ausgerichtet. Dieser Arbeitsschritt muss schnell erfolgen, um eine Aushärtung des Paraplasts zu verhindern. Während der Orientierung der Präparate konnte die Pinzette mit Hilfe von einem Spiritusbrenner immer wieder erwärmt werden. Nachdem das Präparat ausgerichtet wurde, ließ man den Paraplastblock über Nacht bei Raumtemperatur aushärten. Der Paraplastblock wurde grob zugetrimmt und auf einem Holzblöckchen aufgesetzt. Unter dem Binokular wurden die beiden Seiten des Paraplastblockes, die parallel zum Messer sind, mit einer scharfen Rasierklinge parallel zugeschnitten, dadurch kann man in Bändern schneiden. Mit einem Rotationsmikrotom mit einem C-Messer wurden Schnittserien mit einem Messerwinkel von 4° angefertigt. Die 5 µm oder 10 µm dicken Schnitte wurden mit Hilfe einer Pinzette oder eines Pinsels in destilliertem Wasser auf Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen. Anschließend wurde auf eine 40°C warme Heizplatte gelegt, wo die Schnitte sich strecken und über Nacht auf der Objektträger die Schnitte ankleben. Der Paraplast konnte mittels Xylol (zwei mal zwei Minuten) und absteigender Isopropanolreihe (2x 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, je 10 Minuten) entfernt werden. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Isopropanolreihe (30, 50, 70, 80, 90, 96, 2 x 100%, je 7

Minuten) dehydriert und in Methylsalicylat geklärt.

2.9 Bilder

Konfokalmikroskopie

Optische Schnitte der Präparate zum Beispiel der Antenne beziehungsweise des Oberschlundganglions der Embryonen wurden mit einem Leica TCS NT Konfokallaserscanning Mikroskop (Leica Konfokal Software: „TCS NT, Version 1.6.587“) erhalten, das mit Objektiven UV 10x0.4NA imm HC PLAPO, UV 20x0.7NA imm HC PLAPO, UV 40x1.25NA oil PLAPO 1.25-0.75 und UV 63x1.32NA oil PLAPO ausgestattet ist. Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Hilfe von Argonlaser mit Anregung 514 nm (für Cy3 und Dil) visualisiert.

Fluoreszenzmikroskopie

Fotografien wurden auch mit einer digitalen Kamera (Nikon Coolpix 4500), die am Epifluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar, Dialux 20) angeschlossen ist, erfasst. Dieses Mikroskop ist ausgestattet mit folgenden Objektiven: NPL FLUATOR 6,3/0,20 (160/-), NPL FLUATOR 10/0,30 PHACO1 (160/-), NPL FLUATOR 16/0,45 PHACO1 (160/0,17), NPL FLUATOR 25/0,55 PHACO2 (160/0,17) und 50/1,00 OEL PHACO3 (160/-)). Das mikroskopische Bild wurde über die Kamera auf dem Bildschirm des Computers mit Hilfe von Motv (Motif TV application; Gerd Knorr 2002, kraxel@bytesex.org) angezeigt. Für die Darstellung der Cy3- und Dil-Markierungen wurde ein Anregungsfilter von 550 nm und ein Emissionsfilter von 570 nm verwendet.

Bildbearbeitung

Die Fotografien wurden mit den Bildbearbeitungsprogrammen ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. [Http://rsb.info.nih.gov/ij/java](http://rsb.info.nih.gov/ij/java) 1.5.0_04) und Gimp 2.2.4 bearbeitet. Um Überblicksabbildungen zu erstellen, wurden optische Schnitte von Ganzpräparaten mit dem Konfokallaserscanning Mikroskop und dem

Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Schnittdicken (zwischen 1 μm und 3 μm) erfasst. Eine Z-Projektion der Fotografien eines Präparats ist eine Überlagerung dieser optischer Schnitte in einer Serie von Fotografien.

3. ERGEBNISSE

3.1 Altersbestimmung der Grillenembryonen

Eine genaue Altersbestimmung der Grillenembryonen ist Voraussetzung für alle entwicklungsbiologischen Untersuchungen. In dieser Arbeit werden bei der Altersbestimmung der Grillenembryonen quantitative und qualitative Merkmale berücksichtigt. Als quantitative Merkmale werden Körperlänge und absolute und relative Antennenlänge auf ihre Eignung zur Altersbestimmung getestet (siehe Kapitel 3.1.2). Als qualitative Merkmale dienen äußerliche morphologische und physiologische Merkmale (siehe Kapitel 3.1.3). So wird eine quantitative Altersbestimmungsmethode während des Zeitfensters von etwa 25% bis 95% der Embryogenese entwickelt. Mit Hilfe von äußerlichen morphologischen und physiologischen Merkmalen, die zusätzlich zur Altersbestimmung herangezogen werden, erfolgt eine Einteilung der embryonalen Entwicklung der Grillen, zwischen 25% und 95% der Embryogenese, in 15 Stadien (siehe Kapitel 3.1.4).

Die gesamte Entwicklungsdauer der Grillenembryonen wird in Prozent der gesamten Entwicklungszeit angegeben (Bentley et al., 1979; Tyrer, 1969 und 1970, Wardhaugh, 1978; Chapman und Whitham, 1968).

3.1.1 Entwicklungsdauer und Schlupfzeit der Grillenembryonen

Die Grillen legen die Eier einzeln und nicht in Eipaketen ab. Daher entwickeln sich die Grillenembryonen asynchron. Der Gewinn einer großen Anzahl synchron entwickelter Eier ist deswegen nicht möglich. Auf Grund der asynchronen Entwicklung sind die Schlupfzeiten der Grillenembryonen unterschiedlich. Um die gesamte Entwicklungsdauer zu ermitteln, wurden die Schlupfzeiten von 297 Grillenembryonen bestimmt. Für diesen Zweck wurden die Grillenembryonen, wie in Material und Methoden Kapitel 2.3.2 beschrieben, vorbereitet. Der Schlupf der Grillenembryonen beginnt 187,5

h nach der Ablage und endet nach 245,5 h (Abb. 3.1.1). Die Schlupfzeit ist nicht normal verteilt ($p < 0.01$, Kolmogorov-Smirnov Test, $N = 297$). Die Lücke im Histogramm in der Abbildung 3.1.1 ist deshalb zustande gekommen, weil in der Nacht keine Beobachtung erfolgte. Die Kontrolle der Schlupfzeiten wurde von ca. 08:00 Uhr morgens bis 19:00 Uhr abends gemacht. Die Schlupfzeiten von 297 Embryonen wurde gemittelt, um die Entwicklungsdauer der Grillenembryonen zu bestimmen. Bei einer Temperatur von $29 \pm 1^\circ\text{C}$ beträgt die Entwicklungsdauer $214,95 \text{ h} \pm 17,22 \text{ h}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die zeitliche Abweichung in der Entwicklungsdauer beträgt damit 8% der gesamten Entwicklungsdauer. Unter diesen Bedingungen entspricht ein Tag 11% der gesamten Entwicklung.

Die frisch geschlüpften Grillenembryonen können an der weichen und durchsichtigen Kutikula erkannt werden. Nach dem erfolgten Schlupf beginnt nach ca. fünf Minuten die Pigmentierung der Kutikula. In der ersten halben Stunde wird die Kutikula grau, nach einer Stunde wechselt sie zur schwarzen Färbung.

Bei den Embryonen mit der ausgefärbten Kutikula, die man in den Morgenstunden beobachten konnte, weiß man die genaue Schlupfzeit nicht (Abb. 3.1.2). Einige dieser Embryonen sind eventuell in der Nacht geschlüpft. In der Beobachtungszeit von 08:00 Uhr bis 19:00 Uhr schlüpfen die Grillenembryonen innerhalb dieser Zeitspanne (Abb. 3.1.2).

Abb. 3.1.1

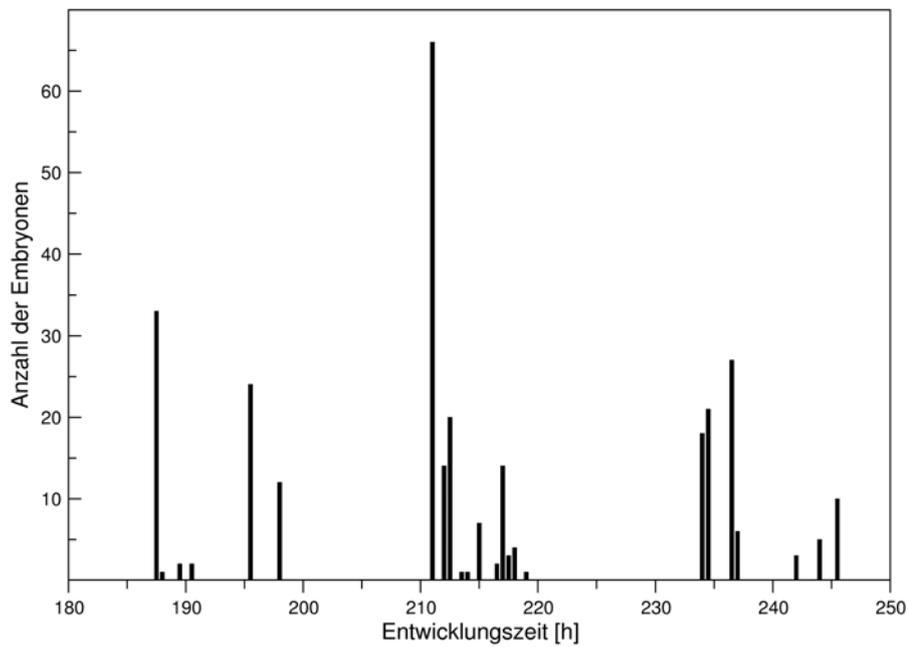


Abb. 3.1.1: Entwicklungsdauer asynchron entwickelter Grillenembryonen bei $29 \pm 1^\circ\text{C}$ ($N = 297$).

Abb. 3.1.2

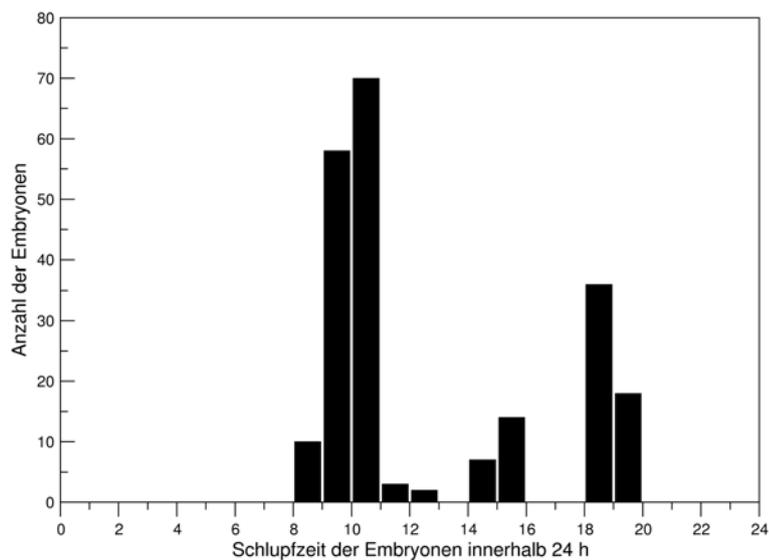


Abb. 3.1.2: Schlupfzeiten der Grillenembryonen innerhalb 24 h (von 08:00 Uhr morgens bis 19:00 Uhr abends) ($29 \pm 1^\circ\text{C}$; $N = 297$).

3.1.2 Morphometrische Analyse

Um eine quantitative Altersbestimmungsmethode zu entwickeln, wurden verschiedene morphometrische Messungen bei den sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befindenen Grillenembryonen durchgeführt. Die Messungen erfassen sowohl die Körperlänge als auch relative (Normierung der absoluten Antennenlänge auf die Körperlänge) und absolute Antennenlängen. Mit den von diesen Messungen erhaltenen Daten werden Korrelationsanalysen durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.2.1). Die Vorbereitung der Embryonen für diese Messungen und deren Durchführung werden in Material und Methoden Kapitel 2.4 und 2.5.2 beschrieben.

Die quantitative Erfassung der morphometrischen Daten dieser Merkmale im Verlauf der embryonalen Entwicklung ist in der folgenden Tabelle zu sehen. Außerdem werden im Folgenden diese Merkmale in Relation zur Entwicklungsdauer in Grafiken dargestellt. Die prozentualen Altersstadien werden jeweils in Klassen mit der Klassenbreite 10 zusammengefasst (siehe Tabelle 3.1.1, KM). Bei einer Klassenmitte (KM) zum Beispiel von 24,5% werden alle Messungen an Embryonen zwischen 20% und 29% der Embryogenese zusammengefasst.

Tab. 3.1.1: Körperlänge, relative Antennenlänge und absolute Antennenlänge der Grillenembryonen im Verlauf der Entwicklung. Die Entwicklungsdauer wird in Klassen geteilt. KM: Klassenmitte; MW: Mittelwert; STABW: Standardabweichung; N: Anzahl der Embryonen pro Klasse; 8% ZABW: 8% zeitliche Abweichung in der Entwicklungsdauer.

Entwicklungsdauer		Körperlänge [mm]		N	relative Antennenlänge [mm]		N	absolute Antennenlänge [mm]		N
KM [%]	8% ZABW [h]	MW	STABW		MW	STABW		MW	STABW	
34,5	2,76	1,6	0,34	10	19,57	10,57	11	0,27	0,1	16
44,5	3,56	1,76	0,22	19	39,97	12,93	19	0,64	0,24	22
54,5	4,36	2,23	0,45	12	57,56	7,6	12	1,28	0,24	12
64,5	5,16	2,66	0,45	18	59,49	9,04	17	1,53	0,21	20

Entwicklungsdauer		Körperlänge [mm]		N	relative Antennenlänge [mm]		N	absolute Antennenlänge [mm]		N
KM [%]	8% ZABW [h]	MW	STABW		relative Antennenlänge [mm]			absolute Antennenlänge [mm]		
					MW	STABW		MW	STABW	
74,5	5,96	2,86	0,11	17	60,74	3,45	17	1,75	0,12	18
84,5	6,76	2,98	0,15	11	60,05	2,89	11	1,79	0,06	13
94,5	7,56	2,85	0,05	3	61,07	1,58	3	1,74	0,06	3

3.1.2.1 Körperlänge und relative Antennenlänge

In der Abbildung 3.1.3 ist das Wachstum der Körperlänge der Grillenembryonen zwischen 25% und 95% der Embryogenese zu sehen. Der Körper der Grillenembryonen wächst kontinuierlich in die Länge bis circa 85% der Embryogenese. In 85% der Embryogenese erreicht der Körper eine Länge von circa 3 mm. Von 85% bis 95% der Embryogenese zeigt die Körperlänge einen Abfall von ca. 0,125 mm. Nach der Korrelationsanalyse erhielt man für die Körperlänge einen Korrelationskoeffizient von 0,81 (N = 93, Spearman Rangkorrelation, $p \leq 0.001$). Die Grafik in der Abbildung 3.1.4 zeigt die relative Antennenlänge zwischen 25% und 95% der Embryogenese. Bis circa 55% der Embryogenese nimmt die relative Antennenlänge stark zu. Zwischen 55% und 75% der Embryogenese verlangsamt sich das Wachstum der relativen Antennenlänge. Ab 75% der Embryogenese bleibt sie konstant. Für die relative Antennenlänge erhielt man einen Korrelationskoeffizient von 0,72 (N = 93, Spearman Rangkorrelation, $p \leq 0.001$).

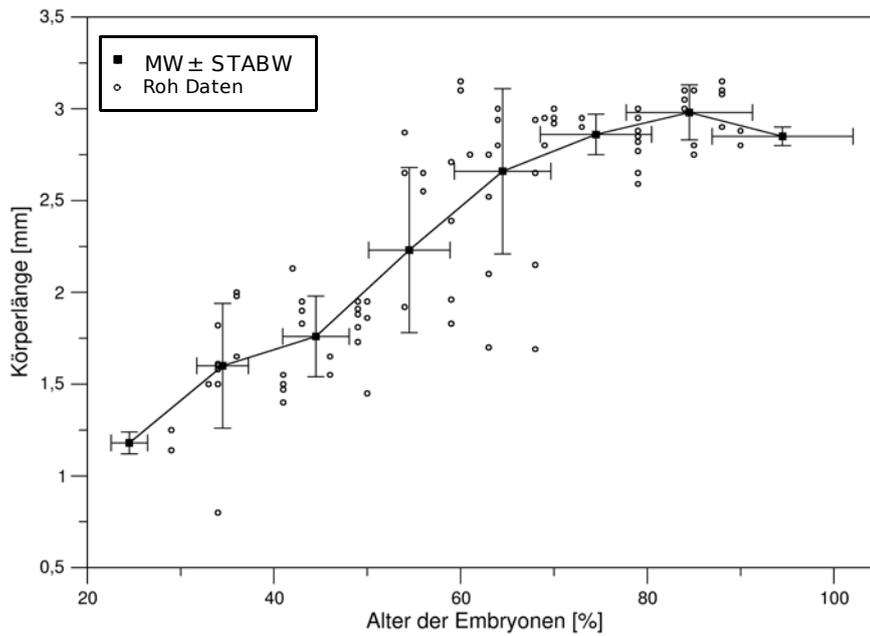


Abb. 3.1.3: Körperlänge im Verlauf der embryonalen Entwicklung ($29 \pm 1^\circ\text{C}$; $N = 93$). MW: Mittelwert; STABW: Standardabweichung. Standardabweichung auf der X-Achse 8 %.

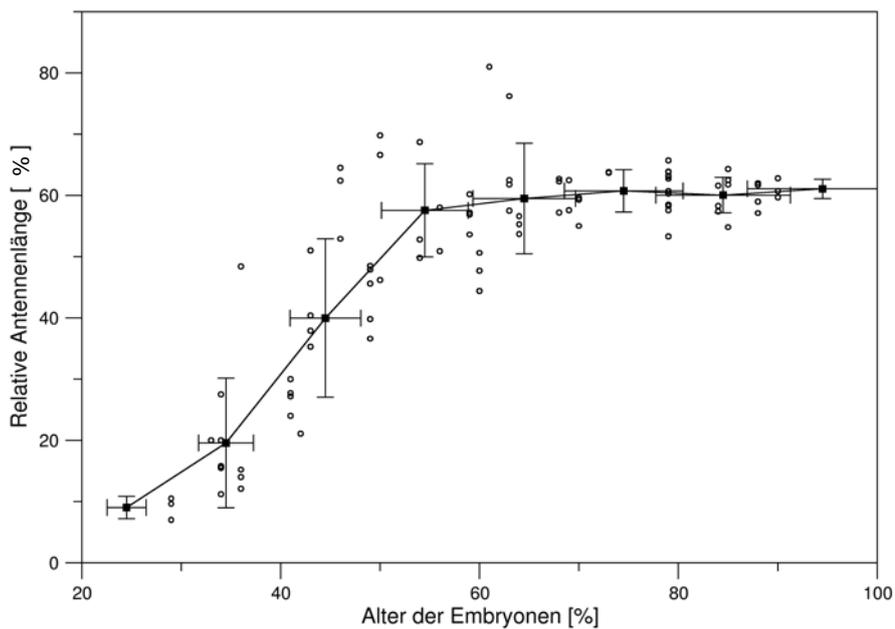


Abb. 3.1.4: Relative Antennenlänge im Verlauf der embryonalen Entwicklung ($29 \pm 1^\circ\text{C}$; $N = 93$). MW: Mittelwert; STABW: Standardabweichung.

3.1.2.2 Absolute Antennenlänge als ein Maß für die Altersbestimmung

Für die absolute Antennenlänge erhält man einen Korrelationskoeffizient von 0,93 (N = 107, Spearman Rangkorrelation, $p \leq 0.001$) im Gegensatz zu den Korrelationskoeffizienten von 0,72 für die relative Antennenlänge (N = 93) und 0,81 für die Körperlänge (N = 93). Die morphometrische Eigenschaft, die den besten Korrelationskoeffizient liefert, nämlich die absolute Antennenlänge, wird für die Erstellung des quantitativen Altersbetimmungsmodels während des Zeitfensters von etwa 25% bis 95% der Embryogenese verwendet (siehe Abb. 3.1.5).

In der Abbildung 3.1.5 ist das Wachstum der Antenne zwischen 25% und 95% der Embryogenese zu sehen. Das Längenwachstum der Antenne fängt ab 25% der Embryogenese an und geht kontinuierlich bis 75% der Embryogenese weiter. Von 45% bis ungefähr 55% der Embryogenese wächst die Antenne sehr stark und nimmt um circa 1,25 mm zu. Zwischen 55% - 75% der Embryogenese verläuft das Wachstum der Antenne langsamer, dabei nimmt die Antennenlänge nochmals circa 0,5 mm zu. Ab 75% der Embryogenese verlangsamt sich das Wachstum der Antenne nochmals. Bei circa 85% der Embryogenese erreicht die Antenne eine Länge von ungefähr 1,8 mm.

Abb. 3.1.5

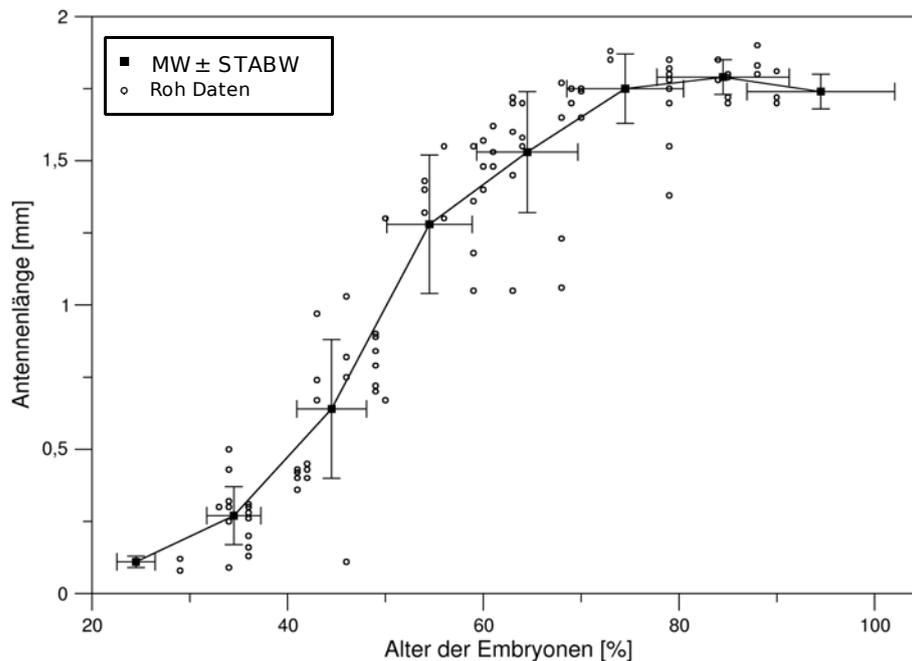


Abb. 3.1.5: Antennenlänge im Verlauf der embryonalen Entwicklung ($29 \pm 1^\circ\text{C}$; $N = 107$). MW: Mittelwert; STABW: Standardabweichung. Standardabweichung auf der X-Achse 8 %.

3.1.3 Äußerliche morphologische und physiologische Merkmale der Grillenembryonen

Die Grillenembryonen, die sich in verschiedenen Stadien befinden, zeigen unterschiedliche äußerliche morphologische und physiologische Merkmale. Mit Hilfe dieser Merkmale kann man das Alter der Grillenembryonen unabhängig von der Entwicklungsgeschwindigkeit bestimmen, die stark von Temperatur abhängt.

Im Folgenden werden die äußerlichen morphologischen und physiologischen Merkmale der Grillenembryonen für jedes 5%-Stadium zwischen 25% und 95% der Embryogenese beschrieben.

Die Embryonen, die sich unter 25% der Embryogenese befinden, werden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, weil hier keine antennen-bezogenen

Merkmale erhoben werden können. Die Antennen der Grillenembryonen jünger als 25% werden am Kopf als kurze Antennenknospen angelegt. In der Tabelle 3.1.2 werden für jedes Stadium typische Merkmale der Grillenembryonen zwischen 25% und 95% der Embryogenese vergleichend dargestellt.

3.1.4 Beschreibung der Entwicklungsstadien durch ihre Merkmale

In der folgenden Beschreibung werden die Achsen des Eies nach Kanellis (1952) und Miyamoto und Shimosawa (1983) verwendet. Die konvexe Seite des Eies entspricht der ventralen Seite des späteren Embryonen, die konkave Seite des Eies der dorsalen Seite des späteren Embryonen. Der Hinterpol des Eies ist mehr abgerundet und dicker als der Vorderpol (Kanellis, 1952). Der spitze Vorderpol wird als der „anteriore Pol“ bezeichnet, weil der Embryo aus diesem Pol schlüpft (Miyamoto und Shimosawa, 1983).

25% der Embryogenese

Das Grillenei ist mit Dotter ausgefüllt. Der Embryo ist von außen nicht zu sehen. Der Dotter ist grobkörnig. Der Embryo liegt tief im Dotter auf der ventralen Seite des Eies und erstreckt sich vom posterioren Pol bis über die Hälfte der Eilänge. Der Kopf zeigt nach posterior und das Abdomen nach anterior. Die ventrale Seite des Embryonen ist auf der ventralen Seite des Eies. Zum Dotter hin ist der Embryo dorsal offen und liegt in diesem Stadium in der Amnionhülle. In der Abbildung 3.1.6a ist eine Zeichnung eines 25%-igen Embryonen zu sehen. Der Embryo ist vollständig segmentiert. Die Anlagen aller Extremitäten sind vorhanden. Am Kopf sind Labrum (Lb), Antennen (An), Mundwerkzeuge (Mandibeln (M), erste und zweite Maxillen (1. und 2. Mx) und an der Brust die drei Beinpaare zu erkennen. Der Labrum liegt anterior zum Stomodaeum. Das Abdomen ist in 11 Segmente gegliedert. Am siebten Abdominalsegment

ist das Abdomen nach dorsal gekrümmt (Abb. 3.1.6a, großer Pfeil). Das erste Abdominalsegment hat Extremitätenknospen, Pleuropodien (Pl). Das Proctodaeum ist bis zum neunten Abdominalsegment invaginiert. Die drei Gehirnteile, Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum (Sterne) sind zu sehen. In dem Stadium sind die Embryonen sehr zerbrechlich.

30% der Embryogenese

Das Ei ist in der Nähe des anterioren Poles breiter als auf der posterioren Polseite. Der Embryo ist in der Amnionhülle und liegt tief im Dotter. Von außen ist der Embryo nicht zu sehen. In der Abbildung 3.1.6b und c ist eine Zeichnung eines 30%-igen Embryonen in ventraler Ansicht zu sehen. In der Abbildung 3.1.7a (in ventraler Ansicht) und b (in dorsaler Ansicht) sind Fotografien eines 30%-igen Embryonen zu sehen. Die dorsale Seite des Embryonen ist offen. Die primäre Kutikula (Müller, 1963; Micciarelli und Sbrenna, 1972) bedeckt die Oberfläche des Embryonen.

In diesem Stadium ist die Entwicklung der Extremitäten fortgeschritten. Die Extremitätenknospen am Abdomen sind deutlich zu erkennen. Bei den Beinen beginnt die Segmentierung (Abb. 3.1.6c, kleine Pfeile). Die Antennen (An) sind verlängert. Die ersten und zweiten Maxillen sind gegliedert (Abb. 3.1.6b, kleine Pfeile). Zwischen 30% und 40% der Embryogenese ist das Abdomen am siebten Abdominalsegment nach vorne geklappt. Zwischen 30% und 40% der Embryogenese nimmt das Abdomen in der Breite zu. Die Extremitätenanlagen nehmen in der Länge zu. Das Proctodaeum ist bis zur posterioren Grenze des siebten Abdominalsegments invaginiert. Erkennbar sind die Thorakalganglien.

Abb. 3.1.6

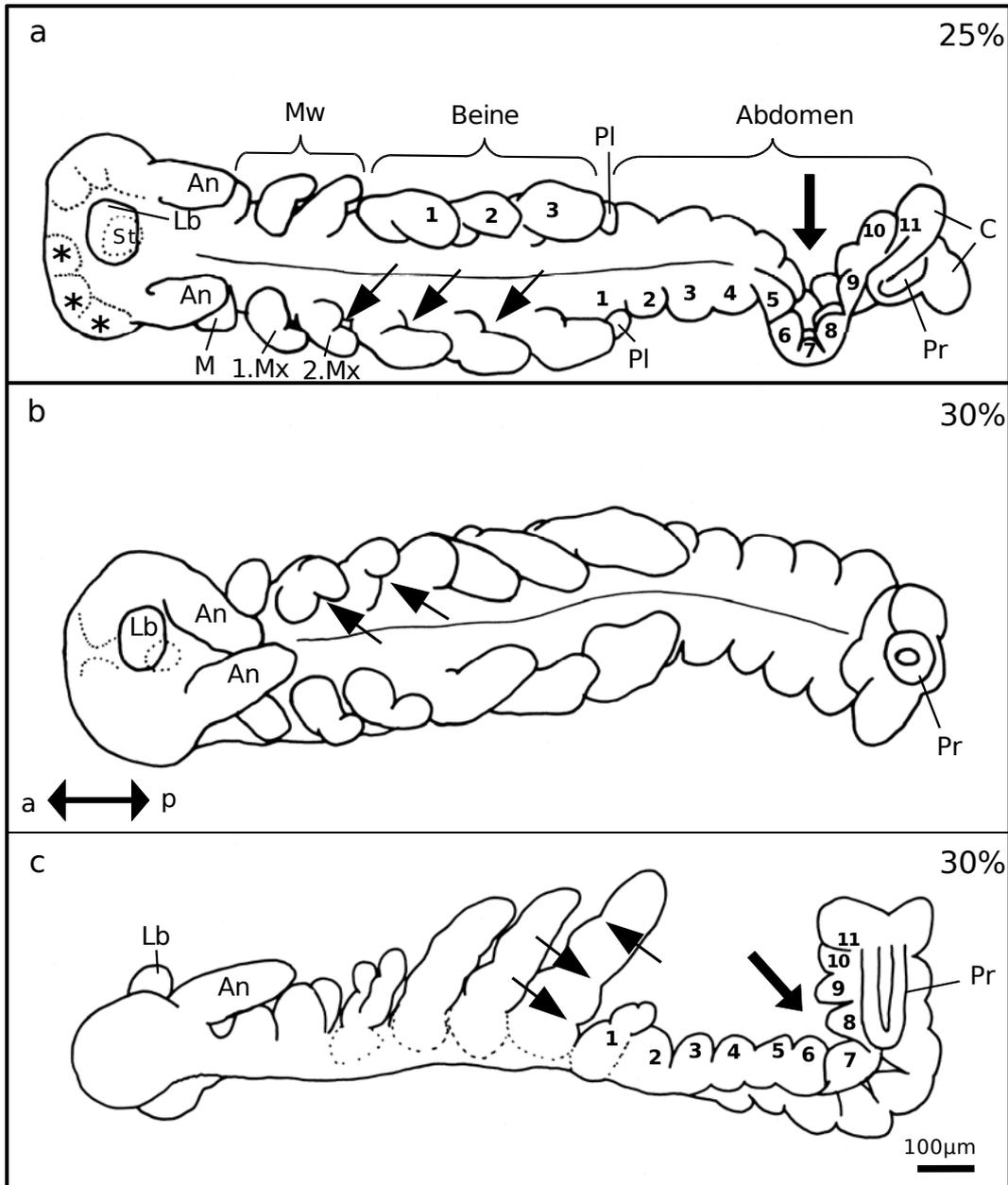


Abb. 3.1.6: Zeichnungen der Grillenembryonen in 25% (a) und 30% (b und c) der Embryogenese. **a:** Ein 25%-iger Embryo in ventraler Ansicht. Der Embryo ist vollständig segmentiert. Die Anlagen aller Extremitäten sind vorhanden. **b:** Ein 30%-iger Embryo in ventraler Ansicht. **c:** Ein 30%-iger Embryo in seitlicher Ansicht. Die Extremitätenanlagen sind gegliedert.

An: Antennenanlage; B: Beine; C: Cerci; großer Pfeil: Krümmung des Abdomens; 1-11: Abdomensegmente von 1 bis 11; kleine Pfeile: Segmentgrenzen der Mundwerkzeuge und Beine; Lb: Labrum; Mw: Mundwerkzeugen; M: Mandibel; 1. MX und 2. Mx: erste und zweite Maxillen; Pl: Pleuropodium; Pr: Proctodaeum; St: Stomodaeum; Sterne: drei Gehirnteile. Maßstab: 100 µm.

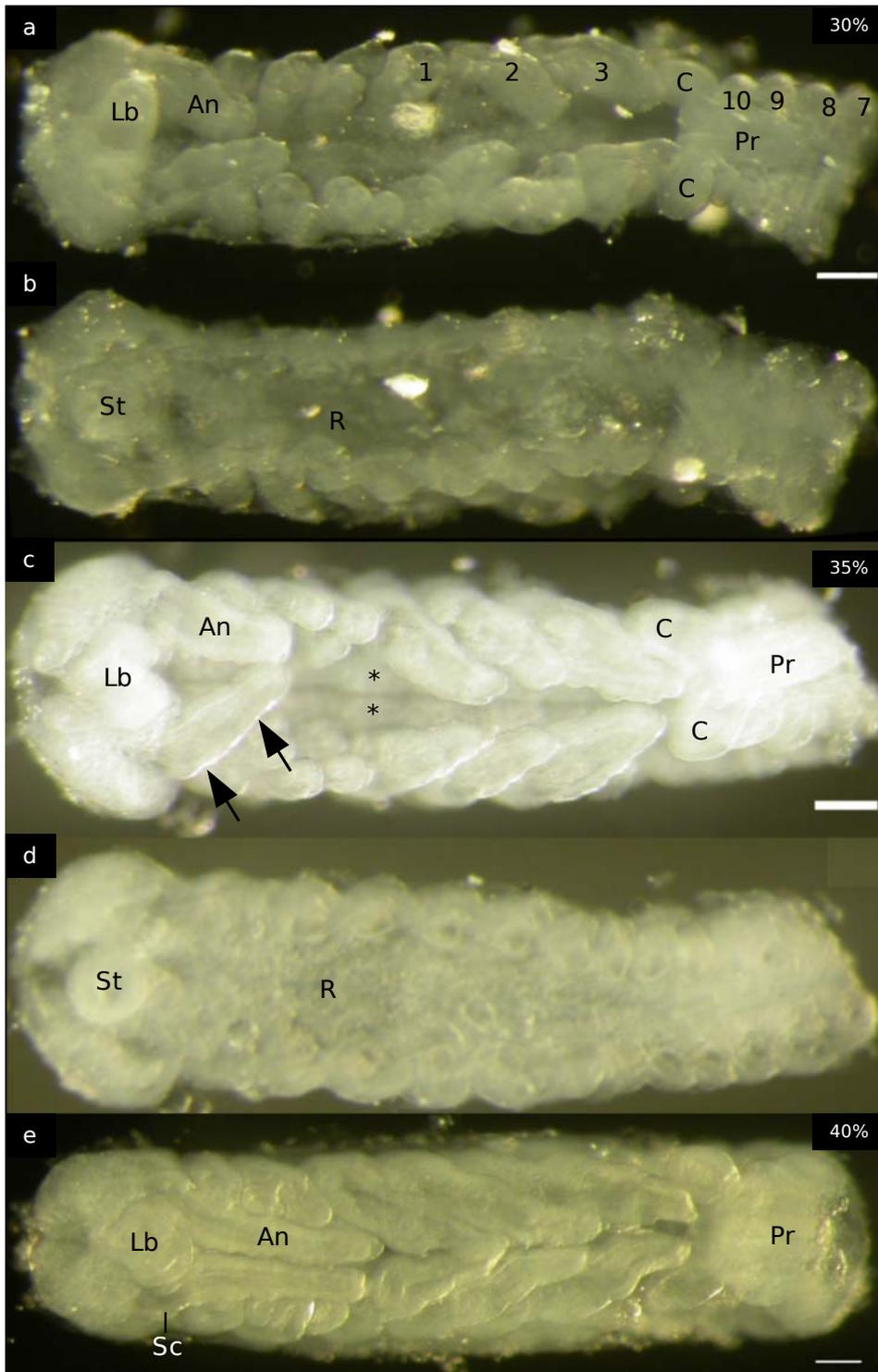


Abb. 3.1.7: Fotografien der Grillenembryonen in 30% (a und b), in 35% (c und d) und in 40% (e) der Embryogenese. **a:** Ein 30%-iger Embryo in ventraler Ansicht. 1-3: drei Beinpaare; 7-10: Abdominalsegmente. **b:** Der 30%-ige Embryo in dorsaler Ansicht. **c:** Ein 35%-iger Embryo in ventraler Ansicht. Die beginnende Segmentierung der Antenne (Pfeile). **d:** Der 35%-ige Embryo in dorsaler Ansicht. **e:** Ein 40%-iger Embryo in ventraler Ansicht. Das erste Antennenbasissegment ist zu sehen (Sc: Scapus). An: Antennenanlage; C: Cerci; Pr: Proctodaeum; R: Rückseite der Embryonen; St: Stomodaeum; Sterne: rechte und linke Hälfte des Prothorakalganglions. Maßstab: 100 µm.

35% der Embryogenese

Der Embryo ist immer noch in der Amnionhülle und liegt tief im Dotter. In der Abbildung 3.1.7c ist eine Fotografie eines 35%-igen Embryonen in ventraler Ansicht zu sehen (in d: in dorsaler Ansicht). Die Rückseite (R) des Embryonen ist weiterhin offen (Abb. 3.1.7d, R). Auf der dorsalen Seite des Embryonen sieht man den Anfang des Stomodaeums. Am siebten Abdominalsegment bleibt das Abdomen noch nach vorne geklappt. Jetzt beginnt die Segmentierung der Antenne (An). Der Anfang der drei Antennensegmentgrenzen in der Antennenanlage ist zu sehen (Abb. 3.1.7c, Pfeile). Die Beinanlagen werden weiter differenziert. Alle Extremitätenanlagen nehmen in der Länge zu. Das Proctodaeum ist bis zur posterioren Grenze des siebten Abdominalsegments invaginiert. Die Thorakalganglien (G) sind, da sie nun kompakter sind, deutlicher zu erkennen.

40% der Embryogenese

Bei 40% der Embryogenese liegt der Embryo näher an der Ei-Oberfläche. Die Antennen und die Spitzen der Beine sind von außen zu sehen. Die Rückseite des Embryonen ist nach wie vor offen. Der Embryo ist nur noch bis zur Mitte des Körpers in der Amnionhülle, wo die mesothorakalen Beine sind. An dem posterioren Ende des Eies befindet sich der Kopf des Embryonen und man sieht eine Lücke zwischen der Amnionhülle und dem Kopf (40- 43%). In der Abbildung 3.1.7e ist eine Fotografie eines 40%-igen Embryonen in ventraler Ansicht zu sehen. Der Embryo nimmt in der Breite zu und die Extremitätenanlagen sind weiter verlängert. Ab 40% der Embryogenese ist das erste Antennensegment, der Scapus (Sc), deutlich zu erkennen und in der restlichen Antenne setzt sich die Segmentierung fort. Die Segmentgrenzen der Beine sind in der Epidermisschicht zu sehen. Ab ca. 43% der Embryogenese beginnt die dorsale Schließung der Körperwand am posterioren Ende des Embryonen und geht zum anterioren Ende des Embryonen weiter, in dem der Dotter in das Abdomen

eingeschlossen wird. Zwischen 40% und 45% wandert der Embryo um den posterioren Pol zur Dorsalenseite des Eies (Umrollung). Während der Umrollung des Embryonen geht die Krümmung des Abdomens auf. Das Proctodaeum hat bis zum siebten Abdominalsegment invaginiert. Die Cerci (C) liegen seitlich vom Proctodaeum.

45% der Embryogenese

Die Umrollung des Embryonen ist abgeschlossen. Der Embryo ist ausgestreckt. Das Kopfende des Embryonen zeigt zum anterioren und das Abdomen zum posterioren Pol des Eies. Der Embryo erstreckt sich vom posterioren Pol bis über die Hälfte des Eies. Das Ei ist weniger als die Hälfte der Eilänge mit Dotter ausgefüllt. In der Abbildung 3.1.8a ist eine Fotografie eines 45%-igen Embryonen in seitlicher Ansicht zu sehen. Der Dotter (D) befindet sich anterior und dorsal des Kopfes des Embryonen. Auf der dorsalen Seite des Körpers ist der Dotter von der Amnionhülle umschlossen. In diesem Stadium ist das Größenverhältnis zwischen dem Embryo und dem Dotter 3: 2 (Länge). Ab diesem Zeitraum nehmen die Antennen ganz schnell in der Länge zu. Die fünf Segmentgrenzen der Antennen sind in der Epidermisschicht zu sehen (Pfeilspitzen: Abb. 3.1.8a). Der Embryo ist im Bereich der letzten vier abdominalen Segmente bei 45% der Embryogenese am Abdomen geschlossen. Während der dorsalen Schließung wächst das Gewebe von beiden Körperseiten zur Mitte der Rückseite des Körpers hin und schließt an der dorsalen Mittellinie. Dann beobachtet man peristaltische Bewegung der Flanken der Körperwand (hier genannt als Bewegung des Gewebes I), beginnend vom siebten Abdominalsegment Richtung anteriores Ende des Embryonen. Die Pigmentierung der Augen beginnt in diesem Stadium. Das Stomodaeum wächst nach posterior im Embryo. Das Proctodaeum wächst anterior zum siebten Abdominalsegment. Die Cerci (C) liegen nahe nebeneinander und sind nicht mehr lappenförmig sondern spitzer geworden. Die Katatrepsis soll bei 45% der Embryogenese abgeschlossen sein. Katatrepsis ist wieder Verschmelzung der Embryo mit dem Blastoderm (Serosa) (Wheeler, 1893).

Der Embryo ist bei 45% der Embryogenese nicht mehr in der Amnionhülle.
Die ventrale Seite des Embryonen liegt wieder auf der ventralen Seite des Eies.

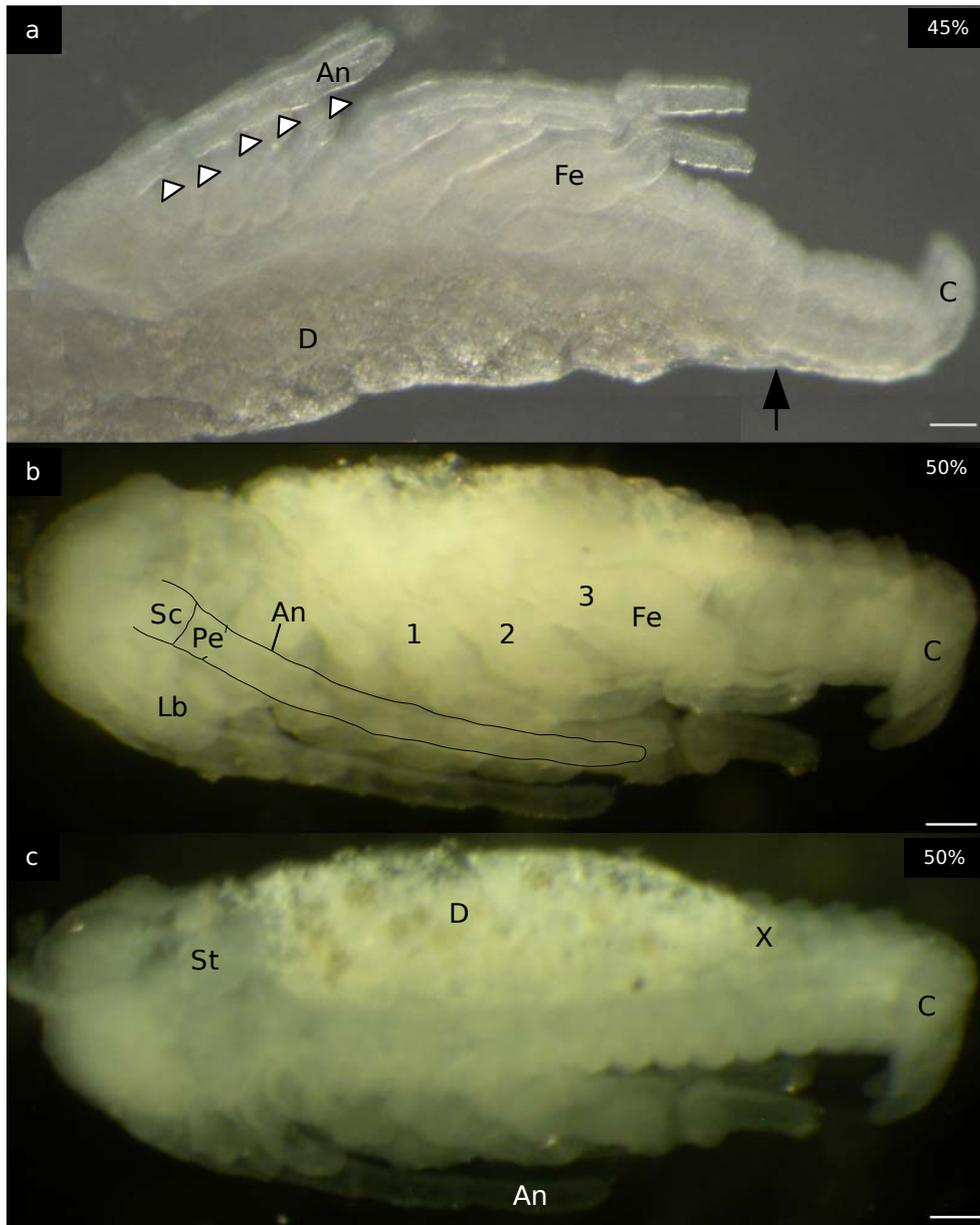


Abb. 3.1.8: Fotografien der Grillenembryonen von 45% bis 50% der Embryogenese. **a:** Ein 45%-iger Embryo ist in seitlicher Ansicht zu sehen. Die Antennen sind segmentiert. Die Segmentgrenzen sind erkennbar (Pfeilspitzen). Der Rückenschluß beginnt (großer Pfeil). **b** und **c:** Ein 50%-iger Embryo in ventraler und dorsaler Ansicht. Die ersten beiden Antennensegmente, Scapus (Sc) und Pedicellus (Pe) sind gut erkennbar. 1-3: drei Beinpaare; „X“: Stelle des Rückenschlusses.

An: Antennenanlage; C: Cerci; D: Dotter; Fe: Femur; Lb: Labrum; St: Stomodaeum. Maßstab: 100 µm.

50% der Embryogenese

Der Dotter füllt $\frac{1}{3}$ und der Embryo $\frac{2}{3}$ des Eies aus. In der Abbildung 3.1.8b ist eine Fotografie eines 50%-igen Embryonen (in c: in dorsaler Ansicht) zu sehen. Der Embryo ist hinten am Kopf offen und hat dort Verbindung mit dem Dotter (D). Der Dotter dorsal des Embryonen ist von der Amnionhülle eingeschlossen und füllt den Darm. Alle Extremitätenanlagen sind verlängert. Die ersten beiden Antennensegmente, Scapus (Sc) und Pedicellus (Pe), sind gut erkennbar. Die Grenze zwischen diesen beiden Segmenten ist deutlich. Die Spitze der Antennen hat fast die Spitze der zweiten Beinpaare erreicht. Die Cerci (C) wachsen weiter in die Länge und werden immer spitzer. Deutlich ist die Pigmentierung der Augen erkennbar. Das Stomodeum (St) reicht bis zum prothorakalen Bein (das erste Beinpaar). Das Proctodaeum reicht bis zum sechsten abdominalen Segment. Die peristaltische Bewegung der Flanken der Körperwand (Bewegung des Gewebes I), beginnend vom siebten Abdominalsegment Richtung anteriores Ende des Embryonen, beobachtet man weiter bei 50% der Embryogenese.

55% der Embryogenese

Der Dotter füllt $\frac{1}{3}$ und der Embryo $\frac{2}{3}$ des Eies aus. In der Abbildung 3.1.9a ist eine Fotografie eines 55%-igen Embryonen (in b: in seitlicher Ansicht) zu sehen. Die Rückseite des Embryonen ist bis zum Prothorax geschlossen. Der Embryo ist hinten am Kopf offen und hat dort Verbindung mit dem Dotter. Der Dotter dorsal des Embryonen ist in den Darm eingeschlossen. Auf der Rückseite des Embryonen sind die Körpersegmente zu erkennen (Abb. 3.1.9a und b, Pfeile). Zwischen 50% und 55% der Embryogenese nehmen die Cerci (C) schnell an Länge zu. Das Femur-Tibia-Gelenk befindet sich zwischen 55% und 70% der Embryogenese ungefähr dort, wo das vierte Abdominalsegment ist. Der Femur des dritten Beines ist im Verhältnis zu den anderen dicker. Dieses Bein hat eine s-förmige Krümmung. Auf der Rückseite hat der Embryo

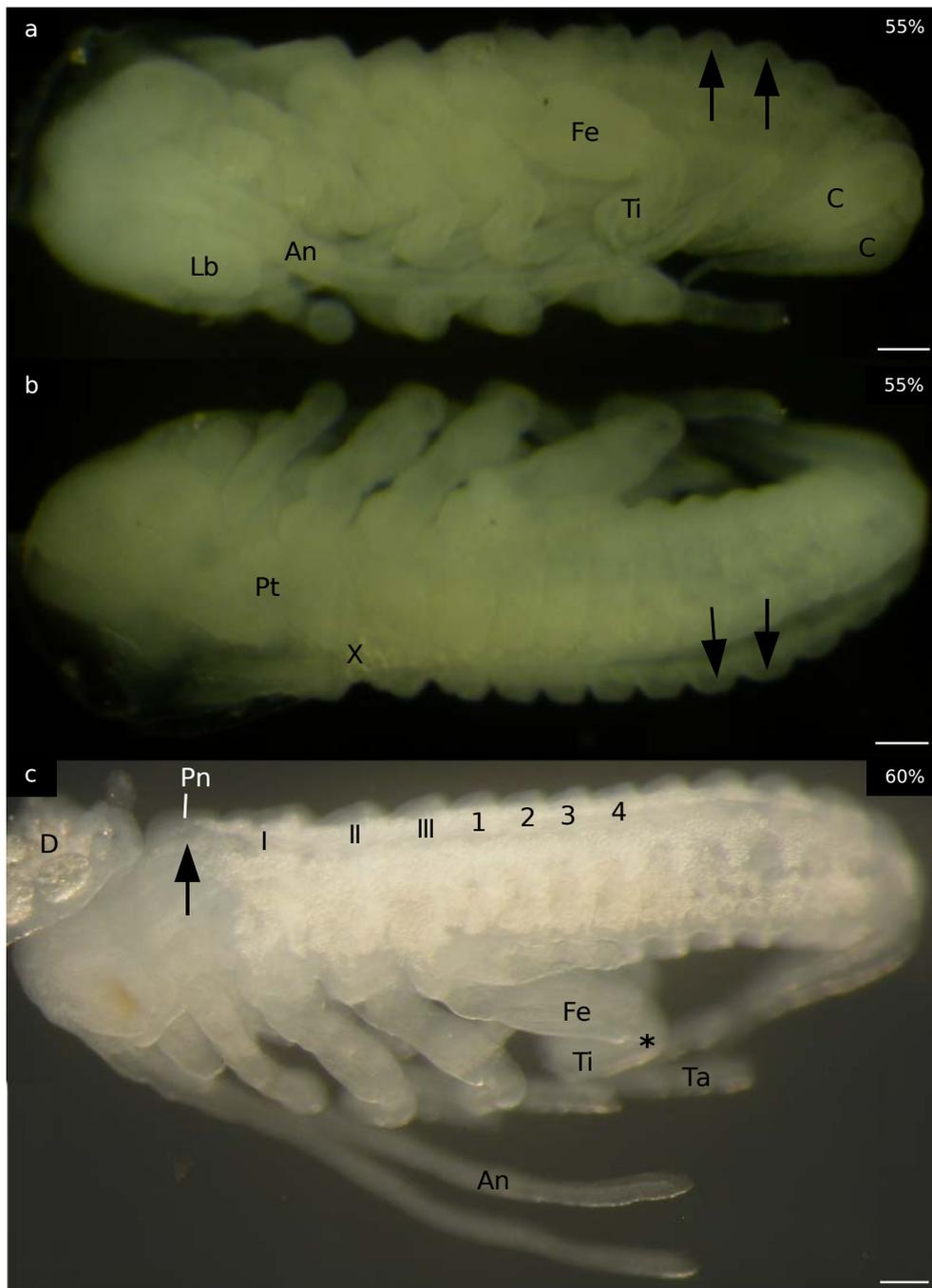


Abb. 3.1.9: Fotografien der Grillenembryonen von 55% bis 60% der Embryogenese. **a** und **b**: Ein 55%-iger Embryo in seitlicher Ansicht. Körpersegmente sind zu erkennen (Pfeile); Pt: Prothorax; „X“: Stelle des Rückenschlusses. **c**: Ein 60%-iger Embryo ist in seitlicher Ansicht zu sehen. Kopf ist noch offen und Dotter (D) ist zu sehen. Gewebebewegung wird im Bereich des Pronotum (Pn) beobachtet (Pfeil). Stern: das Femur-Tibia-Gelenk des dritten Beines; Tarsus: Tarsus; 1-4: Abdominalsegmente; I-III: drei Thoraxsegmente. An: Antennenanlage; C: Cerci; Fe: Femur; Lb: Labrum; Ta: Tarsus; Ti: Tibia. Maßstab: 100 µm.

weiße Fettkörper. Das Abdomen wächst weiter in die Länge. Die peristaltische Bewegung des Gewebes I, beginnend vom siebten Abdominalsegment Richtung anteriores Ende des Embryonen, beobachtet man weiter bei 55% der Embryogenese.

60% der Embryogenese

Der Dotter nimmt $\frac{1}{4}$ und der Embryo $\frac{3}{4}$ des Eies ein. In der Abbildung 3.1.9c ist eine Fotografie eines 60%-igen Embryonen zu sehen. In diesem Stadium ist der Embryo lediglich am Kopf offen (Abb. 3.1.9c, D). Die Spitzen der Antennen befinden sich jetzt in der Höhe der Spitzen des Tarsus (Ta) des dritten Beines. Nach anterior setzt sich die Pigmentierung der Augen fort. Das Femur-Tibia-Gelenk des dritten Beinpaars (Stern) befindet sich in der Nähe des vierten Abdominalsegmentes. Der Femur aller drei Beine ist verlängert und hat nicht mehr die geschwollene Form, die bei 50% und 55% der Embryogenese zu sehen ist. Die Spitzen der Cerci berühren den Femur (Fe) des dritten Beines.

In diesem Stadium werden Bewegungen des Gewebes im Bereich des Pronotum (Pn) beobachtet (hier genannt als Bewegungen des Gewebes II) (Abb. 3.1.9c, Pfeil). An der Stelle der Rückenschließung sind diese langsamen Bewegungen von beiden Seiten zur Mittellinie hin zu sehen. Diese Bewegung beginnt bei 60% der Embryogenese und setzt sich bis 95% der Embryogenese fort.

Weißer Fettkörper auf der Rückseite des Embryonen vermehren sich ab 60% der Embryogenese.

65% der Embryogenese

Es befindet sich kein Dotter mehr im Ei. Eine Fotografie eines 65%-igen Embryonen ist in der Abbildung 3.1.10a zu sehen. Der Embryo ist geschlossen. Der ganze Dotter befindet sich im Darm des Embryonen. Der Dotter ist gelb. Man sieht den Dotter vom posterioren Ende des Embryonen bis zum Prothorax (Pt) auf der dorsalen Seite des Embryonen.

Zwischen 65%-80% der Embryogenese ist der Prothorax frei vom Dotter. Die Pigmentierung der Augen ist deutlich stärker geworden. Die Antennen (An) liegen unter den Beinen. Im Prothorax an der Stelle der Rückenschließung sind Bewegungen von beiden Körperseiten zur Mittellinie hin zu beobachten (Bewegungen des Gewebes II). Sie sind ein bisschen schneller als die Bewegungen bei 60% der Embryogenese. Zusätzlich zur Gewebebewegung (Bewegungen des Gewebes I und II) sind peristaltische Darmbewegungen zu beobachten. Der Körper des Embryonen ist noch nicht pigmentiert.

70% der Embryogenese

Der Embryo füllt das ganze Ei aus. In der Abbildung 3.1.10b ist eine Fotografie eines 70%-igen Embryonen in seitlicher Ansicht zu sehen. In diesem Stadium sieht man den Dotter im Darm bis zum Prothorax und er ist gelb. Ab 70% der Embryogenese beginnt die Pigmentierung des Embryonen auf dem zweiten Antennensegment, dem Pedicellus (Pe), und auf dem ersten Flagellumsegment (1. Fs) ist eine leichte Pigmentierung zu sehen. Das Femur-Tibia-Gelenk des dritten Beinpaars (Stern) befindet sich im Bereich des vierten Abdominalsegmentes. Dorsal des Kopfes sieht man die Stelle, an der der Darm geschlossen ist („+“), nachdem der Dotter in den Darm eingeschlossen wurde. In diesem Stadium erkennt man eine Schwellung (Pfeil) am Pronotum (Pn) auf der dorsalen Seite. Die Pigmentierung (p) der Augen hat eine für dieses Stadium typische Strukturierung. Die Pigmentierung ist mittig in der Augenplatte zu sehen. (siehe Abb. 3.10b, A).

75% der Embryogenese

Das Ei ist vom Embryo erfüllt. In der Abbildung 3.1.10c ist eine Fotografie eines 75%-igen Embryonen in ventraler Ansicht zu sehen. Man sieht den Dotter im Darm bis zum Prothorax und er ist gelb. Auf dem ersten Antennensegment, dem Scapus (Sc), auf dem Kopf und auf den

Cercianlagen ist eine leichte Pigmentierung zu sehen. Die Chitinisation (Ch) des Labrums (Lb) hat am rechten und linken Rand begonnen. Zwischen 75% und 95% der Embryogenese befindet sich das Femur-Tibia Gelenk des dritten Beinpaars (Stern) in der Höhe des sechsten Abdominalsegmentes. Der Femur nimmt weiter an Länge zu. Ab 75% der Embryogenese sind Gewebe- und Darmbewegung deutlich langsamer geworden. Die sekundäre Kutikula ist vorhanden.

80% der Embryogenese

In diesem Stadium sieht man den Dotter im Darm auf der Rückseite des Embryonen bis zum Prothorax. Der Dotter ist ab diesem Stadium grün. Eine Fotografie eines 80%-igen Embryonen in seitlicher Ansicht ist in der Abbildung 3.1.10d zu sehen. Auf dem Körper des Embryonen ist eine leichte Pigmentierung zu sehen. Ab 80% der Embryogenese nimmt die Pigmentierung auf der Körperoberfläche, dem Kopf, der Antennen und den Cerci zu. Die Kaufläche der Mandibel beginnt, Form anzunehmen. Ab diesem Stadium sieht man auf dem Kopf des Embryonen eine helmartige Struktur (H).

85% der Embryogenese

Ein Beispiel für dieses Stadium ist in der Abbildung 3.1.11a in seitlicher Ansicht zu sehen. Zwischen 85% und 90% der Embryogenese ist der Dotter auf der Rückseite des Embryonen zwischen dem Metathorax (Mt) und dem siebten Abdominalsegment sichtbar. Die bisherige Pigmentierung ist stärker geworden, besonders auf dem Kopf und den Cerci. Die Augen sind stark pigmentiert, die Kaufläche (K) der Mandibel (M) hingegen leicht. An den Ansatzstellen der Beine ist ebenfalls eine Pigmentierung zu erkennen. Auf dem Kopf sieht man die Ocellen (O).

