

Rst und *kirre* exprimierende
Zelltypen im optischen Lobus
von *D. melanogaster*

Diplomarbeit

angefertigt an der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Till Felix Malte Andlauer

April 2007

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Karl-Friedrich Fischbach

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	4
2 Einleitung.....	5
2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellsystem.....	5
2.2 Zeitlicher Ablauf der Entwicklung von <i>D. melanogaster</i>	5
2.3 Das visuelle System von <i>Drosophila</i>	6
2.3.1 Das Komplexauge.....	6
2.3.2 Der optische Lobus.....	7
2.4 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie.....	11
2.4.1 Allgemeines.....	11
2.4.2 IRM-Proteine.....	11
2.5 Genetische Werkzeuge.....	17
2.5.1 Das Gal4/UAS-System.....	17
2.5.2 MARCM.....	18
2.6 Zielsetzung.....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Materialien.....	23
3.1.1 Chemikalien.....	23
3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	23
3.1.3 <i>Drosophila</i> -Futtermedien.....	25
3.1.4 Enzyme.....	25
3.1.5 Molekularbiologische Kits.....	25
3.1.6 Zelllinien.....	26
3.1.7 Plasmide.....	26
3.1.8 Primer.....	26
3.1.9 Fliegenstämme.....	27
3.1.10 Antikörper.....	27
3.1.11 Geräte.....	28
3.1.12 Software.....	28
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	28
3.2.1 Agarose Gelelektrophorese.....	28
3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	29
3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29

3.2.4	Einzelfliegen-PCR.....	30
3.2.5	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Minipräp).....	31
3.2.6	Restriktionsverdau.....	31
3.2.7	pUAST-Klonierung.....	32
3.3	Erstellung des Konstruktes <i>UAS-sns-ECD</i>	33
3.3.1	Wahl der Primer.....	33
3.3.2	Amplifikation.....	33
3.3.3	Klonierung.....	35
3.4	Methoden für die Arbeit mit <i>Drosophila</i>	35
3.4.1	Fliegenhaltung.....	35
3.4.2	Fliegenkreuzung.....	35
3.4.3	Synchronisierung der Puppenentwicklung.....	36
3.5	Histologische Methoden.....	36
3.5.1	Kragentechnik.....	36
3.5.2	<i>Wholemout</i> Gehirnpräparate.....	37
3.6	Immunologische Methoden.....	38
3.6.1	Antikörperfärbung von Gehirnpräparaten.....	38
3.7	MARCM.....	38
3.7.1	Kreuzung.....	38
3.7.2	Eiablage.....	39
3.7.3	Selektion der Weibchen.....	40
3.7.4	Hitzeschock.....	40
3.7.5	Antikörper.....	41
3.7.6	Präparation.....	42
3.7.7	Bildbearbeitung.....	43
3.8	Mikroskopie.....	44
3.8.1	Konfokale Laserscan Mikroskopie.....	44
3.8.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	MARCM-Analyse der Linien NP2044 und NP2273.....	46
4.1.1	Expressionsmuster von <i>irreC-rst</i> und <i>kirre</i> in optischen Loben später Puppenstadien.....	46
4.1.2	Gal4-Expressionsmuster im optischen Lobus.....	50
4.1.3	Übersicht der untersuchten Gehirne.....	53

4.1.4 Anmerkungen zur Bestimmung der Zelltypen.....	55
4.1.5 Zelltypen der Linie NP2044.....	55
4.1.6 Zelltypen der Linie NP2273.....	71
4.1.7 Zusammenfassung und Vergleich der beiden Linien.....	81
4.2 Analyse der Linie Herpes.....	84
4.2.1 Kreuzung der Linie.....	84
4.2.2 Charakterisierung der Linie.....	86
4.2.3 MARCM-Analyse.....	89
5 Diskussion.....	95
5.1 Vollständigkeit der Liste identifizierter Zelltypen.....	96
5.2 Auswirkungen des Zeitpunkts der Hitzeschockgabe.....	97
5.3 Unterschiedlich starke <i>gal4</i> -Expression in verschiedenen Neuronen.....	97
5.4 Die geringe Zahl an markierten Retinulazellen.....	99
5.5 Übereinstimmung der Expression von <i>gal4</i> mit <i>rst</i> und <i>kirre</i>	99
5.6 Unterschiede zwischen den beiden Linien.....	101
5.7 Aufstellung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen den markierten Zelltypen.....	102
5.8 Rückschlüsse auf die Lokalisierung von Rst/Kirre innerhalb der Zellen...	103
5.9 Variabilität im Phänotyp von Herpes-Fliegen.....	106
5.10 Interpretation der Gehirn-Phänotypen von Herpes-Fliegen.....	107
5.11 Zukünftige Experimente.....	110
6 Anhang.....	111
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	111
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	114
6.3 Literaturverzeichnis.....	118
6.4 Danksagung.....	123

Die digitale Ausgabe dieser Diplomarbeit kann unter folgendem Link
heruntergeladen werden:

<http://biologie.andlauer.de/diplomarbeit.pdf>

1 Zusammenfassung

IrreC-Rst und Kirre, Zelladhäsionsmoleküle aus der Immunglobulin-Superfamilie, sind aus einer Genduplikation entstanden. Sie spielen während der Entwicklung der optischen Loben von *D. melanogaster* eine wichtige Rolle bei der axonalen Wegfindung und möglicherweise der axonalen Terminierung.

Der Fliegenstamm NP2044 trägt die Insertion *gal4*^{NP2044} stromaufwärts von *irreC-rst*, der Stamm NP2273 die Insertion *gal4*^{NP2273} stromaufwärts von *kirre*. Beide Insertionen folgen zu einem gewissen Grad dem Expressionsmuster der stromabwärts gelegenen Gene.

Mit der MARCM-Methode ist es möglich, stochastisch einzelne Zellen in einer wildtypischen Umgebung zu markieren und genetisch zu verändern.

In dieser Arbeit wurde mit der MARCM-Methode systematisch untersucht, in welchen Zelltypen der optischen Loben *gal4*^{NP2044}- und *gal4*^{NP2273}-Expression getrieben wird.

Durch den Vergleich der identifizierten Zelltypen mit der Rst- und Kirre-Immunreaktivität wurde festgestellt, daß *gal4*^{NP2044} die *rst*-Expression weitgehend widerspiegelt. *Gal4*^{NP2273} folgt dem Expressionsmuster von *kirre* hauptsächlich im distalen Lobus.

Es konnten deutliche Hinweise darauf gefunden werden, daß Rst und Kirre in die axonalen Terminalien der Neurone lokalisieren.

Die MARCM-Methode ermöglicht es, Gene in einzelnen Zellen fehlzuexprimieren oder durch RNAi herunterzuregulieren. Mit der Identifizierung der in den Gal4-Stämmen durch die MARCM-Methode häufig markierten Zelltypen wurde der Grundstein für derartige Analysen gelegt.

In der Augenentwicklung wurde bereits nachgewiesen, daß die Proteine Hbs und Rst *in trans* miteinander interagieren. Um die Interaktion von Rst und Hbs während der Entwicklung der optischen Loben untersuchen zu können, wurde ein Konstrukt zur Fehlexpression der extrazellulären Domäne von *hbs* in die Linie NP2044 eingekreuzt. In dem entstandenen Stamm wurden mutante Phänotypen in der Augen- und Gehirnentwicklung gefunden. Eine MARCM-Analyse lieferte erste Hinweise auf zellautonome Effekte der Fehlexpression, wie z.B. faszikulierte Axone in den optischen Chiasmen.

2 Einleitung

2.1 *Drosophila melanogaster* als Modellsystem

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wird *Drosophila melanogaster* mit großem Erfolg als Modellsystem eingesetzt. Über die Jahre wurden hunderte mutante Fliegenstämme beschrieben und eine umfassende Auswahl an genetischen Techniken etabliert. Mutationen und Insertionen in das Genom wurden systematisch durchgeführt. Zusätzlich zu den einfachen Haltungsbedingungen und der kurzen Generationszeit von zehn Tagen bei 25 °C sind Werkzeuge wie Balancer-Chromosomen und die Gal4/UAS-Methode für den Erfolg dieses Modellsystems verantwortlich. Neben der klassischen Entwicklungsbiologie eignet sich *Drosophila* durch den hoch geordneten und vergleichsweise simplen Aufbau des Gehirns und vor allem der optischen Loben in besonderer Weise für das Studium des Nervensystems.

2.2 Zeitlicher Ablauf der Entwicklung von *D. melanogaster*

Bei 25 °C schlüpfen die L1-Larven 24 Stunden nach der Eiablage, dieses Stadium dauert weitere 24 Stunden, ebenso wie das darauf folgende L2-Stadium (Abbildung 1). Das abschließende Larvalstadium L3 hält 48 Stunden an, kann jedoch in eine frühe und eine späte Phase unterschieden werden, die jeweils 24 Stunden dauern. Während der späten Phase wandern die Larven aus dem Futterbrei heraus und bewegen sich über die Wand der Fliegengläser, dies ist als Kriterium zur Unterscheidung der beiden Phasen hinreichend (Ashburner 1989a). Die individuelle Variabilität in der Dauer der Entwicklung beträgt zwischen dem Schlüpfen der L1-Larven und der Mitte des L3-Stadiums sechs Stunden (Ashburner 1989b).

Insgesamt 120 Stunden nach der Eiablage verpuppen sich die Larven, die Puppenstadien dauern 98-102 Stunden, danach schlüpfen die Adulttiere (Ashburner 1989c; Bainbridge und Bownes 1981).

Zur Bestimmung des Alters von Puppen wird üblicherweise die Entwicklung zu Beginn der Verpuppung synchronisiert, da die Geschwindigkeit der Individualentwicklung jedoch auch hier einer Variation von sieben Stunden

unterliegt, ist diese Methode nur begrenzt genau. Der Entwicklungsstand einer älteren Puppe ab P60 (60 % Puppenentwicklung) sollte daher zusätzlich anhand optischer Kriterien überprüft werden (siehe 3.4.3, 3.7.2 und 3.7.6; Bainbridge und Bownes 1981).

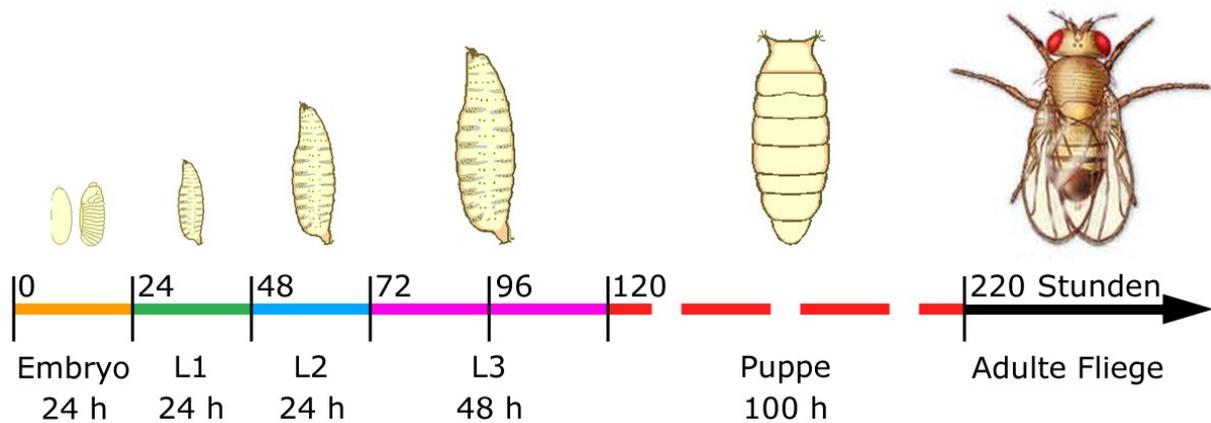


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Entwicklungsdauer von *D. melanogaster*. Die Zeitleiste ist nicht maßstabsgetreu. Angegebene Zeiten nach Ashburner 1989 bei 25 °C. Bildmaterial von WebLink1 und WebLink2.

2.3 Das visuelle System von *Drosophila*

2.3.1 Das Komplexauge

Das hoch geordnete Komplexauge von Insekten setzt sich aus ca. 750 Einzelaugen oder Ommatidien zusammen. Jedes Ommatidium besteht aus acht Photorezeptoren (Retinulazellen R1-R8), vier Kristallkegelzellen, die die Linse segregieren und zwei diese umschließenden primäre Pigmentzellen (Abbildung 2). Sekundäre und tertiäre Pigmentzellen sowie mechanosensorische Borstenzellen isolieren die Einzelaugen voneinander (Wolff und Ready 1993).

Durch die fenestrierte Membran an der Unterseite der Ommatidien gelangen die Axone der Retinulazellen zu den optischen Loben des Gehirns.

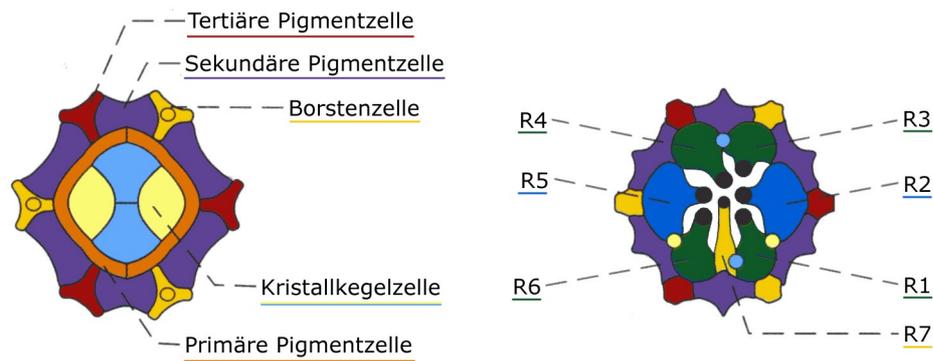


Abbildung 2: Querschnitte durch den oberen (links) und den mittleren Bereich (rechts) eines Ommatidiums, der Photorezeptor R8 beginnt noch tiefer und ist daher nicht abgebildet. Verändert nach Wolff und Ready 1993.

2.3.2 Der optische Lobus

2.3.2.1 Neuropile

Die optischen Loben von *Drosophila* bestehen aus vier Neuropilen: Der Lamina, der Medulla und dem Lobulakomplex, der sich wiederum in Lobula und Lobulaplatte unterteilen läßt. Jeweils zwischen Lamina und Medulla sowie zwischen Medulla und Lobulakomplex befinden sich Chiasmen (Abbildung 3).

Die Zellkörper der Zellen des optischen Lobus liegen in den äußeren Kortexschichten, ihre Dendriten und Terminalien in den Neuropilen.

Die Neuropile lassen sich aufgrund der Arborisierungen der verschiedenen Neurone in laterale Schichten unterteilen. Die Medulla kann mit der aus Tangentialzellen aufgebauten Serpentschicht als Grenze weiter in einen proximalen und einen distalen Teil aufgespalten werden. Proximal bedeutet hier näher am Zentralhirn gelegen, gleiches gilt für die Unterscheidung der Chiasmen in ein inneres und ein äußeres.

Die vier Neuropile sind kolumnar aufgebaut, die Zahl der Säulen entspricht hierbei der der Ommatidien. In eine Kolumne projizieren jedoch nicht die acht Retinulazellen eines einzelnen Ommatidiums, sondern jeweils die acht Rezeptoren von benachbarten Einzelaugen, die auf den selben Punkt im Raum gerichtet sind (neuronal Superposition). Der gesamte optische Lobus ist also retinotopisch aufgebaut. Sowohl von der Medulla als auch vom Lobulakomplex aus projizieren Neurone in die optischen Glomeruli des Zentralhirns.

Die Komplexität der Verarbeitung der visuellen Signale steigt von der Lamina zum Lobulakomplex an. In der Lamina mit ihren verhältnismäßig wenigen Zelltypen findet nur eine basale Verschaltung der Information statt, von den tangentialen Zellen der Lobulaplatte ist z.B. bekannt, daß sie die Eigenbewegungen der Fliege in verschiedenen Drehebeneen verarbeiten (Rajashekhar und Shamprasad 2004).

In der Lobulaplatte und den oberflächlichen Schichten der Lobula werden in erster Linie Informationen für die Bewegungswahrnehmung verarbeitet, in den tiefen Schichten der Lobula die Farbwahrnehmung (Bausenwein *et al.* 1992).

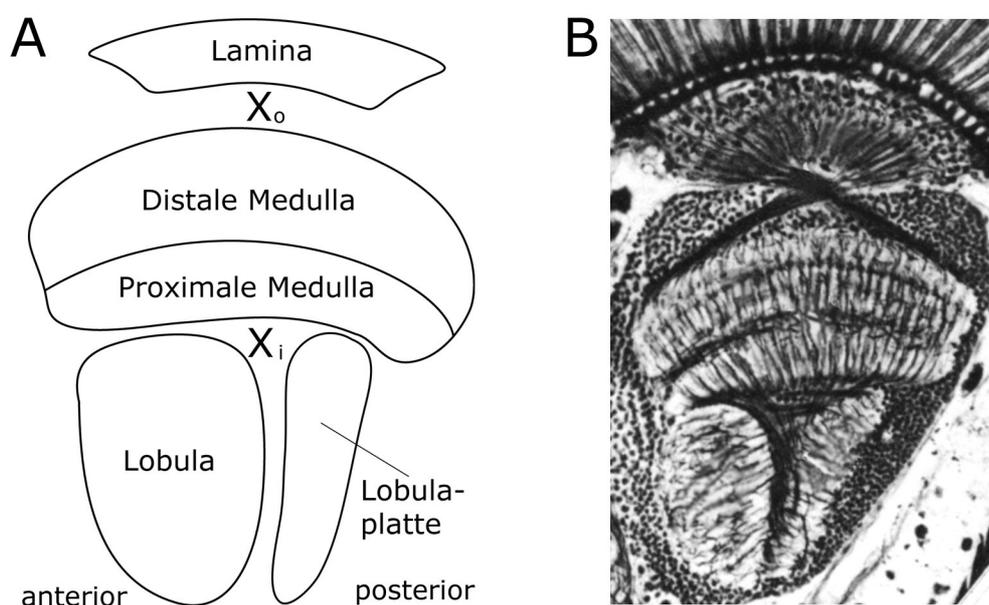


Abbildung 3: A: Schematische Darstellung der Neuropile des optischen Lobus sowie des äußeren (X_o) und inneren Chiasmas (X_i) (basierend auf Fischbach und Dittrich 1989).

B: Kragenschnitt verändert nach Meinertzhagen und Hanson 1993.

2.3.2.2 Entwicklung

Die Zellen, die Lamina und distale Medulla aufbauen, entstehen hauptsächlich aus der äußeren optischen Anlage, die der proximalen Medulla und des Lobulakomplexes aus der inneren. Kolumnare Zellen, die den optischen Lobus mit dem Zentralhirn verbinden, haben jedoch ihren Ursprung vermutlich in keiner dieser beiden Anlagen, denn ihre Zellkörper liegen in der Rinde des Zentralhirns (Fischbach und Dittrich 1989).

Neuroblasten, pluripotente neuronale Vorläuferzellen, teilen sich ab dem L1-

Stadium. Die ersten Ganglionmutterzellen, die direkten Vorläufer von ausdifferenzierten Neuronen, entstehen im zweiten Larvalstadium (Meinertzhagen und Hanson 1993).

Die Zellen der Medulla differenzieren sich ontogenetisch als erstes, im Laufe des zweiten und vor allem dritten Larvenstadiums. Neurone der Lamina und des Lobulakomplexes folgen ab der Mitte des dritten Larvenstadiums (Glia bereits einige Stunden früher). Die Entwicklung erfolgt von posterior nach anterior, tangential Elemente bilden sich zuerst (Meinertzhagen und Hanson 1993).

Photorezeptoren aus den Ommatidien terminieren in Lamina und Medulla, sie bilden sich während des L3-Stadiums (Wolff und Ready 1993).

Kolumnare Neurone sind auf die korrekte Ausbildung der Photorezeptoraxone angewiesen, Tangentialzellen dagegen nicht (Fischbach und Dittrich 1989).

Die Synaptogenese beginnt in der zweiten Hälfte der Puppenentwicklung und wird erst im adulten Tier abgeschlossen (Meinertzhagen und Hanson 1993). Anzahl und Position der Arborisierungen von Neuronen entsprechen nach meinen eigenen Beobachtungen bereits ab P60 denen von adulten Neuronen.

2.3.2.3 Zelltypen

Der optische Lobus ist aus Dutzenden von verschiedenen Zelltypen aufgebaut, die Informationen in Richtung des Zentralhirns weiterleiten oder rückkoppeln, Informationen integrieren und lateral inhibieren.

Die Neurone des optischen Lobus wurden 1989 von Fischbach und Dittrich umfassend durch Golgi-Analysen beschrieben, die auch die Grundlage für die Bestimmung von Zelltypen in dieser Arbeit darstellen.

Unterschieden werden kolumnare Zellen, die üblicherweise in jeder Säule auftreten, wodurch jeder Zelltyp hunderte Male vorkommt, und seltenere tangential Neurone, bei denen es manche Typen nur ein einziges Mal pro Gehirn gibt.

Kolumnare Neurone sind anatomisch so definiert, daß ihre Axone parallel zur Achse der Säulen verlaufen. In wie weit sich ihre Arborisierungen dabei lateral erstrecken, ist für diese Definition nicht von Bedeutung.

Alle Neurone variieren zu einem gewissen Grad in ihrem Aussehen, ihre Klassifizierung bezieht sich daher auf die invariabelsten Aspekte, wie z.B. die Position der Zellkörper, die Anzahl der Verzweigungen und die Schichten der Arborisierungen.

Neben den Photorezeptoren R7 und R8 sind die wichtigsten Zellen, die das äußere optische Chiasma durchziehen, die Laminamonopolarzellen (Abbildung 4). Ihre Zellkörper befinden sich distal der Lamina, die Terminalien in der distalen Medulla. Die Laminamonopolarzellen L1, L2 und L3 sind in der Lamina postsynaptisch zu den Retinulazellen R1-R6. L1 und L2 bilden Synapsen mit allen sechs Photorezeptoren. Die Dendriten von L3 zeigen nur in eine Richtung, was durch die azentrische Lage dieser Zelle bedingt ist (Fischbach und Dittrich 1989). L4 vermittelt laterale Inhibition zwischen benachbarten Säulen innerhalb der Lamina, L5 arborisiert in diesem Neuropil praktisch nicht sichtbar. In der Medulla weisen alle fünf Zelltypen unterscheidbare Arborisierungsmuster auf. Die Laminamonopolarzellen sind also durch die Form ihrer Arborisierungen bzw. durch die Schicht, in der sie terminieren, eindeutig identifizierbar. Dies macht sie zu idealen Kandidaten für die Analyse von Defekten in axonaler Wegfindung und axonaler Terminierung.

Auf weitere Zelltypen wird in den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisteils eingegangen.

