

Sensorische Eingänge und synaptische Verbindungen im Zentralnervensystem von Insekten

Experimentelle Degeneration in der antennalen Sinnesbahn im Oberschlundganglion von Fliegen und Schaben*

JÜRGEN BOECKH, CLARA SANDRI und KONRAD AKERT

Institut für Hirnforschung der Universität Zürich
und Zoologisches Institut der Universität Frankfurt (a. Main)

Eingegangen am 28. Oktober 1969

Sensory Inputs and Synaptic Connections in the Insect CNS

Experimental Degeneration in the Antennal Afferent Pathway in the Supraoesophageal Ganglia of Flies and Cockroaches

Summary. Pathways of axons from antennal receptor organs into the brain have been traced by means of anterograde experimental degeneration in *Calliphora vicina* and *Periplaneta americana*. After removal of one antennal flagellum (with the two proximal segments left intact) degenerating nervous processes were found in the glomeruli of the ipsilateral deutocerebrum. In *Calliphora* a great number of these axons run via a pathway dorsal to the oesophagus into the glomeruli of the contralateral deutocerebrum. A big branch of the antennal nerve of *Calliphora* runs toward a posterior region of the brain bypassing the glomerular region. After removal of the whole antenna including the proximal segments degenerations can be seen also in this branch on the ipsilateral side. The synapses in the glomerular region of the deutocerebrum resemble other central synapses in insects described so far (electron dense cleft, often ribbon-like dense structures within the presynaptic element near or at the synaptic membrane, clear vesicles *etc.*).

Key-Words: Insect CNS — Deutocerebrum — Experimental degeneration — Ultrastructure.

Zusammenfassung. Bei *Calliphora vicina* und *Periplaneta americana* wurde mit Hilfe experimentell erzeugter anterograder Degeneration der Verlauf von Axonen antennaler Rezeptorzellen im Oberschlundganglion verfolgt. Nach Abtrennen einer Antennengeißel (die beiden proximalen Segmente bleiben intakt) findet man degenerierte Nervenfortsätze in den Glomeruli des ipsilateralen Deutocerebrum. Bei *Calliphora* laufen viele dieser Axone über eine Bahn dorsal des Oesophagus in die Glomeruli des contralateralen Deutocerebrum. Ein großer Ast des Antennennerven von *Calliphora* zieht vorbei an der Region der Glomeruli in posteriore Regionen des Oberschlundganglions. Nach Abtrennen der ganzen Antenne einschließlich der proximalen Segmente findet sich in diesem Trakt eine große Zahl degenerierter Axone. Die Synapsen in der Region der Glomeruli ähneln anderen Synapsen, wie sie im Zentralnervensystem von Insekten bisher beschrieben wurden.

Einleitung

Die Methoden der experimentellen Degeneration ermöglichten in den letzten Jahren in zunehmendem Maße die Untersuchung verwickelter Verbindungswege im Nervensystem (Nauta und Gyax, 1954; Fink und Heimer, 1967). Dies gilt besonders seit dem Einsatz des Elektronenmikroskops, mit dem auch individuelle

* Mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds für die wissenschaftliche Forschung Nr. 3807.

synaptische Kontakte aufgefunden und untersucht werden können (Gray und Hamlyn, 1962; Colonnier, 1954; Walberg, 1964; Zusammenfassungen bei Alksne *et al.*, 1966; Gray und Guillery, 1966). Die Erfolge dieser Methode lassen hoffen, daß wir auch bei Insekten zu genaueren Kenntnissen nervöser Verbindungen kommen werden. Im Insektenhirn sind nur wenige Bahnen und Kerngebiete in groben Umrissen erkennbar. Die oft sehr dünnen Zellfortsätze enden im dichten Filz des Neuropils, in dem auch die synaptischen Verbindungen lokalisiert sind. An diesen feinen und verwickelten Strukturen versagen meist die herkömmlichen Imprägnations- und Färbemethoden. So gelang es nur wenigen hervorragenden Spezialisten wie Cajal und seinen Schülern (Cajal und Sánchez, 1915) oder Zawarzin (1924) an besonders geeigneten Objekten, etwa den hochorganisierten optischen Ganglien von Fliegen und Schmetterlingen oder dem leicht färbbaren Bauchmark von Insektenlarven, feinere Verbindungen aufzudecken. Erst neuerdings wurde, ausgehend von physiologischen Fragestellungen, die Untersuchung des Neuropils wieder vorangetrieben (s. z. B. Braitenberg, 1967; Strausfeld, 1969); es existieren elektronenmikroskopische Beiträge zur Feinstruktur des Neuropils (Hess, 1959 a; Smith, 1967; Trujillo-Cenóz, 1965, 1969; Steiger, 1967). Ferner gelang Trujillo-Cenóz (1965, 1969) in Dünnschnittserien die Klärung wichtiger Details in der Verschaltung von Seh- und Ganglienzellen des Fliegenauges.

Einige Versuche zur Anwendung der experimentellen Degeneration erscheinen auch bei Insekten vielversprechend (Hess, 1958 b; Lund und Collett, 1968; Farley und Milburn, 1969). Die kleinen Abmessungen der Insektenganglien ermöglichen sogar eine besonders effektive Kombination licht- und elektronenmikroskopischer Methoden (Lamparter *et al.*, 1967). In einer Serie von Semi-Dünnschnitten werden die von der Degeneration betroffenen Regionen lokalisiert; auf zwischengeschalteten Dünnschnitten des ganzen Ganglions kann dann im Elektronenmikroskop die Feinstruktur und das Bild der Degeneration in der betreffenden Region genauer untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit berichtet von ersten Ansätzen, mit Hilfe der experimentellen Degeneration einen bedeutenden Abschnitt der Gehirne von Fliegen und Schaben zu untersuchen, über den bisher wegen besonderer histologischer Schwierigkeiten nur wenig exakte Angaben existieren: das *Deutocerebrum*, die zentrale Eingangsstation wichtiger Sinnesorgane, u. a. der vielen tausend Geruchsrezeptoren auf den Antennen. In den Arbeiten Bretschneiders (1914) und bei Hanström (1928) finden sich Angaben über das Deutocerebrum von *Periplaneta americana*, Power untersuchte (1946) ausführlich die Antennenzentren von *Drosophila melanogaster*, Satija (1958) das Deutocerebrum von *Calliphora erythrocephala* (s. auch die entsprechenden Kapitel in Bullock und Horridge, 1965, und Goll's Beschreibung des Gehirns von *Formica*, 1966).

Das Ziel unserer Untersuchung war, die z. T. sehr feinen (bis weniger als 0,1 μm dicken) Antennenfasern im Oberschlundganglion aufzuspüren und damit die Projektionsfelder dieser wichtigen Sinnesorgane zu finden¹. Die Antennenzentren boten sich außerdem als günstiges Objekt für die experimentelle Degeneration an, da bei einer Ausschaltung der vielen Rezeptorzellen ein massiver, gut erkennbarer

¹ Die Rezeptorzellen auf den Antennen sind, wie andere Sinneszellen von Insekten, (primäre) Sinnesnervenzellen, d. h. ein und dieselbe Zelle stellt sowohl sensible Fortsätze als auch den zentripetalen Axon.

Degenerationseffekt im Gehirn zu erwarten war. Mit Fliegen und Schaben wurden Vertreter aus zwei recht verschiedenartigen Insektenordnungen gewählt, denn es erwies sich als sinnvoll, schon zu Anfang Vergleiche über die Organisationsprinzipien bei mehreren Arten anzustellen. Zudem ergab sich die Möglichkeit, bestimmte Fragestellungen am jeweils günstigen Objekt zu studieren.

Material und Methodik

1. *Lichtmikroskopie.* Die Gehirne von *Periplaneta americana* und *Calliphora vicina* (= *erythrocephala*) wurden in alkoholischer Bouinscher Lösung fixiert, über Alkohol und Benzol in Paraplast eingebettet und in Serien von (10–20 μm dicken) Schnitten zerlegt. Die Imprägnation mit Silberalbumin und Goldchlorid (nach Bodian, modifiziert von Ziesmer, 1951) oder die Färbung mit Azan nach Heidenhain erfolgten am entwässerten Schnitt.

2. *Degeneration.* Den frisch geschlüpften bzw. gehäuteten Imagines wurden in CO_2 -Narkose Teile einer Antennengeißel oder eine ganze Antenne abgetrennt. Die Tiere wurden bei Zimmertemperatur in Plastikgefäßen gehalten und mit Futter sowie Wasser versorgt. Sie zeigten keine auffälligen Störungen beim Fressen und Umherlaufen, die Fliegen konnten jedoch nicht mehr richtig geradeaus fliegen (Ausfall des Fluggeschwindigkeitsmessers auf der operierten Seite). Die Lebenszeit schien durch die Operation nicht verkürzt zu sein.