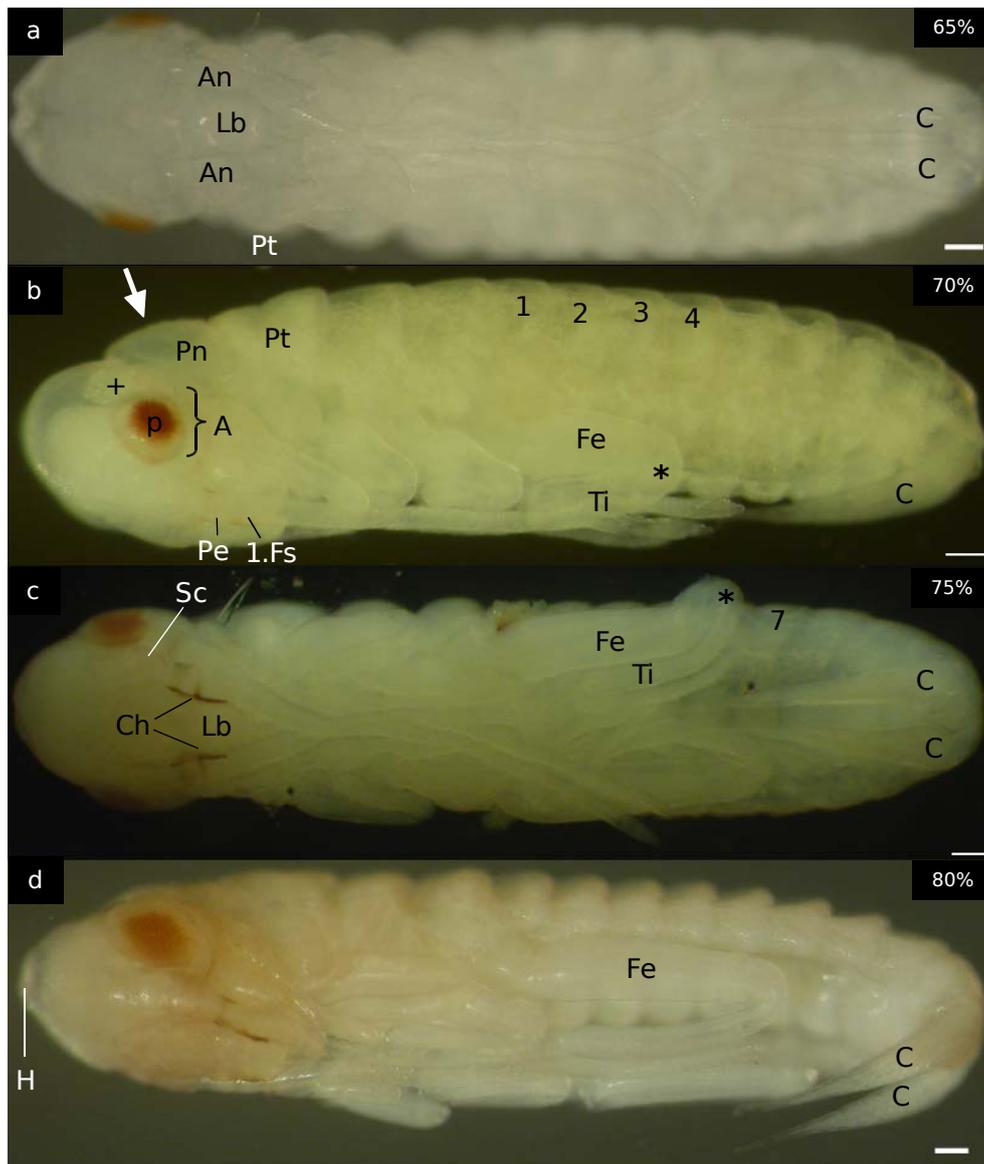


Abb. 3.1.10: Fotografien der Grillenembryonen von 65% bis 80% der Embryogenese. **a:** Ein 65%-iger Embryo in ventraler Ansicht. **b:** Ein 70%-iger Embryo in seitlicher Ansicht. „+“: Stelle der Schließung des Darmes. **c:** Ein 75%-iger Embryo in ventraler Ansicht. **d:** Ein 80%-iger Embryo. A: Augenplak; An: Antennenanlage; C: Cerci; Ch: Chitinisation des Labrums; Fe: Femur; H: helmartige Struktur; Lb: Labrum; Pn: Pronotum; Pt: Prothorax; Sc: Scapus; Stern: das Femur-Tibia-Gelenk des dritten Beines. Maßstab: 100 µm.

90% der Embryogenese

Eine Fotografie eines 90%-igen Embryonen ist in der Abbildung 3.1.11b zu sehen. Die Kaufläche der Mandibel ist stärker pigmentiert. Die Pigmentierung auf dem ganzen Körper verstärkt sich. Die ersten Haare sind auf den Beinen und den Cerci zu sehen. Auf dem Femur des dritten Beines, in der Nähe des Femur-Tibia Gelenkes, ist ein grauer Fleck (im Kreis) zu erkennen.

95% der Embryogenese

Der Embryo füllt fast das gesamte Ei aus. Eine Fotografie eines 95%-igen Embryonen ist in der Abbildung 3.1.11c zu sehen. Die Pigmentierung der Augen ist abgeschlossen. Auf der gesamten Körper- und Antennenoberfläche des Embryonen befinden sich Haare. Es ist immer noch ein wenig Dotter im Darm des Embryonen zu erkennen. Dieser ist grün und auf der Rückseite des Embryonen zwischen dem zweiten und fünften Abdominalsegment zu sehen. Man erkennt die erste Kutikula (Pfeil) auf der Körperoberfläche des Embryonen, die dem Embryo während des Schlupfes verloren geht.

Schlupf

Der Embryo häutet sich während des Schlupfes. Die Kutikula des frisch geschlüpften Embryonen ist weiß und wird in der ersten halbe Stunde nach dem Schlupf grau (Ausfärbung der Kutikula). Nach einer Stunde ist die Kutikula schwarz. Der frisch geschlüpfte Embryo hat 31 Annuli in der Antenne.

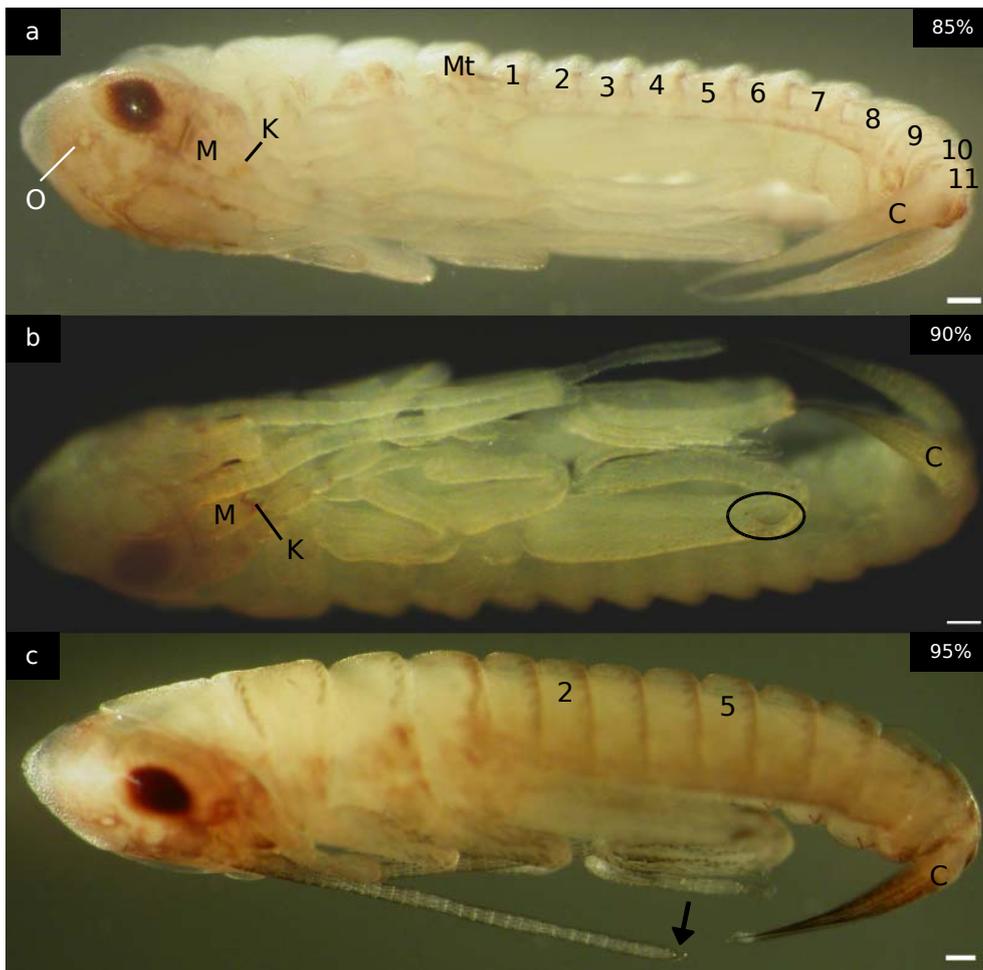


Abb. 3.1.11: Fotografien der Grillenembryonen von 85% bis 95% der Embryogenese. **a:** Ein 85%-iger Embryo. Die Ocellen (O) sind zu erkennen. Die Kauffläche (K) des Mandibels (M) ist pigmentiert. **b:** Ein 90%-iger Embryo in ventraler Ansicht. Ein grauer Fleck (im Kreis) ist auf dem Femur (Fe) zu sehen. **c:** Ein 95%-iger Embryo in seitlicher Ansicht. Der Embryo hat überall Haare auf dem Körper. Pfeil: Kutikula.
 An: Antennenanlage; C: Cerci; K: Kauffläche des Mandibels (M); Mt: Metathorax; 1-11: Abdominalsegmente. Maßstab: 100 µm.

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Stadien zwischen 25% und 95% der Embryogenese jeweils mit typischen äußerlichen morphologischen und physiologischen Merkmalen zusammengefasst.

Tabelle 3.1.2 Für jedes Stadium typische, äußerliche morphologische und physiologische Merkmale der Grillenembryonen zwischen 25% und 95% der Embryogenese. Die Entwicklung wird in 15 Stadien gegliedert. Jedes Stadium stellt 5% der gesamten Entwicklungsdauer dar.

Alter der Embryonen [%]	Merkmale
25	Der Embryo ist vollständig segmentiert. Alle Anlagen der Extremitäten sind zu erkennen: Antennen, Labrum, Mandibel, erste und zweite Maxillen und alle Beine. Das Stomodaeum und das Proctodaeum invaginieren. Das Abdomen an der Stelle des siebten Segments ist nach dorsal gefaltet. Die Segmentierung der Beine und der ersten und zweiten Maxillen beginnt.
30	Die Anlagen aller Extremitäten sind verlängert. Die Körperknospen am Abdomen sind deutlich zu erkennen. Das Abdomen ist am siebten Segment nach vorne geklappt.
35	Die Segmentierung der Antenne beginnt. Der Anfang der drei Antennensegmentgrenzen ist zu sehen. Die Rückseite des Embryonen ist immer noch offen. Das Abdomen ist am siebten Segments nach vorne geklappt.
40	Der Embryo nimmt in der Breite zu und die Extremitätenanlagen sind weiter gewachsen. Das erste Antennensegment, der Scapus, ist deutlich zu erkennen. Ab diesem Stadium findet die Umrollung des Embryonen statt. Das Abdomen ist am siebten Segment nach vorne geklappt.
45	Die Umrollung des Embryonen ist abgeschlossen. Der Körper ist ausgestreckt. Der Kopf des Embryonen zeigt zum anterioren Pol im Ei. Fünf Segmentgrenzen in der Antenne sind zu erkennen. Ab diesem Stadium nimmt die Länge der Antennenanlage besonders schnell zu. Der Rückenschluß des Embryonen vollzieht sich beginnend vom posterioren Ende des Embryonen. Man beobachtet peristaltische Bewegung der Flanken der Körperwand (Bewegung des Gewebes I), beginnend vom siebten Abdominalsegment Richtung anteriores Ende des Embryonen. Die Pigmentierung der Augen beginnt.

Alter der Embryonen [%]	Merkmale
50	Die Pigmentierung der Augen ist deutlich erkennbar. Die ersten beiden Antennensegmente, Scapus und Pedicellus, sind gut erkennbar. Das Stomodeum reicht bis zum prothorakalen Bein. Das Proctodaeum reicht bis zum sechsten abdominalen Segment. Der Darm beginnt, den Dotter einzuschließen.
55	Die Rückseite des Embryonen ist bis zum Prothorax geschlossen. Das Femur-Tibia-Gelenk des dritten Beines erreicht das vierte Abdominalsegment. Die Cerci sind verlängert und spitz. Auf der Rückseite hat der Embryo weiße Fettkörper.
60	Der Embryo ist nur noch am Kopf offen. Der Femur aller drei Beine ist verlängert. Die Spitze der Antenne reicht bis zur Spitze des Tarsus des dritten Beines. Langsame Bewegungen sind an der Stelle des Rückenschlusses zu sehen, wo sich das Pronotum befindet (Bewegungen des Gewebes II).
65	Der Rückenschluß des Embryonen ist abgeschlossen. Der ganze Dotter wird vom Darm des Embryonen eingeschlossen. Die peristaltischen Darmbewegungen sind zu beobachten. Der Körper des Embryonen ist noch nicht pigmentiert.
70	Leichte Pigmentierung auf dem zweiten Antennensegment, dem Pedicellus, und auf dem ersten Flagellumsegment ist zu sehen. Die für dieses Stadium typische Strukturierung der Pigmentierung der Augen und die Schwellung am Hinterkopf ist zu sehen.

Alter der Embryonen [%]	Merkmale
75	Leichte Pigmentierung ist auf dem ersten Antennensegment, dem Scapus, auf dem Gesicht und auf den Cercianlagen zu sehen. Die Chitinisation des Labrums hat am rechten und linken Rand des Labrums begonnen. Das Femur-Tibia Gelenk des dritten Beines erreicht das sechste Abdominalsegment.
80	Leichte Pigmentierung ist auf dem Körper zu sehen. Die Kaufläche des Mandibels nimmt Gestalt an. Auf dem Kopf des Embryonen ist eine helmartige Struktur zu sehen.
85	Die bisherige Pigmentierung ist stärker geworden. An den Ansatzstellen der Beinanlagen ist die Pigmentierung zu sehen. Die Kaufläche des Mandibels ist leicht pigmentiert. Die Ocellen sind zu erkennen.
90	Die Kaufläche des Mandibels ist stärker pigmentiert. Die ersten Haare sind auf den Beinen und den Cerci des Embryonen zu sehen. Auf dem Femur des dritten Beines in der Nähe des Femur-Tibia Gelenks ist ein grauer Fleck zu sehen.
95	Der Embryo hat überall Haare auf dem Körper. Die Pigmentierung der Auge ist vollständig.

3.2 Die Entwicklung der antennalen sensorischen Neurone

Um das raum-zeitliche Entstehungsmuster der mechanosensorischen Neurone der Antennenbasis aufzuklären, wurden die sensorischen Neurone der Grillenantennen mit Hilfe neuron-spezifischer Immunfärbungen gegen Meerrettich-Peroxidase (HRP) gefärbt (Jan und Jan, 1982; Snow et al., 1987) (siehe Material und Methoden Kapitel 2.6.1). Im Folgenden wird die Entwicklung der peripheren Bahn in den Antennen der Grillenembryonen beschrieben. Das Entstehungsmuster der sensorischen Neurone in der ganzen Antenne wird zwischen 30% und 55%, das der basalen Mechanorezeptoren in der Antennenbasis zwischen 60% und 75% der Embryogenese aufgeklärt. Der Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Grillenembryonen und der Anzahl der sensorischen Neurone in den Antennen wird bis zur Hälfte der Entwicklung anhand von Tabellen und Grafiken gezeigt. Für die Beschreibung des Achsensystems siehe Material und Methoden, Kapitel 2.1.

3.2.1 Nomenklatur

Die Nomenklatur, die hier für die individuellen Pionierneurone verwendet wird, hergeleitet aus der Arbeit von Ho und Goodman (1982) und von Boyan und Williams (2004), wurde in dieser Arbeit modifiziert. Die Reihenfolge des Auftretens der ventralen Pionierneurone wird hier mit in Betracht gezogen. Die ventralen Pionierneurone werden als vPN1 und vPN2 bezeichnet. Für die dorsalen Pionierneurone werden die Abkürzung, dPN, und für die basalen Pionierneurone die Abkürzung, bPN verwendet.

3.2.2 Die Entwicklung der peripheren Bahn in den embryonalen Antennen der Grillen

Um die Neurogenese und die Entwicklung der peripheren Bahn in den embryonalen Antennen der Grillen zu untersuchen, wurden sich differenzierende antennale Pionierneurone mit einem neuron-spezifischen anti-HRP Antikörper gefärbt. Diese Methode erlaubt eine zuverlässige Identifizierung der Pionierneurone (Bentley und Caudy, 1983; Pflüger und Kutsch, 1987; Seidel und Bicker, 2000; Boyan und Williams, 2004).

In den Antennen der Grillenembryonen befinden sich keine sensorischen Neurone bis ca. 30% der Embryogenese. Die ersten Neurone in der Antenne, die in ca. 30% der Embryogenese HRP-immunopositiv sind, sind die paarigen Pionierneurone der embryonalen Antenne (Bate, 1976; Ho und Goodman, 1982; Boyan und Williams, 2004). Diese Pionierneurone bilden, als die ersten überhaupt, Axone in den embryonalen Antennen der Grillen. Die Axone dieser Neurone sind es, welche die erste Verbindungsbahn zum Zentralnervensystem aufbauen. Diese paarigen Pionierneurone differenzieren sich ventral, in der Spitze der Grillenantenne, in ca. 30% der Embryogenese und werden als vPN1 (die ersten ventralen Pionierneurone) bezeichnet. In der Abbildung 3.2.1a sind diese Pionierneurone (vPN1) in den Antennen eines 33%-igen Embryos zu sehen. Ihre Axone sind mit einem offenen weißen Pfeil markiert. In diesem Stadium liegen die Zellkörper dieser paarigen Pionierneurone (vPN1) nebeneinander und auf der lateralen Seite der Antenne (Abb. 3.2.1b, Sterne). Ab ca. 35% der Embryogenese gehen die Zellkörper der Pionierneurone auseinander (Abb. 3.2.2a und b, Sterne). In dieser Arbeit wird vPN1 bei Stadien älter als 50% der Embryogenese nicht berücksichtigt. Die Axone der vPN1 laufen proximal in Richtung zum Oberschlundganglion (Abb. 3.2.1a, offener weißer Pfeil). In der Abbildung 3.2.1b sieht man die Filopodien (F) der vPN1. In der gleichen Zeit ist ein Zellkörper von einem Neuron in der Antennenbasis zu erkennen, der das basale Pionierneuron (bPN) der embryonalen Antenne ist (33%; Abb. 3.2.1a, 35%; Abb. 3.2.2c, bPN).

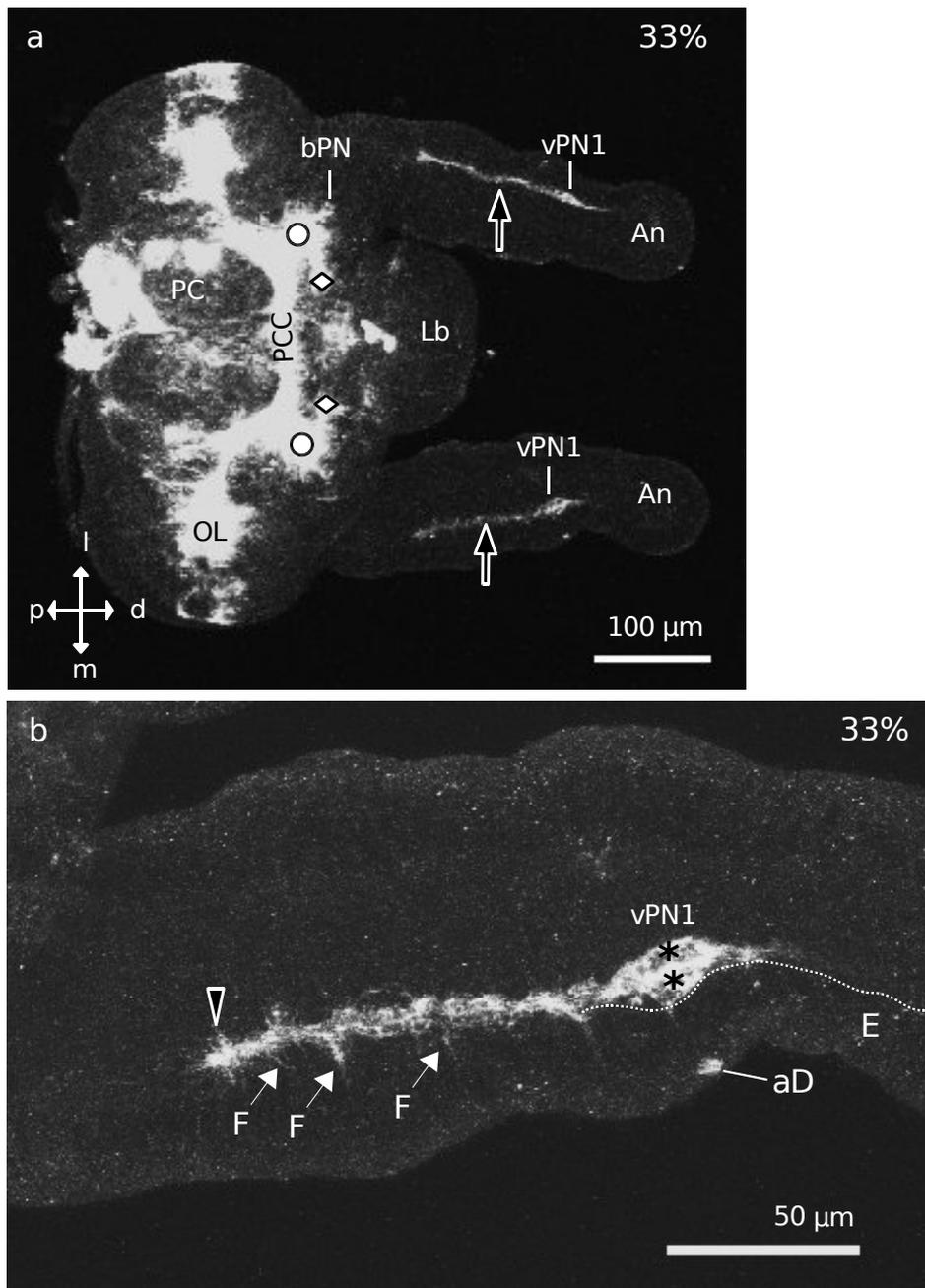


Abb. 3.2.1: HRP-Immunhistochemie. Ganzpräparat. Z-Projektionen. **a:** Konfokale Fotografie des Kopfes eines 33%-igen Grillenembryonen. Erste ventrale Pionierneurone (vPN1) mit ihren Axonen (offene weiße Pfeile) in den Antennen und die basalen Pionierneurone (bPN) sind zu sehen. **b:** Ausschnittsvergrößerung der ventralen Pionierneurone (vPN1) mit ihren Axonen.

aD: apikaler Dendrit einer sensorischen Zelle; An: Antenne; d: distal; E: Epithelschicht; F: Filopodien; Kreis: Deutocerebrum; l: lateral; Lb: Labrum; offene weiße Pfeilspitze: Wachstumskegel mit Filopodien; m: medial; OL: optischer Lobus; PC: Protocerebrum; PCC: Protocerebralkommissur; p: proximal; Raute: Tritocerebrum; Sterne: Zellkörper der ventralen Pionierneurone (vPN1).

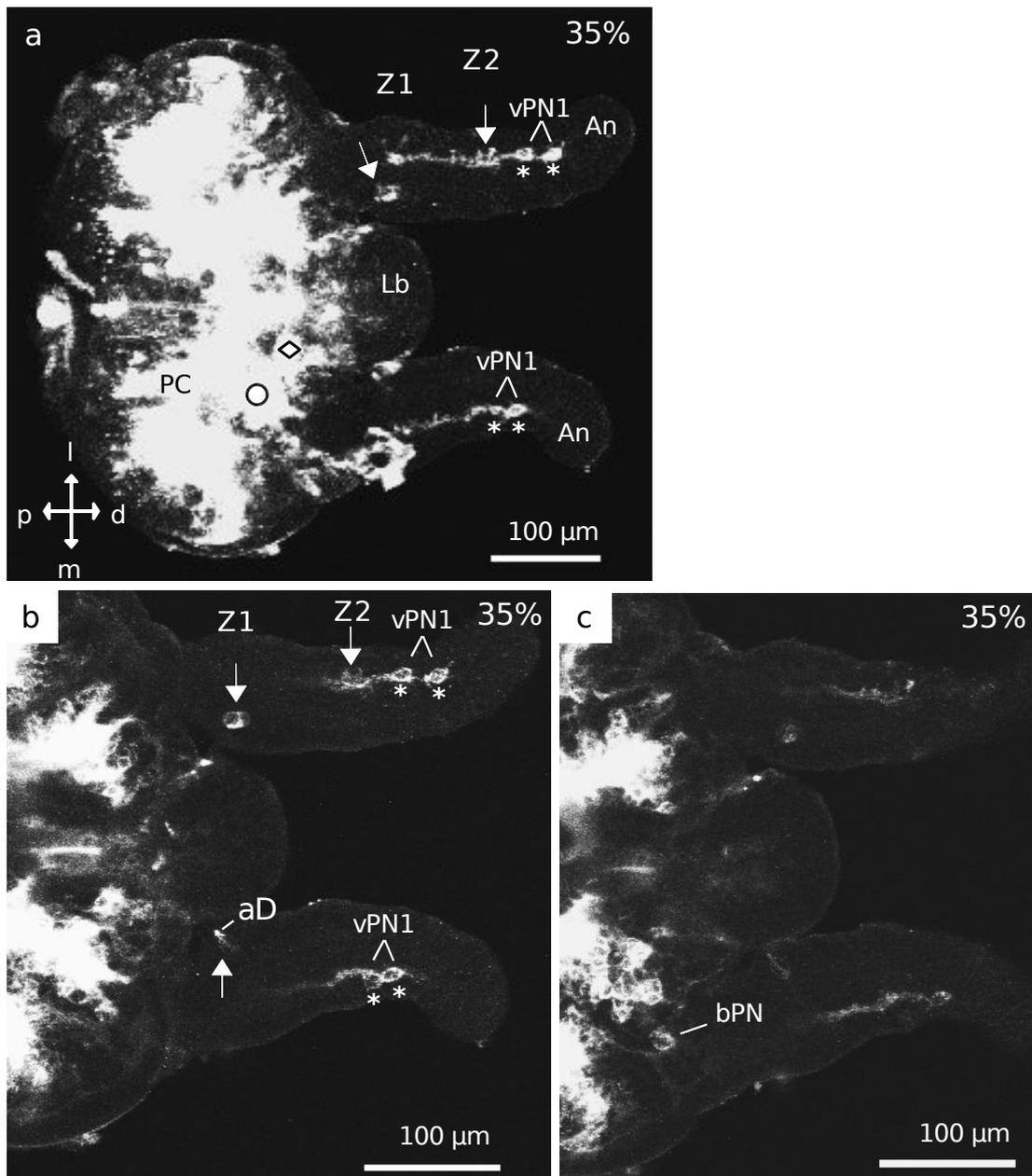


Abb. 3.2.2: HRP-Immunhistochemie. Ganzpräparat. Z-Projektionen. **a:** Konfokale Fotografie des Kopfes eines 35%-igen Embryonen. Die ersten Pionierneurone (vPN1), die ersten sensorischen Neurone (weiße Pfeile) in Zellbildungszone Z1 und Z2 in den Antennen sind zu sehen. **b** und **c:** Die Antennen sind in der höheren Vergrößerung. Ein basales Pionierneuron (bPN) ist in der Antennenbasis in „c“ zu sehen.

aD: apikaler Dendrit einer sensorischen Zelle; An: Antenne; d: distal; Kreis: Deutocerebrum; l: lateral; Lb: Labrum; m: medial; PC: Protocerebrum; p: proximal; Raute: Tritocerebrum; Sterne: Zellkörper der ventralen Pionierneurone (vPN1).

Die Wachstumskegel der ventralen Pionierneurone (vPN1) mit Filopodien erstrecken sich entlang der inneren Fläche des antennalen Epithels und erreichen die basalen Pionierneurone (bPN) bei ca. 37% der Embryogenese (Abb. 3.2.3b, offene weiße Pfeilspitze). Die deutocerebralen Motoneurone differenzieren sich vermutlich vor ca. 37% der Embryogenese, da die Axone mit Ihren Wachstumskegeln und Filopodien von Motoneuronen ventral in dem ersten Antennensegment in ca. 37% der Embryogenese zu erkennen sind. Dieses axonale Bündel ist der anfängliche Nerve 2 und 3 und wird hier als ventraler Nerv (vN) bezeichnet. Das Bündel ist anterior von den Axonen der ventralen Pionierneurone positioniert (Abb. 3.2.3a, vN). Der Nerv 2 ist ein sensomotorischer Nerv, der sowohl Axone der Motoneurone enthält, die die scapo-pedicellären Muskeln (M6 und M7) im Scapus innervieren, als auch alle Afferenzen der Mechanorezeptoren (Haare und ein Chordotonalorgan) im Scapus. Nerv 3 ist ebenfalls ein senso-motorischer Nerv, der die Muskeln (alle M4 und M5a) im Kopf innerviert und die Axone von einem Mechanorezeptor enthält (Honegger et al. 1990). Die Filopodien des Wachstumskegels der sensorischen Neurone laufen an den Filopodien der Motoneurone vorbei, zu den basalen Pionierneurone hin. Ihre Filopodien kontaktieren die basalen Pionierneurone (bPN) und die Axone wachsen ins Deutocerebrum im Oberschlundganglion ein (Abb. 3.2.3b). Die Axone dieser Pionierneurone (offene weiße Pfeile) bilden später den ventralen Trakt (vT) des peripheren antennalen Nervensystems.

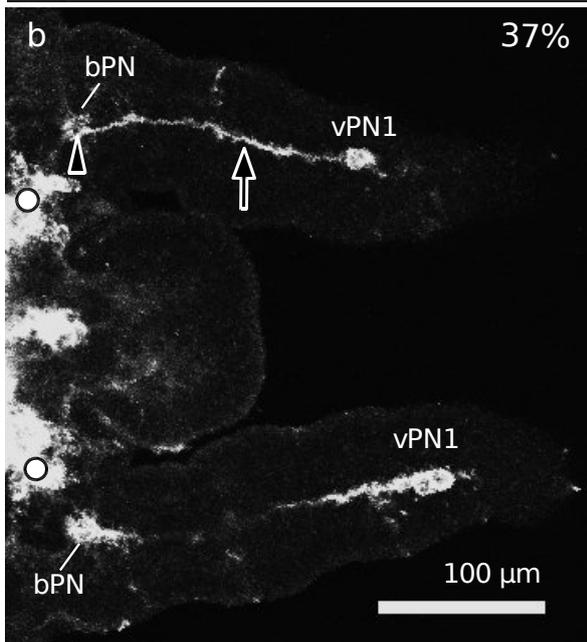
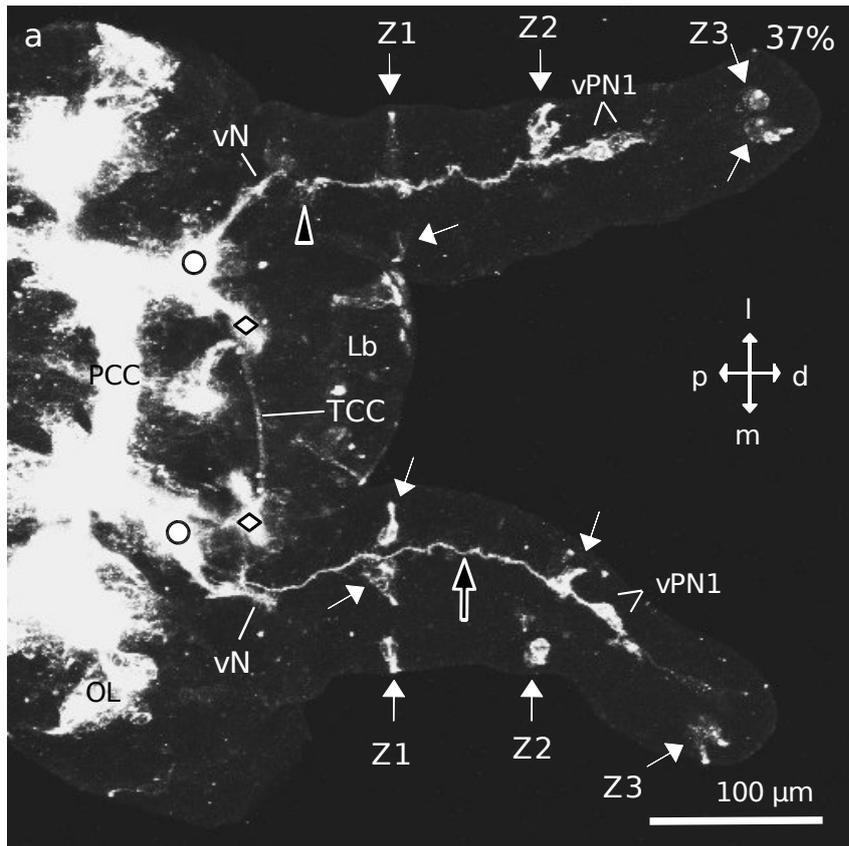


Abb. 3.2.3: HRP-Immunhistochemie. Ganzpräparat. Z-Projektionen.

a: Konfokale Fotografie des Kopfes eines 37%-igen Embryonen. Drei sensorische Zellbildungszone Z1, Z2 und Z3 mit sensorischen Zellen (weiße Pfeile) in den Antennen sind zu sehen. **b:** Ausschnitt. Basale Pionierneurone (bPN) sind zu sehen.

Kreis: Deutocerebrum; Lb: Labrum; offene weiße Pfeile: Axone der Pionierneurone (vPN1); offene weiße Pfeilspitze: Wachstumskegel mit Filopodien; OL: optischer Lobus; PC: Protocerebrum; PCC: Protocerebralkommissur; Raute: Tritocerebrum; TCC: Tritocerebralkommissur; vN (ventraler Nerv): das ventrale axonale Bündel der Motoneurone.

Neben dem ventralen, axonalen Bündel von Motoneuronen (vN) ist ein dorsales, axonales Bündel mit Wachstumskegeln und Filopodien im ersten Antennenbassissegment in ca. 43% der Embryogenese zu erkennen. Das dorsale, axonale Bündel liegt posterior von vN der Antenne und wird hier als dorsaler Nerv (dN) bezeichnet (Abb. 3.2.4c, dN). Im Verlauf der Entwicklung verbreiten diese Motoneurone ihre Filopodien im ersten Antennensegment (Abb. 3.2.5b und 3.2.6b, Doppelpfeil).

Ab ca. 40% der Embryogenese differenzieren sich in der Spitze der Antenne, auf der medialen und lateralen Seite der Antenne, neue Pionierneurone. Sie bestehen auch jeweils aus zwei sensorischen Neuronen. Sie senden ihre Axone nach proximal entlang der inneren Fläche des antennalen Epithels. Die Axone der medialen Pionierneurone liegen ventral in der Antenne und sie werden hier als vPN2 (das zweite Paar ventraler Pionierneurone) bezeichnet. Dorsal in der Antenne liegen die Axone der lateralen Pionierneurone und sie werden hier als dorsale Pionierneurone (dPN) bezeichnet. In der Abbildung 3.2.4a sind vPN2 und dPN in der Antenne eines 43%-igen Embryonen zu sehen. In ca. 43% der Embryogenese erreichen die Axone der vPN2 die Zellkörper der ersten ventralen Pionierneurone (vPN1), deren Axone sich bereits im Deutocerebrum im Oberschlundganglion befinden (Abb. 3.2.4a, offene weiße Pfeilspitze). Die Axone der dorsalen Pionierneurone (weißer Pfeil) reichen in diesem Stadium noch nicht bis zum Oberschlundganglion. Die Bildungszonen der sensorischen Neurone in der embryonalen Antenne werden in dieser Arbeit als sensorische Zellbildungszone (Z) bezeichnet (siehe Kapitel 3.2.3). Die Wachstumskegel der dorsalen Pionierneurone mit Filopodien liegen distal von der basalen, sensorischen Zellbildungszone Z1 (Abb. 3.2.4a, weiße Pfeilspitze).

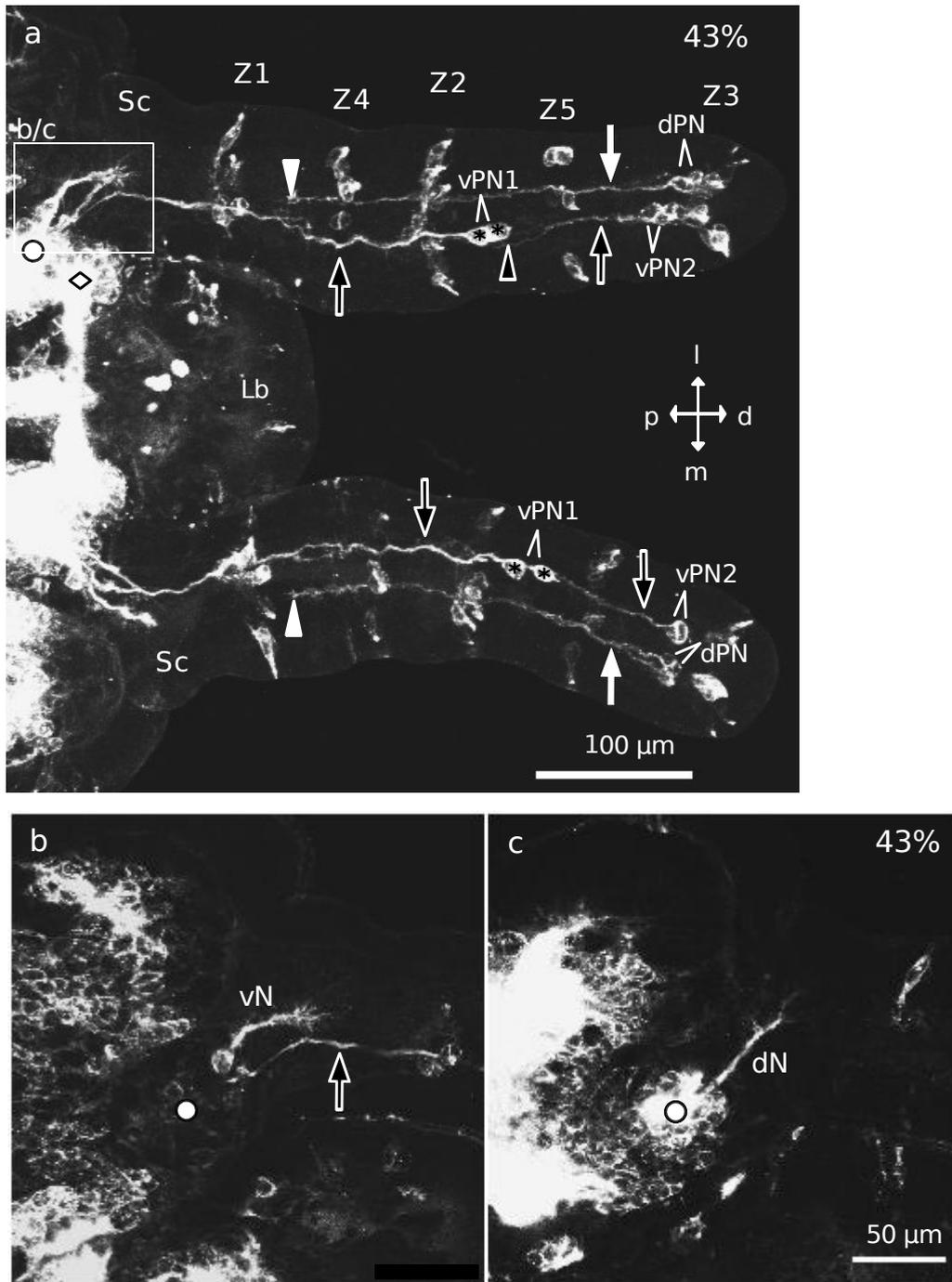


Abb. 3.2.4: HRP-Immunhistochemie. Ganzpräparat. Z-Projektionen. **a:** Konfokale Fotografie des Kopfes eines 43%-igen Embryonen. Hier sind die Antennen mit sensorischen Zellbildungszonen von Z1 bis Z5 zu sehen. Ventrale (vPN1 und vPN2) und dorsale (dPN) Pionierneurone mit ihren Axonen (offene weiße Pfeile und weißer Pfeil) sind zu sehen. Weiße Pfeilspitze: Filopodien von dPN; Offene weiße Pfeilspitze: Filopodien von vPN2. **b** und **c:** Die linke Antennenbasis in „a“ im Rechteck ist in der höheren Vergrößerung in **b** in der ventralen Ansicht und in **c** in der dorsalen Ansicht. Der ventrale Nerv (vN) und der dorsale Nerv (dN) sind in der Antennenbasis zu sehen. dN (dorsaler Nerv): das dorsale axonale Bündel der antennalen Motoneurone; offener weißer Pfeil: ventraler Trakt der Antenne; vN (ventraler Nerv): das ventrale axonale Bündel der antennalen Motoneurone. Kreis: Deutocerebrum; Lb: Labrum; Raute: Tritocerebrum; Sc: Scapus.

Die Axone der dorsalen Pionierneurone (weiße Pfeile) bilden den dorsalen Trakt (dT) des peripheren antennalen Nervensystems. In 45% der Embryogenese erreichen die Wachstumskegel vom dorsalen Trakt (dT), die Zellbildungszone Z1 (Abb. 3.2.5c, weiße Pfeilspitze). Der dorsale (dT) und ventrale Trakt (vT) schließen sich im ersten Antennenbasissegment in 47% der Embryogenese zusammen (Abb. 3.2.6b, großer weißer Pfeil). Dieser aus vT und dT entstandenen Trakt, der später den Antennennerven (AN) bildet, projiziert in das Deutocerebrum im Oberschlundganglion (Abb. 3.2.6b, AN). Alle, in der Entwicklung später entstehenden sensorischen Neurone benutzen vermutlich die von den Pionierneuronen gelegten Bahnen (Pflüger und Kutsch, 1987). Die Entstehung weiterer antennaler, sensorischer Neurone werden in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Ab etwa 37% der Embryogenese ist die erste Verbindung zwischen der antennalen Peripherie und dem Zentralnervensystem durch die Axone der ventralen Pionierneurone (vPN1) vorhanden. Durch die Pionierneurone vPN2 entsteht die ventrale Bahn im distalen Teil der Antenne, hingegen entsteht durch die Pionierneurone dPN die dorsale Bahn der Antenne.

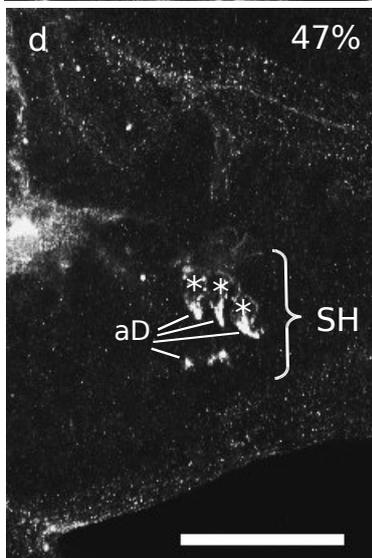
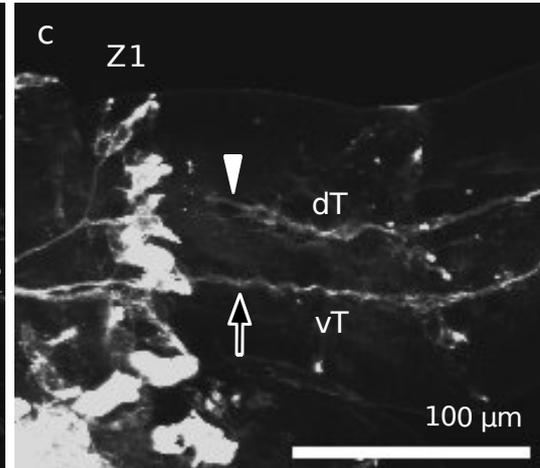
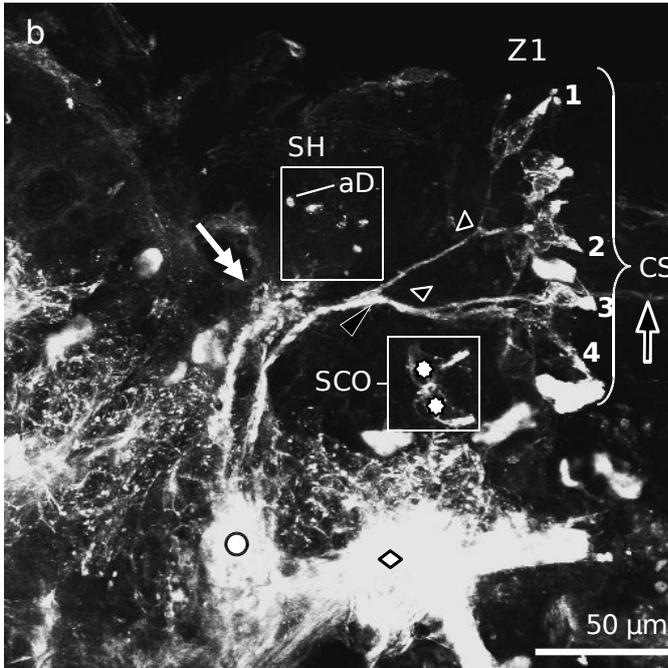
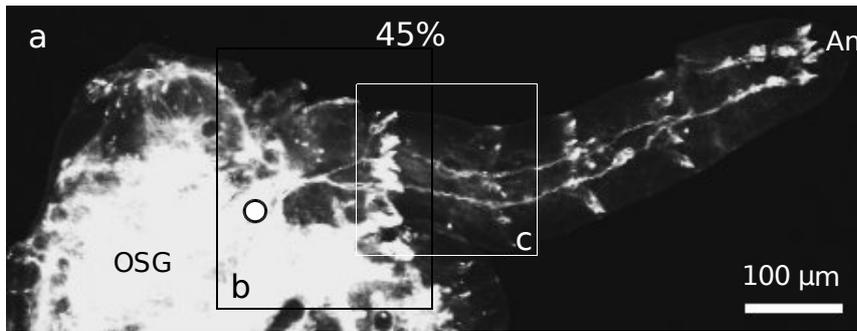


Abb. 3.2.5: HRP-Immunhistochemie. Ganzpräparat. Z-Projektionen. **a:** Konfokale Fotografie der Antenne eines 45%-igen Embryonen. Die linke Hälfte des Oberschlundganglions (OSG) und die linke Antenne (An) sind hier zu sehen. In b und c sind Ausschnitte von der Antennenbasis in der höheren Vergrößerung zu sehen. **b:** campaniforme Sensillen (CS) in der Zellbildungszone Z1. Vier campaniformen Sensillen (1-4) mit ihren Axonen sind markiert. Axone zweier CS schließen sich jeweils auf der medialen und lateralen Seite des Segmentes zusammen (offene weiße Dreiecke). Apikale Dendriten (aD) scapaler Haarsensillen (SH) sind durch das Rechteck gekennzeichnet. Doppelpfeil: axonales Bündel von Motoneuronen mit Filopodien; SCO: scapales Chordotonalorgan; Sterne: Zellkörper der Neurone von SCO. offener weißer Pfeil; ventraler Trakt der Antenne. **c:** Der ventrale Trakt (vT: offener weißer Pfeil) der Antenne und der dorsale Trakt (dT) der Antenne mit Filopodien (weiße Pfeilspitze) sind zu sehen. **d:** scapale Haarsensillen (SH) mit ihren apikalen Dendriten (aD); Sterne: Zellkörper von drei scapalen Haarsensillen. Maßstab in d: 50 µm.

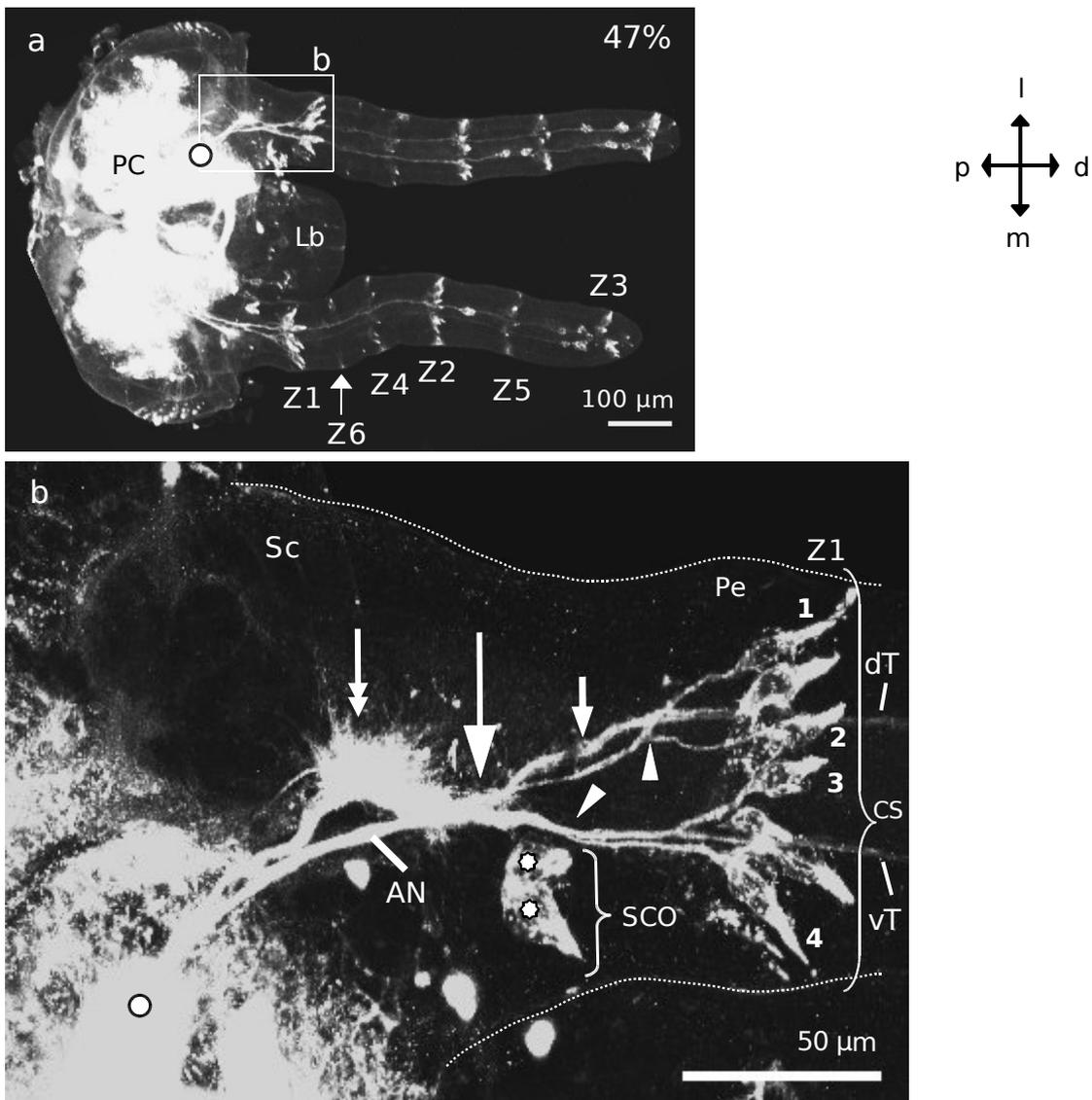


Abb. 3.2.6: HRP-Immunhistochemie. Ganzpräparat. Z-Projektionen. **a:** Konfokale Fotografie des Kopfes eines 47%-igen Embryonen. Zellbildungszone von Z1 bis Z6 sind hier zu sehen. Linke Antennenbasis ist in der höheren Vergrößerung in **b**. **b:** campaniforme Sensillen (CS) in der Zellbildungszone Z1. Vier campaniformen Sensillen (1-4) mit ihren Axonen. Axone zweier CS schließen sich jeweils auf der medialen und lateralen Seite des Segmentes zusammen (weiße Pfeilspitze). AN: Antennennerv; Doppelpfeil: Filopodien des axonalen Bündels von Motoneuronen; großer weißer Pfeil: Zusammenschluss der dorsalen und ventralen Trakten; kleiner weißer Pfeil: dorsaler Trakt (dT) der Antenne; Kreis: Deutocerebrum; Lb: Labrum; PC: Protocerebrum; Pe: Pedicellus; Sc: Scapus; SCO: scapales Chordotonalorgan; Sterne: Zellkörper der Neurone von SCO; vT: ventraler Trakt der Antenne.

3.2.3 Die Entstehung der antennalen sensorischen Neurone und ihre Anordnung (33%-50%)

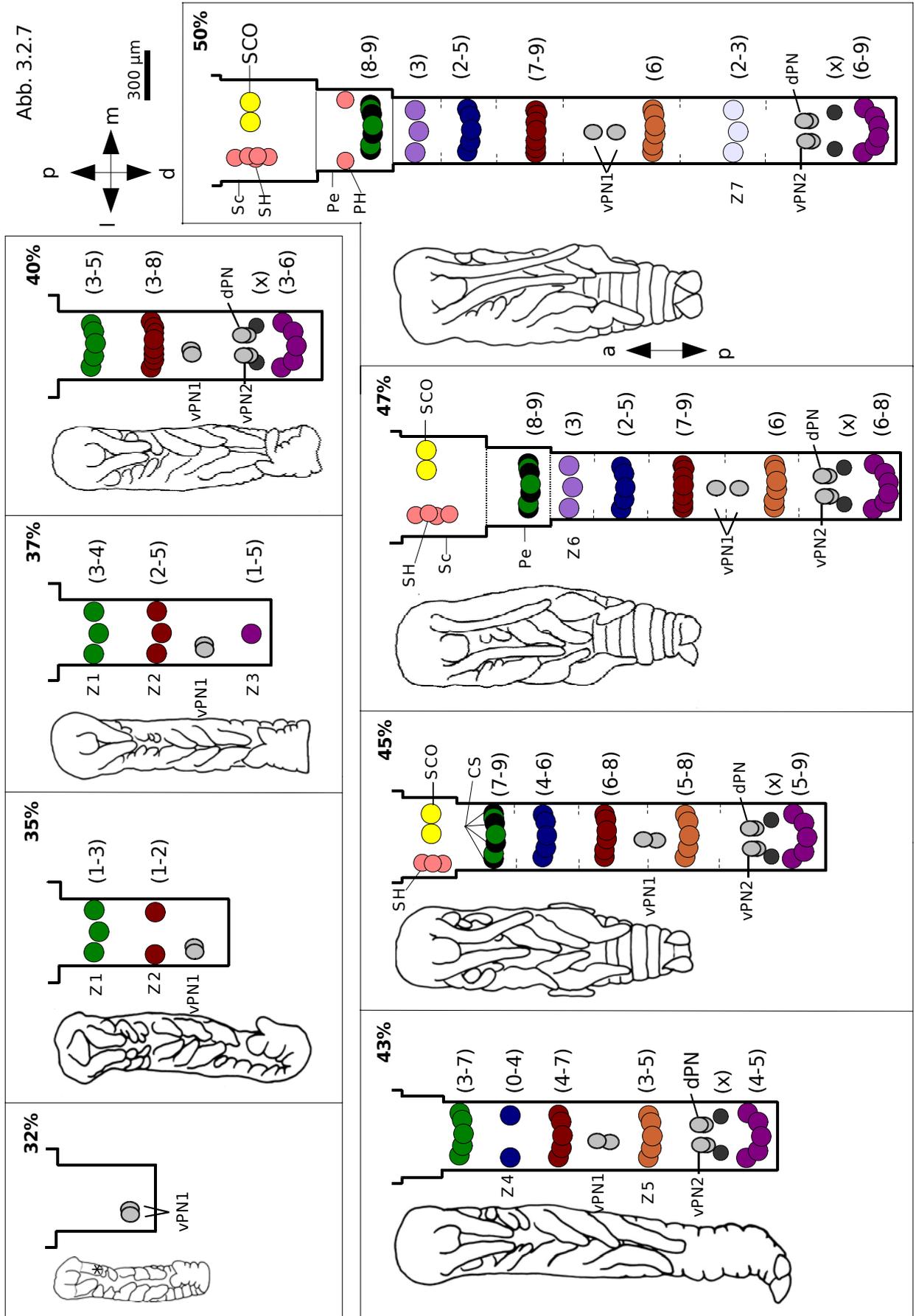
Die ersten sensorischen Neurone differenzieren sich ab 33% der Embryogenese im Epithel der Antenne. Diese Neurone haben hervortretende apikale Dendriten (33%; Abb. 3.2.1b und 35%; Abb. 3.2.2b, aD), die darauf hindeuten, dass es sensorische Neurone sind (Seidel und Bicker, 2000). Die sensorischen Neurone sind in der Abbildung 3.2.2a, b und 3.2.3a mit einem weißen Pfeil markiert. Die Differenzierung der sensorischen Neurone erfolgt erst in der Nähe der Antennenbasis, in Zellbildungszone 1 (Z1) und proximal von den ersten ventralen Pionierneuronen, in Z2 (Abb. 3.2.2a). Die sensorischen Neurone differenzieren sich auch auf der anderen Seite in der Antenne. Dort ist noch keine axonale Bahn vorhanden (Abb. 3.2.2a und b, weiße Pfeile in Zellbildungszone Z1). Ab ca. 37% der Embryogenese differenzieren sich weitere sensorische Neurone in der Spitze der Antenne (Z3). In der Abbildung 3.2.3a sind die drei Zellbildungszonen (Z1, Z2 und Z3) in 37% der Embryogenese in der Nähe der Antennenbasis, in der Mitte und in der Spitze der Antenne zu sehen. In 43% der Embryogenese sind die Antennen in die Länge gewachsen und in der Antenne differenzieren sich zusätzliche sensorische Zellbildungszonen zwischen den ersten drei Zellbildungszonen (Abb. 3.2.4a, Z4: zwischen Z1 und Z2, und Z5: zwischen Z2 und Z3). Die äußerliche Segmentation und Annulierung der Antenne beginnt ab ca. 43% der Embryogenese und das erste Antennenbasissegment (Scapus) ist ab diesem Stadium zu erkennen (Abb. 3.2.4a, Sc). Neue sensorische Neurone differenzieren sich im Scapus auf der dorsalen und ventralen Seite, als zwei verschiedene Gruppen (SH: scapale Haarsensillen und SCO: scapales Chordotonalorgan), ab ca. 45% der Embryogenese (siehe Kapitel 3.2.4 und Abb. 3.2.5b und d, SH; Abb. 3.2.5b, SCO). Da diese sensorischen Neurone in diesem Segment sich nicht in einer Zone differenzieren, werden ihre Entstehungsstellen nicht als Zellbildungszone bezeichnet. In 47% der Embryogenese entsteht eine neue Zellbildungszone (Z6) zwischen Z1 und Z4 (Abb. 3.2.6a, Z6). Die Zellbildungszone Z7 entsteht in ca. 50% der

Embryogenese zwischen Z5 und Z3. In diesem Stadium im zweiten Antennenbasissegment (Pedicellus) entwickeln sich weitere neue sensorische Neurone proximal von Z1 (siehe Kapitel 3.2.4 und Abb. 3.2.8, PH). Die Entstehung der sensorischen Neurone im Scapus (Sc) und im Pedicellus (Pe) werden unten in Kapitel 3.2.4 ausführlich beschrieben.

Die antennalen sensorischen Neurone differenzieren sich in Bändern in der embryonalen Antenne. Die Differenzierung dieser Neurone erfolgt in jedem Segment der Antenne parallel zum Beginn der Segmentation ab ca. 45% der Embryogenese. Alle Zellbildungszonen (Z1 - Z7) in der Antenne und die sensorischen Neurone in den ersten beiden basalen Antennensegmenten, im Scapus und im Pedicellus der Grillenembryonen zwischen 35% und 50% der Embryogenese sind in der Abbildung 3.2.7 schematisch dargestellt.

Abb. 3.2.7: Überblick zur Entwicklung der Antenne der Grillenembryonen zwischen 32% und 50% der Embryogenese. Die sensorischen Neurone in den Zellbildungszonen in den embryonalen Antennen werden schematisch dargestellt. Die Anzahl der sensorischen Neurone in jeder Zellbildungszone in der Antenne der Embryonen wurden zwischen 32% und 50% der Embryogenese bestimmt (30%, N = 5; 32%, N = 5; 35%, N = 5; 37%, N = 6; 40%, N = 4; 43%, N = 5; 45%, N = 3; 47%, N = 3; 50%, N = 4). Ihre Anzahl wird jeweils neben den Zellbildungszonen in Klammern angegeben (Minimal-Maximal). Die äußerlichen Morphologie der Grillenembryonen werden jeweils gezeichnet. Das Alter der Grillenembryonen werden in % der Entwicklungsdauer angegeben. Die Identität der sensorischen Zellbildungszone ist farbig kodiert. dPN: dorsale Pionierneurone; CS: campaniforme Sensillen; Pe: Pedicellus; PH: Haarsensillen im Pedicellus; Sc: Scapus; SCO: Chordotonalorgan im Scapus; SH: Haarsensillen im Scapus; Stern: linke Antenne; vPN1 und vPN2: ventrale Pionierneurone. anterior (a)- posterior (p) Achse für Embryonen. lateral (l)-medial (m) und posterior (p)- distal (d) Achsen für Antennen.

Abb. 3.2.7



3.2.4 Das Entstehungsmuster der sensorischen Neurone in der Antennenbasis

Die sensorischen Neurone der Mechanorezeptoren, die in der Antennenbasis der adulten Grillen vorkommen, Chordotonalorgane und Haarsensillen (Honegger et al., 1990; Yildiz, 2002; Diplomarbeit, Lehrstuhl für Zoologie, TU München; Yildiz und Gebhardt, 2003), sind früh in der Entwicklung mit einem neuron-spezifischen anti-HRP Antikörper nachzuweisen (Seidel und Bicker, 2000; Boyan und Williams, 2004). Die sensorischen Neurone der basalen Mechanorezeptoren in der Antenne der Grillen sind bis zur Hälfte der Entwicklung in der Abbildung 3.2.7 schematisch dargestellt (SH, SCO, CS und PH).