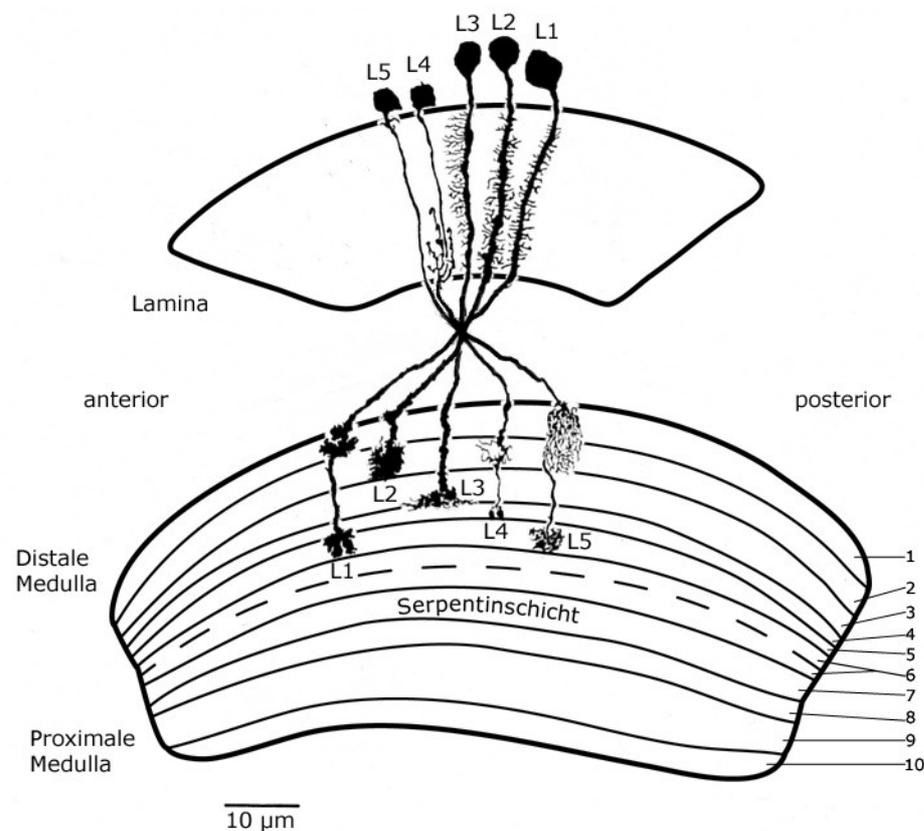


Abbildung 4: Darstellung der fünf Laminamonopolarzelltypen (verändert nach Fischbach und Dittrich 1989).

2.4 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie

2.4.1 Allgemeines

Für Zell-Zell-Erkennung, -Kommunikation und -Zusammenhalt spielen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Ihre Mitwirkung bei axonaler Wegfindung, Zellmigration und synaptischer Plastizität wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Walsh und Doherty 1997; Martin-Bermudo *et al.* 1999; Murase und Schuman 1999).

Zelladhäsionsproteine lassen sich größtenteils in die vier Superfamilien Integrine, Cadherine, Selektine und Immunglobuline einteilen.

Zur weitläufigen Superfamilie der Immunglobuline gehören neben Zelladhäsionsmolekülen vor allem Komponenten des Immunsystems von Vertebraten.

Das verbindende Element dieser Proteine ist die Immunglobulin-Domäne (Ig-Domäne), die aus zwei antiparallelen β -Faltblättern besteht, die durch hydrophobe Wechselwirkungen und eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Teil vieler Immunglobuline sind außerdem Fibronectin-Typ-III-Domänen. Die extrazelluläre Domäne von Immunglobulinen wird modular aus mehreren Ig- und (in manchen Fällen) Fibronectin-Domänen aufgebaut, der intrazelluläre Teil der Moleküle zeigt dagegen kaum Gemeinsamkeiten.

Der modulare extrazelluläre Abschnitt dieser Proteine ermöglicht diverse homo- und heterophile Interaktionen *in cis* und *trans* sowohl mit Immunglobulinen als auch mit Molekülen aus anderen Familien.

2.4.2 IRM-Proteine

Zum Irre-Zellerkennungsmodul (*Irre cell Recognition Module*, IRM) werden zwei Gruppen von Immunglobulinen gezählt. Mitglieder der ersten Gruppe haben in der Regel fünf Ig-Domänen, die anderen typischerweise neun Ig-Domänen, eine davon unvollständig, sowie eine Fibronectin-Domäne. Die Konservierung zwischen den Proteinen ist N-terminal am stärksten und nimmt von dort aus ab. Zur ersten Gruppe gehören IrreC-Rst (Irregular chiasmC – Roughest) und Kirre (Kin-of-irre) in *Drosophila*, Neph1, Neph2 und Neph3 im Menschen sowie SYG-1

in *C. elegans*; Mitglieder der zweiten Gruppe sind SNS (Sticks-and-stones) und Hbs (Hibris) in *Drosophila*, Nephrin im Menschen und SYG-2 in *C. elegans* (Abbildung 5; Donoviel *et al.* 2001; Shen und Bargmann 2003; Shen *et al.* 2004).

Sie spielen eine Rolle bei der Entwicklung der Augen, dem Gehirn, den Muskeln, Antennen und Flügeln von *Drosophila* (s.u.) sowie der Nieren und Gehirne bei Säugetieren (Gerke *et al.* 2006). In *C. elegans* ist eine Mitwirkung bei der Synaptogenese bekannt (Shen und Bargmann 2003).

Eine Interaktion von Proteinen der ersten Gruppe mit denen der zweiten wurde mehrfach gezeigt (Liu *et al.* 2003; Galletta *et al.* 2004; Shen *et al.* 2004; Bao und Cagan 2005).

Die intrazelluläre Domäne (ICD) divergiert stark zwischen den IRM-Proteinen. Für manche Funktionen ist sie essentiell, für andere scheint sie keine Rolle zu spielen. Bei SNS ist sie *in situ* notwendig (Galletta *et al.* 2004); ist dagegen die ICD von Rst verkürzt (Mutante *rst^{CT}*), erscheinen die optischen Loben wildtypisch, die Fliegen haben jedoch stark rauhe Augen (Boschert *et al.* 1990).

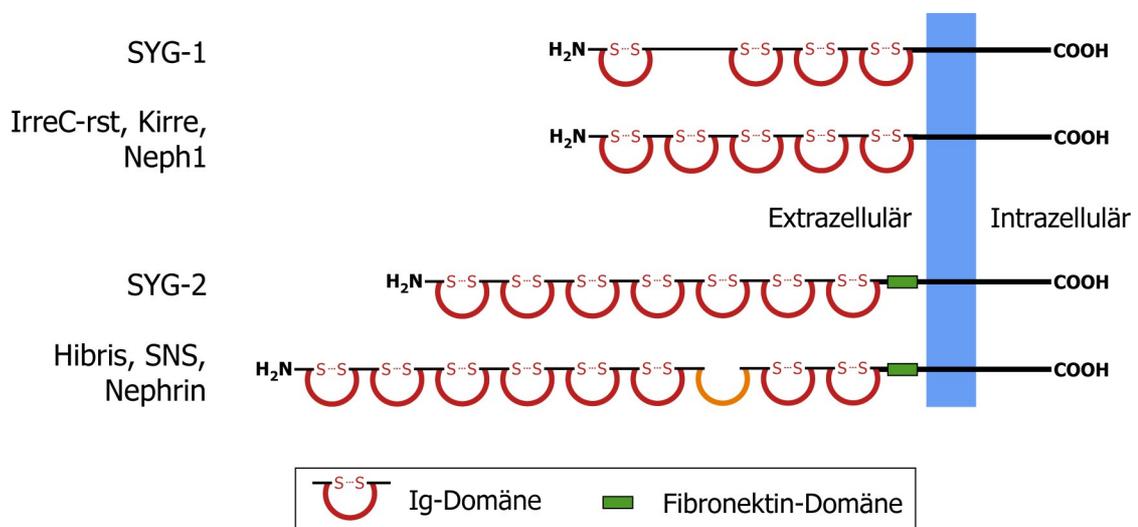


Abbildung 5: Schema der extrazellulären Domänen von Immunglobulinen aus der Gruppe der IRM-Proteine. Die siebte Ig-Domäne von Hibris, SNS und Nephrin ist unvollständig (Braun 2004; Shen und Bargmann 2003; Shen *et al.* 2004).

2.4.2.1 Irregular chiasmC - roughest

Irregular chiasmC - roughest (rst) ist das am längsten bekannte Mitglied der IRM-Familie.

Es wird räumlich und zeitlich sehr dynamisch exprimiert, u.a. während der Augenentwicklung, im optischen Lobus, während der Muskelfusion, in den Imaginalscheiben der Beine, Flügel und Antennen sowie in Epithelzellen (Boschert *et al.* 1990; Schneider *et al.* 1995; Reiter *et al.* 1996; Reddy *et al.* 1999; Strünkelnberg *et al.* 2001).

In Zellkultur wurde eine homophile Adhäsion *in trans* nachgewiesen (Schneider *et al.* 1995; Galletta *et al.* 2004). Eine bevorzugte heterophile Interaktion *in trans* wurde mit SNS in Zellkultur (Galletta *et al.* 2004) und mit Hbs *in situ* gezeigt (Bao und Cagan 2005).

Im Komplexauge ist die korrekte Lokalisierung von Rst notwendig für die Sortierung und Apoptose der Interommitidialzellen (IOCs) (Reiter *et al.* 1996; Grzeschik und Knust 2005). Das Fehlen oder eine Überexpression von *rst* führt durch überzählige Zellen zu einem Phänotyp mit rauhen Augen (Abbildung 6C; Reiter *et al.* 1996). Es wurde gezeigt, daß im Zuge dieser Zellsortierung Rst und Hbs direkt *in trans* miteinander interagieren (Hbs in den primären Pigmentzellen, Rst in den IOCs) (Bao und Cagan 2005).

Rst ist auch für die korrekte Zellsortierung bei der Bildung der antennalen Sinnesorgane notwendig (Reddy *et al.* 1999).

Rst und sein Paralog Kirre verhalten sich bei der Muskelfusion redundant, Mutanten von *rst* haben nur einen schwachen Phänotyp, die Präsenz eines der beiden Proteine ist jedoch essentiell (die Doppelmutante ist embryonal letal) (Strünkelnberg *et al.* 2001). Galletta *et al.* haben gezeigt, daß Rst und Kirre hier die Partner von SNS sind (Galletta *et al.* 2004).

Rst spielt eine Rolle bei der axonalen Wegfindung von Neuronen im optischen Lobus. Sowohl bei Überexpression als auch in Mutanten kommt es zu starken axonalen Wegfindungsstörungen mit ektopischen Bündeln im äußeren und Projektionsdefekten im inneren Chiasma (Abbildung 7A, C, und I; Boschert *et al.* 1990; Schneider *et al.* 1995; Reiter *et al.* 1996).

Im Gegensatz zur Zellsortierung bei Augen- und Antennenentwicklung ist die Notwendigkeit der intrazellulären Domäne für den korrekten Aufbau der optischen Loben unklar. *Rst^{CT}*, ein Allel mit einer partiellen Deletion der ICD, zeigt hier keinen Phänotyp (Boschert *et al.* 1990; Ramos *et al.* 1993; Schneider *et al.* 1995; Reiter *et al.* 1996; Reddy *et al.* 1999).

Rst kann während der Entwicklung des Gehirns vor allem in den optischen Loben in Axonen und bestimmten Schichten der Neuropile nachgewiesen werden.

Eine Rolle von Rst bei der axonalen Terminierung oder Synaptogenese kann vermutet werden, da die Lokalisierung des Proteins in den Terminalien und putativen Dendriten anhält, während es in den Axonen zu späteren Entwicklungszeitpunkten nicht mehr detektierbar ist (Schneider *et al.* 1995).

2.4.2.2 Kin-of-irre

Rst und *kin-of-irre* (*kirre*; auch *dumbfounded*) sind das Resultat einer Genduplikation, die vor mindestens 40 Millionen Jahren stattgefunden hat. Während einer solch langen Zeitspanne geht in mehr als 90 % der Fälle eine der Kopien verloren. Da sowohl *rst* als auch *kirre* nach wie vor exprimiert werden, scheint ein Selektionsdruck auf die Erhaltung beider Gene zu bestehen. Eine unabhängige funktionelle Relevanz der Gene ist also sehr wahrscheinlich. Es ist aber nicht auszuschließen, daß sich *kirre* durch eine Anhäufung von Mutationen in einem Zwischenzustand auf dem Weg zum Funktions- und/oder Transkriptionsverlust befindet (Strünkelnberg *et al.* 2003).

Die extrazellulären Domänen der beiden Proteine sind sehr stark konserviert, die Sequenzidentität nimmt vom Aminoterminus hin zur Zellmembran jedoch ab (Abbildung 6A). Die intrazellulären Domänen divergieren deutlich, der intrazelluläre Abschnitt von Kirre ist wesentlich länger als der von Rst. Es gibt lediglich drei kurze stark konservierte intrazelluläre Motive (Strünkelnberg *et al.* 2003).

Das Expressionsmuster von *kirre* ähnelt sehr stark dem von *rst*, scheint jedoch in der Anzahl der Zelltypen etwas begrenzter zu sein. Unterschiede wurden nur in Einzelfällen gefunden, zum Beispiel kann Rst in fusionskompetenten Myoblasten nachgewiesen werden, Kirre jedoch nicht (Strünkelnberg *et al.* 2001; Galletta *et al.* 2004).

Auch die Interaktionen entsprechen denen von Rst. Aufgrund der Homologie der beiden Gene wurden die Experimente in manchen Veröffentlichungen nur mit einem von beiden durchgeführt. Es gibt in Zellkultur eine homophile Interaktion *in trans* sowie eine stärkere heterophile Interaktion *in trans* mit SNS, die nur die ECDs benötigt (Dworak *et al.* 2001; Galletta *et al.* 2004). Kirre und SNS interagieren im Embryo bei der Muskelfusion (Galletta *et al.* 2004).

Die Unterschiede im Expressionsmuster von *rst* und *kirre* könnten eine Konsequenz aus Mutationen in der regulatorischen Sequenz von *kirre* sein (Strünkelnberg *et al.* 2003).

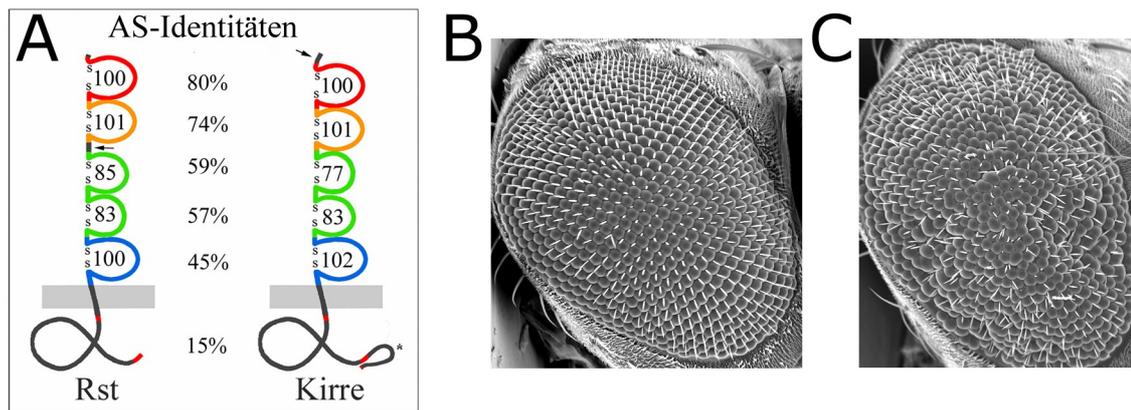


Abbildung 6: A: Vergleich der Aminosäure-Identitäten zwischen Rst und Kirre in *D. melanogaster* (aus Strünkelnberg *et al.* 2003).

B und C: Vergleich eines weitgehend wildtypischen Auges (Abbildung B) mit einem *rst kirre*⁻ Auge mit rauhem Phänotyp (genetisches Mosaik; Abbildung C) (Alexander Hertenstein, unveröffentlichte Ergebnisse).

2.4.2.3 Hibris

Auch *hibris* (*hbs*) wird sehr dynamisch exprimiert. Die Deletion bleibt ohne einen letalen Phänotyp, es scheint also eine Redundanz mit einem weiteren Protein vorzuliegen. Eine Reduzierung der Expression von *hbs* führt in den Augen unter anderem zu Sortierungsfehlern und damit rauhen Augen. Die Überexpression erzeugt Defekte in Muskeln, Flügeln und der Anordnung von sensorischen Borsten sowie rauhe Augen. Außerdem gibt es starke Projektionsdefekte im inneren optischen Chiasma, die denen der Überexpression von *rst* und *sns* ähneln (Abbildung 7; Dworak *et al.* 2001; Bonengel 2002; Bao und Cagan 2005).

Eine homophile Interaktion kann in Zellkultur nicht beobachtet werden, jedoch eine heterophile Interaktion *in trans* mit Kirre. Eine Interaktion mit Rst konnte in Zellkultur nicht nachgewiesen werden, jedoch *in situ*. (Dworak *et al.* 2001; Bao und Cagan 2005).

Hbs interagiert während der Zellsortierung in der Augenentwicklung mit Rst (siehe 2.4.2.1). Hbs und Rst kolokalisieren, wenn sie in benachbarten Zellen vorhanden sind (Bao und Cagan 2005).

Bei der Muskelfusion wird Hbs nur eine nicht-essentielle regulatorische Rolle zugeschrieben, die Expression erfolgt wie bei *sns* in fusionskompetenten Myoblasten (Artero *et al.* 2001; Dworak *et al.* 2001). Die Überexpression der ICD führt zu Muskeldefekten, die der ECD dagegen nicht (Artero *et al.* 2001).

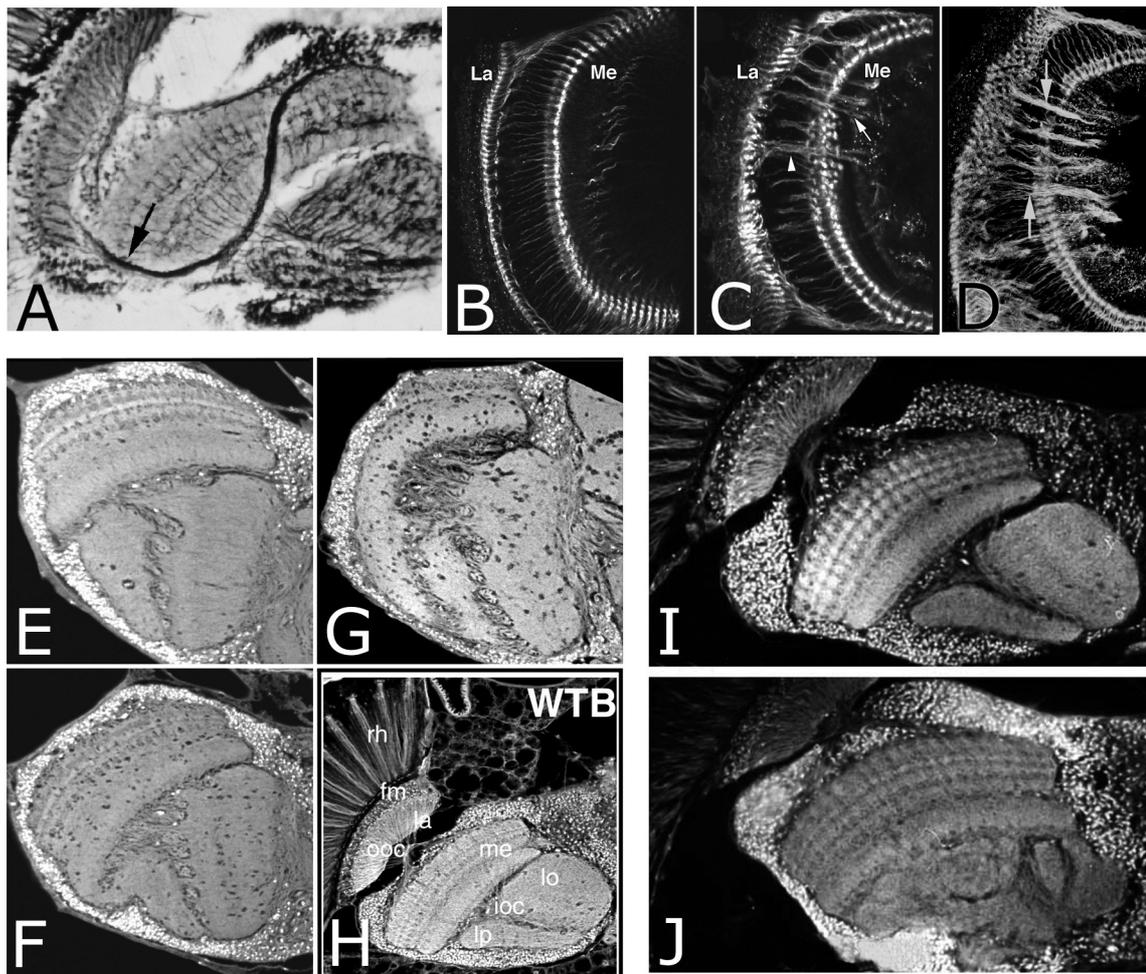


Abbildung 7: Mutanten und Fehlexpression verschiedener IRM-Proteine.

A: Ektopisches Faserbündel in der Mutante *irreC-rst^{UB883}* (Boschert *et al.* 1990).

B-D: Anti-Fasciclin-II-Färbungen. **B:** Wildtyp (Nie 1995).

C: Faszikulierte Faserbündel im äußeren Chiasma bei *elav-Gal4>UAS-rst* (Nie 1995).

D: Faszikulierte Faserbündel im äußeren Chiasma in *irreC-rst^{UB883}* (Schneider *et al.* 1995).

E-G: Fehlexpression von *sns* und *hbs* (Bonengel 2002). **E und F:** Defekte im inneren Chiasma bei *1369-Gal4>UAS-hbs*-Fehlexpression. **G:** Defekte im inneren Chiasma bei *1369-Gal4>UAS-sns*-Fehlexpression. **H:** Wildtypvergleich zu E-G.

I und J: Defekte im inneren Chiasma bei *1407-Gal4>UAS-rst*-Fehlexpression, I ist der Wildtyp, J die Fehlexpression (Reiter 1995).

2.4.2.4 Sticks-and-stones

Sticks-and-stones (*sns*) ist essentiell für die Muskelfusion. Es wird in fusionskompetenten Myoblasten exprimiert und ist hier der Partner von Rst und Kirre (Bour *et al.* 2000; Galletta *et al.* 2004). Dagegen ist keine Interaktion mit Rst in der Augenentwicklung nachweisbar, hier ist Hbs der Partner (Bao und

Cagan 2005).

Es sind keine Defekte in der Mutante im ZNS zu erkennen (Bour *et al.* 2000), im Gegensatz dazu führt die Überexpression zu starken Fehlprojektionen im inneren optischen Chiasma, die denen der Überexpression von *rst* und *hbs* ähneln (Abbildung 7; Bonengel 2002).

Es erfolgt keine homophile Interaktion *in trans* in Zellkultur, jedoch eine heterophile Interaktion mit Rst und Kirre; die Bindung von SNS mit Rst oder Kirre benötigt nur die ECDs. Dagegen ist für die Muskelfusion das komplette Protein inklusive der Transmembrandomäne und der ICD notwendig (Galletta *et al.* 2004).

