

Teil II

4. Das entwicklungsabhängige Wachstum dendritischer Filopodien während der Metamorphose von *Manduca sexta*

4.1 Einleitung

Filopodien sind dünne, mitunter sehr lange Fortsätze sich entwickelnder Neurone und sind charakteristisch insbesondere für Wachstumskegel. Filamentöses Aktin (F-Actin) in ihrem Zytoskelett bildet die Grundlage ihrer außerordentlichen Beweglichkeit. Der damit verbundene rasche Formwandel von Filopodien und ihr nur vorübergehendes Auftreten während diskreter, meist früher Entwicklungsphasen (Miller und Peters, 1981) deuten auf eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Wachstumsprozessen hin, so bei der Navigation von Wachstumskegeln (*pathfinding*) und der Synaptogenese. Fragen nach der strukturellen Plastizität und den Regulationsmechanismen von Filopodien stehen deshalb im Fokus entwicklungsbiologischer Forschung, stellen sie doch den Schlüssel zu Aufklärung einer zentralen Frage dar, nämlich: Wie prüfen und finden Neurone, die einen Schaltkreis bilden, unter vielen tausend möglichen den jeweils korrekten Partner?

Die Morphologie ausgereifter neuronaler Strukturen ist seit Ramón y Cajals breit angelegter Studie *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* (1899, 1904) umfassend untersucht. Ebenfalls Cajal, beeindruckt von der Vielfalt, Komplexität und der präzisen Orientierung von Wachstumskegeln, versuchte bereits eine plausible Erklärung zu finden für das, was er eine *intelligente Kraft der lotsenden Mechanismen* nannte. Er vermutete, dass Zielzellen Signalstoffe absondern, die von Wachstumskegeln chemotaktisch beantwortet werden (Teoría neurotrópica; vgl. auch Sotelo, 2002).

Die eigentliche Funktion von Filopodien bei diesen Orientierungs-Prozessen, insbesondere deren Rolle bei der Synaptogenese, ist jedoch noch immer weitgehend unklar. Dagegen ist bekannt, dass Wachstumskegel und damit auch Filopodien der Regulation durch verschiedene extrinsische (i), intrinsische (ii) und aktivitätsabhängige (iii) Prozesse unterliegen. Diese Prozesse wirken zeitgleich interaktiv oder in sequentieller Folge auf die verschiedenen Entwicklungsstufen. Letztere lassen sich grob einteilen in das initiale und gerichtete Auswachsen des primären Neuriten hin zum Zielgebiet. Daraufhin verzweigt der Wachstumskegel. Schließlich bildet er unter Verlangsamung der Wachstumsprozesse in diesem Gebiet ein Grundgerüst, welches durch Abspalten von Zweigen höherer Ordnung zunehmend verfeinert wird (Wu et al., 1999). Die Navigation des Wachstumskegels ebenso

wie die Form von Filopodien wird durch Oberflächenmoleküle oder Botenstoffe (i) reguliert (Kater und Shibata, 1994; Gomez et al., 2001; Trimm und Rheder, 2004). Daneben weisen einige Autoren auf die Bedeutung intrinsischer Wachstumsfaktoren (ii) hin (Sotelo, 1990; Portera-Cailliau, 2005). Beispielsweise entwickeln bestimmte Zellen des ZNS von Säugern in Zellkultur auch ohne Interaktion mit anderen Neuronen oder mit Gewebe die für ihren Zelltyp charakteristische Morphologie (Montague und Friedlander, 1989). Ferner zeigt eine große Zahl von Untersuchungen, dass präsynaptische Aktivität (iii) entscheidenden Einfluß auf Bewegungs- und Strukturveränderungen in Filopodien von auswachsenden Dendriten (Portera-Cailliau et al., 2003; Lohmann et al., 2005) und Axonen (Gomez et al., 1999; 2001; Gomez und Spitzer, 2000) hat. Schließlich demonstrieren neuere Befunde die Stabilisierung von Filopodien durch synaptischen Kontakt: auswachsende Filopodien, die en passant postsynaptische Strukturen ausbilden, ziehen sich nur bis zu diesen synaptischen Strukturen zurück, während andere Filopodien, die keine solchen putativen Kontakte ausbilden, gänzlich zurückgebildet werden (*synaptotopic guidance*; Niell et al., 2004; vgl. Konur und Yuste, 2004; Lohman et al., 2005; zum Beitrag von Filopodien an der Synaptogenese vgl. auch: Vaughn, 1989; Ziv und Smith, 1996; Fiala et al., 1998).

Die sehr rasche Vervielfachung unseres Wissens über Wachstumsmechanismen setzte erst in den letzten Jahren ein - mit der Entwicklung neuer Live-Imaging-Techniken (Gomez et al., 2001; Portera-Cailliau, 2003; Yuste und Bonhoeffer 2004; Robles et al., 1999; Konur und Yuste, 2004; Lohmann et al., 2005; Niell et al., 2004). Dennoch, der weitaus größte Teil von Untersuchungen befasst sich mit axonaler Wegfindung und axonaler Synaptogenese (Kater und Rehder, 1995; Beattie, 2000; Charron und Tessier-Lavigne 2005; Rose und Chiba, 2000). Darüber hinaus betrachten insbesondere Live-Imaging-Techniken Entwicklungsvorgänge meist nur über eine kurze Zeitspanne. Aber gerade auch Kontroversen über solch lang bestehende Theorien, wie die, dass Neuriten eine sequentielle Abfolge von Wachstum (*overgrowth*) und nachfolgender Rückbildung durchlaufen (*growth and pruning*; Hua und Smith, 2004), bestätigen die Bedeutung von Untersuchungen der Entwicklungsvorgänge über eine lange Zeitspanne (Portera-Cailliau et al., 2005).

Eine solche länger durchgeführte Beobachtung an Pyramidenzellen des visuellen Neocortex von Mäusen konnte die Existenz verschiedener Filopodientypen zeigen (Portera-Cailliau et al., 2003). Hierbei induziert Aktivität überraschenderweise ein gegensätzliches Verhalten von zwei Filopodientypen. Bislang ist unklar, ob dieser Merkmalsunterschied ein generelles Charakteristikum von dendritischen Filopodien ist. Ebenfalls ist unklar, wie dieser Unterschied zu Mechanismen von Wachstum, Zielwahl und Synaptogenese beiträgt.

Holometabole Insekten wie *Manduca sexta* und *Drosophila melanogaster* sind als Larven langsam kriechende Raupen. Als laufende und fliegende Imagines dagegen sind sie Tiere mit Lokomotionstypen, die gänzlich andere motorische Schaltkreise voraussetzen. Die Fortbewegungsart der adulten Tiere setzt dabei hohe Anforderungen insbesondere an Geschwindigkeit und zeitliche Präzision der neuronalen Verarbeitung (Consoulas et al., 2000; Tissot und Stocker, 2000). Die Metamorphose von Insekten eröffnet somit die faszinierende Möglichkeit, besonders drastische neuronale Umbauprozesse während eines postembryonalen Formwandels zu studieren. Durch Vergleich mit embryonalem Formwandel könnten überdies die jeweiligen Besonderheiten aber auch die generellen Entwicklungsprinzipien abgeleitet werden, welche beiden Prozessen zu Grunde liegen.

Unter den Modifikationen der neuronalen Architektur des Tabakswärmers, *Manduca sexta* finden sich so verschiedenartige Vorgänge, wie Neurogenese (Booker et al., 1996), programmierter Zelltod (Weeks und Truman, 1985; Streichert et al., 1997) und die morphologisch/funktionelle Umbildung persistierender Neurone (Kent und Levine, 1988; Consoulas et al., 2000). Viele dieser Prozesse unterliegen dabei der direkten Kontrolle durch Hormone, welche als Volumensignale die Veränderungen bei einer großen Zahl von Neuronen synchronisieren. Das Ecdysteroid 20-Hydroxyecdysol (20-HE) nimmt Einfluss auf die dendritische Struktur (Weeks und Truman, 1986; Truman, 1990; Levine et al., 1995; Levine und Weeks, 1996) und bewirkt bei Wachstumskegeln eine Längen- und Segmentzunahme (Matheson und Levine, 1999).

Ein bereits gut dokumentiertes Modellsystem in *Manduca* ist das Motoneuron 5 (MN5). Es ist eines von fünf larvalen Kriechmotoneuronen der Körperwand, die während der etwa 18 Tage dauernden Verpuppung in Flugmotoneurone des dorsal-longitudinalen Flugmuskels umgewandelt werden. Dabei ändern sich die Membraneigenschaften (Duch und Levine, 2000), tonisches Antwortverhalten wird phasisch. Auffällig aber sind vor allem die morphologischen Umwandlungen. Schon während später Larvenstadien (*wanderer*) bilden sich die Dendriten zurück (Duch und Levine, 2000; Duch und Mentel, 2004). In der Puppe erscheinen an den verbliebenen Neuriten erstmals Wachstumskegel, die schließlich einen neuen Dendritenbaum bilden. Lediglich in dieser frühen Phase von etwa 3 - 4 Tagen (PhI; Puppenstadien P3-P5) sind die Dendriten dicht mit Filopodien besetzt. Die zweite Phase des Auswachsens (PhII) und der Synaptogenese wird gekennzeichnet durch einen anderen, etwa zweiwöchigen Entwicklungsmodus ohne Wachstumskegel, bei welchem bestehende Dendriten neue Segmente abspalten. Dieser Modus ist auf Dendriten höherer Ordnung beschränkt (Libersat und Duch, 2002).