Im Scapus differenzieren sich ab 45% der Embryogenese dorsal sensorische Neurone, die die scapalen Haarsensillen (SH) darstellen (45%: Abb. 3.2.5b, apikale Dentrinen (aD) von SH und 47%: Abb. 3.2.5d, SH). Diese Haarsensillen bilden das dorsale Haarfeld auf dem Scapus bei den adulten Grillen. Sie sind v-förmig in diesem Segment angeordnet und entsprechen der Anordnung adulter Haarsensillen. Ebenfalls in ca. 45% der Embryogenese treten sensorische Neurone auf der ventralen Seite und medial im Scapus auf; dabei handelt es sich um das scapale Chordotonalorgan (SCO) (Honegger et al., 1990). In diesem Stadium besteht dieses Organ nur aus zwei Neurone (N = 6, Abb. 3.2.5b, SCO). Im zweiten Antennensegment (Pedicellus) sind ab ca. 45% der Embryogenese zwei distal liegende Gruppen von Neuronen in der Zellbildungszone Z1 erkennbar. Nach ihrer Lage und dem Verzweigungsmuster der Fasernbündel (Yildiz, 2002; Diplomarbeit, Lehrstuhl für Zoologie, TU München), in dem sich ihre Axone befinden, sind diese Neurone die campaniformen Sensillen (CS) des Pedicellus (Abb. 3.2.5b, CS). Bei ca. 45% der Embryogenese senden vier campaniforme Sensillen ihre Axone in Richtung zum Oberschlundganglion (Abb. 3.2.5b, 1-4). In diesem Stadium faszikulieren die Axone von zwei dieser campaniformen Sensillen jeweils auf der medialen und lateralen Seite im Pedicellus (Abb. 3.2.5b, offene weiße Dreiecke). Ihre Axone ziehen weiter proximal, um sich im Scapus mit dem ventralen Trakt (offener weißer Pfeil) der Antenne

zusammenzuschließen und ins Oberschlundganglion projizieren. In diesem Stadium befinden sich in der Zellbildungszone Z1 sieben bis neun Neurone ($N = 3$). Vier dieser Neurone haben bereits ihre Axone. Bei den anderen sensorischen Neuronen, die in Z1 liegen, sind dagegen noch keine ihrer Axone ausgewachsen. Bei 50% der Embryogenese sind weiterhin nur vier campaniformen Sensillen mit ihren Projektionen im Pedicellus vorhanden (Abb.3.2.6b, 1-4). Die Verfolgung der Axone der weiteren campaniformen Sensillen, die sich in Z1 differenzieren, ist, ab ca. 60% der Embryogenese, schwer möglich, da sich die Anzahl der Neurone in Z1 erhöht und sie als Folge der dichten Ansammlung nicht mehr nach zu verfolgen sind.

Im Pedicellus differenzieren sich, ab 50% der Embryogenese, sensorische Neurone proximal von den campaniformen Sensillen. Diese sensorischen Neurone sind die Haarsensillen des Pedicellus (PH) (Abb. 3.2.8a, PH). Sie sind anders positioniert als die restlichen Neurone, die sich in diesem Segment in der Zellbildungszone Z1 befinden. Sie liegen in der medio-lateralen Achse im proximalen Bereich dieses Segmentes. Die Neurone, die sich im distalen Bereich in diesem Segment in der Zellbildungszone Z1 befinden, sind in der proximal-distalen Achse gelegen (Abb. 3.2.8a). Die Axone der Haarsensillen (PH) faszikulieren mit den Axonen von campaniformen Sensillen (Abb. 3.2.8a, kleiner Pfeil). Ab 60% der Embryogenese kommen sie in Reihen vor (Abb. 3.2.8b, PH). Von diesem Stadium an liegt eine Gruppe der Haarsensillen in zwei Reihen dorsal auf der medialen Seite (Abb. 3.2.8c (65%) und Abb. 3.2.8d (70%), PH1 und PH2). Eine weitere Gruppe der Haarsensillen existiert in zwei Reihen ventral, auf der lateralen Seite, in diesem Segment (Abb. 3.2.8c (65%) und Abb. 3.2.8d (70%), PH3). Ebenfalls in ca. 50% der Embryogenese ist eine medial liegende Gruppe von Neuronen, im Pedicellus, in der Zellbildungszone Z1 zu erkennen, die ein Chordotonalorgan des Pedicellus darstellt (PCO) (Abb. 3.2.8a). Die ersten Neurone dieses Organs differenzieren sich bereits in ca. 47% Embryogenese. Die Axone der Neurone dieses Organs bilden ein Bündel (weiße Pfeilspitze) und verbinden sich mit dem dorsalen Trakt (dT) des antennalen Nervensystems im Pedicellus.

Das Chordotonalorgan (PCO) und die bereits vorhandenen Haarsensillen (PH) im Pedicellus haben ihre zentralen Projektionen bei 50% der Embryogenese (Abb. 3.2.8a). Dagegen haben das Chordotonalorgan (SCO) und die Haarsensillen (SH) im Scapus, in diesem Stadium, noch keine zentrale Projektion erreicht.

Ab 50% der Embryogenese verzweigen sich die beiden axonalen Bündel vN und dN im ersten Antennensegment (Abb. 3.2.8a, großer Pfeil). Ein Ast zweigt von dN ab und läuft ventro-medial im Scapus. Die Axone der Neurone des SCO bilden ein Bündel (50%: Abb. 3.2.8a, offene weiße Pfeilspitze) und laufen dorso-lateral im Scapus. Bei ca. 55% der Embryogenese projizieren sie dort ins Oberschlundganglion, von wo der dN aus dem Oberschlundganglion auswächst (60%: Abb. 3.2.8b, offene schwarze Pfeilspitze). Die Axone der scapalen Haarsensillen (SH) faszikulieren dorsal mit einem dorsalen Ast von dN, in ca. 60% der Embryogenese (60%: Abb. 3.2.8b, weiße Pfeile). Weitere zwei Äste zweigen von dN in der Basis in diesem Segment ab. Ein Ast bleibt dorsal im Scapus und ihre Filopodien breiten sich dort aus. Ein Ast läuft ventro-lateral und faszikuliert mit einem Ast von vN (nicht gezeigt).

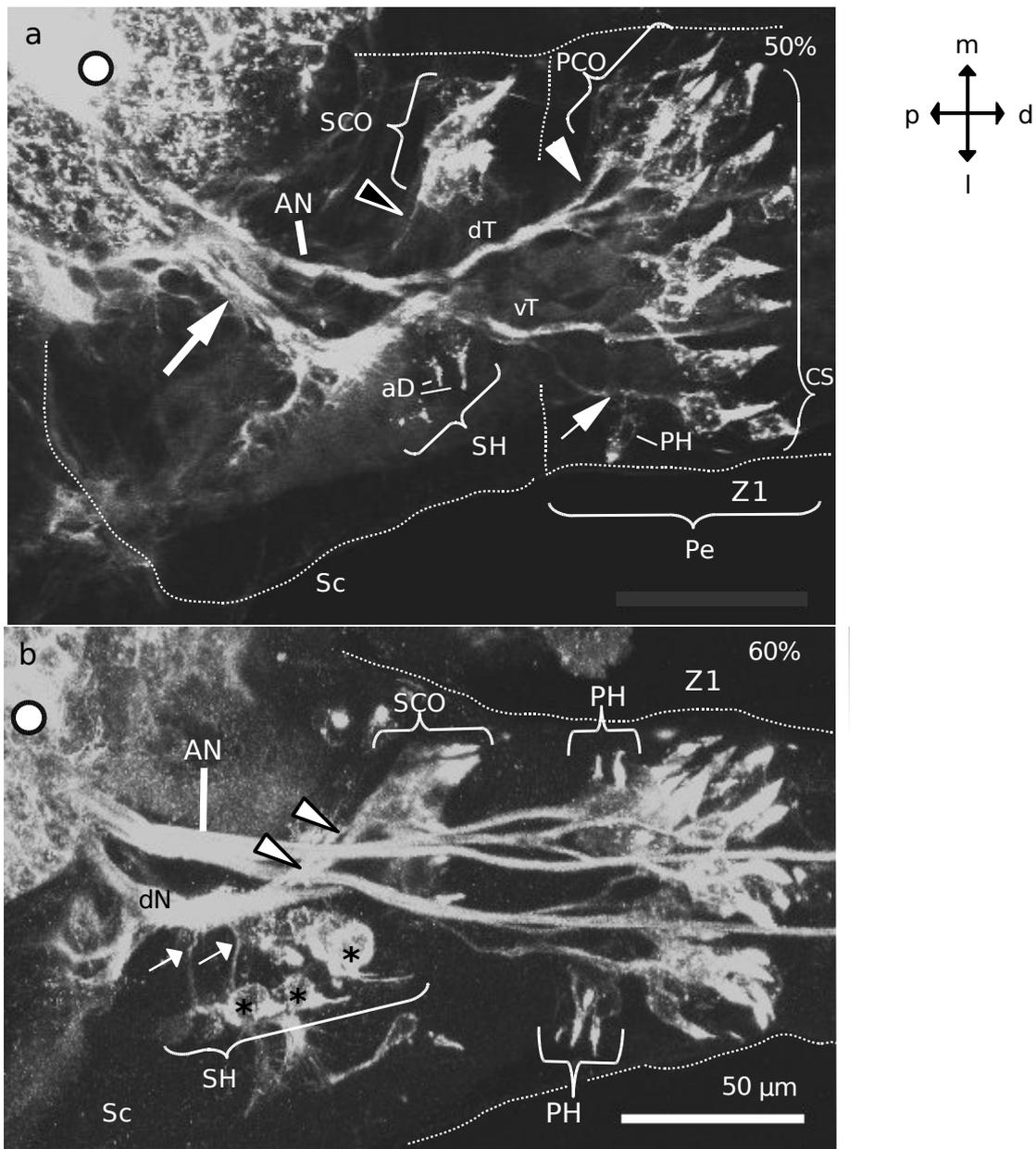
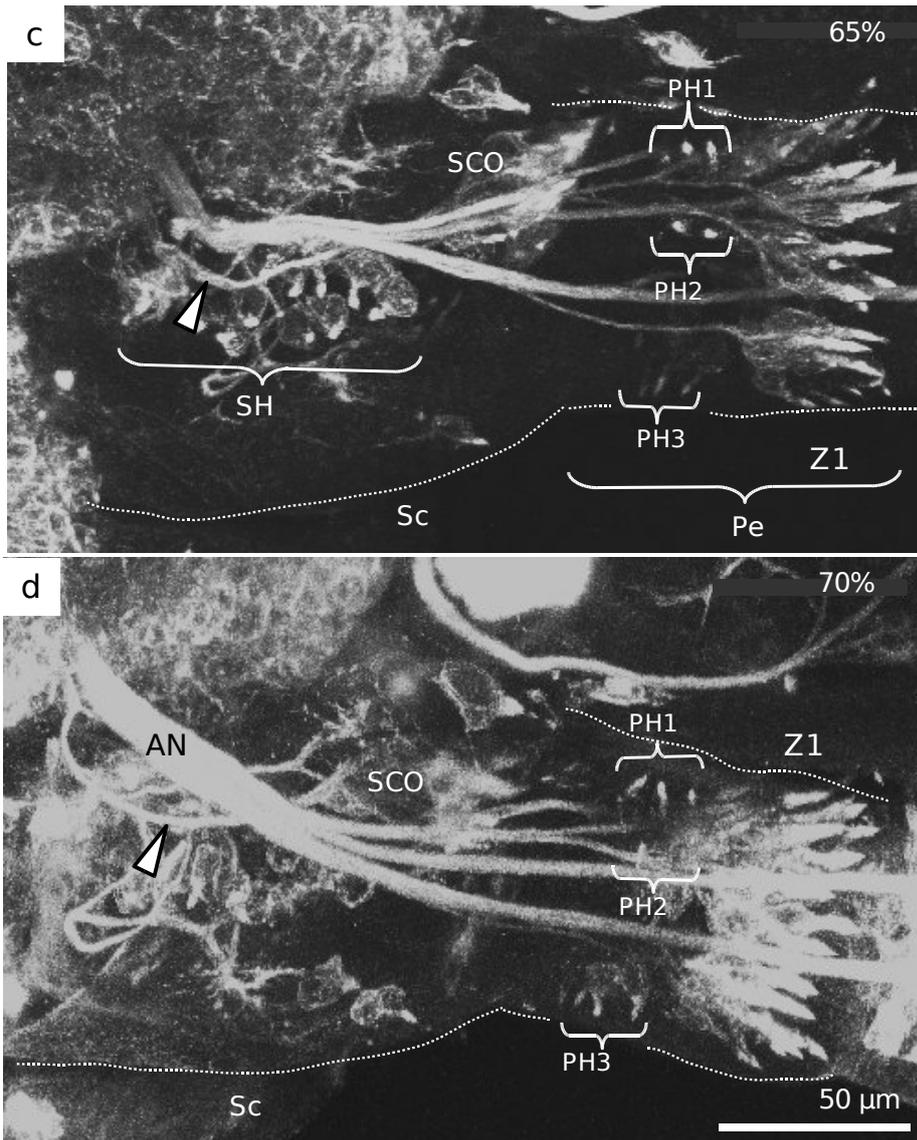


Abb. 3.2.8a-d: HRP-Immunhistochemie. Ganzpräparat. Z-Projektionen. Konfokale Fotografien der Antennenbasis eines 50%-igen (**a**), eines 60%-igen (**b**), eines 65%-igen (**c**) und eines 70%-igen (**d**) Embryonen. Alle Mechanorzeptoren der beiden Antennenbasissegmenten, Scapus (Sc) und Pedicellus (Pe) sind zu sehen: scapales Chordotonalorgan (SCO), Chordotonalorgan im Pedicellus (PCO), campaniformen Sensillen (CS) in der Zellbildungszone Z1 im Pedicellus, scapale Haarsensillen (SH) und Haarsensillen im Pedicellus (PH). **a:** aD: apikale Dendriten scapaler Haarsensillen; dT: dorsaler Trakt der Antenne; kleiner weißer Pfeil: Axon eines pedicellaren Haarsensillums; offene weiße Pfeilspitze: Axone der Neurone von SCO; vT: ventraler Trakt der Antenne; weiße Pfeilspitze: Axone der Neurone von PCO. **b:** dN: dorsaler Nerv (dorsale axonale Bündel der antennalen Motoneurone); kleine weiße Pfeile: Axone zweier scapalen Haarsensillen (SH); Sterne: Zellkörper von drei scapalen Haarsensillen. **c** und **d:** drei verschiedene Reihen der pedicellaren Haarsensillen PH1, PH2 und PH3 sind im proximalen Bereich des Pedicellus zu sehen. AN: Antennennerv; Kreis: Deutocerebrum; offene schwarze Pfeilspitze: Bündel der Axone der Neurone von SCO; Pe: Pedicellus; Sc: Scapus.

Abb. 3.2.8



3.2.5 Die Anzahl der sensorischen Neurone in der Antenne (30% - 60%)

Wie im Kapitel 3.2.3 beschrieben, differenzieren sich im Verlauf der Embryogenese neue Zellbildungszonen in der embryonalen Antenne. Ebenfalls entwickeln sich neue sensorische Neurone in jeder Zellbildungszone der Antenne. In der Abbildung 3.2.7 werden die sensorischen Neurone in jeder Zellbildungszone, in den Antennen der Grillenembryonen und in jedem basalen mechanosensorischen Organ während des Zeitfensters von 32% bis 50% der Embryogenese schematisch dargestellt und die minimale und maximale Anzahl der sensorischen Neurone wird angegeben (32%, N = 5; 35%, N = 5; 37%, N = 6; 40%, N = 4; 43%, N = 5; 45%, N = 3; 47%, N = 3; 50%, N = 4).

Bei ca. 30% der Embryogenese befinden sich nur zwei Pionierneurone (vPN1) in der Spitze der Antenne (30%, N = 5). Die Anzahl der ersten sensorischen Neurone, in der embryonalen Antenne, bei 35% der Embryogenese, variiert in Z1 zwischen eins und drei und in Z2 zwischen eins und zwei. In der dritten Zellbildungszone bei 37% der Embryogenese variiert die Anzahl der sensorischen Neurone zwischen eins und fünf. Ab 40% der Embryogenese sind zusätzlich zu vPN1 in jeder Antenne zwei Paar Pionierneurone (vPN2 und dPN) vorhanden. Ebenfalls differenzieren sich dort neue sensorische Neurone, die schwer zu zählen sind, weil die Zellkörper dieser Neurone und die Zellkörper der Pionierneurone nahe nebeneinander oder teils übereinander liegen. Die Zellbildungszone Z4, die sich wie Z5 in 43% der Embryogenese differenziert hat, enthält null bis vier Neurone. In Z5, die sich zwischen Z2 und Z3 befindet, liegen drei bis fünf Neurone. Das scapale Chordotonalorgans (SCO) beinhaltet zwei Neurone bei 45% der Embryogenese. Bei ca. 47% der Embryogenese steigt die Anzahl der Neurone des SCO auf vier. Die Anzahl der Neurone des SCO variiert bei 50% der Embryogenese zwischen vier und sechs (N = 4), bei 55% der Embryogenese zwischen sechs und acht (N = 5) und bei 60% der Embryogenese zwischen sieben und neun (N = 4). Scapale Haarsensillen (SH) sind nachweisbar zwischen null bis vier, in ca. 45% der

Embryogenese (N = 6), zwischen drei bis fünf in ca. 50% der Embryogenese (N = 9), zwischen fünf und sieben in ca. 55% der Embryogenese (N = 5) und zwischen acht und zehn in ca. 60% der Embryogenese (N = 4). Bei 45% der Embryogenese sind vier campaniforme Sensillen mit ihren Projektionen im Pedicellus (CS) in der Zellbildungszone Z1 vorhanden. In Z1, in diesem Stadium, befinden sich insgesamt sieben bis neun Neurone (N = 3). Die Anzahl der Neurone in Z1 variiert zwischen zehn und 16 in ca. 50% der Embryogenese, zwischen 14 und 16 in ca. 55% der Embryogenese (N = 4) und zwischen 14 und 19 in ca. 60% der Embryogenese (N = 4). Die Menge der campaniformen Sensillen mit ihren Projektionen bleibt aber unverändert bis 50% der Embryogenese. Ab 50% der Embryogenese fusionieren die Axone weiterer Neurone in Zellbildungszone Z1 mit den Axonen der campaniformen Sensillen. Die Bestimmung ihrer Anzahl ist ab ca. 60% der Embryogenese nicht mehr möglich, da sich eine Vielzahl neuer Neurone bilden und, als Folge davon, eng aneinander liegen. In 47% und 50% der Embryogenese liegt die Anzahl der Neurone in Z6 bei drei. In Z7, in 50% der Embryogenese, variiert sie zwischen zwei und drei. Die Anzahl der pedicellaren Haarsensillen (PH) liegt zwischen eins und drei bei 50% der Embryogenese (N = 3), zwischen zwei und sechs bei 55% der Embryogenese (N = 4) und zwischen sieben und neun bei 60% der Embryogenese (N = 4). Bei 50% der Embryogenese liegen die Neurone des pedicellaren Chordotonalorgans (PCO) zwischen drei und vier vor (N = 4), bei 55% der Embryogenese zwischen vier und sechs (N = 4) und bei 60% der Embryogenese zwischen fünf und sieben (N = 3). Die Anzahl der sensorischen Neurone in den Antennen der Grillenembryonen finden sich bei 50% der Embryogenese in Z1 zwischen acht und neun, in Z2 zwischen sieben und neun, in Z3 zwischen sechs und neun, in Z4 zwischen zwei und fünf und in Z7 zwischen zwei und drei. In Z5 liegt die Anzahl der Neurone bei sechs und in Z6 bei drei. Im Verlauf der Entwicklung der Grillenembryonen zwischen 35% und 50% der Embryogenese vermehren sich die sensorischen Neurone in jeder Zellbildungszone (Z1-Z7) und in den basalen Mechanorezeptor-Organen (SH, SCO, CS, PCO und PH).

Zwischen 50% und 75% der Embryogenese bleibt die Anzahl der basalen Mechanorezeptoren dagegen konstant.

Die gesamte Anzahl der sensorischen Neurone in der rechten und linken Antenne der Grillenembryonen zwischen 35% und 55% der Embryogenese ist in der Tabelle 3.2.1 aufgelistet. Die Pionierneurone vPN1, vPN2 und dPN und die sich in der Spitze der Antenne differenzierenden Neurone, die schwer zu zählen sind, wurden nicht mitgezählt. Es wurden die sensorischen Neurone aufgenommen, die in den Zellbildungszonen (Z1-Z7) vorkommen und die Neurone, aus denen die basalen Mechanorezeptoren (SH, SCO, CS, PCO und PH) entstehen.

Tab. 3.2.1: Anzahl der sensorischen Neurone in den Antennen der Grillenembryonen im Verlauf der Entwicklung. Die Entwicklungsdauer wird in Klassen geteilt. Klassenbreite = 10; KM: Klassenmitte; N: Anzahl der Embryonen pro Klasse; Min-Max: die minimale und maximale Anzahl der Neurone in den Grillenantennen.

Alter [%]	Anzahl der sensorischen Neurone in den Antennen								
	in beiden Antennen (gesamt)			in den linken Antennen			in den rechten Antennen		
KM [%]	N	Median	Min-Max	N	Median	Min-Max	N	Median	Min-Max
34,5	10	13	3-29	10	7	1-14	10	6	2-15
44,5	15	43	24-87	18	22,5	11-44	18	21	9-44
54,5	3	85	83-89	4	43,5	39-61	4	44,5	42-45

Die gesamte Anzahl der sensorischen Neurone in beiden Antennen der Grillenembryonen variiert bei ca. 34,5% der Embryogenese zwischen drei und 29 (Median 13; N = 10), bei ca. 44,5% der Embryogenese zwischen 24 und 87 (Median 43; N = 15) und bei ca. 54,5% der Embryogenese zwischen 83 und 89 (Median 85; N = 3). Der Median der sensorischen Neurone in der linken Antenne ist bei ca. 34,5%-igen Embryonen sieben (Spannweite: 1-14; N = 10), bei ca. 44,5%-igen Embryonen 22,5 (Spannweite: 11-44; N = 18) und bei ca. 54,5%-igen Embryonen 43,5

(Spannweite: 39-61; N = 4). Der Median der sensorischen Neurone in der rechten Antenne ist bei ca. 34,5%-igen Embryonen sechs (Spannweite: 2-15; N = 10), bei ca. 44,5%-igen Embryonen 21 (Spannweite: 9-44; N = 18) und bei ca. 54,5%-igen Embryonen 44,5 (Spannweite: 42-45; N = 4). Wie man auch in der Abbildung 3.2.9a sieht, erhöht sich die Anzahl der sensorischen Neurone, in den embryonalen Antennen, mit der Entwicklung der Grillenembryonen. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der Neurone in der rechten und linken Antenne (Wilcoxon Test, $z = -1$, $p = 0.3$, $N = 28$) (Tab. 3.2.1 und Abb. 3.2.9a). Die Regressionsanalyse der Daten hat gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Neuronen in den embryonalen Antennen und der Entwicklung der Grillenembryonen gibt ($r = 0.83$; Spearman Rangkorrelation; $N = 28$; $p = 0.01$). Die Grafik in der Abbildung 3.2.9b zeigt die Relation der Entwicklung der Grillenembryonen zur Anzahl der sensorischen Neurone, in den beiden Antennen der Grillenembryonen, ca. bis zur Hälfte der embryonalen Entwicklung. Im Verlauf der Entwicklung der Grillenembryonen entstehen neue sensorische Neurone in den Grillenantennen.

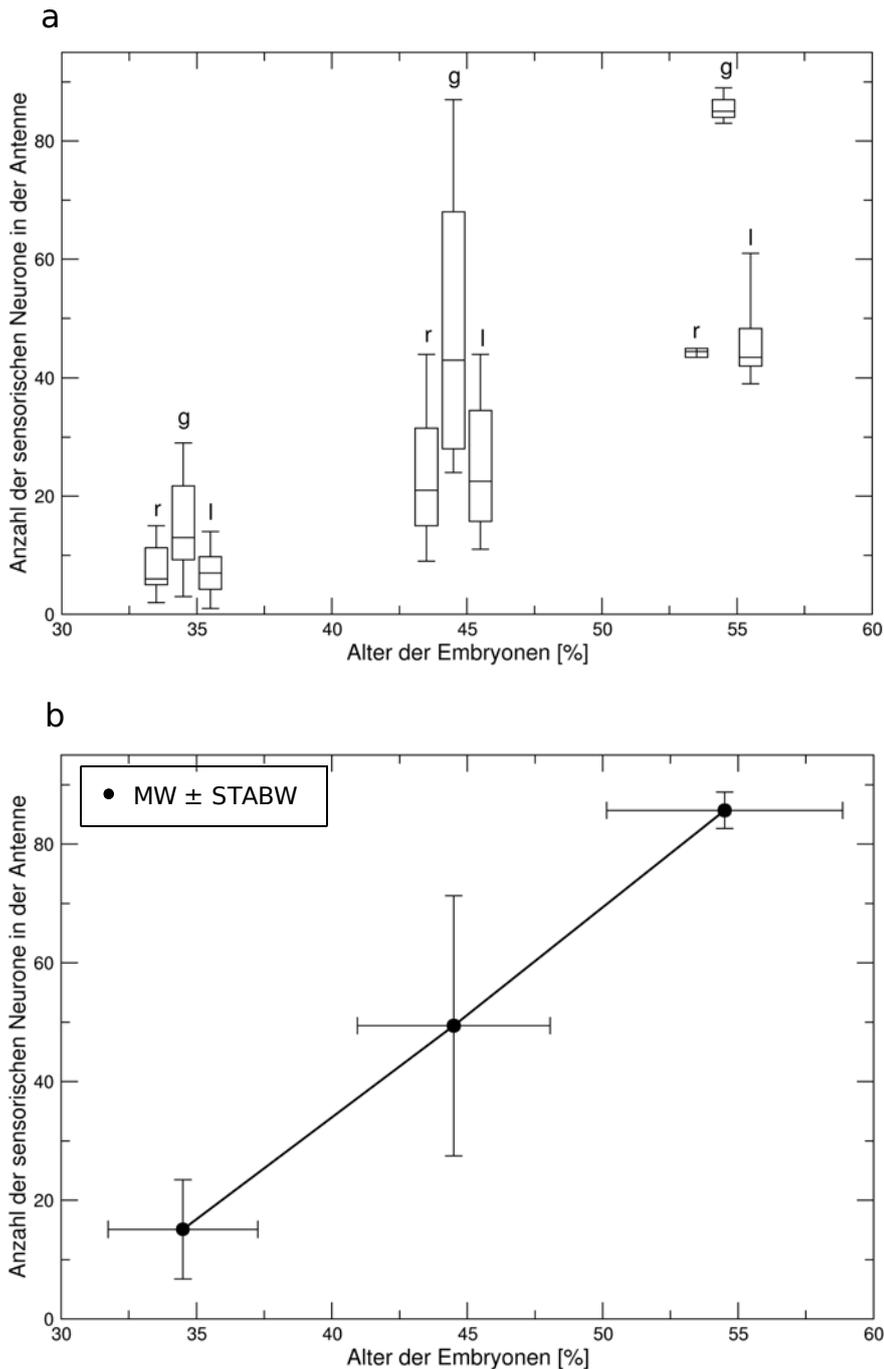


Abb. 3.2.9: Anzahl der sensorischen Neurone in den Antennen der Grillenembryonen zwischen ca. 35% und 55% der Entwicklung. Die Entwicklungsdauer wird in drei Klassen geteilt. Für die Anzahl der Embryonen pro Klasse siehe Tabelle 3.2.1. **a:** Die Darstellung der Daten mit Box-Whiskers Plot. g: gesamte Anzahl der Zellen in beiden Antennen; l: Anzahl der Zellen in der linken Antenne; r: Anzahl der Zellen in der rechten Antenne. **b:** Die Grafik zeigt die Anzahl der Zellen in beiden Antennen im Verlauf der Entwicklung (35% - 55%) in drei Klassen. MW: Mittelwert; Standardabweichung (STABW) auf der X-Achse ist 8%. (Entwicklungsdauer: $214,9 \pm 17,2$ h. $17,2$ h = 8%).

3.3 Die Projektion der antennalen Sensorik der Grillenembryonen

Um die Projektionsareale und die Verteilung der antennalen Sensorik im Deutocerebrum der Grillenembryonen während der Embryogenese zu zeigen, wurde der Antennennerv, in dem sich die Axone der antennalen sensorischen Neurone befinden, anterograd mit verschiedenen Substanzen (Nickelchlorid, Kobaltchlorid oder Dil) gefüllt. Im Folgenden werden die Projektionsareale der antennalen sensorischen Neurone zwischen 65% und 95% der Embryogenese mit Fotografien von Ganzpräparaten und Schnitten dargestellt und somit wird ihre Lokalisation im Deutocerebrum aufgeklärt (Kapitel 3.3.1). Um zu zeigen, wie die Projektionen einzelner basaler mechanosensorischer Neurone während der Embryogenese im Oberschlundganglion organisiert sind, wurden Zellen im zweiten Antennensegment (Pedicellus) durch die iontophoretische Injektion der Farbstoffe (Neurobiotin oder Lucifer Yellow) in die Zellkörper dieser Zellen gefärbt. Im Kapitel 3.3.3 werden die Ergebnisse der Einzelzellfärbungen dieser Zellen der Antennenbasis der Grillenembryonen zwischen 40% und 55% der Embryogenese aufgeführt. Die für die Einzelzellfärbungen verwendeten Embryonen waren aufgrund der embryonalen Kutikula, die eine Penetration mit der Elektrode sehr erschwert, nicht älter als 55%. Eine impermeable embryonale Kutikula bildet sich ab ca. 50% der Embryogenese (Shankland und Bentley, 1983). Die Lokalisation der Projektionsareale der sensorischen Neurone im Deutocerebrum der Grillenembryonen werden in der Reihenfolge der folgenden drei Achsen beschrieben: dorsal – ventral, lateral – medial und anterior – posterior (für die Beschreibung der Achsen siehe „Material und Methoden“ Kapitel 2.1).

3.3.1 Die Projektionsareale der antennalen sensorischen Neurone der Grillenembryonen zwischen 65% und 95% der Embryogenese

In 65% der Embryogenese sind bereits die Projektionen der antennalen sensorischen Neurone im Deutocerebrum zu erkennen (Abb. 3.3.1). Nachdem der Antennennerv (AN) in das Oberschlundganglion hereinzieht, zweigen Fasern in einem Faserbündel, hier als F1 bezeichnet, von dem Antennennerv ab und laufen in eine anteriore und mediale Richtung im Deutocerebrum und enden in einem hier P1 genannten Projektionsareal im medianen Deutocerebrum (Abb. 3.3.1a und b, offene Pfeile: P1). Ein weiteres Faserbündel, hier als F2 bezeichnet, ist ventral im Deutocerebrum zu erkennen (Abb. 3.3.1a, F2). Die Fasern in diesem Bündel laufen posterior und medial von Faserbündel F1 und enden posterior von Faserbündel F1 in einem hier P2 genannten Projektionsareal im Deutocerebrum (Abb. 3.3.1a und b, offene Pfeilspitzen: P2). Die Projektion dieser Fasern erstreckt sich bis nach dorsal im Deutocerebrum (Abb. 3.3.1d, offene Pfeilspitzen: P2). Ein drittes, hier P3 genanntes Projektionsareal der antennalen sensorischen Neurone ist auch bereits in 65% der Embryogenese dorsal im Deutocerebrum zu erkennen (Abb. 3.3.1d, geschlossene Pfeilspitze: P3). Dieses Projektionsareal ist anterior von dem Projektionsareal P2 lokalisiert. In der Abbildung 3.3.1c ist eine Unterscheidung der beiden Projektionsareale P2 und P3 (offene und geschlossene Pfeilspitze) der antennalen sensorischen Neurone in dieser Ebene der Fotografie schwer möglich. In der Abbildung 3.3.1 ist das Eintreten der Fasern in das Projektionsareal P3 (geschlossene Pfeilspitze) nicht zu sehen.

Abb. 3.3.1

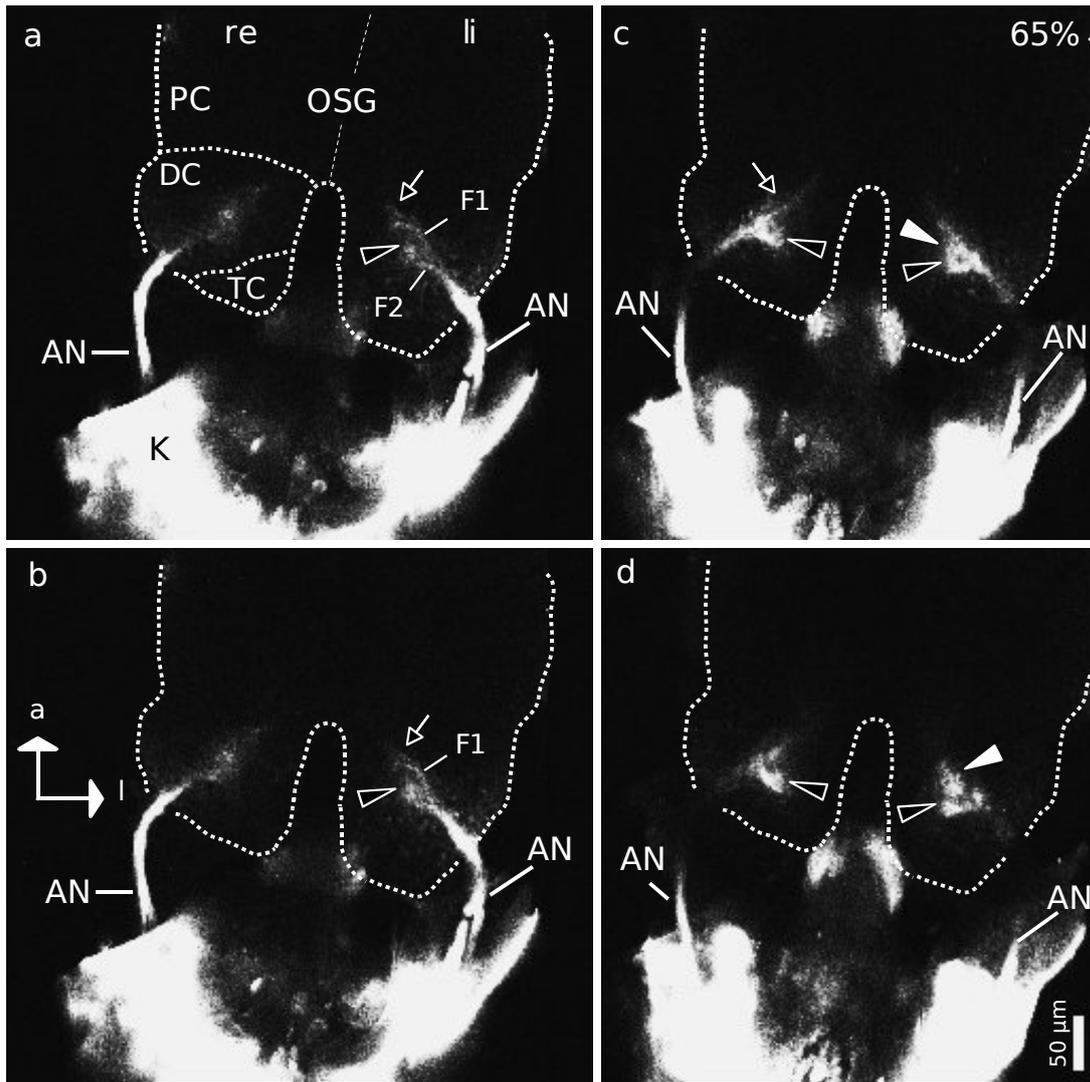


Abb. 3.3.1: Konfokale Fotografien von einem Ganzpräparat des Oberschlundganglions (OSG) eines 65%-igen Embryonen. Die Applikation am Antennennerv (AN). **a-d:** Vier Fotografien von verschiedenen Ebenen des Deutocerebrums von ventral nach dorsal. Das OSG und seine drei Teile (PC: Protocerebrum, DC: Deutocerebrum und TC: Tritocerebrum) sind mit einer gestrichelten Linie markiert. a: anterior; F1 und F2: Faserbündel antennaler sensorischer Neurone; geschlossene Pfeilspitze: Projektionsareal P3 von F3; K: Kutikula, die Eigenautofluoreszenz besitzt und deswegen stark fluoresziert. l: lateral; offener Pfeil: Projektionsareal P1 von F1; offene Pfeilspitze: Projektionsareal P2 von F2; re und li: die rechte und linke Hälfte des Oberschlundganglions.

In älteren Stadien der Grillenembryonen kann man besser verfolgen, wie die Axone der antennalen sensorischen Neuronen in verschiedene Areale projizieren und wie ihre Projektionen im Deutocerebrum verteilt sind. In den Abbildungen 3.3.2 und 3.3.3 sind die Faserbündel F1, F2 und F3 der antennalen sensorischen Neurone, sowie die Lokalisation ihrer Projektionsareale im Deutocerebrum in einem Ganzpräparat eines 70%-igen Embryonen und auf Schnitten von einem Oberschlundganglion eines 75%-igen Embryonen zu sehen. Die Axone der antennalen sensorischen Neurone treten aus dem Antennennerv lateral in das ventrale Deutocerebrum ein (Abb. 3.3.2a, schwarzer Pfeil und Abb. 3.3.3a und b, AN). Die Fasern im Faserbündel F1 laufen in anteriorer, medialer Richtung und enden im anterioren Deutocerebrum (Abb. 3.3.2a; kleine weiße Pfeile und Abb. 3.3.3d; schwarze Pfeile). Weitere Fasern laufen in eine posteriore, mediale Richtung (Abb. 3.3.2 und Abb. 3.3.3; F2). Diese Fasern enden im Projektionsareal P2 im posterioren Deutocerebrum und sind dort dicht gepackt. In der Abbildung 3.3.2d ist der am weitesten dorsal liegende Teil des Projektionsareals P2 im dorsalen Deutocerebrum zu sehen. Eine Gruppe der Fasern der antennalen sensorischen Neurone zieht anterior von dem Faserbündel F2 und posterior von dem Faserbündel F1 in das Deutocerebrum herein (Abb. 3.3.2a und c und Abb. 3.3.3b; F3). Sie laufen in eine mediale Richtung im Deutocerebrum und verzweigen sich im Projektionsareal P3 anterior von dem Projektionsareal P2 im Deutocerebrum (Abb. 3.3.2a und c und Abb. 3.3.3d; P3).

In der Abbildung 3.3.2d ist ein aufsteigendes Faserbündel im dorsalen Deutocerebrum (dF: dorsale Faserbündel) bei einem 70%-igen Grillenembryo zu erkennen, das in eine anteriore, mediale Richtung verläuft. Im dorsalen Deutocerebrum eines 75%-igen Embryonen ist ein absteigendes Faserbündel (aF) posterior zu erkennen, das von dort zum Schlundkonnektiv (SK) verläuft und dorsal in das Unterschlundganglion (USG) hereinzieht (Abb. 3.3.4c; aF). Die Abbildung 3.3.4a zeigt das Deutocerebrum in ventraler Ansicht. In einem 95%-igen Embryo ist auch ein absteigendes Faserbündel (aF) zu erkennen (Abb. 3.3.4d), das vom dorsalen Deutocerebrum zum Schlundkonnektiv (SK) läuft und dorsal in

das Unterschlundganglion hereintritt. Die ventrale Ansicht des Deutocerebrums wird in der Abbildung 3.3.4b gezeigt.

Abb. 3.3.2

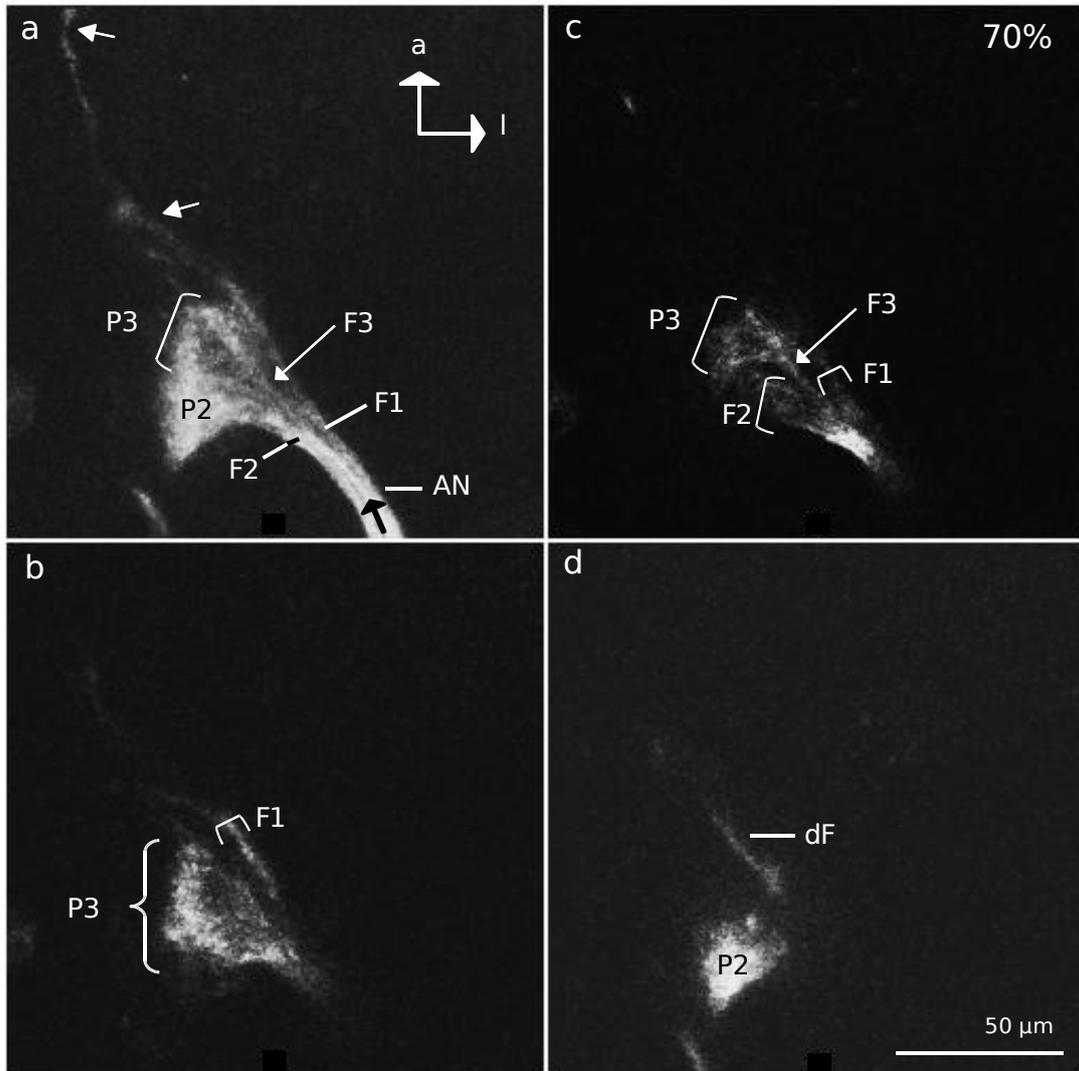


Abb. 3.3.2: Konfokale Fotografien von einem Ganzpräparat des Oberschlundganglions eines 70%-igen Embryonen. Dil Applikation am Antennennerven. **a-d:** Zu sehen sind die Projektionen der antennalen sensorischen Neurone im Deutocerebrum. **a:** Z-Projektion von einem Ausschnitt des Deutocerebrums; kleine weiße Pfeile: Projektionen einzelner Fasern von F1; schwarzer Pfeil: Antennennerv (AN). **b-d:** Drei Fotografien von verschiedenen Ebenen des Deutocerebrums von ventral nach dorsal. df: dorsales Faserbündel antennaler sensorischer Neurone; F1, F2 und F3: Faserbündel der antennalen sensorischen Neurone; P2 und P3: Projektionsareale von F2 und F3.

Abb. 3.3.3

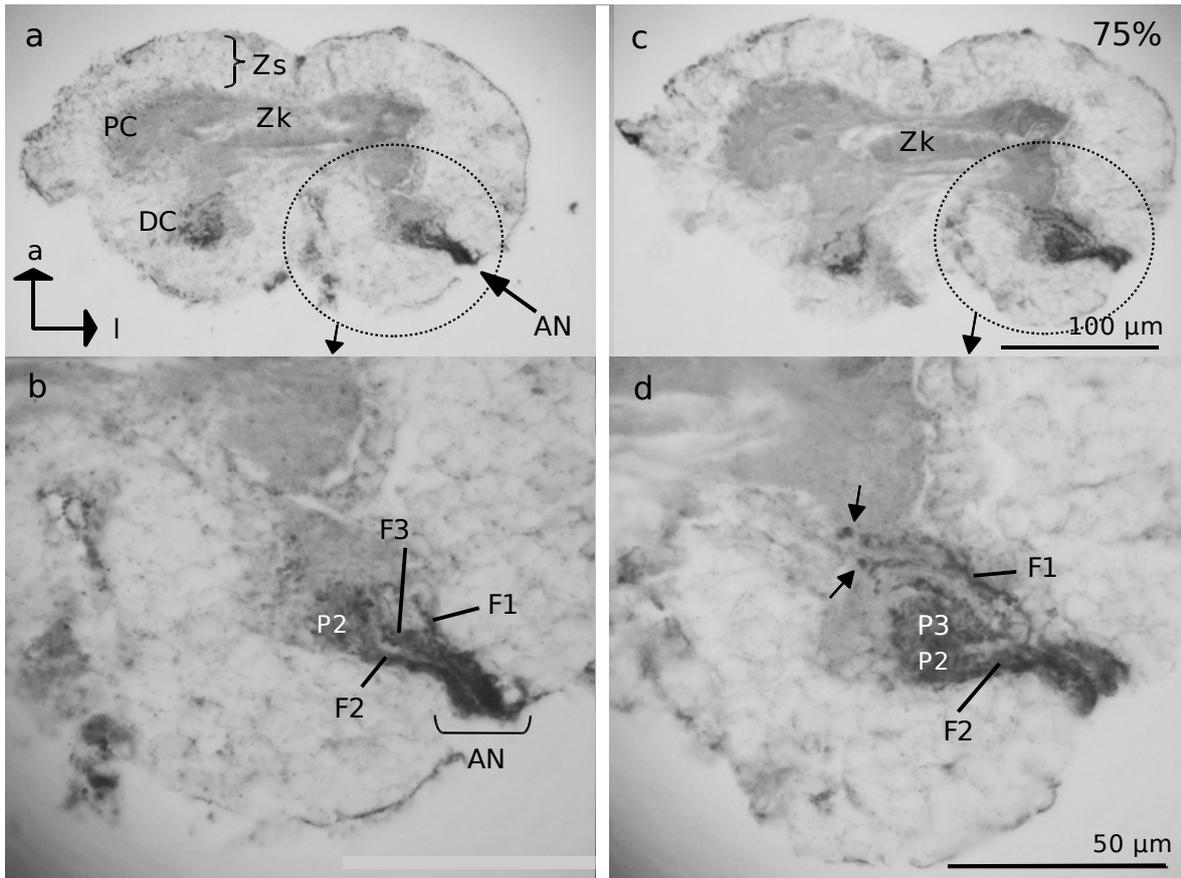


Abb. 3.3.3: Fotografien der Paraplastschnitte des Oberschlundganglions eines 75%-igen Embryonen; retrograde Füllung des Antennennerven (AN) vom Flagellum mit NiCl_2 ; Silber-Intensivierung bei Ganzpräparaten. **a** und **c**: Zwei Schnitte von einer Serie der horizontalen Schnitte des Oberschlundganglions; Schnittdicke: 5 μm . **b** und **d**: Deutocerebrum in der höheren Vergrößerung; schwarze Pfeile: Projektionen einzelner Fasern von F1.

DC: Deutocerebrum; F1, F2 und F3: Faserbündel der antennalen sensorischen Neurone; P2 und P3: Projektionsareale von F2 und F3; PC: Protocerebrum; schwarze Pfeile in d: Projektionen der Fasern von F1; Zs: Zellschicht des Oberschlundganglions (Kortex); Zk: Zentralkörper. Maßstab: 100 μm (in a und b) und 50 μm (in b und d).

Abb. 3.3.4

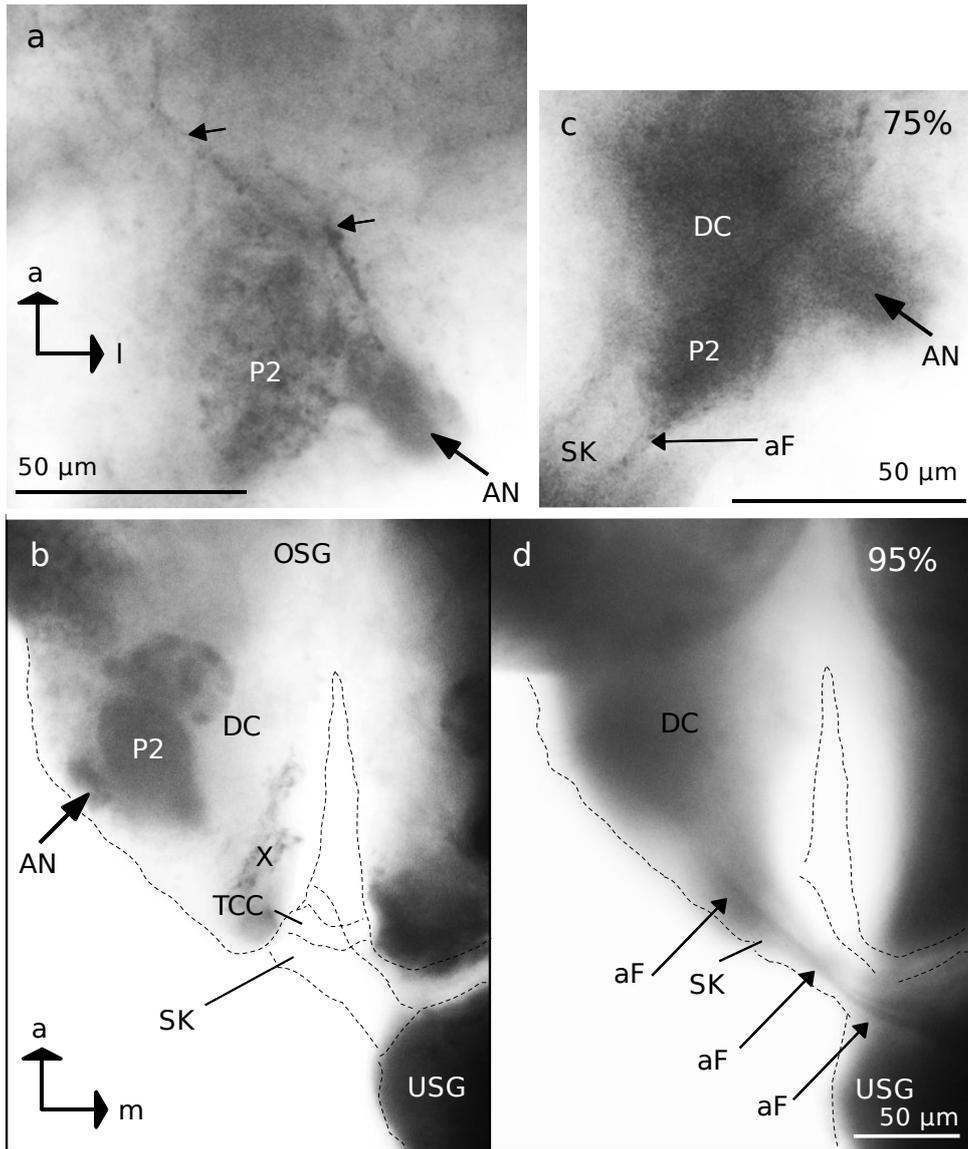


Abb. 3.3.4: Fotografien von Ganzpräparaten des Oberschlundganglions eines 75%-igen Embryonen (**a**) und eines 95%-igen Embryonen (**b**); retrograde Füllung des Antennennerven vom Flagellum mit NiCl_2 ; Silber-Intensivierung bei Ganzpräparaten. **a** und **b**: Deutocerebrum in der ventralen Ansicht; **c** und **d**: dorsale Ansichten von Deutocerebrum in a und in b.

aF; absteigendes Faserbündel antennaler sensorischer Neurone; AN: Antennennerv; DC: Deutocerebrum; OSG: Oberschlundganglion; P2: Projektionsareal der Fasern von F2; schwarze Pfeile: Projektionen einzelner Fasern von F1; SK: Schlundkonnektiv; TCC: Tritocerebralkommissur; USG: Unterschlundganglion; X: Fremdkörper. SK und TCC sind in b außerhalb des Fokus und deswegen werden sie mit einer gestrichelten Linie gezeichnet. Maßstab: 50 µm (in b und d).

In der Abbildung 3.3.5a ist das Eintreten der drei Faserbündel F1, F2 und F3 aus der Antenne eines 80%-igen Embryonen in das Deutocerebrum zu sehen. In dieser Abbildung sind im linken Deutocerebrum die einzelnen Fasern der antennalen sensorischen Neuronen zu erkennen, die parallel von lateral in das Projektionsareal P2 eintreten und dort in eine lateral-mediale Richtung laufen. Dann biegen sie in eine anteriore, laterale Richtung in diesem Projektionsareal ab. Die Fasern aus dem Faserbündel F1 treten anterior, lateral in das Projektionsareal P1 ein. Sie verzweigen sich und glomeruli-ähnliche Strukturen (G) bilden sich an den terminalen Endigungen dieser Fasern (Abb. 3.3.5a; G). In der Abbildung 3.3.5b und c sind die Glomeruli (Sterne) im Projektionsareal P1 im Deutocerebrum eines 80%-igen Embryonen besser zu erkennen. In der Abbildung 3.3.6a-b (Ganzpräparat) und 3.3.6c-h (Schnitte) sind die Glomeruli (G) im Projektionsareal P1 und die Projektionsareale P2 und P3 im Deutocerebrum des Oberschlundganglions bei 95%-igen Embryonen zu sehen.

Abb. 3.3.5

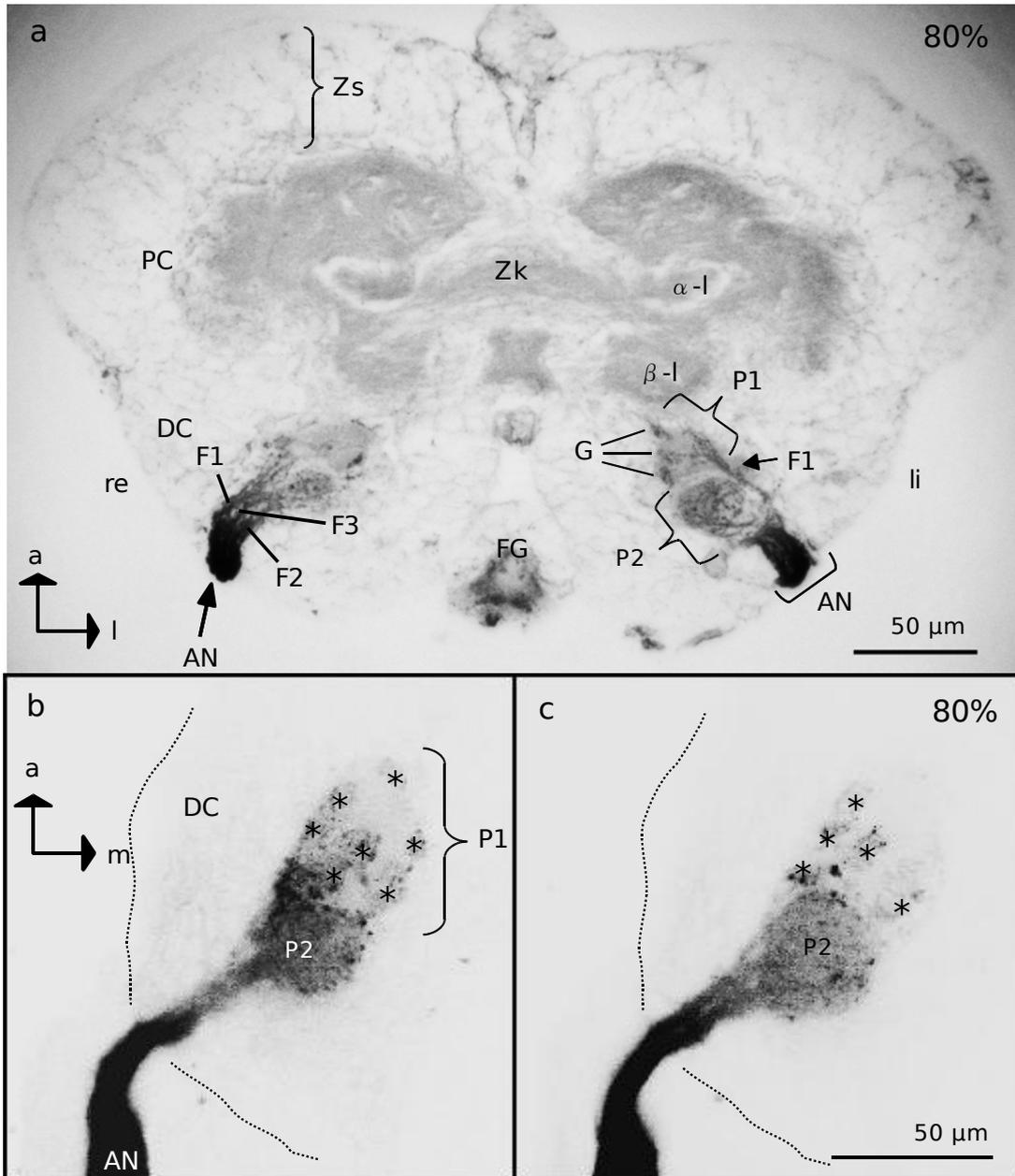


Abb. 3.3.5: **a:** Fotografie eines Paraplastschnittes des Oberschlundganglions eines 80%-igen Embryonen; retrograde Füllung des Antennennerven vom Flagellum mit NiCl_2 ; Silber-Intensivierung bei Ganzpräparaten. Ein Paraplastschnitt einer Serie der horizontalen Schnitte; Schnittdicke: 5 μm . F1, F2 und F3: Faserbündel der antennalen sensorischen Neurone; P1: Projektionsareal der Fasern von F1. **b** und **c:** Zu sehen sind zwei Konfokale Fotografien von einem Ganzpräparat des Deutocerebrums und der Antennenbasis eines 80%-igen Embryonen in verschiedenen Ebenen von ventral nach dorsal. Dil Applikation am Antennennerven.

AN: Antennennerv; DC: Deutocerebrum; FG: Frontalganglion; G (in a) und Sterne (in b und c): Glomeruli; PC: Protocerebrum; P2: Projektionsareal der Fasern von F2; Sterne: Glomeruli (G); Zs: Zellkorperschicht des Oberschlundganglions; Zk: Zentralkörper; α -l und β -l: alfa und beta-lobus des Pilzkörpers.

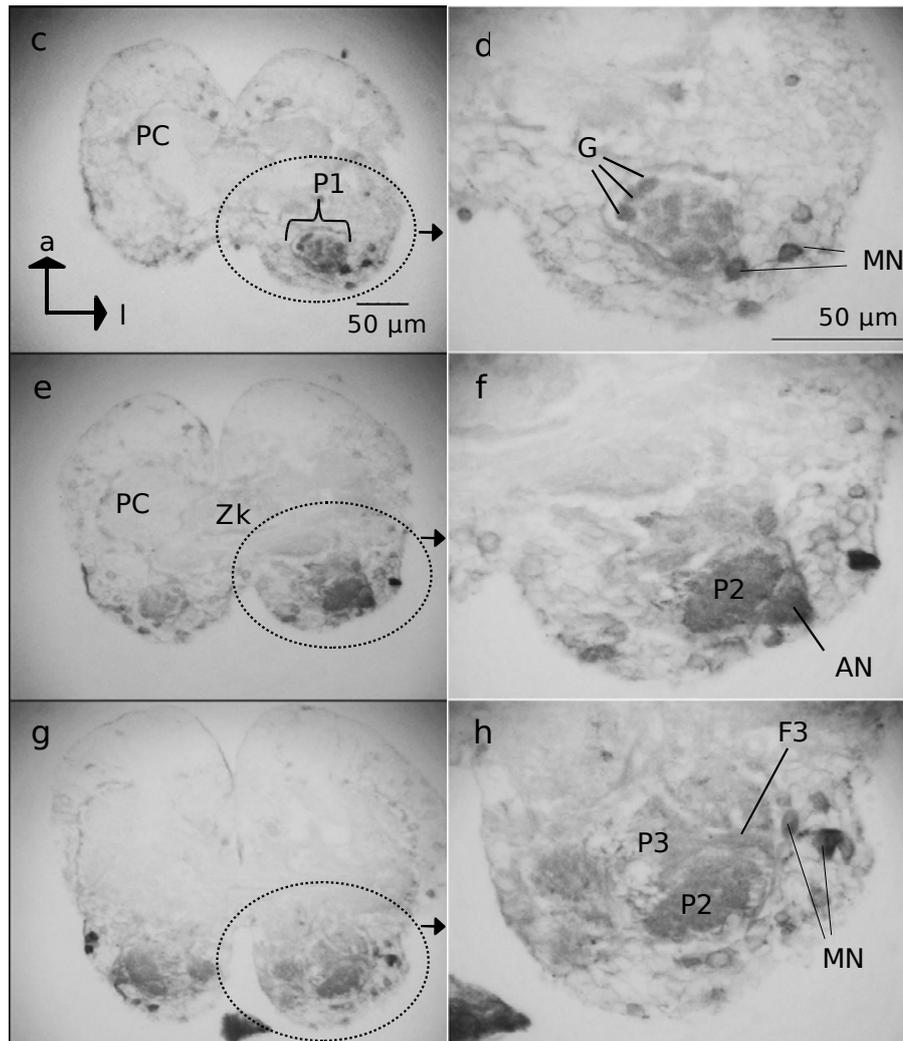
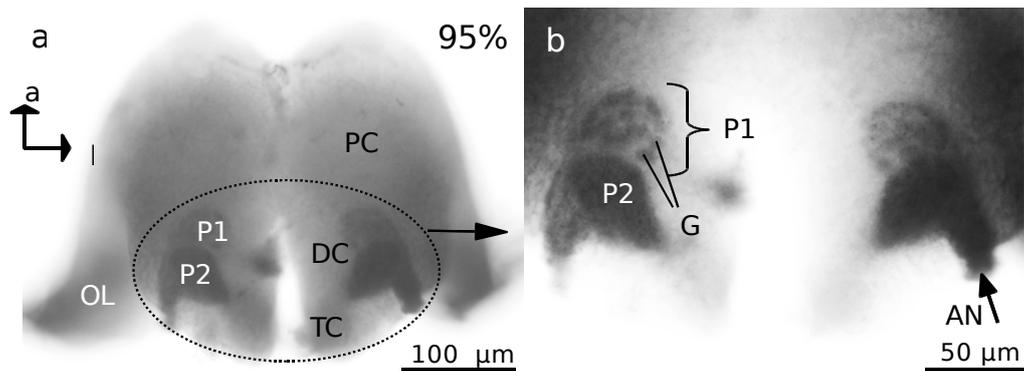


Abb. 3.3.6: Fotografien eines 95%-igen Embryonen; retrograde Füllung des Antennennerven vom Flagellum mit NiCl_2 ; Silber-Intensivierung bei Ganzpräparaten. **a:** Ganzpräparat des Oberschlundganglions. **b:** Deutocerebrum ist in der höheren Vergrößerung zu sehen. **c, e** und **g:** Paraplastschnitte des Oberschlundganglions; drei Schnitte von einer Serie der horizontalen Schnitte des Oberschlundganglions; Schnittdicke: 5 μm . **d, f** und **h:** Deutocerebrum ist in der höheren Vergrößerung zu sehen. AN: Antennennerv; DC: Deutocerebrum; G: Glomeruli; MN: Motoneurone; OL: optischer Lobus; PC: Protocerebrum; P1, P2 und P3: Projektionsareale der Fasern von Faserbündeln F1, F2 und F3; TC: Tritocerebrum; Zk: Zentralkörper.