2.5 Genetische Werkzeuge

2.5.1 Das Gal4/UAS-System

Gal4 ist ein Transkriptionsaktivator aus der Hefe, der bei Bindung an eine spezifische Sequenz (UAS – *upstream activating sequence*) durch Rekrutierung der Polymerase die Expression von beliebigen der UAS nachgeschalteten Genen aktivieren kann.

Dieses Aktivierungssystem wurde auf *Drosophila* übertragen und wird dort zur gezielten Fehl- und Überexpression von Genen eingesetzt (Brand und Perrimon 1993).

Insertionen des *gal4*-Aktivators wurden mittels der P-Element-Enhancer-Trap-Methode systematisch in das *Drosophila*-Genom eingeführt. Bei dieser Methode wird ein mutiertes Transposon als Vektor genutzt, um ein gewünschtes Gen in das Genom zu integrieren. Wenn es in der Nähe cis-regulatorischer Regionen eines Gens inseriert, kann das eingeführte Gen unter deren Kontrolle geraten. Es wird dann mit der Spezifität dieses Enhancers exprimiert. Da ein Gen über mehrere Enhancer verfügt, muß die Insertion jedoch nicht dem vollen Expressionsspektrum des endogenen Gens folgen.

Sowohl stromaufwärts von *rst* als auch von *kirre* existieren derartige *gal4*-Insertionen (Abbildung 8). Diese *gal4*-Insertionen folgen zumindest teilweise dem durch Immunfärbungen nachgewiesenen Expressionsmuster der beiden Gene (Küffner 2006).

In Zellen, in denen der Gal4-Aktivator durch eine genomische Regulationseinheit

produziert wird, werden alle Gene exprimiert, die über eine UAS verfügen. Dies kann zur Markierung der Zellen durch Reportergene wie *gfp* aber auch zur Fehl- und Überexpression anderer Gene oder Genfragmente genutzt werden, vor die eine UAS kloniert wurde.

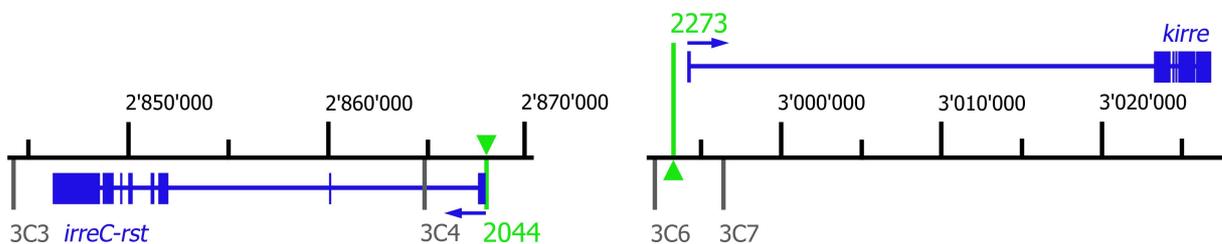


Abbildung 8: Die *gal4*-Insertionen NP2044 vor *rst* und NP2273 vor *kirre*.

2.5.2 MARCM

MARCM steht für *Mosaic Analysis using a Repressible Cell Marker* und wurde 1999 von Lee und Luo eingeführt (Lee und Luo 1999; Lee und Luo 2001). Die Methode stellt eine auf mitotischer Rekombination basierende Weiterentwicklung des Gal4/UAS-Systems dar. Bei MARCM wird die Expression der ortsspezifischen FLP-Rekombinase durch einen Hitzeschock aktiviert. Diese vermittelt dann die mitotische Rekombination an FRT-Sequenzen.

Für die Anwendung der Methode wird ein Stamm, der homozygot für eine Gal4-Insertion und FRT-Sequenzen ist, mit einem Stamm gekreuzt, der auf dem gleichen Chromosom die Gene für den Gal80-Repressor und die FLP-Rekombinase trägt (Abbildung 9; Kreuzungsschema siehe Abbildung 13).

Gal80 stammt ebenfalls aus der Hefe, bindet an Gal4 und inhibiert dadurch die Transkriptionsaktivierung. Das Gen steht bei der MARCM-Methode unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierenden Tubulin-Promotors.

Auf einem anderen Chromosom befinden sich ein oder mehrere Gene mit einer UAS-Sequenz, z.B. *mCD8::gfp* als Fluoreszenzmarker. *MCD8::gfp* ist das Produkt aus der Fusion von GFP mit einem Membranprotein aus der Maus.

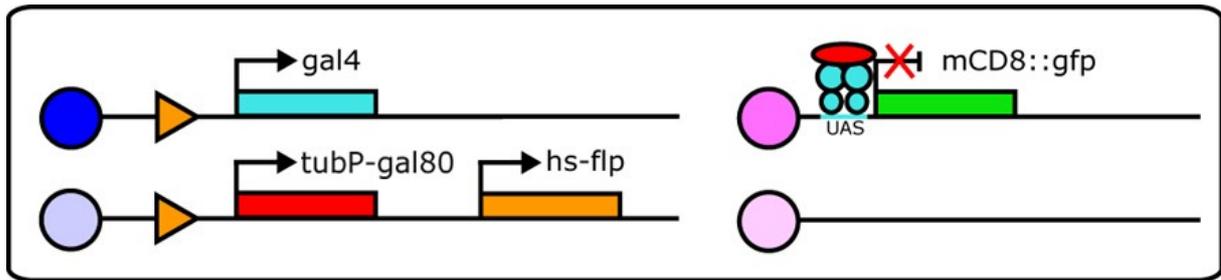


Abbildung 9: Genotyp nach einer MARCM-Kreuzung. Dargestellt sind die Arme zweier Chromosomen. Kreise repräsentieren die Zentromere, Dreiecke FRT-Sequenzen. Der Marker wird in diesem Fall nicht exprimiert, da sowohl Gal4 (türkis) als auch Gal80 (rot) in der Zelle produziert werden.

Die FLP-Rekombinase vermittelt eine mitotische Rekombination an spezifischen FRT-Sequenzen. Sie steht hier unter der Kontrolle eines hitzeschocksensiblen Promotors, wird also nur ab 37 °C exprimiert. Die FRT-Sequenzen müssen zwischen dem Zentromer und den zu rekombinierenden Chromosomenabschnitten liegen.

Bei der MARCM-Methode wird im Normalfall Gal4 an der UAS durch Gal80 inhibiert. Führt man einen Hitzeschock durch, wird die FLP-Rekombinase produziert und kann in beliebigen Zellen eine Rekombination vermitteln. Die Rekombination findet während der Mitose statt, wenn die Zelle tetraploid ist. Dadurch können die Chromosomenarme so rekombiniert werden, daß eine Tochterzelle beide Exemplare des *gal4*-Gens erhält und die andere beide Kopien des *gal80*-Gens (Abbildung 10). Ob es zu einer Rekombination kommt und welche Tochterzelle *gal4* erhält, hängt vom Zufall ab. Gal4 kann in der Folge in der Zelle, die das *gal4*-Gen erhält (und ihrer Tochterzellen) die Transkription von Genen, die über eine UAS verfügen, aktivieren. In allen anderen Zellen wird die Transkription dieser Gene nicht aktiviert, da in ihnen nach wie vor *gal80* vorhanden ist.

MARCM hat gegenüber dem ursprünglichen Gal4/UAS-System den Vorteil, daß die Expression des Markers (oder anderer Gene, die über eine UAS verfügen) nicht in allen Zellen, in denen Gal4 produziert wird, erfolgt, sondern nur in einer zufälligen Untergruppe. Die durch die Insertion *gal4*^{NP2044} (stromaufwärts von *rst*) getriebene Expression von *gfp* färbt weite Teile der optischen Loben. MARCM ermöglicht es, einzelne Zellen aus dieser Gesamtpopulation zu markieren und dadurch zu bestimmen.

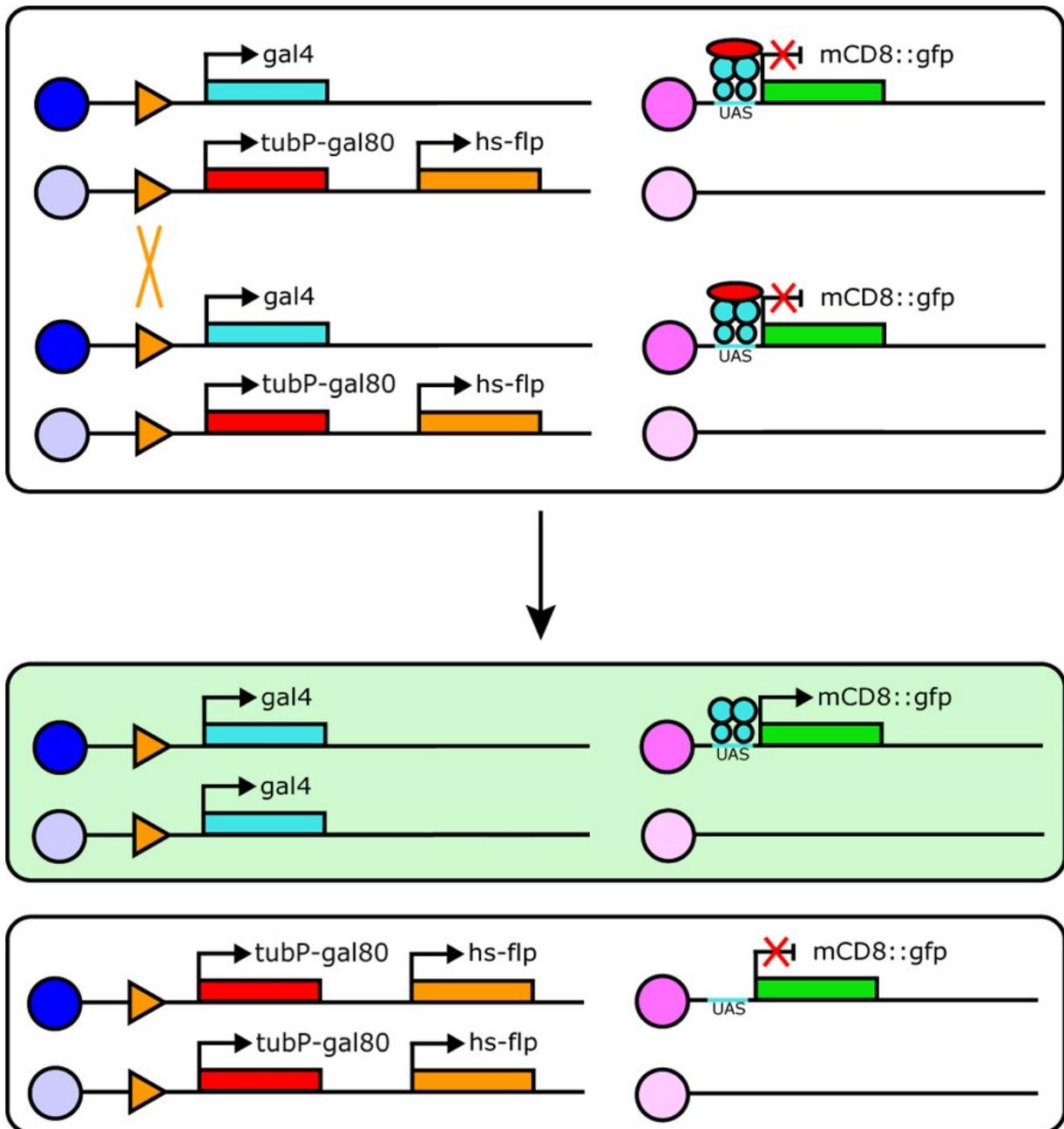


Abbildung 10: Rekombination bei MARCM. Im oberen Teil des Bildes ist die Zelle während der Mitose vor der Rekombination dargestellt, unten der Genotyp der entstandenen Tochterzellen. Dargestellt sind einzelne Chromosomenarme. Kreise repräsentieren die Zentromere, Dreiecke FRT-Sequenzen.

Auf diese Weise ist es auch möglich, mutante Zellen in einem wildtypischen Kontext zu erzeugen und daraus entstehende zellautonome Effekte zu studieren. Die MARCM-Methode wurde während der letzten Jahre in einer Vielzahl von Fragestellungen erfolgreich angewendet und befindet sich noch ständig in Weiterentwicklung.

Während der Entwicklung des Nervensystems bilden sich zunächst pluripotente Neuroblasten, die sich anfangs jeweils erneut in zwei Neuroblasten teilen und im Zuge der Ausdifferenzierung des Gehirns schließlich Ganglionmutterzellen bilden. Typischerweise teilt sich zu diesem Zeitpunkt ein Neuroblast in eine Ganglionmutterzelle und einen Neuroblasten. Eine Ganglionmutterzelle kann sich nicht mehr beliebig oft teilen, sie bildet zwei Neurone (Abbildung 11; Meinertzhagen und Hanson 1993).

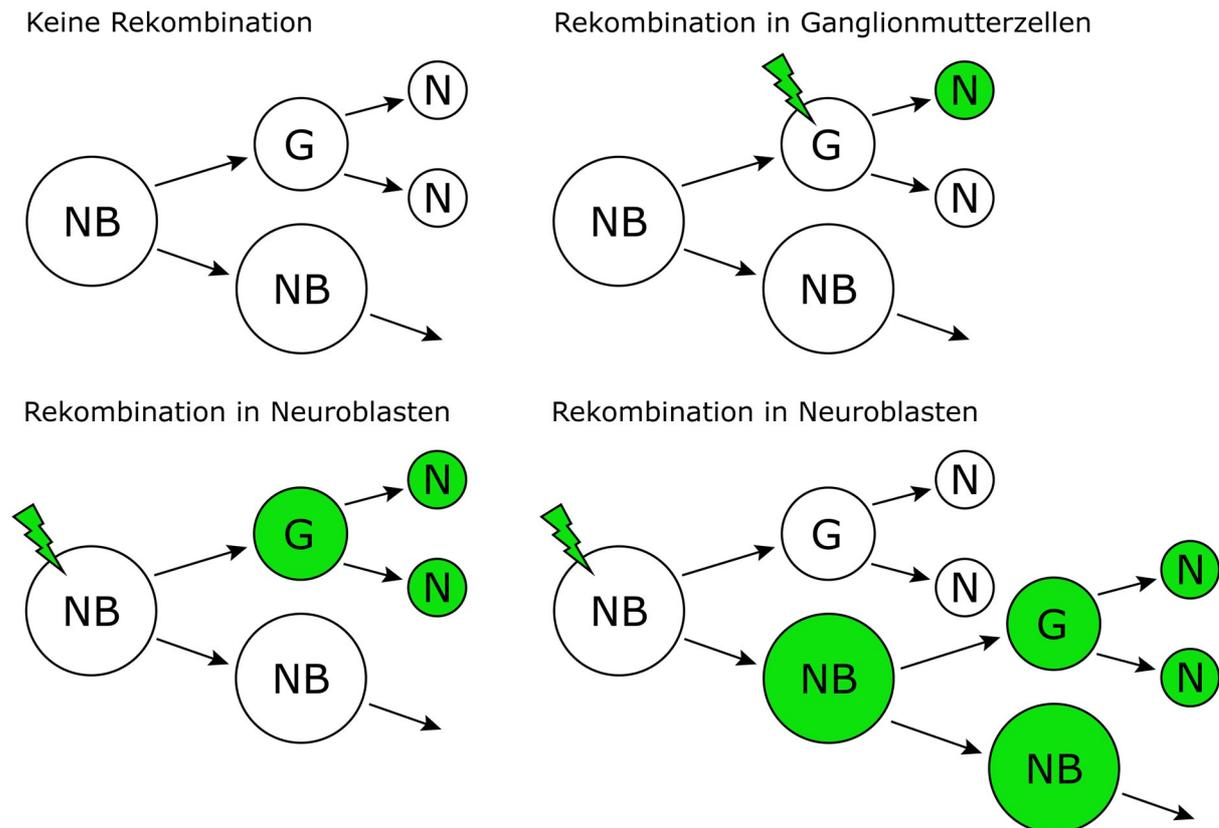


Abbildung 11: Mögliche Ergebnisse der Rekombination in verschiedenen Zelltypen. Der Blitz symbolisiert den Hitzeschock, der zur Rekombination führt. Grüne Zellen tragen zwei Kopien des *gal4*-Gens und kein *gal80* und können daher UAS-kontrollierte Gene exprimieren. Bei der Rekombination in einem Neuroblasten kann entweder die Ganglionmutterzelle oder der Neuroblast *gal4* erhalten. NB = Neuroblast, G = Ganglionmutterzelle, N = Neuron.

Die durch den Hitzeschock aktivierte Rekombination kann in jedem beliebigen Zelltyp stattfinden. Welche Zelle betroffen ist, ist sowohl vom Zufall als auch vom Zeitpunkt des Hitzeschocks abhängig. Früher in der Entwicklung teilen sich mehr Neuroblasten, Ganglionmutterzellen erst später (Meinertzhagen und Hanson 1993). Je nach dem, in welchem Zelltyp rekombiniert wird, können während der

Entwicklung unterschiedliche Mengen an Zellen das *gal4*-Gen ohne *gal80* erhalten (Abbildung 11). So können sowohl nur einzelne Zellen als auch riesige Gruppen von Neuronen betroffen sein. Es ist natürlich auch möglich, daß es in keiner einzigen Zelle zur Rekombination kommt.

Aufgrund der stochastischen Eigenschaften der Methode müssen also große Mengen an Individuen betrachtet werden, um schlüssige Aussagen mit MARCM treffen zu können.

2.6 Zielsetzung

Um die Funktion von Rst und Kirre während der Entwicklung der optischen Loben von *D. melanogaster* besser verstehen zu können, sollte in dieser Arbeit mit Hilfe der MARCM-Methode eine Übersicht der Zelltypen aufgestellt werden, in denen der Gal4-Aktivator in den beiden Linien NP2044 (stromaufwärts von *rst*) und NP2273 (stromaufwärts von *kirre*) im optischen Lobus exprimiert wird. Unterschiede zwischen den in NP2044 und NP2273 identifizierten Zelltypen können zum Verständnis möglicher unabhängiger Funktionen von Rst und Kirre beitragen. Anhand der identifizierten Neurone sollten außerdem Hinweise auf die Lokalisierung der beiden Proteine innerhalb der Zellen gewonnen werden.

Mit der MARCM-Methode ist es möglich, Gene in einzelnen Zellen innerhalb einer wildtypischen Umgebung fehlzuexprimieren. Zu diesem Zweck sollte ein Stamm etabliert werden, der in Rst-positiven Zellen die extrazelluläre Domäne des Interaktionspartners *hbs* fehlexprimiert. Zellautonome Effekte dieser Fehlexpression sollten mit der MARCM-Methode untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Grundchemikalien wurden über Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Spezielle Chemikalien:

Bezeichnung	Hersteller
DePeX	Serva, Heidelberg
Fixogum	Marabu, Tamm
Paraffin (Roti-Plast)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Vectashield	Vector Laboratories; Vertrieb Linaris, Wertheim

3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Bezeichnung	Beschreibung
Carnoy-Fixierlösung	60 % Ethanol p.a. (getrocknet)
	30 % Chloroform
	10 % Essigsäure (Eisessig)
DNA-Ladepuffer	15 % Ficoll-400
	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylen Cyanol FF
	in ddH ₂ O
LB-Amp-Platten	LB-Medium mit 15 g/L Agarose ansetzen und autoklavieren Im Wasserbad auf 60 °C abkühlen lassen 100 µg/mL Ampicillin zugeben Platten gießen und bei 4 °C lagern

Bezeichnung	Beschreibung
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefe-Extrakt 10 g NaCl Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen und autoklavieren
PBS 25x	200 g NaCl 5 g KCl 5 g KH ₂ PO ₄ x 2 • H ₂ O Mit HCL/NaOH auf pH 7,6 einstellen Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen
PBT	1x PBS mit 0,4 % Triton X-100
PFA 4 %	4 g Paraformaldehyd in 35 ml 60 °C warmem ddH ₂ O lösen 15 min rühren 1 N NaOH tropfenweise hinzugeben bis die Lösung klar wird Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen 40 ml 1/15 M Na ₂ HPO ₄ zugeben Titration mit 1/15 M KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 (ca. 20 mL) Aliquotieren und bei -20 °C lagern
SB-Puffer (<i>squishing buffer</i>)	10 mM Tris-HCl pH 8,2 1 mM EDTA 25 mM NaCl 200 µg/mL Proteinase K werden bei Verwendung zugegeben
STET	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 5 % Triton X-100
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat pH 7,5 20 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

3.1.3 *Drosophila*-Futtermedien

Bezeichnung	Beschreibung
Apfelsaftplatten	30 g Bacto-Agar in 1 L Wasser 350 mL Apfelsaft 32 g Glukose 1 mL Ethanol 2 g Nipagin 0,5 mL Essigsäure
Futterbrei	7 L Leitungswasser 88 g Agarose 686 g Hefeflocken 560 g Maisgrieß 756 g Sojamehl 280 g Rübensirup 560 g Malzsirup 30 mL Propionsäure 7 g Nipagin in 70 mL Ethanol

3.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
BioThermRed Taq DNA-Polymerase	GeneCraft, Lüdinghausen
Lysozym	Serva, Heidelberg
Paq 5000 Taq DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
Restriktionsenzyme	Gibco; jetzt Invitrogen, Karlsruhe New England Biolabs, Frankfurt a. M.
RNase H	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
TaqPlus Long DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

3.1.5 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
DH5a	Transformationskompetente <i>E. Coli</i> -Bakterien zur Plasmidvermehrung
TOPO One Shot TOP10	Transformationskompetente <i>E. Coli</i> -Bakterien für die TOPO-Klonierung

3.1.7 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pCRII-TOPO	Vektor für die TOPO-Klonierung
pUAST	Expressionsvektor mit UAS-Sequenzen zur Transformation von <i>Drosophila</i>

3.1.8 Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
BamHI_3	CCA GCT CAT CTG GTA CAA GAA C	SNS-ECD Fragment 1 Reverse
BamHI_5	TCG GCC AGA GGT TCT ATA GG	SNS-ECD Fragment 2 Forward
SNS_3	CGG CTG GCA TCA GTT CAA GT	SNS-ECD Reverse
SNS_3b	GTC ATC TGG ACC TGG CTT CA	Testprimer für SNS_5
SNS_5	CCA ACA GAG CGA GCA TAA CG	SNS-ECD Forward
SNS_5b	CAA TCC TGG CGA GGA TGC AA	Testprimer für SNS_3
SNS3ext	GCG GTA CCT GGC ATC AGT TCA AGT CCT	SNS-ECD Reverse, Überhang mit KpnI-Schnittstelle
SNS5ext	GCG AAT TCA ACA GAG CGA GCA TAA CG	SNS-ECD Forward, Überhang mit EcoRI-Schnittstelle
SNS_SEQ1	GAA GGA GCC GAG GCC ATG AT	Für die Sequenzierung
SNS_SEQ2	TGA CGA CTA CAC GGA GTA CA	Für die Sequenzierung
SNS_SEQ3	TGC GCA ATG CCA CCT CAA	Für die Sequenzierung
SNS_SEQ4	GAG ACC GTG CGC CTA GAG AT	Für die Sequenzierung
UAS	CTG CAA CTA CTG AAA TCT GCC	UAS Forward
UASR	GGC ATT CCA CCA CTG CTC CC	UAS Reverse
XhoI_3	ACG CAT TGA ACC GGA AGA	SNS-ECD Fragment 2 Reverse
XhoI_5	ATT GCT GGA GCT CGA GTC AC	SNS-ECD Fragment 3 Forward

Die Primer wurden mit dem Programm *Primer Designer* erstellt.