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals im Gewebeverband die morphologischen Veränderungen von Filopodien während der ersten Phase (PhI; P3-P5) des Auswachsens. Morphometrische Studien haben hierfür die stetige Zunahme von Verzweigungszahl und Länge des gesamten Dendritenbaumes bereits eingehend beschrieben (Duch und Levine, 2000). Jedoch, im Gegensatz zu Dendriten, sind Filopodien sehr kurzlebige Strukturen mit raschem Wachstum und nachfolgender Regression. Filopodien von Pyramidenzellen beispielsweise durchlaufen einen kompletten Zyklus in meist weniger als 10 Minuten (Dailey und Smith, 1996; Portera-Cailliau et al., 2003). Ob es bei der Gesamtheit solcher kurzlebigen Strukturen im Verlauf der viel größeren Zeitspanne von 3 - 4 Tagen (PhI) ebenfalls zu morphometrischen Veränderungen kommt, ist nicht bekannt. Solche Veränderungen aber geben Auskunft über längerfristige Veränderungen von Signalkaskaden und – in Kombination mit Daten über die Synapsenverteilung – tragen sie zur Klärung der entscheidenden Frage bei, wie Filopodienentwicklung und Synaptogenese einander beeinflussen.

Hier wird am Beispiel eines Motoneurons (MN5) der Formwandel von Filopodien während der Wachstumskegel-abhängigen Entwicklung in PhI gezeigt. Neuartige dreidimensionale Rekonstruktionsverfahren in Kombination mit quantitativen Analyseverfahren ermöglichten die Erhebung präziser morphometrischer Daten (Schmitt et al., 2004; Evers et al., 2005).

Die postembryonal angelegten Filopodien erschienen meist nicht als einfache Segmente sondern als mehrfach verzweigende Strukturen. Komplexitätsgrad und Länge von Filopodien verringerten sich während PhI. Demgemäß sollten graduelle Veränderungen der Wirkung von Signalkaskaden die Form von Filopodien nicht nur lokal, sondern in einem großen Dendritenfeld beeinflussen. Zu Beginn von PhII schließlich ist die Grundstruktur des Dendritenbaums bereits manifest und es fanden sich am Dendriten nur noch wenige, sehr vereinzelte Filopodien.

Innerhalb der gleichen Entwicklungsstufe waren Länge und Komplexität von Filopodien an der Spitze signifikant verschieden von denen am Dendritenschaft. Dabei weist die größere Uniformität der meist kürzeren Schaftfilopodien auf unterschiedliche Regulationsmechanismen hin, die an beiden Typen wirksam sind²³.

²³ Teil II ist ein gemeinsames Projekt von Dr. Jan-Felix Evers und mir. Beide trugen im gleichen Maß zur Arbeit bei.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Der filopodienabhängige Wachstumsmodus während früher Phasen dendritischer Reorganisation des MN5

Der Dendritenbaum des MN5 wird während später larvaler und früher Puppenstadien zurückgebildet. Ab P3 dann wachsen die Dendriten erneut aus (Abb. 4.1, obere Reihe links). Während der nur dreitägigen Zeitspanne der Stadien P3-P5 wird der Dendritenbaum in seiner Grundstruktur bereits festgelegt. In P5 umspannt er etwa die Ausdehnung des adulten Verzweigungsgebietes (Abb. 4.1, obere Reihe rechts). Während der sich anschließenden zweiwöchigen Puppenentwicklung ist das Wachstum auf Segmente höherer Ordnung beschränkt (Libersat und Duch, 2002).

Filopodien erschienen erstmals, aber innerhalb weniger Stunden in großer Zahl in P3 (Abb. 4.1, obere Reihe links). Filopodien sind im Vergleich zu Dendriten extrem schmal und wurden anhand ihrer geringen Farbeintensität und des geringen Radius ($2 \mu\text{m} \pm 0,05 \mu\text{m}$) identifiziert (Yuste und Bonhoeffer, 2004). Solche Strukturen fanden sich sowohl an sämtlichen Dendritenspitzen (Abb. 4.1, vgl. Pfeile in der mittleren Reihe) als auch an fast allen dahinter liegenden Schaftbereichen (Abb. 4.1, vgl. Pfeile in der unteren Reihe) - ein Umstand, der deren Bedeutung für den ersten dendritischen Wachstumsmodus deutlich demonstriert. Das Soma und die außerhalb des Neuropils befindlichen Neuriten waren dagegen immer frei von Filopodien.

Schon die qualitative Beurteilung der konfokalen Aufnahmen offenbart Unterschiede zwischen den Stadien. Während P3- und P4-Filopodien insbesondere an den Spitzen eine sehr komplexe und raumgreifende Architektur ausbildeten (Abb. 4.1, mittleren Reihe links und Mitte), waren die Spitzen in P5 wenig auffällig und oft nur mit wenigen Auswüchsen besetzt (Abb. 4.1, mittleren Reihe rechts). Ebenso fanden sich an den Schaftsegmenten nur noch vereinzelte Filopodien (Abb. 4.1, untere Reihe rechts). In P6 setzte sich dieser Rückgang drastisch fort: filopodienartige Strukturen waren bei Betrachtung des kompletten Dendritenbaumes nur noch ausnahmsweise festzustellen und deren geringe Zahl schloss eine statistische Analyse aus.

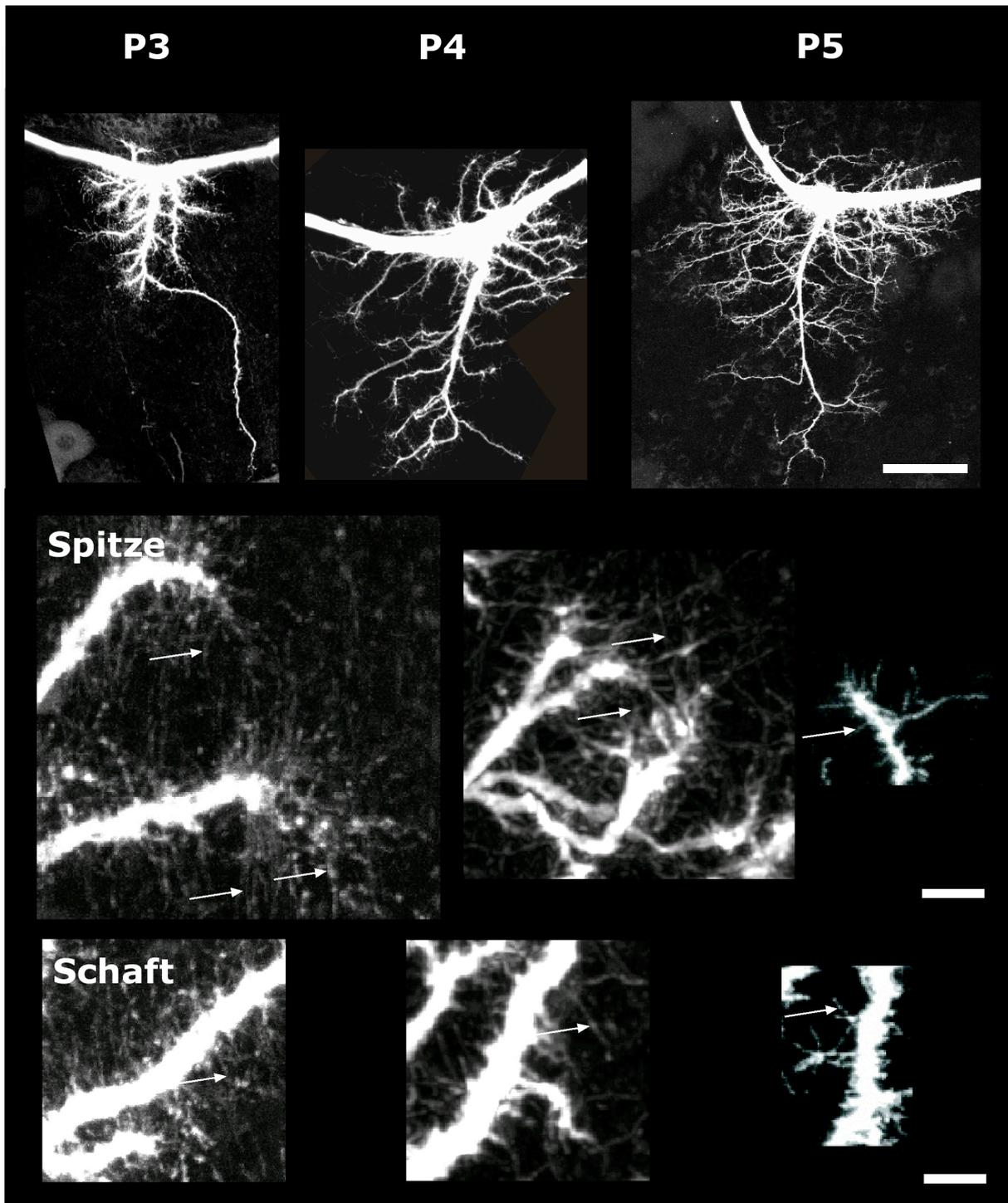


Abb. 4.1: Hochauflösende konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen morphologische Veränderungen von Dendritenbaum und Filopodien während der ersten, dreitägigen Auswuchsphase des Motoneurons 5 (MN5) in Puppenstadien von *Manduca sexta*. Im Anschluss an die maximale Regression des Dendritenbaumes wuchsen in **P3** die Dendriten erstmals aus (obere Reihe, P3). Sowohl Dendritenabschnitte der Spitze (mittlere Reihe) als auch des Schaftes (untere Reihe) waren dicht mit Filopodien besetzt (Pfeile). Diese bildeten vor allem um die Dendritenspitze herum eine dichte, vielfach verzweigende und ausgedehnte Struktur. Schaftfilopodien erscheinen dagegen weniger komplex. In **P4** (mittlere Spalte) waren die Dendriten weiter ausgewachsen. Filopodien waren zwar ebenfalls oft sehr lang und verzweigten mehrfach, erschienen aber besonders um die

Dendritenspitze herum weniger komplex und raumgreifend. In **P5** (rechte Spalte) erreichte der Dendritenbaum schon nahezu die Ausdehnung des ausgewachsenen Neurons und auch jetzt fanden sich Filopodien noch an allen Dendritenbereichen. Diese waren allerdings weniger zahlreich, erschienen meist deutlich kürzer und waren weniger verzweigt. Balken: obere Reihe: 50 μm . Untere Reihe: 5 μm .