3. *Untersuchung der Degeneration.* Die Gehirne wurden nach Sabatini, Bensch und Barnett (vgl. Steiger, 1967) in 6,25% iger Glutar(di)aldehydlösung in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,4) für 2 Std bei Zimmertemperatur fixiert, bei 4° C in Phosphatpuffer (0,2 M + 6,8% Saccharose) mindestens 6 Std ausgewaschen, darauf in 2% iger Lösung von OsO_4 in Veronalacetatpuffer (pH 7,4, nach Palade) + 6,8% Saccharose bei 4° C etwa 2 Std nachfixiert und imprägniert. Anschließend wurden sie in der Alkoholreihe entwässert und über Propylenoxid in Epon 812 (Epikote) eingebettet. Die grobe Lokalisation der Regionen mit degenerierten Neuronen erfolgte an Serienschnitten durch das ganze Gehirn im Phasenkontrastbild (Schnittdicke etwa 1 μm). In der kritischen Region wurden zwischen diese Semi-Dünnschnitte Ultradünnschnitte eingeschoben (Interferenzfarbe silbergrau) und auf dem Objektträger 2 Std mit gesättigter wäßriger Lösung von Uranylacetat (Watson) und anschließend $\frac{1}{2}$ Std mit Bleihydroxid (Karnovsky, Methode B) gefärbt (s. Steiger, 1967). Für Übersichtsbilder wurden die Schnitte auf Formvar-beschichtete Lochobjektträger aufgezogen, für hoch auflösende Aufnahmen auf folienlose Netzobjektträger. Die Photographien wurden bei 1100–40000facher Primärvergrößerung im Siemens Elmiskop I aufgenommen.

Die Färbung mit Wismutiodid erfolgte nach dem Rezept von Pfenninger *et al.* (1969).

Ergebnisse

I. Bau des Deutocerebrum

1. *Periplaneta americana* (Abb. 1). Die beiden Antennenhügel liegen beiderseits des Oesophagus ventral des Protocerebrum (*P*). Äußerlich sind sie gut als nach frontal und leicht lateral vorstehende Halbkugeln (Durchmesser ca. $\frac{1}{2}$ mm) erkennbar. Der Antennennerv (*N*) erreicht den Hügel von frontal-lateral, den Hauptanteil der Fasern stellen die Axone der Sinneszellen von ca. 45000 Sinneshaaren auf der Antennen. Ein Großteil dieser Sinneshaare sind Chemorezeptoren; je nach Typ finden sich 2 bis 3, manchmal mehr Sinneszellen pro Haar. Der Verlauf der dünnen Antennenfasern kann im Einzelnen im Lichtmikroskop nicht verfolgt werden.

Die auffälligsten Strukturen im Deutocerebrum sind die Glomeruli (*G*), kugelige Gebilde von 30–100 μm Durchmesser, die zum Rand des Antennenhügels hin dichter, im Inneren mehr lose verstreut zwischen Faserzügen liegen. Im Elektronenmikroskop stellen sich diese Strukturen als Knäuel dicht zusammenliegender, meist feiner Fortsätze heraus (vgl. Abb. 6).

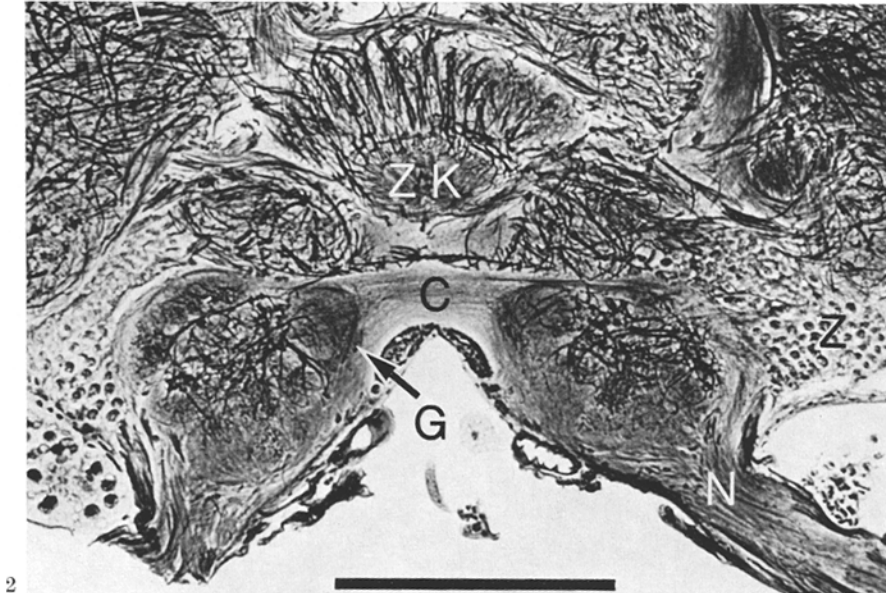
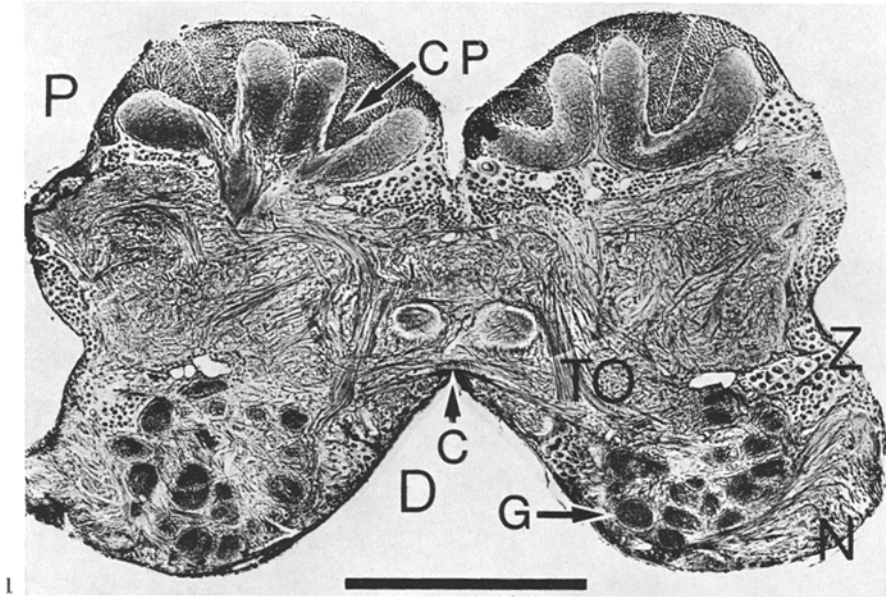


Abb. 1. *Periplaneta americana*, Frontalschnitt durch das Oberschlundganglion. *C* Bahn zwischen den beiden Seiten des Deutocerebrum, *CP* Corpora pedunculata, *D* Deutocerebrum, *G* Glomerulus, *N* Antennennerv, *TO* Tr. olfactorio-globularis, *Z* Zellgruppe (s. Text). Silber-impregnation nach Bodian (Mod. nach Ziesmer, 1951), Maßstab 500 μm . Vergr. 1:64

Abb. 2. *Calliphora vicina*, Horizontalschnitt durch die mittlere Hirnregion in Höhe des Zentralkörpers (*ZK*). Bezeichnungen und Färbung wie in Abb. 1, Maßstab 200 μm . Vergr. 1:185

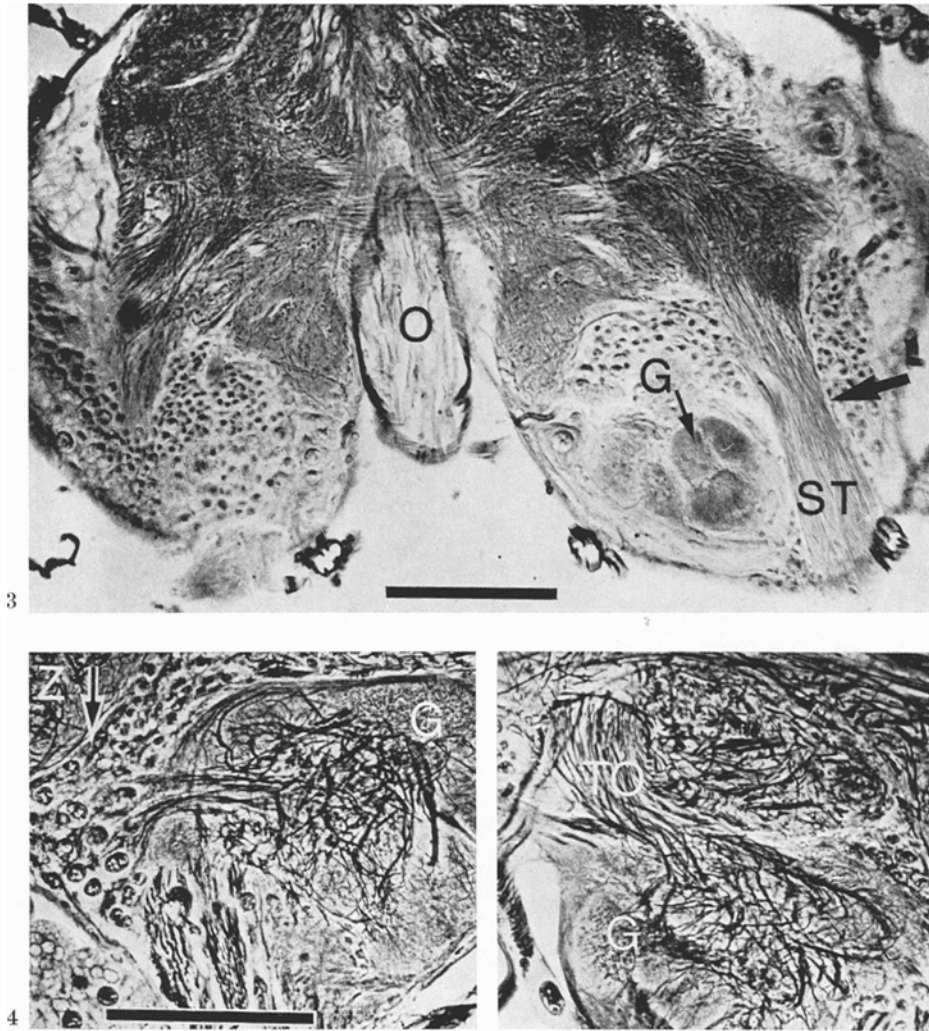


Abb. 3. *Calliphora vicina*. Horizontalschnitt durch das Deutocerebrum, leicht in die Frontalebene gekippt. *G* Glomerulus, *O* Oesophagus, *ST* Seitentrakt des Antennennervs. Der Pfeil markiert die Schnittebene in der Abb. 11. Färbung wie in Abb. 2, Maßstab 175 μm . Vergr. 1:125