3.1.9 Fliegenstämme

Bezeichnung	Beschreibung (Chromosom)	Herkunft, Nummer
2044FRT	Gal4 Enhancer Trap Linie NP2044 mit FRT 19A (1)	GETDB Japan / Labor Fischbach, 384
2044RDL	NP2044, FRT 19A; UAS-Rdl::HA (1;2)	Shamprasad Varija Raghu, diese Arbeit
2044UG	Gal4 Enhancer Trap Linie NP2044; UAS-mCD8::GFP (1;2)	GETDB Japan
2273FRT	Gal4 Enhancer Trap Linie NP2273, FRT 19A (1)	GETDB Japan / Labor Fischbach, 387
2273RDL	NP2273, FRT 19A; UAS-Rdl::HA (1;2)	Shamprasad Varija Raghu, diese Arbeit
2273UG	Gal4 Enhancer Trap Linie NP2273; UAS-mCD8::GFP (1;2)	GETDB Japan
5134	FRT 19A, tubP-Gal80, hsFLP; UAS-mCD8::GFP (1;2)	Bloomington Stock Center
CyO	white; Curly of Oster (1;2)	Labor Fischbach, 306
FM7	FM7, eve LacZ / 1R34 (1)	Labor Fischbach, 102
Hbs-ECD	UAS-Hbs-ECD (1;2)	Labor Mary Baylies, 649
Herpes	NP2044, FRT 19A; UAS-Hbs-ECD (1;2)	Diese Arbeit
SNS	UAS-SNS (3)	Labor Helen Sink, 646
WTB	Wildtyp Berlin	Labor Fischbach, 302
yw	yellow, white (1)	Labor Fischbach, 310

3.1.10 Antikörper

Primärantikörper	Tier	Konzentration	Herkunft
Bruchpilot - NC82	Maus	1:10	Hybridoma Bank
Choptin - mAb24B10	Maus	1:50	Hybridoma Bank
Hibris	Kaninchen	1:300	Labor Mary Baylies
Kirre - 126 intra	Kaninchen	1:100	Labor Fischbach
mCD8 α - 5H10	Ratte	1:100	Caltag; jetzt Invitrogen
Rst - mAb24A5.1	Maus	1:10	Labor Fischbach

Als sekundäre Fluoreszenz-Antikörper wurden die entsprechenden Alexa-Ziegen-Antikörper (Molecular Probes; jetzt Invitrogen) in einer Konzentration von 1:200 verwendet.

Die Antikörper wurden in der angegebenen Konzentration in PBT gegeben, die Lösung zur Konservierung mit Natriumazid (1:200) versetzt.

3.1.11 Geräte

Gerät	Bezeichnung
Konfokalmikroskop	Leica TCS 4D
PCR-Thermocycler	Stratagene RoboCycler Gradient 40
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss S435VP

3.1.12 Software

Bezeichnung	Hersteller / Vertrieb
Adobe Photoshop 7 / CS2	Adobe Systems
Amira 3.1.1	Mercury Computer Systems
Clone Manager, Primer Designer	Scientific & Educational Software
Scanware 04.2a	Leica Lasertechnik

3.2 Molekularbiologische Methoden

Standardtechniken und Methoden, bei denen ein Handbuch des Herstellers verwendet wurde, werden hier nicht näher ausgeführt, wenn keine Änderungen am Protokoll vorgenommen wurden.

3.2.1 Agarose Gelelektrophorese

Mit dieser Methode kann DNA elektrophoretisch aufgetrennt werden. Je größer ein DNA-Fragment ist, desto langsamer wandert es durch die Poren des Gels. Durch den Vergleich mit einem definierten Marker kann so die Länge von einzelnen Banden bestimmt werden. Ein 1 %iges Agarosegel ist zur Auftrennung von DNA mit einer Größe von 0,5 kbp bis 10 kbp geeignet.

- 1 % Agarose durch Erhitzen in TAE-Puffer lösen
- Aus der leicht abgekühlten Agaroselösung ein ca. 1 cm dickes Gel gießen und mit 4 µL Ethidiumbromid vermischen
- Das erstarrte Gel in eine Gelkammer legen und mit TAE-Puffer übergießen
- Marker und DNA-Proben (in Ladepuffer) in die Gelkammern pipettieren
- Die DNA bei 100-120 mV auftrennen
- Analyse des Bandenmusters bei kurzweiligem UV-Licht

3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

- DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung bei langwelligem UV-Licht aus dem Gel ausschneiden
- Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmente nach dem Herstellerprotokoll des Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kits

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) kann ein definierter Teil eines DNA-Strangs *in vitro* exponentiell vervielfältigt werden. Dazu werden zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, die vier Desoxyribonukleotide (dNTPs), eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. taq-Polymerase), Mg²⁺-Ionen und Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase optimierte chemische Umgebung sicherstellen.

Die Primer hybridisieren mit je einem der beiden DNA-Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

Eine PCR ist eine zyklische Reaktion, in jedem Zyklus wird die Menge an amplifizierter DNA verdoppelt. Ein Zyklus besteht aus den Schritten Denaturierung der DNA-Stränge, Hybridisierung der Primer mit ihrer Zielsequenz und Elongation der Primer.

Die Hybridisierungstemperatur (*Annealing*) hängt von der Sequenz der Primer ab, sie sollte 2-3 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen.

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Es kann von einer Elongationsgeschwindigkeit von 1000 bp pro Minute ausgegangen werden.

Bei der Verwendung von Überhangprimern bindet das 5'-Ende der Primer nicht an die Originalsequenz. Dies kann ausgenutzt werden, um neue

Restriktionsschnittstellen zu erzeugen. Um in diesem Fall die Effizienz der PCR zu erhöhen, werden die ersten Zyklen mit einer niedrigeren Hybridisierungstemperatur durchgeführt (Vorschleife). Dies erleichtert die Bindung an die Originalsequenz.

50 µL Reaktionsansatz:

- 5 µL 10x-Reaktionspuffer
- 4 µL dNTPs (10 mM)
- 5 µL 5'-Primer (50 pMol)
- 5 µL 3'-Primer (50 pMol)
- 1 µL Matrizen-DNA (*Template*, 1 ng)
- 0,4 µL taq-DNA-Polymerase (entspricht 2 U bei 5 U/µL)
- Mit ddH₂O auffüllen

In dieser Arbeit verwendetes Standardprogramm:

Schritt	Wiederholungen	Temp.	Dauer	Bemerkung
1	1x	94 °C	3 Minuten	Denaturierung der DNA
2	5x	94 °C	30 Sekunden	Optionale Vorschleife mit niedrigerer Temperatur bei überhängenden Primern
		52 °C	45 Sekunden	
		72 °C	4 Minuten	
3	35x	94 °C	30 Sekunden	Denaturierung der DNA
		58 °C	45 Sekunden	Hybridisierung der Primer
		72 °C	4 Minuten	Elongation der DNA
4	1x	72 °C	10 Minuten	Terminale Elongation
5	1x	6 °C	Beliebig	Lagerung des Produkts

Länge und Menge des Produkts können durch eine gelelektrophoretische Größenauftrennung überprüft werden (8 µl Produkt mit 2 µl 5x-Ladepuffer).

3.2.4 Einzelfliegen-PCR

Bei der Einzelfliegen-PCR dient die genomische DNA einer Fliege als Matrize.

- Zu 50 µL SB-Puffer 8 µL Proteinase K (200 µg/mL) geben
- Eine Fliege 5-10 Sekunden lang mit einer Pipettenspitze zerquetschen, die den Puffer enthält; die Flüssigkeit erst danach auf die Fliege geben
- 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

- 1-2 Minuten auf 95 °C (Zerstörung der Proteinase K)
- 5 µL als Matrize für eine PCR-Reaktion einsetzen

3.2.5 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Minipräp)

Mit der Minipräp werden Plasmide aus bakteriellen Übernachtskulturen isoliert.

- 1,5 mL einer Übernachtskultur 5 Minuten bei 5000 UpM zentrifugieren
- Überstand abnehmen
- 32 µL STET zugeben
- 20 µL Lysozym in TE (20 mg/mL) zugeben
- Pellet durch Vortexen resuspendieren
- 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 90 Sekunden bei 100 °C kochen
- 10 Minuten bei 13200 UpM zentrifugieren
- Pellet mit einem Zahnstocher entfernen
- 60 µL STET zugeben
- 100 µL Isopropanol zugeben, 3-5x invertieren
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 Minuten bei 13200 UpM zentrifugieren, Überstand vollständig abnehmen
- Pellet mit 500 µL 70 % Ethanol waschen
- 2 Minuten bei 13200 UpM zentrifugieren, Überstand vollständig abnehmen
- Pellet bei Raumtemperatur trocknen lassen bis es weiß wird
- Pellet in 50 µL ddH₂O mit RNase H (10 µg/mL) aufnehmen

3.2.6 Restriktionsverdau

DNA wird durch Restriktionsenzyme geschnitten, entweder als Testverdau zur Untersuchung von Minipräps oder im Zuge einer Klonierung.

- 20 µL Reaktionsansatz:
 - 5 µL Plasmid
 - 2 µL 10x-Puffer
 - 0,5 µL pro Restriktionsenzym (entspricht 5 U bei 10 U/µL)
 - 12,5 µL ddH₂O (bei 1 Restriktionsenzym)
- Mindestens 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- Beenden der Reaktion durch Zugabe von DNA-Ladepuffer

3.2.7 pUAST-Klonierung

Durch einen Doppelverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender Ligation können PCR-Produkte mit den entsprechenden Schnittstellen in den pUAST-Expressionsvektor kloniert und unter die Kontrolle einer UAS-Sequenz gebracht werden. Anschließend können Fliegen mit diesem Vektor transfiziert werden.

- Verdau des Vektors und des aufgereinigten Inserts mit den gewünschten Restriktionsenzymen in zwei Einzelverdaus (siehe auch 3.2.6)
 - Erster Verdau: 40 μL Ansatz, 10 μL aufgereinigtes PCR-Produkt
 - Gel-Aufreinigung, Aufnahme in 30 μL ddH₂O
 - Zweiter Verdau: 34 μL Ansatz mit dem gesamten aufgereinigten Produkt aus dem ersten Verdau (30 μL)
 - Gel-Aufreinigung, Aufnahme in 30 μL ddH₂O
- Ligation
 - 2 μL 10x-Ligationspuffer
 - 1 μL T4-DNA-Ligase (400 U/ μL)
 - Ca. 3x so viel Insert wie Vektor
 - Mit ddH₂O auf 20 μL auffüllen
 - Über Nacht bei 18 °C inkubieren
 - Als Kontrolle geschnittener Vektor ohne Insert
- Transformation
 - DH5 α -Zellen auf Eis auftauen
 - Den gesamten Ligationsansatz zu den Zellen geben
 - 30 Minuten auf Eis inkubieren
 - 90 Sekunden auf 42 °C
 - 2 Minuten auf Eis abkühlen lassen
 - Mit 250 μL LB-Medium versetzen
 - 1 Stunde bei 37 °C schütteln
- Verschiedene Mengen auf LB-Amp-Platten ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren
- Kolonien picken für Übernachtskulturen
- Minipräp und anschließender Testverdau zur Untersuchung des Plasmids

3.3 Erstellung des Konstruktes *UAS-sns-ECD*

Von SNS existiert bisher nur ein Konstrukt für die Fehlexpression des vollständigen Proteins (*UAS-sns*). Die extrazelluläre Domäne (ECD) von *sns* wurde im Rahmen dieser Arbeit per PCR amplifiziert, damit ein Konstrukt zur Fehlexpression der sezernierten ECD erstellt werden kann (*UAS-sns-ECD*).

Hierfür muß das PCR-Produkt in einen pUAST-Vektor hinter UAS-Sequenzen kloniert werden. Dieser Vektor kann direkt zur Transformation von *Drosophila* genutzt werden. Durch die UAS-Sequenzen steht das Konstrukt dann unter der Kontrolle eines Gal4-Aktivators.

3.3.1 Wahl der Primer

Die mRNA von *sns* hat eine Gesamtlänge von 8023 bp (CG33141-RA, FlyBase ID FBtr0088635). Das Startcodon liegt bei bp 549. Vom 5'-Ende aus folgt auf neun Ig-Domänen (eine davon unvollständig) eine Fibronektin-III-Domäne. An diese schließen sich Transmembran- und intrazelluläre Domäne an.

Mit Hilfe der Werkzeuge der ExpASY-Website wurde die Transmembrandomäne im Bereich zwischen bp 3783 und bp 3858 der putativen mRNA vorhergesagt (*Topology prediction* auf <http://www.expasy.ch/tools/>).

Die Primer wurden so gewählt, daß in der amplifizierten DNA der Bereich zwischen Startcodon und Fibronektin-III-Domäne enthalten ist (Abbildung 12A).

Es wurden verschiedene Primer getestet, bevor ein Paar gefunden wurde, mit dem sich die DNA effizient amplifizieren ließ. Diese binden bei bp 521 und bp 3744. Damit das PCR-Produkt in den Vektor ligiert werden kann, wurden Überhang-Primer gewählt. Der 5'-Primer enthält eine EcoRI-Schnittstelle, der 3'-Primer eine KpnI-Schnittstelle, diese liegen jeweils am 5'-Ende der Primer. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 3238 bp.

Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 3.1.8 aufgelistet. Die Amplifikation wurde mit den Primern „SNS5ext“ und „SNS3ext“ durchgeführt.

3.3.2 Amplifikation

Es stand zunächst keine cDNA von *sns* als Matrize für die PCR zur Verfügung. Daher wurde versucht, Einzelfliegen-PCRs mit Fliegen durchzuführen, die *UAS-sns* enthalten (Stamm 646). Auch nach wiederholter Variation der

Reaktionsbedingungen und der Primer ist es auf diese Weise nicht gelungen, ein Produkt zu erhalten.

Erst nachdem es möglich war, *sns*-cDNA direkt als Template zu verwenden, wurde die Effizienz der PCR-Reaktion deutlich gesteigert.

Da die Reaktion jedoch auch weiterhin nur ein schwaches Produkt geliefert hat, wurde auch die Polymerase ausgetauscht, mit der Stratagene Paq 5000 Taq-Polymerase konnte schließlich zuverlässig ein PCR-Produkt erhalten werden.

Die optimalen Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 3.2.3 aufgeführt.

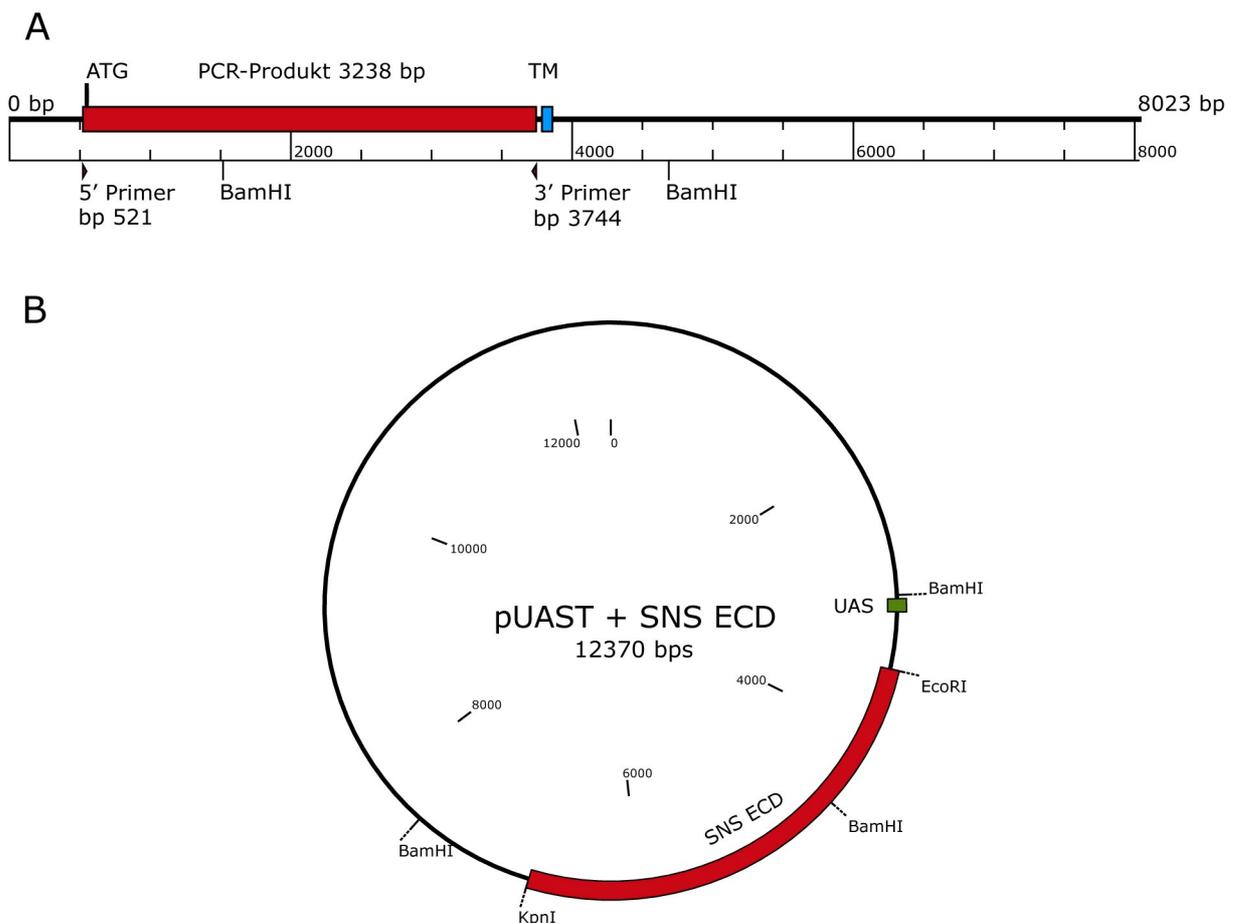


Abbildung 12: A: Darstellung der Position des PCR-Produkts innerhalb der *sns*-cDNA. Die Amplifikation beginnt oberhalb des Startcodons ATG (bp 549-557) und endet vor der Transmembrandomäne TM (bp 3783-3858). BamHI-Restriktionsschnittstellen sind zur Visualisierung der Orientierung des PCR-Produkts angegeben. **B:** Darstellung des Ligationsprodukts aus dem pUAST-Vektor und dem PCR-Produkt. Der 5'-Primer enthält eine EcoRI-Schnittstelle, der 3'-Primer eine Schnittstelle für KpnI. BamHI-Restriktionsschnittstellen sind zur Visualisierung der Orientierung des PCR-Produkts im Vektor angegeben. UAS = UAS-Sequenzen zur Transkriptionsaktivierung.

3.3.3 Klonierung

Da es bei der Amplifikation zu den oben beschriebenen Schwierigkeiten kam, konnte die Klonierung des PCR-Produkts aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden. Da nun aber ausreichend PCR-Produkt vorhanden ist, kann dieser Schritt in Zukunft abgeschlossen werden.

Das Produkt, das bei der Ligation von PCR-Produkt und pUAST-Vektor entstehen wird, ist in Abbildung 12B dargestellt. Da zwei unterschiedliche Restriktionsschnittstellen in den Primern verwendet wurden, erfolgt die Ligation in der richtigen Orientierung (die UAS-Sequenzen liegen dann stromaufwärts des Startcodons).

3.4 Methoden für die Arbeit mit *Drosophila*

3.4.1 Fliegenhaltung

Die Fliegen werden in Plastikgläsern gehalten, die zu ca. $\frac{1}{4}$ mit Futterbrei gefüllt und mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen sind.

Der Futterbrei wird mit einer Spatelspitze frischer Hefe versetzt.

Wenn nicht anderes angegeben erfolgt die Haltung bei Raumtemperatur.

Alle drei bis vier Wochen werden die adulten Fliegen in neue Gläser überführt, um den Befall mit Schädlingen und das Aufbrauchen des Futterbreis zu vermeiden.

3.4.2 Fliegenkreuzung

Weibchen werden erst ca. sechs Stunden nach dem Schlüpfen geschlechtsreif.

Diese jungfräulichen Weibchen können anhand ihrer hellen Körperfarbe und einem dunklen Fleck im Abdomen identifiziert werden.

Männchen können von Weibchen u.a. durch die Geschlechtskämme an den Tibien des vorderen Beinpaars unterschieden werden.

Jungfräuliche Weibchen können über mehrere Tage hinweg gesammelt werden, bevor sie mit einer entsprechenden Zahl an Männchen eines anderen Stamms gekreuzt werden.

3.4.3 Synchronisierung der Puppenentwicklung

Zur Präparation von Puppen in definierten Stadien müssen diese zu Beginn der Verpuppung synchronisiert werden. Dies wird erreicht, in dem weiße Präpuppen gesammelt und bei 25 °C gehalten werden. Das Stadium der Präpuppen hält ein bis zwei Stunden an (Bainbridge und Bownes 1981).

Weibliche Puppen entwickeln sich schneller als Männchen, im Durchschnitt um ca. vier Stunden. Darüber hinaus gibt es auch bei definierten Bedingungen eine individuelle Variabilität der Entwicklungsgeschwindigkeit, diese beträgt sieben Stunden im Laufe der Puppenentwicklung, fünf Stunden bei rein weiblichen Puppen (Bainbridge und Bownes 1981). Bei Zeitangaben von Puppenstadien sollte diese Variabilität berücksichtigt werden.

Das tatsächliche Stadium der Puppen kann während der Präparation optisch kontrolliert werden, hierbei kann man sich nach Bainbridge und Bownes 1981 richten.

Puppenstadien werden nach dem Schema P_n angegeben, wobei n für n % der abgeschlossenen Entwicklung steht. Bei 25 °C entspricht n praktisch der Zahl an Stunden nach der Verpuppung.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Kragentechnik

Durch die Kragentechnik nach Heisenberg und Böhl (1979) können mit einem Mikrotom frontale, horizontale oder sagittale Serienschnitte von bis zu 20 Köpfen gleichzeitig angefertigt werden.

In den Schnitten gelangen die fluoreszierenden Augenfarbstoffe durch Diffusion ins Gewebe, diese Autofluoreszenz kann unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Als Marker und Kontrollen dienen helläugige *yw*-Fliegen.

Mit CO₂ betäubte Fliegen werden mit einer Pinzette in den Schlitz eines Metallkragens eingeführt und ausgerichtet.