3.3.2 Untersuchungen zu den Projektionsarealen einzelner mechano-sensorischer Neurone der Antennenbasis

Um die Projektionsareale einzelner basaler mechano-sensorischer Neurone der Grillenembryonen zu zeigen, wurden die einzelnen Zellen durch die iontophoretische Injektion der Farbstoffe (Neurobiotin oder Lucifer Yellow) in die Zellkörper dieser Zellen gefärbt. Dabei wurden die mechano-sensorischen Neurone beziehungsweise Organe des zweiten Antennensegments (Pedicellus), besonders die campaniformen Sensillen und Chordotonalorgane, berücksichtigt. Die Einstichstellen der Elektrode wurden so ausgewählt, dass entweder eines der campaniformen Sensillen oder ein Neuron der Chordotonalorgane injiziert wird.

Bei 30 (N = 22; Neurobiotin und N = 8; LY) von insgesamt 100 Individuen wurden Zellen gefärbt. In der Tabelle 3.3.1 sind die Eigenschaften der Injektionen der Farbstoffe in die einzelnen Zellen, Informationen über die angefärbten Zellen und die Präparate aufgelistet, bei denen Zellen angefärbt sind. Etwa 20% der gefärbten Zellen wurden mit ihrem Axonansatz gefärbt (siehe Tabelle 3.3.1). Keine dieser Zellen weist ein Axon auf, das bis in das Oberschlundganglion verfolgt werden kann.

Tabelle 3.3.1: Informationen über die Einzelzellfärbungen der Zellen im zweiten Antennenbasissegment, im Pedicellus (Pe) der Grillenembryonen durch iontophoretische Injektionen von Lucifer Yellow (LY) oder Neurobiotin (Nb). Präparat No: die erste Zahl ist der Name des Embryonen. Die Zahl hinter dem Schrägstrich zeigt die Häufigkeit der Einstiche der Elektrode. re und li: rechte und linke Antenne; m: medial; l: lateral. Eigenschaften der Injektionen: Die Stromstärke (nA), mit der die verschiedenen Farbstoffe (LY und Nb) in die Zelle gebracht wurden, wird angegeben. LY wurde durch Hyperpolarisation und Nb durch Depolarisation mit einem „duty cycle“ von 50% (100 ms = Pulsdauer) in die Zelle gebracht. P: gepulst; „ ' “: die Dauer der Injektion des Farbstoffes in Minuten. Die Angabe nach der Dauer der Injektion ist die Dauer der Diffusion des Farbstoffes. Wenn keine Zeitangabe nach der Dauer der Injektion steht, heißt das, dass das Präparat nach der Injektion gleich fixiert wurde. h: Stunde; ÜN: Über Nacht; x: Angabe fehlt. MΩ: Widerstand der Elektrode.

Tabelle 3.3.1

Präparat No	Farbstoff	Alter des Embryonen [%]	Injektionsstelle	Eigenschaften der Injektionen	Membranpotenzial der Zellen	Färbung
18	LY	50	Pe/li/m	4 nA, 4', 20 MΩ	-20 mV	Zellkörper (Ø = 12 µm), Axonansatz (17 µm)
25	LY	45	Pe/re	3 nA, 5', 30 MΩ	-25 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (10 µm)
28	LY	45	Pe/re/l	3 nA, P, 8', 25 MΩ	-20 mV	Zellkörper (Ø = 6 µm)
30	LY	45	Pe/li/l	3 nA, P, 5', 30 MΩ	-40 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm)
36/2	LY	45	Pe/li/l	3 nA, P, 5', 28 MΩ	-30 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm)
39/2	LY	45	Pe/re/m	3 nA, P, 5', 20 MΩ	-25mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (2 µm)
56/2	Nb	45	Pe/re/l	3 nA, P, 5', 1 h, 30 MΩ	-25 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (5 µm)
62/1	Nb	45	Pe/re/mi	3 nA, P, 10', ÜN, 40 MΩ	-25 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (2 µm)
66	Nb	55	Pe/re/m	3 nA, P, 20', ÜN, 30 MΩ	-30 mV	Zellkörper (Ø = 7 µm), Axonansatz (3 µm)
67/2	Nb	55	Pe/re/m	3 nA, P, 20', ÜN, 32 MΩ	-35 mV	Abb.3.3.8c Zellkörper (Ø = 8 µm), Axonansatz (10 µm)
69/2	Nb	45	Pe/li/l	1,2 nA, 20', ÜN, 30 MΩ	-40mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (11 µm)

Präparat No	Farbstoff	Alter des Embryonen [%]	Injektionsstelle	Eigenschaften der Injektionen	Membranpotenzial der Zellen	Färbung
71/4	Nb	50	Pe/li/m	1,2 nA, P, 20', ÜN, 32 MΩ	-20 mV	Abb.3.3.8a Zellkörper (Ø = 12 µm)
75/1	Nb	45	Pe/li/l	3 nA, P, 45', 45 MΩ	-30 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (5 µm) und 1 Hüllzelle (Ø = 5 µm)
75/2	Nb	45	Pe/li/m	3 nA, P, 30', 38 MΩ	-20 mV	2 Zellkörper (Ø = 10 µm), 1 Zellkörper (Ø = 5 µm)
78/3	Nb	50	Pe/li/l	3 nA, P, 10', ÜN, 30 MΩ	-40 mV	Zellkörper (Ø = 7 µm), Axonansatz (5 µm)
78/1	Nb	50	Pe/li/m	3 nA, P, 15', ÜN, 30 MΩ	-32 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (2 µm)
79	Nb	40	Pe/li/m	3 nA, P, 30', 40 MΩ	-40 mV	Zellkörper (x)
83/1	Nb	50	Pe/re/l	3 nA, P, 30', 3 h, 25 MΩ	-20 mV	Zellkörper (x)
85/1		45	Pe/re/m	4,5 nA, P, 10', 4 h, 25 MΩ	x	Zellkörper (Ø = 5 µm)
86/1	Nb	40	Pe/li/l	3 nA, P, 15', 2 h, 30 MΩ	-30 mV	Abb.3.3.7a-b Zellkörper (Ø = 9 µm), Axonansatz (5 µm)
87/1	Nb	50	Pe/re/l	3 nA, P, 15', 3 h, 25 MΩ	-10 mV	Zellkörper (Ø = 7 µm)
87/3	Nb	50	Pe/re/m	3 nA, P, 15', 3 h, 25 MΩ	-5 mV	Zellkörper (Ø = 5 µm)

Präparat No	Farbstoff	Alter des Embryonen [%]	Injektionsstelle	Eigenschaften der Injektionen	Membranpotenzial der Zellen	Färbung
88/1	Nb	55	Pe/li/l	3,5 nA, P, 15', 3 h, 25 MΩ	-32 mV	Zellkörper (x)
90/1	Nb	43	Pe/re/l	3 nA, P, 30', ÜN, 40 MΩ	-30 mV	Zellkörper (Ø = 5 µm)
91/1	Nb	50	Pe/li/m	2 nA, P, 20', ÜN, 25 MΩ	-15 mV	2 Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (16 µm und 18 µm) und 1 Hüllzelle (Ø = 10 µm)
92/2	Nb	50	Pe/li/l	3 nA, P, 20', 1 h, 40 MΩ	-20 mV	Zellkörper (Ø = 6 µm), Axonansatz (6 µm)
94/1	Nb	48	Pe/re/l	1 nA, P, 10', 40 MΩ	-20 mV	Abb.3.3.7c Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (15 µm)
94/2	Nb	48	Pe/li/l	1 nA, P, 10', 20 MΩ	-20 mV	Abb.3.3.7d Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (7 µm) und 1 Hüllzelle (Ø = 10 µm)
95/2	Nb	50	Pe/li/l	0,6 nA, 5', 1 h, 30 MΩ	-30 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm), Axonansatz (10 µm)
98/3	Nb	55	Pe/re/l	1 nA, P, 20', ÜN, 40 MΩ	-20 mV	3 Zellkörper (Ø = 10 µm)
99/2	Nb	48	Pe/li/l	1 nA, P, 10', ÜN, 40 MΩ	-10 mV	3 Zellkörper in Epithelschicht (Ø = 15 µm)
99/4	Nb	48	Pe/re/l	1 nA, P, 10', ÜN, 30 MΩ	-40 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm) Axonansatz (2 µm)

Präparat No	Farbstoff	Alter des Embryonen [%]	Injektionsstelle	Eigenschaften der Injektionen	Membranpotenzial der Zellen	Färbung
100/3	Nb	53	Pe/re/l	1 nA, P, 10', 5 h, 30 MΩ	-20 mV	Zellkörper (Ø = 10 µm) Axonansatz (5 µm) und 1 Zellkörper (Ø = 10 µm)

Im Folgenden werden die angefärbten Zellen im Pedicellus im Beispiel von vier Grillenembryonen gezeigt, die sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung (Embryo 86: 40%, Embryo 94: 48%, Embryo 71: 50% und Embryo 67: 55%) befinden. Für mehr Informationen über die Färbungen dieser Beispiele siehe die Tabelle 3.3.1.

In der Abbildung 3.3.7a ist ein Neuron (Ø = 9 µm) mit einem kurzen Axonansatz (5 µm) in der linken Antenne im distalen Pedicellus eines 40%-igen Grillenembryonen (Embryo 86) zu sehen. Der Zellkörper dieses Neurons liegt lateral im Pedicellus und befindet sich noch in der Epithelschicht (E). In der Abbildung 3.3.7b zeigt ein Pfeil seinen Axonansatz. Das Axon zieht ins Lumen (L) der Antenne und ist nicht weiter zu verfolgen. Im rechten und linken Pedicellus eines 48%-igen Embryonen (Embryo 94) wurden Neurone mit ihren Axonansatz angefärbt (Abb. 3.3.7c und d). Das angefärbte Neuron (Stern) in der Abbildung 3.3.7c ist in der Abbildung 3.3.7d vergrößert zu sehen. Wie man in der Abbildung 3.3.7c sieht, erstreckt sich das Neuron (Ø = 10 µm) im lateralen Pedicellus von lateral nach median. Das Axon dieses Neurons (Pfeil) mit seiner Länge von etwa 15 µm läuft in das Lumen der Antenne nach medial zum Zentrum dieses Antennensegments. Dort hört die Färbung des Axons auf. Im linken Pedicellus des gleichen Embryos (Embryo 94) liegt ein angefärbtes Neuron (Ø = 10 µm) mit seinem Axon (7 µm) in einer proximal-distalen Achse der Antenne (Abb. 3.3.7d, Stern). Lateral von dem mit dem Stern markierten Neuron ist eine gefärbte Zelle (Ø = 10 µm) zu erkennen, die kein Axon aufweist. Diese Zelle ist vermutlich eine der Hüllzellen des gefärbten Neurons (Abb. 3.3.7d, Hz). Im linken Pedicellus eines 50%-igen Embryonen

(Embryo 71) ist ein gefärbter Zellkörper (Stern) eines Neurons in der Abb.3.3.8a zu sehen. Der Zellkörper ($\emptyset = 12 \mu\text{m}$) liegt medial im distalen Pedicellus. Dieses Neuron weist ebenfalls kein Axon auf. In der Abbildung 3.3.8b sind die campaniformen Sensillen (CS) des Pedicellus der rechten Antenne eines 50%-igen Embryonen zu sehen. Die campaniformen Sensillen sind mit einem neuron-spezifischen Antikörper gegen HRP (Meerrettichperoxidase) gefärbt. Die durch die Einzelzellfärbung angefärbte Zelle in der Abbildung 3.3.8a liegt im distalen Bereich des Pedicellus genauso wie die campaniformen Sensillen des Pedicellus. Die Form dieser Zelle ist der Form der campaniformen Sensillen ähnlich. Außerdem ist diese Zelle ($\emptyset = 12 \mu\text{m}$) ungefähr so groß wie die campaniformen Sensillen (ca. $10 \mu\text{m}$). Im Pedicellus eines 55%-igen Embryos (Embryo 67) wurde ein Neuron ($\emptyset = 8 \mu\text{m}$) mit seinem Axon (Pfeil) mit einer Länge von etwa $10 \mu\text{m}$ angefärbt (Abb. 3.3.8c, Stern). Sein Axon läuft nach proximal in diesem Segment. Die Färbung des Axons hört im Pedicellus auf. Die Projektion dieses Neurons ist nicht zu verfolgen. Eine der Hüllzellen (Hz) dieses Neurons, die medial von diesem Neuron in der Abbildung 3.3.8c zu sehen ist, ist schwach mit angefärbt. In der Abbildung 3.3.8d sind das Neuron und die Hüllzelle in höherer Vergrößerung zu sehen.

Abb. 3.3.7

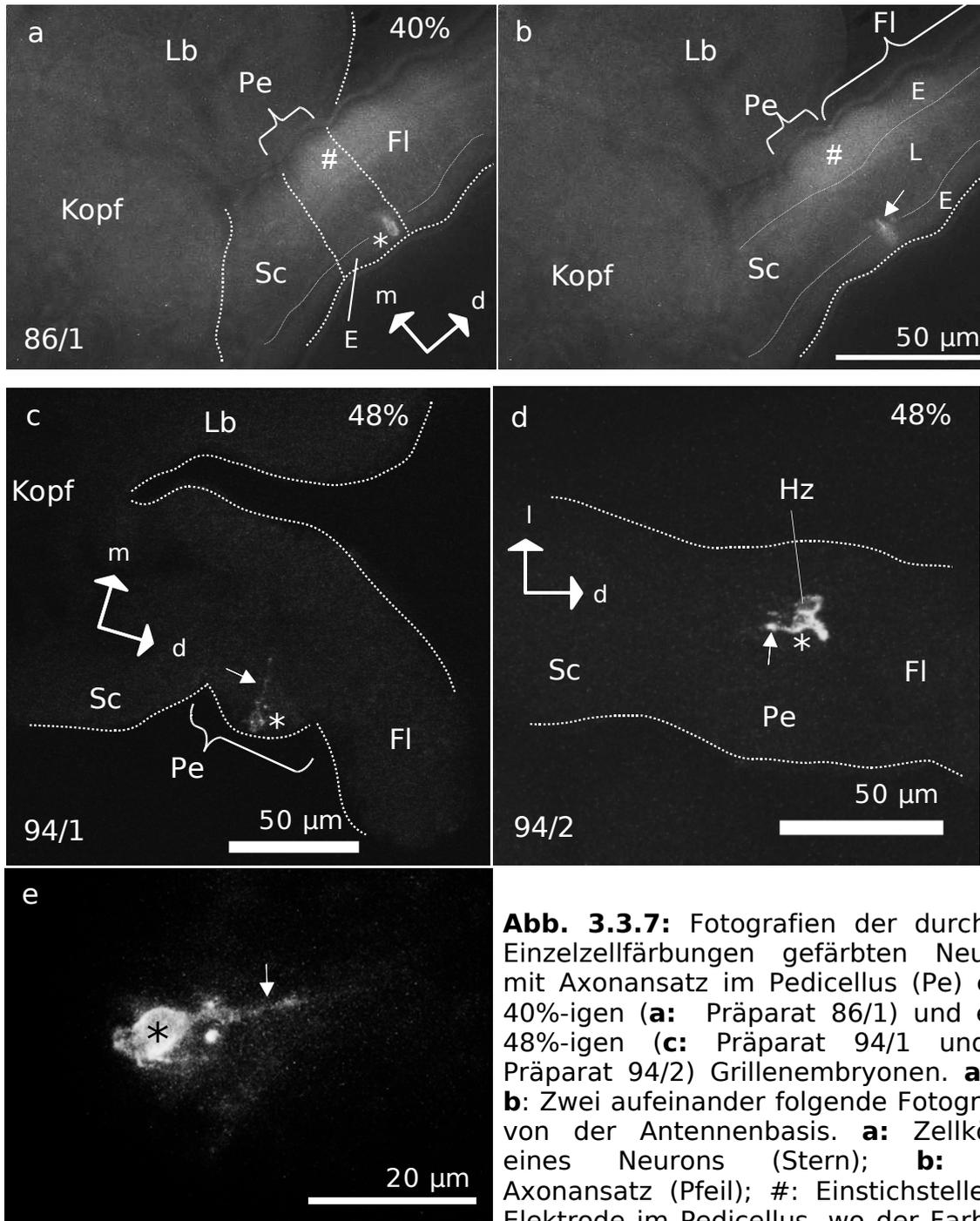


Abb. 3.3.7: Fotografien der durch die Einzelzellfärbungen gefärbten Neurone mit Axonansatz im Pedicellus (Pe) eines 40%-igen (**a**: Präparat 86/1) und eines 48%-igen (**c**: Präparat 94/1 und **d**: Präparat 94/2) Grillenembryonen. **a** und **b**: Zwei aufeinander folgende Fotografien von der Antennenbasis. **a**: Zellkörper eines Neurons (Stern); **b**: sein Axonansatz (Pfeil); #: Einstichstelle der Elektrode im Pedicellus, wo der Farbstoff unspezifisch ins Gewebe diffundiert ist. **c**: Neuron mit seinem Axonansatz (Pfeil) im rechten Pedicellus; Stern: sein Zellkörper. **d**: Ein angefärbtes Neuron mit seinem Axonansatz (Pfeil) und einer Hüllzelle (Hz) sind im linken Pedicellus zu sehen. **e**: Neuron in c ist stärker vergrößert. d: distal; E: Epithelschicht; Fl: Flagellum; Lb: Labrum; l: lateral; m: medial; Pfeil: Axonansatz; Sc: Scapus; Stern: Zellkörper des Neurons.

Abb. 3.3.8

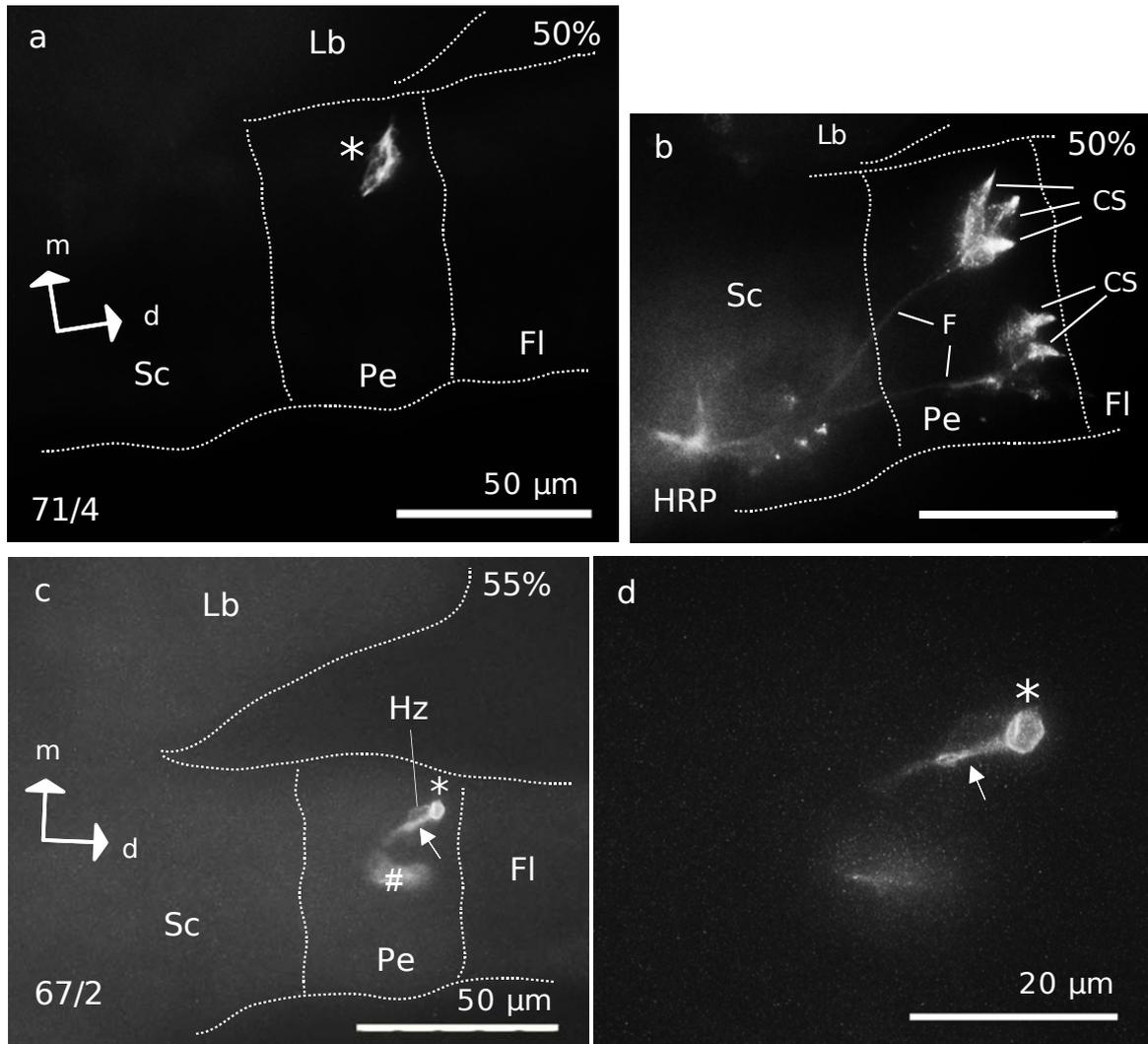


Abb. 3.3.8: **a:** Fotografie des durch die Einzelzellfärbung angefärbten Zellkörpers (Stern) eines Neurons im medialen Pedicellus (Pe) eines 50%-igen Grillenembryonen. Präparat 71/4. **b:** Mit Hilfe von HRP (Meerrettichperoxidase)-Immunhistochemie gefärbten campaniforme Sensillen des Pedicellus eines 50%-igen Grillenembryonen. CS: Zellkörper der campaniformen Sensillen; F: Faserbündel der Axone der campaniformen Sensillen. Maßstab: 50 μ m. **c:** Fotografie eines durch die Einzelzellfärbung angefärbten Neurons mit seinem Axonansatz im medialen Pedicellus eines 55%-igen Grillenembryonen. Präparat 67/2 **d:** Neuron in c ist vergrößert zu sehen.
d: distal; Fl: Flagellum; Hz: Hüllzelle; Lb: Labrum; m: medial; Pe: Pedicellus; Pfeil: Axonansatz; Sc: Scapus; Stern: Zellkörper des Neurons.

3.3.3 Membranpotenzial der Zellen der Antennenbasis

In den intrazellulären Versuchen, deren Ergebnisse in Kapitel 3.3.2 geschildert wurden, deutet sich an, dass die embryonalen Neurone vermutlich noch nicht elektrisch aktiv sind. Während der Injektion verhielten sich diese angefärbten Zellen ruhig und es waren keine Aktionspotentiale zu erkennen. Die angefärbten embryonalen Zellen weisen ein Membranpotenzial von -5 mV bis -42 mV auf (siehe Tabelle 3.3.1). In der Abbildung 3.3.9a und b sind die Ausschnitte aus zwei Aufzeichnungen zu sehen, die während der Penetration der Zellkörper mit der Elektrode aufgenommen wurden. Die zwei Grafiken zeigen die Membranpotenziale zweier Zellen, die im Pedicellus der Grillenembryonen gefärbt wurden, die sich in 45% (Embryo 56/2) und 50% (Embryo 71/4) der Embryogenese befinden. Die Penetration ihrer Zellkörper wird von einem Abfall des Potenzials begleitet. Das Membranpotenzial der Zelle im Pedicellus des Embryonen 56/2 beträgt ca. -25 mV (Abb. 3.3.9a und b). Eine andere Zelle im Pedicellus des Embryonen 71/4 weist ein Membranpotenzial von ca. -20 mV auf (Abb. 3.3.9b). Eine Fotografie dieser Zelle ist in der Abb. 3.3.8a zu sehen. Für die Enzellheiten der Injektion siehe die Tabelle 3.3.1. Im Verlauf der Penetration der angefärbten Zellen bleiben die Membranpotenziale dieser Zellen nicht ganz stabil und zeigen Schwankungen. Wie man in der Abb. 3.3.9a sieht, steigt das Membranpotenzial von -25 mV innerhalb von ca. 2,5 Sekunden um ca. 10 mV an und bleibt dann stabil bis zur Injektion der Zelle. Ebenso steigt das Membranpotenzial der anderen Zelle von -20 mV innerhalb von ca. 5 Sekunden um 10 mV an und bleibt dann stabil bis zur Injektion der Zelle (Abb. 3.3.9b). Das Membranpotenzial (-40 mV) einer Zelle im Pedicellus des Embryonen 78/3 fällt innerhalb einer Sekunde um 5 mV weiter ab und dann bleibt das Potenzial stabil bis zur Injektion der Zelle (Grafik nicht gezeigt).

In der Abbildung 3.3.9c werden Membranpotenziale der angefärbten Zellen im Pedicellus der Embryonen (40% - 55%) gezeigt (N = 31). Bei verschiedenen Stadien der Embryonen weisen die angefärbten Zellkörper

im Pedicellus unterscheidliche Membranpotenziale von -5 mV bis -42 mV auf (siehe Tabelle 3.3.1). Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Embryonen und dem Membranpotenzial der Zellen ($r = -0.26$, $N = 31$, Spearman Rang-Korrelation, $p = 0.16$).

Die Grafik in der Abbildung 3.3.9d zeigt die Häufigkeit des Vorkommens unterschiedlicher Membranpotenziale der angefärbten Zellen im Pedicellus der Grillenembryonen (40% - 55%). Die bei den erfolgreichen Injektionen aufgetretenden Membranpotenziale wurden in Klassen mit der Klassenbreite 10 mV geteilt. Am häufigsten haben die angefärbten Zellen ein Membranpotenzial von ca. -30 mV ($N = 11$). Das zweit-häufigste gemessene Membranpotenzial beträgt ca. 20 mV ($N = 10$).

Um zu testen, ob die Elektrode intrazellulär ist, wurden Rechteckpulse von 100 ms Dauer in unregelmäßigen Abständen während der Injektion der Zellen gegeben. Die Abbildung 3.3.10a und 3.3.10b zeigen, die Pulse, die vor der Penetration der Zellen gegeben wurden. In der Abbildung 3.3.10c und 3.3.10d sind zwei Pulse zu sehen, die während der Injektion der Zellen im Pedicellus der Embryonen 87/1 (in c) und 88/1 (in d) gegeben wurden. Bei beiden Injektionen wurden Zellkörper angefärbt (für die Einzellheiten der Färbung siehe die Tabelle 3.3.1). Die Form der Pulse hat sich während der Injektion der Zelle im Pedicellus des Embryonen 87/1 nicht geändert. In der Abbildung 3.3.10d sieht man eine Änderung in der Form der Rechteckpulse während der Injektion der Zelle im Pedicellus des Embryonen 88/1. Obwohl die Formen der Rechteckpulse, die während der Injektion der Zellen im Pedicellus der Embryonen 87/1 und 88/1 gegeben wurden, Unterschiede zeigen, wurden bei beiden Injektionen Zellkörper angefärbt. Die Änderung der Formen der Rechteckpulse während der Injektion ist keinen Hinweis darauf, dass die Elektrode intrazellulär ist.

Abb. 3.3.9: **a-b:** Ausschnitte aus zwei Aufzeichnungen während der Penetration der Zellkörper. Grafiken zeigen das Membranpotenzial der Zelle. **a:** Membranpotenzial (ca. -25 mV) einer Zelle im Pedicellus des Embryonen 56/2. **b:** Membranpotenzial (ca. -20 mV) einer Zelle im Pedicellus des Embryonen 71/4. **c:** Membranpotenziale der Zellen, die sich im Pedicellus der Grillenembryonen zwischen 40% und 55% der Embryogenese befinden ($N = 31$). Die Zahlen in Klammer zeigen die Häufigkeit des Vorkommens der jeweiligen Werte. **d:** Häufigkeit des Auftretens unterschiedlicher Membranpotenziale der Zellen, die sich im Pedicellus der Grillenembryonen zwischen 40% und 55% der Embryogenese befinden ($N = 31$). Klassenbreite = 10 mV.

Abb. 3.3.9

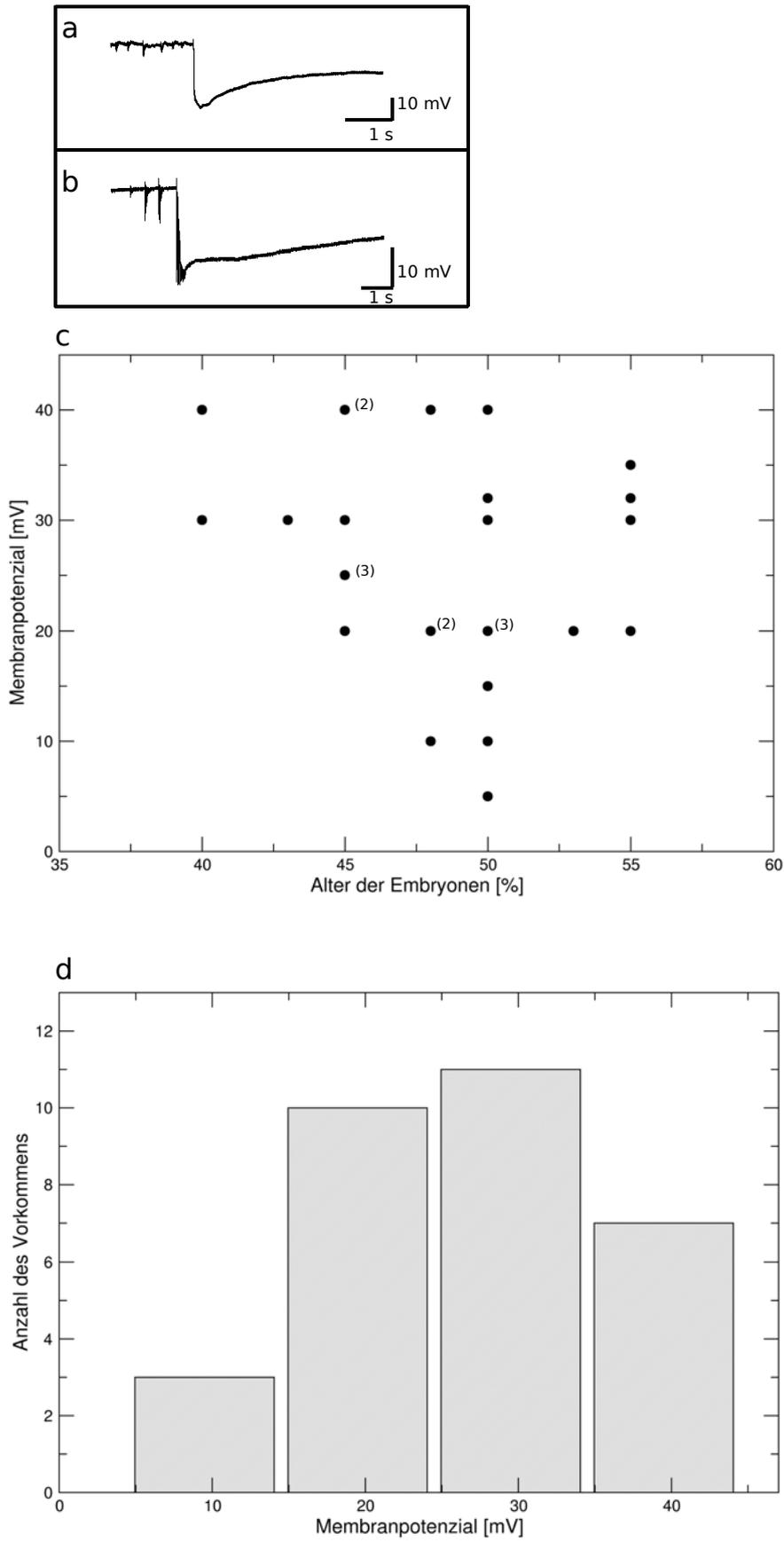


Abb. 3.3.10

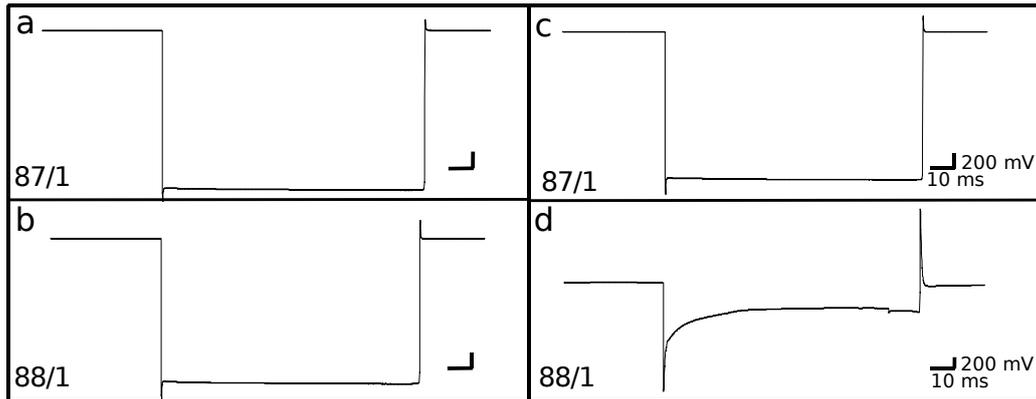


Abb. 3.3.10: Rechteckpulse (Dauer = 100 ms) sind zu sehen, die vor der Penetration der Zellen (**a**) und (**b**) und während der Injektion der Zellen im Pedicellus der Embryonen 87/1 (**c**) und 88/1 (**d**) gegeben wurden.

3.4 Entwicklung und Verzweigung absteigender Interneurone

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es auch, zu zeigen, wann und wo die Interneurone entstehen, die vom Oberschlundganglion zu den Thorakalganglien absteigen, und wo im Oberschlundganglion sie sich verzweigen. Um das heraus zu finden, wurden sie durch Retrograde-Füllungen an einem ganzen Halskonnektiv oder durch Injektionen verschiedener Farbstoffe (Lucifer Yellow bzw. Neurobiotin) in ein Halskonnektiv der Grillenembryonen zwischen 60% und 95% der Embryogenese gefärbt. Im Folgenden werden die Verteilung ihrer Zellkörper und ihre Verzweigung im Oberschlundganglion mit Hilfe von Zeichnungen und Fotografien von Ganzpräparaten und Schnitten dargestellt. Ihre Anzahl wird in Form von Tabellen und Grafiken gezeigt.

3.4.1 Nomenklatur

In diesem Kapitel werden zur Vereinfachung der Beschreibung der Interneurone und Interneurongruppen die folgenden Kurzbezeichnungen eingeführt. Die Zellkörper der Interneurone befinden sich entweder in der ipsilateralen oder kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions. Wenn die Zellkörper der Interneurone auf der Seite der Konnektiv-Füllung lokalisiert sind, werden sie ipsilateral genannt. Die Interneurone, die ihre Zellkörper auf der gegenüber liegenden Seite der Konnektiv-Füllung haben, werden als kontralateral bezeichnet. Die Zellkörper der Interneurone kommen meistens in Gruppen vor. Die ipsilateral absteigenden Gruppen der Interneurone werden dann als iG und die kontralateral absteigenden Gruppen der Interneurone werden als cG bezeichnet. Unterschiedliche Gruppen werden nummeriert (iG1-iG8 und cG1-cG5). Nach dieser Nomenklatur heißt die Gruppe iG1, ipsilateral absteigende Interneurone mit ihren Zellkörpern in der Gruppe 1. Eine Gruppe der Zellkörper, die medial im Oberschlundganglion lokalisiert ist, wird mG1 (mediale Gruppe 1) genannt. In einer Gruppe werden diejenigen Interneurone nummeriert, die morphologisch (mit ihren Verzweigungen)

charakterisiert werden konnten. Das erste charakterisierte Interneuron in der Gruppe iG1 bezeichnet man als iG1-1. Einzelne liegende Zellkörper und kleine Gruppen der Zellkörper werden als ix bzw. cx (ipsi- bzw. kontralateraler Zellkörper bzw. Zellgruppe) bezeichnet. Diese Interneurone werden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt, weil sie jeweils in verschiedenen Bereichen und Positionen im Oberschlundganglion vorkommen. Aus diesem Grund ist es nicht möglich sie irgendeiner Gruppe zuzuordnen.

3.4.2 Achsensystem

Die Darstellung der Positionen der Zellkörper der Interneurone und die Beschreibung ihrer Verzweigung im Oberschlundganglion erfolgt nach den Neuroachsen (Boyan et al., 1993). Die Positionen der Gruppen der Zellkörper werden in folgender Reihenfolge dargestellt: 1. ventral-dorsal Achse, 2. medial-lateral Achse und 3. anterior-posterior Achse. Diese Achsen im Oberschlundganglion werden in der Abbildung 3.4.1 gezeigt. Bei der Beschreibung der Position der Zellgruppen in der zweiten Achse (medial-lateral Achse) wird die Abkürzung mi (mitte) für die Mitte dieser Achse eingeführt, um die Beschreibung der Position der Zellgruppen in dieser Achse zu verdeutlichen. Die Zellkörper der Interneurone kommen lediglich im Kortex des Oberschlundganglions vor (Abb. 3.4.1, K). Deswegen muss man darauf achten, dass mit den Achsenbeschreibungen „ mitte“ und „medial“ nicht die Mitte oder das Zentrum des Oberschlundganglions gemeint ist, sondern die Mitte der jeweiligen Achse.

Abb. 3.4.1

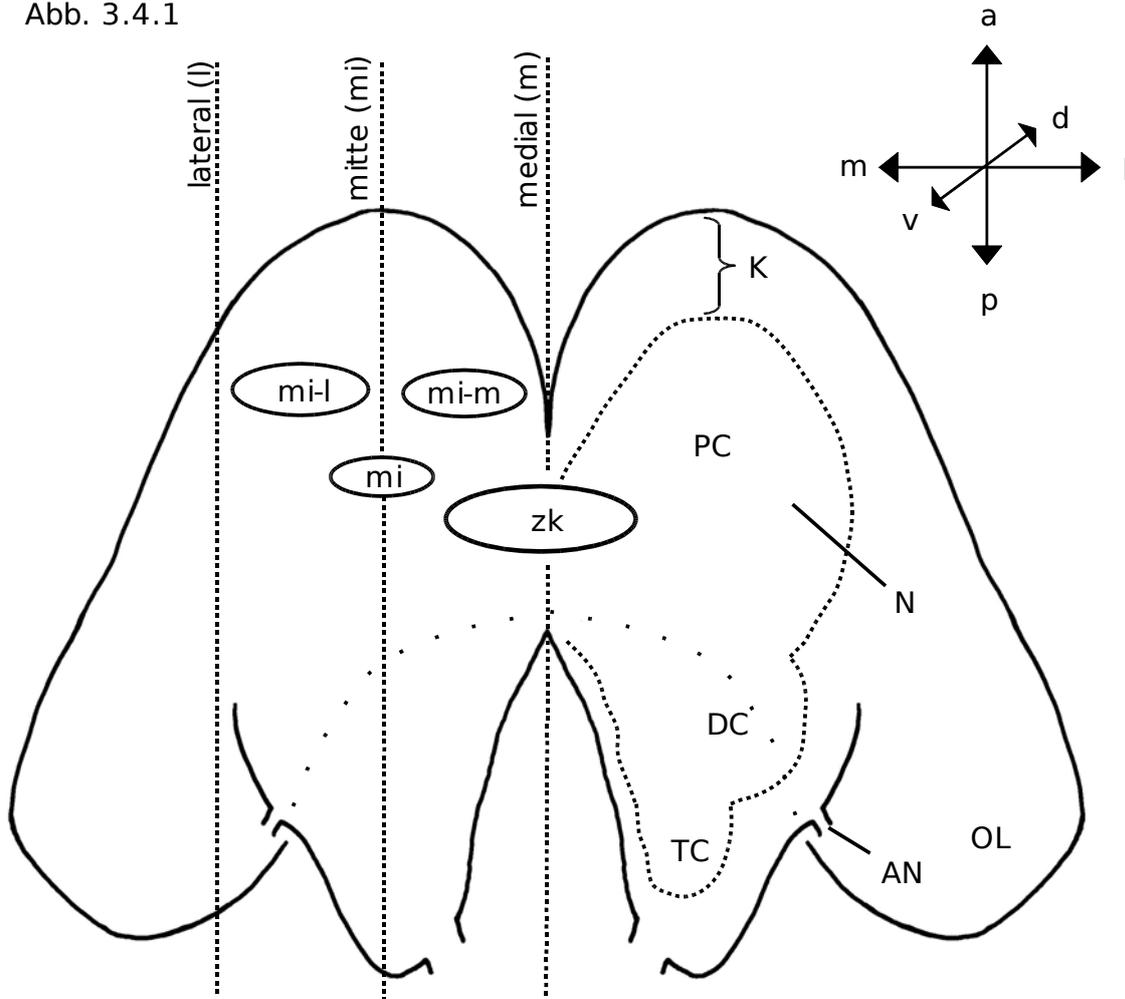


Abbildung 3.4.1: Schematische Darstellung des Oberschlundganglions eines Grillenembryonen. Dargestellt sind die Achsen, mit deren Hilfe die Position der Zellkörper der Interneurone im Oberschlundganglion der Embryonen in dieser Arbeit beschrieben wird. Die Bestimmung der Achsen folgt den Neuroachsen. PC: Protocerebrum; DC: Deutocerebrum; TC: Tritocerebrum; AN: Antennennerv; OL: Optischer Lobus; zk: Zentralkörper; N: Neuropilgebiet; K: Kortex; v: ventral; d: dorsal; m: medial; mi: mitte; l: lateral; mi-l: von mitte bis lateral; mi-m: von mitte bis medial; a: anterior; p: posterior.

3.4.3 Verteilung der Zellkörper im Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen

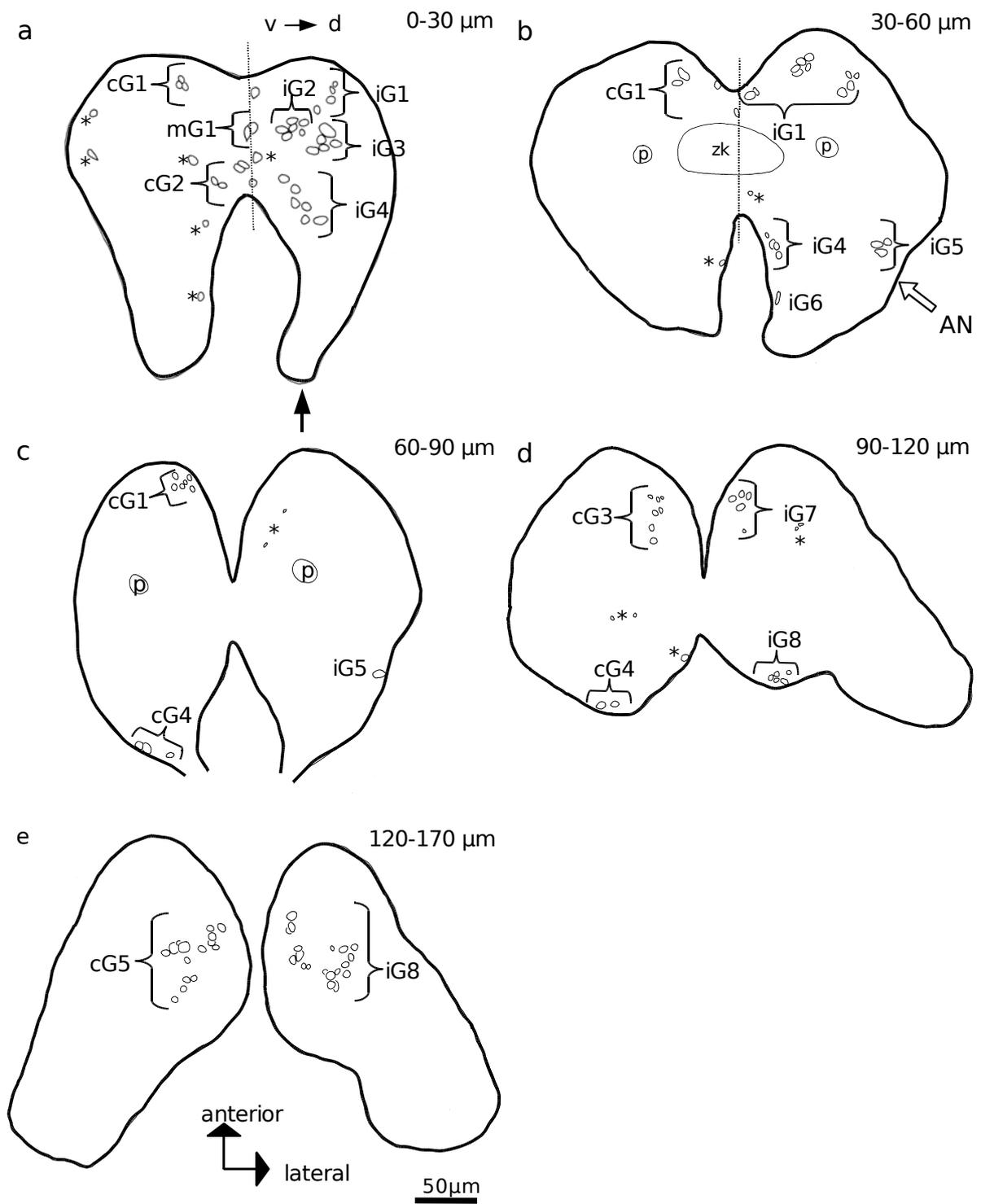
Für eine übersichtliche Darstellung der Verteilung der Zellkörper absteigender Interneurone werden die Zellgruppen der ipsi- und kontralateral absteigenden Interneurone am Beispiel eines 95%-igen

Embryonen mit Hilfe von fünf Zeichnungen eines horizontal geschnittenen Oberschlundganglions gezeigt (Abb. 3.4.2a-e). Die Zeichnungen stammen jeweils von verschiedenen Tiefen des Oberschlundganglions. Im Kortex des Oberschlundganglions eines 95%-igen Embryonen kann man 14 Gruppen (iG1-iG8, cG1-cG5 und mG1) der Zellkörper der Interneurone unterscheiden, die ipsilateral bzw. kontralateral vom Oberschlundganglion zu den Thorakalganglien über Halskonnektive absteigen (Abb. 3.4.2). Auf der ipsilateralen Hälfte des Oberschlundganglions wurden acht Gruppen der Zellkörper (iG1-iG8) und auf der kontralateralen Seite fünf Gruppen (cG1-cG5) und eine Gruppe (mG1) medial im Oberschlundganglion gefärbt. Die Gruppen der Zellkörper befinden sich in verschiedenen Bereichen des Oberschlundganglions, nämlich des Protocerebrums, des Deutocerebrums oder des Tritocerebrums. Die ipsilateralen Gruppen werden nur im Protocerebrum und Deutocerebrum gefunden, wohingegen eine Gruppe auch auf der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions im Tritocerebrum gefunden wurde. Im Protocerebrum kommen neun Gruppen der Interneurone vor. Fünf Gruppen der Interneurone (iG1-3, iG7 und iG8) liegen in der ipsilateralen Hälfte des Oberschlundganglions, drei Gruppen (cG1, cG3 und cG5) liegen in der kontralateralen Hälfte und eine Gruppe (mG1) liegt in der Mitte des Oberschlundganglions. Im Deutocerebrum sind vier Gruppen der Interneurone zu sehen. Drei (iG4-iG6) von vier Gruppen liegen in der ipsilateralen Hälfte und eine Gruppe (cG2) befindet sich in der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions. Im Tritocerebrum gibt es nur in der kontralateralen Hälfte eine Gruppe (cG4). Die Zellkörper der Interneurone der Gruppen iG1 und cG1 liegen ventral, von mitte bis medial, und anterior im Protocerebrum (Abb. 3.4.2a-c). Eine Gruppe der Zellkörper der Interneurone (iG2) liegt in der ipsilateralen Hälfte des Oberschlundganglions ventral, zwischen mitte und medial, und medial im Protocerebrum vor (Abb. 3.4.2a). Eine ventral liegende Gruppe (iG3) kommt lateral von der Gruppe iG2 vor (Abb. 3.4.2a). Eine andere Gruppe (mG1) liegt ventral, medial im Oberschlundganglion und medial im Protocerebrum (Abb. 3.4.2a). In der ipsilateralen Hälfte im Deutocerebrum sind eine medial liegende Gruppe (iG4) und eine lateral liegende Gruppe

(iG5) zu sehen, die ventral und anterior im Deutocerebrum lokalisiert sind (Abb. 3.4.2a-c). Die Gruppe iG5 liegt anterior vom Antennennerv (Abb. 3.4.2b, AN). Eine andere Gruppe (iG6) ist ventral, medial und posterior im Deutocerebrum lokalisiert (Abb. 3.4.2b). In der kontralateralen Hälfte des Deutocerebrums ist eine ventral liegende Gruppe (cG2) zu sehen, die medial und anterior im Deutocerebrum lokalisiert ist (Abb. 3.4.2a). Im Protocerebrum in der ipsilateralen und der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions befinden sich medial liegende Gruppen der Interneurone (iG7 und cG3), die medial, und anterior im Protocerebrum positioniert sind (Abb. 3.4.2d). In der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions im Tritocerebrum liegt eine dorsal liegende Gruppe (cG4) vor (Abb. 3.4.2c und d). Im Protocerebrum in der ipsilateralen und kontralateralen Hälften des Oberschlundganglions wurden dorsal liegende Gruppen der Zellkörper der Interneurone (iG8 und cG5) gefärbt (Abb. 3.4.2, e). Ihre Zellkörper liegen von mitte bis medial und von anterior bis posterior im Protocerebrum. Es werden Zellkörper der Interneurone in der ipsilateralen und in der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions gesehen, die einzeln oder in kleinen Gruppen an verschiedenen Stellen im Kortex des Oberschlundganglions positioniert sind (Abb. 3.4.2a-d; Sterne: ix und cx). Die Entwicklung dieser im Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen gezeigten Gruppen der absteigenden Interneurone wird in Kapitel 3.4.4 zwischen 95% und 60% der Embryogenese beschrieben.

Abbildung 3.4.2: Verteilung der Zellkörper absteigender Interneurone, die durch die retrograde-Füllung an einem ganzen Halskonnektiv eines 95%-igen Embryonen angefärbt sind. Das Oberschlundganglion (OSG) wurde horizontal geschnitten (Gefrierschnitte). Die Schnittdicke beträgt 10 µm. Die Zellkörper der gleichen Gruppen werden in Klammer gezeigt. Die Namen der Zellgruppen sind neben den jeweiligen Klammern zu sehen. Die Schnitte liegen von ventral nach dorsal : 0-170 µm. Pfeil: Seite der Konnektiv-Füllung. iG1-8: Die Zellkörper der ipsilateral absteigenden Interneurone der Gruppe 1 bis 8; cG1-5: Die Zellkörper der kontralateral absteigenden Interneurone der Gruppe 1 bis 5. mG1: Die Gruppe der medialen Interneurone. „*“: Einzelne Zellkörper oder Zellgruppen der ipsi- bzw. kontralateralen Interneurone (ix und cx), die zu keiner Gruppe gehören. AN: Antennennerv; zk: Zentralkörper; p: Pedunculus; v: ventral; d: dorsal.

Abb. 3.4.2



3.4.4 Entwicklung der Zellgruppen zwischen 95% und 60% der Embryogenese

Die Entwicklung der absteigenden Interneurone wurde im 95%-igen Stadium bei vier Präparaten, im 90%-igen Stadium bei einem Präparat, im 85%-igen Stadium bei zwei Präparaten, im 80%-igen Stadium bei drei Präparaten, im 75%-igen Stadium bei zwei Präparaten und im 60%-igen Stadium bei einem Präparat untersucht. In der Tabelle 3.4.1 werden die Informationen über diese absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der Grillenembryonen zwischen 95% und 60% der Embryogenese zusammengefasst: Lokalisation der Gruppen der Zellkörper, Zahl der Interneurone und Gruppenzugehörigkeit. Auf die Anzahl der Interneurone wird im Kapitel 3.4.4.2 eingegangen. In der Abbildung 3.4.3A-G werden die Gruppen der Zellkörper der absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der Grillenembryonen zwischen 95% und 60% der Embryogenese jeweils an einem Beispiel gezeigt. Bei diesen Präparaten wurde an einem ganzen Halskonnektiv entweder das rechte oder das linke Konnektiv retrograd gefüllt. Die Seite der Füllung ist auf Fotografien und Zeichnungen mit einem Pfeil markiert.

Tabelle 3.4.1: Zusammenfassung der Informationen über die Gruppen der Zellkörper absteigender Interneurone im Oberschlundganglion, die zwischen 95% und 60% der Embryogenese untersucht wurden (95%, N = 4; 90%, N = 1; 85%, N = 2; 80%, N = 3; 75%, N = 2; 60%, N = 1). Die Positionen der Zellgruppen werden nach dieser Reihenfolge angegeben: 1. ventral- dorsal Achse, 2. medial-lateral Achse, 3. anterior- posterior Achse. „*“: plus zusätzliche, schwer zählbare Zellkörper der Interneurone; „+“: leicht möglich; „-“: schwer möglich. Achsen in Klammer bedeutet: betreffende Zellgruppe befindet sich bei weiteren Präparaten („#“: bei zwei Präparaten und „~“: bei einem Präparat wenn N größer als 2 ist) in benannter Achse in dieser Position. PC: Protocerebrum; DC: Deutocerebrum; TC: Tritocerebrum. (1) Die absteigenden Interneurongruppen im Oberschlundganglion der adulten Grillen (*Gryllus bimaculatus*) (Staudacher, 1998).

Tabelle 3.4.1

95%	N	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
iG1	4	2-8	PC	v, m (# mi-m), a	i4	+
iG2	4	4-6	PC	v, m, m (# p)	i5n	+
iG3	4	5-9	PC	v, mi-l, a	i5	-
iG4	4	2-5	DC	v, m (~mi-m), a	i7	+
iG5	3	2-7	DC	v, l (~mi-l), a	i6	+
iG6	2	3-4	DC	v, m, p von iG4/ v, l, p von AN	i8	+
iG7	4	5-7	PC	m, m, (~mi-m), a	i3	+
iG8	4	15-31	PC	d, l-m (~mi-m), a-p/ ~ d, l-m, a	i1+2	-
cG1	3	5-7	PC	v, mi-m, (~m), a	c4	+
cG2	4	3-4	DC	v, m, a	c5	+
cG3	3	2-9	PC	m, mi-m (# m), a	c3	+
cG4	1	5	TC	d, l-m	c6	+
cG5	4	8-27	PC	d, l-m (~mi-m), a-p/ ~d, mi-m, a	c1+2	+
mG1	2	2-5	PC	v, m, a von zk (m)	pi	+

90%	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
iG1	7	PC	v, m, a	i4	+
iG2	5	PC	v, mi-m, p	i5n	+
iG3	3	PC	v, mi-l, a	i5	+
iG4	4	DC	v, mi-m, a	i7	+
iG5	3	DC	v, l, a von AN	i6	+

90%	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
iG6	1	DC	v, mi-m, p	i8	+
iG7	5	PC	m, mi-m, a	i3	+
iG8	16*	PC	d, l-m, a	i1+2	-
cG1	5	PC	v, mi-m, a	c4	+
cG2	5	DC	v, mi-m, a	c5	+
cG3	6	PC	m, mi-m, a	c3	+
cG5	7	PC	d, mi-m, a	c1+2	+
mG1	2	PC	v, m, p	pi	+

85%	N	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
iG1	2	7-9	PC	v, mi-m, a	i4	+
iG2	2	7-9	PC	v, m (mi-m), m	i5n	+
iG3	2	1*-12	PC	v, m (mi-l), a	i5	-
iG4	2	9-10*	DC	v, m, a	i7	+
iG5	2	2-5	DC	v, l, a von AN	i6	+
iG7	2	5-6	PC	m, m, a	i3	+
iG8	2	15-21*	PC	d, mi-m (l-m), a	i1+2	-
cG1	2	12-13	PC	v, m-m, a	c4	+
cG2	2	3-5	DC	v, m (mi-m), a	c5	+
cG3	1	4	PC	m, m, a	c3	+
cG4	2	4-5	TC	d, (m)	c6	+
cG5	2	12-19	PC	d, mi-m, (l-m), a, (a-p)	c1+2	-
mG1	2	5	PC	v, m, p	pi	+

80%	N	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
iG1	3	5-11	PC	v, mi-m (~m), a	i4	+
iG2	3	3-6	PC	v, m (~mi-m), m	i5n	+
iG3	3	6*-9*	PC	v, mi-l, (~m), a	i5	+
iG4	3	6-10	DC	v, m, a	i7	+
iG5	3	2-9	DC	v, l (~mi-l), a	i6	+
iG6	2	6-7	DC	v, m (mi-l), p	i8	+
iG7	3	2-11	PC	m, m, a	i3	+
iG8	3	1*-17	PC	d, l-m, a-p/ d, m-l (~mi-m), a	i1+2	-
cG1	3	2-18	PC	v, m, a	c4	+
cG2	3	1-3	DC	v, m, a	c5	+
cG3	2	5-11	PC	m, m, a	c3	+
cG4	1	2	DC	d, mi-m,	c6	+
cG5	3	11-14	PC	d, l-m, a-p (~a)	c1+2	+
mG1	3	1-2	PC	v, m, m (~p)	pi	+

75%	N	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
iG1	2	5-15	PC	v, mi-m (m), a	i4	+
iG2	2	6-9	PC	v, mi-m (m), m	i5n	+
iG3	2	6*-10*	PC	v, mi-l (mi-m), a	i5	+
iG4	2	6-8	DC	v, m, a	i7	+
iG5	2	4-5	DC	v, l, a	i6	+
iG6	1	6	DC	v, m, p	i8	+
iG7	1	10	PC	m, mi-m, a	i3	+
iG8	2	15-15*	PC	d, l-m, a-p	i1+2	-

75%	N	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
cG1	2	8	PC	v, mi-m, a	c4	+
cG2	2	5-6	DC	v, mi-m, a	c5	+
cG3	2	5-8	PC	m, mi-m (m), a	c3	+
cG4	2	1-3	TC	d, m	c6	+
cG5	2	9-10*	PC	d, mi-m (l-m), a (a-p)	c1+2	+
mG1	2	2	PC	v, m, p (m)	pi	+

60%	Anzahl (min- max)	Lokali- sation im OSG	Position (nach Neuroachsen)	Adult (1)	Bestimmung der Anzahl
iG1	5	PC	v, mi-m, a	i4	+
iG2	6	PC	v, mi-m, p	i5n	-
iG3	4	PC	v, m, p	i5	+
iG4	2	DC	v, mi-m, a	i7	+
iG5	2	DC	v, l, a von AN	i6	+
iG6	1	DC	v, mi-l, p von AN	i8	+
iG8	11	PC	d, l-m, a	i1+2	+
cG1	3	PC	v, mi-m, a	c4	+
cG2	2	DC	v, mi-m, a	c5	+
cG5	13	PC	d, l-m, a-p	c1+2	+
mG1	3	PC	v, m, p	pi	+

In allen Stadien zwischen 95% und 60% der Embryogenese wurden im Oberschlundganglion der Embryonen ipsilateral und kontralateral absteigende Interneurone markiert. Wie man in der Tabelle 3.4.1 sieht, wurden die Gruppen iG1-iG4, iG7, iG8, cG2 und cG5 in allen vier Präparaten im Oberschlundganglion der 95%-igen Embryonen gefärbt. Die Gruppen iG5, cG1 und cG3 wurden nur in drei von vier Präparaten gesehen. Die Gruppen, iG6 und mG1 wurden in zwei Präparaten gefärbt. In der Abbildung 3.4.3A sind die Gruppen der Zellkörper der Interneurone in einem Ganzpräparat des Oberschlundganglions eines 95%-igen Embryonen zu sehen. Bei 90% der Embryogenese wurden die Gruppen iG1-iG8, cG1-cG3, cG5 und mG1 gefärbt (siehe Tabelle 3.4.1 und Abb. 3.4.3B, C). Bei zwei Präparaten im 85%-igen Stadium sind die Gruppen iG1-iG5, iG7 und iG8, cG1, cG2, cG4, cG5 und mG1 im Oberschlundganglion zu sehen. Die Gruppe cG3 wurde nur bei einem Präparat markiert (siehe Tabelle 3.4.1 und Abb. 3.4.3D). Im Oberschlundganglion von drei Embryonen, die sich im 80%-igen Stadium befinden, wurden die Gruppen iG1-iG5, iG7 und iG8, cG1, cG2, cG5 und mG1 gefärbt. Die Gruppen iG6 und cG3 wurden bei zwei Präparaten und cG4 bei einem Präparat gefärbt (siehe Tabelle 3.4.1 und Abb. 3.4.3E). Die Gruppen iG1-iG5, iG8, cG1-cG5 und mG1 wurden im Oberschlundganglion von zwei Embryonen in 75% der Embryogenese gefärbt. Die Gruppen iG6 und iG7 wurden aber nur bei einem Präparat gesehen (siehe Tabelle 3.4.1). In der Abbildung 3.4.3F sind die Gruppen der Zellkörper der absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion am Beispiel von einem 75%-igen Embryo zu sehen. Im Oberschlundganglion eines 60%-igen Embryonen sind die Gruppen iG1-iG6, iG8, cG1, cG2, cG5 und mG1 zu erkennen (siehe Tabelle 3.4.1 und Abb. 3.4.3G).