Abb. 4. Deutocerebrum von *Calliphora vicina*. Linkes Bild: lateral gelegene Zellgruppe (*Z*) mit Ausläufern zu den Glomeruli (*G*). Rechtes Bild: Beginn des Tr. olfactorio-globularis (*TO*) zum Protocerebrum (vgl. Abb. 1). Färbung wie in Abb. 2, Maßstab 100 μm . Vergr. 1:280

Im dorsal-lateralen Winkel zwischen Protocerebrum und Deutocerebrum, dicht an den großen Tracheen zwischen diesen Hirnteilen, liegt eine Gruppe von Zellen (*Z*), deren Ausläufer z.T. in die Glomeruliregion ziehen. Einige Zellen in diesem Verband zeigen nach Abtrennen des Antennennervs dicht am Gehirn deutliche Anhäufung von RNS-haltigem Material um die Kernregion (Nachweis

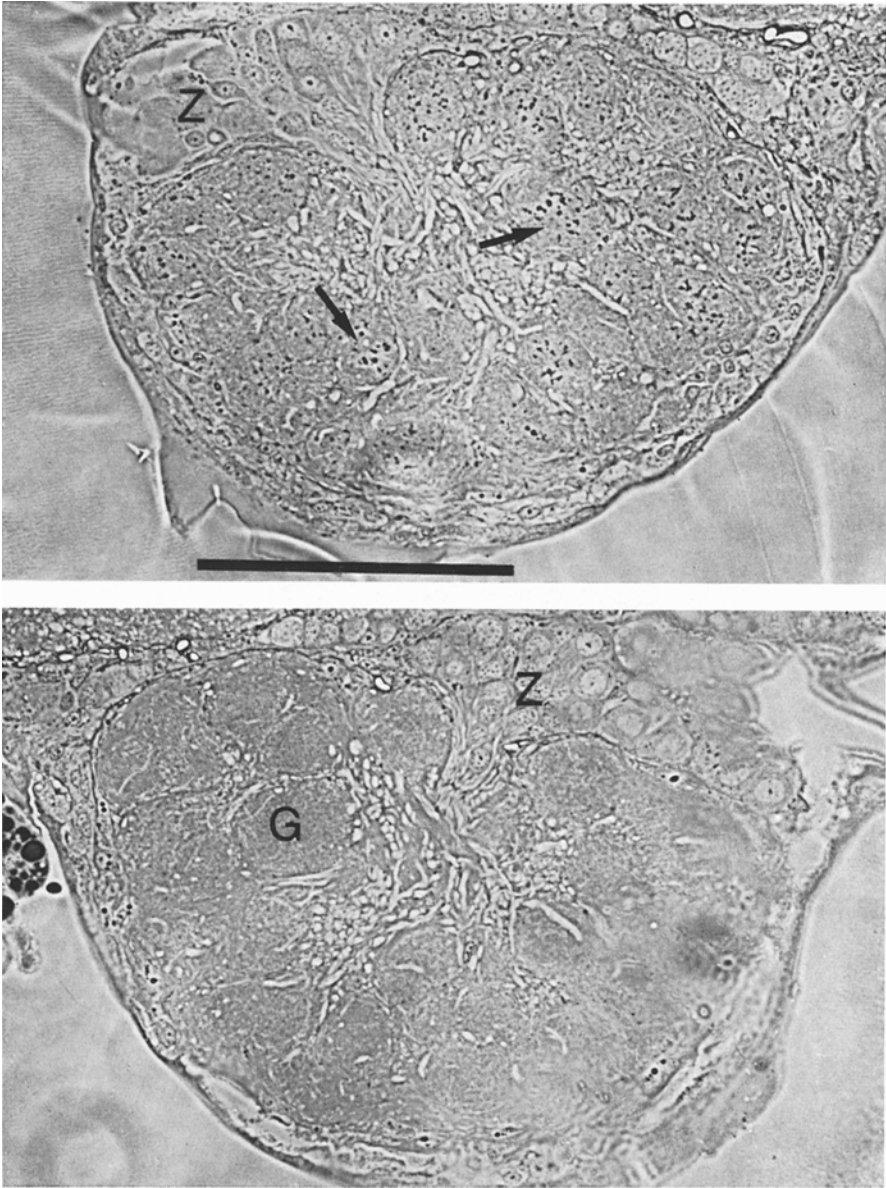


Abb. 5. *Periplaneta americana*. Antennenhügel des Deutocerebrum, fixiert 3 Tage nach dem Abtrennen der rechten Antennengeißel. Oben: rechter Antennenhügel; man beachte die dunklen Punkte in den Glomeruli (Konglomerate degenerierten Materials). Unten: linker Antennenhügel ohne Degenerationserscheinungen. *G* Glomerulus. Osmiumimprägnation, Epon-schnitt (ca. 1 μm dick). Aufnahme bei Phasenkontrastbeleuchtung. Maßstab 250 μm . Vergr. 1:170

mit der Pyronin-Malachitgrün-Technik von Baker und Williams, nach Cohen und Jacklet, 1967). Dies läßt vermuten, daß es sich um efferente Neurone (vielleicht zu den Antennenmuskeln) handelt.

Zwischen der Pilzkörperregion (*PK*) des Protocerebrum und der Region der Glomeruli im Antennenhügel verläuft ein mächtiger Strang mit dickeren Fasern (Abb. 1, *TO* = Tr. olfactorio-globularis), zwischen den beiden Hälften des Deutocerebrum ein dünner Trakt dorsal des Oesophagus (Abb. 1, *C* = Commissur).

2. *Calliphora vicina* (Abb. 2—4). Hier liegen die Antennenhügel (Durchmesser ca. $\frac{1}{3}$ mm) etwas tiefer in das Gehirn eingesenkt zu beiden Seiten des Schlunddurchtritts (Abb. 3, *O*). Das ganze Gehirn ist durch die starke Entwicklung der Augenganglien mehr in die Breite gezogen, der zentrale Teil nimmt, verglichen mit der Schabe, einen relativ kleinen Raum ein. Die Glomeruli (*G*, Durchmesser zwischen 30 und 60 μ m) liegen dicht aneinander wie in einer Kugelschale um das Zentrum des Deutocerebrum; dort hinein ziehen Fasern aus einer lateral liegenden Zellgruppe (Abb. 2 und 4, *Z*). Bei Fliegen lassen sich dickere Fasern mit vielen Verzweigungen, wahrscheinlich sekundäre Fasern, in den Glomeruli erkennen (Abb. 2 und 4). Die Verbindung zum Protocerebrum (Abb. 4, *TO*) entspringt in der Region der Glomeruli. Besonders auffällig ist bei Fliegen eine mächtige Bahn zwischen den beiden Hirnhälften dorsal des Oesophagus (Abb. 2, *C*), deren ventraler Abschnitt viele sehr dünne (ca. 0,1 μ m im Durchmesser) Fasern enthält. Wie sich in Degenerationsversuchen zeigt, handelt es sich dabei z.T. um primäre Sinnesfasern aus den Antennen (vgl. Abb. 9). Der Antennennerv (*N*) zieht von frontal zum Deutocerebrum. Er enthält motorische Axone zu den Antennenmuskeln und Fasern aus verschiedenen Sinnesorganen: 1. von einigen tausend Sinneshaaren auf dem Funiculus (dem Hauptsegment der Antenne); ein Großteil davon sind Chemorezeptoren, 2. von mehreren hundert Sinneszellen des Johnstonschen Sinnesorgans in einem besonderen Segment an der Antennenbasis, dem Pedicellus (diese Rezeptoren spielen als Anzeiger der Fluggeschwindigkeit eine wichtige Rolle), 3. von anderen Mechanorezeptoren an Pedicellus und Scapus (einem anderen Segment an der Antennenbasis) sowie in den Gelenken zwischen den Antennensegmenten und im Gelenk zwischen Kopf und Antenne.

Lateral an der Region der Glomeruli vorbei läuft nach posterior ein starker Ast des Antennennerven mit z.T. dicken Fasern (Abb. 3, *ST*).