3.5.1.1 Fixierung der Fliegenköpfe

- 4 Stunden Fixierung der Präparate in Carnoy-Fixierlösung
- 40 Minuten Trocknen in 70 % Ethanol
- 2x 40 Minuten Trocknen in 100 % getrocknetem Ethanol
- Inkubation in Methylbenzoat über Nacht

3.5.1.2 Einbetten der Krägen in Paraffin

- 90 Minuten Inkubation bei 65 °C in Paraffin / Methylbenzoat (1:1)
- 4x 1 Stunde Inkubation bei 65 °C in Paraffin
- Kragen entweder mit den Köpfen nach oben in die Gussform aus Alufolie legen (frontale Schnitte) oder längs auf der Seite ausrichten (horizontale Schnitte) und mit flüssigem Paraffin übergießen
- Paraffin aushärten lassen

3.5.1.3 Serienschnitte mit dem Mikrotom

- Den Kragen mit einer Rasierklinge freilegen und von den Köpfen abtrennen
- Den Paraffinblock mit einer Rasierklinge trimmen
- Mit dem Schlittenmikrotom Schnitte von 7-10 µm Dicke anfertigen
- Die Serienschnitte werden mit Pinseln auf einen wasserbeschichteten Objektträger übertragen und bei 40 °C auf einer Wärmeplatte getrocknet
- 2x 20 Minuten Inkubation in Xylol, um das Paraffin zu entfernen
- Objektträger im Abzug trocknen lassen
- Eindeckeln der Präparate in DePeX

3.5.2 *Wholemout* Gehirnpräparate

- Gehirne von L3-Larven oder Puppen in PBS auf Eis freipräparieren
- Die Gehirne mit einer abgeschnittenen 200 µL-Pipettenspitze in ein Sammelgefäß mit PBS auf Eis überführen
- 20 Minuten in 4 % PFA auf Eis fixieren
- 5x 5 Minuten Waschen mit 200 µL PBS
- 1x 20 Minuten Waschen mit 200 µL PBT
- Fortfahren mit der Antikörperfärbung (3.6.1)

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Antikörperfärbung von Gehirnpräparaten

- Inkubation mit 150 μ L des primären Antikörpers (für die Verdünnungen siehe 3.1.10) über Nacht bei 4 °C (mindestens sechs Stunden; alternativ zwei Stunden bei Raumtemperatur)
- 5x 5 Minuten Waschen mit 200 μ L PBT
- Inkubation mit 150 μ L des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers im Dunkeln, zwei Stunden bei Raumtemperatur
- 5x 5 Minuten Waschen mit 200 μ L PBT im Dunkeln
- Zwei Lagen Tesafilm als Abstandshalter auf einen Objektträger aufbringen
- Die Präparate mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze mit möglichst wenig Flüssigkeit auf den Objektträger überführen, Absaugen überschüssiger Flüssigkeit
- Eindeckeln der Präparate mit Vectashield
- Abdichtung des Deckglases mit Fixogum

Es können mehrere Antikörper gleichzeitig verwendet werden, wenn diese in verschiedenen Tieren hergestellt wurden.

3.7 MARCM

3.7.1 Kreuzung

Für die Durchführung der MARCM-Methode müssen zunächst Fliegen einer Gal4-FRT-Linie mit dem Stamm 5134 gekreuzt werden. In Abbildung 13 ist diese Kreuzung exemplarisch für den Stamm 2044FRT dargestellt.

Die Zahl an Fliegen pro Glas sollte nicht zu groß sein, zehn Jungfrauen mit einer ähnlichen Zahl an Männchen sind sinnvoll. Bei einer höheren Zahl an Weibchen werden so viele Eier gelegt, daß sich die Entwicklungsdauer der Larven um Stunden verlangsamt (Ashburner 1989d), was zu Ungenauigkeit beim Zeitpunkt des Hitzeschocks führt.

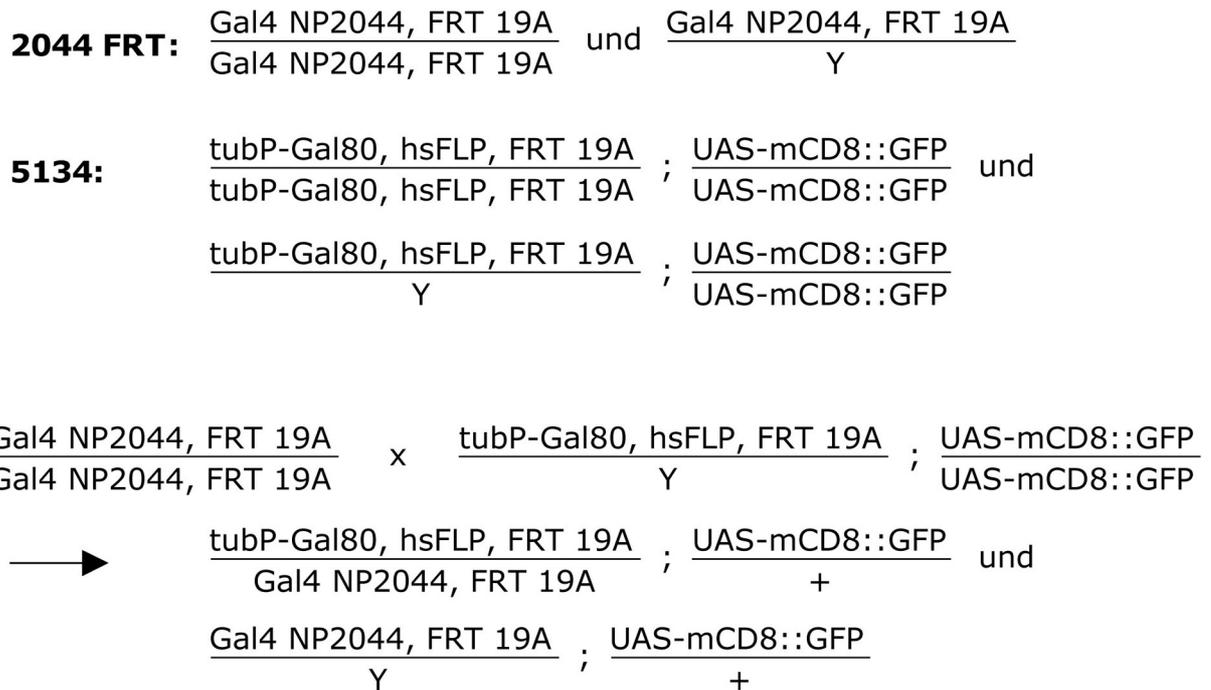


Abbildung 13: Kreuzungsschema für die MARCM-Methode. Als Beispiel ist hier der Stamm 2044FRT verwendet worden, mit 2273FRT läuft die Kreuzung analog ab. Verwendet werden nur die Weibchen.

3.7.2 Eiablage

Für die Gabe des Hitzeschocks in definierten Entwicklungsstadien muß der Zeitraum der Eiablage bekannt sein.

Am Tag nach dem Beginn der Kreuzung werden die Fliegen in ein neues Glas umgesetzt, das erste Glas wird verworfen, da in diesem der Beginn der Eiablage nicht bekannt ist.

Im Kontext dieser Arbeit war keine extreme Genauigkeit beim Zeitpunkt des Hitzeschocks notwendig, da ein breiter Überblick über die vorhandenen Zelltypen während der gesamten Entwicklung gewonnen werden sollte.

Daher wurden die Fliegen zwei Mal täglich in neue Gläser umgesetzt, die beiden Zeiträume sollten dabei ähnlich lang sein, sonst kommt es durch die unterschiedliche Anzahl an Eiern zu deutlichen Abweichungen in der Entwicklungsgeschwindigkeit (Ashburner 1989d).

Werden kürzere Zeiträume verwendet, sinkt durch den Verlust an Tieren bei jedem Schritt die Ausbeute an Gehirnen pro Glas, es sollten in diesem Fall gleichzeitig mehrere Kreuzungen in verschiedenen Gläsern angesetzt werden.

Wird eine höhere Genauigkeit für den Zeitpunkt des Hitzeschocks angestrebt, muß neben den Unterschieden in der Entwicklung durch die Populationsdichte auch beachtet werden, daß die Geschwindigkeit der Individualentwicklung vom Schlüpfen der L1-Larven bis zur Mitte des L3-Stadiums um sechs Stunden variiert (Ashburner 1989b). Es sind also unter Umständen in diesem Fall weitere Synchronisierungsschritte beim Schlüpfen der Tiere oder beim Übergang zwischen den Larvalstadien notwendig.

3.7.3 Selektion der Weibchen

Da Insertionen auf dem X-Chromosom verwendet wurden, funktioniert die MARCM-Methode in diesem Fall nur in Weibchen. Im späten L3-Stadium müssen daher die Weibchen von den Männchen getrennt werden. Diese Sortierung kann anhand der bei den Männchen im fünften Abdominalsegment sichtbaren Gonaden mit einem Pinsel in PBS auf Eis erfolgen.

Die Larven benötigen im späten L3-Stadium keine Nahrung mehr und können in Minifliegengläsern ohne Futterbrei gesammelt werden.

Da sich Weibchen schneller als Männchen entwickeln, ist bei der Sortierung meist keine gleichmäßige Verteilung zu erwarten.

3.7.4 Hitzeschock

Die Hitzeschocks werden im Wasserbad bei 37 °C gegeben, die Gläser müssen dabei mindestens bis zum unteren Ende des Schaumstoffstopfens mit Wasser bedeckt sein, die Gläser können zusätzlich mit Parafilm verschlossen werden.

Wenn der Hitzeschock vor der Sortierung erfolgt, wird er in Gläsern mit Futterbrei gegeben. Die Wärmeübertragung durch das Wasser ist effizient genug, um den Hitzeschock auch für Tiere zu gewährleisten, die sich im Futterbrei befinden. Es kann sogar beobachtet werden, daß die Larven versuchen, während des Hitzeschocks den warmen Futterbrei zu verlassen.

Bei den frühen Versuchen wurde ein Hitzeschock von 2x 40 Minuten bei 37 °C mit 30 minütiger Unterbrechung auf 25 °C gegeben.

Nach Rücksprache mit Bruno Bello (Zoologisches Institut, Universität Basel) und aus eigenen Erfahrungen heraus wurde der Hitzeschock auf 60 Minuten ohne Unterbrechung verändert. Die Länge des Hitzeschocks hat im Kontext dieser Arbeit nur untergeordnete Bedeutung, durch den 60 minütigen Hitzeschock

werden sowohl Einzelzellklone als auch Klone großer Zellgruppen erzeugt. Nach Expression der FLP-Rekombinase ist diese für einige Stunden aktiv, was die Genauigkeit des Zeitpunkts des Hitzeschocks weiter reduziert (Persönliche Mitteilung Bruno Bello).

3.7.5 Antikörper

Bei der Betrachtung der Autofluoreszenz von mCD8-GFP ist das Signal-Rausch-Verhältnis in der Regel zu schlecht, um feine Strukturen erkennen zu können. Durch die Verwendung eines Antikörpers gegen die α -Kette von mCD8 kann das Signal deutlich verbessert werden. Um das Signal des Antikörpers komplett von der bei 488 nm angeregten Autofluoreszenz von GFP zu trennen, wurde für diese Arbeit ein sekundärer Antikörper gewählt, der bei 568 nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Dies hat jedoch den Nachteil, daß aufgrund der Beschränkungen des verwendeten Konfokalmikroskops in diesem Fall die Neuropil-Gegenfärbung (angeregt bei 647 nm) nicht gleichzeitig mit mCD8 α betrachtet werden kann. Darüber hinaus überlappen sich bei Verwendung des sehr stark fluoreszierenden Kirre-Antikörpers die Emissionsspektren der sekundären Antikörper (Anregung bei 586 nm und 647 nm), so daß beim Betrachten der bei 586 nm angeregten Fluoreszenz in der Regel auch das Signal von Anti-Kirre (angeregt bei 647 nm) zu erkennen ist (Abbildung 14).

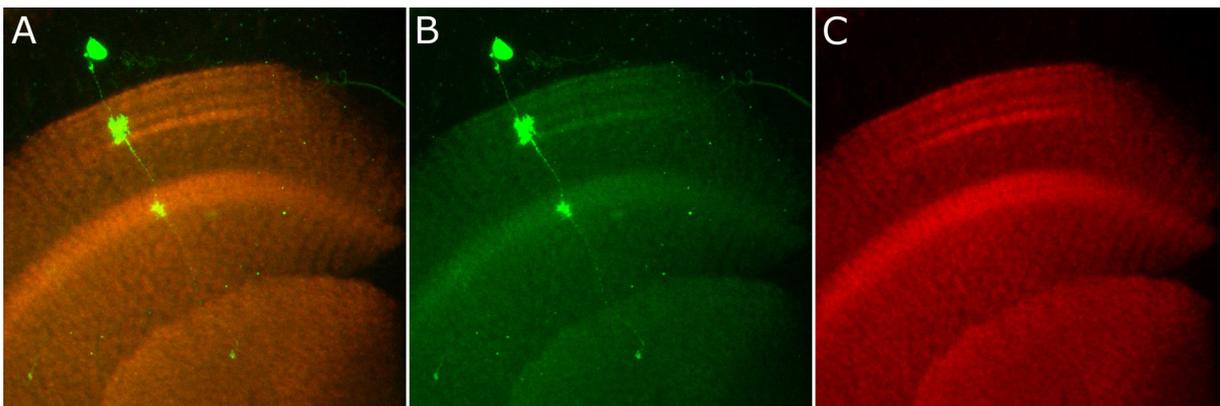


Abbildung 14: Projektionsansicht einer TM1-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre; Präparation P60. **A:** Kombination beider Farbkanäle. **B:** Anti-mCD8-Signal. Das Signal des Kirre-Antikörpers (sekundärer Antikörper 647 nm) hat in den Kanal des mCD8-Antikörpers (sekundärer Antikörper 586 nm) durchgeschlagen. **C:** Anti-Kirre-Signal.

Da es für diese Arbeit am wichtigsten war, die feinen Strukturen der Neurone erkennen zu können, wurde trotz der beschriebenen Nachteile die Kombination von bei 568 nm (mCD8a) und 647 nm (Neuropil-Gegenfärbung) angeregter Fluoreszenz gewählt.

Der Antikörper gegen mCD8a wurde auf eine Empfehlung von Liqun Luo (Howard Hughes Medical Institute, Universität Stanford, Kalifornien) hin gewählt.

3.7.6 Präparation

GFP-exprimierende Neurone in optischen Loben, präpariert im Stadium P60-P70, entsprechen in ihrem Aussehen und der Zahl an Arborisierungen adulten Zellen. Daher wurde dieses Stadium gewählt, um Neurone zu identifizieren. Die in dieser Arbeit präparierten Puppen befanden sich in den Stadien P60 bis P80 (in der Regel P70). Es wurde kein Unterschied im Aussehen der Neurone zwischen diesen Stadien festgestellt.

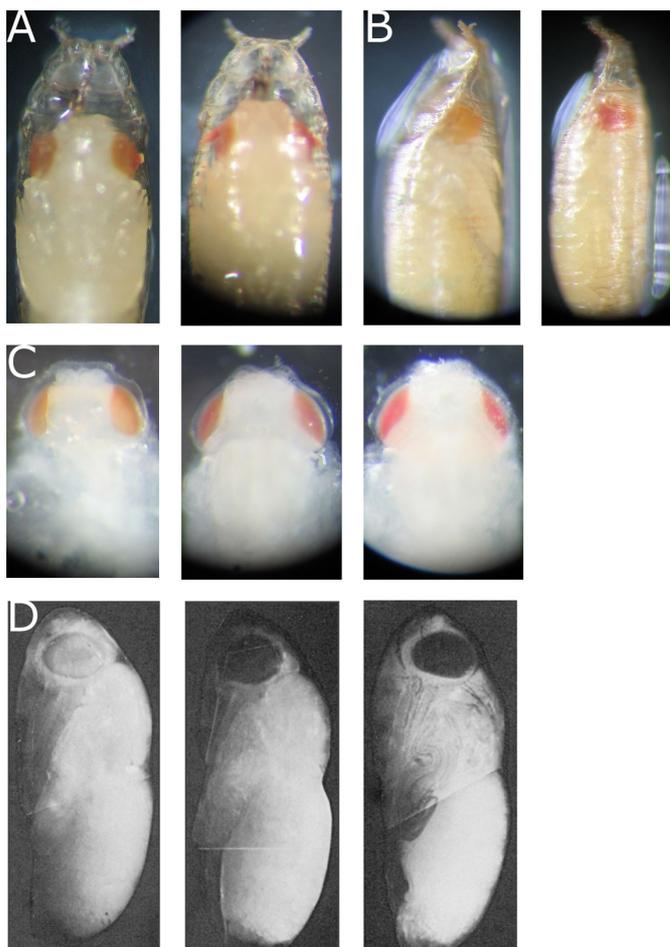


Abbildung 15:

Optische Merkmale bei der Altersbestimmung von Puppen.

A-C: Verschiedene Puppen der Linie 2044FRT 70 Stunden nach Verpuppung. Es wurde nicht nach Männchen und Weibchen unterschieden, um die gesamte Variationsbreite der Augenfarbe zu zeigen, sie reicht von orange bis zu hellrot.

In C wurde die Puppenhülle entfernt.

D: Aufnahmen aus Bainbridge und Bownes 1981, von links nach rechts den Stadien P60 (orangene Augen), P70 (hellrote Augen) und P80 (dunkelrote Augen, Borsten, graue Flügel) entsprechend.

Die Bestimmung der Stadien erfolgte auf der Basis von Bainbridge und Bownes 1981. Aus ihrer Arbeit geht hervor, daß Puppen mit orangenen Augen das Stadium P60 erreicht haben, mit hellroten Augen das Stadium P70 (Abbildung 15). Dieser Zusammenhang zwischen Augenentwicklung und Stadium wurde mit Puppen der Stämme 2044FRT und 2273FRT bestätigt.

3.7.7 Bildbearbeitung

Eine Nachbearbeitung der in *Amira* erstellten Bilder (siehe 3.8.1) fand in *Adobe Photoshop 7.0* und *CS2* statt. Angepasst wurden Kontrast, Helligkeit und Tonwertkurven der Einzelfarbkanäle. Wenn einzelne Neurone dargestellt werden sollten, wurden in *Photoshop* die Signale anderer Zellen aus dem grünen Kanal entfernt. In einigen Fällen wurden die Zellen aus identisch zugeschnittenen Z-Ebenen manuell in *Photoshop* zusammengesetzt, um eine optimale Darstellung aller Abschnitte der Zelle zu gewährleisten. Wenn bei einer Projektionsansicht die Neuropil-Gegenfärbung gegenüber dem GFP-Signal verschoben wirkte, wurde die Gegenfärbung in *Photoshop* aus einzelnen Z-Ebenen zusammengesetzt, damit jeder Abschnitt der Zelle vor der korrekten Gegenfärbung dargestellt wird (Abbildung 16A-B).

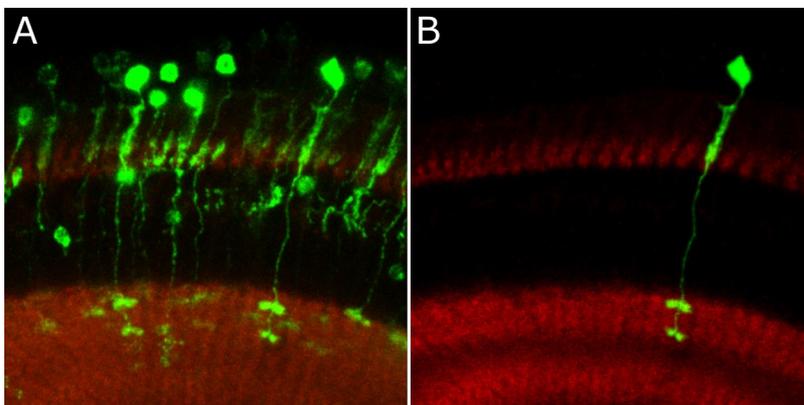


Abbildung 16: Projektionsansicht von Laminamonopolarzellen in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre; Präparation P60. **A:** Projektionsansicht aus *Amira*.

B: Nachbearbeitetes Bild zur Hervorhebung der L1-Zelle. Die Signale anderer Zellen wurden aus dem grünen Kanal gelöscht, ohne das relevante Neuron zu verändern. Dadurch wird die Zelle klarer erkennbar. Die Neuropilgegenfärbung wurde jeweils aus der Z-Ebene verwendet, in der sich das Signal der Zelle befindet. Dadurch werden die korrekten Schichten der Arborisierungen deutlich. In A wird der Eindruck einer falschen Projektionstiefe in der Medulla erweckt, in B ist dies korrigiert.

3.8 Mikroskopie

3.8.1 Konfokale Laserscan Mikroskopie

Das Mikroskop Leica TCS 4D verwendet einen Argon-Krypton-Laser, mit dem Fluoreszenz mit den drei Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 647 nm angeregt werden kann.

Der Laser tastet das Präparat in jeder Fokusebene zeilenweise ab. Außerhalb der Fokusebene liegende Schichten werden nicht zur Fluoreszenz angeregt, wodurch es möglich ist, *wholamount* Präparate schichtweise zu untersuchen.

Das Mikroskop wird mit der Software *Scanware 04.2a* von Leica Lasertechnik über einen TCS-Rechner (TCS = *True Confocal Scanner*) angesteuert.

Die Aufnahmen wurden in der Regel mit dem 63x vergrößernden Ölimmersions-Objektiv erstellt, gelegentlich wurden die 40x oder 100x Objektive verwendet. Das 40x Objektiv kann einen Bildausschnitt von 250 x 250 µm darstellen, das 63x Objektiv 159 x 159 µm und das 100x Objektiv 100 x 100 µm. In Fällen sehr schwacher Fluoreszenz wurde das 40x Objektiv mit einem zusätzlichen digitalen Zoom mit einem Faktor von bis zu 1,67x kombiniert, der den Bildausschnitt auf bis zu 150 x 150 µm verkleinert hat.

Die Detektorblende betrug üblicherweise 90 (*Pinhole*).

Der TCS-Rechner kann pro Kanal 44 Bilder in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln bzw. 177 Bilder in einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln speichern. Es wurde in der Z-Achse ein Bild pro µm erstellt. Überschritt die Gesamtzahl der aufgenommenen Z-Ebenen 44, wurde die niedrigere Auflösung gewählt.

Die Bilder wurden beim Aufnehmen 4x-8x zeilenweise gemittelt.

Zur Analyse der Bilder wurde die Software *Amira 3.1.1* verwendet. Mit dem Modul *OrthoSlice* werden einzelne Z-Ebenen abgebildet, mit *ProjectionView* eine beliebige Zahl an Z-Ebenen zu einem Einzelbild überlagert (nach maximaler Intensität). Mit *Voltex* oder *IsoSurface* werden 3D-Rekonstruktionen erstellt.

3.8.2 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Vorbereitung auf die Elektronenmikroskopie werden Fliegen in einer Acetonreihe (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 %; jeweils 30 Minuten) getrocknet und ihre Köpfe anschließend auf einen Probenträger geklebt.

Die Präparate werden mit Gold bedampft, um eine gleichmäßig hohe Leitfähigkeit der Oberfläche zu erzeugen und die elektrische Aufladung des Präparats während des Abtastens zu verhindern.

Die Abtastung des Präparats durch den Elektronenstrahl findet im Vakuum statt, um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen aus der Luft zu vermeiden.