Die meisten Gruppen der Interneurone befinden sich im Protocerebrum (iG1-3, iG7, iG8, cG1, cG3, cG5 und mG1). Die Gruppen iG4, iG5, iG6 und cG2 sind im Deutocerebrum lokalisiert. Eine Gruppe (cG4) liegt im Tritocerebrum vor (siehe Tabelle 3.4.1 und Abb. 3.4.3A-G).

Im folgenden werden die Positionen der absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der Grillenembryonen zwischen 95% und 60% der

Embryogenese beschrieben.

3.4.4.1 Die Position der Gruppen der Zellkörper (95% - 60%)

Die Positionen der Zellgruppen der Interneurone im Oberschlundganglion der Grillenembryonen werden in folgender Reihenfolge in drei Achsensystemen bestimmt: 1: ventral-dorsal Achse, 2: medial-lateral Achse und 3: anterior-posterior Achse. Die drei Achsensysteme sind in einem Schema eines Oberschlundganglions in der Abbildung 3.4.1 zu sehen. In der Tabelle 3.4.1 wird nach diesen drei Achsensystemen aufgeführt, welche Positionen der Gruppen der Zellkörper der Interneurone im Oberschlundganglion die Grillenembryonen während der Embryogenese (95% - 60%) einnehmen. Im Folgenden wird ein Überblick über die Positionen der Zellgruppen der Interneurone gegeben (Für eine ausführliche Information über ihre Position siehe Tabelle 3.4.1 und für ein Beispiel zu jedem Stadium zwischen 95% und 60% der Embryogenese siehe Abb. 3.4.3A-G).

1. ventral - dorsal Achse:

Bei allen Stadien im Oberschlundganglion der Grillenembryonen liegen die Gruppen iG1-iG6, cG1, cG2 und mG1 ventral, die Gruppen iG7 und cG3 medial und die Gruppen iG8, cG4 und cG5 dorsal.

2. medial - lateral Achse:

Die Gruppen iG1, iG2, iG7, cG1 und cG3 sind im Protocerebrum und die Gruppen iG4 und cG2 im Deutocerebrum entweder medial oder zwischen mitte und medial lokalisiert. Die Gruppe mG1 ist medial im Oberschlundganglion positioniert. Im Deutocerebrum liegt die Gruppe iG5 lateral und die Gruppe iG6 entweder medial, oder zwischen mitte und lateral. Die Gruppe iG3 liegt meistens lateral und anterior von iG2. Die Gruppe iG8 liegt zwischen lateral und medial, mitte und medial, oder mitte und lateral. Die Gruppe cG5 liegt auch zwischen lateral und medial, oder mitte und medial.

3. anterior - posterior Achse:

Die Gruppen iG1, iG3, iG4, iG5, iG7, cG1, cG2 und cG3 im

Oberschlundganglion der Embryonen zwischen 95% und 75% der Embryogenese liegen anterior im Protocerebrum (siehe Abb. 3.4.3A-F). Die Gruppe iG3 liegt nur bei einem 60%-igen Embryo medial im Protocerebrum (siehe Abb. 3.4.3G). Die Gruppe iG2 ist entweder medial oder posterior im Protocerebrum positioniert. Die Gruppe iG6 liegt posterior von iG4 und die Gruppe iG5 liegt anterior vom Antennennerven im Deutocerebrum. Die Gruppen iG8 und cG5 liegen entweder anterior im Protocerebrum oder von anterior bis posterior im Protocerebrum. Die Gruppe mG1 liegt medial oder posterior im Protocerebrum. Bei einem Präparat, im Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen wurde diese Gruppe anterior des Zentralkörpers gefärbt.

Abbildung 3.4.3A-G: Verteilung der Zellkörper absteigender Interneurone, die durch die Retrograde-Füllung an einem ganzen Halskonnektiv angefärbt sind. Die Zellkörper der gleichen Gruppe werden entweder mit einer Klammer oder einem Kreis gezeigt. Die Namen der Zellgruppen sind neben den jeweiligen Klammern bzw. Kreisen vermerkt. iG1-8: Zellkörper der ipsilateral absteigenden Interneurone der Gruppe 1 bis 8; cG1-5: Zellkörper der kontralateral absteigenden Interneurone der Gruppe 1 bis 5; mG1: mediale Gruppe der Interneurone; ix und cx: ipsi- und kontralateral absteigende, einzeln liegende oder in kleinen Gruppen vorkommende Zellkörper der Interneurone; Pfeil: Stelle der Konnektiv-Füllung. Zellkörper der Interneurone mit der Markierung „\“ bzw. „/“ liegen ventral, ohne Markierung medial, mit dem Punkt dorsal. TCC: Tritocerebralkommissur; „#“: Fremdkörper; **A:** Zeichnung des Oberschlundganglions eines 95%-igen Embryonen; zwei kontralateral absteigende Interneurone mit ihren Verzweigungen im Deutocerebrum (1 und 2). **B:** Zeichnung des Oberschlundganglions eines 90%-igen Embryonen. **C:** Fotografie (Z-Projektion) des Oberschlundganglions eines 90%-igen Embryonen; a: ventraler Ansicht; b: dorsaler Ansicht. **D:** Fotografie (Z-Projektion) des Oberschlundganglions eines 85%-igen Embryonen; a: ventraler Ansicht; b: medialer Ansicht; c: dorsaler Ansicht; d: eine konfokale Fotografie; Positionen der medial liegenden Zellgruppen der ipsi- und kontralateral absteigenden Interneurone (iG7 und cG3). Das Neuropilgebiet ist mit einer gestrichelten Linie markiert. **E:** Fotografie (Z-Projektion) des Oberschlundganglions eines 80%-igen Embryonen; a: ventraler Ansicht; b: dorsaler Ansicht. **F:** Zeichnung des Oberschlundganglions eines 75%-igen Embryonen. **G:** Zeichnung des Oberschlundganglions eines 60%-igen Embryonen.

Abb. 3.4.3A

95%

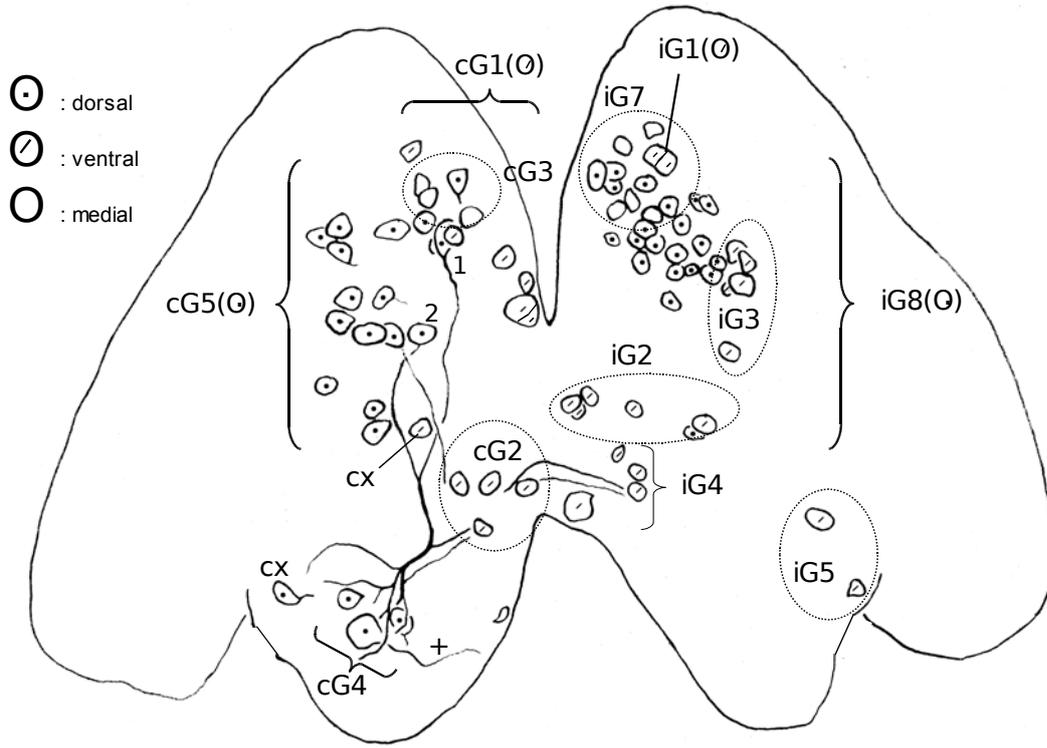


Abb. 3.4.3B

90%

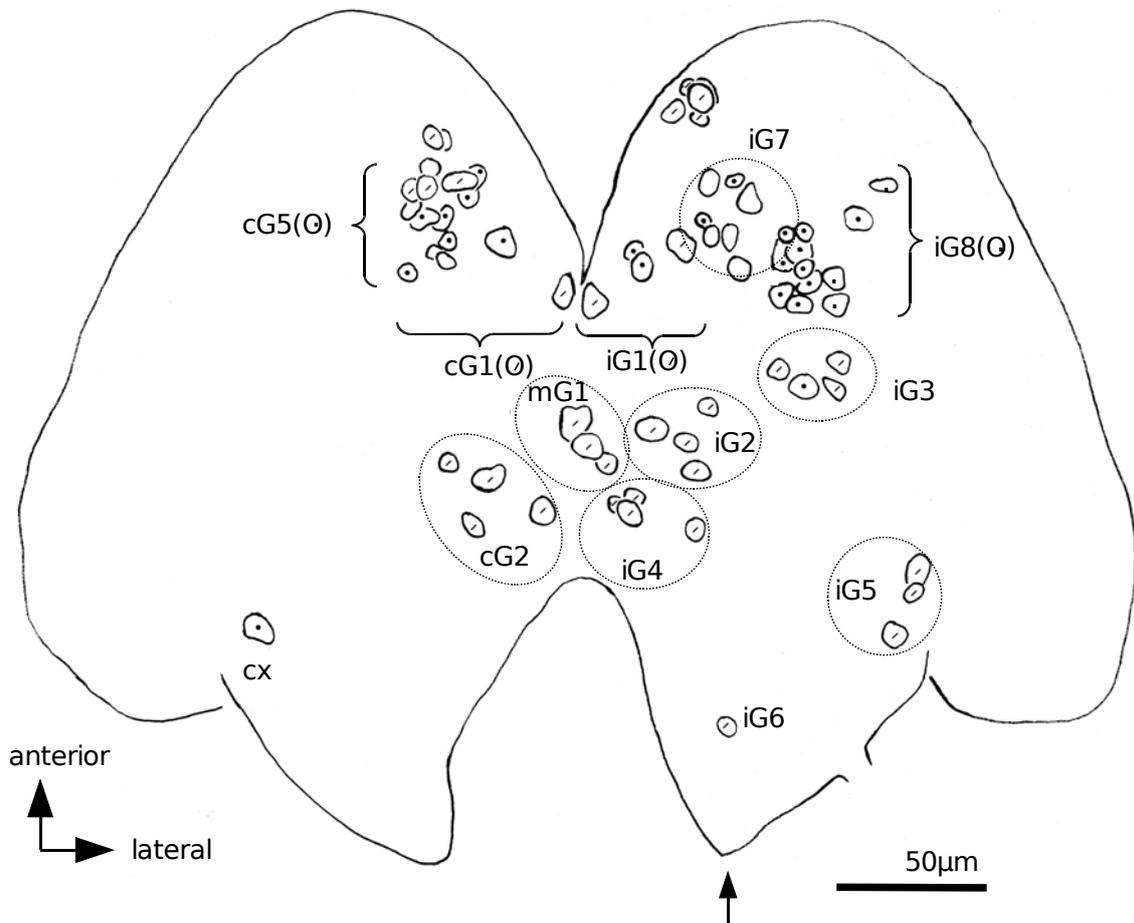


Abb. 3.4.3C

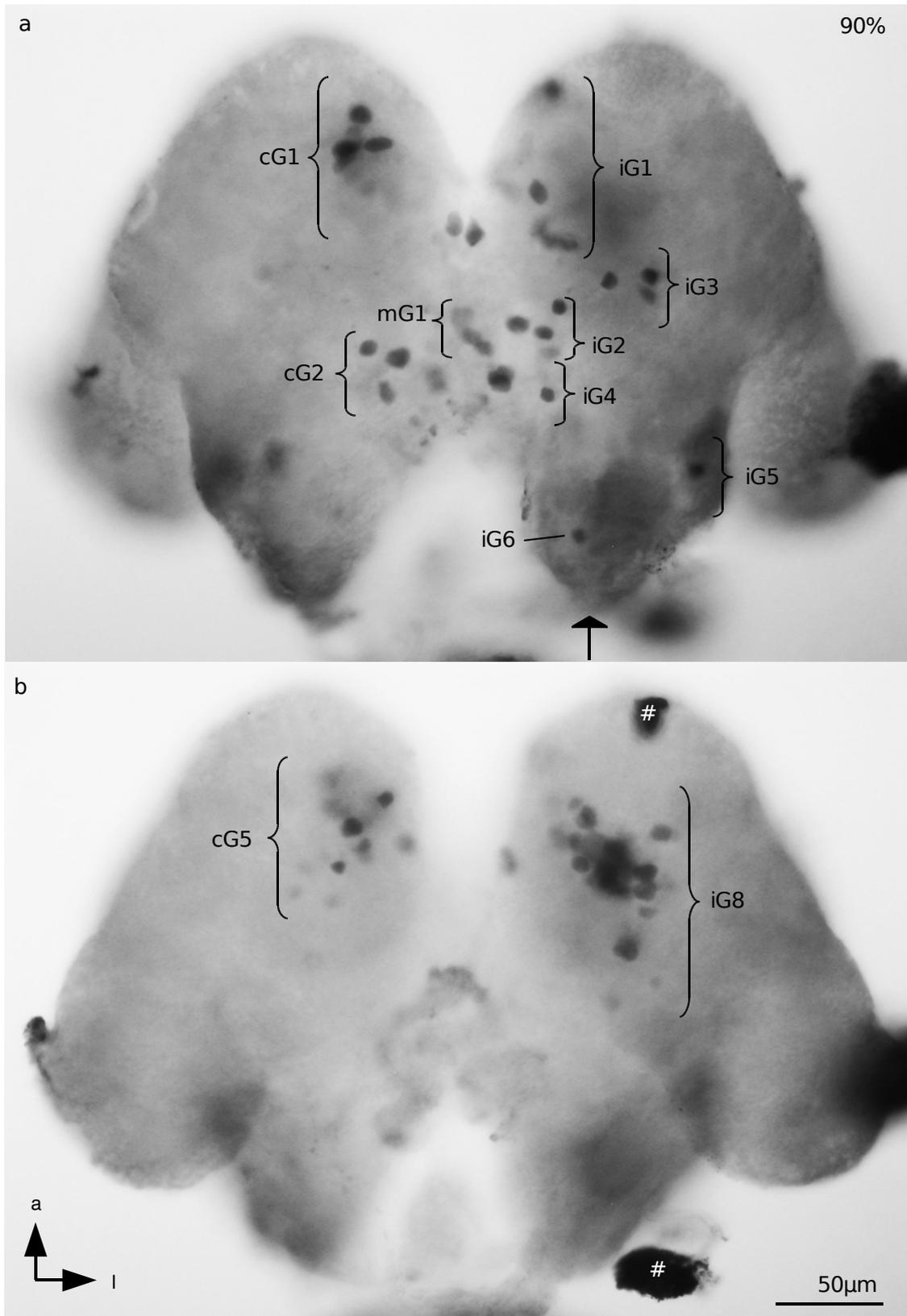


Abb. 3.4.3D

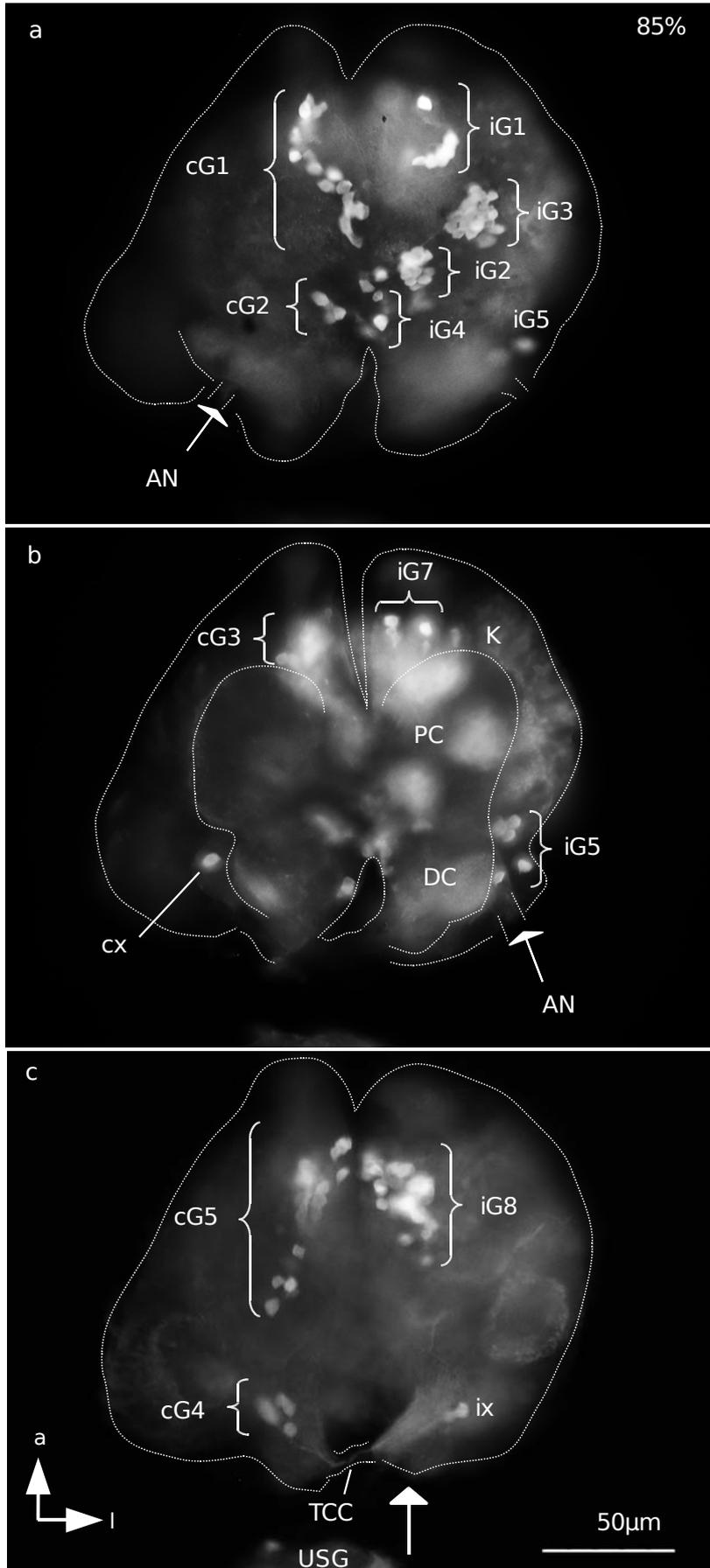


Abb. 3.4.3D

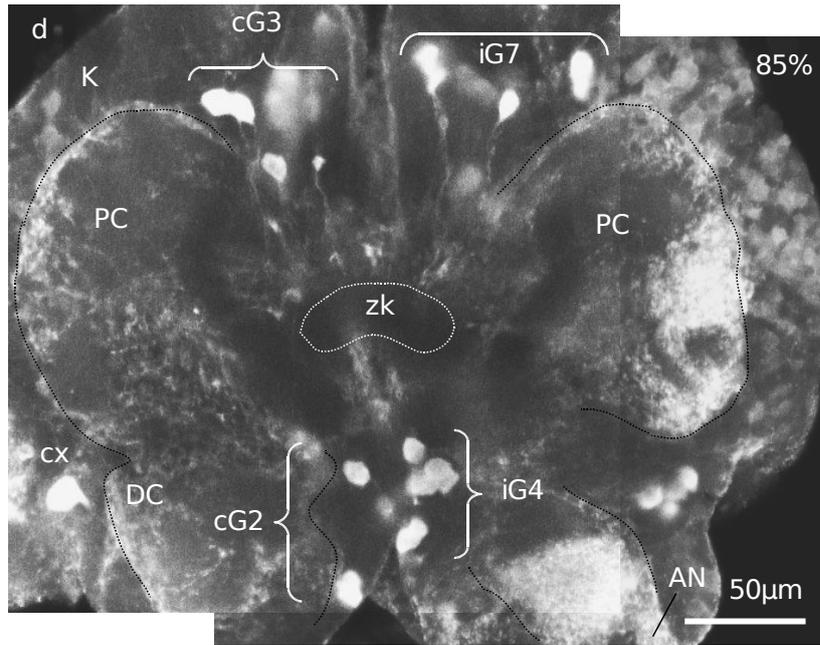


Abb. 3.4.3E

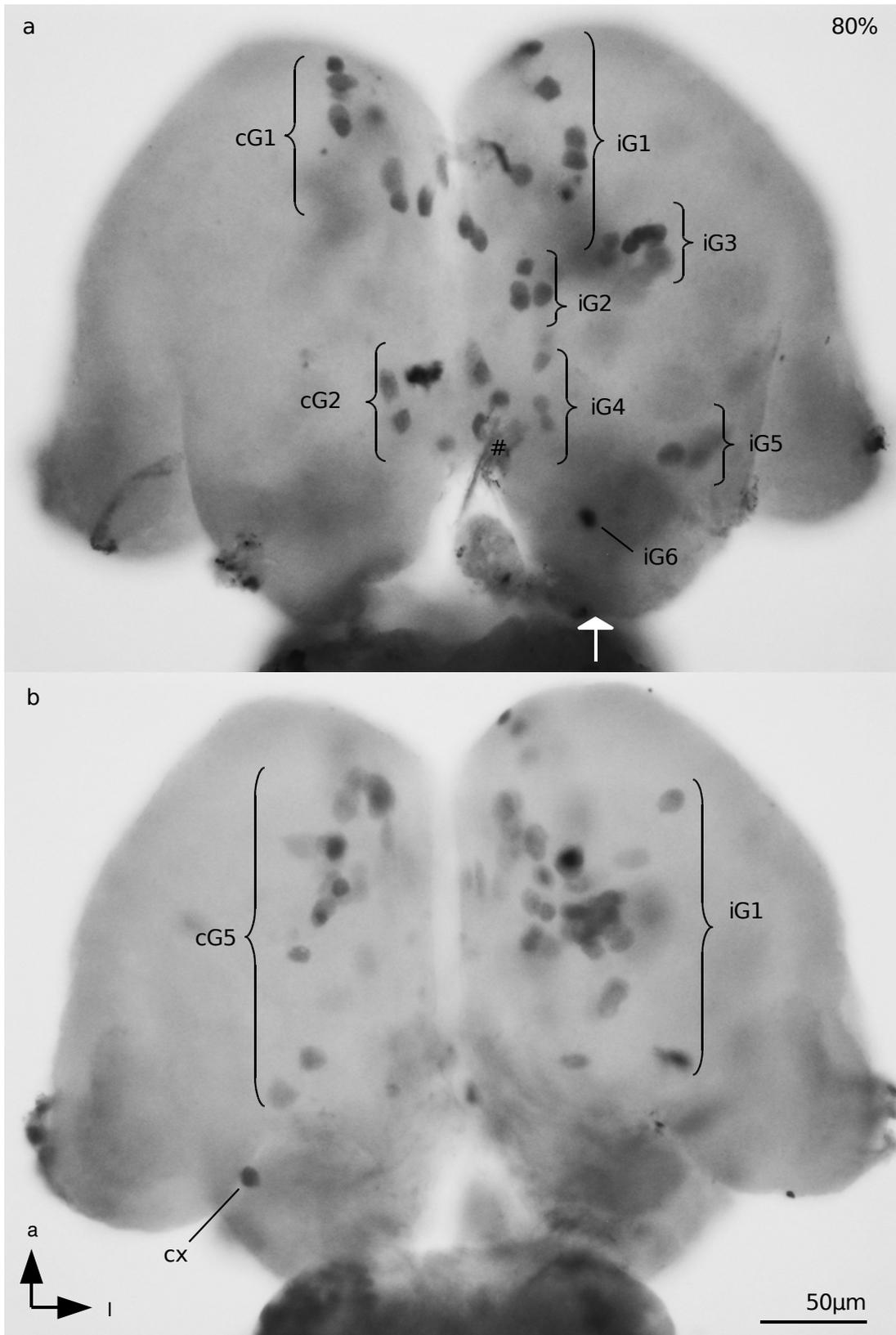


Abb. 3.4.3F

75%

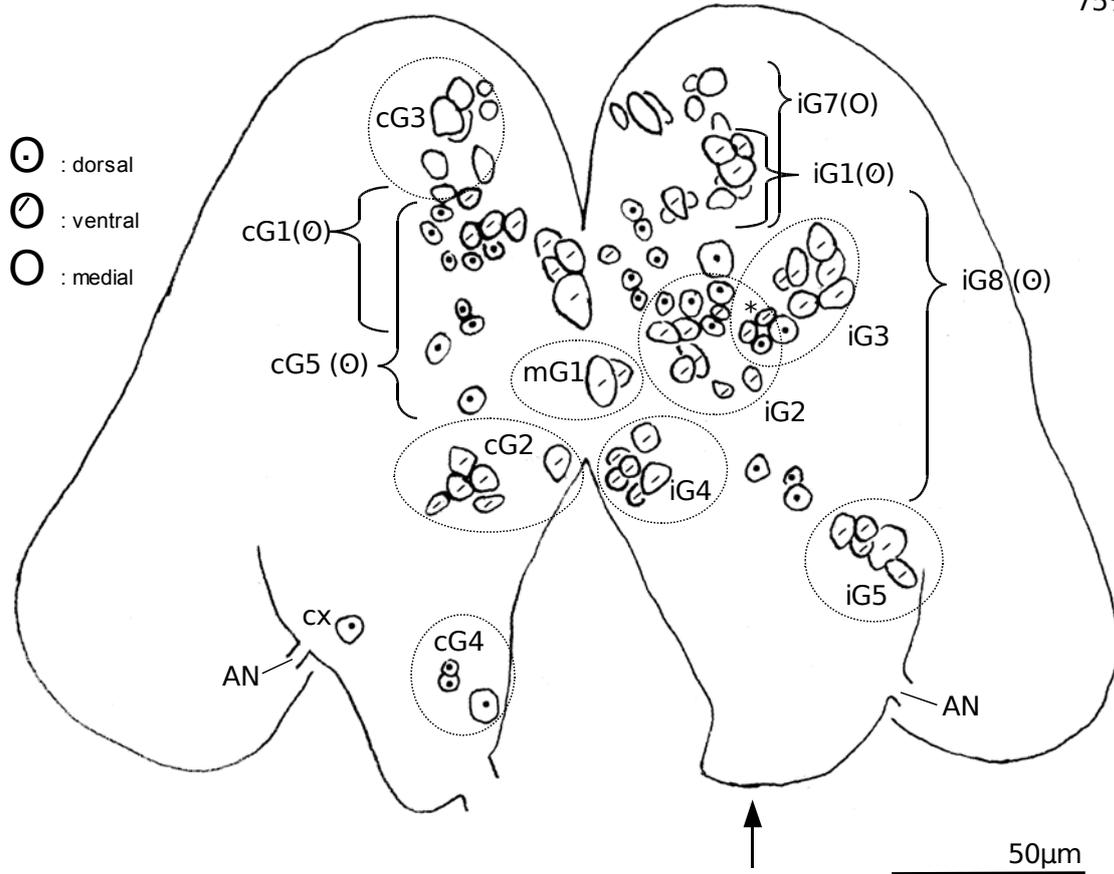
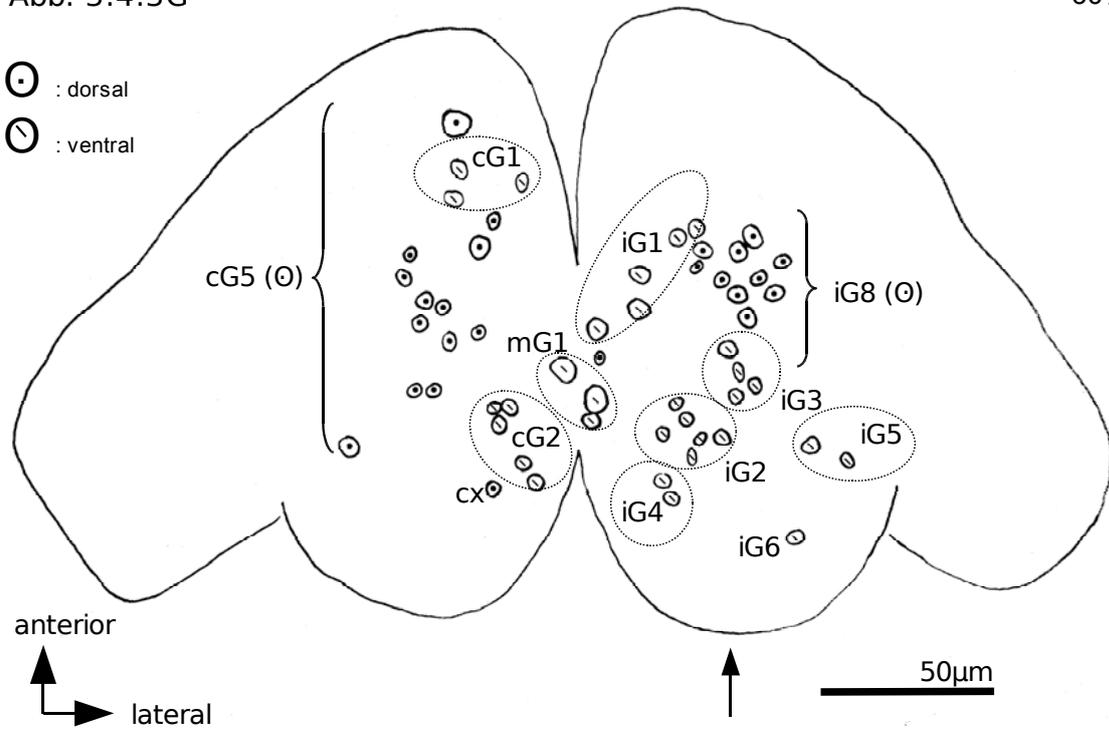


Abb. 3.4.3G

60%



3.4.4.2 Anzahl der Zellkörper der absteigenden Interneurone

Die gesamte Anzahl absteigender Interneurone im Oberschlundganglion der Grillenembryonen wurde bei Ganzpräparaten zwischen 95% und 60% der Embryogenese bestimmt (siehe Tabelle 3.4.2). Das Zeichen „*“ neben manchen Zahlen symbolisiert zusätzliche, nicht zählbare Zellkörper der Interneurone. Sie variiert zwischen 56* und 125 bei 95%-igen Embryonen (median 86; N = 4), zwischen 95* und 118* bei 85%-igen Embryonen (median 106,5; N = 2), zwischen 57* und 129* bei 80%-igen Embryonen (median 78; N = 3) und zwischen 93* und 105* bei 75%-igen Embryonen (median 99; N = 2). Die gesamte Anzahl markierter, absteigender Interneurone beträgt 70* bei einem 90%-igen Embryo und 56 bei einem 60%-igen Embryo.

Die Anzahl der ipsi- und kontralateral absteigenden Interneurone ist unterschiedlich (siehe Tabelle 3.4.2, 3.4.3 und Abb. 3.4.4). Der Median der ipsilateral absteigenden Interneurone ist bei 95%-igen Embryonen 48,5 (Spannweite: 43*-70, N = 4), bei 85%-igen Embryonen 61,5 (Spannweite: 55*-68*, N = 2), bei 80%-igen Embryonen 44 (Spannweite: 37*-86, N = 3) und bei 75%-igen Embryonen 62,5 (Spannweite: 56*-69*, N = 2). Die Anzahl der ipsilateral absteigenden Interneurone beträgt 44* bei einem 90%-igen Embryo und 31 bei einem 60%-igen Embryo. Der Median der kontralateral absteigenden Interneurone ist bei 95%-igen Embryonen 37,5 (Spannweite: 13-55, N = 4), bei 85%-igen Embryonen 45 (Spannweite: 40-50, N = 2), bei 80%-igen Embryonen 34 (Spannweite: 20-43, N = 3) und bei 75%-igen Embryonen 36,5 (Spannweite: 36*-37, N = 2). Die Anzahl der kontralateral absteigenden Interneurone beträgt 26 bei einem 90%-igen Embryo und 25 bei einem 60%-igen Embryo. Der Median der medialen Gruppe (mG1) ist bei 95%-igen Embryonen 3,5 (N = 2), bei 85%-igen Embryonen 5 (N = 2), bei 80%-igen Embryonen 2 (N = 3) und bei 75%-igen Embryonen 2 (N = 2). Die Anzahl der medialen Gruppe (mG1) beträgt 2 bei einem 90%-igen Embryo und 3 bei einem 60%-igen Embryo.

Im ventralen Kortex des Oberschlundganglions liegen neun Gruppen (iG1-iG6, cG1, cG2 und mG1) und im dorsalen Kortex des Oberschlundganglions

drei Gruppen (iG8, cG4 und cG5) vor. Im medialen Kortex befinden sich zwei Gruppen (iG7, cG3).

Die Anzahl der ventralen Zellkörper ist leicht zu bestimmen, wohingegen die Anzahl der dorsal liegenden Interneurone nicht so leicht zu bestimmen ist, weil manche Zellkörper der Interneurone unmittelbar benachbart liegen. Deswegen erschwert die Massenfärbung die Zählung dieser Zellkörper.

Die Anzahl der Interneurone mit ihren Zellkörpern in ventral liegenden Gruppen ist leicht höher als die Anzahl der dorsal liegenden Interneurone (siehe Tabelle 3.4.4). Der Median der mit ihren Zellkörpern ventral liegenden Interneurone bei 95%-igen Embryonen ist 38 (Spannweite: 26-51*, N = 4), bei 85%-igen Embryonen 58,5 (Spannweite: 53*-64, N = 2), bei 80%-igen Embryonen 40 (Spannweite: 40-72*, N = 3) und bei 75%-igen Embryonen 58 (Spannweite: 47*-69*, N = 2). Die Anzahl der mit ihren Zellkörpern ventral liegenden Interneurone beträgt 35 bei einem 90%-igen Embryo und 31 bei einem 60%-igen Embryo. Der Median der dorsal liegenden Interneurone bei 95%-igen Embryonen ist 37,5 (Spannweite: 25*-59, N = 4), bei 85%-igen Embryonen 40,5 (Spannweite: 36-45*, N = 2), bei 80%-igen Embryonen 26 (Spannweite: 15*-28, N = 3) und bei 75%-igen Embryonen 29,5 (Spannweite: 28-31*, N = 2). Die Anzahl der mit ihren Zellkörpern dorsal liegenden Interneurone beträgt 24* bei einem 90%-igen Embryo und 25 bei einem 60%-igen Embryo. Die kleinste Anzahl der Zellkörper der Interneurone ist in der medial liegenden Gruppe lokalisiert. Der Median der mit ihren Zellkörpern medial liegenden Interneurone bei 95%-igen Embryonen ist 10,5 (Spannweite: 5-15, N = 4), bei 85%-igen Embryonen 7,5 (Spannweite: 6-9, N = 2), bei 80%-igen Embryonen 12 (Spannweite: 2-29, N = 3) und bei 75%-igen Embryonen 11,5 (Spannweite: 5-18, N = 2). Die Anzahl der mit ihren Zellkörpern medial liegenden Interneurone beträgt 11 bei einem 90%-igen Embryo. Bei einem 60%-igen Embryo wurden keine medial liegenden Neurone gefärbt.

Die meisten Zellkörper der Interneurone sind im Protocerebrum positioniert. Einige Zellkörper liegen im Deutocerebrum und im

Tritocerebrum vor. Die meisten Zellkörper der Interneurone kommen in den dorsal liegenden Gruppen vor, wohingegen die medial und ventral liegenden Gruppen eine kleine Anzahl der Zellkörper der Interneurone enthalten (siehe Tabelle 3.4.4).

Tabelle 3.4.2: Anzahl der ipsi- und kontralateral absteigenden Interneurone und die gesamte Anzahl der Interneurone im Oberschlundganglion der Grillenembryonen, die sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung befinden (95%, N = 4; 90%, N = 1; 85%, N = 2; 80%, N = 3; 75%, N = 2 und 60%, N = 1). IN = Interneurone; „*“: plus zusätzliche, schwer zählbare Zellkörper der Interneurone.

Alter der Embryonen [%]	Anzahl der ipsilateralen IN	Anzahl der kontralateralen IN	gesamte Anzahl der IN
95	45	37	82
95	43*	13	56*
95	52*	38*	90*
95	70	55	125
90	44*	26	70*
85	55*	40	95*
85	68*	50	118*
80	86*	43	129*
80	37*	20	57*
80	44*	34	78*
75	56*	37	93*
75	69*	36*	105*
60	31	25	56

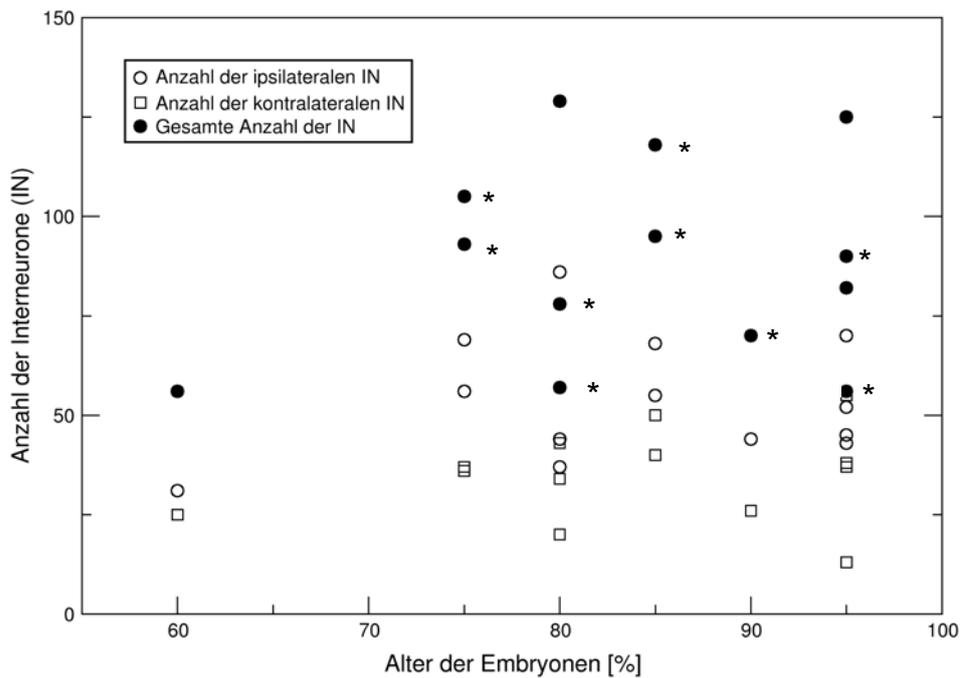
Tabelle 3.4.3: Minimale und maximale Anzahl und die Medianwerte der ipsi- und kontralateral absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der Embryonen. IN: Interneurone; N: Anzahl der Embryonen. „*“: plus zusätzliche, schwer zählbare Zellkörper der Interneurone.

Alter der Embryonen [%]	N	Anzahl der IN					
		Ipsilateral		Kontralateral		Gesamt	
		Median	Min-max	Median	Min-max	Median	Min-max
95	4	48,5	43*-70	37,5	13-55	86	56*-125
90	1	-	44*	-	26	-	70*
85	2	61,5	55*-68*	45	40-50	106,5	95*-118*
80	3	44	37*-86	34	20-43	78	57*-129*
75	2	62,5	56*-69*	36,5	36*-37	99	93*-105*
60	1	-	31	-	25	-	56

Abbildung 3.4.4: Anzahl der absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der Embryonen zwischen 60% und 95% der Embryogenese. **a:** Gesamte Anzahl der Interneurone, Anzahl der ipsi- und kontralateral absteigenden Interneurone. „*“: plus zusätzliche, schwer zählbare Zellkörper der Interneurone. **b:** Anzahl der absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der Embryonen zwischen 60% und 95% der Embryogenese werden durch Box- and-Whisker-Plots dargestellt. **g:** gesamte Anzahl der IN; **i:** Anzahl der ipsilateral absteigenden IN; **c:** Anzahl der kontralateral absteigenden IN. (95%, N = 4; 90%, N = 1; 85%, N = 2; 80%, N = 3; 75%, N = 2 und 60%, N = 1).

Abb. 3.4.4

a



b

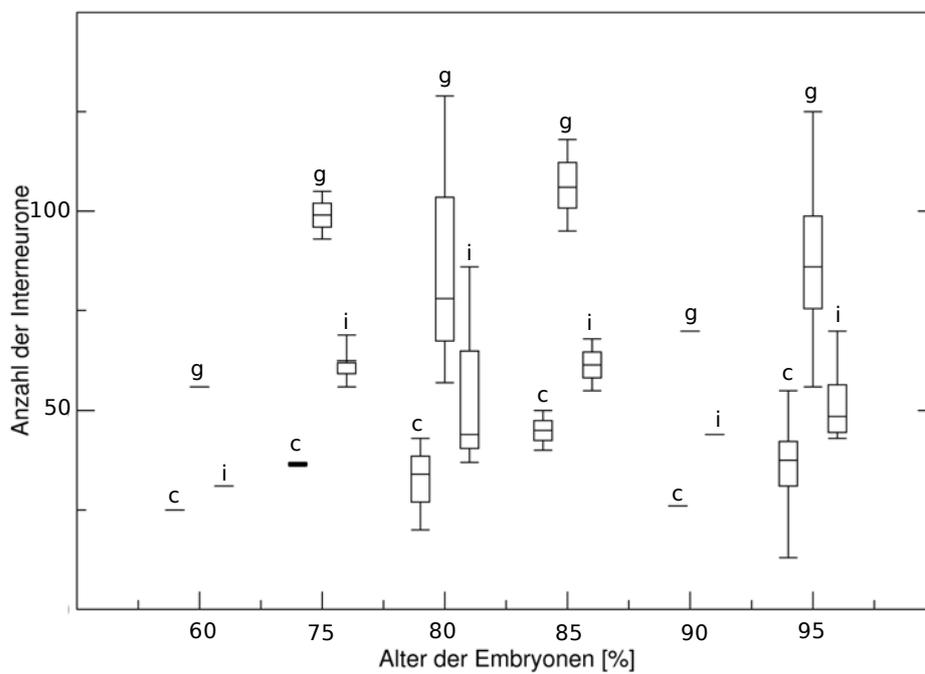


Tabelle 3.4.4: Anzahl der mit ihren Zellkörpern ventral, dorsal und medial liegenden absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der Embryonen. IN: Interneurone; N: Anzahl der Embryonen. „*“: plus zusätzliche, schwer zählbare Zellkörper der Interneurone.

Alter der Embryonen [%]	N	Anzahl der IN					
		ventral liegende IN		dorsal liegende IN		medial liegende IN	
		Median	Min-max	Median	Min-max	Median	Min-max
95	4	38	26-51*	37,5	25*-59	10,5	5-15
90	1	-	35	-	24*	-	11
85	2	58,5	53*-64	40,5	36-45*	7,5	6-9
80	3	40	40-72*	26	15*-28	12	2-29
75	2	58	47*-69*	29,5	28-31*	11,5	5-18
60	1	-	31	-	25	-	-

3.4.4.3 Verzweigung der absteigenden Interneurone

Wenige über ein Halskonnektiv gefärbte Interneurone der Grillenembryonen (60% - 95%) können mit ihren Verzweigungen im Oberschlundganglion charakterisiert werden. Einige der gefärbten Interneurone kann man mit ihren primären Neuriten im Oberschlundganglion verfolgen. Wo sie sich verzweigen und wie sie vom Oberschlundganglion absteigen, kann aber nicht verfolgt werden.

In der Abbildung 3.4.5a sind in der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions zwei Interneurone der Gruppe cG5 zu sehen (cG5-1 und cG5-2). Die Zellkörper dieser Interneurone liegen dorsal im anterioren Protocerebrum. Ihre primären Neuriten laufen nach posterior zum Deutocerebrum. Der primäre Neurit des Interneurons cG5-1 läuft ziemlich gerade bis zum posterioren Protocerebrum. Der Zellkörper des Interneurons cG5-2 liegt dorsal und posterior von dem Zellkörper des Interneurons cG5-1. Der primäre Neurit dieses Interneurons cG5-2 macht eine Schlinge erst nach dorsal und dann nach ventral, nachdem er den Zellkörper verlassen hat. Er verläuft dann in der Höhe des Zentralkörpers in eine dorso-laterale Richtung. Im posterioren Protocerebrum laufen die

primären Neuriten der beiden Interneurone so nahe nebeneinander, dass man sie nicht voneinander unterscheiden kann. Sie ziehen zum medioanterioren Deutocerebrum und dort verzweigen sie sich. Ihre Verzweigungen liegen im dorsalen Deutocerebrum. In der Abbildung 3.4.5b sind die dendritischen Verzweigungen dieser zwei Interneurone in stärkerer Vergrößerung zu sehen. Die Axone (Abb. 3.4.5b, offene Pfeilspitze) dieser beiden Interneurone laufen zusammen (Abb. 3.4.5b, Pfeil) und verlassen das Oberschlundganglion kontralateral. Sie steigen vom Oberschlundganglion dorsal ab. In der Abbildung 3.4.5a sind Zellkörper einiger Interneurone (Sterne) mit ihren primären Neuriten zu sehen. Es ist aber unmöglich sie weiter zu verfolgen.

Im Oberschlundganglion der Embryonen konnten die Interneurone der Gruppe iG3 bei drei Embryonen im 95%-igen Stadium und bei einem 80%-igen Embryo mit ihrer Verzweigung charakterisiert werden. Die ventral liegende Gruppe iG3 enthält maximal neun Interneurone bei 95%-igen Embryonen (minimum: 5; N = 4). In der Abbildung 3.4.5a ist ein Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen zu sehen. Bei diesem Präparat wurde das Neurobiotin in das rechte Halskonnektiv (Hk) dorsal injiziert. In diesem Präparat enthält die Gruppe iG3 fünf Interneurone. In der Abbildung 3.4.5c ist ein Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen zu sehen. Bei diesem Präparat wurde das Neurobiotin in das rechte Halskonnektiv (Hk) retrograd gefüllt. Die Gruppe iG3 enthält hier neun Interneurone. Die primären Neurite dieser Interneurone laufen in einem Bündel (Abb. 3.4.5c2-6, kleine Pfeile) in eine dorso-mediale Richtung im Protocerebrum und machen eine Kurve ungefähr in der Höhe des Zentralkörpers. An der Grenze zwischen dem posterioren Protocerebrum und dem anterioren Deutocerebrum sind ihre dendritischen Verzweigungen dorsal zu sehen (Abb. 3.4.5c6, Doppelpfeile). Die dendritischen Verzweigungen dieser Interneurone kann man nicht voneinander unterscheiden, weil die Interneurone der Gruppe iG3 nahe beieinander liegen und ihre primären Neuriten in einem Bündel laufen. Die Axone dieser Interneurone steigen dorsal über das Deutocerebrum und das Tritocerebrum ab.

Abb. 3.4.5

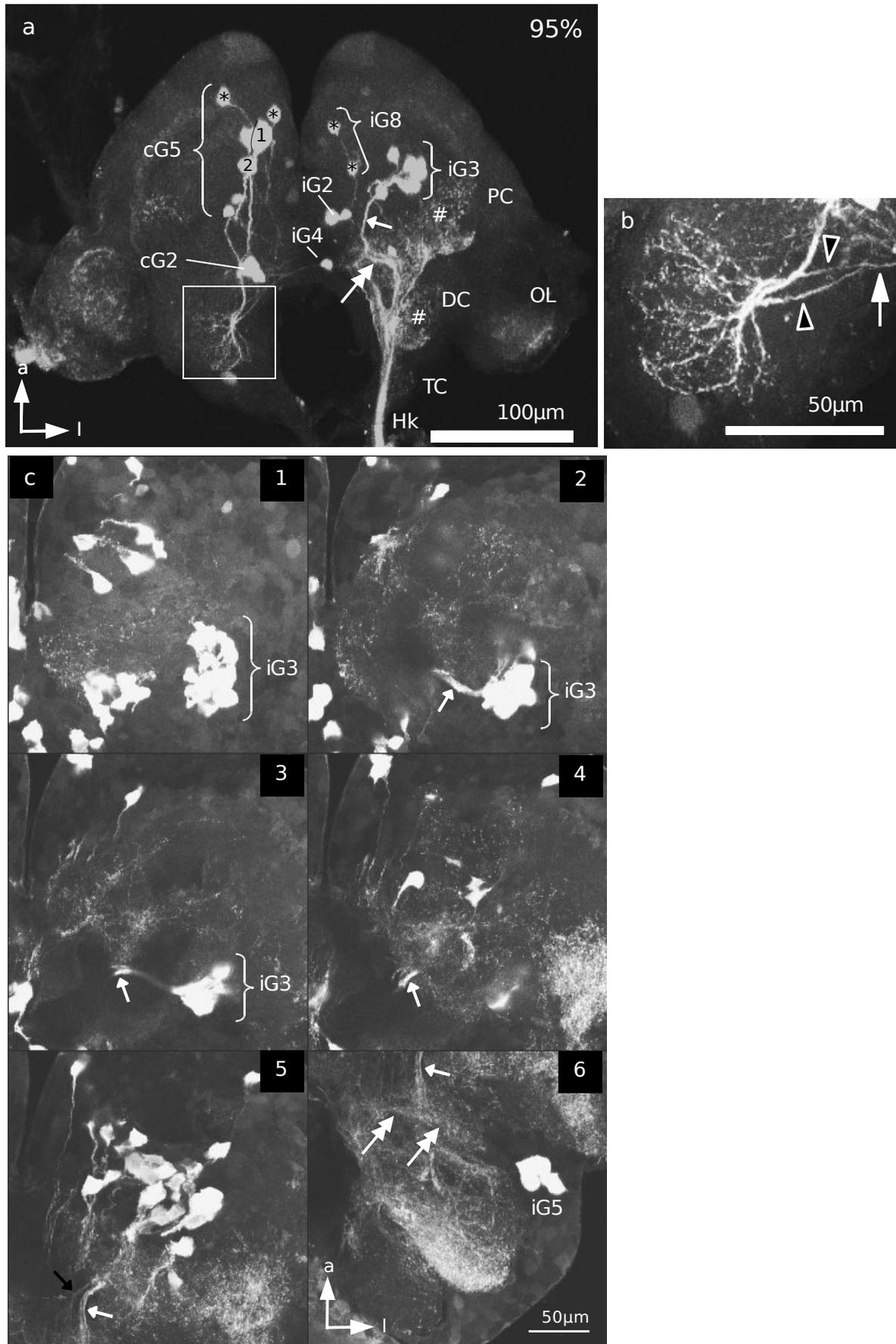


Abbildung 3.4.5: Konfokale Fotografien der Interneurone mit ihren Verzweigungen im Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen. Ganzpräparate; Z-Projekte. **a:** Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen. Das Neurobiotin wurde in ein Halskonnektiv (Hk) dorsal injiziert. Zu sehen sind die Interneurone von iG3 und die Interneurone cG5-1 und cG5-2 mit ihren Projektionen; kleiner Pfeil: Bündel der primären Neuriten der Interneurone von iG3; „*“: Interneurone mit ihren primären Neuriten; „#“: Endverzweigungen aufsteigender intersegmentaler Interneurone; **b:** dendritische Verzweigungen von cG5-1 und cG5-2 in der höheren Vergrößerung. offene Pfeilspitze: Axone der Interneurone von cG5-1 und cG5-2; Pfeil: Axone der Interneurone von cG5-1 und cG5-2; **c:** iG3 mit ihren primären Neuriten im Bündel (kleiner Pfeil) im Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen; retrograde Füllung an einem ganzen Halskonnektiv; Doppelpfeile: dendritische Verzweigung der Interneurone von iG3; schwarzer Pfeil: primärer Neurit eines Interneurons von der Gruppe iG7.

Ein Interneuron der Gruppe iG5 mit seiner Verzweigung konnte bei drei Embryonen im 95%-igen Stadium und bei zwei 80%-igen Embryonen charakterisiert werden. In der Abb. 3.4.6a sind vier Interneurone der Gruppe iG5 mit ihren primären Neuriten (kleine Pfeile) bei einem 95%-igen Embryo zu sehen. Ihre Zellkörper sind im Deutocerebrum lateral und anterior vom AN positioniert. Vier von fünf Interneuronen liegen nahe beieinander und ihre primären Neuriten laufen im Bündel in die dorso-mediale Richtung im Deutocerebrum. Sie können bis zum posterioren Deutocerebrum weiter verfolgt werden. Ab diesem Punkt ist es nicht möglich zu bestimmen, wie sie weiter vom Deutocerebrum absteigen. Der Zellkörper des fünften Interneurons (iG5-1) ist posterior von diesen vier Interneuronen (die Stelle der vier Zellkörper der Interneurone ist mit einem Kreis markiert) positioniert (Abb. 3.4.6b). Sein primärer Neurit (in b2, b3 und b4; kleiner Pfeil) läuft nach medial im Deutocerebrum und verzweigt sich ventral im medialen Bereich des Deutocerebrums (große Pfeile). Seine Projektion ist nicht weiter zu verfolgen.

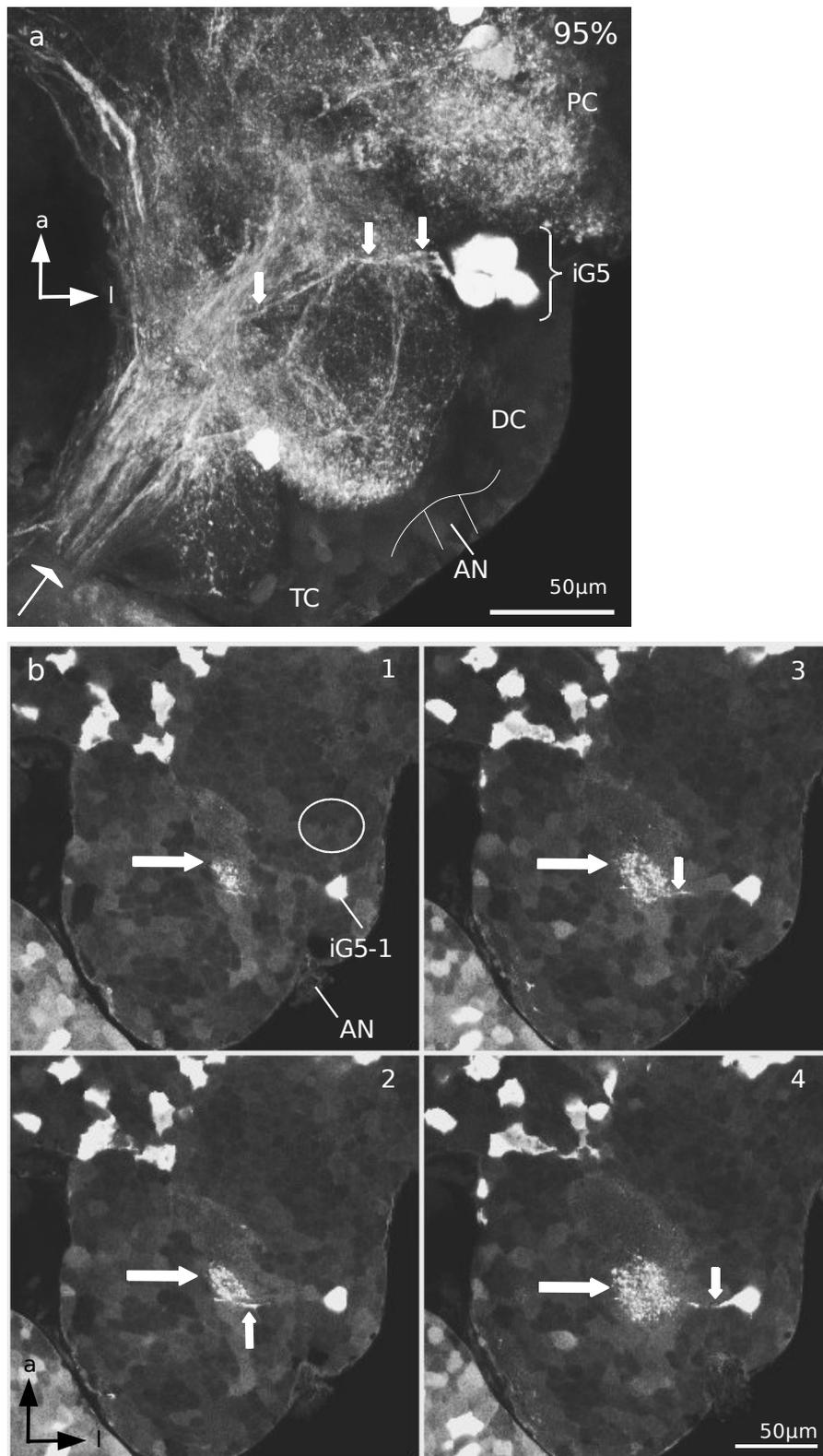


Abbildung 3.4.6: Konfokale Fotografien des Oberschlundganglions eines 95%-igen Embryonen. Ganzpräparat; **a:** Interneurone von iG5 mit ihren primären Neuriten (Pfeile) im Deutocerebrum. Z-Projektion; **b:** Interneuron iG5-1 mit seinem primären Neurit (kleiner Pfeil) und seiner dendritischen Verzweigung (großer Pfeil) im Deutocerebrum. Kreis: die Stelle anderer Interneurone von iG5, die in a zu sehen ist, ist markiert.

In der Abbildung 3.4.7 sind vier Interneurone der Gruppe cG4 im dorsalen Tritocerebrum im Oberschlundganglion eines 95%-igen Embryonen zu sehen. Ein Interneuron (cG4-1) davon ist mit seinem primären Neuriten zu sehen (kleine Pfeile). Der Zellkörper von cG4-1 liegt dorsal im Tritocerebrum. Der primäre Neurit dieses Interneurons läuft in eine dorso-mediale Richtung zur Tritocerebralkommissur (TCC). Er verläuft durch diese Kommissur und verlässt das Oberschlundganglion kontralateral. Die anderen Zellkörper der Interneurone der Gruppe cG4 können aber mit ihren primären Neuriten nicht verfolgt werden. Die anderen Zellkörper der Interneurone der Gruppe cG4 können aber mit ihren primären Neuriten nicht verfolgt werden.

Abb. 3.4.7

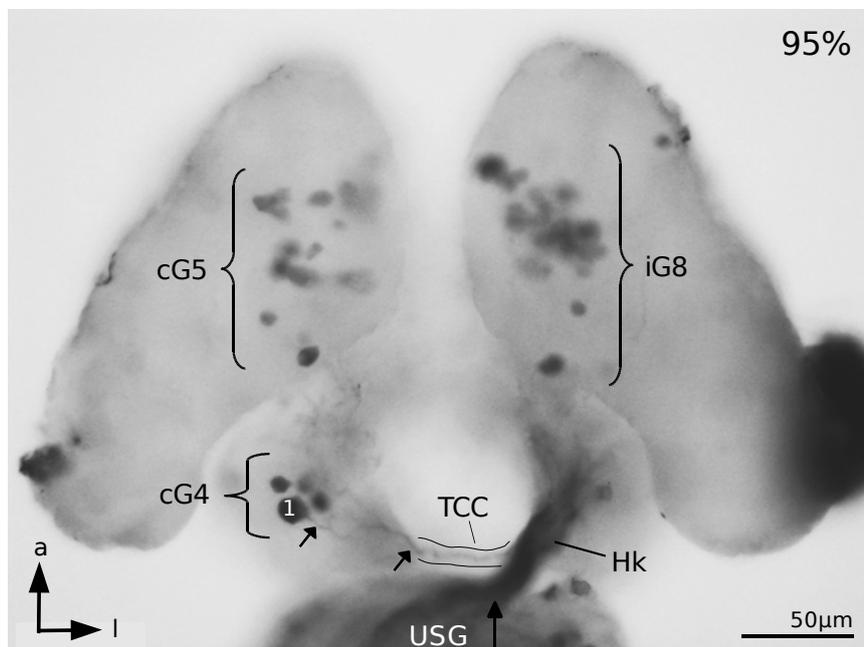


Abbildung 3.4.7: Fotografie des Oberschlundganglions eines 95%-igen Embryonen. Ganzpräparat. Retrograde Füllung an einem ganzen Halskonnektiv (Hk) (großer Pfeil). Visualisierung mit DAB. Zu sehen sind die Zellkörper der Interneurone von cG4 im Tritocerebrum und das Interneuron cG4-1 mit seinem primären Neurit (kleine Pfeile) sind zu sehen. USG: Unterschlundganglion; TCC: Tritocerebralkommissur.