II. Erscheinungsbild der Degeneration

Bereits 6 Std nach der Operation findet man in vielen Profilen des Deutocerebrum den charakteristischen elektronendichten Inhalt degenerierender Nervenfasern (Abb. 7). Nach etwa 24 Std ist bei *Calliphora* bereits ein Maximum der Ausbreitung der Degeneration erreicht (Abb. 8). Viele Profile sind mit dichtem Material gefüllt, der Gewebsverband ist jedoch weitgehend erhalten. 3 Tage nach der Operation treten zahlreiche typische kugelige Konglomerate aus dichtem Material auf, in denen noch schattenhaft Vesikel, Membranstücke und Reste von Mitochondrien erkennbar sind (Abb. 7). Der Gewebsverband zeigt jetzt größere Lücken, z.T. Löcher; Gliamaterial ist häufiger zu beobachten als in gesundem Gewebe, zuweilen findet sich eine größere Menge der abgekugelten Körper in dicht erscheinender Glia eingebettet (Abb. 10).

Insgesamt gleicht das Bild dem der inzwischen allgemein bekannten und etablierten anterograden (Wallerschen) Degeneration im Nervensystem der Wirbeltiere (vgl. die in der Einleitung zitierte Literatur). Hess (1958b), Farley und

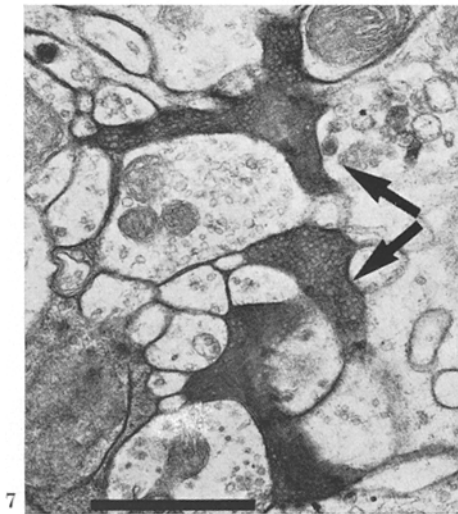
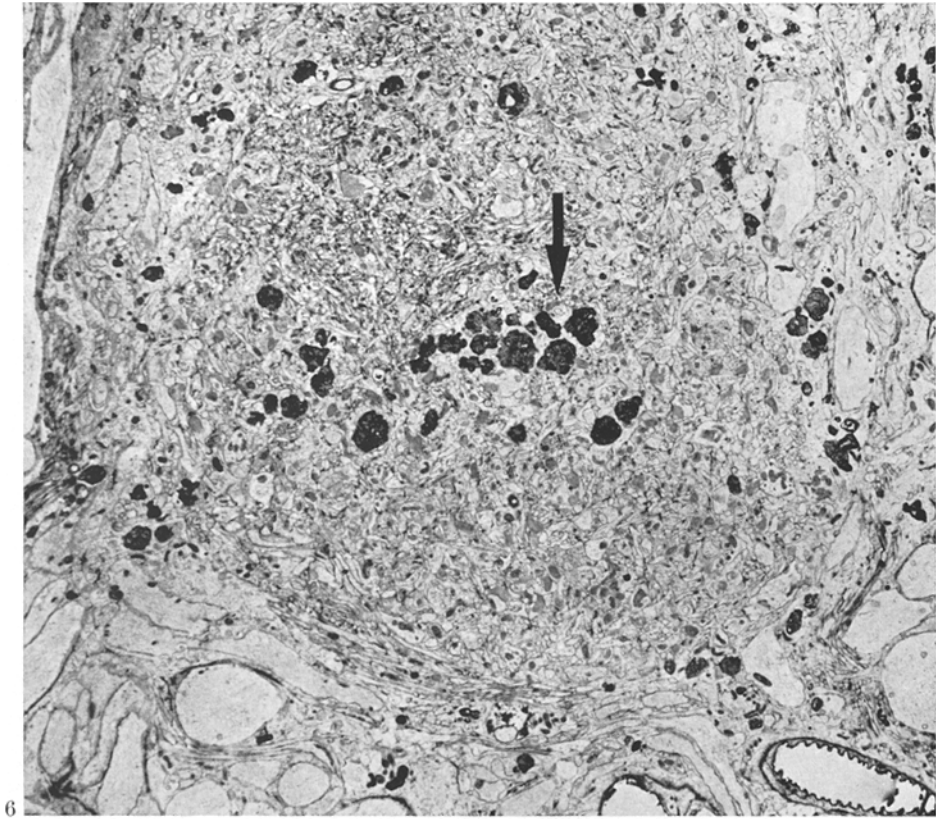


Abb. 6 u. 7

Milburn (1969) und vor allem Lamparter u. Mitarb. (1967) beschreiben ausführlich ganz ähnliche Erscheinungen im Bauchmark einiger Insekten, Hamori und Horridge (1966) in den Augenganglien des Hummers. Deshalb kann hier auf die Darstellung weiterer Details verzichtet werden.

Das Phasenkontrastbild der Degeneration ist 24 Std nach der Operation noch sehr unklar, nach 3 Tagen sind die betroffenen Gebiete deutlich an den verklumpten Konglomeratkugeln zu erkennen (Abb. 5a und 6). Vorläufig konnten degenerierte präsynaptische Endigungen auch im Elektronenmikroskop nur sehr selten ausgemacht werden. Entweder erschien die synaptische Region prä- und postsynaptisch intakt oder die Dichte des degenerierenden Materials ließ keine Auflösung charakteristischer synaptischer Strukturen mehr zu (vgl. Abschnitt IV). Die häufig in degenerierten Fortsätzen auftretenden Vesikel (vgl. Abb. 7) können lediglich als Indiz dafür gelten, daß in der Nähe eine synaptische Verbindung liegt.

III. Verlauf der Antennenfasern im Oberschlundganglion

1. *Periplaneta*. Nach dem Abtrennen einer Antenne bis auf Scapus und Pedicellus treten im Antennennerven, in den Glomeruli des Deutocerebrum und in deren nächster Umgebung Degenerationen auf (Abb. 5 und 6). Sie sind ganz auf den ipsilateralen Antennenhügel beschränkt; in anderen Hirnteilen wurden keine auffälligen Ansammlungen von degenerierten Axonen gefunden (vgl. Diskussion). Es muß daher angenommen werden, daß zumindest die Mehrzahl der Antennenfasern im Bereich der Glomeruli endet.

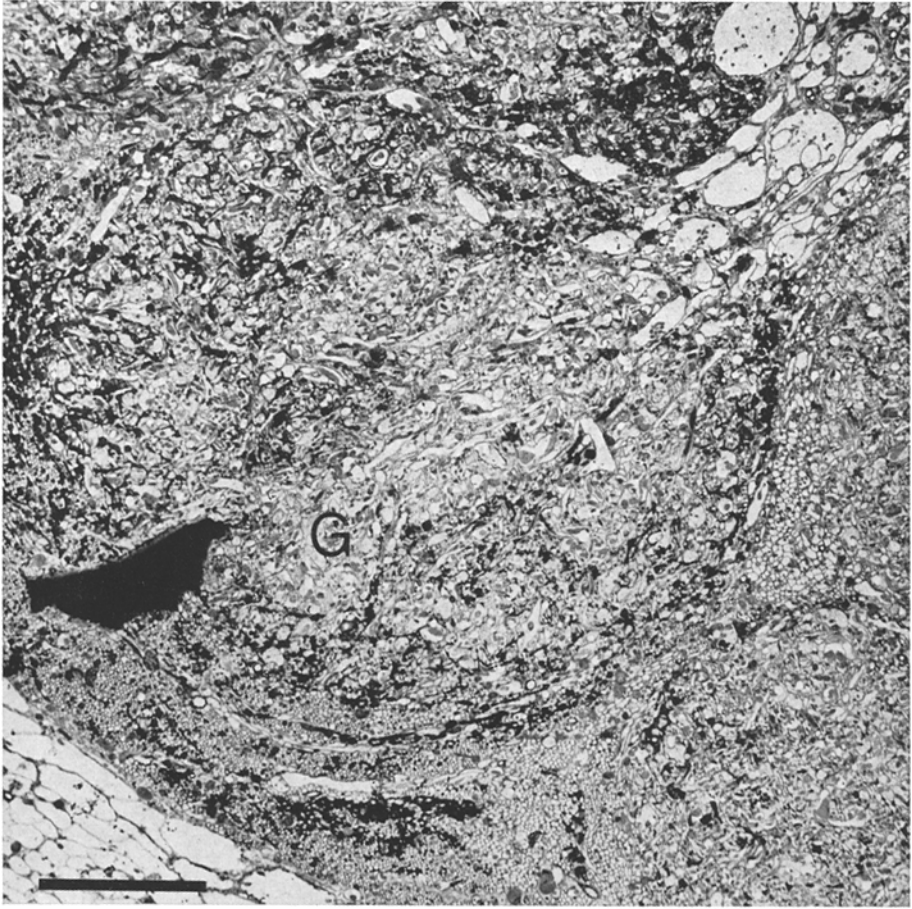
2. *Calliphora*. a) Nach Abtrennen einer Antenne bis auf die beiden proximalen Segmente (Scapus und Pedicellus) finden sich Degenerationen 1. im Antennennerv, 2. ipsi- und contralateral in den Glomeruli des Deutocerebrum sowie deren nächster Umgebung (Abb. 8 und 11) und 3. in der Commissur zwischen den beiden Antennenhügeln (Abb. 2, C, und Abb. 9). Schließt man massive transneurale Degeneration aus, so bedeutet dieser Befund, daß Sinnesfasern aus dem Antennennerv an den ipsilateralen Glomeruli vorbei durch die Commissur in das kontralaterale Deutocerebrum ziehen.