4.2.2 Morphologie der Filopodien

Filopodien sind zwar im Gegensatz zu Dendriten sehr kurzlebig und haben immer sehr geringe Durchmesser (vgl. 4.1), aber doch wiesen die Filopodien des MN5 im natürlichen Zellverband eine große Vielfalt und Komplexität auf. Neben kurzen unverzweigten Auswüchsen von lediglich 1 μm Länge, traten solche auf, die mehr als fünfmal verzweigten und deren Gesamtlänge größer als 30 μm war. Auch die maximale Wegstrecke, mit der sich ein Filopodium vom Dendriten entfernt, betrug zwischen 1 und mehr als 10 μm . Diese inhomogene Verteilung erklärt sich daraus, dass in einem Stadium jeweils kurze, neu generierte, maximal ausgestreckte als auch gerade sich zurückziehende Strukturen nebeneinander existieren. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit aber ist es festzustellen, ob während der Entwicklung Veränderungen bei Filopodien auftreten, die auf eventuelle globale Veränderungen von wachstumsregulierenden Faktoren hindeuten. Da innerhalb der uneinheitlichen Gesamtheit von Filopodien solche Veränderungen natürlich schwer zu detektieren sind, wurden für jedes Entwicklungsstadium morphometrische Daten für jeweils eine große Anzahl von rekonstruierten Filopodien ($n > 200$) erhoben.

Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch Beispiele für dreidimensionale Rekonstruktionen (Evers et al., 2005) von Filopodien an der Spitze von Dendriten. Um in dieser Gruppe Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden nur solche Filopodien gewertet, die innerhalb der letzten 5 μm vom Dendriten abzweigten. Abbildung 4.2 zeigt für P3, P4 und P5 sowohl Projektionen der räumlichen Repräsentation (obere Reihe) als auch Dendrogramme (untere Reihe) der betreffenden Abschnitte. In den Dendrogrammen sind die Verzweigungspunkte blau markiert. Einzelne Abzweige vom Dendritensegment sind rot markiert. Die Längen, der im dreidimensionalen Raum verlaufenden Filopodien wurden in eine Ebene übertragen, so dass die entsprechenden Längenmaße hier direkt ablesbar sind.

Die Filopodien in P3 hatten die größte räumliche Ausdehnung (Abb. 4.2, oben links). Diese verringerte sich in P4 (Abb. 4.2, oben Mitte). In P5 setzte sich der Rückgang der Ausdehnung jedoch in weitaus drastischerer Weise fort (Abb. 4.2, oben rechts).

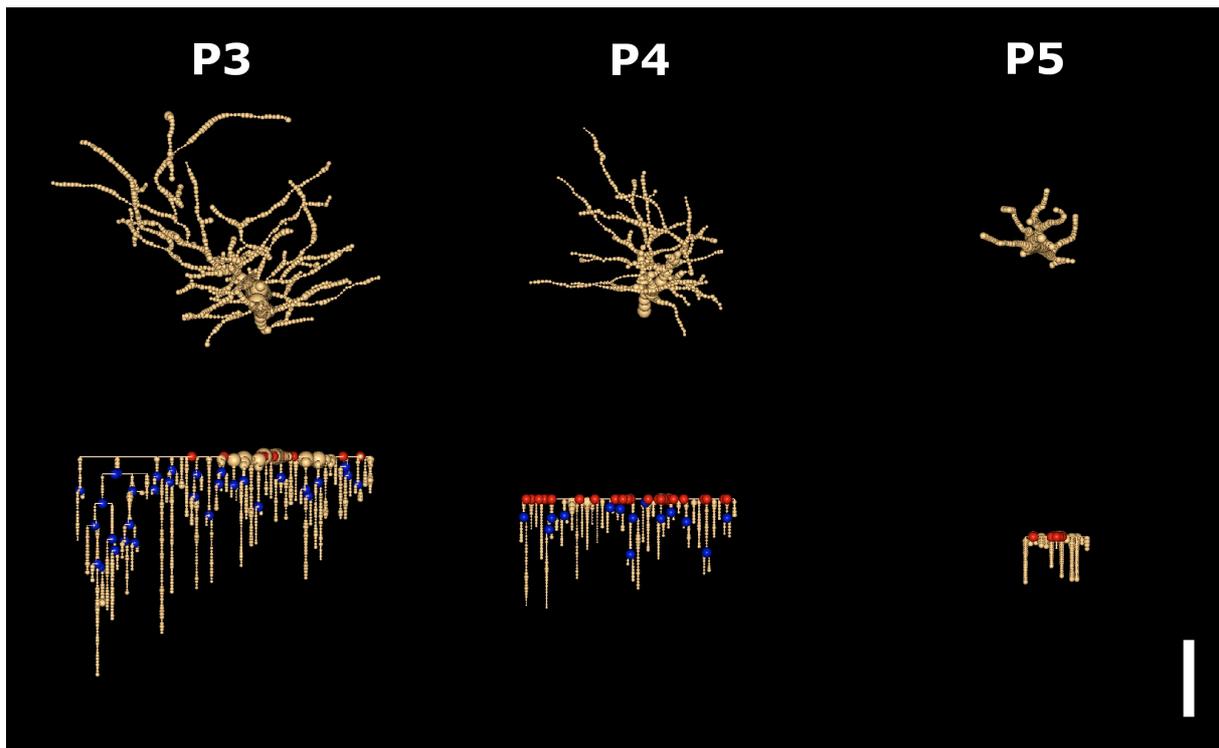


Abb. 4.2: Dreidimensionale Rekonstruktionen von Dendritenabschnitten ermöglichen die Erhebung präziser morphometrischer Daten über die entwicklungsabhängige Verkürzung von Filopodien. Repräsentative Beispiele für Filopodien an der Spitze von Dendriten in P3 bis P5. Obere Reihe: Projektionsansichten der 3D-Rekonstruktionen. Untere Reihe: Nach Verzweigungsordnung sortierte Dendrogramme zeigen die entwicklungsabhängige Verringerung von Filopodienlänge und -komplexität. Ausgewählte Abzweige vom Dendriten sind rot markiert, Verzweigungen innerhalb eines Filopodiums blau. Insbesondere die Verkürzung der maximalen Weglänge (MWL, Abstand vom Filopodienursprung, rot, zum weitest entfernten, unteren Punkt auf dem Filopodium) wird deutlich. Balken: 5 μ m.

Damit einhergehend verringerte sich für die gezeigten Beispiele auch die Komplexität der Filopodien, was die Zahl der dargestellten Verzweigungspunkte demonstriert (Abb. 4.2, untere Reihe, blau markiert). Waren in P3 und P4 mehrfach verzweigende Filopodien zahlreich, so bestanden Filopodien in P5 meist nur aus einem Segment. Ähnlich deutlich wird die Verringerung der maximalen Weglänge innerhalb des nur dreitägigen Wachstumsmodus (Abb. 4.2 untere Reihe: Abstand vom Ursprung eines Filopodiums – obere Linie mit roten Markierungen - zum am weitesten unten befindlichen Punkt eines Filopodiums).

Schon bei Durchsicht der konfokalen Aufnahmen erschienen die Filopodien am Dendritenschaft in ihrer Form und der Längenverteilung weniger variabel als solche an der Spitze. Um zu prüfen, ob das auf die Existenz zweier, eventuell auch funktionell,

verschiedener Klassen hindeutet, wurden in als zweite Testgruppe auch Schaftfilopodien rekonstruiert und definiert als Abzweige von einem geraden, mindestens 10 μm langen, unverzweigten Dendritensegment (vgl. auch oben: Definition für Filopodien).