In der Abbildung 3.4.8A sind die absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion eines 80%-igen Embryonen zu sehen. In der ipsilateralen Hälfte des Oberschlundganglions sind zwei Gruppen dorsal liegender Zellkörper der Interneurone zu erkennen (Abb. 3.4.8A1, Sterne). Ihre primären Neuriten laufen in zwei Bündeln (große offene Pfeile). Sie folgen einer ventro-medialen Richtung, machen eine Kurve (#) und laufen dann nach lateral im posterioren Protocerebrum. Ab dieser Stelle ist es nicht möglich, sie weiter zu verfolgen. In dieser Hälfte des Oberschlundganglions sind auch ventral liegende Zellkörper der Interneurone (in Abb. 3.4.8A2, A3 und A4; „+“) zu sehen. Die primären Neuriten der in der Abbildung 3.4.8A2 mit „+“ markierten Zellkörper der Interneurone (kleine offene Pfeile) kann man nur bis zum posterioren Protocerebrum verfolgen. Die primären Neuriten der in der Abbildung 3.4.8A3 mit „+“ markierten Zellkörper der Interneurone laufen medial im anterioren Protocerebrum und machen eine Kurve und laufen nach lateral, nachdem sie den Zentralkörper erreicht haben und sind nicht mehr zu verfolgen (Abb. 3.4.8A3, kleiner offener Pfeil). Die primären Neuriten einiger Interneurone (zum Beispiel: in Abb. 3.4.8A4 mit „+“ markierter Zellkörper) laufen in eine dorso-mediale Richtung und nach lateral, nachdem sie den Zentralkörper erreicht haben und sind nicht mehr zu verfolgen (Abb. 3.4.8A4, kleiner Pfeil). In der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions (Abb. 3.4.8B1) sind eine dorsal liegende Gruppe der Zellkörper der Interneurone („*“) und ein einzelner Zellkörper („+“) im anterioren Protocerebrum zu sehen. Die primären Neuriten der Zellkörper der Interneurone der dorsale Gruppe („*“) laufen in einem Bündel (großer offener Pfeil) in eine ventro-mediale Richtung im anterioren Protocerebrum und machen eine Kurve in die medial-posteriore Richtung, kurz bevor sie den Zentralkörper erreicht haben (Abb. 3.4.8B2 und B3, große offene Pfeile). Auf der Höhe des Zentralkörpers laufen sie weiter medial und weiter nach posterior vom Zentralkörper (Abb. 3.4.8B4: großer offener Pfeil) und gehen dann in die ipsilaterale Hälfte des Oberschlundganglions hinein (Abb. 3.4.8B2, B3 und B4: große geschlossene Pfeile). Ihre weitere Verfolgung ist nicht möglich. Der primär Neurit des mit „+“ markierten

Interneurons (in Abb. 3.4.8B1: kleiner offener Pfeil) und das Bündel der primären Neuriten der dorsalen Gruppe („*“) laufen nebeneinander und in die gleiche Richtung.

Abb. 3.4.8A

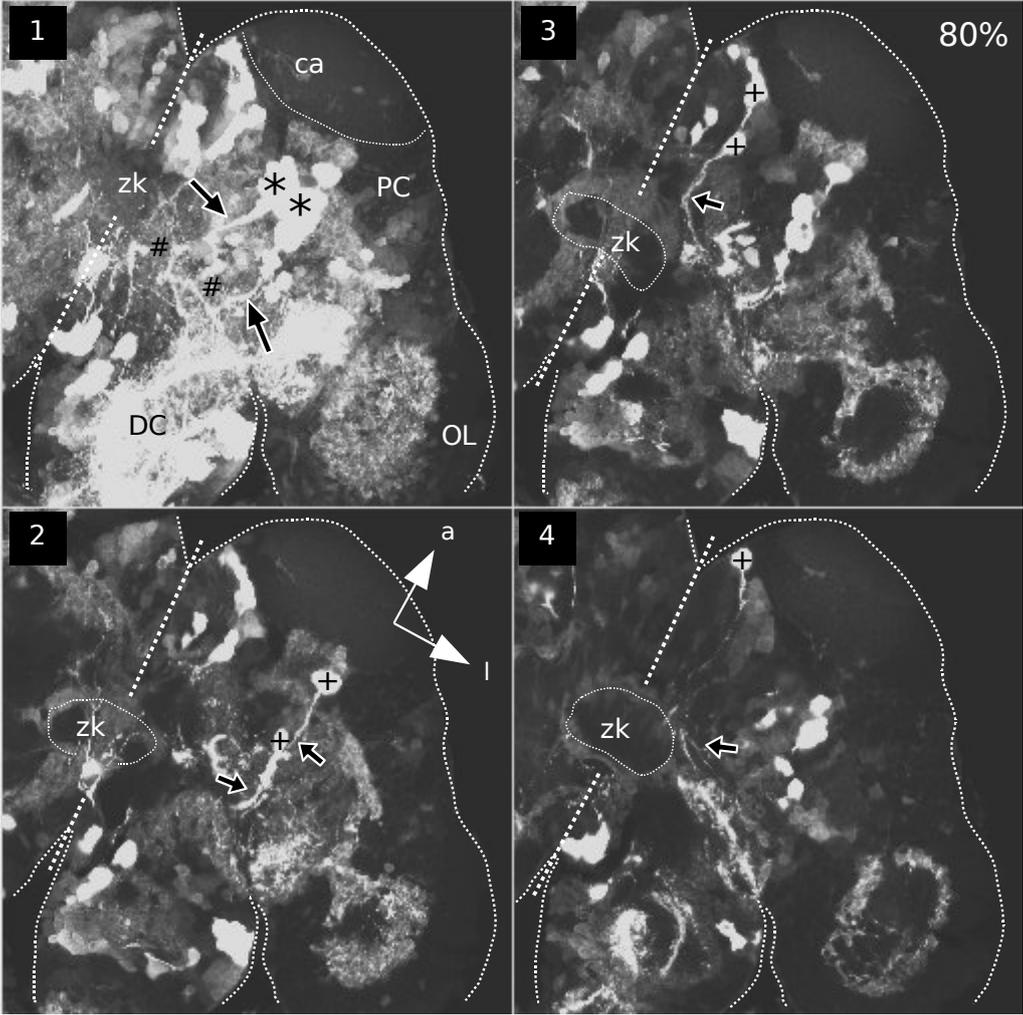


Abb. 3.4.8B

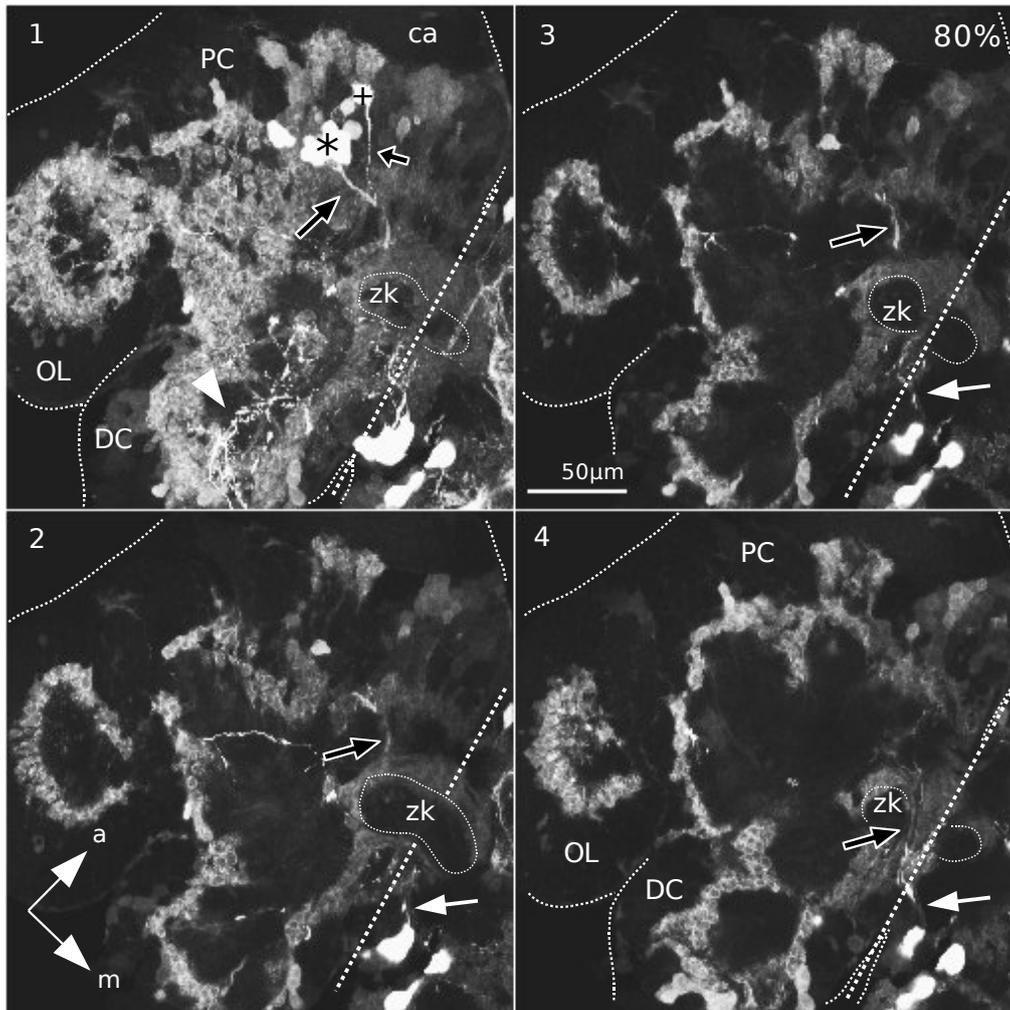


Abbildung 3.4.8A-B: Konfokale Fotografien des Oberschlundganglions eines 80%-igen Embryonen. Zu sehen sind die Interneurone mit ihren primären Neuriten. Ganzpräparat. Retrograde Füllung an einem ganzen Halskonnektiv. **A:** ipsilateral absteigende Interneurone; A1-A4: Z- Projektionen der Fotografien, die aus verschiedenen Tiefen stammen; A1: dorsal; A2-A4: von ventral nach dorsal; **B:** kontralateral absteigende Interneurone; B1-B4: Z- Projektionen der Fotografien, die aus verschiedenen Tiefen stammen; von dorsal nach ventral. „*“: Zellgruppe der Zellkörper der Interneurone; „+“: einzelne Zellkörper der Interneurone; große offene und geschlossene Pfeile: Bündel der primären Neuriten der Zellgruppe; kleine offene Pfeile: primäre Neurite einzelne Interneurone; ca; calyx ; zk: Zentralkörper. Die Mitte des Oberschlundganglions ist mit einer gestrichelten Linie markiert.

4. DISKUSSION

4.1 Die Entwicklungsdauer der Grillenembryonen

Die gesamte Entwicklungsdauer der Grillenembryonen der Art *Gryllus bimaculatus* bei einer Temperatur von $29 \pm 1^\circ\text{C}$ beträgt $214,95 \pm 17,22$ Stunden (Mittelwert \pm Standardabweichung, $N = 297$). Die Variabilität der Entwicklungsdauer der Embryonen ist unter konstanten Bedingungen, vor allem bei einer konstanten Inkubationstemperatur, mit 17,22 Stunden Streuung bis zum Schlupftermin sehr hoch im Vergleich zu Heuschrecken. Die zeitliche Abweichung in der Entwicklungsdauer beträgt damit 8% der gesamten Entwicklungsdauer. Die Schlupfzeiten der Grillenembryonen variieren stärker als bei Heuschrecken. Es gibt verschiedene Gründe für diese Variabilität in der Entwicklungsdauer. Man kann diese Variabilitäten in methodisch bedingte und intrinsischen Variabilitäten teilen.

Methodisch bedingte Variabilitäten: **(1)** die Genauigkeit, mit der die Ablaufzeit der Entwicklung bekannt ist. Für die Ermittlung der gesamten Entwicklungsdauer der Grillenembryonen wurden Eier gesammelt, die innerhalb von zwei Stunden abgelegt worden waren. Wenn die Grilleneier befruchtet sind, als sie abgelegt werden, variiert also das absolute Alter der Embryonen zwischen null und zwei Stunden. Sato und Tanaka-Sato (2002) haben berichtet, dass in neu abgelegten Grilleneiern der Art *Gryllus bimaculatus* Spermienkerne in der Nähe der Mikropylen (Eintrittsstelle der Spermien) beobachtet werden. Sarashina et al., (2005) haben das bestätigt, dass die Befruchtung der Grilleneier vor der Eiablage stattfindet, weil in Eiern zwei Minuten nach der Eiablage Spermien nachgewiesen wurden. Die gesamte Entwicklungsdauer der Grillembryonen von *Gryllus bimaculatus* bei einer Temperatur von 28°C beträgt 250 ± 10 Stunden (Miyamoto und Shimozawa, 1983). Bei einer niedrigeren Temperatur, hier 28°C , dauert die Entwicklung länger als bei $29 \pm 1^\circ\text{C}$. In dieser Studie wurden die Grilleneier von einem Weibchen 20 Minuten lang gesammelt, damit kann der Zeitpunkt der Befruchtung bis auf ± 10 Minuten bestimmt

werden. Trotz der kürzeren Sammelzeit der Eier ist die Streuung der Entwicklungsdauer mit 10 Stunden viel höher als das bei Heuschrecken der Fall ist. Es soll weitere Gründe geben, die auch bei der hohen Streuung der Entwicklungsdauer der Grillenembryonen eine wesentliche Rolle spielen. Da handelt es sich um intrinsische Variabilitäten: **(2)** Die Asynchronie der Eiablage und die damit verbundene Asynchronie der Entwicklungsdauer sind weitere Ursachen für die hohe Streuung der Entwicklungsdauer von Grillenembryonen. Anders als die Heuschreckenembryonen legen die Grillen ihre Eier einzeln und nicht in Eipaketen ab. Daher entwickeln sich die Grillenembryonen asynchron im Gegensatz zur Heuschreckenembryonen. Der Gewinn einer großen Anzahl synchron entwickelter Eier ist deswegen auch nicht möglich.

Die Heuschreckeneier sind auch befruchtet wie die Grilleneier, wenn sie abgelegt werden (McNabb, 1928; Slifer und King, 1934) und der „Zusammenbau“ eines Geleges, das 25 bis 100 Eier enthält, dauert etwa eine Stunde. Der Zeitpunkt der Befruchtung konnte deswegen bis auf ± 30 Minuten bestimmt werden und die Schlupfzeit wird durch die Beobachtung der Gelege alle 30 Minuten bis auf ± 15 Minuten festgestellt. Die Heuschreckeneier in einem Gelege entwickeln sich synchron. Die Asynchronie der Entwicklungsdauer der sich in dem gleichen Gelege entwickelnden Heuschreckenembryonen der Art *Schistocerca nitens* ist kleiner als $\pm 0,5\%$ der gesamten Entwicklungszeit (Bentley et al., 1979). Ähnliche Werte der Synchronie wurden für viele Heuschreckenspezies dokumentiert (*Locusta*: Salzen, 1960; *Schistocerca*: Shulov und Pener, 1963; Tyrer, 1970; *Chortoicetes*: Wardhaugh, 1978). Dank der synchronen Eiablage und Entwicklung, im Gegensatz zur Grille, ist es möglich, eine große Anzahl von Heuschreckenembryonen von einem Gelege zu erhalten. Von jedem dieser einzelnen Embryonen kann die gesamte Entwicklungsdauer mit einer Genauigkeit von ± 45 Minuten bestimmt werden (Bentley et al., 1979).

(3) Ein weiterer Faktor ist die individuelle Variabilität der Grilleneier und der sich in diesen Eiern entwickelnden Embryonen auf Grund der unterschiedlichen Vaterschaft.

Die Embryonen in Eiern von einem Grillenweibchen der *Gryllus bimaculatus* in einer Ablagephase entwickeln unterschiedlich. Sie variieren sich in der Körpergröße in dem gleichen Entwicklungsstadium. Eine Bestätigung dafür ist bei Grillen der Art *Acheta domesticus* zu sehen. In einer einzigen Ablage abgegebene Eier vom gleichen Weibchen variieren im Entwicklungsstadium und in der Entwicklungsgeschwindigkeit (Kanellis, 1952).

Die Grillenweibchen haben eine kugelförmige Spermathek (Simmons, 1986). Diese Morphologie der Spermathek ermöglicht die Durchmischung der Spermien. Dadurch steigt die genetische Variabilität der Nachkommen an, wie das bei Tsetsefliegen nachgewiesen worden ist (Jordan, 1972). In den Spermatheken der Grillenweibchen der Art *Gryllus bimaculatus* erfolgt daher eine Mischung der Spermien der Männchen, mit denen das Weibchen kopuliert hat.

Aus den Eiern eines Grillenweibchens schlüpfen daher die Embryonen von verschiedenen Vätern mit folglich unterschiedlicher individueller Variabilität, die sich zum Beispiel in unterschiedlicher Körpergröße äußert. Diese Embryonen entwickeln sich mit unterschiedlicher Entwicklungsgeschwindigkeit, was auch für die hohe Streuung der Entwicklungsdauer der Grillembryonen verantwortlich sein kann. Für eine andere Grillenart wurde von Weigensberg et al. (1998) berichtet, dass die väterlichen Faktoren (Genotyp und Phänotyp vom Vater) einen Einfluss auf die Eigröße und die Körpergröße der Nachkommen hat. Die Grillenembryonen der *Gryllus firmus*, die von verschiedenen Männchen gezeugt werden, erreichen verschiedene Körpergrößen am 10. Tag nach der Eiablage (25 – 30°C). Im Gegensatz zu Heuschrecken haben die Grilleneier bereits hohe individuelle Variabilität wegen der Vielfalt der Vaterschaft, wenn sie abgelegt werden. Alle Heuschreckeneier werden von Spermien des letzten Männchen befruchtet, weil die Heuschreckenmännchen die Spermien aus den Spermatheken der Weibchen entfernen, die aus der vorhergehenden Kopulation mit einem anderen Männchen stammen (*Schistocerca gregaria*: Hunter-Jones, 1960). Es ist in der Literatur bekannt, dass neben den väterlichen Faktoren die

mütterlichen Faktoren für die Eigröße und für die Größe der Nachkommen entscheidend ist. Bei der Altersbestimmung der Grillenembryonen der *Gryllus bimaculatus* wurden Eier von neun Grillenweibchen genommen. Daher muss der Einfluss wegen der Vielfalt der mütterlichen Faktoren auf die Eier beziehungsweise auf die Embryonen berücksichtigt werden, was auch eine Variabilität im Entwicklungsstadium und in der Entwicklungsdauer der Embryonen verursachen kann.

Um eine genügende Anzahl von Grilleneiern zu bekommen, wurden Eier von neun verschiedenen Grillenweibchen gesammelt. Da die Grillenweibchen auch unbefruchtete Eier ablegen können, wurden in dieser Arbeit zur Eigewinnung nur Weibchen verwendet, bei denen die Kopulation stattgefunden hatte (anhängende Spermatophore). Dadurch war die Möglichkeit höher, dass man genügend entwickelte Eier von einer Ablagephase bekam. Dennoch schlüpfen nicht aus allen Eiern dieser Grillenweibchen Embryonen. In der Literatur wurde auch von unbefruchteter Eiablage bei Grillen dokumentiert (*Teleogryllus commodus*: Loher, nicht veröffentlicht; aus: Huber, et al., 1989). Außerdem ist es bekannt, dass erfolglose Paarungen in Grillen vorkommen können (*Teleogryllus commodus*: Alexander und Otte, 1967; *Acheta domesticus* und *Gryllus integer*: Sakaluk und Cade, 1983).

In der Literatur wurde gezeigt, dass in Insekten die Größe von Nachkommen sehr stark mit der Größe vom Ei korreliert ist (McLain und Mallard, 1991; Rossiter, 1991). In einigen oviparen Organismen wurde gezeigt, dass die Größe vom Ei im wesentlichen durch die mütterlichen Faktoren (Genotyp und Phänotyp) bestimmt wird (Eidechse: Sinervo, 1991). Es wurde auch berichtet, dass sich mütterliche Faktoren (Genotyp und Phänotyp) auf die Größe der Embryonen auswirken (Fisch: Reznick, 1991). Bei Grillen der Art *Gryllus bimaculatus* beeinflussen sowohl mütterliche als auch väterliche Faktoren die Größe der Nachkommen. Von Simmons (1987) wurde nachgewiesen, dass verschiedene Aspekte der Körpergröße, wie zum Beispiel Körpergewicht, Bein- und Körperlänge der beiden Elternteile erblich sind. Große Eltern bekommen große Nachkommen (Simmons, 1987).

4.2 Methoden zur Altersbestimmung von Insektenembryonen

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine quantitative Altersbestimmungsmethode für Grillenembryonen der Art *Gryllus bimaculatus* entwickelt. Die Auswahl dieser Methode und die Auswahl der verwendeten Merkmale werden hier diskutiert. Eine genaue Altersbestimmung der Grillenembryonen ist Voraussetzung für alle entwicklungsbiologischen Untersuchungen. In dieser Arbeit wurde deswegen beabsichtigt, eine Altersbestimmungsmethode zu entwickeln, die bei ungefärbten und lebenden Embryonen anwendbar ist. Außerdem muss diese Methode die komplette Embryogenese abdecken, wobei das embryonale Alter in Prozenten der gesamten Entwicklungsdauer angegeben wird. Auf die Gründe dafür wird im Folgenden eingegangen. An Literatur über die Entwicklung der Grillenembryonen ist vorhanden: *Acheta domestica*: Heymons, 1895; Denger, 1934; Krause, 1939; Kanellis, 1940 und 1952; Mahr, 1960, *Acheta domestica*: Lauga, 1969; Vollmar, 1972, *Gryllus bimaculatus*: Miyamoto und Shimozawa, 1983; Sato und Tanaka-Sato, 2002; Sarashina et al., 2005. Bis jetzt existiert aber keine solche quantitative Methode für die Altersbestimmung der Grillenembryonen.

Die Embryonalentwicklung der Grillen der Art *Acheta domestica* von der ersten bis zum letzten Entwicklungsstadium werden von verschiedenen Autoren durch äußerliche morphologische Merkmale beschrieben (Heymons, 1895; Denger, 1934; Krause, 1939; Kanellis, 1940 und 1952; Mahr, 1960). Lauga (1969) hat die Entwicklung der Grillenembryonen von *Acheta domestica* bei einer Temperatur von 25°C in 31 Stadien geteilt. Er hat die frühe embryonale Entwicklung im Ei zwischen dem Stadium vier (vier Stunden nach der Eiablage) und dem Stadium neun (zwei Tage und 10 Stunden nach der Eiablage) gezeigt. Die Entwicklung der Embryonen ab Stadium 10 (zwei Tage und 12 Stunden nach der Eiablage) bis zum Schlupf (18 Tage nach der Eiablage) werden mit Hilfe der Änderungen äußerlicher morphologischer Merkmale der Embryonen, wie zum Beispiel Änderungen der Extremitätenanlagen und des Abdomens, beschrieben. Dabei wird

auch das Längenverhältnis des Embryonen zum Dotter ab Stadium 22 (sieben Tage und 18 Stunden nach der Eiablage) berücksichtigt. Miyamoto und Shimosawa (1983) haben die Embryonalentwicklung der Grillen der Art *Gryllus bimaculatus* zwischen 45 Stunden und 170 Stunden nach der Eiablage beschrieben. Dabei wurden von grundlegenden Entwicklungsvorgängen, wie zum Beispiel Anatrepsis beziehungsweise Katatrepsis, und von leicht erkennbaren äußerlichen morphologischen Merkmalen profitiert. In den Arbeiten von Sato und Tanaka-Sato (2002) und Sarashina et al. (2005) wurde die frühe embryonale Entwicklung der Grillenembryonen der Art *Gryllus bimaculatus* aufgeklärt. Sato und Tanaka-Sato (2002) haben die Embryonalentwicklung der Grillen im Ei bis 12 Stunden nach der Eiablage bei einer Temperatur von 26°C und Sarashina et al. (2005) bis 45 Stunden nach der Eiablage bei einer Temperatur von 28°C beschrieben.

In den oben erwähnten Arbeiten über die Embryonalentwicklung der Grillen werden grundlegende Entwicklungsvorgänge beschrieben, die die Embryonen während der Embryogenese durchmachen. Dabei werden die Embryonen durch Änderungen äußerlicher morphologischer Merkmale beschrieben. Wie oben erwähnt, wurde bei der Grille der Art *Gryllus bimaculatus* bis jetzt nur ein Teil der Embryonalentwicklung und zwar die frühe embryonale Entwicklung beschrieben. Es gibt keine detaillierte Altersbestimmungsmethode für die Grillembryonen, die den Methoden ähnelt, die für andere Invertebraten, zum Beispiel *Drosophila* (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985) und Heuschrecken (Bentley et al., 1979) beschrieben wurden.

Grundsätzlich wurden mehrere Methoden für die Altersbestimmung von Insekten entwickelt. Eine umfassende Literatur gibt es über die Altersbestimmung der Heuschrecken, die wie die Grillen zu den hemimetabolen Insekten gehören (*Locusta*: Roonwal, 1936 und 1937; Shulov und Pener, 1959; Salzen, 1960; *Ornithacris* und *Pyrgomorpha*: Chapman und Whitham, 1968; *Schistocerca*: Shulov und Pener, 1963; Tyrer, 1970; *Melanoplus*: Slifer, 1932; Bentley et al., 1979).

Bei der Altersbestimmung einer Anzahl der Heuschreckenspezies, wie bei

den Grillenembryonen, wurden Entwicklungsstadien durch Änderungen äußerlicher morphologischer Merkmale der Embryonen oder Änderungen der Ausrichtung der Embryonen während der Embryogenese gekennzeichnet. Dabei erfolgt die Bestimmung der Entwicklungsstadien nach dem absoluten Alter des Embryonen. Absolutes Alter ist die Entwicklungsdauer eines Embryonen nach der Eiablage bei einer bestimmten Temperatur. Mit dieser Methode werden die Entwicklungsstadien beliebig festgelegt, je nachdem, wann die charakteristische Änderungen äußerlicher morphologischer Merkmale des Embryonen auftreten. Diese Erscheinungen sind nicht äquidistant während der Embryogenese verteilt. Dadurch sind die Abstände zwischen aufeinanderfolgenden Stadien durchaus nicht gleich, d.h. einzelne Stadien beanspruchen unterschiedliche Zeiträume. In diesem System kommen relativ lange und lückenhaft beschriebene Entwicklungsperioden vor. Bei entwicklungsbiologischen Untersuchungen ist es notwendig, eine Altersbestimmungsmethode zu haben, die lückenlos die gesamte Embryogenese abdeckt.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Embryonen der *Gryllus bimaculatus*, die sich in einem gleichen Entwicklungsstadium befinden, voneinander abweichende Merkmale zeigen. Deswegen mussten morphometrische Parameter ermittelt werden, die eine möglichst genaue Altersbestimmung gestatten. Bei der Altersbestimmung der Grillenembryonen wurden als quantitative Merkmale sowohl die Körperlänge als auch relative und absolute Antennenlänge ausgewählt. In erster Linie zeigen alle diese Merkmale ein Wachstum mit der Embryogenese, deswegen wurden diese Merkmale auf ihre Eignung zur Altersbestimmung getestet. Außerdem decken diese Merkmale einen großen Teil der Entwicklung ab, von etwa 25% bis 95% der Embryogenese. Die morphometrische Eigenschaft, die den besten Korrelationskoeffizient liefert, die absolute Antennenlänge, wurde für die Erstellung des quantitativen Altersbestimmungsmodells während des Zeitfensters von etwa 25% bis 95% der Embryogenese verwendet. Lauga (1969) hat ein anderes morphometrisches Merkmal, die Femurlänge des dritten Beines

der Grillenembryonen der Art *Acheta domesticus* bei der Altersbestimmung berücksichtigt. Die Femurlänge der Embryonen nimmt auch mit der Entwicklung zu. Allerdings nimmt das Femurwachstum viel langsamer als das Antennenwachstum während der Embryogenese zu. Zum Beispiel erreicht die Femurlänge der Embryonen von *Acheta domesticus* etwa 50% der gesamten Länge und die Antennenlänge der Embryonen der *Gryllus bimaculatus* erreicht etwa 85% der gesamten Länge im 65% der Embryogenese.

Außerdem variieren die Femurlängen des dritten Beines zum Beispiel 12 Tage alter Embryonen um 12% der Femurlänge (N = 50). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die absolute Antennenlänge der Grillenembryonen der *Gryllus bimaculatus* nicht so stark variiert, wie die Femurlänge der Grillenembryonen der Art *Acheta domesticus*. Die absoluten Antennenlängen der Embryonen, die gleich alt sind, wie die oben erwähnten Grillenembryonen der Art *Acheta domesticus*, schwankt nur um 6,8% (N = 18) der absoluten Antennenlänge.

Aus diesen Gründen ist das Wachstum der Antennenlänge entscheidender als das der Femurlänge bei der Altersbestimmung der Embryonen.

In dieser Arbeit wird die Entwicklungsdauer in Prozent der gesamten Entwicklungszeit angegeben. Mit der hier entwickelten quantitativen Altersbestimmungsmethode, die das Zeitfenster von 25% bis 95% der Embryogenese abdeckt, kann das Alter der Grillenembryonen der *Gryllus bimaculatus* mit einer Genauigkeit von 8% der gesamten Entwicklungsdauer bestimmt werden. Außerdem wird die Embryonalentwicklung der Grillen zwischen 25% bis 95% der Embryogenese durch die Änderungen äußerlicher morphologischer Merkmale der Embryonen in 15 äquidistante Stadien von je 5% eingeteilt. Die Entwicklungsdauer in Prozent anzugeben, erlaubt größere Flexibilität in der zeitlichen Auflösung und eine gleichmäßige Verteilung der Entwicklungsstadien während der gesamten Entwicklungsdauer. Die Embryonalentwicklung ist ein kontinuierlicher Prozess, aber es ist praktisch, die Prozesse in einer Anzahl der Stadien basierend auf die charakteristische Merkmale der Embryonen in gleichmäßigen Abständen

zu teilen.

Bentley et al. (1979) haben eine Altersbestimmungsmethode für Heuschreckenembryonen der Art *Schistocerca nitens* verwendet, bei der die Stadien auch in Prozenten der gesamten Entwicklungsdauer angegeben werden, die Stadien die Entwicklungsdauer gleichmäßig eingeteilt und die Stadien durch die Änderungen äußerlicher morphologischer Merkmale der Embryonen beschrieben werden. Für die Entwicklung einer solchen Altersbestimmungsmethode ist es nötig, Embryonen zu verwenden, die sich synchron entwickeln und deren gesamte Entwicklungsdauer genau vorhergesagt werden kann. Durch die Untersuchung des Grades der Differenzierung des metathorakalen Beines der sich in einem Gelege befindenden Embryonen in verschiedenen Stadien wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu Grillen mehrere Heuschreckenembryonen in einem Gelege in einem sehr ähnlichen Entwicklungsstadium sind. Mit dieser Methode kann das prozentuale Alter der Heuschreckenembryonen mit einer Genauigkeit von 1% berechnet werden. Bei der Altersbestimmung eines holometabolen Insekts, dem Tabakswärmer *Manduca sexta*, wurden die Entwicklungsstadien auch in Prozenten der gesamten Entwicklungsdauer angegeben und die morphologischen Merkmale der Embryonen wurden für jedes Stadium beschrieben (Broadie et al., 1991).

Die Altersbestimmungsmethode, bei der die Entwicklungsdauer in Prozent angegeben wird, kann bei unterschiedlicher Temperatur und für verschiedene Entwicklungsgeschwindigkeit verwendet werden. Der Vorteil der Darstellung der Entwicklungsdauer in Prozent ist es, dass die Beschreibung beziehungsweise die Methode dadurch temperaturunabhängig wird und Temperatur hat ja einen enormen Einfluss auf die ektothermen Insekten. Außerdem ist diese Methode auch unabhängig von der Entwicklungsgeschwindigkeit. Dieses Ergebnis wurde von *Locusta* (Champman und Whitham, 1968), *Schistocerca* (Shulov und Pener, 1963; Tyrer, 1970) und *Chortoicetes* (Wardhaugh, 1978) bestätigt. Die relative Zeit zu vergleichen, die verschiedene Spezies brauchen um ein bestimmtes Stadium zu erreichen, ist auch möglich, indem man diese

Zeit in Prozent der gesamten Entwicklungsdauer angibt. Shulov and Pener (1963) haben diese Methode in ihren Studien an *Schistocerca* verwendet. Moore (1948) hatte eine ähnliche Methode beim Vergleichen der Entwicklung der *Camnula* und *Melanoplus* ssp. verwendet. Sein Vergleich basiert auf der prozentualen Entwicklung, wie durch die von Slifer (1932) gemachten Studien an *Melanoplus* gezeigt wurde. Chapman und Whitham (1968) haben gezeigt, dass die Entwicklungsdauer, die man bis zu einem bestimmten Stadium der Entwicklung braucht, ist unabhängig von der Temperatur, wenn sie in Prozent angegeben wird. Dadurch ist die Entwicklungsdauer sehr ähnlich in allen Heuschreckenspezies, deren Embryogenese bereits sorgfältig beschrieben wurde. *Locusta* (Roonwal, 1936; Shulov und Pener, 1959) und *Schistocerca* (Shulov und Pener, 1963) wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, dabei wurde festgestellt, dass die Entwicklung in Prozent mit der Temperatur nicht variiert. Daher ist ein Vergleich zwischen verschiedenen Spezies auch möglich.

4.3 Die Entwicklung der peripheren Bahn in den Antennen der Grillenembryonen

Die ersten Neurone in der Antenne der Grillenembryonen der *Gryllus bimaculatus* sind die Pionierneurone. Diese Pionierneurone lassen sich wie die der Heuschreckenembryonen mit einem neuron-spezifischen anti-HRP (Meerrettichperoxidase) Antikörper färben (Bentley und Caudy, 1983; Pflüger und Kutsch, 1987; Seidel und Bicker, 2000; Boyan und Williams, 2004). Die ersten Pionierneurone differenzieren sich paarweise, ventral in der Spitze der Antenne von 30%-igen Grillenembryonen und ihre Axone bilden die erste Verbindungsbahn zum Zentralnervensystem. Das basale Pionierneuron (bPN), das als ein einziges Neuron in jeder embryonalen Antenne der Grillen vorkommt, ist in der gleichen Zeit wie die ventralen Pionierneurone zu erkennen. In den embryonalen Antennen der Grillen erreichen die Axone der basalen Pionierneurone (bPN) als die ersten überhaupt das Deutocerebrum. Die Filopodien der ventralen

Pionierneurone erreichen die basalen Pionierneurone in 37% der Embryogenese. Dabei kontaktieren die Filopodien der ventralen Pionierneurone die Filopodien der Motorneurone (Abb. 3.2.3a), bevor sie die basalen Pionierneurone erreicht haben.

Bei der Entwicklung der ersten peripheren Bahn in den embryonalen Antennen der *Gryllus bimaculatus* und in den embryonalen Antennen und den Extremitäten von *Schistocerca gregaria* gibt es eine Reihe von Ähnlichkeiten: Sowohl in der Antenne als auch in den Extremitäten der Heuschreckenembryonen sind die ersten Neurone auch Pionierneurone, die sich auch paarweise, ventral in der Spitze der Antenne und des Beines in 30%-igen Embryonen differenzieren (Bate, 1976; Keshishian, 1980; Bentley und Keshishian, 1982; Ho und Goodman, 1982; Berlot und Goodman, 1984; Seidel und Bicker, 2000; Boyan und Williams, 2004). Das basale Pionierneuron der embryonalen Antenne der Heuschrecken ist auch zur gleichen Zeit wie die ventralen Pionierneurone zu erkennen. Seidel und Bicker (2000) haben gezeigt, dass die basalen und die ventralen Pionierneurone in der embryonalen Antenne der Heuschrecken in der gleichen Zeit HRP-positiv sind. Die Axone der basalen Pionierneurone erreichen auch als die ersten überhaupt das Deutocerebrum (Ho und Goodman, 1982; Seidel und Bicker, 2000). Von Ho und Goodman (1982) wurde beschrieben, dass die Wachstumskegel der Axone der ventralen Pionierneurone die Motorneurone kontaktieren, die die basale Muskulatur innervieren, bevor sie die basalen Pionierneurone erreicht haben. Etwa im gleichen Stadium (37%) wie bei den Grillenembryonen erreichen sie die basale Pionierneurone (Seidel und Bicker, 2000).

Die oben erwähnten ersten ventralen Pionierneurone sind das erste Paar ventraler Pionierneurone (vPN1) in der Antenne der Embryonen der Art *Gryllus bimaculatus* und ihre Axone bilden später den proximalen Teil des ventralen Traktes des peripheren antennalen Nervensystems. Ab ca. 40% der Embryogenese differenzieren sich in der Spitze der Antenne zwei Paar zusätzlicher Pionierneurone, das zweite Paar ventraler Pionierneurone (vPN2) und die dorsalen Pionierneurone (dPN). Sie senden ihre Axone proximal entlang der inneren Fläche des antennalen Epithels. Von den

Axonen der vPN2 wird der distale Teil des ventralen Traktes gebildet. In 43% der Embryogenese erreichen die Axone der vPN2 die Zellkörper der vPN1 und so wird der ventrale Trakt des zukünftigen Antennennerven gebildet. Der dorsale Trakt wird von den Axonen der dorsalen Pionierneurone gebildet. Kurz vor der Hälfte der Embryogenese (47%) fusioniert der dorsale Trakt mit dem ventralen Trakt und so wird die komplette periphere Bahn in der Antenne der Grillenembryonen gebildet. Die ersten Studien über die periphere Bahn in der Antenne der Heuschreckenembryonen berichten, dass zwei Paar der Pionierneurone, die sogenannten ventralen und dorsalen Pionierneurone, erst die ventralen und dann die dorsalen Pionierneurone in der Spitze der Antenne erscheinen, wodurch zwei axonale Bahn in der Antenne gebildet werden und so das komplette sensorische Nervensystem der Antenne bahnen (Ho und Goodman, 1982; Berlot und Goodman, 1984; Goodman, 1984). Eine Bestätigung finden diese Befunde in der Arbeit von Seidel und Bicker (2000). Das Muster der Bildung des dorsalen Traktes des peripheren antennalen Nervensystems der *Gryllus bimaculatus* wird von den Axonen von einem Paar der dorsalen Pionierneurone gebildet, wie das in den früheren Stadien für die Heuschreckenembryonen berichtet wurde, anders als von Boyan und Williams (2004) für Heuschreckenembryonen gezeigt wurde. Der ventrale Trakt des peripheren antennalen Nervensystems der Grillen wird nicht lediglich von einem Paar Pionierneurone gebildet, wie das von Ho und Goodman (1982) für Heuschrecken gezeigt wurde. Das Muster der Bildung des ventralen Traktes des peripheren antennalen Nervensystems der Grillen ähnelt dem Muster der Bildung des ventralen Traktes in der Antenne der Heuschreckenembryonen, wie von Boyan und Williams (2004) dokumentiert wurde. Im Gegensatz zu früheren Studien haben Boyan und Williams (2004) zusätzlich sich differenzierende Pioniere in mehr proximalen Zonen gezeigt, ähnlich wie in den Beinen der Heuschreckenembryonen von Meier und Reichert (1991) berichtet wurde. Dadurch wird die antennale periphere Bahn in einer „trittstein-artigen“ Art gebildet, wie das in den Beinen der Heuschreckenembryonen der Fall ist (Bentley und Keshishian, 1982; Ho und Goodman, 1982). Die axonale

periphere Bahn in der Antenne der Heuschreckenembryonen der *Schistocerca gregaria* wird von vier Paar Pionierneurone gebildet. Ein ventrales und ein dorsales Paar differenzieren sich in der Spitze der Antenne (A1:vPN und A1:dPN), und die anderen zwei Paare, das andere ventrale und dorsale Paar (A2:vPN und A2:dPN), differenzieren sich in der Mitte der Antenne in etwa 30% der Embryogenese. In etwa 40% der Embryogenese fusionieren die Axone der ventralen Pionierneurone mit den Axonen der dorsalen Bahn in der Nähe der Antennenbasis. Der ventrale Trakt wird von den beiden Paaren der ventralen Pionierneurone gebildet wie bei der *Gryllus bimaculatus*. Das ventrale Pionierneuronenpaar der Antennenspitze bildet anders als bei der Grille den distalen Teil des ventralen Traktes, und das zweite Paar der ventralen Pionierneurone aus der Mitte bildet den proximalen Teil des ventralen Traktes. Der dorsale Trakt wird in einer identischen Weise wie der ventrale Trakt gebildet. Die Axone der dorsalen Pionierneurone aus der Antennenspitze bilden den distalen Teil und die der dorsalen Pionierneurone aus der Antennenmitte den proximalen Teil des dorsalen Traktes.

In der embryonalen Heuschreckenantenne kommen anders als in der embryonalen Grillenantenne zwei Paar Pionierneurone pro Annulus in zwei Annuli (in A1 und A2) des zukünftigen Flagellums vor. In der embryonalen Grillenantenne differenzieren sich erst ein Paar Pionierneurone in einem Annulus in der Antennenspitze und etwas später in der Embryogenese, dem Zuwachs der Antenne folgend, zusätzliche zwei Paar Pionierneurone in einem distalen Annulus des zukünftigen Flagellums. Das antennale periphere Nervensystem der Heuschrecken wird von vier Paar Pionierneuronen, das der Grillembryonen von drei Paar Pionierneurone gebildet. Das Bildungsmuster der axonalen peripheren Bahn in der Antenne der Grillen bleibt bis etwa zur Hälfte der Embryogenese (55%) unverändert. Das Entstehungsmuster des dorsalen Traktes des Antennennervs stimmt mehr mit dem Muster der Bildung des dorsalen Traktes überein, wie es in den früheren Stadien für die Heuschreckenembryonen dokumentiert wurde. Der ventrale Trakt des

peripheren antennalen Nervensystems der Grillen wird, wie der ventrale Trakt in der Antenne der Heuschreckenembryonen, nach einem „trittstein-artigen“ Muster gebildet, wie von Boyan und Williams (2004) dokumentiert wurde.

Obwohl es einen Unterschied im Entstehungsmuster des dorsalen Traktes des Antennennervs zwischen den Grillen und den Heuschrecken gibt, wird die erste Verbindungsbahn zum Zentralnervensystem in diesen beiden Gruppen in etwa 37% der Embryogenese schrittweise von Axonen der Pionierneuronen gebildet.

Wie bereits von Pflüger und Kutsch (1987) und von Seidel und Bicker (2000) für Heuschrecken berichtet wurde und wie es sich auch in dieser Arbeit für Grillen herausstellte, werden die von den Pionierneuronen gelegten Bahnen von allen in der Entwicklung später entstehenden sensorischen Neuronen benutzt und schließlich wird das komplette antennale sensorische Nervensystem gebildet.

In holometabolen Insekten, wie zum Beispiel *Drosophila*, beginnen sich die ersten Neurone in Imaginalscheiben der Antenne, der Beine und der Flügel während der Metamorphose zu differenzieren (Murray et al., 1984; Jan et al., 1985; Palka et al., 1986). Von Jhaveri et al. (2000) wurde auch berichtet, dass die Differenzierung und Spezifizierung der sensorischen Zellen in Imaginalscheiben bei diesen Insekten postembryonal vorkommen. Das allgemeine Schema der Entstehung der peripheren Bahn durch Pionierneurone wurde auch bei holometabolen Insekten gefunden (Murray et al., 1984).

Verschiedene Strategien der Bahnbildung werden von unterschiedlichen Imaginalscheiben (Bein, Flügel und Antenne) verfolgt, je nach der Änderungen der Strukturen, die der während der Metamorphose ausgesetzt haben. In der Beinscheibe wird die Bahn verfolgt, die die larvalen Pionierneurone gebildet haben. In der Imaginalscheibe der Flügel entstehen neue Pionierneurone während der Metamorphose und sie bilden die peripheren Bahn in der Flügel. In der Antennenscheibe entstehen keine Pionierneurone, weil die Umstülpung der Imaginalscheibe der Antenne sehr langsam erfolgt und die Entfernung von der Antennenbasis zur

Antennenspitze während der Metamorphose die ganze Zeit kurz bleibt. Die antennalen sensorischen Neurone differenzieren sich während der Metamorphose und ihre Axone beziehungsweise Faserbündel erreichen den larvalen Nerv und schließlich projizieren sie in das Zentralnervensystem.

Wie oben geschildert, spielen die larvalen sensorischen Neurone eine wichtige Rolle bei der peripheren Bahnbildung bei holometabolen Insekten. Der larvale Nerv (von larvalen Pionierneuronen) bildet eine Brücke zwischen den sensorischen Neuronen der jeweiligen Gliedmaßen und dem Zentralnervensystem (Jan et al., 1985; Shepherd und Smith, 1996; Tissot et al., 1997).

Bei Insekten, die eine Metamorphose durchmachen, stammen die adulten peripheren Nerven aus den neuronalen Bahnen, die zwischen den Imaginalscheiben und dem Zentralnervensystem bereits gebildet werden. Sanes und Hildebrand (1976) haben gezeigt, dass neu entstandene antennale sensorische Neurone ihre Axone entlang der vorher gebildeten Puppenerven in den Antennallobus senden.

Es gibt einen großen Unterschied zwischen der Entwicklung der hemimetabolen und holometabolen Insekten. Grillen und Heuschrecken sind hemimetabole Insekten, bei denen der Larve ein Miniatur-Adult ist. Meiste oder alle Bahnbildung kommt während der Embryogenese vor. Die postembryonale Entwicklung ist an der Erhöhung der Anzahl und Größe der sensorischen Strukturen beteiligt. In holometabolen Insekten wie zum Beispiel *Drosophila* entstehen die adulten Strukturen aus den Imaginalscheiben bei der Metamorphose. Alle Organe und Gliedmaßen sind bereits in der Larve als Imaginalscheiben vorhanden. Die adulten sensorischen Strukturen erscheinen während oder kurz vor der Metamorphose.

Die larvalen Pionierneurone der Imaginalscheiben und die Pionierneurone, die während der Metamorphose aus der Imaginalscheiben bei der holometabolen Insekten entstehen, haben die gleiche Funktion, nämlich die peripheren Bahnbildung, wie die Pionierneurone der Grillen, die ein hemimetaboler Insekt ist.

4.4 Die Entstehung der antennalen Sensorik der Grillenembryonen

Die durch einen anti-HRP-Antikörper gefärbten sensorischen Neurone zeigen hervortretende apikale Dendriten, die ein Merkmal für sensorische Neurone sind (Seidel und Bicker, 2000). Die ersten sensorischen Neurone differenzieren sich ab etwa 33% der Embryogenese im Epithel der Antenne der *Gryllus bimaculatus*, wie das für die embryonale Antenne der Heuschrecken der *Schistocerca gregaria* von Boyan und Williams (2004) berichtet wurde. Seidel und Bicker (2000) haben allerdings bei Heuschreckenembryonen der gleichen Art dokumentiert, dass sich sensorische Neurone erst ab 38% der Embryogenese differenzieren. Ähnlich wie bei den Heuschreckenembryonen (Seidel und Bicker, 2000; Boyan und Williams, 2004) erfolgt die Differenzierung der sensorischen Neurone in der Antennenspitze, in der Antennenmitte und in der Nähe der Antennenbasis der Grillenembryonen. Im 37% der Embryogenese hat die Antenne der Grillenembryonen drei sensorische Zellbildungszonen, wie bei Heuschreckenembryonen. Im Gegensatz zu Heuschreckenembryonen, die zwischen 43% und 45% der Embryogenese drei Zellbildungszonen in der Antenne haben (A1-A3; Boyan und Williams, 2004), hat die Antenne der Grillenembryonen fünf Zellbildungszonen (Z1-Z5). Die antennalen sensorischen Neurone differenzieren sich in Bändern in der embryonalen Antenne. Die Differenzierung dieser sensorischen Neurone erfolgt in jedem Annulus der Antenne der Grillen, parallel zum Beginn der Segmentierung (ab etwa 45%). Diese Zellbildungszonen entsprechen der Annuli der Grillenantennen. Diese Befunde finden eine Bestätigung in den Arbeiten an den Heuschreckenembryonen (Seidel und Bicker, 2000; Boyan und Williams, 2004).

Die äußerliche Segmentierung und Anulierung der Antenne der Grillen beginnt ab ca. 43% der Embryogenese und das erste Antennenbasissegment (Scapus) ist ab diesem Stadium zu erkennen. Die basale Zellbildungszone (Z3) gehört wegen ihres neuronalen Besatzes zum zweiten Antennensegment Pedicellus und die restlichen Zellbildungszonen zum Flagellum. Am Ende der Embryogenese besteht die Antenne der

Grillen wie auch der Heuschrecken aus dem Scapus, dem Pedicellus und dem Flagellum, das bei Grillen 29 Annuli besitzt. Das Flagellum der Heuschreckenembryonen der *Schistocerca americana* trägt 11 Annuli beim Schlupf (Chapman, 2002). Der große Unterschied zwischen der Anzahl der sensorischen Zellbildungszone der beiden Gruppen wird dadurch erklärt, dass das Flagellum der Antenne der Heuschrecken am Ende der Embryogenese weniger Annuli (11) als die Grillen (29) hat. Die Grillen der *Gryllus bimaculatus* gehören zur Ordnung Langfühlerschrecken (Ensifera) im Gegensatz zu Heuschrecken der *Schistocerca* (Kurzfühlerschrecken = Caelifera).

Die sensorischen Neurone der Mechanorezeptoren, die in der Antennenbasis der adulten Grillen vorkommen, Chordotonalorgane und Haarsensillen (Honegger et al. 1990; Yildiz, 2002; Diplomarbeit, Lehrstuhl für Zoologie, TU München; Yildiz und Gebhardt, 2003), sind früh in der Entwicklung mit einem neuron-spezifischen anti-HRP Antikörper nachzuweisen, ebenso wie die Neurone des pedicellaren Chordotonalorgans (Johnstonsches Organ) der Heuschreckenembryonen der *Schistocerca gregaria* (Seidel und Bicker, 2000; Boyan und Williams, 2004).

Die Identifizierung der basalen embryonalen Mechanorezeptoren erfolgte nach Merkmalen, die die Mechanorezeptoren in der Antennenbasis der adulten Grillen zeigen (Yildiz, 2002; Diplomarbeit, Lehrstuhl für Zoologie, TU München; Yildiz und Gebhardt, 2003). Folgende Kriterien wurden für die Identifizierung verwendet: **(1)** Lokalisation und Anordnung der sensorischen Neurone der Mechanorezeptoren in den jeweiligen Antennensegmenten. **(2)** Verzweigungsmuster der Axone beziehungsweise der Faserbündel der sensorischen Neurone der Mechanorezeptoren.

Ab etwa 45% der Embryogenese differenzieren sich die sensorischen Neurone der scapalen Haarsensillen (SH) auf der dorsalen Seite im Scapus und die des scapalen Chordotonalorgans (SCO) auf der ventralen Seite im Scapus. Die embryonalen Haarsensillen sind genauso v-förmig wie die des dorsalen Haarfeldes auf dem Scapus adulter Grillen angeordnet. Das embryonale scapale Chordotonalorgan liegt ventral im Scapus und besteht

aus zwei Gruppen von sensorischen Neuronen, wie das bei adulten Grillen bekannt ist (Honegger, unveröffentlichte Arbeit; Seidl, eigene Daten). Die campaniformen Sensillen (CS) des Pedicellus wurden nach ihrer Lage und dem Verzweigungsmuster der Faserbündel, in dem sich ihre Axone befinden, ab ca. 45% der Embryogenese charakterisiert. Die campaniformen Sensillen sind als zwei distal liegende Gruppen von Neuronen im Pedicellus zu erkennen. Ab 50% der Embryogenese wurden die Haarsensillen des Pedicellus (PH) proximal von den campaniformen Sensillen charakterisiert. Sie sind anders positioniert als die restlichen Neurone, die sich in diesem Segment befinden. Sie liegen in der medio-lateralen Achse im proximalen Bereich dieses Segmentes. Die Neurone, die sich im distalen Bereich in diesem Segment befinden, sind in der proximal-distalen Achse gelegen. Ab 60% der Embryogenese zeigen sie die adult-ähnliche Anordnung, sie kommen nämlich in Reihen vor. Von diesem Stadium an liegt eine Gruppe der Haarsensillen in zwei Reihen auf der medialen Seite und eine weitere Gruppe der Haarsensillen auch in zwei Reihen auf der lateralen Seite dieses Segmentes. Schließlich bilden sie die medialen und lateralen Haarfelder im proximalen Bereich des Pedicellus der adulten Grillen. Das Chordotonalorgan des Pedicellus (PCO) wurde in ca. 50% der Embryogenese charakterisiert. Dieses embryonale Chordotonalorgan kommt im Pedicellus als eine medial liegende Gruppe von Neuronen vor. Die ersten Neurone dieses Organs differenzieren sich bereits in ca. 47% der Embryogenese. Das Bündel der Axone der Neurone dieses Organs verbinden sich mit dem dorsalen Trakt des antennalen Nervensystems im Pedicellus.

In der Literatur wurde bis jetzt nur das pedicellare Chordotonalorgan in der Antennenbasis der Heuschrecken der *Schistocerca gregaria* während der Embryogenese gezeigt. Seidel und Bicker (2000) haben berichtet, dass sich sensorische Neurone des pedicellaren Chordotonalorgans (Johnstonsches Organ: Johnston, 1855; Gewecke, 1972) in der basalen sensorischen Zellbildungszone, im zukünftigen Pedicellus der Heuschreckenembryonen ab 38% der Embryogenese differenzieren. Dieser Befund hat eine Bestätigung in der Arbeit von Boyan und Williams

(2004) gefunden. Das Johnstonsche Organ im Pedicellus wurde in 47% der Embryogenese gezeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte ein entsprechendes Organ im Pedicellus der Grillenembryonen nicht nachgewiesen werden. Dieses Organ ist entweder noch nicht entstanden in den untersuchten Entwicklungsstadien (bis etwa 60% der Embryogenese) oder so ein Organ kommt in der Grillenantenne nicht vor. Im etwa gleichen Stadium, in dem das pedicellare Chordotonalorgan der Heuschrecken zu erkennen ist, kommt im Pedicellus der Grillenembryonen die campaniformen Sensillen vor. Im Gegensatz zu Heuschreckenembryonen konnte in den Grillenembryonen ein pedicellares Chordotonalorgan, die pedicellaren Haarsensillen und die campaniformen Sensillen im Pedicellus embryonal nachgewiesen werden.

Die postembryonale Entwicklung verschiedener Typen antennaler Sensillen wurde von Chapman (2002) bei der *Schistocerca* untersucht und die zentralen Projektionen einiger Sensillen wurden bei adulten Heuschrecken gezeigt (Gewecke, 1979; Bräunig et al., 1983; Hansson et al., 1996). Die embryonale Entwicklung der antennalen Sensorik wurde aber bis jetzt nicht im Detail untersucht. Es ist dennoch bekannt, dass zum Beispiel adulte *Locusta migratoria* neben dem Johnstonschen Organ auch ähnlich wie die adulten Grillen ein Chordotonalorgan, campaniformen Sensillen, Haarsensillen im Pedicellus, Chordotonalorgane (ein laterales und ein mediales) und Haarsensillen im Scapus (Gewecke, 1972) besitzen. Im etwa gleichen Stadium (47%), in dem sich die sensorischen Neurone des scapalen Chordotonalorgans der *Gryllus bimaculatus* zu differenzieren beginnen, sind zwei Gruppen sensorischer Neurone im Scapus der Heuschreckenembryonen von *Schistocerca gregaria* zu erkennen (in A4; Boyan und Williams, 2004). Diese Gruppen wurden nicht weiter charakterisiert. Sie gehören vermutlich zum scapalen Chordotonalorgan.

Die deutocerebralen Motoneurone differenzieren sich vermutlich vor etwa 37% der Embryogenese, da die Axone mit Ihren Wachstumskegeln und Filopodien von Motoneuronen ventral in dem ersten Antennensegment in ca. 37% der Embryogenese zu erkennen sind. Dieses axonale Bündel, das hier in dieser Arbeit als ventraler Nerv (vN) bezeichnet wird, ist der

anfängliche Nerv 2 und der Nerv 3. Der Nerv 2 ist ein sensomotorischer Nerv, der sowohl Axone der Motoneurone enthält, die die scapopedicellären Muskeln (M6 und M7) im Scapus innervieren, als auch alle Afferenzen der Mechanorezeptoren (Haare und ein Chordotonalorgan) im Scapus. Diese Mechanorezeptoren werden von den Ästen 2A₁, 2B und 2C₁ innerviert. Nerv 3 ist ebenfalls ein senso-motorischer Nerv, der die intrinsischen Antennenmuskeln (alle M4 und M5a) innerviert und die Axone von einem Mechanorezeptor enthält (Honegger et al. 1990). Im ersten Antennenbasissegment ist bei 43% der Embryogenese ein dorsales, axonales Bündel zu erkennen, das hier als dorsaler Nerv (dN) bezeichnet wird. Im Verlauf der Entwicklung verbreiten diese Motoneurone ihre Filopodien im ersten Antennensegment. Dieser Nerv soll der deutocerebrale Nerv 4 der adulten Grillen sein, der ein motorischer Nerv ist (Honegger et al. 1990). Der Ast A dieses Nerven 4 innerviert die scapalen Muskeln M5a und M5b. Der Seitenast A₁ projiziert sich auf den Muskel M5a und verbindet sich mit dem Ast E des Nerven 3. Der Ast 4B innerviert den Muskel M7 und fusioniert mit dem Ast 2A des Nerven 2. Sowohl in den Antennen der Heuschreckenembryonen als auch der Grillenembryonen differenzieren sich die sensorischen Neurone in drei Zonen. Mit dem Beginn der Segmentierung der embryonalen Antennen der beiden Insekten erfolgt die Differenzierung in jedem Annulus des Flagellums. Bei beiden Gruppen differenzieren sich die ersten sensorischen Neurone der adulten Mechanorezeptoren im Pedicellus im etwa gleichen Stadium (etwa 38%), die jedoch zu zwei verschiedenen Mechanorezeptoren gehören (*Schistocerca gregaria*: das pedicellare Chordotonalorgan (Johnstonsches Organ); *Gryllus bimaculatus*: die campaniformen Sensillen). In der Antennenbasis der Grillembryonen entstehen als nächstes die scapalen Haarsensillen und das scapale Chordotonalorgan (ab 45%). Die embryonalen Mechanorezeptoren im Pedicellus, das Chordotonalorgan und die pedicellaren Haarsensillen sind erst ab die Hälfte der Embryonenese (50%) zu charakterisieren. Außer den campaniformen Sensillen sind die zentralen Projektionen aller mechanosensorischen Neurone der Antennenbasis der Grillenembryonen,

die in dieser Arbeit gezeigt wurden, ab der Hälfte der Embryogenese fertig gestellt. Die campaniformen Sensillen haben ihre Projektionen wie die sensorischen Neurone des pedicellaren Chordotonalorgan der Heuschreckenembryonen ab etwa 40% der Embryogenese. Das pedicellare Chordotonalorgan und die pedicellaren Haarsensillen haben ihre zentralen Projektionen bei 50% der Embryogenese. Bei ca. 55% der Embryogenese werden die Axone des scapalen Chordotonalorgans ins Oberschlundganglion projiziert. Die scapalen Haarsensillen haben ihre Projektion ab 60% der Embryogenese. Aus diesem Schema der Projektionen der sensorischen Neurone verschiedener antennalen basalen Mechanorezeptoren ergibt sich, dass eine Differenzierung der mechanosensorischen Areale im Zentralnervensystem ab etwa 40% der Embryogenese erkannt werden kann.

4.5 Die Projektionsareale der antennalen Sensorik der Grillenembryonen

In der vorliegenden Arbeit konnten die Projektionsareale der antennalen sensorischen Neurone zwischen 65% und 95% der Embryogenese charakterisiert werden. Dafür wurde die so genannte „backfill“-Methode und die Dil-Applikation verwendet. Wegen der geringen Größe und großer mechanischer Empfindlichkeit der Grillenembryonen, die jünger als 65% sind, konnten diese Methoden am Antennennerv junger Embryonen nicht angewendet werden.