Wie Übersichtsbilder bei schwächerer Vergrößerung zeigen, liegen die degenerierten Antennenfasern randständig in den Glomeruli; zum Zentrum des Glomerulus hin finden sich zunehmend mehr (nicht degenerierte) dickere Fasern (Abb. 8). Der Glomerulus gleicht einem Pilz, in dessen seitlich weit herunterreichenden Hut die Sinnesfasern enden und dessen Fuß von dicken Fasern gebildet wird.

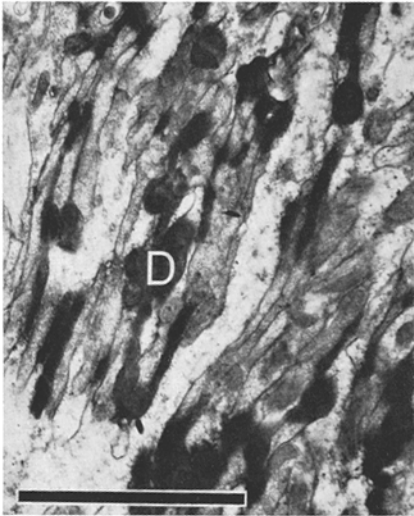
Auch 8 Tage nach der Operation finden sich in den Glomeruli noch intakte synaptische Verbindungen mit nicht degenerierten prä- und postsynaptischen

Abb. 6. *Periplaneta americana*. Glomerulus im rechten Deutocerebrum, fixiert 3 Tage nach Abtrennen der rechten Antennengeißel. Dunkle Konglomerate (Pfeile) als Zeichen der Degeneration. Die Umrisse des Glomerulus sind gut durch die Grenzen des dichten Neuropils gegen die dickeren Fasern abgehoben. Vergr. 1:2200

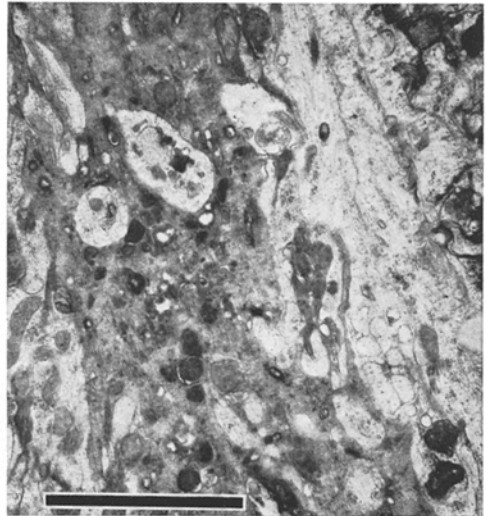
Abb. 7. *Periplaneta americana*, Details aus der Region der Glomeruli des rechten Deutocerebrum. Linkes Bild: 6 Std nach Abtrennen der rechten Antennengeißel fixiert, Einzelprofile im Gewebsverband mit elektronendichtem Material (Pfeile). Rechts: 3 Tage nach der gleichen Operation. D Material degenerierter Fasern. Maßstab 1 µm. Vergr. 1:22000



8



9



10

Abb. 8—10

Elementen. Vielleicht handelt es sich um Enden efferenter Fasern an sekundären Neuronen (vgl. Diskussion).

b) Nach Abtrennen der ganzen Antenne samt Scapus und Pedicellus treten Degenerationen auch in dem bisher nicht betroffenen großen Seitentrakt auf (Abb. 3, *ST*, und Abb. 11) und zwar vorwiegend in den dünneren Axonen. Es ist schwierig zu erkennen, ob auch in den Glomeruli jetzt mehr degenerierende Fasern vorliegen, denn ein Zuwachs um einige hundert läßt sich bei den insgesamt mehreren tausend nicht feststellen. Sicher ziehen also Axone der Antennenbasis am Antennenhügel vorbei, evtl. in Gebiete außerhalb des Deutocerebrum; ob es sich um die Axone des Johnstonschen Organs oder um andere Mechano-rezeptoren in den Gelenken oder um beide handelt, muß offen bleiben.

IV. Synapsen im Bereich der Glomeruli (Abb. 12—18)

Die synaptischen Kontakte im Bereich der Glomeruli im Deutocerebrum von *Calliphora* und *Periplaneta* zeigen nach Fixierung in Glutaraldehyd-Osmium und Färbung mit Bleihydroxid und Uranylacetat die charakteristischen Merkmale zentraler Synapsen von Insekten (vg. Hess, 1959; Smith, 1967; Steiger, 1967; Trujillo-Cenóz, 1965, 1969; Lamparter et al., 1969): Der Interzellularraum ist zwischen prä- und postsynaptischen Elementen auf 150—200 Å erweitert und mit elektronendichtem Material ausgefüllt. Prä- und postsynaptisch finden sich dichte Strukturen in Nähe und an der Membran (Abb. 12—16). Meist zeigt sich auch deutliche Polarisierung durch Ansammlungen „klarer“ Vesikel (Durchmesser zwischen 300 und 600 Å) auf der einen Seite (Abb. 12, 13, „p“ in Abb. 17). Ein Großteil dieser Vesikel färbt sich deutlich mit Zinkiodosmium nach der Methode von Akert und Sandri (1968), manche lassen sich nur wenig oder gar nicht imprägnieren. Da neuerdings Zweifel an einer Spezifität der Zinkiodosmium-Färbung für Acetylcholin geäußert wurden (vgl. Akert und Sandri, 1968; Lamparter et al., 1969), kann diese Imprägnation vorerst nur einer besseren Darstellung der Vesikel und dem leichteren Auffinden von synaptischen Verbindungen dienen.

Ist ein präsynaptisches Element mit mehreren postsynaptischen verschaltet (vgl. Abb. 12 und 13), finden sich im präsynaptischen Profil meist elektronendichte Balkenstrukturen in der Nähe oder im Kontakt mit der präsynaptischen Membran (*B* in den Abb. 12—16). Als häufigste Form dieser Gebilde im Deutocerebrum von *Calliphora* erscheint im Dünnschnitt ein dicker „Fuß“ mit langen,

Abb. 8. *Calliphora vicina*. Glomerulus im Deutocerebrum, 24 Std nach Abtrennen eines Antennenfuniculus (Scapus und Pedicellus intakt) fixiert. Die Umrisse des Glomerulus (*G*) sind deutlich an den dunklen (degenerierten) Profilen erkennbar. Man beachte die geringe Zahl dunkler Profile in der Mitte sowie die dickeren Fortsätze am Stiel des Glomerulus (rechts oben). Das Neuropil erscheint feiner als das der Schabe (vgl. Abb. 6). Maßstab 10 µm.

Vergr. 1:2200

Abb. 9. *Calliphora vicina*. Längsschnitt durch den Verbindungstrakt (*C* in Abb. 2) zwischen den beiden Antennenhügeln, fixiert 24 Std nach dem Abtrennen eines Antennenfuniculus. Die dunklen Profile sind degenerierende Axone (*D*). Maßstab 3,5 µm. Vergr. 1:8500

Abb. 10. *Calliphora vicina*, Glomeruliregion im Deutocerebrum, 3 Tage nach dem Abtrennen einer Antenne fixiert. Dunkle Glia mit Konglomeratkugeln. Maßstab 3 µm. Vergr. 1:8800

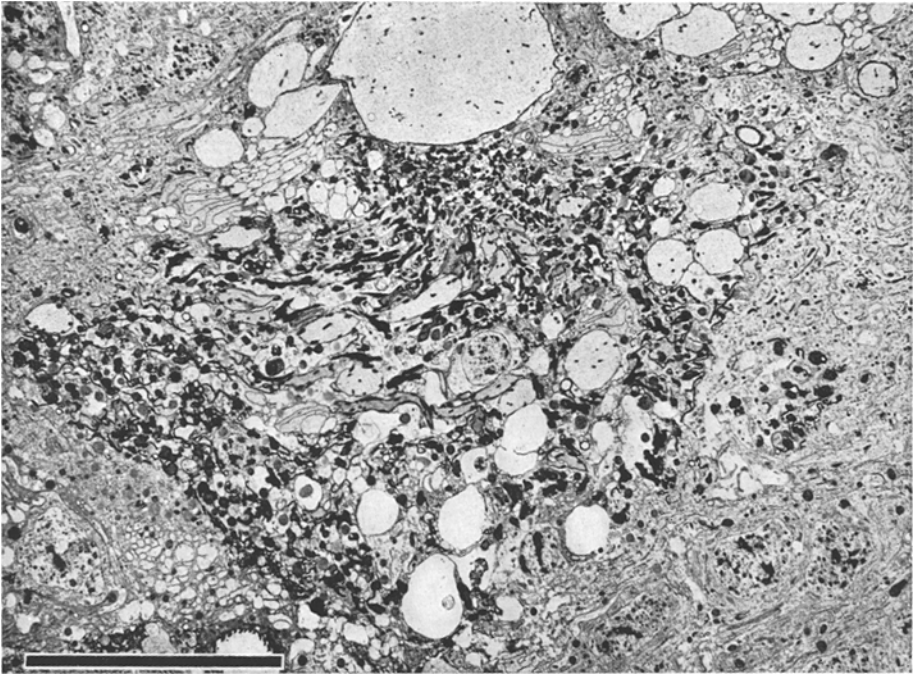


Abb. 11. *Calliphora vicina*. Querschnitt durch den Seitentrakt (ST in Abb. 3, Schnittebene durch den Pfeil markiert), 24 Std nach dem Abtrennen der ganzen ipsilateralen Antenne (incl. Scapus und Pedicellus). Die kleineren Profile zeigen Degeneration. Maßstab 20 μm . Vergr. 1:17000