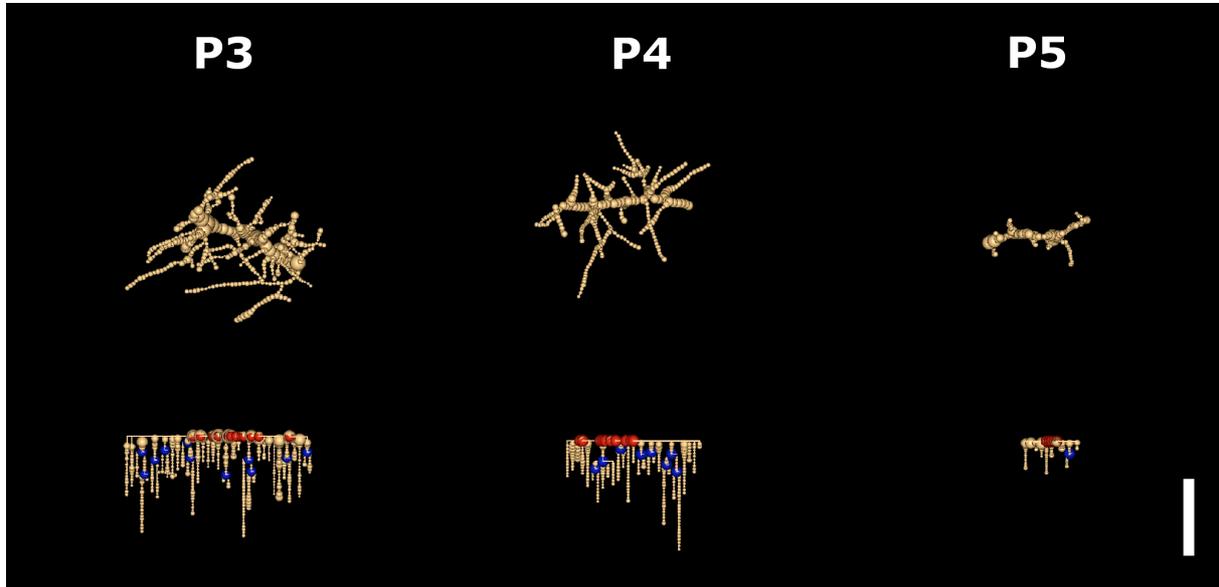


Abb. 4.3: Filopodien am Dendritenschaft erscheinen weniger komplex und kürzer als die an der Spitze (exemplarische dreidimensionale Rekonstruktionen aus P3, P4, P5). Obere Reihe: Projektionsansichten der 3D-Rekonstruktionen. Untere Reihe: Nach Verzweigungsordnung sortierte Dendrogramme zeigen die entwicklungsabhängige Verringerung von Filopodienlänge und –komplexität (für Farbkodierung vgl. Abb. 4.2). Balken: 5 μm .

Wie auch bei den Filopodien der Spitze verringerten sich Verzweigungszahl und Längen in P4 gegenüber P3. Ein drastischer Wandel aber vollzog sich erst in P5 (Abb. 4.3, untere Reihe).

Der Vergleich von Spitzen- (Abb. 4.2) und Schaftfilopodien (Abb. 4.3) derselben Stadien weist darüber hinaus aber tatsächlich schon auf einen grundlegenden Unterschied zwischen den Klassen hin: Komplexität und Längenmaße, sind bei den dargestellten Schaftfilopodien geringer.

Inwieweit die beobachteten klassen- und entwicklungsabhängigen Unterschiede auch bei Betrachtung einer großen Stichprobenmenge manifest sind, demonstrieren die Abbildungen 4.4 bis 4.7.

Für den statistischen Vergleich wurden drei verschiedene Längenmaße ausgewertet. Die Gesamtlänge eines Filopodiums (LG) ist bei einfachen Filopodien gleich der Länge des einzigen Segments. Bei mehrfach verzweigenden Filopodien ist sie gleich der Summe aller Segmente, die einem gemeinsamen Segment erster Ordnung entstammen, also einem einzigen

vom Dendriten abspaltenden Ursprung besitzen. Die maximale Weglänge (MWL) ist die Strecke zum am weitesten vom Dendriten entfernten Punkt eines einzelnen Filopodiums. Die Segmentlänge (SL) ist die Strecke zwischen zwei Verzweigungspunkten oder zwischen Verzweigungs- und Endpunkt eines einzelnen Segments. LG soll hier die gesamte Suchstrecke repräsentieren, mit der ein Filopodium die Umgebung auf putative Ziele prüft. MWL bezeichnet die maximale Entfernung des Sondierungsgebietes eines Filopodiums vom Dendriten. Die Analyse der Segmentlänge schließlich könnte einen Hinweis auf generelle Bauprinzipien von Filopodien geben, nämlich, ob es eine Vorzugslänge bei Filopodien gibt, ab der ein Segment, statt sich weiter auszustrecken, eher neue Segmente abspaltet.

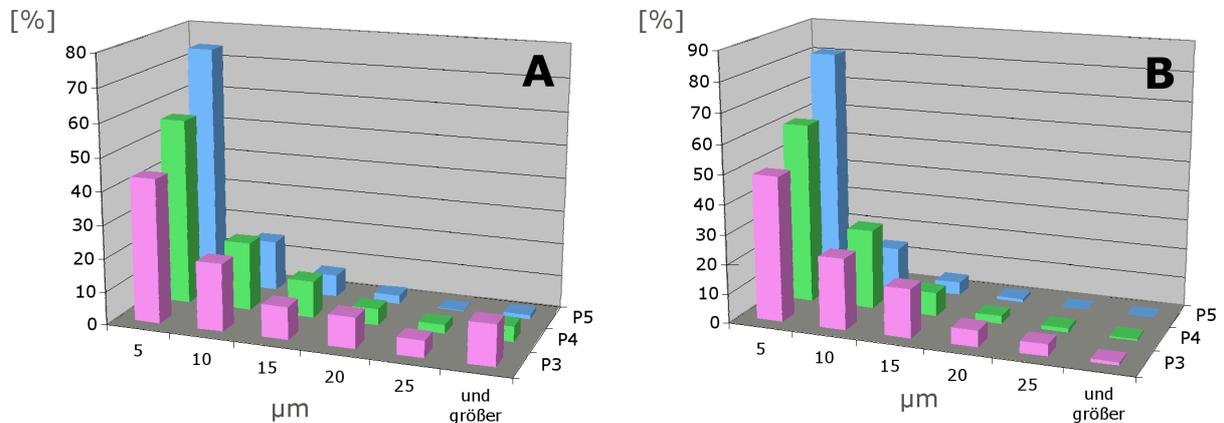


Abb. 4.4: *Dendritische Filopodien zeigten eine große Gestaltvielfalt.* Prozentualer Anteil der Filopodien verschiedener Längensklassen (Filopodiengesamtlänge; LG) an Dendritenspitzen (A) und -schäften (B) in P3 (rosa), P4 (grün) und P5 (blau). In allen Entwicklungsstadien waren Filopodien mit weniger als 5 µm LG am häufigsten (Klasse: 5 µm). Während fortschreitender Entwicklung nahm der relative Anteil dieser kürzeren Filopodien zu. Der Anteil langer Filopodien war bei Filopodien des Schaftes geringer als bei denen der Spitze, das gilt insbesondere für frühe Stadien (P3, P4). Stichprobenumfang: (A) P3: n=295 an N=16 Dendritensegmenten; P4: n=383; N=20; P5: n=392; N=36. (B) P3: n=281; N=15; P4: n=276; N=23; P5: n=215; N=11.

4.2.3 Die entwicklungsabhängige Verkürzung der Gesamtlänge von Filopodien

Wie schon beschrieben unterschieden sich Filopodien hinsichtlich ihrer Länge als auch hinsichtlich ihrer Komplexität. Die Gesamtlänge eines Filopodiums (LG) ist nicht nur ein einfaches Längenmaß, sondern wird auch durch die Komplexität eines Filopodiums bestimmt: Unterschiede von Segmentlängen als auch Unterschiede der Segmentzahl führen zu

unterschiedlichen LG und werden durch dessen Berechnung berücksichtigt.