Die Aufnahmen wurden in einer Auflösung von 2000 x 1600 Pixeln erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 MARCM-Analyse der Linien NP2044 und NP2273

4.1.1 Expressionsmuster von *irreC-rst* und *kirre* in optischen Loben später Puppenstadien

Immunfärbungen des Antikörpers gegen die extrazelluläre Domäne von Rst wurden 1995 von Schneider *et al.* in Puppenstadien bis P49 beschrieben; spätere Stadien wurden bisher nicht genauer untersucht. Da das Expressionsmuster von *irreC-rst* während der Entwicklung sehr variabel ist, war nicht auszuschließen, daß sich die Rst-Immunfärbung in den Stadien P60-P70 noch einmal verändert. Auch die Immunreaktivität des Antikörpers gegen die intrazelluläre Domäne von Kirre wurde bisher in diesen Stadien nicht beschrieben.

Die Neurone des optischen Lobus arborisieren stereotypisch in bestimmten Schichten der Neuropile, die 1989 durch Fischbach und Dittrich definiert wurden. Diese Schichten sind M1-M10 in der Medulla, Lo1-Lo6 in der Lobula und LP1-LP4 in der Lobulaplatte. Anti-Rst und Anti-Kirre markieren einzelne Schichten in diesen Neuropilen. Durch den Vergleich der Arborisierungen der in dieser Arbeit identifizierten Zelltypen mit den Rst- und Kirre-Immunfärbungen konnte bestimmt werden, welchen Schichten nach Fischbach und Dittrich diese Immunreaktivität entspricht (Abbildungen 17 und 18).

Die Antikörper gegen Rst und Kirre markieren in den Stadien P60-P70 sehr ähnliche Schichten. In der distalen Medulla entspricht die stärkste Immunreaktivität M1, M2, M3 und M5. Der untere Terminus von L4-Zellen kennzeichnet die Schicht M4, er liegt zwischen den beiden unteren Schichten mit starker Rst/Kirre-Immunreaktivität (Abbildungen 24A und 39I). In der proximalen Medulla markiert Anti-Rst die Schichten M8, M9 und M10, M8 jedoch schwächer als M9 und M10. Dies wird z.B. an der zweiten Arborisierung von TM4-Zellen deutlich (Abbildungen 29D und H). Anti-Kirre färbt dagegen nur die Schichten M9 und M10, worauf u.a. die zweiten Arborisierungen von TM1- und TM4-Zellen Hinweise geben (43A, B, J und K). Für das Fehlen von Kirre-Immunreaktivität in der Schicht M8 spricht ebenfalls, daß der Abstand zwischen den beiden stark gefärbten Abschnitten in distaler und proximaler Medulla bei

Kirre-Färbungen stets größer ist als bei Anti-Rst. In Abbildung 18B kann ein Axonbündel von Tangentialzellen zentral im schwächer gefärbten mittleren Teil der Medulla erkannt werden, das durch die Schicht M7 verläuft. Der Bereich darunter (also M8) zeigt keine Kirre-Immunreaktivität.

In der Lobula wurde der posterior am stärksten gefärbte Bereich den Schichten Lo1 und Lo2 zugeordnet, da sowohl TM1- als auch TM2-Zellen darin terminieren (Abbildung 43C und F). Bei Färbungen mit Anti-Rst ist zwischen den in Abbildung 17G und H als Lo3 und Lo4 bezeichneten Schichten eine weitere dünne deutlich markierte Linie erkennbar. Diese liegt vermutlich auch in Lo3. Für Anti-Kirre fehlt die entsprechende Färbung (Abbildung 18H und I). Die Arborisierung von LC12-Zellen läßt darauf schließen, daß Lo4 bis zum Beginn der letzten durch Anti-Rst und Anti-Kirre stark markierten Schicht reicht (Abbildung 33C).

In Abbildung 17 ist die Rst-Immunfärbung während der Stadien P60-P70 dargestellt, sie entspricht im wesentlichen der von Schneider *et al.* für P43/P49 beschriebenen. Unterschiede bestehen in der sehr schwachen Färbung der distalen Medulla (ab P70 sind die in Abbildung 17D (P60) gezeigten Schichten kaum noch zu erkennen) sowie in der starken Färbung eines optischen Glomerulus am Rande des Zentralhirns (Abbildung 17C), die ab dem Stadium P60 auftritt. Nur in Ausnahmefällen konnten die einzelnen Schichten der Lobula und v.a. der Lobulaplatte so wie in Abbildung 17G-H klar identifiziert werden. In der Regel hebt sich in der Lobula nur die posteriore Schicht Lo1/Lo2 vom einheitlich schwach gefärbten Rest ab, die Lobulaplatte ist typischerweise durchgehend schwach gefärbt. Der optische Glomerulus wurde nicht in allen Gehirnen angefärbt. Es konnte jedoch hierfür kein zeitliches Muster gefunden werden – er wurde z.B. sowohl in Präparationen im Stadium P60 als auch in P80 markiert.

Abbildung 18 zeigt die Kirre-Immunfärbung während den Stadien P60-P70. Sie hat große Ähnlichkeit zur Rst-Färbung. Der auffälligste Unterschied ist, daß die Schichten der distalen Medulla deutlicher gefärbt sind, auch zu späten Stadien; sie entsprechen bis auf die oben beschriebenen Unterschiede den Schichten der Rst-Färbung. Das Schichtungsmuster ist in der Lobula nur selten zu erkennen, in der Lobulaplatte nie. In der Regel hebt sich wie auch bei Anti-Rst nur die posteriore Schicht Lo1/Lo2 vom Rest der Lobula ab.

Der optische Glomerulus, der bei Anti-Rst ab dem Stadium P60 heraussticht, wurde bei den Kirre-Färbungen nur selten gesehen; in manchen Gehirnen hebt er

sich schwach von Zentralhirn ab (Abbildung 18C). Auch die Lamina wird durch Anti-Kirre nur schwach gefärbt, die Färbung ist basal am stärksten (Abbildung 18G).

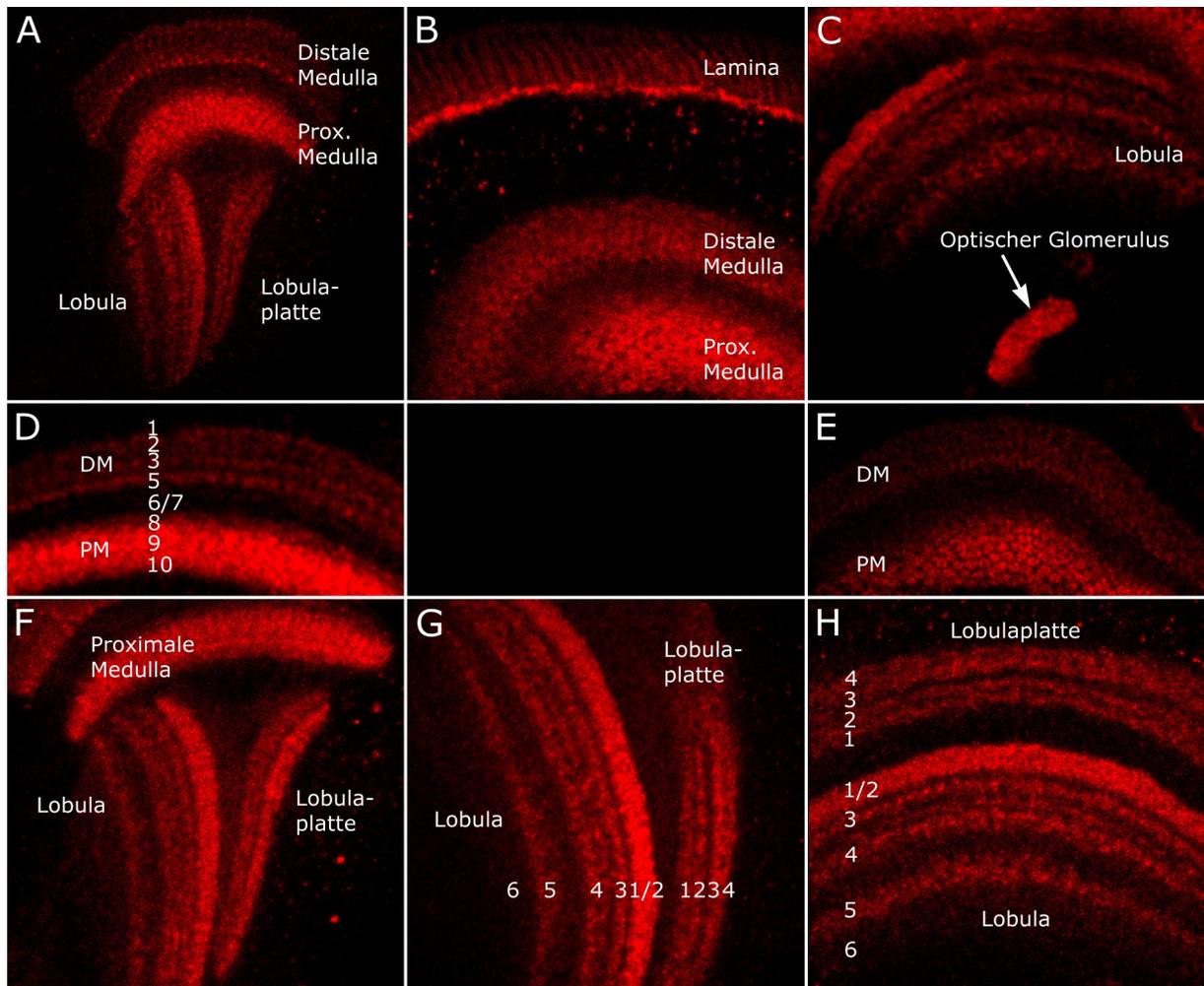


Abbildung 17: Immunfärbungen von Anti-Rst im optischen Lobus in den Stadien P60-P70 (Stamm 2044FRT). DM = Distale Medulla, PM = Proximale Medulla. **A:** Horizontalansicht eines Lobus. Die Lamina ist nicht sichtbar (P70). **B:** Die Lamina ist basal stark gefärbt, darüber ist schwach ein kolumnares Muster erkennbar (P60). **C:** Am Rande des Zentralhirns wird ab dem Stadium P60 ein optischer Glomerulus stark gefärbt (P60). **D:** Die distale Medulla ist in späten Stadien nur schwach gefärbt, in P60 lassen sich jedoch noch vier Schichten unterscheiden, die wie angegeben den bekannten Schichten der Medulla zugeordnet werden können. Die Schichten M9-M10 der proximalen Medulla werden in P60 und P70 stark gefärbt, M8 schwächer (P60). **E:** Das kolumnare Muster der proximalen Medulla in einer tangentialen Schnittebene (P60). **F-G:** Horizontalansichten des Lobulakomplexes, in denen das Schichtungsmuster deutlich wird (P70). Zwischen den mit 3 und 4 markierten Schichten ist eine weitere gefärbte Linie zu erkennen, diese ist vermutlich Teil der Schicht Lo3. **H:** Sagittalansicht des Lobulakomplexes (P60).

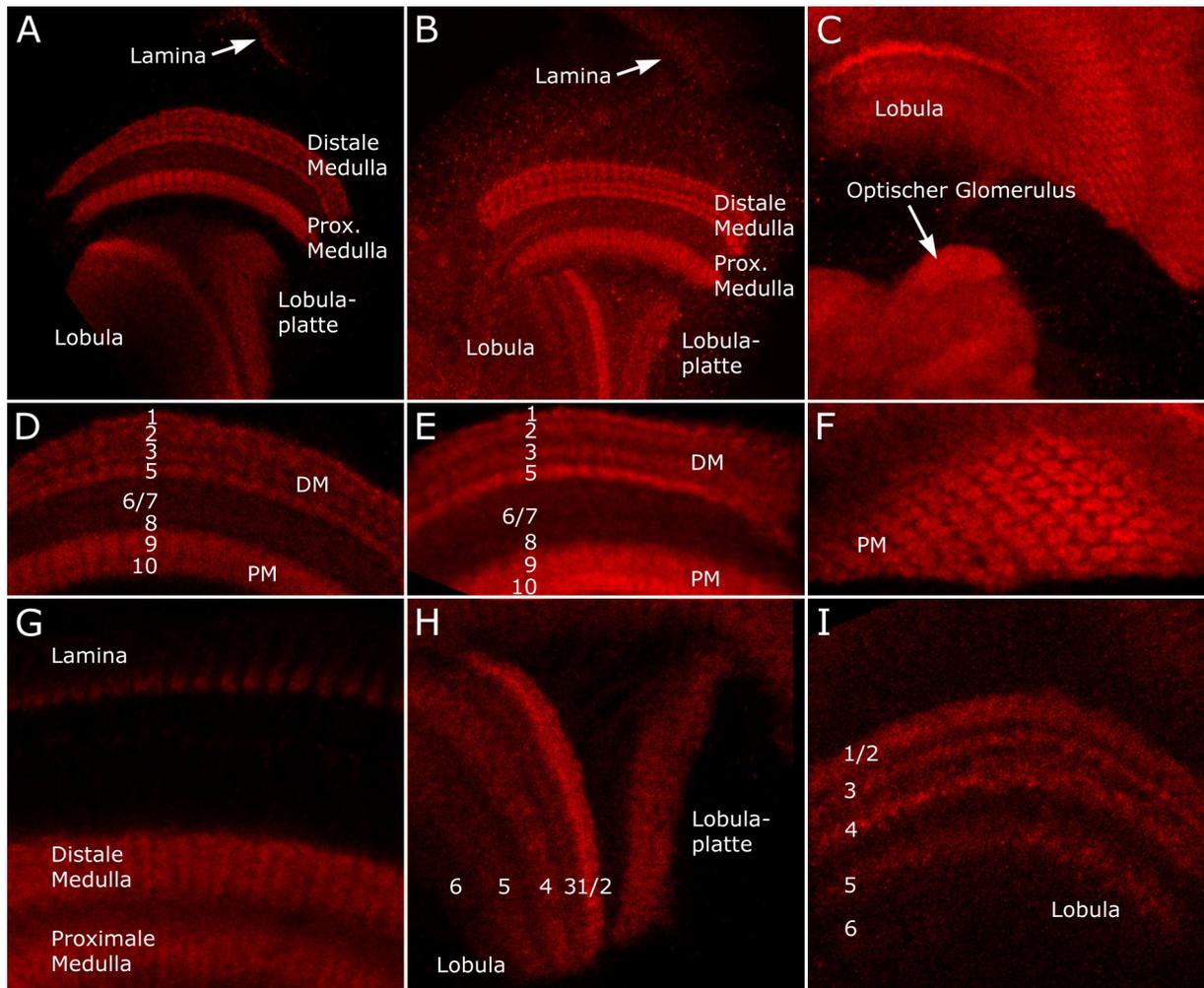


Abbildung 18: Immunfärbungen von Anti-Kirre im optischen Lobus in den Stadien P60-P70 (Stamm 2273FRT). DM = Distale Medulla, PM = Proximale Medulla. **A:** Horizontalansicht der Färbung des Antikörpers gegen die intrazelluläre Domäne (Präparation P70). **B:** Vergleich zu einer Färbung mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne (P55), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Iris Salecker, National Institute for Medical Research, London. **C:** Färbung eines optischen Glomerulus am Rande des Zentralhirns (P70). **D-E:** Das Schichtungsmuster in distaler und proximaler Medulla ist fast immer gut erkennbar, die Schicht M8 wird nicht markiert (P60). **F:** Die kolumnare Anordnung der Schicht M9 in der proximalen Medulla in einer tangentialen Schnittebene (P60). **G:** Die Lamina ist nur basal angefärbt (P60). **H-I:** Das Schichtungsmuster der Lobula läßt sich nur selten deutlich erkennen (außer der Schicht Lo1/Lo2, die immer heraussticht), die Lobulaplatte ist einheitlich schwach gefärbt (P70).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von Kirre verwendet, es existiert jedoch auch ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne (Menon *et al.* 2005). Die beiden Antikörper können in den Bildern 18A und B verglichen werden (Abbildung 18B aus Bazigou *et al.* 2007).

Das Präparationsstadium unterscheidet sich zwischen den Bildern. Es ist jedoch erkennbar, daß die markierten Bereiche grundsätzlich übereinstimmen. Der extrazelluläre Antikörper färbt die Schichten des Lobulakomplexes deutlicher, führt aber auch zu einer stärkeren Hintergrundfärbung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die Rst- und Kirre-Immunfärbungen in den Stadien P60-P70 sehr ähnlich sind. Sie unterscheiden sich in der Intensität der Färbung einzelner Schichten, sowie in den Schichten M8 und Lo3. Mit fortschreitender Puppenentwicklung nimmt die Intensität der Rst-Immunreaktivität ab, in P80 ist sie sehr schwach.

4.1.2 Gal4-Expressionsmuster im optischen Lobus

Die Gal4-Enhancer-Trap-Linien NP2044 (Insertion stromaufwärts von *rst*) und NP2273 (Insertion stromaufwärts von *kirre*) treiben Gal4/UAS-vermittelte Expression u.a. in den optischen Loben.

Durch Kreuzung von NP2044 und NP2273 mit *UAS-mCD8::gfp* werden alle Zellen mit GFP markiert, in denen Gal4 produziert wird.

In diesen Färbungen lassen sich die markierten Zelltypen abschätzen. Dazu kann sowohl die Lokalisierung der gefärbten Zellkörper als auch die Position der neuronalen Arborisierungen herangezogen werden.

4.1.2.1 NP2044

Abbildung 19 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt aus dem optischen Lobus einer Fliege mit dem Genotyp *gal4^{NP2044}; UAS-mCD8::gfp* im Stadium P60.

Anti-Rst und mCD8-GFP zeigen das stärkste Signal in proximaler Medulla, posteriorer Lobula und einem optischen Glomerulus des Zentralhirns. Die GFP-Färbung der distalen Medulla läßt sich in eine breitere distale und eine dünnere proximale Schicht unterteilen, die Schichten M3 und M4 sind kaum markiert (Abbildung 21A-C). Im GFP-Signal in der Lobula gibt es im Gegensatz zur Rst-Färbung nur eine deutlichgefärbte Schicht, die zwei Rst-Schichten entspricht (Lo1-Lo3). Die restliche Lobula sowie die gesamte Lobulaplatte werden durch GFP einheitlich schwach markiert. In der Lobulaplatte entspricht dies der schwachen Rst-Färbung (in Abbildung 19 nicht sichtbar).

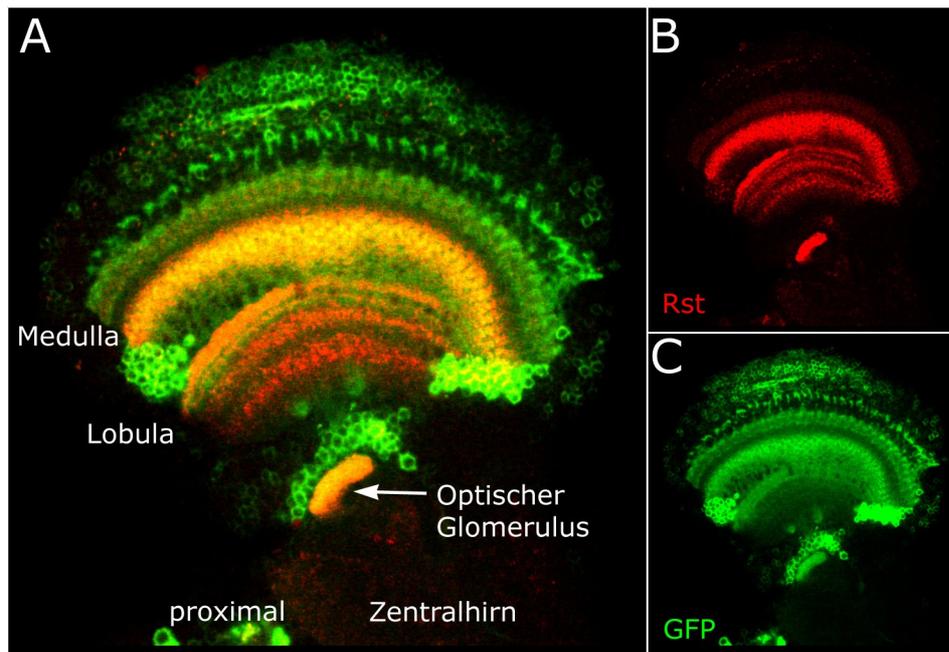


Abbildung 19: Präparation eines männlichen Gehirns aus der MARCM-Kreuzung NP2044 x 5132 (siehe Abbildung 12) zum Zeitpunkt P60.

A-C: GFP-Färbung des Expressionsmusters der Linie NP2044; grün: mCD8-GFP; rot: Rst.

Aus dieser Färbung kann bereits abgeschätzt werden, welche Zelltypen am wahrscheinlichsten zu erwarten sind:

Die Färbung in Lamina, äußerem optischen Chiasma und distaler Medulla läßt auf Laminamonopolarzellen und eventuell Retinulazellen schließen. Aus Untersuchungen von L3-Larven ist bekannt, daß sich Retinulazellen im Expressionsprofil von *gal4^{NP2044}* befinden (Küffner 2006).

Die Färbung in distaler Medulla und Lobula ist wahrscheinlich auf Transmedulla- und medullaintrinsische Zellen zurückzuführen.

Die in Abbildung 19 deutlich erkennbaren Zellkörpergruppen könnten zu lokalen Interneuronen der proximalen Medulla und Lobulakolumnarzellen gehören.

4.1.2.2 NP2273

In Abbildung 20 ist ein Ausschnitt aus dem optischen Lobus einer Fliege mit dem Genotyp *gal4^{NP2273}; UAS-mCD8::gfp* im Stadium P60 dargestellt.

Es handelt sich nicht um die exakt selbe Ansicht wie in Abbildung 19, daher sind u.a. Lamina und Laminakortex deutlicher erkennbar. Dennoch ist ein größerer Unterschied als bei NP2044 zwischen den durch Anti-Kirre gefärbten Bereichen und dem GFP-Signal offensichtlich.

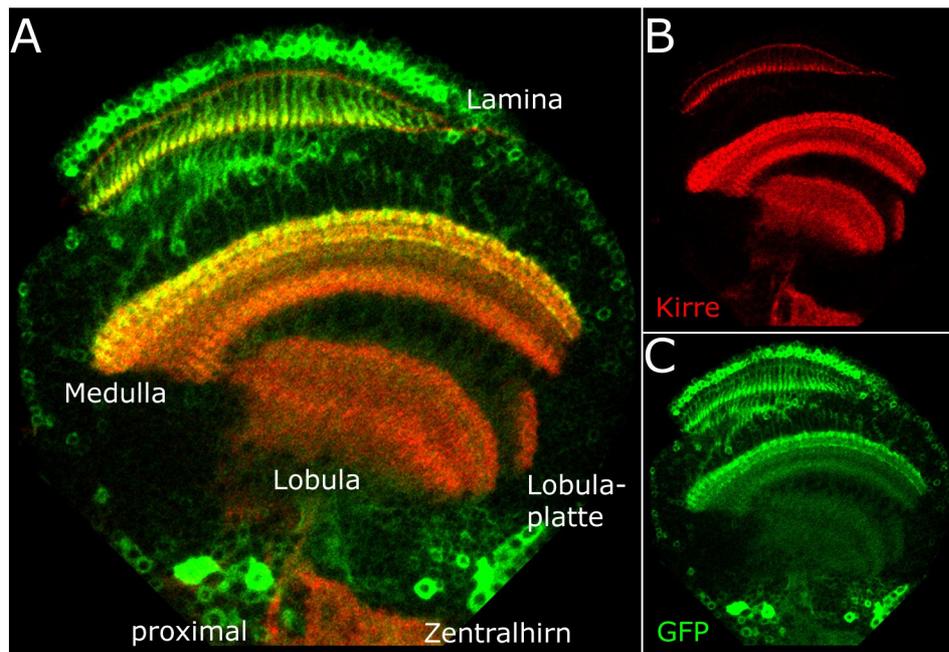


Abbildung 20: Präparation eines männlichen Gehirns aus der MARCM-Kreuzung NP2273 x 5134 (siehe Abbildung 12) zum Zeitpunkt P60. **A-C:** GFP-Färbung des Expressionsmusters der Linie NP2273; grün: mCD8-GFP; rot: Kirre.