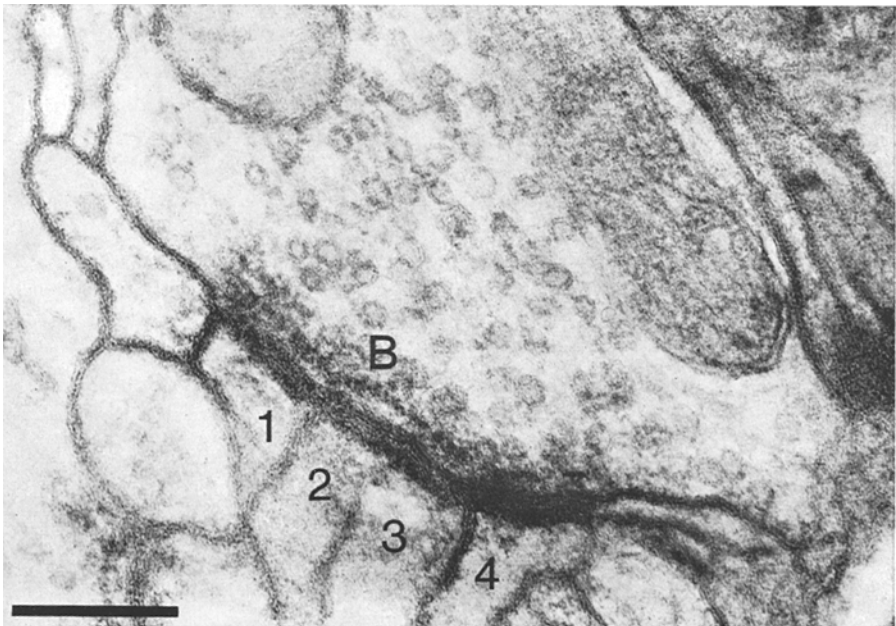
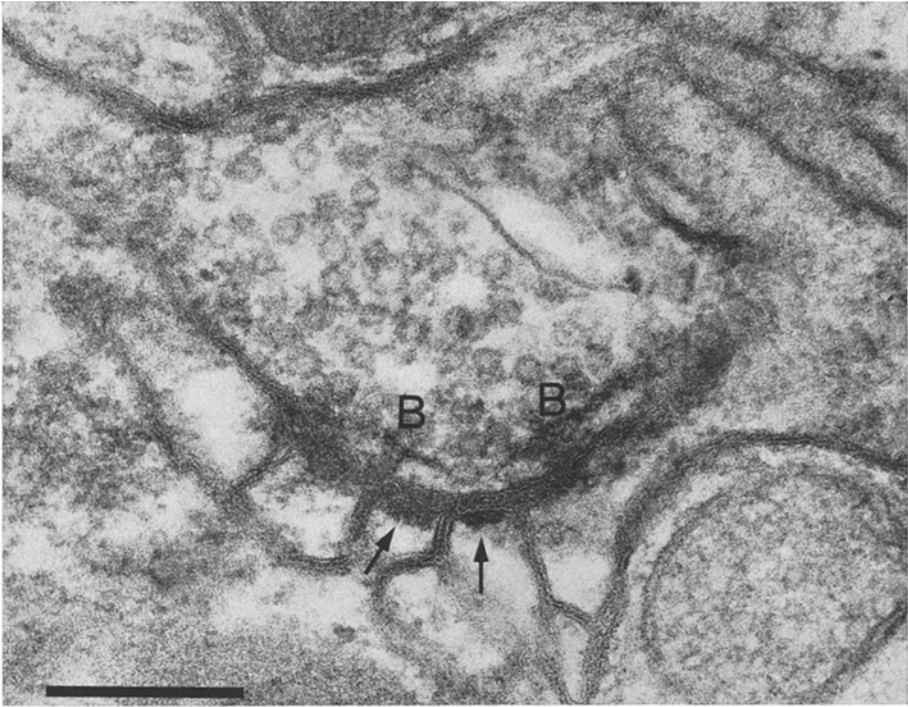
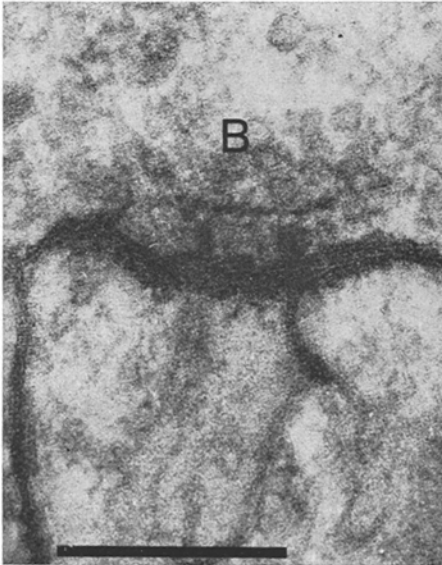


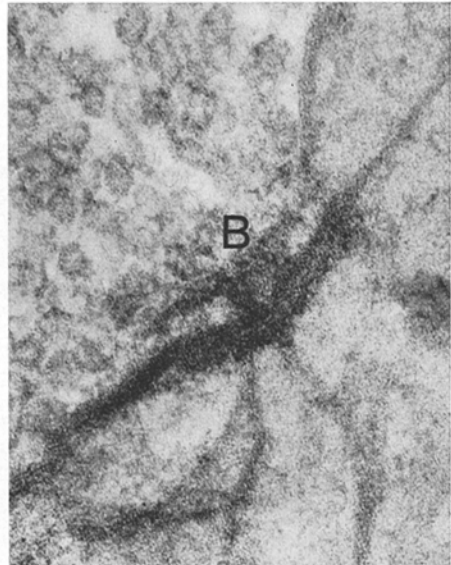
Abb. 12. *Calliphora vicina*, synaptische Verbindung im Bereich der Glomeruli des Deutocerebrum. Beachte die dichte Längsstruktur (B) parallel zur synaptischen Membran auf der präsynaptischen Seite und die Zahl der postsynaptischen Elemente (1—4). Maßstab 0,23 μm . Vergr. 1:90000



13



14



15

Abb. 13. *Calliphora vicina*, synaptische Endigung gegenüber mehreren postsynaptischen Elementen. Elektronendichtes Material auf beiden Seiten der Synapse (Pfeile), präsynaptische Balkenstrukturen (B). Maßstab 0,26 μm . Vergr. 1:100000

Abb. 14. *Calliphora vicina*, synaptische Verbindung im Deutocerebrum. In der präsynaptischen Balkenstruktur (B) sind 2 Füße durch Seitenfortsätze verbunden. Maßstab 0,25 μm . Vergr. 1:120000

Abb. 15. *Periplaneta americana*, synaptische Verbindung im Deutocerebrum. Präsynaptische Balkenstruktur (B) mit Fuß und seitlichen Fortsätzen. Maßstab wie Abb. 14. Vergr. 1:120000

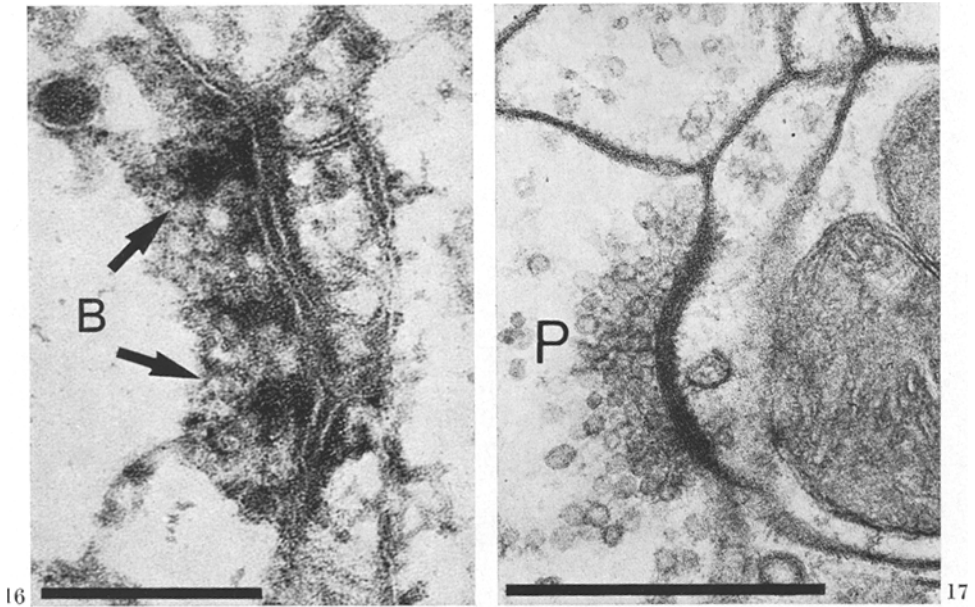


Abb. 16. *Calliphora vicina*, synaptische Kontaktstelle, prä- und postsynaptisch elektronendichtes Material, präsynaptisch dichte Strukturen (B). Wismutimprägnation, Maßstab $0,25 \mu\text{m}$. Vergr. 1:116000