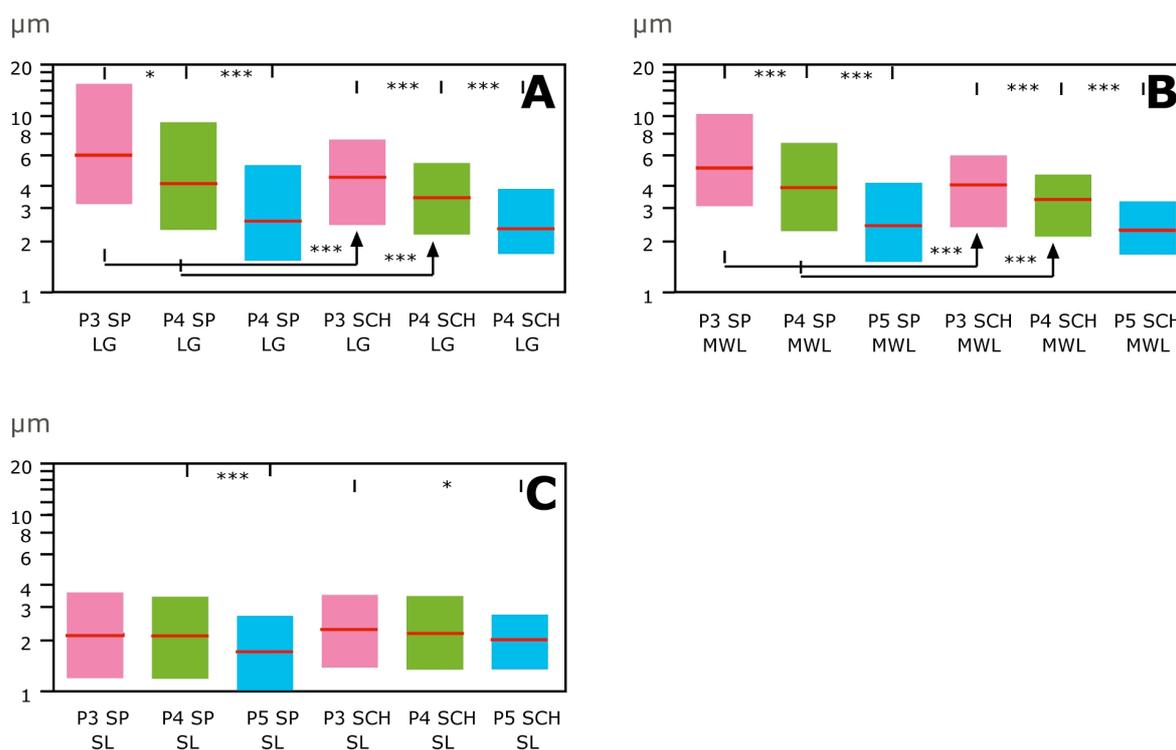


Abb. 4.5: Während fortschreitender Entwicklung traten zunehmend kürzere Filopodien auf. Längenunterschiede belegen die Existenz morphometrisch verschiedener Klassen dendritischer Filopodien. Mediane und Quartile der Gesamtlänge (LG, A), der maximalen Weglänge (MW, B) und der Segmentlänge (SL, C). **A entwicklungsabhängige Verringerung der Mediane für die LG.** Filopodien der Dendritenspitze (SP): P3 Median (M) = 6,0 µm; n=295 an N=16 Dendritensegmenten; P4 M=4,1 µm; n=383; N=20. P5 M=2,5µm; n=392; N=36. **Schaftfilopodien (SCH):** P3 M=4,5µm n=281; N=15; P4 M=3,4 µm; n=276; N=23), P5 M=2,3 µm; n=215; N=11. **B entwicklungsabhängige Verringerung der Mediane für die MWL.** Filopodien der Dendritenspitze P3 M=5,1 µm; n=304; N=16; P4 M=3,9 µm n=383; N=20; P5 M=2,4 µm; n=392; N=36. **Schaftfilopodien:** P3 M=4,1µm; n=281; N=15; P4 M=3,4 µm; n=276; N=23; P5 M=2,2 µm; n=215; N=11. **C Im Gegensatz zu LG und MW verkürzte sich die SL erst in P5.** Filopodien an der Spitze: P3 M=2,1µm; n=1304; N=16; P4 M=2,0µm; n=1029; N=20; P5 M=1,6µm; n=747; N=3.6. **Schaftfilopodien:** P3 M=2,2µm; n=606; N=15; P4 M=2,1µm; n=478; N=23; P5 M=1,9µm; n=298; N=11. (* P<0,05; *** P<0,001; Wilcoxon Test/Bonferroni's p-value adjustment)

Abbildung 4.2 zeigt anschaulich die Variabilität der Gesamtlänge (LG) für Spitzen- (Abb. 4.4 A) und Schaftfilopodien (Abb. 4.4 B). Für alle Stadien sind jeweils mehr als 40% der Filopodien nur 1-5 µm lang. Für beide Typen erhöht sich der prozentuale Anteil innerhalb dieser Klasse von P3 nach P5 deutlich: bei Filopodien an der Dendritenspitze von 43,4 auf 74,1% (Abb. 4.4 A, rosa vs. blau), bei denen am Schaft von 49,0 auf sogar 80,7% (Abb. 4.4 B, rosa vs. blau). In allen Stadien und bei beiden Typen waren die Klassen mit Längen über 5 µm deutlich geringer besetzt und mit fortschreitender Entwicklung verschoben sich die

Verteilungen hin zu kürzeren Längen. Nur bei Filopodien der Dendritenspitze und nur in P3 waren Filopodien mit einer LG > 25 µm zahlreich (12,2%; Abb. 4.4 A, rosa).

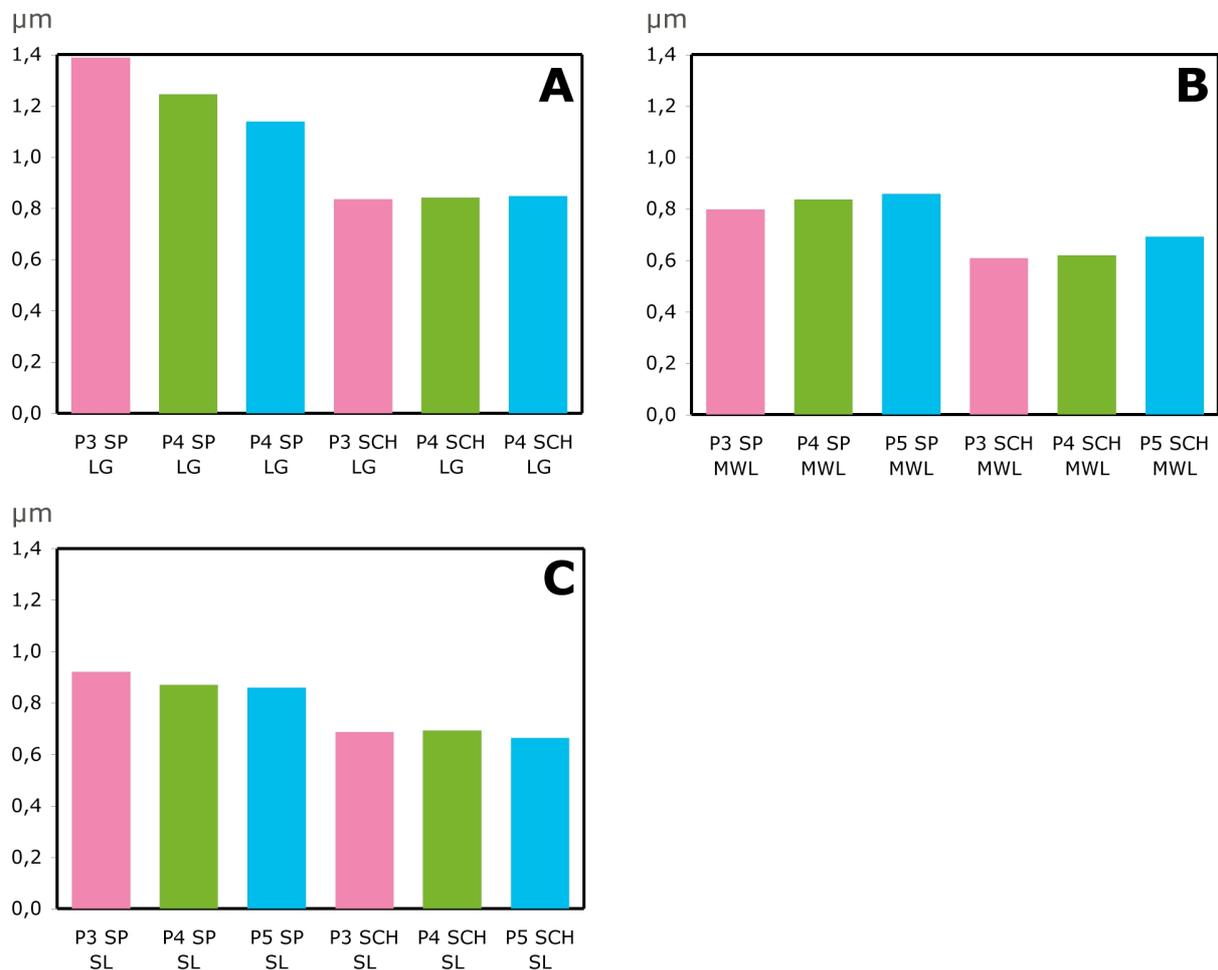


Abb. 4.6 Unterschiedliche relative Variabilitäten von Spitzen- (SP) und Schaftfilopodien (SCH) deuten auf eine unterschiedliche Regulationsstärke an verschiedenen Abschnitten des Dendritenbaums hin. Die Verteilung der Längen war bei Schaftfilopodien weniger variabel. **A** Die Variationskoeffizienten ($VK = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}$) der Gesamtlänge verringerten sich nur bei Filopodien der Spitze und waren hier größer als die von Schaftfilopodien. **B** Die VK der Maximalen Weglänge waren bei Schaftfilopodien geringer. **C** Auch die VK der Segmentlänge waren bei Schaftfilopodien geringer, änderten sich bei beiden Filopodientypen jedoch nicht. (Für den Stichprobenumfang vgl Abb. 4.5)

Unterschiede zwischen Spitzen- und Schaftfilopodien fanden sich vor allem für die Klassen mit Filopodien länger als 15 µm und vor allem in den Stadien P3 und P4 (Abb. 4. A vs. B, rosa und grün).