Die Axone der antennalen sensorischen Neurone im Antennennerv der Grillenembryonen treten lateral in das ventrale Deutocerebrum ein. Nachdem der Antennennerv in das Oberschlundganglion hereinzieht, laufen die Axone der antennalen sensorischen Neurone in drei Faserbündeln (F1, F2 und F3) in unterschiedlichen Richtungen im Deutocerebrum. Sie enden in drei verschiedenen Projektionsarealen (P1, P2 und P3) im Deutocerebrum der Grillenembryonen.

Die Fasern im Faserbündel F1 laufen in eine anteriore und mediale

Richtung im Deutocerebrum und enden in dem Projektionsareal P1 im medianen Deutocerebrum (65%). Ab 70% der Embryogenese laufen einzelne Fasern im Faserbündel F1 weiter in anteriorer, medialer Richtung und enden im anterioren Deutocerebrum. Bei 80% der Embryogenese treten die Fasern aus dem Faserbündel F1 anterior, lateral in das Projektionsareal P1 ein. Sie verzweigen sich und glomeruli-ähnliche Strukturen (G in Abb. 3.3.5a) bilden sich an den terminalen Endigungen dieser Fasern. Das Faserbündel F2 läuft posterior und medial von Faserbündel F1 und endet posterior von Faserbündel F1 in dem Projektionsareal P2 im Deutocerebrum. Die Projektion dieser Fasern erstreckt sich bis nach dorsal im Deutocerebrum. Ab 70% der Embryogenese ist es auffallend, dass diese Fasern im Projektionsareal P2 dicht gepackt sind und der am weitesten dorsal liegende Teil dieses Projektionsareals P2 im dorsalen, posterioren Deutocerebrum zu sehen ist. Bei 80% der Embryogenese treten einzelne Fasern der antennalen sensorische Neuronen aus dem Faserbündel F2 parallel von lateral in das Projektionsareal P2 ein und sie laufen dort in eine lateral-mediale Richtung. Dann biegen sie in eine anteriore, laterale Richtung in diesem Projektionsareal ab. Die dritte Gruppe der Fasern der antennalen sensorischen Neurone im Faserbündel F3 zieht anterior von dem Faserbündel F2 und posterior von dem Faserbündel F1 in das Deutocerebrum herein. Sie laufen in eine mediale Richtung im Deutocerebrum und verzweigen sich im Projektionsareal P3 anterior von dem Projektionsareal P2 im Deutocerebrum. Das Projektionsareal P3 der antennalen sensorischen Neurone liegt dorsal im Deutocerebrum.

In adulten Grillen wurden bereits die Projektionsareale der antennalen Afferenzen im Deutocerebrum von Staudacher und Schildberger (1999) untersucht. Um die Identität der embryonalen Projektionsareale herzuleiten, werden sie mit den Neuropilen der adulten antennalen Afferenzen verglichen. Der Vergleich wird nachfolgend nach dem Verlauf der antennalen Fasern im Deutocerebrum und nach der Lokalisation der Projektionsareale erfolgen.

Die Axone der antennalen Afferenzen aus dem Antennennerv der adulten

Grillen treten in das ventrale, laterale Deutocerebrum ein und bilden verschiedene Trakte (T1-7). Die antennalen Afferenzen projizieren in diesen Trakten in drei verschiedene Projektionsareale im Deutocerebrum. Diese sind der Antennallobus, der Dorsallobus und das Areal vfa (ventral area of flagellar afferents: Staudacher und Schildberger, 1999).

Der Antennallobus der Grillen ist homolog zum olfaktorischen Neuropil der anderer Insekten (Staudacher und Schildberger, 1999). Der Antennallobus der Grillen hat eine ähnliche Lokalisation und eine ähnliche Struktur wie der Antennallobus anderer Insekten (*Manduca*: Rospars und Hildebrand, 1992; *Locusta*: Laurent, 1996; Schabe: Distler und Boeckh, 1996; Fliegen: Straußfeld, 1976). Bei allen hemimetabolen und holometabolen Insekten projizieren die olfaktorischen Rezeptoren in das ventrale, anteriore Deutocerebrum und bilden die Glomeruli des Antennallobus, wo die synaptische Verarbeitung der olfaktorischen Information stattfindet. Die Antennen haben auch nicht olfaktorische Rezeptoren, von denen viele, aber nicht alle in den Dorsallobus, beziehungsweise in das aus funktionellen Gründen AMMC (antennal mechanosensory und motor center) genannte Neuropil projizieren (Suzuki, 1975; Kloppenburg, 1995; AMMC: Rospars, 1988; Homberg et al., 1989; Nishino et al., 2005; Ignell et al., 2005). Einige nicht olfaktorische Fasern, zum Beispiel die Fasern der Thermo- und Hygrorezeptoren der Antenne von *Periplaneta americana* projizieren in den dorso-zentralen Teil des Antennallobus (Nishino et al., 2003).

Staudacher und Schildberger (1999) haben gezeigt, dass das antennal-mechanosensorische Neuropil der adulten Grillen zweigeteilt ist; anders als bei den bis dahin untersuchten Insekten. Die Axone der mechanosensorischen Neurone des Flagellums in dem Trakt T7 enden vermutlich im ventralen, posterioren Bereich dieses Neuropils, im vfa, und die Axone der sensorischen Neurone der Antennenbasis in dem Trakt T5/6 verzweigen sich vermutlich nur im Dorsallobus. Die olfaktorischen Fasern in den Trakten T1-4 und die antennalen Afferenzen in den Trakten T5/6 sind anterior lokalisiert, während die andere Gruppe der Fasern im Trakt T7 posterior verlaufen. Die Fasern im Trakt T7 sind mehr ventral als die

Fasern in T5/6 lokalisiert. Diese Fasern im Trakt T7 verlaufen posterior nach ihrem Eintritt in das Deutocerebrum, während die Fasern in T5/6 horizontal verlaufen. Die Fasern in dem Trakt T7 treten in parallelen Gruppen in das Neuropil vfa ein. Staudacher und Schildberger (1999) haben berichtet, dass dieses Neuropil kleine, dicht gepackte Fasern enthält und im Gegensatz zum Antennallobus nicht aus Glomeruli besteht. Einige der Fasern in T5/6 laufen in dem Trakt T6I zur medialen, anterioren Grenze des Deutocerebrums. Diese Fasern haben Kollateralen, die im Trakt T6II in das Unterschlundganglion absteigen (Staudacher und Schildberger, 1999). Im Unterschlundganglion enden diese Fasern dorsal und ipsilateral, wie für *Locusta* beschrieben wurde (Gewecke, 1979; Bräunig et al., 1983). Wenn man die relative Lage der drei Neuropile im Deutocerebrum der adulten Grillen miteinander vergleicht, liegt der Antennallobus am weitesten anterior im Deutocerebrum. Wenn man das Deutocerebrum von ventral betrachtet, verbirgt der Antennallobus den Dorsallobus, die Trakte T6I und T6II und den am weitesten anterior liegenden Teil des Neuropils vfa.

Im Verlauf der Entwicklung der Grillenembryonen, bereits ab 65% der Embryogenese, differenzieren sich die drei Projektionsareale der antennalen sensorischen Neurone im Deutocerebrum. Der Verlauf der antennalen sensorischen Fasern in den Faserbündeln F1, F2 und F3 und die Lage ihrer Projektionen in den Projektionsarealen P1, P2 und P3 im Deutocerebrum der Grillenembryonen stimmen mit dem Verlauf der Fasern der antennalen Afferenzen in den Trakten T1-4, T5/6 und T7 und mit der Lage der Neuropile der antennalen Afferenzen, Antennallobus, vfa und Dorsallobus im Deutocerebrum der adulten Grillen überein.

Diese drei Neuropile der antennalen Afferenzen der adulten Grillen, Antennallobus, Dorsallobus und vfa differenzieren sich bereits ab 65% der Embryogenese im Deutocerebrum. Die Glomeruli des Antennallobus werden ab etwa 80% der Embryogenese gebildet.

Verschiedene mechanosensorische Rezeptoren, die sich im Dorsallobus verzweigen, wurden in verschiedenen Insekten vor allem in *Locusta* (*Locusta*: Gewecke, 1979; Bräunig et al., 1983; Schaben: Nishikawa et al.,

1995) untersucht. Die antennalen Mechanorezeptoren aus den zwei Antennenbasissegmenten von *Locusta*, Johnstonsches Organ, scapale Haarfelder und pedicellare campaniformen Sensillen projizieren in den Dorsallobus (Gewecke, 1979; Bräunig et al., 1983). Die Fasern des Johnstonschen Organs projizieren in den Dorsallobus und dort teilen sich in zwei Bündel (Gewecke, 1979). Die Fasern im TPPP (tractus pedicello-protocerebrum postero-medianus) verlaufen vom Dorsallobus zum postero-medianen Teil des Oberschlundganglions. Die Fasern im TPSG (tractus pedicello-ganglion suboesophagealis) steigen vom Dorsallobus in das USG ab. Die zentrale Projektion des Johnstonschen Organs (*Locusta*: Gewecke, 1979) könnte zu der Projektion der antennalen Afferenzen in dem Dorsallobus und in den Trakten T6I und T6II in Honigbienen homolog sein (Suzuki, 1975). Das gleiche Projektionsmuster im Deutocerebrum zeigen die scapalen Haarfelder und pedicellaren campaniformen Sensillen in *Locusta* (Bräunig et al., 1983). In adulten Grillen existieren antennale Projektionen, die morphologisch dem Dorsallobus und den Trakten T6I und T6II der Honigbienen und Heuschrecken ähnlich sind und sich in einer vergleichbaren Position befinden (Staudacher und Schildberger, 1999). Staudacher und Schildberger (1999) haben die Füllung am Antennennerv auf dem Niveau des siebten Flagellumsegments durchgeführt. Deswegen haben diese Autoren dieses Projektionsmuster im Dorsallobus und in den Trakten T6I und T6II so interpretiert, dass dieses Projektionsmuster entweder wegen „dye coupling“ zustande gekommen ist oder Fasern aus dem Flagellum in einer ähnlichen Weise wie die Fasern der basalen Mechanorezeptoren in den Dorsallobus projizieren.

In Grillenembryonen wurden Projektionen gefunden, die den Projektionen in den Trakten T6I und T6II in adulten Grillen ähnlich sind. Im dorsalen Deutocerebrum eines 70%-igen Grillenembryonen ist ein Faserbündel (dF: dorsale Faserbündel) angefärbt. Die Fasern in diesem Faserbündel verlaufen in eine anterior-mediale Richtung im Deutocerebrum, ebenso wie die Fasern im Trakt T6I der Adulten. Im posterioren, dorsalen Deutocerebrum eines 75%-igen und eines 95%-igen Embryonen wurde ein absteigendes Faserbündel (aF) beobachtet. Dieses Faserbündel verläuft

von dort zum Schlundkonnektiv und zieht dorsal in das Unterschlundganglion herein, ähnlich wie die im Trakt T6II der adulten Grillen. Bei diesen Embryonen wurde die Füllung der Antennennerven auf Höhe etwa des vierten Flagellumsegments durchgeführt. Das Projektionsmuster im Projektionsareal P3, des zukünftigen Dorsallobus und in den Faserbündeln „dF“ und „aF“ in Embryonen, den vermutlich zukünftigen Trakten T6I und T6II, ist vermutlich ebenfalls durch „dye coupling“ zustande gekommen. Alternativ könnten die Fasern aus dem Flagellum in einer ähnlichen Weise wie die Fasern der basalen Mechanorezeptoren in den Dorsallobus projizieren wie bei Honigbienen (Suzuki, 1975) und auch wie bei Heuschrecken (Gewecke, 1979).

Es ist in der Literatur bekannt, dass Mechanorezeptoren aus dem Flagellum in den Dorsallobus projizieren. Nishikawa et al. (1995) haben gezeigt, dass sich die Kälte/Hygrorezeptoren entweder im Dorsallobus verzweigen und in das Unterschlundganglion absteigen oder sie projizieren in Glomeruli an der Grenze zwischen Antennallobus und Dorsallobus von *Periplaneta americana*. Nishino et al. (2005) haben gezeigt, dass vermutlich alle antennalen mechanosensorischen Afferenzen adulter *Periplaneta americana* in den Dorsallobus des Deutocerebrums und in den anterioren Teil des Unterschlundganglions projizieren. Die mechanosensorischen Afferenzen zeigen dort ein somatotopisches Projektionsmuster. Die Grillen haben im Flagellum zwei Typen von sensorischen Haaren, vermutlich kontakt-chemosensorische und mechanosensorische Haare (Fudalewicz-Niemczyk und Rosciszewska, 1973; Balakrishnan und Pollack, 1997; Staudacher, nicht veröffentlicht; aus: Staudacher, et al., 2005). Die Projektionsmuster im Dorsallobus der Grillembryonen können zu sensorischen Neuronen entweder aus dem Flagellum oder aus der Antennenbasis gehören. Es wurde aber bis jetzt gezeigt, dass die Projektionen in den Trakten T6I und T6II zu den Mechanorezeptoren aus den beiden Antennenbasissegmenten von *Locusta migratoria* gehören (Gewecke, 1979). Deswegen könnte das Projektionsmuster in den Trakten T6I und T6II im Deutocerebrum der Grillembryonen auch aus den sensorischen Neuronen der zukünftigen

Mechanorezeptoren aus den beiden Antennenbasissegmenten stammen.

Es gibt viele Studien, die darauf hindeuten, dass propriozeptive Sinnesorgane wie Chordotonalorgane, Haarsensillen und campaniformen Sensillen in eine dorsale Region des Neuropils und exterozeptive Sinnesorgane in eine ventrale Schicht des Neuropils projizieren. Diese Befunde unterstützen die Zweiteilung des nicht glomerulären antennalen Neuropils der Grillen.

In Embryonen von *Drosophila* sind die Projektionen der Exterozeptoren und der Chordotonalorgane im Zentralnervensystem aufgeteilt, zeigen aber noch kein dorsoventrales Teilungsmuster der Projektionen der Afferenzen, wie das bei anderen Insekten zu erkennen ist (Merritt und Whittington, 1995). Schrader und Merritt (2000) haben die zentralen Projektionen der sensorischen Neurone im ersten Larvenstadium von *Drosophila* gezeigt. Die sensorischen Neurone der Exterozeptoren und der Chordotonalorgane projizieren in vergleichbare Neuropilareale wie taktile und Geschmackssensillen und Chordotonalorgane in adulten Fliegen und in anderen Insekten. Die Neurone der Exterozeptoren (mechanorezeptive, taktile Haare) senden ihre Axone in die ventrale Schicht des Neuropils. Die Neurone der Chordotonalorgane projizieren in eine dorsale Region (Schrader und Merritt, 2000). Es gibt eine Verbindung zwischen der Modalität der Sinnesorgane und ihre Projektionsareale, basierend auf Einzelzellfärbungen in einer Reihe adulter und embryonaler Insekten. Die Axone der taktilen Sensillen projizieren in die ventrale Schicht des Neuropils, in einer somatotopischen Organisation (*Drosophila*: Murphey et al., 1985; *Acheta domesticus*: Johnson und Murphey, 1985; *Locusta*: Pflüger et al., 1988; Newland, 1991). Das gleiche Projektionsmuster der taktilen Sensillen ist in Larven von *Manduca sexta* vorhanden (Levine et al., 1985). Die Axone der Geschmackssensillen projizieren auch in die ventrale Schicht des Neuropils (*Drosophila*: Possidente und Murphey, 1989). Die Axone der propriozeptiven Sinnesorgane, der Chordotonalorgane, der Haarsensillen und der campaniformen Sensillen projizieren in eine dorsale Region des Neuropils (*Locusta*: Pflüger et al., 1988; *Phormia* und *Drosophila*: Murphey et al., 1989b; *Phormia*: Merritt

und Murphey, 1992; *Drosophila*: Reddy et al., 1997; Murphey et al., 1999). Bis jetzt wurde nur die Entwicklung des Antennallobus in verschiedenen Insekten im Detail untersucht (Schabe: zum Beispiel Salecker und Boeckh, 1995; *Manduca*: zum Beispiel Oland und Tolbert, 1996; *Drosophila*: zum Beispiel Python und Stocker, 2002). Im Antennallobus von *Periplaneta americana*, die wie *Gryllus bimaculatus* auch ein hemimetaboles Insekt ist, beginnt die Bildung der Glomeruli ab etwa 65% der Embryogenese. Im Deutocerebrum der Grillenembryonen entstehen glomeruli-ähnliche Strukturen ab etwa 70% der Embryogenese ungefähr gleichzeitig wie im oben genannten Insekt. Die Entwicklungsmechanismen der Bildung der sensorischen Bahnen und der Organisation des Antennallobus scheint bei alle Insekten erhalten zu sein (Oland et al., 1990; Gascuel und Masson, 1991; Malun et al., 1994; Salecker und Boeckh, 1995; Oland und Tolbert, 1996; Tissot et al., 1997; Strausfeld und Hildebrand, 1999; Jhaveri et al., 2000; He und Adler, 2001 und 2002; Jhaveri und Rodrigues, 2002; Anton et al., 2003). Die Entstehung des Antennallobus der Tabakswärmer der Art *Manduca sexta* ist detailliert untersucht worden. Malun et al. (1994) haben gezeigt, dass die Dendriten der Projektionsneurone im Antennallobus der Embryonen bereits früh vor denen der lokalen Interneurone in der Entwicklung vorliegen (40%) und glomeruli-ähnliche Strukturen im lateralen Antennallobus von Embryonen bilden, bei denen das Einwachsen der Afferenzen verhindert wurde. Deswegen wurde angenommen, dass die dendritische Verzweigung eines uniglomerulären Projektionsneurons als Ausgangspunkt für die Konstruktion des glomerulären Bereichs des Antennallobus dient. Sie bildet die erste glomeruli-ähnliche Struktur lateral im Antennallobus. Dort, wo die erste glomeruli-ähnliche Struktur von den Dendriten der Projektionsneurone gebildet wurde, werden die Basisstrukturen der Glomeruli von den Dendriten weiterer Projektionsneurone gebildet. Nachdem die Projektionen der olfaktorischen Rezeptorneurone den Antennallobus gereicht haben, tragen sie zur Etablierung der Glomeruli bei (Oland et al., 1990; Tolbert und Oland, 1990). Aufgrund der frühen Entstehung einer glomerulus-ähnlichen Struktur im lateralen Antennallobus wurde angenommen, dass die

Projektionsneurone eine „aktive“ Rolle bei der Bildung des glomerulären Neuropils des Antennallobus spielen. Schließlich senden die multiglomerulären lokalen Interneurone ihre Fortsätze in die Glomeruli und bilden Synapsen (Oland et al., 1990; Tolbert und Oland, 1990; Oland et al., 1993). Oland et al. (1990) haben berichtet, dass die Verteilung der Verzweigungen der Projektionsneurone im Antennallobus von Embryonen nicht normal ist, wenn das Einwachsen der Afferenzen durch die Entfernung der Antennenanlagen verhindert wurde. Die Projektionen olfaktorischer Rezeptorneurone scheint daher für die richtige Organisation der Glomeruli im Antennallobus erforderlich zu sein.

Wie oben schon erwähnt wurde, verzweigen sich antennale Afferenzen ab bereits 65% der Entwicklung der Grillenembryonen in zwei unterschiedlichen Arealen im antennalen mechanosensorischen Neuropil im Deutocerebrum. Aufgrund der Zweiteilung der Verzweigungen antennaler Afferenzen in diesem embryonalen Neuropil könnten die antennalen Afferenzen zu der Organisation dieses zweigeteilten antennalen mechanosensorischen Neuropils beitragen, ähnlich wie die olfaktorischen Rezeptorneurone von *Manduca sexta*. Außerdem kann eine Differenzierung des antennal-mechanosensorischen Neuropils erst ab etwa 45% der Embryogenese erfolgen, weil ab diesem Stadium die ersten sensorischen Neurone der Antennenbasis ins Deutocerebrum projizieren (die campaniformen Sensillen, siehe Kapitel 3.2.4). Von den campaniformen Sensillen wird vermutet, dass ihre Projektionen im dorsalen Teil des antennal mechanosensorischen Neuropils lokalisiert sind (Staudacher und Schildberger, 1999). Sie könnten daher, ähnlich wie olfaktorischen Afferenzen für den Antennallobus, an der Bildung des dorsalen Deutocerebrums beteiligt sein.

Daher könnte es sein, dass zuerst der Dorsallobus bei 45% der Embryogenese angelegt wird, gefolgt vom Areal „vfa“ bei etwa 65%. Den Abschluss würde dann der Antennallobus machen, dessen Glomeruli ab etwa 70% sichtbar sind.

4.6 Die Projektionsareale einzelner mechanosensorischer Neuronen der Antennenbasis

Um die Projektionsareale einzelner basaler mechanosensorischer Neurone der Grillenembryonen zu zeigen, wurde versucht, einzelne Sinneszellen intrazellulär und iontophoretisch anzufärben. Andere Methoden, wie die spezifische immunhistochemische Markierung der Sinneszellen oder die Anwendung der enhancer trap-Technik (*Drosophila*: Brand und Perrimon, 1993; Yang et al., 1995; Armstrong und Kaiser, 1997) bzw. der spezifischen Expression eingeschleuster Gene für chromophore Proteine, wie GFP (green fluorescent protein), scheiden bei Grillen aus (*Drosophila*: Tyrer et al., 2000; Sivan-Loukianova und Eberl, 2005). Bei der frühen Musterbildung der *Drosophila*-Entwicklung wird ein mehrkerniges syncytiales Blastoderm ausgebildet. Durch das Blastoderm können viele Proteine diffundieren und in die Zellkerne gelangen (Wolpert, 1999). Im Gegensatz zu *Drosophila* kommt die Zellbildung in der frühen Grillenentwicklung während des Blastoderm-Stadiums vor (*Gryllus bimaculatus*: Sarashina et al., 2005). Aus diesem Grund können vermutlich viele Proteine, wie zum Beispiel auch Transkriptionsfaktoren, nicht in das Genom gelangen.

Durch die iontophoretische Injektion wurden Zellen im Pedicellus der Grillenembryonen (zwischen 40% und 55%) angefärbt. Es wurden nur Zellkörper oder Zellen mit einem Axonansatz angefärbt. Der Durchmesser der angefärbten Zellen variierte zwischen 5 μm und 15 μm . Etwa 20% der gefärbten Zellen im Pedicellus der Grillenembryonen wurden mit ihrem Axonansatz gefärbt. Keine dieser Zellen weist ein Axon auf, das bis in das Oberschlundganglion verfolgt werden kann. Bei den angefärbten Neuronen mit einem Axonansatz variiert die Länge des Axonansatzes zwischen 2 μm und 18 μm . Einige der angefärbten Neurone liegen noch in der Epithelschicht der Antenne und sind in der medial-lateralen Achse der Antenne lokalisiert. Die Axone der Neurone, die noch in der Epithelschicht liegen, laufen in das Lumen der Antenne zum Zentrum des entsprechenden Antennensegments. Die restlichen angefärbten Neurone

liegen im Lumen des Pedicellus in der proximal-distalen Achse der Antenne; sie senden ihre Axone in Richtung zur Antennenbasis. Die meisten dieser Neurone sind morphologisch bipolar, wie das für die sensorischen Neurone einiger Sinnesorgane berichtet wurde (Neurone verschiedener Extero- und Propriozeptoren, Bodmer und Jan, 1987). Bei einigen Präparaten wurden drei Zellkörper nebeneinander in verschiedenen Regionen gefärbt. Alle drei Zellen hatten entweder gleiche oder unterschiedliche Durchmesser. In der Epithelschicht wurden drei Zellen gefärbt, die nebeneinander liegen. Vermutlich ist eine dieser Zellen das sich gerade differenzierende Neuron, das Kontakte, gap junctions, über die der Farbstoff hinweg laufen konnte, mit den anderen daneben liegenden Epithelzellen hat. Alle drei Zellen hatten den gleichen Durchmesser (15 μm). Es wurden Neurone mit einem Axonansatz und vermutlich mit einer Hüllzelle angefärbt. Diese Zellen wiesen kein Axon auf. Der Durchmesser der Hüllzellen (10 μm) beträgt entweder genauso viel wie das ihrer Neurone (10 μm) oder die Hälfte des Durchmessers ihres Neurons (5 μm ; nur in einem Präparat).

In der Literatur wurde von „dye coupling“ für sich differenzierende Epithelzellen und Neurone im Nervensystem der Insekten öfter berichtet (Goodman und Spitzer, 1979; Keshishian, 1980; Shankland und Bentley, 1983; Keshishian und Bentley, 1983; Selzer und Schaller-Selzer, 1987; Boyan und Williams, (in press, 2007)). Die Hüllzellen der angefärbten Neurone im Pedicellus der Grillenembryonen wurden vermutlich durch „dye coupling“ angefärbt. Die Neurone, die mit ihrer Hüllzelle im Pedicellus der Grillenembryonen angefärbt sind, können zu einem der mechanosensorischen Organe im Pedicellus gehören. Mechanosensorische Neurone entstehen aus einer Vorläuferzelle, bekannt auch als sensorische Mutterzelle (Jan und Jan, 1993; Ghysen und Dambly-Chaudiere, 2000). Diese sensorische Mutterzelle teilt sich asymmetrisch und dann entsteht eine Familie von Stützzellen und Neuronen. Ihre Anzahl ist je nach Organtyp verschieden. Mechanosensorische Haare bestehen aus einem Klon von fünf Zellen, einem bipolaren Neuron, einer Hüllzelle (thecogen), den Stützzellen (trichogen und tormogen) und einer Gliazelle (Gho et al.,

1999). In Chordotonalorganen gibt es neben einem bipolaren Neuron drei Stützzellen (Graber, 1882).

Die Lage einiger dieser angefärbten Neurone im Pedicellus der Grillenembryonen ist ähnlich der Lage der mechanosensorischen Neurone, die zum Beispiel zu den campaniformen Sensillen oder zu den Haarsensillen des Pedicellus gehören (Für diese Sensillen siehe Kapitel 3.2). Im Pedicellus eines 50%igen Grillenembryonen wurde iontophoretisch eine Zelle gefärbt, die sowohl eine ähnliche Lage als auch einen ähnlichen Durchmesser des Zellkörpers (etwa 10 μm) so wie die campaniformen Sensillen (etwa 12 μm) hat. Diese Zelle wies aber kein Axon auf. Daher ist eine weitere Charakterisierung dieser Zelle nicht möglich.

Bei der iontophoretischen Injektion der Zellen im Pedicellus der Grillenembryonen wurden die Einstichstellen der Elektroden so ausgewählt, dass die Penetration entweder eines der campaniformen Sensillen oder eines Neurons der Chordotonalorgane wahrscheinlich war. Da die sensorischen Neurone '*in vivo*' im verwendeten Versuchsaufbau nicht zu visualisieren waren, wurden die Zellen zufällig penetriert. In den HRP-immunhistochemischen Färbungen der embryonalen Grillenantennen ist zu erkennen, dass die campaniformen Sensillen mit den großen Durchmessern ihrer Zellkörper (etwa 10 μm in 50% der Entwicklung) fast lumenfüllend im distalen Bereich des Pedicellus vorliegen (CS; 47%: siehe Abb. 3.2.6b). Daraus lässt sich ableiten, dass die Chancen eigentlich ganz gut sein sollten, eine der campaniformen Sensillen zufällig zu treffen. Da die Zellen jedoch nicht elektrisch aktiv sind, kann es vorkommen, dass eine Zelle mit der Elektrode getroffen wurde, aber dies unbemerkt bleibt.

Um zu testen, ob die Elektrode intrazellulär platziert ist, wurden über die Elektrode Rechteckpulse von 100 ms Dauer in unregelmäßigen Abständen vor und während der Injektion der Zellen gegeben. Die Form der Pulse wurde vor und während der Injektion der Zelle miteinander verglichen, um zu wissen, ob die Elektrode intrazellulär war. Dabei stellte sich heraus, dass man mit dieser Methode nicht feststellen kann, ob die Elektrode intrazellulär ist.

Um zu testen, ob die Stärke des injizierten Stromes für die Qualität der

Färbung, das heißt die markierten Axonlängen, eine Rolle spielt, wurden Zellen mit unterschiedlichen Stromstärken (0,6-4,5 nA) injiziert. Die Wirkung der Injektions- und Diffusionsdauer auf die Färbung der Zellen wurde untersucht, indem man diese Zeit verlängert oder verkürzt. Bei diesen Experimenten wurde kein Unterschied in der Qualität der Färbungen festgestellt. Boyan und Williams (in press, 2007) haben berichtet, dass die iontophoretische Injektion eines Farbstoffes (Lucifer Yellow) in einer penetrierten Zelle „nerve tract associated cell (NTA)“ zu einer sofortigen Färbung der Zelle geführt hat. Die Injektion wurde zwei Minuten lang mit einer Stromstärke von 2 nA durchgeführt.

Für die unvollständig gefärbten Axone der durch die iontophoretische Injektion angefärbten Zellen im Pedicellus der Grillenembryonen kommen mehrere Erklärungen in Frage: Zum einen ist denkbar, dass die Axone tatsächlich noch nicht zu ihrer vollen Länge ausgewachsen waren und die Färbungen daher die reale Länge wiedergeben. Andererseits wäre denkbar, dass die Neurone während des Färbeprozesses abstarben und damit der Farbstoff nicht weiter in das Axon transportiert wurde. Schließlich ist auch noch denkbar, dass aufgrund der geringen Axondurchmesser ($< 1 \mu\text{m}$) das Fluoreszenzsignal so schwach war, dass es im Mikroskop nicht mehr detektiert werden konnte. Weiterhin wäre möglich, dass die Zellen nicht zu einem zukünftigen antennalen Mechanorezeptororgan gehören, sondern dass diese Zellen eine andere Identität hatten. In Frage kommen etwa die in der embryonalen Antenne von *Schistocerca gregaria* nachgewiesenen, Mes3 (mesektodermaler/mesodermaler Zelloberflächenmarker) exprimierende Zellen, die eine mesektodermale/mesodermale Herkunft haben. Diese Zellen haben eine kugelige Struktur und haben axon-ähnliche Fortsätze (Boyan und Williams, in press, 2007). Diese Zellen gehören zu den NTA-Zellen, die vermutlich als Wegweiserzellen für Pionierneurone und sensorische Axone fungieren. Sie entstehen vermutlich aus dem Antennalcoelom und liegen entlang des Traktes der Antennennerven an der Epithel/Lumen Grenze.

Boyan und Williams (in press, 2007) haben durch die iontophoretische

Injektion die NTA-Zellen gezeigt, um diese Zellen weiter charakterisieren zu können. Diese Zellen haben entweder einen ovalen oder flachen Zellkörper, eine bipolare Organisation und kurze Projektionen (20-40 μm). Einer der Fortsätze hat Wachstumskegel und Filopodien-ähnliche Strukturen und er ist entweder zur Antennenbasis oder zur Antennenspitze gerichtet, und beide Orientierung kommt unter NTA-Zellen vor (33-60%). Im Pedicellus der Grillenembryonen wurden auch ovale Zellen mit oder ohne Fortsatz angefärbt. Die Länge der Fortsätze solcher Zellen waren aber kürzer wie die Fortsätze der NTA-Zellen in der Antenne von *Schistocerca gregaria*. Im Pedicellus wurden keine Zellen angefärbt, die eine Länge wie diese NTA-Zellen (20-40 μm) aufwiesen. Eine hier gefärbte Zelle im Epithel des Pedicellus zeigte die maximale Länge von 18 μm (Abb. 3.3.7c).

In den intrazellulären Versuchen an Grillenembryonen deutet sich an, dass die embryonalen Neurone vermutlich noch nicht elektrisch aktiv waren. Während der Injektion verhielten sich die angefärbten Zellen ruhig und es waren keine Aktionspotentiale zu erkennen. Die Zellen wurden auch mit positivem Strom injiziert, ohne dass Aktionspotentiale ausgelöst werden konnten. Die angefärbten embryonalen Zellen zeigten am häufigsten ein Membranpotenzial von ca. -30 mV (N = 11). Boyan und Williams (in press, 2007) haben gezeigt, dass weder die Pionierneurone (bis 45%) noch die NTA-Zellen in den Antennen von *Schistocerca gregaria* (zwischen 37% und 45%) bei den getesteten Entwicklungsstadien Aktionspotenziale erzeugen, wie dies für die „luminal“ Zelle (Pionierneurone) der Antenne der Schaben beschrieben wurde (Selzer und Schaller-Selzer, 1987), obwohl sie ein ähnliches Ruhepotenzial (50 mV) haben. Diese „luminal“ Zellen erzeugen Aktionspotenziale in 23% der Embryogenese, innerhalb etwa 3% ihrer Delamination aus dem Epithel. Die Pionierneurone im Bein der Heuschrecken sind in 45% der Embryogenese elektrisch erregbar (Keshishian, 1980). Die „dorsal unpaired median (DUM)“ Neurone im Zentralnervensystem der Heuschrecken sind in 50% der Embryogene elektrisch aktiv (Goodman und Spitzer, 1979). Die elektrische Aktivität der „luminal“ Zellen spielt wahrscheinlich bei der Bahnfindung des

Wachstumskegels eine Rolle (Selzer und Schaller-Selzer, 1987). Vermutlich erwerben verschiedene Zellen je nach Funktion eine elektrische Aktivität in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Wenn die gefärbten Zellen im Pedicellus der Grillenembryonen zwischen 40% und 55% der Embryogenese sensorische Zellen sind, sind diese vermutlich noch nicht funktional und zeigen deswegen noch keine elektrische Aktivität.

Es ist bekannt, dass gezielt Zellen durch Transfektion mit dem GFP-Gen sichtbar gemacht werden und damit ihre Morphologie und Projektion aufgeklärt werden kann. Das Gen kann beispielsweise durch Elektroporation in die Neurone eingebracht werden (Haas et al., 2001). So wurde im Gehirn von intakten *Xenopus* Kaulquappen GFP in einzelnen Neuronen und in Gliazellen exprimiert. Das GFP füllt alle Fortsätze und auch feine Axone. Bei so einer Technik kann die Fluoreszenz innerhalb 12 Stunden detektiert werden (Haas et al., 2001). Diese Methode bietet sich an, sensorische Neurone im Pedicellus der Grillenembryonen mit ihrer Projektionen zu visualisieren. Vorversuche um Lucifer Yellow oder ein fluoreszenz-markiertes 10 kDa-Dextran per Elektroporation in antennale Zellen zu injizieren, blieben erfolglos. Auch ein GFP-Konstrukt (pEGFP Vector; Lot# 4050520; BD Biosciences) konnte in Pionierexperimenten nicht erfolgreich exprimiert werden (eigene Daten, mündliche Mitteilung Gebhardt). Gründe für das Scheitern dieser Experimente könnten sein, dass das Konstrukt nicht in das Genom inseriert wurde oder die Transkription nicht stattgefunden hatte.

Antikörper, die verschiedene Teile von Chordotonal- und kutikulären Sensillen färben, wurden aus der *Drosophila* isoliert (Bodmer et al., 1987). Mit diesen Antikörpern werden zum Beispiel Zytoplasma und Zelloberfläche der sensorischen Neurone, die Tubularkörper der kutikulären Sensillen und die Stiftregion der Chordotonalsensillen gefärbt (Bodmer et al., 1987). Diese Markierungen erlauben eine klare Trennung zwischen den zwei Typen der Sensillen, Haarsensillen und Chordotonalsensillen. Ein Antikörper (58C12) färbt die Kappenregion und die Hüllzelle des Chordotonalorgans in Embryonen der *Drosophila*. Es muss untersucht werden, ob das auch bei Grillen der Fall ist und ob die

embryonalen Sensillen so markieren werden könnten.

Die Lage, in der ein mechanosensorisches Organ entstehen wird, wird durch die Expression der proneural Gene bestimmt. Es gibt zwei Kategorien der proneural gene, die im peripheren Nervensystem aktiv sind: *achaete-scute complex* (ASC) und *atonal* (Ghysen und Dambly-Chaudiere, 1988; Jarman et al., 1993). ASC exprimierende Ektodermzellen (Vorläuferzelle für das Sinnesorgan) produzieren alle Exterozeptoren, und *atonal* exprimierende Vorläuferzelle produzieren alle Chordotonalorgane in *Drosophila* (Dambly-Chaudiere und Ghysen, 1987; Jarman et al., 1993).

Ein Vorschlag für weitere Arbeiten zur Entwicklung der antennalen Mechanosensorik bei Grillen wäre, mit Hilfe der Immunhistochemie mechanosensorisch-spezifische Genprodukte zu lokalisieren. Man könnte dann einen Atlas mit Vorläuferzellen der Sinnesorgane im Pedicellus der Grillenembryonen in verschiedenen Stadien erstellen, um später gezielte Färbungen durchführen zu können, zum Beispiel mit Hilfe der GFP-Transfektion.

Acetylcholin ist einer von vielen Neurotransmitter im Nervensystem der Insekten. Die mechanosensorischen Organe in den ersten beiden Antennenbasissegmenten von *Manduca sexta*, sensorische Haare (Böhm bristles) und das Johnstonsche Organ werden von Neuronen innerviert, die AChE (Acetylcholinesterase) positiv sind. Im Flagellum zeigen etwa vier Typen der Rezeptorneurone AChE-Aktivität (Stengl et al., 1990). Cholinerge Transmission wurde besonders für die mechanosensorischen Haare in den larvalen Vorderbeinen von *Manduca sexta* und für mechano- und chemosensorische Neurone der Antennen vorgeschlagen (Sanes und Hildebrand, 1976; Sanes et al., 1977; Prescott et al., 1977; Weeks und Jacobs, 1987; Trimmer und Weeks, 1989; Stengl et al., 1990).

Histamin, ein biogenes Amin, wurde in mechanosensorischen Neuronen der Haarsensillen auf der ganzen Oberfläche der adulten *Drosophila* gefunden (Buchner et al., 1993). Die Färbung wurde sowohl im Zellkörper der Neurone als auch in ihren Axonen gesehen. Andere mechanosensorische Neurone, zum Beispiel campaniformen Sensillen oder Chordotonalorgane wurden nicht gefärbt. Vermutlich funktionieren

Histamine in mechanosensorischen Neuronen der Haarsensillen als Neurotransmitter (Burg et al., 1993; Melzig et al., 1996). Ein 'screening' der antennalen mechanorezeptiven Neurone auf verschiedene Transmitter könnte daher eine weitere Strategie darstellen, die zentralen Projektionen dieser sensorischen Neurone darzustellen, ohne auf komplette intrazelluläre Färbungen angewiesen zu sein.

4.7 Die Verteilung der Zellkörper der absteigenden Interneurone der Grillenembryonen (60% - 95%)

In allen Stadien zwischen 95% und 60% der Embryogenese wurden im Oberschlundganglion der Embryonen ipsilateral und kontralateral absteigende Interneurone markiert. In den Embryonen, die jünger als 60% sind, konnte die Färbung aus methodischen Gründen nicht durchgeführt werden. Wegen der geringen Größe dieser Embryonen war es nicht möglich, die Färbemethode, eine retrograde Füllung an einem ganzen Halskonnektiv anzuwenden. Mit der in dieser Arbeit verwendeten zweiten Methode, iontophoretische Injektion von Lucifer Yellow oder Neurobiotin in ein Halskonnektiv, konnten nur die Interneurone gefärbt werden, deren Axone mit der Elektrode getroffen beziehungsweise verletzt wurden.

Die Zellkörper der absteigenden Interneurone zwischen 60% und 95% der Embryogenese kommen wie in adulten *Gryllus bimaculatus* in Gruppen im Kortex des Oberschlundganglions vor (Staudacher, 1998). Im Kortex des Oberschlundganglions der Embryonen zwischen 95% und 75% der Embryogenese wurden 14 Gruppen der Zellkörper der Interneurone gefärbt, die ipsilateral (iG1-iG8) bzw. kontralateral (cG1-cG5 und mG1) zu den Thorakalganglien absteigen. Im Oberschlundganglion der Embryonen, die im 85%-igen (N = 2) und 90%-igen (N = 1) Stadium waren, wurden nur 13 Gruppen der Interneurone markiert. In den 85%-igen Embryonen fehlt die Gruppe iG6 im Oberschlundganglion und in den 90%-igen Embryonen fehlt die Gruppe cG4. In den anderen Stadien (75%, 80% und 95%) sind alle 14 Gruppen der Interneurone zu erkennen, das heißt auch, dass eine Kontinuität der fehlenden Gruppen vorhanden ist. Vermutlich wurden die

Axone dieser fehlenden Gruppen während des Durchtrennens der Halskonnektive gequetscht und als Folge davon konnte der Farbstoff vom Axon nicht aufgenommen werden. Im Stadium 60% wurden nur 11 Gruppen markiert. Es fehlen die Gruppen iG7, cG3 und cG4 im Oberschlundganglion. Entweder sind diese fehlenden Gruppen in diesem Stadium noch nicht entstanden und sie entstehen erst zwischen 60% und 75% der Embryogenese oder sie konnten wegen der oben genannten Ursachen nicht angefärbt werden.

Gruppen wurden aufgrund der Topologie der Zellkörper der Interneurone definiert. Manche Gruppen konnten leichter definiert werden als andere Gruppen, wenn die Zellkörper nahe beieinander lagen und zusätzlich von anderen Gruppen gut isoliert waren, zum Beispiel die Gruppen iG5 und iG6. Viele Gruppen der Zellkörper, wie die meisten anterioren Gruppen, die ventral und medial liegen, zum Beispiel iG1 und iG7, und cG1 und cG3, sind nicht so leicht voneinander zu unterscheiden. Bei Gruppen der Zellkörper, deren primäre Neuriten zusammen in Bündeln laufen, fällt die Gruppendifinition leichter als bei anderen ohne derartige Neuritenbündelung.

Die Gruppen der Zellkörper befinden sich in verschiedenen Bereichen des Oberschlundganglions. Die ipsilateralen Gruppen werden nur im Protocerebrum und Deutocerebrum gefunden, wohingegen eine Gruppe auf der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions nur im Tritocerebrum gefunden wurde. Zwischen 95% und 75% der Embryogenese kommen die Gruppen der Interneurone iG1, iG2, iG3, iG7, iG8, cG1, cG3, cG5 und mG1 im Protocerebrum und die Gruppen iG4, iG5, iG6 und cG2 im Deutocerebrum und die Gruppe cG4 im Tritocerebrum vor. Im Stadium 60% liegen die Gruppen iG1, iG2, iG3, iG8, cG1, cG5, und mG1 im Protocerebrum und die Gruppen iG4, iG5, iG6 und cG2 im Deutocerebrum vor, wie in den anderen Stadien (75%-95%). Die Positionen der Zellgruppen der Interneurone im Oberschlundganglion verteilen sich entlang der ventral-dorsalen, der medial-lateralen und der anterior-posterioren Achse (siehe Kapitel 3.4.4.1 und Tabelle 3.4.1).

Im Oberschlundganglion der adulten *Gryllus bimaculatus* wurden 17

Gruppen der Zellkörper der absteigenden Interneurone identifiziert (Staudacher, 1998). 10 Gruppen (i1-i5, i5n, i6, i7a, i7b, i8) wurden in der ipsilateralen, sechs Gruppen (c1-c6) in der kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions und eine Gruppe (pi) in der ventralen Pars intercerebralis identifiziert. Die ipsilateralen Gruppen kommen nur im Protocerebrum und Deutocerebrum vor, wohingegen eine Gruppe (c6) im Tritocerebrum in der kontralateralen Hälfte auftritt. Dieses Bild deckt sich mit den hier geschilderten Befunden der Zellkörperverteilung in den embryonalen Gehirnen. Im ventralen Oberschlundganglion kommen die Gruppen i4, i5, i5n, i6, i7b, i8, c4, c5 und pi, im dorsalen i1, i2, c1, c2, c6 und im medialen i3, i7a, c3 vor. Im anterioren Protocerebrum sind die Gruppen i1 - i4 und c1 - c4 lokalisiert. Von den anterior liegen Gruppen liegen die ipsilateralen Gruppen i1 und i2 und die kontralateralen Gruppen c1 und c2 dorsal vom Calyx des Pilzkörpers. Die Zellkörper der Gruppen i3 und c3 liegen medial und die Zellkörper der Gruppen i4 und c4 ventral im Pars intercerebralis. Die restlichen mehr posterior liegenden Gruppen wurden nicht in ein klares Muster angeordnet. Die Gruppe i5 und i5n liegen medial und die Gruppen i6, i7a, i7b, i8, c5 und c6 liegen posterior im Oberschlundganglion.

Auf die von Staudacher (1998) und Gebhardt und Honegger (2001) verwendete Bezeichnung „DBN“ (descending brain neuron) neben der individuellen Kennzeichnung für einzelne Interneurone (zum Beispiel i1-1) wird hier verzichtet.

Wenn man die Lokalisation der Zellgruppen der adulten Interneurone mit den Zellgruppen der Interneurone der Grillenembryonen vergleicht, bekommt man das folgende Bild: Die embryonale Gruppe iG1 ist mit der adulten Gruppe i4, iG2 mit i5n, iG3 mit i5, iG4 mit i7, iG5 mit i6, iG6 mit i8, iG7 mit i3, cG1 mit c4, cG2 mit c5, cG3 mit c3, cG4 mit c6, mG1 mit pi identisch. In der ipsilateralen und in der kontralateralen Hälfte des dorsalen Protocerebrum der Grillenembryonen wurden Zellkörper der Interneurone markiert, die jeweils zu einer einzigen Gruppe (nämlich iG8 und cG5) gezählt werden, weil keine weitere Unterteilung dieser Zellkörper möglich war. Deswegen könnte die embryonale Gruppe iG8 mit den

Gruppen i1 und i2, und die embryonale Gruppe cG5 mit c1 und c2 identisch sein. Staudacher (1998) hat auch berichtet, dass es Zellgruppen (i1-i4) gibt, deren Unterscheidung voneinander schwer möglich ist.

Die Gesamtzahl absteigender Interneurone im Oberschlundganglion der Grillenembryonen zwischen 95% und 60% der Embryogenese wurde bei Ganzpräparaten bestimmt. Sowohl wegen der großen Anzahl der markierten Interneurone, zum Beispiel von 86 (95%; N = 4), als auch wegen der Gruppierung konnten die nahe zusammen liegenden Zellkörper der Interneurone in einer Gruppe nicht immer eindeutig gezählt werden. Die Anzahl der Interneurone beträgt 86 bei 95%-igen Embryonen (N = 4), etwa 70 bei 90%-igen Embryonen (N = 1), etwa 106 bei 85%-igen Embryonen (N = 2), 78 bei 80%-igen Embryonen (N = 3), 99 bei 75%-igen Embryonen (N = 2) und 56 bei einem 60%-igen Embryo. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass nicht alle Interneurone bei manchen Embryonen markiert werden konnten. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass es Interneurone gibt, die wegen des Quetschens ihrer Axone während des Durchschneidens der Konnektive nicht markiert werden konnten. Eine andere Vermutung wäre, dass noch nicht alle Projektionen der Axone der Interneurone im Oberschlundganglion der jüngeren Embryonen zum Beispiel bei 60% der Embryogenese die Halskonnektive erreicht haben. Deswegen konnten sie nicht markiert werden, obwohl sie eventuell mit ihren Zellkörpern im Oberschlundganglion vorhanden sind.

Staudacher (1998) hat berichtet, dass die gesamte Anzahl der absteigenden Interneurone im Oberschlundganglion der adulten Grillen zwischen 135 und 181 (Median = 146; N = 6) variiert. Die Anzahl der ipsilateral (Median = 92, N = 6) und kontralateral (Median = 55, N = 6) absteigenden Interneurone ist unterschiedlich. Im ventralen Oberschlundganglion kommen mehr Gruppen (i4, i5, i5n, i6, i7b, i8, c4, c5 und pi) als im dorsalen (i1, i2, c1, c2, c6) und medialen (i3, i7a, c3) Oberschlundganglion vor. Die Anzahl der Interneurone mit ihren Zellkörpern in den dorsalen Gruppen (Median = 64, N = 6) ist leicht höher als die Anzahl der ventral liegenden Interneurone (Median = 46, N = 6). In der medialen Gruppe ist die Anzahl der Interneurone am geringsten

(Median = 23, N = 6). Mehr Gruppen in der ipsi- (vier von 10 Gruppen) und kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions (vier von sechs Gruppen) gibt es im anterioren Protocerebrum.

Im Oberschlundganglion der Grillenembryonen (95%) wurden maximal 125 Zellkörper der Interneurone gezählt. Ebenso wie bei den adulten Grillen ist die Anzahl der ipsilateral absteigenden Interneurone der Grillenembryonen auch leicht höher als die Anzahl der kontralateral absteigenden Interneurone. Im Gegensatz zu adulten Grillen ist die Anzahl der Interneurone mit ihren Zellkörpern in ventral liegenden Gruppen einfach höher als die Anzahl der dorsal liegenden Interneurone. Die Anzahl der ventralen Zellkörper ist leicht zu bestimmen, wohingegen die Anzahl der dorsal liegenden Interneurone nicht so leicht zu ermitteln ist, weil sich manche Zellkörper der Interneurone überdecken. Deswegen erschwert die Massenfärbung die Zählung dieser Zellkörper. Im ventralen Kortex des Oberschlundganglions liegen neun Gruppen (iG1-iG6, cG1, cG2 und mG1) und im dorsalen Kortex des Oberschlundganglions drei Gruppen (iG8, cG4 und cG5) vor. Im ventralen Oberschlundganglion der adulten Grillen liegen auch mehr Gruppen vor. Im medialen Kortex befinden sich zwei Gruppen (iG7, cG3). Die meisten Gruppen kommen, wie in adulten Grillen, im anterioren Protocerebrum vor.

4.8 Die Verzweigung der absteigenden Interneurone der Grillenembryonen (60% - 95%)

Es konnten die Interneurone in der Gruppe iG3 mit ihren Verzweigungen (maximal neun Interneurone), ein Interneuron der Gruppe c4 (cG4-1) mit primärem Neurit und drei Interneurone verschiedener Gruppen (iG5-1, cG5-1 und cG5-2) mit ihren primären Neuriten und mit ihren dendritischen Verzweigungen charakterisiert werden. Weitere gefärbte Interneurone konnten mit ihren primären Neuriten im Oberschlundganglion charakterisiert werden: In der ipsilateralen und kontralateralen Hälfte des Oberschlundganglions wurden dorsal und auch ventral liegende Zellkörper mit ihren primären Neuriten markiert, die entweder in Bündeln oder

einzelnen laufen. Wo sie sich verzweigen und wie sie vom Oberschlundganglion absteigen, konnte nicht weiter verfolgt werden. Ein Grund dafür ist wieder die intensive Färbung der betreffenden Gehirnareale, so dass einige Interneurone andere Interneurone überdecken. Die absteigenden Interneurone verzweigen sich nicht in den glomerulären Neuropilen des Oberschlundganglions (wie zum Beispiel; Pilzkörper, Zentralkörper und Antennallobus), wie auch Staudacher (1998) berichtet hat. Ihre primären Neuriten machen Schlingen und laufen in Kurven bis zum Verzweigungsort im Oberschlundganglion. Ein weiterer Grund könnte sein, dass das Fluoreszenzsignal aufgrund der geringen Durchmesser der Axone der Interneurone nicht detektiert werden kann.

Im Oberschlundganglion der Embryonen (95%; N = 3 und 80%; N = 1) wurden die Zellkörper der prominenten Gruppe iG3 der absteigenden Interneurone mit ihren Verzweigungen charakterisiert. Diese ventral liegende Gruppe iG3 ist mit der Gruppe i5 der adulten Grillen identisch (siehe Kapitel 4.7). Diese Gruppe enthält maximal neun Interneurone bei 95%-igen Embryonen (Minimum = 5; N = 4). In adulten Grillen variiert die Anzahl der Zellkörper der Interneurone in dieser Gruppe zwischen vier und 19 und sie alle haben die gleiche Morphologie (Staudacher, 1998). Diese embryonale Gruppe der Interneurone zeigt bereits die gleiche Morphologie und das gleiche Verzweigungsmuster im Oberschlundganglion wie die entsprechende Gruppe der adulten Grillen. Die primären Neurite dieser Interneurone laufen in einem Bündel in eine dorso-mediale Richtung im Protocerebrum und machen eine Kurve ungefähr in der Höhe des Zentralkörpers. Diese Interneurone verzweigen sich dorsal an der Grenze zwischen dem posterioren Protocerebrum und dem anterioren Deutocerebrum. Ihre Axone steigen dorsal über Deutocerebrum und Tritocerebrum ab, was man auch in adulten Tieren beobachtet. Diese Gruppe der Interneurone ist bereits bei 60% der Embryogenese (N = 1) mit vier Zellkörpern vertreten. Staudacher und Schildberger (1998) zeigten, dass diese Interneurone die Drehungsgeschwindigkeit des Laufens adulter Grillen beeinflusst.

Ein Interneuron (cG4-1) der Gruppe cG4 wurde mit seinem primären Neurit

charakterisiert (95%; N = 1). Diese Gruppe cG4 ist mit der Gruppe c6 der adulten Grille identisch (siehe Kapitel 4.7). Diese Gruppe enthält fünf Interneurone bei Embryonen (95%; N = 1). In adulten Grillen variiert die Anzahl der Zellkörper der Interneurone in dieser Gruppe zwischen null und drei (N = 6). Der Zellkörper von cG4-1 liegt dorsal im Tritocerebrum und der primäre Neurit dieses Interneurons läuft zur tritocerebralen Kommissur, genauso wie der Neurit des Interneurons c6-1 der adulten Grillen (Staudacher, 1998). Er verläuft durch diese Kommissur und verlässt das Oberschlundganglion kontralateral. Die dendritischen Verzweigungen dieses Interneurons c6-1 liegen im medialen Deutocerebrum und sie erstrecken sich auch in den dorsalen Teil des ventral posterioren Deutocerebrums. Staudacher (1998) hat berichtet, dass das Interneuron c6-1 vermutlich homolog zum TCD (tritocerebral commissure dwarf) Neuron der Heuschrecken ist (Tyrrer et al., 1988). Die dendritische Verzweigung des embryonalen Interneurons cG4-1 konnte dort nicht erkannt werden. Sein primärer Neurit läuft erst posterior-medial und dann anterior-medial, bevor er in die tritocerebrale Kommissur eintritt, genauso wie das Neuron c6-1 in adulten Grillen. Das Interneuron cG4-1 ist vermutlich mit dem Interneuron c6-1 identisch. Diese Gruppe der Interneurone ist bereits in 75% der Embryogenese mit maximal drei Zellkörpern (Minimum = 1; N = 2) vertreten.

Ein Interneuron der Gruppe iG5 mit seiner dendritischen Verzweigung wurde charakterisiert (95%; N = 3 und 80%; N = 2). Diese Gruppe iG5 ist mit der Gruppe i6 der adulten Grillen identisch (siehe Kapitel 4.7). Der Zellkörper des Interneurons iG5-1 ist im Deutocerebrum ventral, lateral und anterior vom Antennennerv positioniert. Sein primärer Neurit läuft nach medial im Deutocerebrum und verzweigt sich ventral im medialen Bereich des Deutocerebrum. Seine Projektion ist nicht weiter zu verfolgen. Ein mit diesem Neuron identisches Interneuron wurde in adulten Grillen bis jetzt nicht beschrieben.

Zwei Interneurone (cG5-1 und cG5-2) der Gruppe cG5 wurden mit ihren primären Neuriten charakterisiert. Diese Gruppe cG5 ist mit den Gruppen c1 und c2 der adulten Grillen identisch (siehe Kapitel 4.7). Die Zellkörper

dieser Interneurone liegen dorsal im anterioren Protocerebrum. Ihre primären Neuriten laufen nach posterior zum Deutocerebrum. Der primäre Neurit des Interneurons cG5-1 läuft ziemlich gerade bis zum posterioren Protocerebrum. Der Zellkörper des Interneurons cG5-2 liegt dorsal und posterior von dem Zellkörper des Interneurons cG5-1. Der primäre Neurit dieses Interneurons cG5-2 macht eine Schlinge erst nach dorsal und dann nach ventral, nachdem er den Zellkörper verlassen hat. Er verläuft dann in der Höhe des Zentralkörpers in eine dorso-laterale Richtung. Im posterioren Protocerebrum laufen die primären Neuriten der beiden Interneurone so nahe nebeneinander, dass man sie nicht voneinander unterscheiden kann. Sie ziehen zum medio-anterioren Deutocerebrum und dort verzweigen sie sich. Ihre Verzweigungen liegen im dorsalen Deutocerebrum. Die Axone dieser beiden Interneurone laufen zusammen und verlassen das Oberschlundganglion kontralateral. Sie steigen vom Oberschlundganglion dorsal ab. Diese Gruppe der Interneurone ist bereits in 60% der Embryogenese mit maximal 13 Zellkörpern (N = 1) vertreten. Im Oberschlundganglion der adulten Grillen sind vier Interneurone c1-1 und c1-2 in der Zellgruppe c1, und c2-2 und c2-3 in der Zellgruppe c2 identifiziert, die ein ähnliches dendritisches Verzweigungsmuster wie die embryonalen Interneurone cG5-1 und cG5-2 aufweisen (Staudacher, 1998; Gebhardt und Honegger, 2001). Die primären Neuriten der Neurone c1-2 und c2-2 geben einige Äste im Protocerebrum ab, anders als die Neurone c1-1 und c2-3, und laufen posterior zum Deutocerebrum. Das Neuron c2-3 verzweigt sich im ventralen, lateralen Deutocerebrum. Ein Ast von c1-2 zieht in den dorsalen Teil des ventralen, posterioren Deutocerebrum, wo er sich großflächig verzweigt. Das kleine Neuron c1-1 verzweigt sich an der gleichen Stelle im Deutocerebrum wie das Neuron c1-2. Die dendritischen Verzweigungen des Neurons c2-2 sind im medialen Teil des ventralen, posterioren Deutocerebrum lokalisiert. Im Gegensatz zum Neuron c1-1 zweigen die Axone der Neurone c1-2 und c2-2 einige Äste im kontralateralen Protocerebrum und Deutocerebrum ab; den ersten im medialen, den zweiten im dorsalen Protocerebrum und Deutocerebrum. Im Protocerebrum der Grillenembryonen wurden keine Äste der primären

Neuriten der Neurone cG5-1 und cG5-2 gefunden. Ob ihre Axone im kontralateralen Protocerebrum und Deutocerebrum Äste abgeben, konnte in den Massenfärbung nicht beobachtet werden.

In der ipsilateralen Hälfte des Oberschlundganglions im anterioren Protocerebrum eines Grillenembryonen (80%) wurden zwei Ansammlungen dorsal liegender Zellkörper der Interneurone markiert. Ihre primären Neuriten laufen in zwei Bündeln in einer ventro-medialen Richtung. Sie machen eine Kurve auf dem Niveau des Zentralkörpers und laufen dann nach lateral im posterioren Protocerebrum. Ab dieser Stelle ist es nicht mehr möglich, sie weiter zu verfolgen. Wegen der Lokalisation ihrer Zellkörper gehören diese Interneurone zu der embryonalen Gruppe iG8. Im anterioren Protocerebrum eines 95%-igen Embryonen wurden einzelne dorsal liegende Zellkörper der Interneurone mit ihren primären Neuriten charakterisiert. Diese Interneurone gehören auch zu der Gruppe iG8, die mit den adulten Interneurongruppen i1 und i2 identisch ist (siehe Kapitel 4.7). Ähnlich wie im oben beschriebenen Embryo konnten die primären Neuriten dieser Neurone nur bis zum Zentralkörper verfolgt werden. Eine weitere Verfolgung der primären Neuriten dieser Neurone war nicht möglich und daher waren ihre dendritischen Verzweigungsmuster nicht zu erkennen.

Im Oberschlundganglion der adulten Grillen wurden einige absteigende Interneurone morphologisch charakterisiert und physiologisch beschrieben, die ihre Eingänge von verschiedenen Afferenzen der Antennen bekommen und die in die antennalen mechanosensorischen Neuropile im Deutocerebrum projizieren (Staudacher, 1998; Gebhardt und Honegger, 2001). Gebhardt und Honegger (2001) haben berichtet, dass die Interneurone i1-2 und i2-1, die zu den adulten Gruppen i1 und i2 gehören, und die Interneurone c1-2/c2-2 und c2-3, die zu der Gruppen c1 und c2 gehören, ihre mechanosensorischen Eingänge aus Afferenzen der Antennenbasis erhalten. Diese absteigenden Interneurone c1-2 und c2-2 erhalten Eingänge vom scapalen Chortotonalorgan und kodieren die Bewegungsrichtung der Antenne der adulten Grillen. Das Neuron c2-3 erhält seinen Eingang vom Pedicellus und kodiert für die Position der

Antennen. Die Interneurone i1-2 und c2-3 verzweigen sich im ventralen, posterioren Deutocerebrum, wo sich vermutlich die Afferenzen aus dem Flagellum der Grillen verzweigen (vfa: Staudacher und Schildberger, 1999). Die Interneurone i1-2 und c2-3 erhalten ihre Eingänge von Afferenzen im Pedicellus. Es ist aber unbekannt, woher das Interneuron i2-1 seinen mechanosensorischen Eingang bekommt (Gebhardt und Honegger, 2001). Beide Interneurone i1-2 und c2-3 kodieren Bewegungen in definierten Bereichen des gesamten Bewegungsraums des Scapuspedicellus-Gelenkes. Staudacher und Schildberger (1999) haben gezeigt, dass das Interneuron i2-1 nach anterior-dorsal von der Verzweigung des Interneurons i1-2, in den Dorsallobus im Deutocerebrum projiziert. Diese Interneurone i1-2, i2-1 und c2-3 könnten aufgrund ihrer Verzweigungsmuster vermutlich eine organisatorische Funktion bei der Zweiteilung des antennal-mechanosensorischen Neuropils im Deutocerebrum der Grillen übernehmen, ähnlich wie dies für die Projektionsneurone beschrieben wurde (Malun et al., 1994).