Abb. 17. *Periplaneta americana*, einfache, polarisierte Synapse im Bereich der Glomeruli des Deutocerebrum, Maßstab $0,9 \mu\text{m}$. Vergr. 1:48000

leicht geschwungenen seitlichen Fortsätzen. Der Fuß sitzt meist der präsynaptischen Membran unmittelbar auf (Abb. 13 und 15). Zuweilen sind zwei Füße durch ihre Fortsätze verbunden (Abb. 14), in anderen Fällen liegen Längsleisten parallel zur präsynaptischen Membran (Abb. 12). Solche Füße finden sich stets gegenüber derjenigen Region, in der zwei postsynaptische Elemente aneinanderstoßen (Abb. 13, 14, 16); die drei Elemente bilden dort eine Art Zwickel. Vielfach findet man eine ganze Reihe von recht kleinen postsynaptischen Elementen gegenüber einem präsynaptischen (Abb. 12 und 13).

Nach Wismut-Imprägnierung (nach der Methode von Pfenninger *et al.*, 1969) treten die Membranen als helle Linien ungefärbt neben dem prä- und postsynaptischen elektronendichten Material in Membrannähe hervor, die Füllung im synaptischen „Spalt“ erscheint ebenfalls sehr dicht (Abb. 16). Die Lage der besonders dichten Gebilde an Zwickeln („B“ in Abb. 16) und die Ähnlichkeit in Form und Größe sprechen dafür, daß es sich dabei um Füße von präsynaptischen Balkenstrukturen handelt.

Diskussion

Mit Hilfe der experimentellen Degeneration kann die erste Station der sensorischen Bahnen aus den Antennen eines Insekts in groben Umrissen lokalisiert werden, die Ergebnisse lassen sich jedoch vorerst nicht quantitativ auswerten. Die Mängel der hier angewandten Methode zeigen sich dort, wo die

Stärke etwa der Silberfärbung liegt: bei der Darstellung individueller Faserverläufe. Im dünnen Gewebsschnitt für die Untersuchung im Phasenkontrast lassen sich einzelne Fasern unterhalb einer bestimmten Querschnittsgröße nicht mehr gut verfolgen. So bleibt die Stichprobe mit dem Elektronenmikroskop, die selbst bei den geringen Abmessungen eines Insektenhirns nicht alle Regionen quantitativ erfaßt. Auch kann das Bild durch „spontane“ Degeneration gestört sein, auf der Kontrollseite können Antennensegmente abbrechen oder Sinneszellen absterben, wobei Axone zugrunde gehen. In einer neueren Arbeit am Thalamus der Katze wurden auch im Kontrollgewebe ohne experimentell verursachte Degeneration Axone mit elektronendichtem Material beschrieben (Cohen und Pappas, 1969), die nach Ansicht der Verfasser zu gesunden Neuronen gehören.

Zudem verdeckt der — auf den ersten Blick günstige — massive Effekt einer Ausschaltung der ganzen Antenne viele Feinheiten. Auf den Fühlern von Insekten finden sich ja Chemorezeptoren mehrerer Funktionstypen, daneben Mechano- und Temperaturrezeptoren (Schneider, 1964). Wo die Axone dieser verschiedenen Rezeptoren jeweils enden, kann nur durch sorgfältige exklusive Ausschaltung einzelner Rezeptorgruppen entschieden werden.

Immerhin ergab sich, daß die Hautmenge der Antennenfasern (die innerhalb von 8 Tagen nach der Operation Degenerationseffekte zeigen) in den Glomeruli des Deutocerebrum endet. Dies war von einigen Autoren schon vermutet worden, konnte aber nicht bewiesen werden, da die Antennenfasern nicht bis in die Glomeruli hinein zu verfolgen waren (s. bei Bullock und Horridge, 1965). Überraschend war der Unterschied zwischen Fliege und Schabe: enden bei *Periplaneta* (zumindest fast) alle Fasern ipsilateral, so ziehen bei *Calliphora* sehr viele Antennenaxone über die Commissur nach contralateral. Auch Power (1946) hatte bei *Drosophila* ähnliches vermutet.

Angesichts der großen Zahl degenerierter Fortsätze im contralateralen Deutocerebrum ist anzunehmen, daß auch Axone von Chemorezeptoren dort enden, da diese ja den Hauptteil der Fasern im Antennennerv stellen. Mögliche Konsequenzen einer solchen bilateralen Repräsentation des Sinneseingangs von einer Körperseite für die Leistungen des Tieres können hier nur angedeutet werden. Bilaterale Verrechnung olfaktorischer Eingänge erfolgt sicher z. B. bei der Biene, welche geringe Unterschiede in der Duftkonzentration zwischen links und rechts zur Orientierung verwenden kann (Martin, 1964). Auf welchem Niveau diese Auswertung erfolgt, bleibt natürlich offen.

Die Rolle des Seitentraktes (Abb. 3, 11) ist noch unklar. Sicher ziehen darin Axone von Mechanorezeptoren aus Scapus und/oder Pedicellus (vgl. auch Satija, 1958; Power, 1946). Alle diese Sinnesorgane sind wichtig für die Information über die Stellung der Antennen zum Kopf und dementsprechend, etwa bei der Fliege, für die Messung der Wind- bzw. der Fluggeschwindigkeit. Es läßt sich leicht denken, daß diese Bahn gleich beim Eintritt ins Gehirn etwa von der der Chemorezeptoren getrennt wird. Nach einer vorsichtigen Schätzung zeigen einige hundert meist dünnere Profile im Seitentrakt Degenerationserscheinungen. In der Größenordnung stimmt diese Zahl mit der der Sinneszellen in Scapus und Pedicellus überein (s. S. 435). Trotzdem ist das kein Beweis, daß nicht doch Axone aus der Region der Antennenbasis in die Glomeruli ziehen.

Vielleicht können hier Untersuchungen an Mückenmännchen weiter helfen. Bei diesen Tieren enthält das Johnstonsche Sinnesorgan besonders viele Sinneszellen, die übrige Geißel besonders wenige; der Effekt der Ausschaltung des Pedicellus wäre also besonders deutlich. Der weitere Verlauf der mechanorezeptorischen Bahn in protocerebrale und thorakale Bereiche (Satija, 1958; Power, 1946) konnte noch nicht geklärt werden, vor allem bleibt offen, ob es sich dabei wirklich um primäre Sinnesfasern handelt. Viele, vor allem auch die besonders dicken Fasern im Seitentrakt sind von der Degeneration nicht betroffen (vgl. Abb. 11). Eventuell handelt es sich um Motoneurone zu den Antennenmuskeln aus dem „motorischen Antennenzentrum“ (Sánchez, 1941).

Die Lokalisation einer größeren Zahl synaptischer Endigungen der Antennenfasern ist vorerst fehlgeschlagen (vgl. S. 437). In einigen Fällen findet sich zwischen dem Profil eines degenerierten Fortsatzes und einem Nachbarelement eine Region, in welcher die Membranen der beiden Elemente auf den Abstand eines synaptischen Zwischenraums auseinanderweichen. Vesikel, Balkenstrukturen und Verdichtungen an den Membranen sind jedoch im dunklen Inhalt des degenerierten Fortsatzes nicht erkennbar. So kann nur berichtet werden, daß bei der Degeneration mit der Zahl der intakten Faserquerschnitte auch die der erkennbaren Synapsen zurückgeht. Eine direkte Zuordnung der Synapsentypen zu einem Neurontyp ist dabei nicht möglich. Andererseits wurden in intakten Antennenhügeln hauptsächlich zwei morphologische Typen von Synapsen mit Vesikeln im präsynaptischen Profil gefunden: häufig die mit präsynaptischen Balkenstrukturen, was anscheinend mit der Verschaltung auf mehr als ein postsynaptisches Element zusammenhängt (Abb. 12—16), seltener die ohne solche Strukturen (Abb. 17). Angesichts der großen Zahl einlaufender Antennenfasern kann deshalb wohl der Balkentyp diesen zugeordnet werden.

Der Befund, daß auch noch 8 Tage nach der Operation viele intakte Synapsen vorhanden sind, kann zweierlei bedeuten. Entweder überlebt eine beträchtliche Zahl von Faserenden das Abtrennen vom Zellkörper so lange, oder es handelt sich um Endigungen efferenter Verbindungsneurone. Goll (1966) beschreibt stark verzweigte Verbindungen zwischen den Glomeruli im Deutocerebrum der Ameise, Strausfeld (persönl. Mitt.) fand im Deutocerebrum von Schwärmern reich verzweigte „amakrine“ Neurone. Allerdings könnte es sich in beiden Fällen auch um Dendritenbäume stark verzweigter Neurone zweiter Ordnung der Antennenbahn handeln, deren Axone im Tr. olfactorio-globularis nicht angefärbt waren.