In Abbildung 4.5 A sind die Mediane und Quartile für die Verteilungen aus Abbildung 4.4 A & B aufgetragen. Der Median der Filopodiengesamtlänge (LG) an der Spitze war in P3 am größten von allen Werten (Median: 6,0 µm; Mittelwert: $12,5 \pm 17,4 \mu\text{m}$; $n=295$ an $N=16$ Dendritensegmenten). Einen Tag später war die LG dieses Typs bereits signifikant verringert

($P < 0,05$; Median: $4,1\mu\text{m}$; Mittelwert: $7,6\pm 9,5\mu\text{m}$; $n=383$; $N=20$). Diese Verringerung setzte sich fort und der Unterschied zwischen P4 und P5, als auch zwischen P3 und P5 war hoch signifikant ($P < 0,0001$; Median: $2,5\mu\text{m}$; Mittelwert: $4,3\pm 4,9\mu\text{m}$; $n=392$; $N=36$).

Schaftfilopodien verkürzten sich innerhalb der dreitägigen Entwicklung ebenfalls signifikant ($P < 0,001$). Der Median der LG betrug in P3 noch $4,5\mu\text{m}$ (Mittelwert: $5,9\pm 5,0\mu\text{m}$; $n=281$; $N=15$), in P4 $3,4\mu\text{m}$ (Mittelwert: $4,5\pm 3,8\mu\text{m}$; $n=276$; $N=23$), in P5 dagegen nur noch $2,3\mu\text{m}$ (Mittelwert: $3,2\pm 2,7\mu\text{m}$; $n=215$; $N=11$).

Wie schon der Unterschied der Verteilungen von Spitzen- und Schaftfilopodien nahe legte (Abb. 4.4 A vs. B, jeweils rosa vs. rosa; grün vs. grün), zeigte auch der statistische Test, dass die LG bei P3- und P4-Schaftfilopodien signifikant kürzer waren als die entsprechenden LG von Filopodien an der Spitze ($P < 0,001$).

4.2.4 Auch die maximale Entfernung der Filopodien vom Dendriten (MWL) verkürzt sich entwicklungsabhängig

Ein Filopodium mit vielen Verzweigungen, dessen einzelne Segmente sich aber nur wenig entfernen vom Dendriten, kann theoretisch dieselbe Gesamtlänge aufweisen, wie ein unverzweigtes, aber entsprechend längeres Filopodium. Als Maß für die größte „Suchdistanz“, d.h. die größte Strecke, mit der sich ein Filopodium vom Dendriten entfernt, wurde deshalb auch die maximale Weglänge (MWL) berechnet. Dies erschien insofern sinnvoll als Verzweigung und Ausstrecken durch verschiedene Mechanismen reguliert werden könnten und mit der MWL das Ausstrecken gemessen wird.

Abbildung 4.5 B zeigt Unterschiede der maximalen Weglänge sowohl zwischen verschiedenen Stadien als auch zwischen den beiden Typen eines Stadiums. Bei beiden Filopodientypen verringerte die MWL in ähnlicher entwicklungsabhängiger Weise wie die LG. Die Werte der LG waren aber, wie angenommen (s.o.), in der Regel geringer.

Der Median der MWL von Filopodien der Spitze war in P3 am längsten (Median: $5,1\mu\text{m}$; Mittelwert: $7,2\pm 5,8\mu\text{m}$; $n=304$; $N=16$), verringerte sich in P4 auf $3,9\mu\text{m}$ (Mittelwert: $5,3\pm 4,5\mu\text{m}$; $n=383$; $N=20$) und weiter in P5 auf $2,4\mu\text{m}$ (Mittelwert: $3,5\pm 3,0\mu\text{m}$; $n=392$; $N=36$). Ähnlich, und ebenso in allen Fällen signifikant ($P < 0,001$), verringerten sich die LG bei Schaftfilopodien von P3 (Median: $4,1\mu\text{m}$; Mittelwert: $4,6\pm 2,8\mu\text{m}$; $n=281$; $N=15$) über P4 (Median: $3,4\mu\text{m}$; Mittelwert: $3,7\pm 2,3\mu\text{m}$; $n=276$; $N=23$) nach P5 mit einem Median von nur noch $2,2\mu\text{m}$ (Mittelwert: $2,9\pm 2,0\mu\text{m}$; $n=215$; $N=11$).

Wiederum, beim Vergleich von Spitzen- mit Schaftfilopodien, zeigte sich zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied in P3 und P4 ($P < 0,001$).

4.2.5 Hinweise auf unterschiedliche Wachstumsregulation von Filopodien an der Dendritenspitze und am Dendritenschaft

Wie schon in der Einleitung erwähnt, belegt eine neuere Untersuchung an Pyramidenzellen des Neocortex von Mäusen (Portera-Cailliau et al., 2003), dass Spitzen- und Schaftfilopodien durch unterschiedliche Mechanismen kontrolliert werden. Ob es sich dabei um ein generelles Charakteristikum von Neuronen handelt ist nicht bekannt.

Ähnlich der oben genannten Untersuchung, legen auch die in den voran gegangenen Kapiteln dargestellten morphometrischen Unterschiede die Existenz von qualitativ unterschiedlichen Regulationsmechanismen an den Filopodientypen auch eines Invertebraten, nämlich *Manduca sexta*, nahe. Im Folgenden soll darüber hinaus untersucht werden, ob auch die Regulationsstärke unterschiedlich ist. Eine stärkere Regulation kann die Variabilität von Strukturen verringern. Ein vernünftiges Maß dafür ist der Variationskoeffizient (VK. Der VK kompensiert für typen- und entwicklungsabhängige absolute Längenunterschiede. $VK = \text{Standardabweichung} \div \text{Mittelwert}$. Das heißt er normiert gewissermaßen die Varianz bzw. die Standardabweichung auf den Mittelwert.) Kleine Werte für den VK, d.h. eine geringere relative Variabilität sollten derart auf eine stärkere Regulation hindeuten.

Abbildung 4.6 zeigt die VK für die beiden Filopodientypen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Für alle drei Längenmaße (GL: Abb. 4.6 A, MWL: Abb. 4.6 B, SL: Abb. 4.6 C) wird klar, dass die VK von Filopodien der Spitze größer waren als die des Schafts. Die deutlichsten Unterschiede fanden sich für die Gesamtlänge der beiden Filopodientypen (GL, Abb. 4.6 A) und hier insbesondere für P3 und P4.

Vereinfachend ausgedrückt bedeutet das: Schaftfilopodien waren nicht nur kürzer (in P3 und P4, vgl. die beiden vorangegangenen Kapitel), sondern ihre Längen waren auch einheitlicher. Qualitativ oder quantitativ unterschiedliche Steuerungsprozesse könnten demnach die Formvielfalt von Schaftfilopodien stärker beschränkt haben, ihr Wachstum also in engere Grenzen zwingen.

Abbildung 4.6 veranschaulicht auch, dass die relative Variabilität von Schaftfilopodien während der Entwicklung kaum Änderungen erfuhr. Bei Filopodien der Spitze war eine deutliche entwicklungsabhängige Verringerung des VK dagegen für die Gesamtlänge festzustellen (Abb. 4.6 A).

4.2.6 Der zweiphasige Entwicklungsmodus von Filopodien der Dendritenspitze

Die Segmentlänge ist das einzige Längenmaß, in das die Verzweigungszahl nicht einfließt (Abb. 4.5 C). Deshalb eröffnet der Vergleich von Gesamtlänge (GL, Abb. 4.5 A) und Segmentlänge (SL) die Möglichkeit, den Einfluss von Verzweigungs- und Längenwachstum näherungsweise separieren zu können.

Im Gegensatz zu GL und MWL, die sich von P3 zu P4 jeweils signifikant verkürzten, blieb die Segmentlänge sowohl bei Spitzen- als auch bei Schaftfilopodien etwa gleich (Filopodien an der Spitze: **P3** - Median: 2,1µm; Mittelwert: 2,9±2,7µm; n=1304; N=16; **P4** - Median: 2,0µm; Mittelwert: 2,8±2,4µm; n=1029; N=20. Schaftfilopodien: **P3** - Median: 2,2µm; Mittelwert: 2,7±1,9µm; n=606; N=15; **P4** - Median: 2,1µm; Mittelwert: 2,6±1,8µm; n=478) N=23; keine signifikante Veränderungen von P3 nach P4).

Das bedeutet: Die Verkürzung der Gesamtlänge (Segmentlänge und Filopodienzahl) unter Beibehaltung der Segmentlänge (nur Länge) ist ein starkes Indiz für einen Entwicklungsmodus in P3 und P4, der über die Verringerung der Verzweigungspunkte reguliert wird.

In P5 dagegen kam es bei beiden Filopodientypen zu einer Verkürzung der Segmentlänge (an der Spitze: Median: 1,6µm; Mittelwert: 2,2±1,9µm; n=747; N=36; am Schaft: Median: 1,9µm; Mittelwert: 2,3±1,5µm; n=298; N=11). Diese war jedoch nur für Filopodien der Spitze signifikant ($P < 0,001$). Bei Schaftfilopodien war ein signifikanter Unterschied lediglich für P3 nach P5 feststellbar ($P < 0,05$), nicht aber für P4 nach P5.

Zumindest also für Filopodien der Spitze scheint ein zweiphasiger Entwicklungsmodus zu existieren: (i) Von P3 nach P4 beruht die Verkürzung der Filopodiengesamtlänge vor allem darauf, dass neugebildete Filopodien in P4 weniger verzweigten. (ii) In P5 aber erreichten auch die Segmentlängen neu gebildeter Filopodien nicht mehr die Länge früherer Stadien, wurden kollektiv zurückgezogen oder kollabierten.