Dieselbe Hypothese könnte für die Interneurone cG5-1 und cG5-2 gelten: Die Lage und die Position ihrer dendritischen Verzweigungen könnten für die Trennung des antennalen mechanosensorischen Neuropils verantwortlich sein. Im Gegensatz zu der Gruppe iG8 (i1 und i2 in adulten Grillen) konnten zwei kontralateral absteigende Interneurone cG5-1 und cG5-2 aus der Gruppe cG5 (c1 und c2 in adulten Grillen) mit ihren dendritischen Verzweigungen im Deutocerebrum in 95% der Embryogenese markiert werden. Außerdem wurden bereits in 60% der Embryogenese die Zellkörper der Interneurone aus der Gruppe cG5 markiert, aus denen die Interneurone entstammen, die wegen ihren dendritischen Verzweigungen im Neuropil bei der Organisation des zweigeteilten mechanosensorischen Neuropils im Deutocerebrum eine Rolle spielen könnten.

Im Oberschlundganglion der Grillenembryonen konnten die Zellkörper der Gruppe cG2 zwischen 60% und 95% markiert werden. Diese Gruppe ist mit der Gruppe c5 der adulten Grillen identisch (siehe Kapitel 4.7). Staudacher (1998) hat ein Interneuron (c5-3) morphologisch charakterisiert und

beschrieben, dass das Interneuron c5-3 homolog zum TCG (tritocerebral commissure giant) Neuron der Heuschrecken zu sein scheint (*Schistocerca gregaria*: TCG: Bacon und Tyrer, 1978; Bacon und Möhl, 1983; VG1: Williams, 1975). In Grillen wurde ein homologes Neuron zu TCG gezeigt (*Gryllus bimaculatus*: Bacon, 1980). Dieses Neuron in Grillen enthält auch einen antennalen mechanosensorischen Eingang. In Grillenembryonen ist die Gruppe cG2, die auch dieses absteigende Interneuron (c5-3: TCG) enthält, ab 60% der Embryogenese mit zwei Zellkörper (N = 1) und bis 95% der Embryogenese mit vier Zellkörper (N = 4) vertreten. Absteigende Interneurone können in Heuschreckenembryonen in etwa 45% der Embryogenese individuell identifiziert werden (descending contralateral movement detector (DCMD); Bentley und Toroian-Raymond, 1981). Sein Zellkörper liegt in diesem Stadium in der adulten Lage im Oberschlundganglion. Der primäre Neurit hat seinen Weg im Oberschlundganglion festgelegt und hat nur wenige kurze Seitenfilopodien. Während der Entwicklung nehmen diese in die Länge zu. Sie bleiben aber auf die Region im Oberschlundganglion beschränkt, die sie im adulten Zustand einnehmen werden. Dieses Neuron erhält neben visuellen Eingängen auch Eingänge aus der Antenne (Rowell und O`Shea, 1980). Dieses Neuron ist vermutlich ein Neuron aus der Gruppe c1 (Staudacher, 1998). Die Gruppe cG5 der Grillenembryonen ist mit der Gruppe c1 der adulten Grillen identisch (siehe Kapitel 4.7). Die Zellkörper der Gruppe cG5, die vermutlich das DCMD Neuron enthält, konnten bereits in 60% der Embryogenese im Oberschlundganglion der Grillenembryonen markiert werden.

Durch Färbungen des Halskonnektivs konnten in dieser Arbeit die absteigenden Interneurone zwischen 60% und 95% der Embryogenese gefärbt werden. Die Lokalisation ihrer Zellkörper im Oberschlundganglion zeigen bereits ab 60% der Entwicklung eine adult-ähnliche Organisation. Einige der Interneurone mit ihren adult-ähnlichen dendritischen Verzweigungen sind in ca. 80% der Embryogenese zu sehen. Außerdem kann eine Differenzierung des antennal-mechanosensorischen Neuropils erst ab etwa 45% der Embryogenese erfolgen, weil ab diesem Stadium die

ersten sensorischen Neurone der Antennenbasis ins Oberschlundganglion projizieren (die campaniformen Sensillen, siehe Kapitel 3.2.4). Die Differenzierung des antennal-mechanosensorischen Neuropils muss in etwa 60% der Embryogenese abgeschlossen sein, weil alle basalen Mechanorezeptoren mit ihren zentralen Projektionen in diesem Stadium bereits vorhanden sind (siehe Kapitel 3.2.4). Wie schon in der Diskussion Kapitel 4. 5 erwähnt wurde, ist die Zweiteilung des antennal-mechanosensorischen Neuropils in vfa und dl bereits bei 65% der Embryogenese deutlich sichtbar. Aus diesen Befunden kann man annehmen, dass das kritische Zeitfenster zwischen 45% und 60% der Embryogenese liegt, in dem die Reihenfolge des Auftretens von dendritischen Verzweigungen absteigender Interneurone und von dendritischen Verzweigungen antennal-mechanosensorischer Neurone im Neuropil aufgeklärt werden muss.

Um eine Aussage machen zu können, ob absteigende antennale Interneurone eine Funktion bei der Organisation des antennal-mechanosensorischen Neuropils übernehmen können, muss gezeigt werden, ab wann die dendritischen Verzweigungen der Interneurone im Neuropil auftreten, also vor oder nach 45% der Entwicklung. Wenn ein Interneuron mit seinen dendritischen Verzweigungen im Neuropil vor 45% der Entwicklung entsteht, das heißt, bevor die erste Projektion antennal-mechanosensorischer Neurone im Neuropil auftritt, könnte für dieses Interneuron eine organisatorische Funktion für die Bildung des antennal-mechanosensorischen Neuropils angenommen werden. Um eine solche Funktion kausal nachweisen zu können, könnte man dieses Interneuron ausschalten, zum Beispiel durch Photoinaktivierung (Miller und Selverston, 1979) und die Entwicklung des mechanosensorischen Neuropils während der Embryogenese weiter verfolgen. Ab 65% der Entwicklung ist die Organisation dieses Neuropils bekannt. Wenn man daher eine Veränderung der Organisation dieses Neuropils ab dem 65%-igem Stadium feststellt, könnte dieses Interneurons kausal am Aufbau des Neuropils beteiligt sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hat entwicklungsbiologische Untersuchungen zur Organisation des peripheren antennalen Nervensystems und der antennal-mechanosensorischen Areale im Oberschlundganglion von *Gryllus bimaculatus* zum Inhalt. Hierzu wurde das raum-zeitliche Entstehungsmuster der mechanosensorischen Neurone der Antennenbasis und der zentralnervösen, antennal-mechanosensorischen Interneurone aufgeklärt, um die Voraussetzungen zu untersuchen, die zur Entstehung des antennal-mechanosensorischen Neuropils führen. Im Gegensatz zum benachbarten olfaktorischen Neuropil, dessen Entwicklung Gegenstand intensiver Untersuchungen ist, lagen bis jetzt keine Daten für die mechanosensorischen Gebiete vor.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Kriterien erarbeitet, die eine quantitative Altersbestimmung der Grillenembryonen auf einer prozentualen Zeitskala erlauben, was eine Voraussetzung für alle entwicklungsbiologischen Untersuchungen ist. Diese Kriterien beinhalten die absoluten Antennenlängen (Abb. 3.1.5) und die äußeren morphologischen Merkmale der Grillenembryonen (Kapitel 3.1.3).

In den embryonalen Antennen der *Gryllus bimaculatus* legen die Pionierneurone die erste periphere Bahn ins Zentralnervensystem (37% Entwicklungsalter). Zwischen antennal-mechanosensorischen Neuronen und dem Zentralnervensystem entsteht die erste neuronale Verbindung ab etwa 45% der Embryogenese. Diese mechanosensorischen Neurone gehören vermutlich zu den campaniformen Sensillen des zweiten Antennensegments (Abb. 3.2.4). Eine Differenzierung des antennal-mechanosensorischen Neuropils kann erst ab etwa 45% der Embryogenese erfolgen, weil erst ab diesem Stadium die ersten sensorischen Neurone aus der Antennenbasis ins Zentralnervensystem projizieren. Die restlichen basalen Mechanorezeptoren (Chordotonalorgane und Haarsensillen) entstehen später (Abb. 3.2.4). Die Differenzierung des antennal-mechanosensorischen Neuropils muss in etwa bei 60% der Embryogenese abgeschlossen sein, weil dann alle basalen

Mechanorezeptoren mit ihren zentralen Projektionen bereits vorhanden sind. Diese Interpretation stimmt mit dem Ergebnis anterograder Füllungen am Antennennerv überein, da die adult-typische Zweiteilung des antennal-mechanosensorischen Neuropils bereits bei 65% der Embryogenese deutlich sichtbar ist. Der olfaktorische Antennallobus ist in diesem Stadium dagegen noch nicht nachweisbar. Dessen typische anatomische Einheiten, die Glomeruli, sind erst ab ca. 80% der Embryogenese zu erkennen.

Durch retrograde Färbungen des Halskonnektivs konnten die absteigenden Interneurone zwischen 60% und 95% der Embryogenese anatomisch charakterisiert werden. Die Lage ihrer Zellkörper im Oberschlundganglion zeigt bereits ab 60% der Entwicklung eine adult-ähnliche Organisation. Zwischen 60% und 75% nimmt die Anzahl der Interneuronengruppen zu und sie bleibt dann bis 95% der Embryogenese konstant. Einige der Interneurone mit ihren adult-ähnlichen dendritischen Verzweigungen sind in etwa 80% der Embryogenese zu sehen.

Durch diese Befunde kann man annehmen, dass das kritische Zeitfenster für die Differenzierung des antennalen Neuropils zwischen 45% und 60% der Embryogenese liegt.

In meiner Dissertation wurden erstmalig die Grundlagen geschaffen, um kausal die Entwicklung der Organisation des antennal-mechanosensorischen Neuropils im Deutocerebrum der Grillenembryonen zu untersuchen. Hierzu werden Vorschläge für weitergehende Untersuchungen im Zeitfenster zwischen 45% und 60% formuliert.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC: Avidin-Biotin-Complex

AN: Antennennerv

cG1-cG5: kontralateral absteigende Interneurone mit Zellkörpern in Gruppen eins bis fünf

CS: campaniformen Sensillen

CY3: Indocarbocyanine

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid

DC: Deutocerebrum

Dil: Dialkylcarbocyan

dl: dorsal lobus

dPN: dorsales Pionierneuronenpaar

EDTA: Ethylen-diamin-tetra-acetat

F1, F2 und F3: Faserbündel der antennalen sensorischen Neurone

HRP (horse raddish peroxidase): Meerrettich-Peroxidase

iG1-iG8: ipsilateral absteigende Interneurone mit Zellkörpern in Gruppen eins bis acht

LY: Lucifer Yellow

MS: Methylsalicylat

NGS: normal goat serum

of: olfaktorische Fasern

OSG: Oberschlundganglion

P1, P2 und P3: Projektionsareale der Faserbündel F1, F2 und F3

PBS: Phosphate buffered saline

PC: Protocerebrum

Pe: Pedicellus

PCO: pedicellares Chordotonalorgan

PH: pedicellare Haarsensillen

Sc: Scapus

SCO: scapales Chordotonalorgan

SH: scapale Haarsensillen

TC: Tritocerebrum

TCC: Tritocerebralkommissur

USG: Unterschlundganglion

vfa: ventral area of flagellar afferents

vPN1: das erste Paar ventraler Pionierneurone

vPN2: das zweite Paar ventraler Pionierneurone

Z1-Z7: sensorische Zellbildungszone Z1 bis Z7 in embryonalen Antennen

ZNS: Zentralnervensystem

7. ANHANG

7.1 Rezepte

7.1.1 Pufferlösungen

Um PBS (Phosphate buffered saline) anzusetzen, muss man erst Phosphate buffer ansetzen.

Phosphate buffer (PB) 0,1M:

Stammlösung 1:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a. 17,8g/ in 1000 ml (Gesamtlösung) $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (M: 177,99)

Stammlösung 2:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$ p.a. 13,8g/ in 1000 ml (Gesamtlösung) $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (M: 137,99)

Um pH-Wert einzustellen, wird zu der ersten Stammlösung solange die zweite Stammlösung dazu gegeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Phosphate buffered saline (PBS) 0,01M:

Man nimmt 100 ml PB (0,1M), in dem 9 g NaCl p.a. aufgelöst wird und füllt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 1000 ml (Gesamtlösung) auf.

PBS mit 0,3% TritonX-100 (TX-100)

In 100 ml PB (0,1 M) wird 9 g NaCl p.a. aufgelöst, 3 ml TX-100 dazu gegeben und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 1000 ml (Gesamtlösung) aufgefüllt. Das TX-100 ist ein Detergenzium und darum muss es ganz langsam in Lösung gebracht werden. Bei zu schnellem Umrühren schäumt die Lösung stark.

TRIS-HCl (0,05 M)

6.055 g Tris p.a. (M = 121.1) werden in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst und anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 1000 ml (Gesamtlösung) aufgefüllt.

Mit HCl wird der entsprechende pH-Wert eingestellt (hier: pH: 7,6) .

7.1.2 Grillenringer

Grillenringer nach EIBL:

Stammlösung:

NaCl	75 g
KCl	7,45 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	4,06 g
NaHCO ₃	3,36 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	8,28 g

Die Chemikalien der Reihe nach in 500 ml H₂O_{dest.} lösen und anschließend mit H₂O_{dest.} auf 1000 ml (Gesamtlösung) auffüllen.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung mit H₂O_{dest.} auf 900 ml auffüllen, Zugabe von 0,22 g CaCl₂ x 2 H₂O und lösen und auf 1000 ml Gesamtlösung mit H₂O_{dest.} auffüllen.

Erst bei der Gebrauchslösung wird der pH-Wert (hier: pH: 7,4) eingestellt.

7.1.3 Neurobiotin Visualisierung:

Inkubieren über Nacht bei Raumtemperatur im Avidin-Biotin-Komplex
Waschen 2 x 10 min in PBS (0,01 M) und 2 x 10 min in Tris-HCl (0,05 M)
Vorinkubieren 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur in 0,01% DAB (in Tris-HCl)

DAB-Entwicklung in 500 µl DAB-Lösung und dazu 2 µl 0,3% H₂O₂-Lösung geben

Um die Reaktion zu stoppen, waschen 2 x 10 Minuten bei Raumtemperatur in Tris-HCl

Entwässern je 7 Minuten in einer aufsteigen Alkoholreihe

Aufklären mit Methylsalicylat und mit Methylsalicylat eindeckeln

Alternativ zum DAB; Detektion der Neurobiotin-Moleküle mit dem Avidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (CY3);

CY3-Avidin 1:4000 in PBS (0,01 M) verdünnen

Inkubieren im Dunkeln bei 4°C über Nacht oder zwei Tage in der CY3-Avidin-Lösung

Waschen 6 x 10 Minuten in PBS 0.1%-TX-100

Eindeckeln entweder in Vectashield, siehe 7.1.7 oder;

Entwässern je 7 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe

Aufklären mit Methylsalicylat und auf einen Objektträger mit Vertiefung eindeckeln

7.1.4 Die Beschichtung der Objektträger mit Chromalaungelatine

Ansatz der Gelatine:

4,5 g Gelatine (Merck) wird bei 55°C in 1000 ml Gesamtlösung $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst.

In der auf Raumtemperatur abgekühlten Gelatinelösung wird 0,5 g Kalium-Chromalaun ($\text{Cr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) gut gelöst. Die Lösung ist im Kühlschrank ca. eine Woche haltbar.

Vorbehandlung der Objektträger:

Objektträger, die man beschichten will, werden in einem Metalständer gestellt und bei 90°C in der Spülmaschine gewaschen.

Beschichtung der Objektträger:

Der Metalständer mit den Objektträgern wird in die Chromalaungeletine eingetaucht und 30 Minuten im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet. Dieser Vorgang (Eintauchen und danach Trocknen) muss noch drei mal wiederholt werden. Den letzten Trockengang macht man über Nacht im Wärmeschrank. Die beschichteten Objektträger werden dann in einem Objektträgerkasten (Spezial-Gefrierbox) im Gefrierfach aufbewahrt.

7.1.5 Rezepte der Gebrauchslösungen

Ansatz des Fixiermittels (4% Formaldehyd):

Stammlösung: 36,5% Formaldehyd in H₂O_{dest.}

4 ml Formaldehyd + 31 ml PBS (0,01 M)

Das verdünnte Fixiermittel kann man im Gefrierfach aufbewahren.

AAF (Alcohol Acetic acid Formol)-Fixierer

85 ml 100% Ethanol + 10 ml Formalin und 5 ml Eisessig

Ansatz von ABC (Avidin-Biotin-Komplex):

(Reihenfolge ist sehr wichtig)

980 µl PBS + 10 µl A : vortexen

Zugabe von 10 µl B : vortexen

bei Raumtemperatur 1 Stunde und abgedunkelt stehen lassen.

20% Saccharose-Lösung:

2 g Saccharose + 10 ml PBS (0,01 M)

7.1.6 Silberintensivierung nach Timm

Lösungen:

Lösung A (Reduktionsmittel): in 100 ml destilliertem Wasser werden 10 g Saccharose, 0,8 g Zitronensäure, 0,17 g Hydrochinin (giftig), 3 g Gummi arabicum bei ca. 50-60°C gelöst. pH- Wert bei Raumtemperatur messen, eventuell mit Zitronensäure auf pH 2,5-2,6 einstellen.

Lösung A kann in größeren Mengen hergestellt und portionsweise eingefroren werden.

Lösung B: 1% AgNO₃ in destilliertem Wasser (in dunkler Flasche aufbewahren, hält ca. eine Woche im Kühlschrank).

Lösung C: 1 Teil Lösung B (kalt) und 9 Teile Lösung A (heiß) kurz vor Gebrauch in vorgewärmten Gefäß mischen.

Bedingungen:

Alle Geräte müssen sauber sein.

Alle Geräte (Bechergläser für die Lösungen und Pipetten) und Flüssigkeiten außer AgNO_3 müssen auf 60°C vorgewärmt werden.

Kein Metalgerät benutzen.

Präparate nicht zu lange dem Licht aussetzen.

Vorgehen für das Ganzpräparat:

Präparate sind in Methylsalicylat.

absteigende Alkoholreihe (100-96-90-80-70-50%, je 7 Minuten)

waschen in destilliertem Wasser für 3 Minuten

Vorinkubation in Lösung C für 10-30 Minuten bei 60°C im Dunkeln.

Inkubation in Lösung C für 10-30 mit bei 60°C im Dunkeln.

Alle 5 min Präparate anschauen, gefärbte Stellen erscheinen bräunlich.

Stoppen der Färbung im warmen destilierten Wasser 5 Minuten im Dunkeln und 5 Minuten im lauwarmen Wasser lassen.

aufsteigende Alkoholreihe (50-70-80-90-96-100%, je 7 Minuten).

klären in Methylsalicylat.

7.1.7 Mikroskopieren der Präparate

Entwässern

Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 96% und 2 x 100% Isopropanol) je 7 Minuten entwässert. Dann wurden sie in Methylsalicylat aufgeklärt. Dabei wurden sie mit Methylsalicylat auf einen Objektträger eingedeckelt.

Fluoreszenzpräparate

Zum Mikroskopieren wurden die Präparate nach dem Waschschrift mit PBS in Glycerol aufgeklärt (30%, 50%, 70%, 90% und 100% Glycerol, je 10 Minuten) und in Vectashield (Mounting Medium for fluorescence H-100: Lot P0415, Vector) auf einen Objektträger eingedeckelt, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben.

7.2 Herkunftsnachweis verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien

Oscilloskop: Tektronix R5103

Audiomonitor: Orion

Verstärker: Eigenbau der Werkstatt des Department of Zoologie, Cambridge (UK)

Stimulator: GRAS SD9

Mikromanipulator: Leitz Wetzlar

Puller: Sutter instrument Co., Model P 97

Borosilikatkapillaren: Clark electromedical instruments

Analog Digitalwandler (CED): Cambridge elektronical design Micro 1401

verwendete Computerprogramme:

Gimp Version 2.2.4

Grace (Version 5.1.18, <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>)

ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. <Http://rsb.info.nih.gov/ij/java> 1.5.0_04)

OpenOffice.org 2.0.4

Spike2 (Version 2.3.13)

Statist (Version 1.0.2, Dirk Melcher 1997-1999 unter der GNU GPL, herausgegeben 1998-2003 von Bernhard Reiter)

7.3 Herkunftsnachweis verwendeter Substanzen

Ammoniumsulfid (Fluka, Art.Nr. 09981)

ABC (Avidin-Biotin-Complex; Vectastain, Elite Standard PK-6100)

Butanol, tert. (Roth, Art.Nr. AE16.1)

Chromalaun (Serva, Art.Nr. 17144)

CY3-Streptavidin (Jackson Immuno Research, Lot 55033)

DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid; Sigma, Lot 29H1060)

Dil (Dialkylcarbocyan; Neuro Trace™ Tissue labeling Paste; N-22880;

Molecular Probes, Lot 71A1-1)
Dithiooxamid (Rubansäure; Fluka, Art.Nr. 43800-5G)
EDTA (Ethylen-diamin-tetra-acetat; Fluka, Art.Nr. 03610)
Formaldehyd (Fluka, Art.Nr. 47629)
Gelatine (gepulvert von Merck, Art.Nr. 4078)
GAR-CY3 (goat anti rabbit IgG-CY3; Jackson Immuno Research, Lot 51234)
Kaliumchlorid (KCl, Merck, 4936)
Kobaltchlorid (CoCl_2 , Merck, 802540)
Lithiumchlorid (LiCl , Merck, 1.05679)
Lucifer Yellow CH dilithiumsalt (Sigma, Art.Nr. L0259)
Methylsalicylat (Sigma, Art.Nr. M-6752)
NGS (Normal Goat Serum; Gibco BRL, Lot 37P9652)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 , Merck, Art.Nr. 6329)
Natriumhydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, Merck, Art.Nr. 1.06346)
Neurobiotin (Vector, Lot P0407)
Nickelchlorid (NiCl_2 , Merck, 8.06722)
rabbit anti-HRP (Sigma, Lot: 066H8806)
Paraplast (Kendall, Lot XP 230 Schmelzpunkt bei 62°C)
pEGFP Vector (BD Biosciences; Lot 4050520; BD Biosciences)
Saccharose-D+ (Riedel-deHaen, Art.Nr. 16104)
Sylgard (Silicon Elastomer mit Katalysator; Sasco, Typ 184)
Tissue-Tek (Sakura, Art.Nr. 4583))
TX-100 (TritonX-100; Serva, Art.Nr. 37250)
Tris (Trishydroxymethylaminomethane; Sigma, art.Nr. T-1503)
Vectashield (Mounting Medium for fluorescence; Vector, Art.Nr. H-1000, Lot Q0413)

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Alexander, R. D. and Otte, D. (1967). The evolution of genitalia and mating behaviour in crickets (Gryllidae) and other Orthoptera. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich. 133: 1-62.
- Altman, J. S. and Tyrer, N. M. (1980). Filling selected neurons with cobalt through cut axons. In: Straußfeld N. J., Müller, T. A. Neuroanatomical technics: Insect nervous system. Springer New York Heidelberg Berlin).
- Anton, A., van Loon, J. J. A., Meijerink, J., Smid, H. M., Takken, W. and Rospars, J. P. (2003). Central projections of olfactory receptor neurons from single antennal and palpal sensilla in mosquitoes. Arthropod Struct. Dev. 32: 319-327.
- Armstrong, J. D. and Kaiser, K. (1997). The study of *Drosophila* brain development. In: Houdebine L. M. (Eds.), Transgenic animals-generation and use Harwood Academic Publishers.
- Bacon, J. P. and Tyrer, M. (1978). The tritocerebral commissure giant (TCG): A bimodal interneurone in the locust, *Schistocerca gregaria*. J. Comp. Physiol. 126: 317-325.
- Bacon, J. (1980). A homologous interneurone in a locust, cricket and a mantid. Verh. Dt. Zool. Ges. 85: 300.
- Bacon, J. and Möhl, B. (1983). The tritocerebral commissure giant (TCG) wind-sensitive interneurone in the locust. I. Its activity in straight flight. J. Comp. Physiol. A 150: 439-452.
- Balakrishnan, R. and Pollack, G. S. (1997). The role of antennal sensory cues in females responses to corting males in the cricket teleogryllus oceanicus. J. Exp. Biol. 200: 511-522.
- Bate, C. M. (1976). Pionierneurons in an insect embryo. Nature 260: 54-55.
- Bate, C. M. and Grünewald, E. B. (1981). Embryogenesis of an insect nervous system. II: a second class of neuron precursor cells and the origin of the intersegmental connectives. J. Embryol. Exp. Morphol. 61: 317-30.
- Bate, C. M., Goodman, C. S. and Spitzer, N. C. (1981). Embryonic development of identified neurons: segment-specific differences in the H cell homologues. J. Neurosci. 1: 103-106.
- Bentley, D., Keshishian, H., Shankland, M. and Toroian-Raymond, A. (1979). Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, *Schistocerca nitens*. J. Embryol. exp. Morph. 54: 47-74.

Bentley, D. and Toroian-Raymond, A. (1981). Embryonic and postembryonic morphogenesis of a grasshopper interneuron. *J. Comp. Neurol.* 201: 507-518.

Bentley, D. and Keshishian, H. (1982). Pathfinding by peripheral pioneer neurons grasshopper. *Science* 218: 1082-1088.

Bentley, D. and Caudy, M. (1983). Pioneer axons lose directed growth after selective killing of guidepost cells. *Nature* 304(5921): 62-5.

Bentley, D. and Toroian-Raymond, A. (1986). Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature* 323: 712-715.

Berlot, J. and Goodman, C. S. (1984). Guidance of peripheral pioneer neurons in the grasshopper: adhesive hierarchy of epithelial and neuronal surfaces. *Science* 223: 493-496.

Bodmer, R., Barbel, S., Sheperd, S., Jack, J. W., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1987). Transformation of sensory organs by mutations of the cut locus of *D. melanogaster*. *Cell* 51: 293-307.

Bodmer, R. and Jan, Y. N. (1987). Morphological differentiation of the embryonic peripheral neurons in *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196: 69-77.

Boyan, G. S. and Ball, E. E. (1990). Neuronal organization and information processing in the windsensitive cercal receptor/giant interneurone system of the locust and other orthopteroid insect. *Progr. Neurobiol.* 35: 217-243.

Boyan, G., Williams, L. and Meier, T (1993). Organization of the commissural fibers in the adult brain of the locust. *J. Comp. Neurol.* 332: 358-377.

Boyan, G. S., Therianos, S., Williams, J. L. D. and 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, G., Williams, J. L. D., and 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, G. S., Williams, J. L. D. and Reichert, H. (1995c). Morphogenetic reorganization of the brain during embryogenesis in the grasshopper. *J. Comp. Neurol.* 361: 429-440.

Boyan, G. and Williams, L. (2000). Building the antennal lobe: *engrailed* expression reveals a contribution from protocerebral neuroblasts in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct. Dev.* 29: 267-274.

- Boyan, G., Reichert, H. and Hirth, F. (2003). Commissure formation in the embryonic insect brain. *Arthropod Struct. Dev.* 32: 61-77.
- Boyan, G. S. and Williams, J. L. D. (2004). Embryonic development of the sensory innervation of the antenna of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct. Dev.* 33: 381-397.
- Boyan, G. S. and Williams, J. L. D. (in Press, 2007). Embryonic development of a peripheral nervous system: nerve tract associated cells and pioneer neurons in the antenna of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct. Dev.*
- Bräunig, P., Pflüger, H. J., Hustert, R. (1983). The specificity of central nervous projections of locust mechanoreceptors. *J. Comp. Neurol.* 218: 197-207.
- Brand, A. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118: 401-415.
- Broadie, S. K., Bate, M. and Tublitz, J. N. (1991). Quantitative staging of embryonic development of the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 199: 327-334.
- Buchner, E., Buchner, S., Burg, M. G., Hofbauer, A., Pak, W. L. and Pollack, I. (1993). Histamine is a major mechanosensory neurotransmitter candidate in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tiss. Res.* 273: 119-125.
- Burg, M. G., Sarthy, P. V., Koliantz, G. and Pak, W. L. (1993). Genetic and molecular identification of a *Drosophila* histidine decarboxylase gene required in photoreceptor transmitter synthesis. *EMBO J.* 12: 911-919.
- Burrows, M. (1992). Local circuits for the control of leg movements in an insect. *TINS* 15: 226-232.
- Burrows, M. (1996). *The neurobiology of an insect brain*. New York, Oxford university press.
- Camhi, J. M. (1993). Neural mechanisms of behavior. *Curr. Opin. Neurol.* 3: 1011-1019.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1985). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Chapman, R. F. and Whitham, F. (1968). The external morphogenesis of grasshopper embryos. *Proc. R. Ent. Soc. Lond. A* 43 (10-12): 161-169.

- Chapman, R. F. (2002). Development of phenotypic differences in sensillum populations on the antennae of a grasshopper, *Schistocerca americana*. *J. Morphol.* 254: 186-194.
- Condrón, B. G. and Zinn, K. (1995). The grasshopper median neuroblast is a multipotent progenitor cell that generates glia and neurons in distinct temporal phases. *J. Neurosci.* 14: 5766-5777.
- Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A. (1987). Independent subpatterns of sense organs require independent genes of the achaete-scute complex in *Drosophila* larvae. *Genes. Dev.* 1: 297-306.
- Denger, G. (1934). Die Embryonalentwicklung des Heimchens. Unveröffentlicht. In: Kanellis, A. (1952). Anlagenplan und Regulationserscheinungen in der Keimanlage des Eies von *Gryllus domesticus*. *Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik* 145: 417-461.
- Distler, P. G. and Boeckh, J. (1996). Synaptic connection between olfactory receptor cells and uniglomerular projection neurons in the antennal lobe of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Comp. Neurol.* 370: 35-46.
- Fudalewicz-Niemczyk, W. and Rosciszewska, M. (1973). The peripheric nervous system of the larva of *Gryllus domesticus* L. (Orthoptera). Part I. Antenna. *Acta Biol. Cracov. Ser.Zool.* XVI: 209-217.
- Gascuel, J. and Masson, C. (1991). Developmental study of afferented and deafferented bee antennal lobes. *J. Neurobiol.* 22: 795-810.
- Gebhardt, M. and Honegger, H. W. (2001). Physiological characterisation of antennal mechanosensory descending interneurons in an insect (*Gryllus bimaculatus*, *Gryllus campestris*) brain. *J. Exp. Biol.* 204: 2265-2275.
- Gewecke, M. (1972). Bewegungsmechanismus und Gelenkrezeptoren der Antennen von *Locusta migratoria* L. (Insecta, Orthoptera). *Z. Morphol. Tiere* 71: 128-149.
- Gewecke, M. (1979). Central projection of antennal afferents for flight motor in *Locusta migratoria*. *J. Comp. Physiol. A* 103: 79-95
- Gho, M., Bellaïche, Y. and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126: 3573-84.
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C. (1988). From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes. Dev.* 2: 495-501.
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C. (2000). A genetic programme for neuronal connectivity. *Trends. Genet.* 16: 221-26.

- Goodman, C. S. and Spitzer, N. C. (1979). Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. *Nature*, 280: 208-214.
- Goodman, C. S., Bate, M. and Spitzer, N. C. (1981). Embryonic development of identified neurons: Origin and transformation of the H cell. *J. Neurosci.* 1: 94-102.
- Goodman, C. S. (1984). Landmarks and labels that help developing neurons find their way. *BioScience* 34: 300-307.
- Graber, V. (1882). Die chordotonalen Sinnesorgane und das Gehör der Insekten. *Arch. Mikrosk. Anat. Entw. Mech.* 20: 506-640.
- Gregory, G. E. (1974). Neuroanatomy of the mesothoracic ganglion of the cockroach *Periplaneta Americana* (L.). The roots of the peripheral nerves. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 267: 421-465.
- Gregory, G. E. (1984). Neuroanatomy of the mesothoracic ganglion of the cockroach *Periplaneta Americana* (L.). II. Median neuron cell body groups. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 306: 191-218.
- Haas, K., Sin, W. C., Javaherian, A., Li, Z. and Cline, H. T. (2001). Single-cell electroporation for gene transfer *in vivo*. *Neuron* 29: 583-591.
- Hansson, B. S., Ochieng, S. A., Grosmaître, X., Anton, S. and Njagi, P. G. N. (1996). Physiological responses and central nervous projections of antennal olfactory neurones in the adult desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *J. Comp. Physiol. A* 179: 157-167.
- Hayashi, J. H. and Hildebrand, J. G. (1990). Insect olfactory neurons *in vitro*: morphological and physiological characterization of cells from the developing antennal lobes of *Manduca sexta*. *J. Neurosci.* 10(3): 848-859.
- He, B. and Anler, P. N. (2001). Cellular mechanisms in the development of the *Drosophila* arista mechanisms of development. 104: 69-78.
- He, B. and Adler, P. N. (2002). The frizzled pathway regulates the development of arista laterals. *BMC Dev. Biol.* 2: 7.
- Heymons, R. (1895). Die Embryonalentwicklung von Dermaptoren und Orthoptoren. Jena.
- Ho, R. K. and Goodman, C. S. (1982). Peripheral pathways are pioneered by an array of central and peripheral neurones in grasshopper embryos. *Nature*, 297: 404-406.
- Homborg, U., Christensen, T. A. and Hildebrand, J. G. (1989). Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 477-501.

- Honegger, H. W., Allgäuer, C., Klepsch, U. and Welker, J. (1990). Morphology of antennal motoneurons in the brains of two crickets, *Gryllus bimaculatus* and *Gryllus campestris*. J. Comp. Neurol. 291: 256-268.
- Huber, F., Moore, T. E. and Loher, W. (Eds.) (1989). Cricket behavior and neurobiology, Cornell University Press, Ithaca and London.
- Hunter-Jones, P. (1960). Fertilization of eggs of the desert locust by spermatozoa from successive copulations. Nature 185: 336.
- Ignell, R., Dekker, T., Ghaninia, M. and Hansson, B. S. (2005). Neuronal architecture of the mosquito deutocerebrum. J. Comp. Neurol. 493: 207-240.
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (8): 2700-4.
- Jan, Y. N., Ghysen, A., Christoph, I., Barbel, S. and Jan L. Y. (1985). Formation of neuronal pathways in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. J. Neurosci. 5(9): 2453-2464.
- Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. Cell 75: 827-830.
- Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1993). Atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. Cell 73: 1307-1327.
- Jhaveri, D., Sen, A., Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (2000). Sense organ identity in the *Drosophila* antenna is specified by the expression of the proneural gene atonal. Mech. Dev. 99: 101-111.
- Jhaveri, D. and Rodrigues, V. (2002). Sensory neurons of the atonal lineage pioneer the formation of glomeruli within the adult *Drosophila* olfactory lobe. Development 129: 1251-1260.
- Johnson, S. E. and Murphey, R. K. (1985). The afferent projection of mesothoracic bristle hairs in the cricket *Acheta domesticus*. J. Comp. Physiol. A 156: 369-379.
- Johnston, C. (1855). Auditory apparatus of the *Culex* mosquito. Q. J. Microsc. Sci. 3, 97-102. In: Göpfert, M. C., Briegel, H. and Robert, D. (1999). Mosquito Hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti*. J. Exp. Biol. 202: 2727-2738.
- Jordan, A. M. (1972). Extracellular ducts within the wall of the spermatheca of the tsetse flies (*Glossina* sp.) (Dipt., Glossinidae). Bull. Entomol. Res. 61: 669-672.

- Kanellis, A. (1940). Morphologische und physiologische Untersuchungen über die Eientwicklung von *Gryllus domesticus* (griechisch), S. 1-50. Athen.
- Kanellis, A. (1952). Anlagenplan und Regulationserscheinungen in der Keimanlage des Eies von *Gryllus domesticus*. Roux'Archiv für Entwicklungsmechanik 145: 417-461.
- Kent, K. S. and Levine, R. B. (1988). Neural control of leg movements in a metamorphic insect: persistence of larval leg motor neurons to innervate the adult legs of *Manduca sexta*. J. Comp. Neurol. 276: 30-43.
- Keshishian, H. (1980). The origin and morphogenesis of pioneer neurons in the grasshopper metathoracic leg. Dev. Biol. 80: 388-397.
- Keshishian, H. and Bentley, D. (1983). Embryogenesis of peripheral nerve pathways in grasshoppers legs. I. The initial nerve pathway to the CNS. Dev. Biol. 96: 89-102.
- Kloppenburg, P. (1995). Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). J. Comp. Neurol. 363: 333-343.
- Krause, G. (1939). Die Eitypen der Insekten. Biol. Zbl. 59: 495.
- Kutsch, W. (1989). Formation of the receptor system in the hindlimb of the locust embryo. Roux's Arch. Dev. Biol. 198: 39-47.
- Lakes-Harlan, R. and Pollack, G. S. (1993). Pathfinding of peripheral neurons in the central nervous system of an embryonic grasshopper (*Chorthippus biguttulus*). Cell Tissue Res 273: 97-106.
- Lauga, P. J. (1969). Table chronologique du developpement embryonnaire de *Acheta domesticus* L. (Orthoptere, Gryllidae). A 25°C. Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris. 12° Serie, Tome XI: 483-504.
- Laurent, G. (1996). Dynamical representation of odors by oscillating and evolving neural assemblies. TINS 19: 489-496.
- Leitch, B., Laurent, G. and Shepherd, D. (1992). Embryonic development of synapses on spiking local interneurons in locust. J. Comp. Neurol. 324: 213-236.
- Leitch, B., Shepherd, D. and Laurent, G. (1995). Morphogenesis of the branching pattern of a group of spiking local interneurons in relation to the organization of embryonic sensory neuropils in locust. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 349: 433-447.
- Levine, R. P., Pak, C. and Linn, D. (1985). The structure, function and metamorphic reorganization of somatotopically projecting sensory neurons in *Manduca sexta* larvae. J. Comp. Physiol. A 157: 1-13.

- Ludwig, P., Williams, J. L. D., Lodde, E., Reichert, H. and Boyan, G. S. (1999). Neurogenesis in the median domain of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. J. Comp. Neurol. 414: 379-390.
- Mahr, E. (1960). Struktur und Entwicklungsfunktion des Dotter-Entoplasmasystems im Ei des Heimchens (*Gryllus domesticus*). Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik, 152: 263-302.
- Malun, D., Oland, L. A. and Tolbert, L. P. (1994). Uniglomerular projection neurons participate in early development of the olfactory glomeruli in the moth *Manduca sexta*. J. Comp. Neurol. 350: 1-22.
- McLain, D. K. and Mallard, S. D. (1991). Sources and adaptive consequences of egg-size variation in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). Psyche 98: 135-164.
- McNabb, J. W. (1928). A study of the chromosomes in meiosis, fertilization, and cleavage in the grasshopper egg (Orthoptera). J. Morph. Physiol. 45: 47-93.
- Meier, T. and Reichert, H. (1991). Serially homologous development of the peripheral nervous system in the mouthparts of the grasshopper. J. Comp. Neurol. 305: 201-214.
- Melzig, J., Buchner, S., Wiebel, F., Wolf, R., Burg, M., Pak, W. L. and Buchner, E. (1996). Genetic depletion of histamine from the nervous system of *Drosophila* eliminates specific visual and mechanosensory behavior. J. Comp. Physiol. A 179: 763-773.
- Merritt, D. J. and Murphey, R. K. (1992). Projections of leg proprioceptors within the CNS of the fly *Phormia* in relation to the generalized insect ganglion. J. Comp. Neurol. 322: 16-34.
- Merritt, D. J. and Whittington, P. M. (1995). Central projections of sensory neurons in the *Drosophila* embryo correlate with sensory modality, soma position and proneural gene function. J. Neurosci. 15(3): 1755-1767.
- Micciarelli, A. S. and Sbrenna, G. (1972). The embryonic apolyses of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera). J. Insect Physiol. 18: 1027-1037.
- Miller, J.P. and Selverston, A.I. (1979). Rapid killing of single neurons by irradiation of intracellularly injected dye. Science 206:702-704.
- Miyamoto, T. and Shimosawa, T. (1983). Embryonic development of the central nervous system in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. I. Segmental homologies early neurogenesis. Zoological Magazine 92: 317-331.
- Moore, H. W. (1948). Variations in fall embryological development in three grasshopper species. Can. Ent. 80: 83-88.

- Müller, N. S. (1963). An experimental analysis of molting in embryos of *Melanoplus differentialis*. *Dev. Biol.* 8: 222-240.
- Murphey, R. K., (1985). A second cricket cercal sensory system: bristle hairs and the neurons they activate. *J. Comp. Physiol.* 156: 357-367.
- Murphey, R. K., Bacon, J. P. and Johnson, S. E. (1985). Ectopic neurons and the organization of insect sensory systems. *J. Comp. Physiol. A* 156: 381-389.
- Murphey, R. K., Possidente, D. R., Vandervorst, P. and Ghysen, A. (1989a). Compartments and the topography of leg afferent projections in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 9(9): 3209-3217.
- Murphey, R. K., Possidente, D. R., Vandervorst, G. and Merritt, D. J. (1989b). Modality-specific axonal projections in the CNS of the flies *Phormia* and *Drosophila*. *J. Comp. Neurol.* 290: 185-200.
- Murphey, R. K., Caruccio P. C., Getzinger, M., Westgate, P. J. and Phillis, R. W. (1999). Dynein-dynactin function and sensory axon growth during *Drosophila* metamorphosis: a role for retrograde motors. *Dev. Biol.* 209: 86-97.
- Murray, M. A., Schubiger, M. and Palka, J. (1984). Neuron differentiation and axon growth in the developing wing of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 104: 259-273.
- Newland, P. (1991). Morphology and somatotopic organisation of the central projections of afferents from tactile hairs on the hind of the locust. *J. Comp. Neurol.* 312: 493-508.
- Nishikawa, M., Yokohari, F. and Ishibashi, T. (1995). Central projections of antennal cold receptor neurons and hygrosensory neurons of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Comp. Neurol.* 361: 165-176.
- Nishino, H., Yamashita, S., Yamazaki, Y., Nishikawa, M., Yokohari, F. and Mizunami, M. (2003). Projection neurons originating from thermo- and hygrosensory glomeruli in the antennal lobe of the cockroach. *J. Comp. Neurol.* 455: 40-55.
- Nishino, H., Nishikawa, M., Yokohari, F. and Mizunami, M. (2005). Dual, multilayered somatosensory maps formed by antennal tactile and contact chemosensory afferents in an insect brain. *J. Comp. Neurol.* 493: 291-308.
- Oland, L. A., Orr, G. and Tolbert, L. P. (1990). Construction of a protoglomerular template by olfactory axons initiates the formation of olfactory glomeruli in the insect brain. *J. Neurosci.* 10: 2096-2112.
- Oland, L. A. and Tolbert, L. P. (1996). Multiple factors shape development of olfactory glomeruli: insights from an insect model system. *J. Neurobiol.* 30: 92-109.

- Oland, L. A. and Hayashi, J. H. (1993). Effects of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone and prior sensory input on the survival and growth of moth central olfactory neurons *in vitro*. *J. Neurobiol.* 24: 1170-1186.
- Oland, L. A., Mercer, A. R., Kirschenbaum, S. R. and Tolbert, L. P. (1993). The 5HT neuron in the olfactory lobe of *Manduca sexta* does not participate in protoglomerulus formation. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 443.
- Palka, J., Malone, M. A., Ellison, R. L. and Donald, J. W. (1986). Central projections of identified *Drosophila* sensory neurons in relation to their time of development. *J. Neurosci.* 6(6): 1822-1830.
- Peterson, B. A. and Weeks, J. C. (1988). Somatotopic mapping of sensory neurons innervating mechanosensory hairs on the larval prolegs of *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.* 275: 128-144.
- Pflüger, H.J. and Kutsch, W. (1987). Pionier- und Wegweiserzellen im Nervensystem der Insekten. *Biologie in unserer Zeit.* 17. Jahrg. Nr. 1.
- Pflüger, H. J., Bräunig, P. and Hustert, R. (1988). The organization of mechanosensory neuropiles in locust thoracic ganglia. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 321: 1-26.
- Possidente, D. and Murphey, R. K. (1989). Genetic control of sexually dimorphic axon morphology in *Drosophila* sensory neurons. *Dev. Biol.* 132: 448-457.
- Prescott, D. J., Hildebrand, J. G., Sanes, J. R. and Jewett, S. (1977). Biochemical and developmental studies of acetylcholine metabolism in the central nervous system of the moth, *Manduca sexta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 56C: 77-84.
- Python, F. and Stocker, R. P. (2002). Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *Drosophila melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J. Comp. Neurol.* 445: 374-387.
- Reddy, G. V., Gupta, B. P., Ray, K. and Rodrigues, V. (1997). Development of the *Drosophila* olfactory sense organs utilizes cell-cell interactions as well lineage. *Dev.* 124: 703-712.
- Reichert, H. (1993). Sensory inputs and flight orientation in locusts. *Comp. Biochem. Physiol.* 104 (4): 647-657.
- Reichert, H. and Boyan, G. (1997). Building a brain: developmental insights in insects. *Trends Neurosci.* 20: 258-264.
- Reznick, D. N. (1991). Maternal effects in fish life histories, pp 780-793. In the unity of evolutionary biology. Fourth international congress of systematic and evolutionary biology. Dioscorides Press, Portland. OR.

- Roonwal, M. L. (1936). Studies on the embryology of the african migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* Reiche and Frm. (Orthopteroidea, Acrididae) I-The early development, with a new theory of multi-phased gastrulation among insects. Phil. Trans. Roy. Soc. B 226: 391-421.
- Roonwal, M. L. (1937). Studies on the embryology of the african migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* Reiche and Frm. (Orthopteroidea, Acrididae) II- Organogeny. Phil. Trans. Roy. Soc. B 227: 175-244.
- Rospars, J. P. (1988). Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. Int. J. Insect Morphol. Embryol. 17: 243-294.
- Rospars, J. P. and Hildebrand, J. G. (1992). Anatomical identification of glomeruli in the antennal lobes of the male sphinx moth *Manduca sexta*. Cell Tiss. Res. 270: 205-227.
- Rossiter, M. C. (1991). Maternal effects generate variation in life history: Consequences of egg weight plasticity in the gypsy moth. Funct. Ecol. 5: 386-393.
- Rowell, C. H. F. and O'Shea, M. (1980). Modulation of transmission at an electrical synapse in the locust movement detector system. J. Comp. Physiol. A 137: 233-241.
- Sakaluk, S. K. and Cade, W. H. (1983). The adaptive significance of female multiple matings in house and field crickets. Pages 319-336 in Orthopteran Mating Systems: Sexual Competition in a Diverse Group of Insects, D. T. Gwynne and G. K. Morris (eds). Westview, Boulder, Colo.
- Salecker, I. and Boeckh, J. (1995). Embryonic development of the antennal lobes of a hemimetabolous insect, the cockroach *Periplaneta americana*: light and electron microscopic observations. J. Comp. Neurol. 352: 33-54.
- Salecker, I. and Boeckh, J. (1996). Influence of receptor axons on the formation of olfactory glomeruli in a hemimetabolous insect, the cockroach *Periplaneta americana*. J. Comp. Neurol. 370: 262-279.
- Salzen, E. A. (1960). The growth of the locust embryo. J. Embryol. exp. Morph. 8: 139-162.
- Sanes, J. R. and Hildebrand, J. G. (1976). Origin and morphogenesis of sensory neurons in an insect antenna. Dev. Biol. 51: 300-319.
- Sanes, J. R., Prescott, D. J. and Hildebrand, J. G. (1977). Cholinergic neurochemical development of normal and deafferented antennal lobes during metamorphosis of the moth, *Manduca sexta*. Brain Res. 119: 389-404.

- Sarashina, I., Mito, T., Saito, M., Uneme, H., Miyawaki, K., Shinmyo, Y., Ochuchi, H. and Noji, S. (2005). Location of micropyles and early embryonic development of the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus* (Insecta, Orthoptera). *Develop. Growth Differ.* 47: 99-108.
- Sato, M. and Tanaka-Sato, H. (2002). Fertilization, syngamy, and early embryonic development in the cricket *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *J. Morph.* 254: 266-271.
- Schrader, S. and Merritt, D. J. (2000). Central projections of *Drosophila* sensory neurons in the transition from embryo to larva. *J. Comp. Neurol.* 425: 34-44.
- Seidel, C. and Bicker, G. (2000). Nitric oxide and cGMP influence axonogenesis of antennal pioneer neurons. *Development* 127: 4541-4549.
- Seidl, F. and Gebhardt, M. (2005). Development of antennal mechanosensory neurons in crickets, in: *Proceedings of the 30th Göttingen Neurobiology Conference 2005*, abstract 373.
- Selzer, R. and Schaller-Selzer, L. (1987). Structure and function of luminal neurons in the early embryonic antenna of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Dev. Biol.* 122: 363-372.
- Shankland, M. and Bentley, D. (1983). Sensory receptor differentiation and axonal pathfinding in the cercus of the grasshopper embryo. *Dev. Biol.* 97: 468-482.
- Shepherd, D. and Laurent, G. (1992). Embryonic development of a population of spiking local interneurons in the locust (*Schistocerca gregaria*). *J. Comp. Neurol.* 319: 438-453.
- Shepherd, D. and Smith, S. A. (1996). Central projections of persistent larval sensory neurons prefigure adult sensory pathways in the CNS of *Drosophila*. *Development* 122: 2375-2384.
- Shulov, A. and Pener, M.P. (1959). A contribution to knowledge of the development of the egg of *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). *Locusta* 6: 73-88.
- Shulov, A. S. and Pener, M.P. (1963). Studies on the development of eggs of the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskal) and its interruption under certain conditions of humidity. *Anti-Locust Bull.* 41: 1-59.
- Siegler, M. V. S. und Pousman, C. A. (1990a). Motor neurons of grasshopper metathoracic ganglion occur in stereotypic anatomical groups. *J. Comp. Neurol.* 297: 298-312.

Siegler, M. V. S. und Pousman, C. A. (1990b). Distribution of motor neurons into anatomical groups in the grasshopper metathoracic ganglion. *J. Comp. Neurol.* 297: 313-327.

Simmons, L. W. (1986). Inter-male competition and mating success in the field cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Anim. Behav.* 34: 567-579.

Simmons, L. W. (1987). Sperm competition as a mechanism of female choice in the field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 21: 197-202.

Sinervo, B. (1991). Experimental and comparative analysis of egg size lizards: constraints on the adaptive evolution of maternal investment per offspring, pp 725-734. In the unity of evolutionary biology: Fourth international congress of systematic and evolutionary biology. Dioscorides Press. Portland, OR.

Sivan-Loukianova, E. and Eberl, D. F. (2005). Synaptic ultrastructure of *Drosophila* Johnston's organ axon terminals as revealed by an enhancer trap. *J. Comp. Neurol.* 491: 46-55

Slifer, E. H. (1932). Insect Development. IV. External morphology of grasshopper embryos of known age and with a known temperature history. *J. Morphol.* 53: 1-21.

Slifer, E. H. and King R. L. (1934). Insect Development. VII. Early stages in the development of grasshopper eggs of known age and with a known temperature history. *J. Morphol.* 56: 593-601.

Snow, P., Patel, N. H., Harrelson, A. L. and Goodman, C. S. (1987). Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos. *J. Neurosci.* 7: 4137-4144.

Staudacher, E. (1998). Distribution and morphology of descending brain neurons in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Cell Tiss. Res.* 294: 187-202.

Staudacher, E. and Schildberger, K. (1998). Gating of sensory responses of descending brain neurones during walking in crickets. *J. Exp. Biol.* 201: 559-572.

Staudacher, E. and Schildberger, K. (1999). A newly described neuropile in the deutocerebrum of the cricket: Antennal afferents and descending interneurons. *Zoology* 102: 212-226.

Staudacher, E. M., Gebhardt, M. and Dürr, V. (2005). Antennal movements and mechanoreception: Neurobiology of active tactile sensors. *Adv. Insect. Physiol.* 32: 49-205.

Stengl, M., Homberg, U. and G. Hildebrand, J. (1990). Acetylcholinesterase activity in antennal receptor neurons of the sphinx moth *Manduca sexta*. Cell Tiss. Res. 262: 245-252.

Straußfeld, N. J. (1976). Atlas of an Insect Brain. Springer, Berlin.

Strausfeld, N. J. and Hildebrand, J. G. (1999). Olfactory systems: common design, uncommon origins? Curr. Opin. Neurobiol. 9: 634-639.

Suzuki, H. (1975). Antennal movements induced by odor and central projection of the antennal neurones in the honey-bee. J. Insect Physiol. 21: 831-847.

Thomas, J. B., Bastiani, M. J., Bate, M. and Goodman, C. S. (1984). From grasshopper to *Drosophila*: A common plan for neuronal development. Nature (London) 310: 203-207.

Tissot, M., Gendre, N., Hawken, A., Stortkuhl, K. F. and Stocker, R. F. (1997). Larval chemosensory projections and invasion of the adult afferents in the antennal lobe of *Drosophila*. J. Neurobiol. 32: 281-297.

Tolbert, L. P. and Oland, L. A. (1990). Glial cells form boundaries for developing insect olfactory glomeruli. Exp. Neurobiol. 109: 19-28.

Trimmer, B. A. and Weeks, J. C. (1989). Effects of nicotinic and muscarinic agents on an identified motoneurone and its direct afferent inputs in larval *Manduca sexta*. J. Exp. Biol. 144: 303-337.

Tyrer, N. M. (1969). The time course of contraction and relaxation in embryonic locust muscle. Nature, Lond. 224: 815-817.

Tyrer, N. M. (1970). Quantitative estimation of the stage of embryonic development in the locust, *Schistocerca gregaria*. J. Embryol. Exp. Morph. 23: 705-718.

Tyrer, N. M. and Gregory, G. E. (1982). A guide to the neuroanatomy of locust suboesophageal and thoracic ganglia. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 297: 91-123.

Tyrer, N. M., Pozza, M. F., Humbel, U., Peters, B. H. and Bacon, J. P. (1988). The tritocerebral commissure „dwarf“ (TCD): a major GABA-immunoreactive descending interneuron in the locust. J. Comp. Physiol. 164: 141-150.

Tyrer, N. M., Shepherd, D. and Williams, D. W. (2000). Methods for imaging neurons together with neuropil features in *Drosophila*. J. Histochem. Cytochem. 48(11): 1575-1581.

- Vollmar, H. (1972). Die Einrollbewegung (Anatrepsis) des Keimstreifs im Ei von *Acheta domesticus* (Orthopteroidea, Gryllidea). Wilhelm Roux' Archiv 170: 135-151.
- Wardhaugh, K. G. (1978). A description of the embryonic stage of the Australian Plague Locust, *Chordoicetes terminifera* (Walk.). Acrida 7: 1-9.
- Weeks, J. C. and Jacobs, G. A. (1987). A reflex behavior mediated by monosynaptic connections between hair afferents and motoneurons in the larval tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Comp. Physiol. A 160: 315-329.
- Weigensberg, I., Carriere, Y. and Roff, D. A. (1998). Effects of male genetic contribution and paternal investment to egg and hatchling size in the cricket, *Gryllus firmus*. J. evol. Biol. 11: 135-146.
- Wheeler, W. M. (1893). A contribution to insects. Embryology. J. Morph. 8: 1-160.
- Whittington, P. M., Bate, M., Seifert, E., Ridge, K. and Goodman, C. S. (1982). Survival and differentiation of identified embryonic neurons in the absence of their target muscles. Science (NY) 215: 973-975.
- Williams, J. L. D. (1975). Anatomical studies of the insect central 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.
- Wohlers, D. W. and Huber, F. (1985). Topographical organization of the auditory pathway within the prothoracic ganglion of the cricket *Gryllus campestris* L. Cell Tissue Res. 239: 555-565.
- Wolpert, L. (1999). Entwicklungsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. Berlin.
- Yang, M. Y., Armstrong, J. D., Vilinsky, I., Strausfeld, N. J. and Kaiser, K. (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. Neuron 15: 45-54.
- Yildiz, F. (2002). Untersuchungen zu den Propriozeptoren der Antennenbasis von Grillen (*Gryllus bimaculatus* und *Gryllus assimilis*). Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie der Technischen Universität München.
- Yildiz, F. and Gebhardt, M. (2003). Complex innervation of the second antennal segment of crickets, in: Proceedings of the 29th Göttingen neurobiology conference 2003, (eds. Elsner N. and Zimmermann H.), abstract 238.

Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Hartenstein, V. (1996). Early neurogenesis in the *Drosophila* brain. *J. Comp. Neurol.* 370: 313-329.

Zacharias, D., Williams, J. L. D., Meier, T. and Reichert, H. (1993). Neurogenesis in the insect brain: cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in grasshopper embryo. *Development.* 118: 941-955.

9. DANKSAGUNG

Ich möchte mich zuallererst und ganz herzlich bei meinem Betreuer, Dr. Michael Gebhardt, bedanken, der die Idee für dieses Thema hatte und der auf professionelle, aber auch sehr persönliche und freundliche Art und Weise immer für beratende Gespräche und Diskussionen bereit stand. Seine engagierte Betreuung, seine beharrlichen Ermunterungen, seine konstruktive Kritik, seine Geduld und sein Wissen haben mir sehr geholfen und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Daneben möchte ich mich bei PD. Dr. Christine Köppl bedanken, die mich im gesamten Verlauf meiner Förderung durch das Graduiertenkolleg in diesem offiziell vertreten hat. Mein Dank gilt auch Prof. Geoffrey A. Manley, der mich finanziell unterstützte, der mir die notwendigen Räumlichkeiten zur Verfügung stellte und der sich bereit erklärt hat, mir die Prüfung abzunehmen. Prof. Dr. Peter Bräunig hat sich bereit erklärt, ein Gutachten meiner Dissertation anzufertigen.

Hervorheben möchte ich Birgit Seibel, die mir Ihre Freundschaft schenkte und die bei Schwierigkeiten sowie schlechter Laune immer aufmunternde Worte für mich fand und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Zoologie und des Fachgebiets Spezielle Zoologie, Dr. Horst Oeckinghaus, Prof. Dr. Franz Peter Fischer, Prof. Dr. Hans Leppelsack, Dr. Michael Henn, Dipl. Ing. Christian Wagner, Dr. Erich Staudacher, Sabine Schlecht, Norbert Dombrowsky, Dipl. Ing. Daniela Fengler, Gaby Schwabedissen, Yvonne Schwarz, Rainer Wittur und viele andere unterstützten mich und sind ein Stück Weg mit mir gegangen. Viele Seminare und Gespräche haben mir sehr geholfen auch hinsichtlich der deutschen Sprache und des Verwaltungsdschungels. Gabi Traute war immer für mich da und hat sich fürsorglich um mich gekümmert.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. George Boyan für seine Anregungen, Diskussionen und die Benutzung des Konfokalen Mikroskopes. Dr. James Chalcraft ermöglichte mir die Benutzung des Konfokallaserscanning Mikroskopes.

Dr. Michael und Diana Obermeier sowie Claudia und Petra Seidl halfen mir bei der sprachlichen Überarbeitung der Texte.

Ein Herzliches Dankeschön geht an meinen Schwiegereltern Jutta und Franz Seidl und meinen Mann Franz Seidl.

Zum Schluss möchte ich mich ausdrücklich bei meinen Eltern und allen meinen Geschwistern bedanken. Meine Schwester Necla und Ihrem Mann Ilhan Koc mit Ihren Kindern Semiha und Hakan waren immer für mich da.

Das uneingeschränkte Vertrauen meiner Eltern Adile und Ömer Yildiz in mich und mein Tun hat mir den notwendigen Rückhalt und Freiraum verschafft, diesen beruflichen Werdegang zu nehmen. Ihre finanzielle Unterstützung und Ihr moralischer Beistand haben mir sehr geholfen.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium vom DFG Graduiertenkolleg „Sensorische Interaktion in biologischen und technischen Systemen, DFG-GRK 267 und ein Promotionsstipendium HWP II: Programm „Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ finanziert.

LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 16. September 1972
Geburtsort: Mühlacker-Deutschland
Geburtsname: Yildiz

Schul- und Hochschulbildung

- 1980 bis 1990** Schulbesuch in der Türkei
- 1990** Abitur am mathematisch-naturwissenschaftlichen Sivas Gazi Gymnasium in Sivas, Türkei.
- 1990 bis 1994** Studium der Biologie an der Cumhuriyet-Universität in Sivas, Türkei. Fakultät für Naturwissenschaften und Literatur, Abteilung: Biologie, Erwerbener akademischer Titel: Diplom-Biologin. Abschluss als Dipl.-Biol. Univ.
- 1994** Lehramt-Zeugnis für das Gymnasium, Cumhuriyet-Universität in Sivas, Türkei. Fakultät für Naturwissenschaften und Literatur, Lehramt Abteilung: Der akademische Bereich: Biologie.
- 1995 bis 1996** Besuch des Deutschkurses für Ausländer bei der LMU in München
- 1996** Die Prüfung zum Nachweis deutscher Sprachkenntnisse (PNdS) bestanden.
- 1996 bis 2002** Studium der Biologie an der Technischen Universität München Fächer: Zoologie, Biochemie und Zellbiologie, Tierökologie und Verhalten. Abschluss als Dipl.-Biol. Univ. am 18. April 2002
- 2001 bis 2002** Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie, TUM
- Seit 2002** Arbeiten zur Promotion am Lehrstuhl für Zoologie, TUM