Die Kirre-Färbung in Lamina und distaler Medulla ist stärker als die Rst-Färbung bei NP2044. Das GFP-Signal ist hier jedoch vergleichbar, Laminakortex, Lamina und zwei Abschnitte der distalen Medulla sind deutlich gefärbt, was vermutlich auf Laminamonopolarzellen zurückzuführen ist. Wie bei NP2044 werden die Schichten M3 und M4 durch GFP nur schwach markiert (Abbildung 21E-F).

Im Laminakortex werden in Abbildung 20 zwei Reihen an Zellkörpern stark gefärbt, eine weitere schwach. Das GFP-Signal im Laminakortex ist in NP2044 vergleichbar (in Abbildung 19 nicht sichtbar). Dies deutet darauf hin, daß sich nicht alle Laminamonopolarzellen im Expressionsprofil von *gal4^{NP2044}* und *gal4^{NP2273}* befinden.

In der proximalen Medulla sticht nur eine dünne zentrale GFP-Färbung in der M9-Schicht hervor, diese könnte am ehesten durch Transmedullazellen hervorgerufen werden. Lobula und Lobulaplatte werden durch mCD8-GFP einheitlich schwach markiert, die posteriore Lobula minimal stärker.

Der durch Anti-Rst gefärbte optische Glomerulus des Zentralhirns ist bei Kirre-Färbungen weniger gut erkennbar. In Abbildung 20 zeigt er keine Kirre-Immunreaktivität. Die in NP2044 prominent markierten Zellkörpergruppen im proximalen Lobus sind in NP2273 weniger deutlich sichtbar. Anterior der proximalen Medulla sind keine Zellkörper zu erkennen (diese könnten zu PM-

Zellen gehören).

Am wahrscheinlichsten sind also Laminamonopolarzellen, Retinulazellen, Transmedullazellen und medullaintrinsische Zellen zu erwarten.

Es scheint, als ob in NP2273 eine Teilgruppe der Zellen aus NP2044 markiert wird. Die Unterschiede liegen v.a. in den durch GFP in NP2044 stark gefärbten Strukturen. Dies sind proximale Medulla, posteriore Lobula und der optische Glomerulus des Zentralhirns.

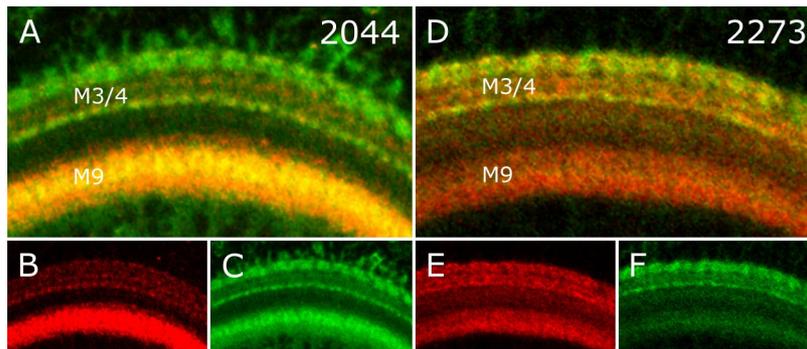


Abbildung 21: Präparation von männlichen Gehirnen aus MARCM-Kreuzungen (siehe Abbildung 12) zum Zeitpunkt P60. **A-C:** GFP-Färbung des Expressionsmusters der Linie NP2044 in der Medulla; grün: mCD8-

GFP; rot: Rst. In den Schichten M3 und M4 gibt es nur ein schwaches GFP-Signal, in der Schicht M9 ist es besonders stark. **D-F:** GFP-Färbung des Expressionsmusters der Linie NP2273 in der Medulla; grün: mCD8-GFP; rot: Kirre. In den Schichten M3 und M4 gibt es nur ein schwaches GFP-Signal, in der Schicht M9 hebt sich zentral eine dünne grüne Linie von der Umgebung ab.

4.1.3 Übersicht der untersuchten Gehirne

Für die Anwendung der MARCM-Methode wurden die Linien 2044FRT (zur Untersuchung von *rst*) und 2273FRT (zur Untersuchung von *kirre*) mit dem Stamm 5134 gekreuzt. Der F1-Generation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der präpupalen Entwicklung ein Hitzeschock gegeben, um mitotische Rekombination auszulösen (für Details und Hintergrundinformationen siehe Einleitung sowie Material und Methoden).

Die Bedingungen für die Gabe der Hitzeschocks wurden über die Zeit der Diplomarbeit stark variiert, um die Effizienz der Methode zu optimieren. Zu Beginn wurden zwei separate Hitzeschocks bei 37 °C Lufttemperatur gegeben, später nur noch ein einzelner einstündiger Hitzeschock im Wasserbad. Die Wirkung der Hitzeschocks im Wasserbad war deutlich stärker. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde im letzten Drittel der Präparationen ein

Antikörper gegen mCD8 verwendet, um das mCD8-GFP-Signal zu verstärken. Erst ab diesem Zeitpunkt waren effizient qualitativ eindeutige Aussagen möglich. Abbildung 22 zeigt eine Übersicht über die Zahl der untersuchten Gehirne unter den verschiedenen Bedingungen.

Insgesamt wurden 179 Gehirne aus der Kreuzung 2044FRT x 5134 und 183 Gehirne aus der Kreuzung 2273FRT x 5134 betrachtet (für das Kreuzungsschema siehe Abbildung 12).

Die Mehrheit der nachfolgend präsentierten Ergebnisse stützt sich auf die Versuche, die mit Anti-mCD8 durchgeführt wurden. Ergänzend dazu wurden die Gehirne ohne mCD8-Antikörperfärbung hinzugezogen.

Die Neurone der optischen Loben differenzieren während des späten L2- und des L3 Stadiums (Meinertzhagen und Hanson 1993), weshalb der größte Teil der Hitzeschocks in späten Larvalstadien durchgeführt wurde.

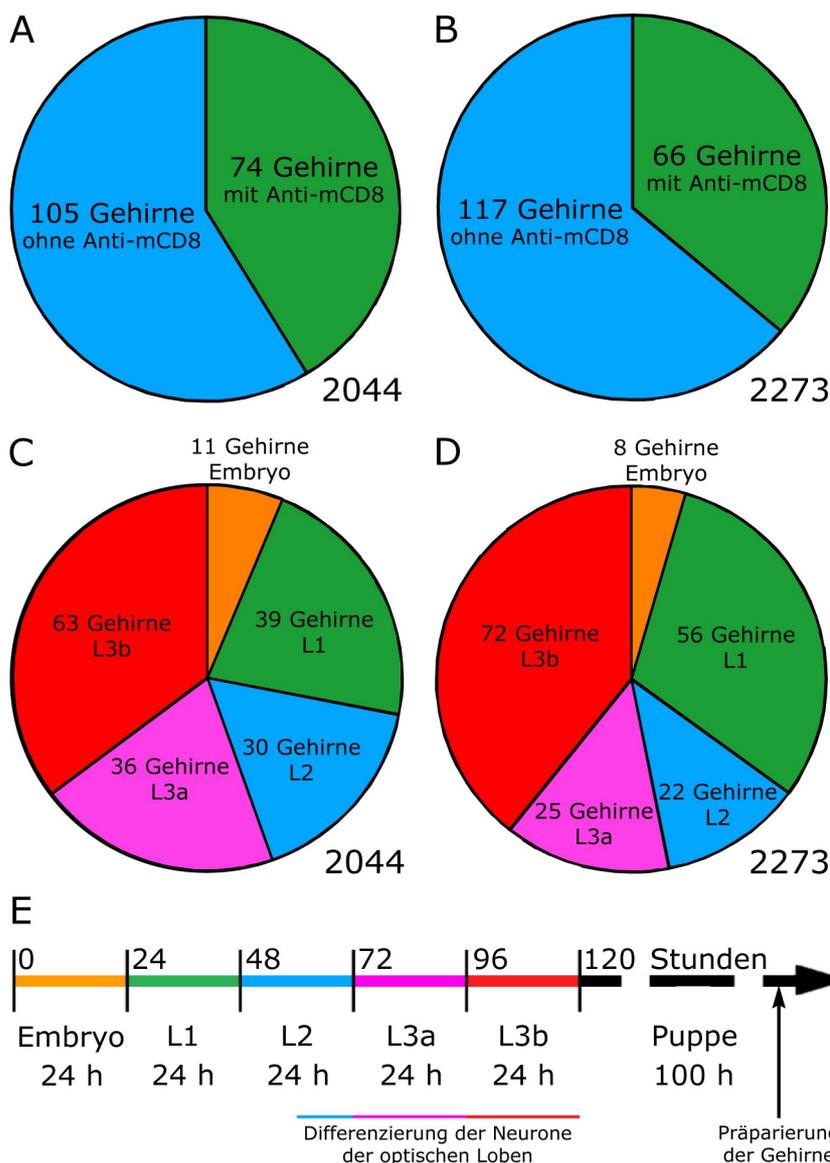


Abbildung 22:

Übersicht der durchgeführten Präparationen.

A und B: Anzahl der Experimente, die mit oder ohne Antikörper gegen mCD8 ausgeführt wurden.

C und D: Aufteilung der Gehirne nach dem Stadium, in dem der Hitzeschock gegeben wurde.

E: Vereinfachte Darstellung der Stadien präpupalen Entwicklung bei 25 °C.

Der Vergleich der markierten Zellen mit Golgi-Zeichnungen adulter Neurone (Fischbach und Dittrich 1989) zeigt, daß die Neurone im Stadium P60 größtenteils bereits ihre adulte Form haben. Deshalb wurden die Gehirnpräparationen zwischen den Stadien P60 und P80 durchgeführt.

4.1.4 Anmerkungen zur Bestimmung der Zelltypen

In den nächsten beiden Kapiteln folgt eine Übersicht der Zelltypen, die klar identifiziert werden konnten. In den Abbildungen werden jeweils typische Beispiele dargestellt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Zellen in der Regel den Zeichnungen aus der Golgi-Analyse von Fischbach und Dittrich gegenübergestellt. Dabei muß beachtet werden, daß diese Zeichnungen die Zellen immer in der Horizontalansicht zeigen, die Ergebnisse in dieser Arbeit jedoch meistens aus Frontalansichten gewonnen wurden.

Die Zeitangaben zum Hitzeschock beziehen sich jeweils auf den Zeitpunkt nach der Eiablage (*AEL*). „Hitzeschock 48-72h“ bedeutet also, daß der Hitzeschock den Larven 48-72 Stunden nach der Eiablage verabreicht wurde.

Nicht alle Zellen konnten sicher zugeordnet werden. Neurone, bei denen die Qualität der Färbung keine sinnvolle Aussage über den Zelltyp möglich gemacht hat, werden hier nicht erwähnt. Es wird angegeben, in wie vielen Gehirnen jeder Zelltyp gefunden wurde. Ein Zelltyp wird als häufig markiert angesehen, wenn er nach dem Hitzeschock in einem bestimmten Stadium in einem Viertel der Gehirne oder öfter gefärbt wurde. Diese Zellen wurden in der Regel nicht genauer quantifiziert. Eine exakte Zählung dieser Neurone führt im Rahmen der Fragestellung zu keinem Informationsgewinn. Es wird im Text angegeben, wenn ein Zelltyp besonders häufig markiert wurde.

4.1.5 Zelltypen der Linie NP2044

4.1.5.1 Retinulazellen (R-Zellen)

Es ist bekannt, daß in der Linie NP2044 bei Präparationen im L3-Stadium durch *gal4^{NP2044}*-getriebenes GFP Photorezeptoren markiert werden (Küffner 2006). Überraschend war daher, daß im Zuge dieser MARCM-Analyse nur in drei Gehirnen Retinulazellen gefunden wurden.

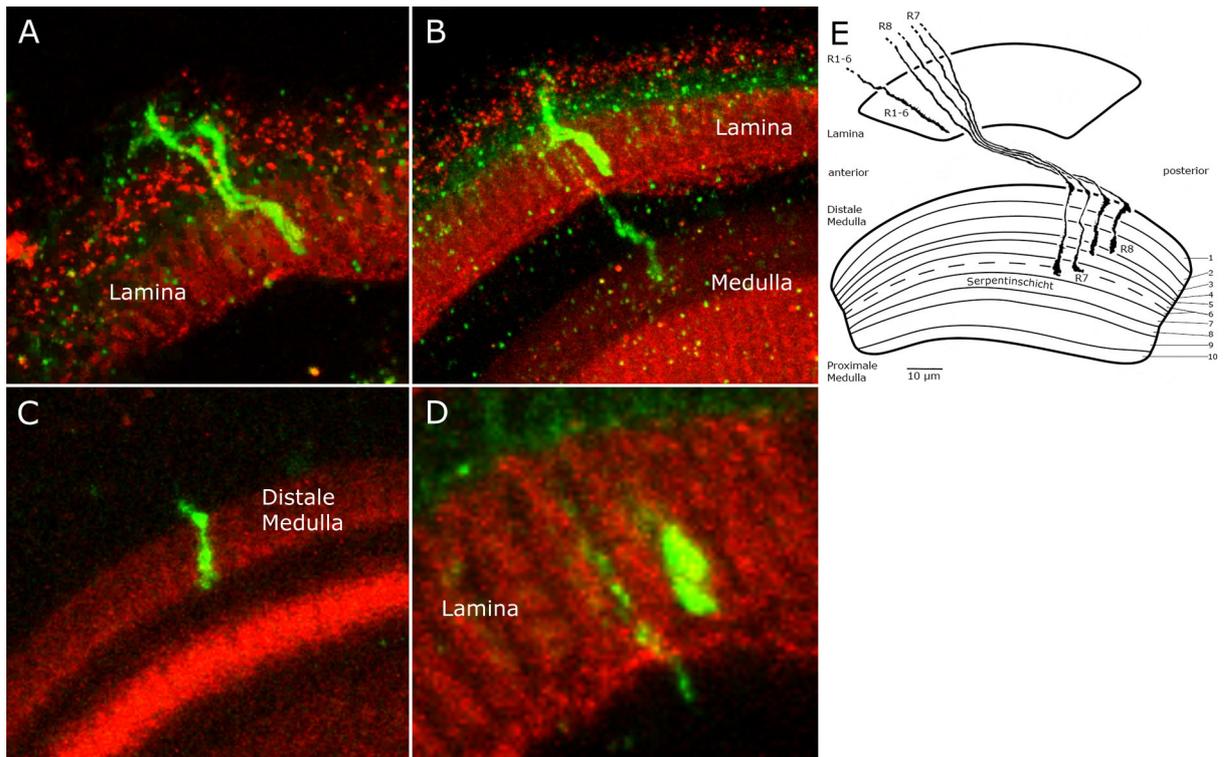


Abbildung 23: Projektionen von Retinulazellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 28-46h (L1), Präparation P60. **A:** Termini der Retinulazellen R1-R6 in der Lamina. **B:** R1-R6 aus A und eine R8-Zelle, die in der Medulla terminiert. **C:** Terminus der langen R8-Zelle aus B. **D:** Ausschnitt der Zellen aus B in der Lamina. R1-R6 kolokalisieren mit einer Rst-positiven Säule, R8 nicht. **E:** Vergleich zu Retinulazellen aus der Golgi-Analyse von Fischbach und Dittrich.

Im in Abbildung 23 dargestellten Gehirn (Hitzeschock im L1-Stadium) sind sowohl zwei R1-R6-Zellen (diese können bei frontaler oder horizontaler Ansicht des optischen Lobus nicht genauer bestimmt werden) als auch eine R8-Zelle erkennbar. Weitere R1-R6-Zellen wurden nach Hitzeschocks im L3-Stadium markiert.

Es existiert eine kürzere und eine längere Form von R8-Zellen. Die hier dargestellte Zelle wurde als lange Form von R8 eingeordnet. Sie geht nicht über die M5-Schicht hinaus und arborisiert am deutlichsten in der Schicht M3. R7-Zellen terminieren klar in der Schicht M6, dies ist hier nicht der Fall.

In Abbildung 23D ist erkennbar, daß die Termini von R1-R6 mit Anti-Rst kolokalisieren, das Axon von R8 dagegen nicht.

4.1.5.2 Laminamonopolarzellen (L-Zellen)

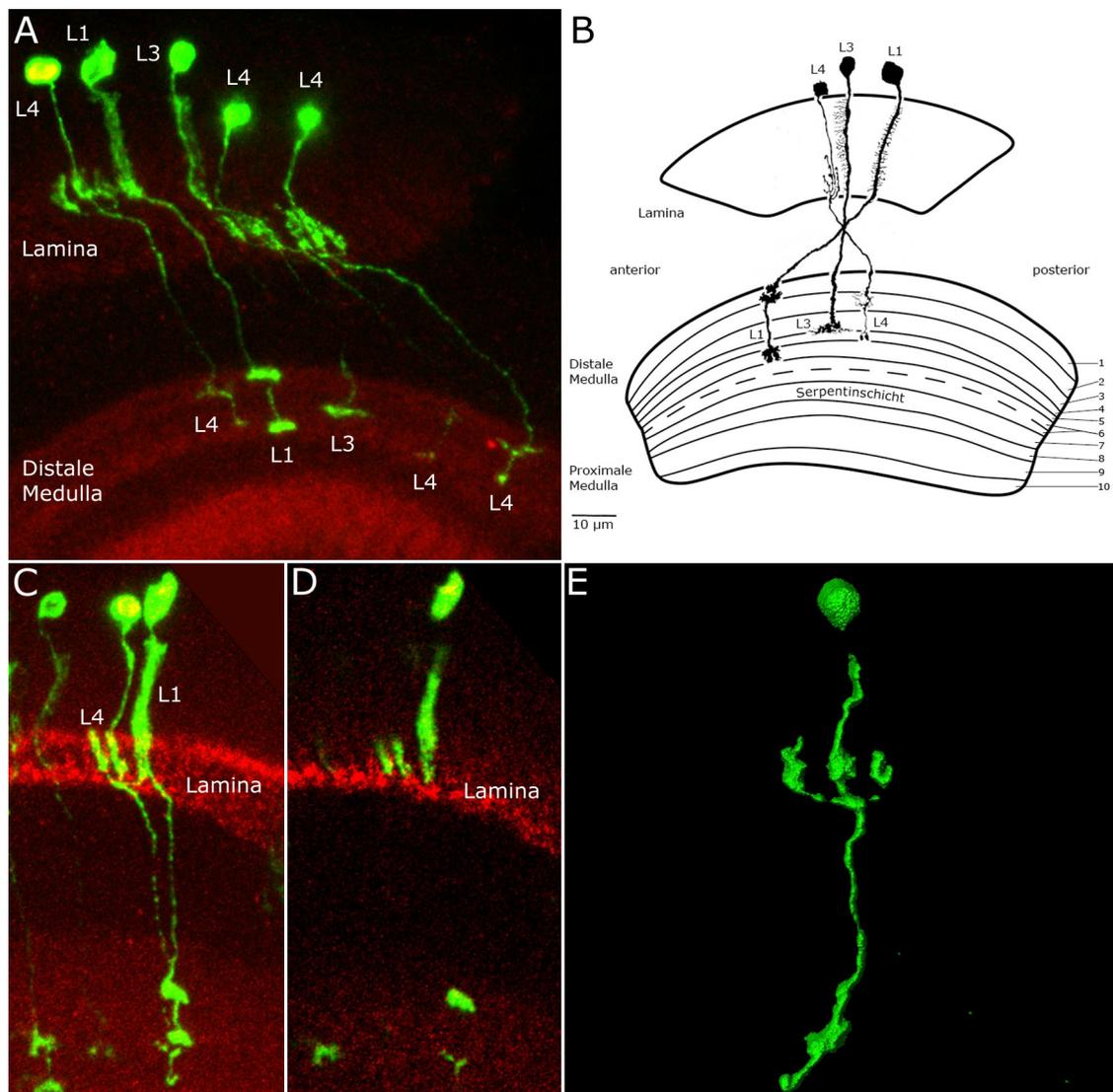


Abbildung 24: **A:** Projektionsansicht der Zellen L1, L3 und L4 in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 79-96h (L3a), Präparation P60. **B:** Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse. **C-D:** Projektionen von L1 und L4 in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 79-96h (L3a), Präparation P60. In C ist die Überlappung einer L4-Kollateralen mit einer benachbarten L1-Zelle sichtbar. Die Projektionsansicht in D besteht aus einer geringeren Zahl an Z-Ebenen, dadurch läßt sich erkennen, daß die Rst-Färbung in diesem Stadium nur basal mit den L4-Kollateralen kolokalisiert. **E:** *IsoSurface*-3D-Rekonstruktion einer L4-Zelle.

Laminamonopolarzellen stellen die am häufigsten markierte Zellgruppe dar (Abbildung 24). Bei Gabe des Hitzeschocks im L3-Stadium sind in fast jedem Gehirn L-Zellen erkennbar (in den Stadien davor vereinzelt). Die Neurone L1 und

L4 wurden besonders oft identifiziert, L3 seltener, L2 und L5 nie. L3-Zellen sind in fünf Gehirnen sicher erkennbar. Für eine genauere Beschreibung der L-Zellen siehe Kapitel 2.3.2.3. In Abbildung 24C ist sichtbar, wie eine L4-Kollaterale mit einer L1-Zelle in der benachbarten Säule überlappt. In Abbildung 24D wird deutlich, daß sich die starke Rst-Färbung im Stadium P60 auf den proximalen Teil der Lamina beschränkt und nicht auf ganzer Höhe mit den L4-Kollateralen kolokalisiert.

Siehe Abbildung 39 für detailliertere Ansichten von L-Zellen.

4.1.5.3 Zellen, die die distale Medulla mit der Lamina verbinden

In drei Fällen konnten T1-Zellen klar identifiziert werden. Der Hitzeschock wurde im L1- oder L3a-Stadium durchgeführt (Abbildung 25).