Dagegen war keine signifikante Verkürzung der Segmentlängen zwischen zwei aufeinander folgenden Stadien bei Schaftfilopodien festzustellen, im Gegensatz zur Gesamtlänge. Das deutet für Schaftfilopodien auf einen Entwicklungsmodus hin, der generell eher über die Verzweigungszahl reguliert wird (i).

4.2.7 Die Filopodiendichte wird unterschiedlich reguliert bei beiden Filopodientypen

Filopodien verschwanden beim Übergang von P5 nach P6 nahezu vollständig. Ein vorstellbarer Grund dafür ist das kollektive Zurückziehen, oder anders ausgedrückt ein synchronisierter Kollaps dieser Strukturen zu diesem Zeitpunkt. Deshalb wurde auch die Regulierung der Dichte von Filopodien (Filopodienzahl/ μm) für sämtliche drei Stadien vor P6 untersucht (Abb. 4.7).

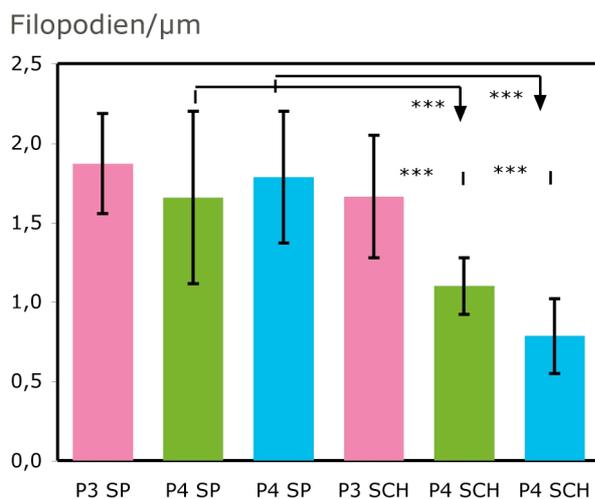


Abb. 4.7 Die Dichte von Filopodien (Filopodien/ μm der Dendritenmittellinie) der Spitze blieb während der Entwicklung etwa konstant. Die Filopodiendichte am Schaft verringerte sich dagegen in etwa kontinuierlicher Weise von P3 nach P5. Fehlerbalken: Standardabweichung. (***) $P < 0,001$; t-Test nach Student)

Die Dichte von Filopodien an der Spitze blieb von P3 nach P4 etwa gleich. Im Unterschied dazu verringerte sich die Dichte der Schaftfilopodien auch schon von P3 nach P5 signifikant ($P < 0,001$). Die Dichte und mithin die Zahl der Filopodien dieses Typs verringerte sich also in einer weitaus kontinuierlicheren Weise und beginnt weit vor dem Verschwinden in P6.

4.3 Diskussion

Wachstumsprozesse von Filopodien wurden mehrfach in artifiziellen Ansätzen untersucht, beispielsweise in dissoziierter Zellkultur (Ziv und Smith, 1996) oder in organotypische Kultur (Dailey und Smith, 1996). Die vorliegende Studie analysiert dagegen entwicklungsabhängige Veränderungen morphometrischer Parameter an fixiertem Material des intakten ZNS von *Manduca sexta*. Neue dreidimensionale Rekonstruktionsverfahren ermöglichten hier darüber hinaus die sehr präzise Bestimmung morphometrischer Daten.

Entwicklungsabhängige morphometrische Veränderungen

Während des frühen postembryonalen Umbauprozesses (P3-P5) waren die auswachsenden Dendriten dicht mit Filopodien besetzt. Filopodien waren vielgestaltig in der Form und insbesondere in P3 und P4 oft sehr komplex. Das mehrfache Verzweigen und die gebogenen Verläufe sind möglicherweise typisch für dendritische Filopodien. So sind Filopodien an axonalen Wachstumskegeln von Pyramidenneuronen im Gegensatz zu dendritischen Auswüchsen derselben Neurone seltener gebogen und verzweigen fast nie (Portera-Cailliau et al., 2003).

Zwar waren die Längen einzelner Filopodien in jedem Stadium sehr variabel, trotzdem zeigte die Analyse einer großen Zahl dieser Strukturen eine deutliche Verkürzung innerhalb der Gesamtheit der Filopodien. Das bedeutet: Die immer wieder neu gebildeten Strukturen unterliegen während zunehmender Reifung der Zelle einem generellen Trend zu kürzerer Länge und geringerer Komplexität. Das ist insofern nicht trivial, als Filopodien sehr schnell wachsen (Pyramidenzellen beispielsweise mit $2,5 \mu\text{m}/\text{min}$; Dailey und Smith, 1996) und einem hohen *turnover* unterliegen (Zyklusdauer $< 0,5$ Stunden, ebenfalls Dailey und Smith, 1996).

Die in dieser Arbeit für ein postembryonales Invertebratenneuron gezeigte entwicklungsabhängige Komplexitäts- und Längenabnahme von Filopodien ist in guter Übereinstimmung mit einer jüngeren Studie an Vertebraten (Pyramidenzellen des visuellen Cortex). Mittels *Zwei-Photonen-Live-Imaging* zeigen Portera-Cailliau (2003) für das embryonale Wachstum ebenfalls eine Verkürzung und Dichteabnahme. Ein Unterschied der beiden Untersuchungen liegt jedoch darin, dass sich die Filopodiendichte der Spitze in *Manduca* während der Entwicklung nicht änderte (Abb. 4.7).

Die generell kürzere Erscheinung von Filopodien in P4 und mehr noch in P5 weist auf eine eventuell globale Veränderung von Regulationsmechanismen in Folge zunehmender Zell- und Netzwerkeifung hin. Eine in diesem Kontext wichtige, aber noch offene Frage ist, wie sehr zellintrinsische (Reifung des MN5) und -extrinsische Faktoren zu den morphometrischen Veränderungen beitragen. Wichtig wäre dafür beispielsweise ein vergleichender Ansatz, der diesen Ergebnissen Entwicklungsveränderungen an vereinzelt Zellen gegenüberstellt.

Ein wichtiger extrinsischer Wachstumsregulator mit weiträumiger Wirkung ist 20-HE. Die Konzentrationen dieses Ecdysteroids durchlaufen ein transientes Maximum genau zu jenem Zeitpunkt (Bollenbacher et al., 1981), an dem Filopodien des MN5 erstmalig postembryonal erscheinen (P3) und die in der Regel am längsten sind (Abb. 4.5). Die Wachstumskegel isolierter Beinmotoneurone von *Manduca* (Matheson und Levine, 1999) erfahren während

einer 14 Tage dauernden Zellkultur keine signifikanten morphometrischen Veränderungen, ein Hinweis darauf dass zellinterne Reifungsprozesse kaum Auswirkungen auf das Filopodienwachstum haben. Dagegen führte der Zusatz von 20-HE im gleichen Zeitraum zu einer deutlichen Zunahme von Verzweigungszahl und Länge bei Wachstumskegeln. Ein wesentlicher Unterschied, der die Vergleichbarkeit der Arbeit von Matheson und Levine mit den hier vorgestellten Daten allerdings einschränkt ist, dass in Zellkultur keine Unterscheidung axonaler und dendritischer Neuriten möglich ist. Die gezeigten Veränderungen könnten mithin möglicherweise nur auf einen der beiden Typen zutreffen, da axonale und dendritische Strukturen evtl. unterschiedlich reguliert werden (vergleiche zum Beispiel Yamada et al., 2005: gegensätzliches Antwortverhalten dendritischen und axonalen Wachstums auf cAMP). Zum andern mag es sein, dass bestimmte Zellreifungsprozesse nur in vivo, also im Gewebeverband manifest werden.

Ein anderer wichtiger extrinsischer Regulator, der das Filopodienwachstum in *Manduca* beeinflussen könnte, ist Stickstoffmonoxid (NO). Es ist bekannt, dass NO die Zielfindung von Neuronen (Haase und Bicker, 2003) als auch die Synaptogenese (Gibbs & Truman, 1998) kontrolliert. Außerdem bewirkt NO in der Regel die Retraktion von Filopodien (Ernst et al., 2000).

Darüberhinaus ist von Vertebraten bekannt, dass die Filopodienlänge ebenfalls kontrolliert wird durch präsynaptischen Kontakt (Konur und Yuste, 2004) und synaptisch induzierte Aktivität (Lohmann et al., 2005; Portera-Cailliau et al., 2003). Alle diese Mechanismen tragen in möglicherweise konzertierter Aktion zu den gezeigten entwicklungsabhängigen Längen- und Komplexitätsverringern in *Manduca* bei, einige eher lokal und synapsen- bzw. kontaktspezifisch andere eher weiträumig (20-HE).

Die zwei Typen dendritischer Filopodien

Die morphometrische Analyse erbrachte vier Indizien für die Existenz von wenigstens zwei verschiedenen dendritischen Filopodientypen für ein Motoneuron von *Manduca sexta*. Filopodien der Spitze waren im Unterschied zu denen des Schaftes signifikant kürzer und weniger verzweigt (Abb. 4.5). Nur die Dichte von Schaftfilopodien verringerte sich während der Entwicklung (Abb. 4.7). Die Längen von Filopodien der Spitze variierten über einen größeren Bereich (Abb. 4.6) und nur bei Filopodien der Spitze deutet der Vergleich von Gesamtlänge und Segmentlänge auf einen zweiphasigen Entwicklungsmodus hin.