Der Feinbau der Synapsen in den Glomeruli des Deutocerebrum entspricht den Befunden anderer Autoren. Smith (1967) beschrieb in Augenganglien von Fliegen prä- und postsynaptisch elektronendichtes Material und präsynaptische Balkenstrukturen („T-shaped structures“). Auch diese zeigen einen Fuß („pillar“); die seitlichen Fortsätze werden als Deckscheibe („disc“) gedeutet. Trujillo-Cenóz (1965, 1969) fand ebenfalls Zwickelsynapsen in optischen Ganglien von Fliegen. Er konnte durch Imprägnation mit Phosphorwolframsäure auch seitliche Fortsätze an den Füßen darstellen; die gesamte präsynaptische Struktur bezeichnete er als „osmophilic synaptic ribbon“ (vgl. auch die Befunde von Dowling und Boycott, 1966 an der Säugerretina). Seiner Meinung nach entspricht die räumliche Struktur dieser Gebilde einem Balken mit Kreuzprofil. Lamparter *et al.*

(1969) beschrieben Mehrfachsynapsen („Dyaden“ und andere sehr spezielle Verschaltungen) im Gehirn und Thorakalmark der Ameise, in denen ebenfalls Balkenstrukturen auftauchen. Nach Imprägnation mit Phosphorwolframsäure zeigen diese nach Ansicht der Autoren in der Feinstruktur gewisse Ähnlichkeiten mit den „dense projections“ in Synapsen des Zentralnervensystems von Säugetieren (Gray, 1963). Dort bilden die dense projections an der präsynaptischen Membran ein Gitter, dessen hexagonal angeordnete Maschen die Weite eines synaptischen Vesikels haben (Pfenninger *et al.*, 1969; Akert *et al.*, 1969).

Synaptische Balkenfüße im Deutocerebrum von *Calliphora* und *Periplaneta* finden sich jedoch nur in den Zwickelsynapsen, also, wenn mehrere postsynaptische Elemente vorliegen, und dort nur im Zwickel, damit also weiter als einen Vesikeldurchmesser voneinander entfernt. Keines dieser Kriterien trifft auf die „dense projections“ des Säugetiers zu. Eingehende Untersuchungen an Schnittserien und mit besonderen histochemischen Methoden werden zur Klärung der Feinstruktur und der Verschaltungsweise solcher Synapsen beitragen können und vor allem die Frage beantworten, ob ein Zusammenhang zwischen Balkenstrukturen und synaptischen Vesikeln besteht (vgl. Trujillo-Cenoz, 1969; Dowling und Boycott, 1966; Akert *et al.*, 1969).

Literatur

- Akert, K., Moor, H., Pfenninger, K., Sandri, C.: Contribution of new impregnation methods and freeze etching to the problem of synaptic fine structure. In: Synaptic mechanisms (ed. K. Akert and P. G. Waser). Progr. Brain Res. **31**, 223—240 (1969).
- Sandri, C.: An electron-microscopic study of zinc iodide-osmium impregnation of neurons. I. Staining of synaptic vesicles at cholinergic junctions. Brain Res. **7**, 286—295 (1968).
- Alksne, J. F., Blackstad, T. W., Walberg, F., White, L. E.: Electron microscopy of axon degeneration: a valuable tool in experimental neuroanatomy. Ergeb. Anat. Entwickl.-Gesch. **39**, 1—32 (1966).
- Braitenberg, V.: Patterns of projection in the visual system of the fly. Retina-lamina projections. Exp. Brain Res. **3**, 271—298 (1967).
- Bretschneider, F.: Über die Gehirne der Küchenschabe und des Mehlkäfers. Jena. Z. Naturw. **52**, 296—362 (1914).
- Bullock, T. T., Horridge, G. A.: Structure and Function in the nervous systems of invertebrates. San Francisco: Freeman & Co. 1965.
- Cajal, S. R., Sánchez, D.: Contribution al conocimiento de los centros nerviosos de los insectos. Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madrid **13**, 1—164 (1915).
- Cohen, M. J., Jacklet, J. W.: The functional organization of motor neurons in an insect ganglion. Phil. Trans. B **252**, 561—572 (1967).
- Colonnier, M.: Experimental degeneration in the cerebral cortex. J. Anat. Lond. **98**, 47—53 (1964).
- Farley, R. D., Milburn, N. S.: Structure and function of the giant fibre system in the cockroach, *Periplaneta americana*. J. Insect Physiol. **15**, 457—476 (1969).
- Fink, R. P., Heimer, L.: Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. Brain Res. **4**, 369—374 (1967).
- Goll, W.: Strukturuntersuchungen am Gehirn von *Formica*. Z. Morph. Ökol. Tiere **59**, 143—210 (1967).
- Gray, E. G.: Electron microscopy of presynaptic organelles in the spinal cord. J. Anat. (Lond.) **97**, 101—106 (1963).
- Guillery, R. W.: Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. Int. Rev. Cytol. **19**, 111—182 (1965).
- Gray, E. G., Hamlyn, L. H.: Electron microscopy of experimental degeneration in the avian optic tectum. J. Anat. (Lond.) **96**, 309—316 (1962).

- Hamori, J., Horridge, G. A.: The lobster optic lamina III Degeneration of retinula cell endings. *J. Cell Sci.* **1**, 271—274 (1966).
- Hanström, B.: Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere unter Berücksichtigung seiner Funktion. Berlin: Springer 1928.
- Hess, A.: The fine structure of nerve cells, and fibres, neuroglia, and sheaths of the ganglion chain in the cockroach (*Periplaneta mexicana*). *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 731—742 (1958a).
- Experimental anatomical studies of pathways in the severed central nerve cord of the cockroach. *J. Morph.* **103**, 479—502 (1958b).
- Lamparter, H. E., Akert, K., Sandri, C.: Wallersche Degeneration im Zentralnervensystem der Ameise. *Schweiz. Arch. Neurol. Neurochir. Psychiat.* **100**, 337—354 (1967).
- Steiger, U., Sandri, C., Akert, K.: Zum Feinbau der Synapsen im Zentralnervensystem der Insekten. *Z. Zellforsch.* **99**, 435—442 (1969).
- Lund, R. D., Collett, T. S.: A survey of reduced silver techniques for demonstrating neuronal degeneration in insects. *J. exp. Zool.* **167**, 391—409 (1968).
- Martin, H.: Zur Nahorientierung der Biene im Duftfeld. Zugleich ein Nachweis für die Osmotropotaxis bei Insekten. *Z. vergl. Physiol.* **48**, 481—533 (1964).
- Nauta, W. J. H., Gygax, P. A.: Selective silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system. *Stain Technol.* **26**, 5—11 (1954).
- Pfenninger, K., Sandri, C., Akert, K., Eugster, C. H.: Contribution to the problem of structural organization of the presynaptic area. *Brain Res.* **12**, 10—18 (1969).
- Power, M. E.: The antennal centers and their connections with the brain of *Drosophila melanogaster*. *J. comp. Neurol.* **85**, 485—509 (1946).
- Sánchez, D.: Contribution à la connaissance des centres nerveux des insectes. Nouveaux rapports sur la structure du cerveaux des abeilles (*Apis mellifica*). *Trab. Inst. Cajal Invest. biol.* **33**, 165—236 (1941).
- Satija, R. C.: A histological study of the brain and thoracic nerve cord with specific reference to the descending nervous pathways. *Res. Bull. Panjab Univ. (Zool.)* **142**, 81—96 (1958).
- Smith, D. S.: The organization of the insect neuropile. In: *Invertebrate nervous systems* (ed. C. A. G. Wiersma), Chicago: Chicago Univ. Press 1967.
- Steiger, U.: Über den Feinbau des Neuropils im corpus pedunculatum der Waldameise. *Z. Zellforsch.* **81**, 511—536 (1967).
- Strausfeld, N. J.: The comparative anatomy of the optic lobe of some lepidoptera and diptera. Ph. D. Thesis, University College, London, 1968.
- Trujillo-Cenóz, O.: Some aspects of the structural organization of the intermediate retina of dipterans. *J. Ultrastruct. Res.* **13**, 1—33 (1965).
- Some aspects of the structural organization of the medulla in muscoid flies. *J. Ultrastruct. Res.* **27**, 533—553 (1969).
- Walberg, F.: The early changes in degenerating boutons and the problem of argyrophilia. Light and electron microscopic observations. *J. comp. Neurol.* **122**, 113—137 (1964).
- Zawarzin, A.: Zur Morphologie der Nervenzentren. Das Bauchmark der Insekten. Ein Beitrag zur vergleichenden Histologie. *Z. wiss. Zool.* **122**, 323—424 (1924).
- Ziesmer, Ch.: Modifizierte Methode zur Silberimpregnierung. *Z. wiss. Mikr.* **60**, 57—77 (1951).

Prof. Dr. J. Boeckh
 Zoologisches Institut
 der Universität Frankfurt
 6 Frankfurt a. M.
 Siesmayerstr. 70

Prof. Dr. K. Akert und C. Sandri
 Institut für Hirnforschung
 der Universität Zürich
 Ch-8008 Zürich (Schweiz)
 August-Forel-Str. 1