Die Variationskoeffizienten der Segmentlängen von Schaftfilopodien waren geringer als von

denen an der Spitze. Zwar erlauben die hier gezeigten Daten von fixierten *Manduca*-Ganglien keinen direkten Vergleich der Motilität von Filopodien, aber die geringeren Variationskoeffizienten (Abb. 4.6 C) sind möglicherweise auch Ausdruck generell geringerer Wachstumsgeschwindigkeiten bei Schaftfilopodien (Populationen gleich schnell auswachsender, unverzweigter Strukturen sollten gleiche Variationskoeffizienten zeigen, auch bei unterschiedlicher absoluter Länge). Alternativ können internodiale und Endsegmente beider Typen unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen. Der beobachtbare höhere Anteil von sehr langen Endsegmenten bei Filopodien der Spitze würde sich dann ebenfalls in einem größeren Variationskoeffizienten ausdrücken.

Zusammenfassung und Ausblick:

Ausschließlich während früher Stadien der Metamorphose von *Manduca sexta* waren die auswachsenden Dendriten des Motoneurons MN5 dicht besetzt mit Wachstumskegeln und Filopodien. Während zunehmender Reifung des MN5 in diesen Stadien zeigten die dendritischen Filopodien einen generellen Trend zu kürzerer Länge und geringerer Komplexität. Anhand von Strukturunterschieden und ungleichem entwicklungsabhängigen Wachstum ließen sich zwei Filopodientypen unterscheiden. Das deutet auf verschieden wirksame Regulationsmechanismen hin, die an der Dendritenspitze und am Dendritenschaft wirken. Die hier dargestellten Resultate bildeten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen. So eröffnete die Kombination der morphometrischen Daten und immunzytochemischer Synapsenmarkierung die Möglichkeit, die Translokation präsynaptischer Terminale in Richtung des Dendriten zu erklären und mit der Synaptogenese in Beziehung zu setzen. Filopodien an der Dendritenspitze wachsen demgemäß synaptotroph. Die Relokation von Präsynapsen entlang von Schaftfilopodien lässt sich dagegen durch interaktives aufeinander zu Bewegen von prä- und postsynaptischem Partner erklären (Evers et al., 2006).

4.4 Literatur

- Beattie CE** (2000) Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. *Brain Res Bull.* 53:489-500.
- Bollenbacher, WE, Smith SL, Goodman W, Gilbert LI** (1981) Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrin* 44(3):302-306.
- Booker R, Babashak J, Kim JB** (1996) Postembryonic neurogenesis in the central nervous system of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. I. Neuroblast arrays and the fate of their progeny during matamorphosis. *J Neurobiol* 29:233-48.
- Charron F, Tessier-Lavigne M** (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development.* 132:2251-62
- Consoulas C, Duch C, Bayline RJ, Levine RB** (2000) Behavioral transformations during metamorphosis: remodeling of neural and motor systems. *Brain Res Bull* 53(5):571-583.
- Dailey ME, Smith SJ** (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16(9):2983-94.
- Duch C, Levine, R. B.** (2000) Remodeling of membrane properties and dendritic architecture accompanies the postembryonic conversion of a slow into a fast motoneuron. *J Neurosci* 20(18):6950-6961.
- Duch C, Mentel T** (2004) Activity affects dendritic shape and synapse elimination during steroid controlled dendritic retraction in *Manduca sexta*. *J Neurosci* 24(44):9826-9837.
- Ernst AF, Gallo G, Letourneau PC, McLoon SC** (2000) Stabilization of growing retinal axons by the combined signaling of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 20:1458-69. *J Neurosci.* 2000 Feb 15;20(4):1458-69.

Evers, JF, Muench D, Duch C (2006) Developmental relocation of presynaptic terminals along distinct types of dendritic filopodia *Dev Biol* (angenommenes Manuskript)

Evers JF, Schmitt S, Sibila M, Duch C (2005) Progress in functional neuroanatomy: Precise automatic geometric reconstruction of neuronal morphology from confocal image stacks. *J Neurophysiol* 93(4):2331-2342.

Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area ca1. *J Neurosci* 18(21):8900-8911.

Gibbs SM, Truman JW (1998) Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron* 20:83-93.

Gomez, TM, Dagan D, Spitzer NC (1999). Regulation of growth cone cytoskeletal dynamics by calcium transients. *Mol Biol Cell* 10:27A.

Gomez TM, Robles E, Poo MM, Spitzer NC (2001) Filopodial calcium transients promote substrate- dependent growth cone turning. *Science* 291(5510):1983-1987.

Gomez TM, Spitzer NC (2000) Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives. *J Neurobiol* 44(2):174-183.

Haase A, Bicker G (2003) Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo *Development* 130:3977-87.

Hua JY, Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* 7:327-32.

Kater SB, Rehder V (1995) The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* 5:68

Kater SB, Shibata A (1994) The unique and shared properties of neuronal growth cones that

enable navigation and specific pathfinding. *J Physiol Paris*, 88(3):155-163.

Kent KS, Levine RB (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.

Konur S, Yuste R (2004) Imaging the motility of dendritic protrusions and axon terminals: roles in axon sampling and synaptic competition. *Mol Cell Neurosci* 27(4):427-440.

Levine RB, Morton DB, Restifo LL (1995) Remodeling of the insect nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5(1):28-35.

Levine RB, Weeks JC (1996) Cell culture approaches to understanding the actions of steroid hormones on the insect nervous system. *Dev Neurosci* 18(1-2):73-86.

Libersat F, Duch C (2002). Morphometric analysis of dendritic remodeling in an identified motoneuron during postembryonic development. *J Comp Neurol* 450(2):153-166.

Lohmann C, Finski A, Bonhoeffer T (2005) Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia. *Nat Neurosci* 8(3):305-312.

Matheson SF, Levine RB (1999) Steroid hormone enhancement of neurite outgrowth in identified insect motor neurons involves specific effects on growth cone form and function. *J Neurobiol* 38(1):27-45.

Miller M, Peters A (1981) Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 203:555-73.

Montague PR, Friedlander MJ (1989) Expression of an intrinsic growth strategy by mammalian retinal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7223-7.

Niell CM, Meyer MP, Smith SJ (2004) In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat Neurosci* 7(3):254-260.

- Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R** (2003) Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 23(18):7129-7142.
- Portera-Cailliau C, Weimer RM, De Paola V, Caroni P, Svoboda K** (2005) Diverse modes of axon elaboration in the developing neocortex. *PLoS Biol* 3(8):e272.
- Ramón y Cajal, S** (1899, 1904). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. 3 Bände. Madrid: N. Moya. (Englische Übersetzung: (1990). *New ideas on the structure of the nervous system in man and vertebrates*, trans. N. Swanson and L. W. Swanson. Cambridge, MA: MIT Press.)
- Robles E, Gomez TM, Spitzer NC** (1999) Global and local growth cone calcium transients promote axon turning at substrate borders in vitro. *Mol Biol Cell* 10:451A.
- Rose D, Chiba A** (2000) Synaptic target recognition at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Microsc Res Tech* 49:3-13.
- Schmitt S, Evers JF, Duch C, Scholz M, Obermayer K** (2004) New methods for the computer-assisted 3-d reconstruction of neurons from confocal image stacks. *Neuroimage* 23(4):1283-1298.
- Sotelo C** (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153:225-49.
- Sotelo, C** (2002) The chemotactic hypothesis of Cajal: a century behind. *Prog Brain Res* 136:11-20.
- Streichert LC, Pierce JT, Nelson JA, Weeks JC** (1997) Steroid hormones act directly to trigger segment-specific programmed cell death of identified motoneurons in vitro. *Dev Biol* 183(1):95-107.
- Tissot M, Stocker RF** (2000) Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: the fate of neurons throughout the stages. *Progress in Neurobiology* 62(1):89-111.

- Tolbert LP, Matsumoto SG, Hildebrand JG** (1983) Development of synapses in the antennal lobes of the moth *Manduca sexta* during metamorphosis. *J Neurosci* 3(6):1158-1175.
- Trimm KR, Rehder V** (2004) Nitric oxide acts as a slow-down and search signal in developing neurites. *Eur J Neurosci.* 19:809-18.
- Truman J** (1990). Metamorphosis of the insect nervous system. In Gilbert L., Tata J, Atkinson B (Herausgeber) *Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*, Seiten: 283-320. Academic, San Diego.
- Vaughn JE** (1989) Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate. central nervous system. *Synapse* 3:255–285.
- Weeks JC, Truman JW** (1985) Independent steroid control of the fates of motoneurons and their muscles during insect metamorphosis. *J Neurosci.* 5:2290-300.
- Weeks JC, Truman JW** (1986) Hormonally mediated reprogramming of muscles and motoneurons during the larval pupal transformation of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Exp Biol* 125:1-13.
- Wu GY, Zou DJ, Rajan I, Cline H** (1999) Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. *J Neurosci* 19:4472-83.
- Yamada RX, Matsuki N, Ikegaya Y** (2005) cAMP differentially regulates axonal and dendritic development of dentate granule cells. *J Biol Chem* 280(45):38020-8.
- Yuste R, Bonhoeffer T** (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5(1):24-34.
- Ziv NE, Smith SJ** (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17(1):91-102.