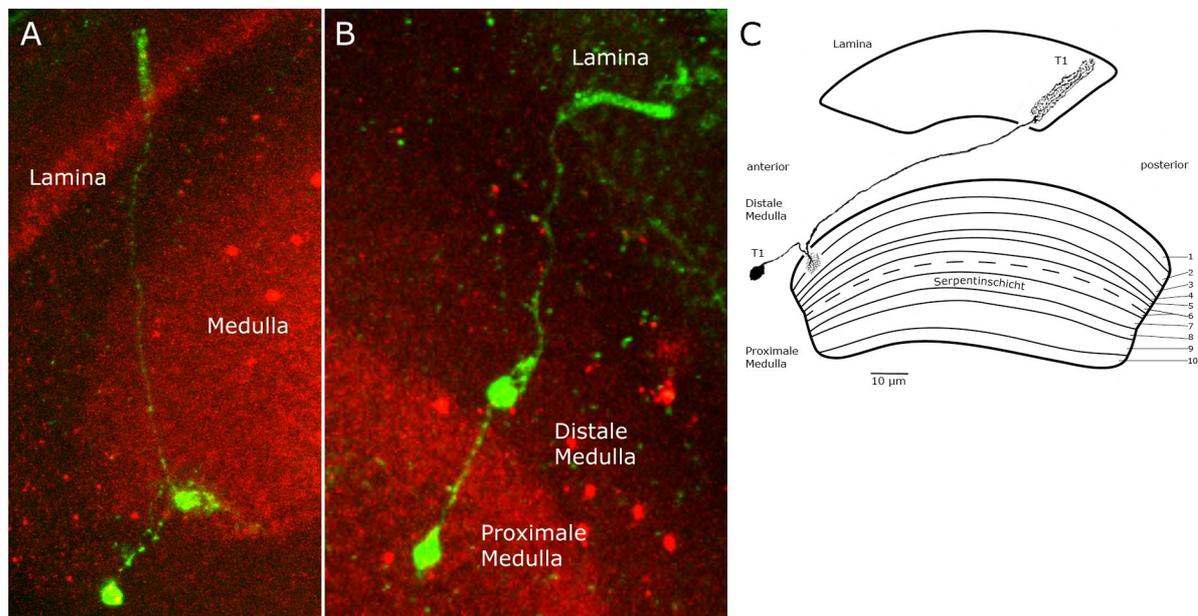


Abbildung 25: Projektionen von T1-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70. **A und B:** Verschiedene T1-Zellen. **C:** Vergleich zur T1-Zelle aus der Golgi-Analyse.

4.1.5.4 Zellen, die die distale und die proximale Medulla miteinander verbinden (MI-Zellen)

Von Fischbach und Dittrich wurden zwölf verschiedene MI-Zelltypen bestimmt. Hier wurden drei Neurone gefunden, die vermutlich MI-Zellen darstellen (Abbildung 26). Der Hitzeschock wurde jeweils während des L3a-Stadiums gegeben. Sie befinden sich alle an der Grenze zwischen distaler und proximaler Medulla, bei dem Neuron in Abbildung 26B könnte es sich auch um eine DM-Zelle handeln. Alle drei Zellen haben ihre Zellkörper anterior der Medulla, was für MI- und gegen DM-Neurone spricht.

Die Zelle in Abbildung 26A könnte eine Variation von MI11 darstellen, sie verzweigt in den Schichten M6-M9. Das Neuron in Abbildung 26C arborisiert in den Schichten M4-M8, was keiner der von Fischbach und Dittrich bestimmten Zellen entspricht. Auch die Zelle aus Abbildung 26B kann nicht zufriedenstellend mit einem Neuron aus dieser Aufstellung zur Deckung gebracht werden.

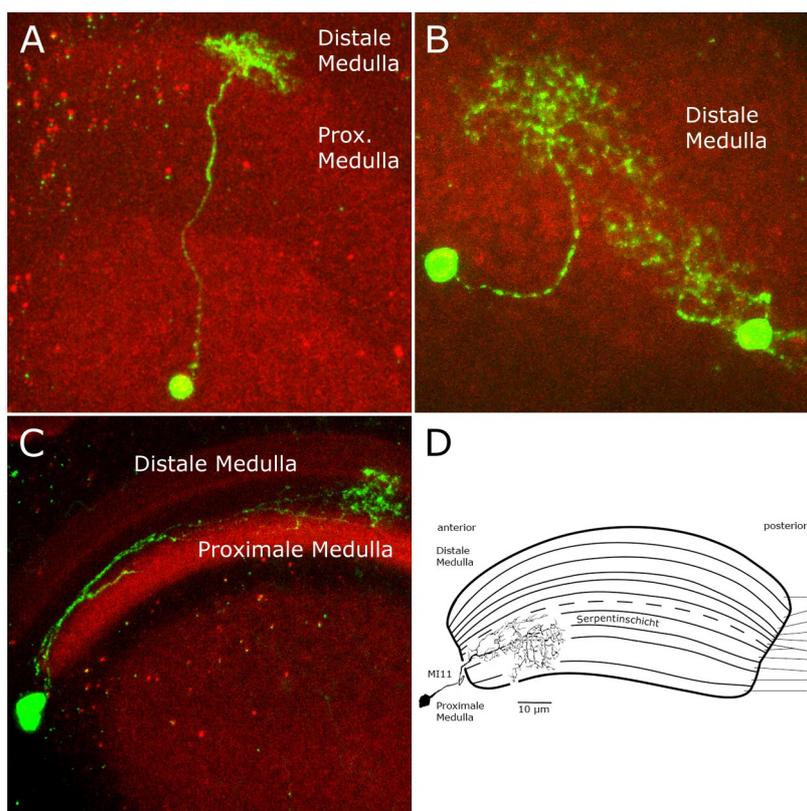


Abbildung 26:

Projektionen von MI-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst.

A: Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70. Die Zelle verzweigt sich in den Schichten M6-M9, der Zellkörper liegt anterior der Medulla. **B:** Hitzeschock 79-96h (L3a), Präparation P60. Die Zellen verzweigen am unteren Ende der distalen Medulla. **C:** Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70. Die Zelle verzweigt in M4-M8. **D:** Vergleich zu MI11 aus der Golgi-Analyse.

4.1.5.5 Lokale Interneurone der distalen Medulla (DM-Zellen)

Es wurden in vier Gehirnen Zellen markiert, die nur eine einzige Verzweigung distal in der Medulla haben. Es ist keine zweifelsfreie Zuordnung zu den acht von Fischbach und Dittrich bestimmten DM-Neuronen möglich, sie entsprechen jedoch am ehesten den Typen DM1 und DM6 (Abbildung 27). Unsicherheit besteht, da die Zellen teilweise nicht eindeutig nur in der ersten Schicht der Medulla arborisieren. Für eine sichere Aussage ist die Zahl an markierten Neuronen zu gering. Abbildung 27D stellt wahrscheinlich eine Gruppe von DM6-Zellen dar. Die DM1-Zellen wurden nach einem Hitzeschock im Stadium L3 gefärbt, die DM6-Zellen im L1-Stadium.

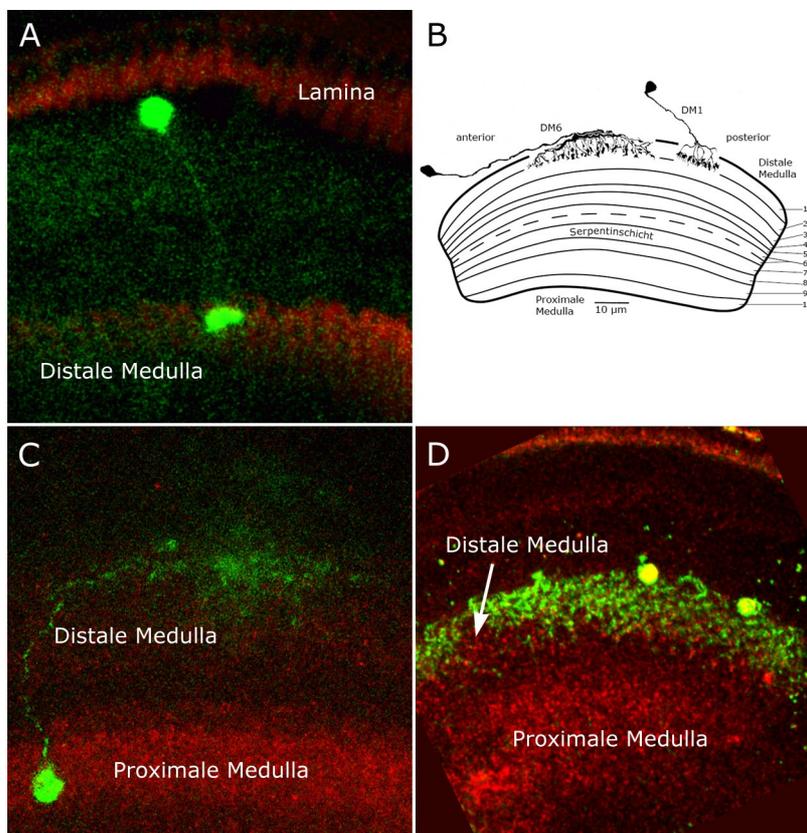


Abbildung 27:

Projektionen von DM-Zellen in der Linie NP2044. **A:** Mutmaßliche DM1-Zelle.

Grün: mCD8-GFP, rot: NC82. Hitzeschock 84-88h (L3a), Präparation P70.

B: Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse.

C: DM6-Zelle. Grün: mCD8-GFP, rot: Rst. Hitzeschock 24-48h (L1), P70.

D: Gruppe von putativen DM6-Zellen. Grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 21-30h (L1), Präparation P70.

4.1.5.6 Lokale Interneurone der proximalen Medulla (PM-Zellen)

Beide bekannten PM-Zelltypen befinden sich im Expressionsprofil. PM1 wurde sehr häufig markiert (in 17 Gehirnen), PM2 in einem Gehirn. Die PM-Neurone wurden nach Hitzeschocks im L1-, L2- und L3-Stadium gefunden und traten entweder einzeln oder in Zweiergruppen auf (Abbildung 28).

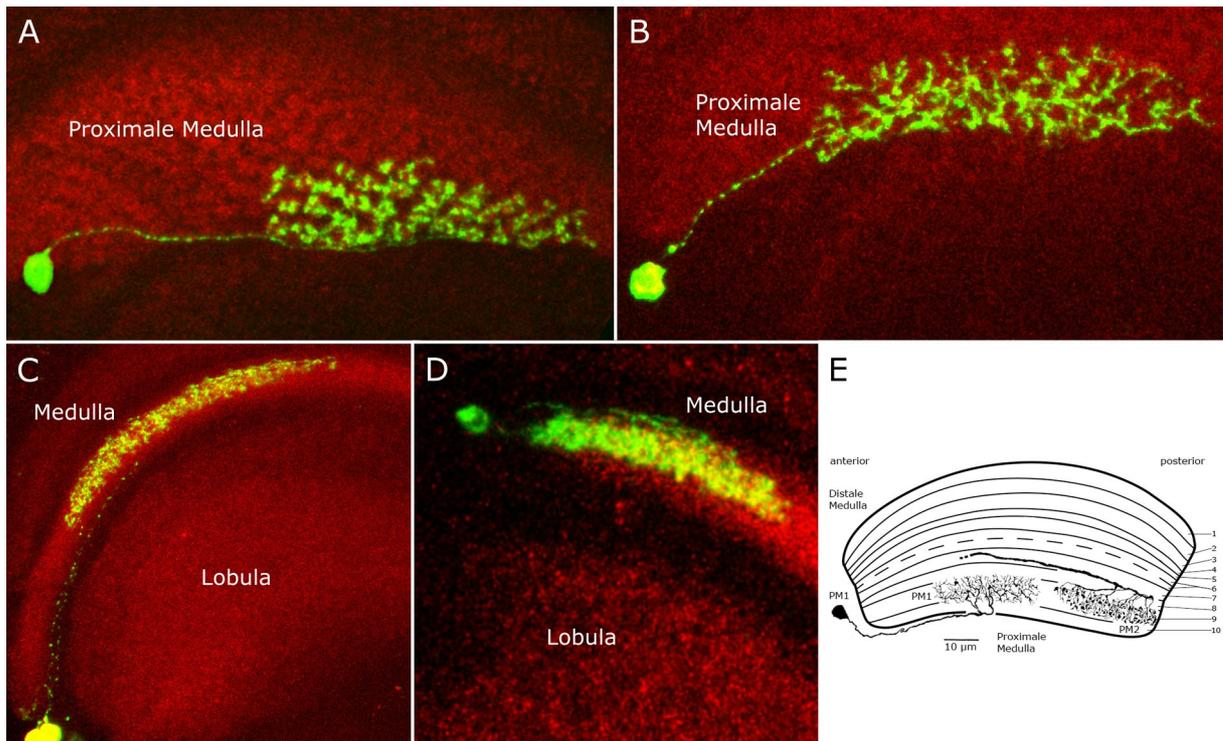


Abbildung 28: Projektionen von PM-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock für A, B und D 79-96h (L3a), für C 28-46h (L1), Präparation P60.

A-C: Verschiedene PM1-Zellen. **D:** Zwei PM2-Zellen.

E: Vergleich zu PM-Zellen aus der Golgi-Analyse.

4.1.5.7 Zellen, die die distale Medulla mit der Lobula verbinden (TM-Zellen)

Transmedullazellen stellen einen der sehr häufig markierten Zelltypen dar (Abbildung 29). Da sie oft in Gruppen gefärbt wurden, war die Identifizierung der Zellen in vielen Fällen schwierig. Es ist daher davon auszugehen, daß es neben den hier beschriebenen noch weitere TM-Zellen mit *gal4^{NP2044}*-Expression gibt.

In 13 Gehirnen wurden TM1-Neurone sicher identifiziert, in einem Gehirn TM2, in neun Gehirnen TM3 und in fünf Gehirnen TM4. Eine sichere Identifizierungen war nur möglich, wenn sich die Zellen nicht zu stark überlappten. TM-Neurone wurden also insgesamt häufiger markiert als diese Zahlen suggerieren.

Die identifizierten TM-Zellen haben zwei bis drei räumlich vergleichsweise begrenzte Arborisierungen in der Medulla und einen kaum verzweigten Terminus in der posterioren Lobula gemeinsam. Die Termini von TM1 und TM2 kolokalisieren mit der am stärksten durch Anti-Rst gefärbten Schicht in der Lobula.

Bei MARCM-Präparationen der Linie Herpes, die auf NP2044 basiert (siehe Kapitel 4.2), wurden ebenfalls sehr häufig TM-Zellen markiert; primär die Zelltypen TM1, TM3 und TM4.

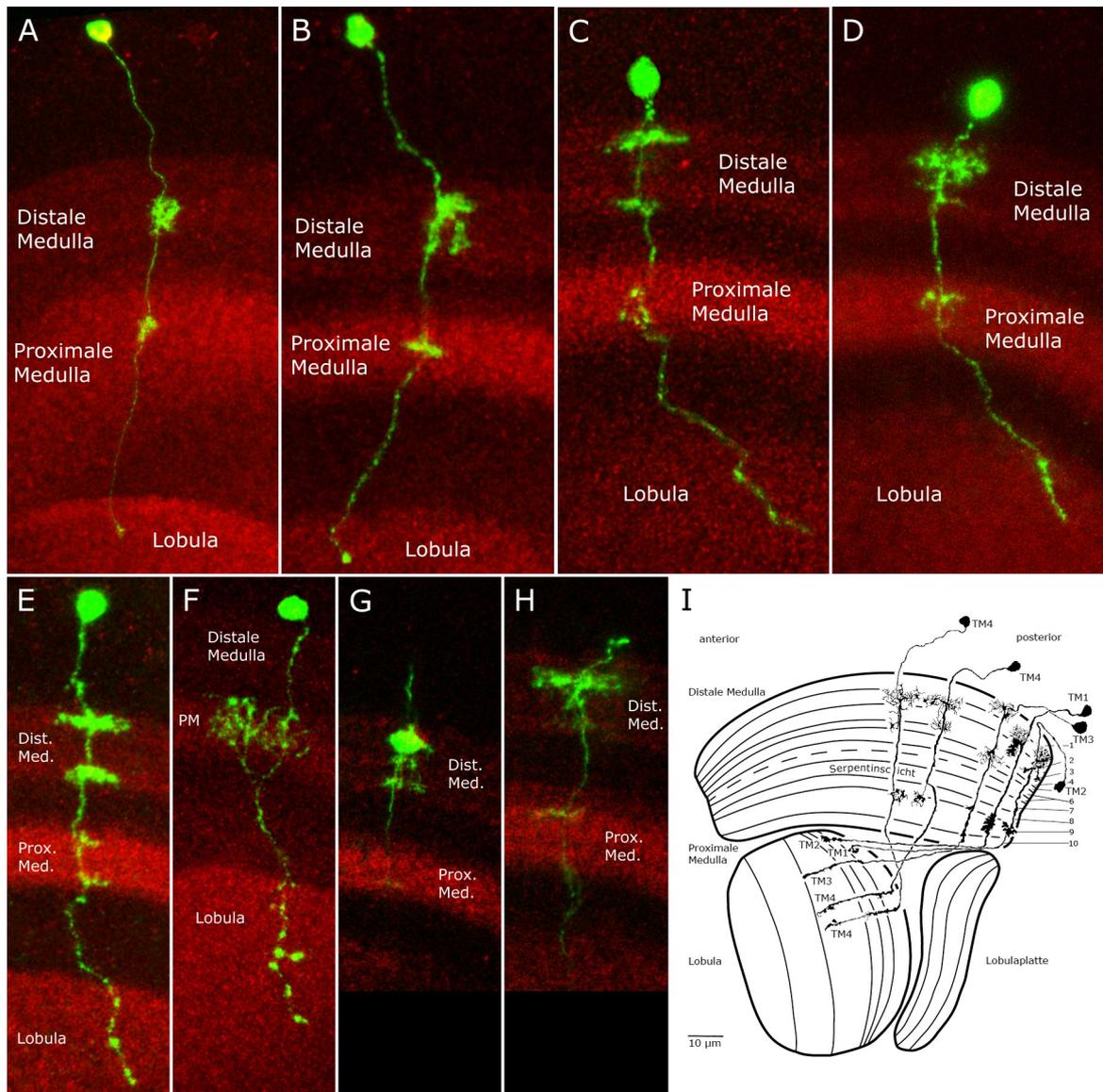


Abbildung 29: Projektionen von TM-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock für A-D und F-H 79-96h (L3a), Präparation P60; Hitzeschock für E 52-70h (L2), Präparation P70. **A:** TM1, **B:** TM2, **C:** TM3, **D:** TM4, **E-F:** TM-Zellen, die nicht klar zugeordnet werden konnten. PM = Proximale Medulla. **G:** Arborisierung einer TM2-Zelle in der distalen Medulla, **H:** Arborisierung einer TM4-Zelle in der distalen Medulla. **I:** Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse.

Von Fischbach und Dittrich wurden 28 TM-Zelltypen bestimmt. Dennoch traten in manchen Fällen Zellen auf, die nicht klar zugeordnet werden konnten. Ein Beispiel ist in Abbildung 29E dargestellt. Dieses Neuron ähnelt TM3 stark, hat

jedoch zwei klar getrennte Verzweigungen in der proximalen Medulla. Es handelt sich hierbei also vermutlich um eine Variation von TM3. Die Zelle in Abbildung 29F mit ihrer ungewöhnlichen Arborisierung in der proximalen Medulla konnte ebenfalls nicht zugeordnet werden.

TM-Zellen wurden hauptsächlich nach Hitzeschocks im L3-Stadium gefunden, gelegentlich jedoch auch im L1- oder L2-Stadium.

Weitere Detailaufnahmen der Verzweigungen der Zellen TM1-TM4 sind in Abbildung 43 dargestellt.

4.1.5.8 Zellen, die die proximale Medulla mit der Lobula oder der Lobulaplatte verbinden

Es gibt zwei Zelltypen, die die proximale Medulla mit der Lobula verbinden, T2 und T3. T3-Zellen wurden in fünf Gehirnen markiert (Hitzeschocks embryonal oder im L3-Stadium), T2-Zellen nie (Abbildung 30A).

T4-Zellen, die die proximale Medulla mit der Lobulaplatte verbinden, wurden häufig gefärbt (in elf Gehirnen), nach Hitzeschocks im Embryonal-, L1-, L2- oder L3-Stadium (Abbildung 30B).

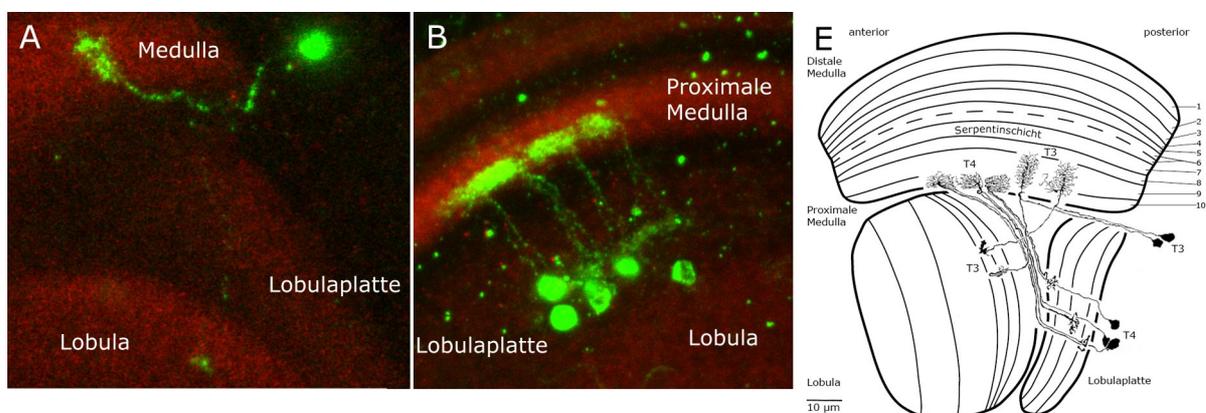


Abbildung 30: **A:** Projektion einer T3-Zelle in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 95-102h (L3b), Präparation P80. **B:** Projektion einer Gruppe T4-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 28-46h (L1), Präparation P60. **C:** Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse.

4.1.5.9 Zellen, die die proximale Medulla mit Lobula und Lobulaplatte verbinden (Y-Zellen)

Das Neuron Y3 konnte mehrfach sicher identifiziert werden (in fünf Gehirnen, mit dem Hitzeschock jeweils während des L3-Stadiums; Abbildung 31A). Eine weitere Zelle ähnelt Y1, wurde jedoch nur ein einziges Mal markiert und kann deshalb nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

In vier Loben wurde ein mutmaßlicher Y-Typ gefärbt, der mit keiner der bekannten Zellen übereinstimmt (Abbildung 31C-D). Der Zellkörper befindet sich posterior der Lobulaplatte und der Zellkörperfaden verläuft durch die Lobulaplatte. Es ist eine räumlich sehr begrenzte Arborisierung in der Lobulaplatte zu erkennen, die in den meisten Aufnahmen Y3 ähnelt, in einem Fall jedoch als eigenständige Verzweigung deutlich wird. Im inneren Chiasma teilt sich das Axon in der für Y-Zellen charakteristischen Art auf. Ein Ast projiziert in die Lobula, die ganz posterior gelegene Arborisierung ist dort mit Y5 zu vergleichen. Der andere Ast führt zur Medulla, wo er proximal in einer mit Y6 vergleichbaren Weise arborisiert. Insgesamt zeigt der Zelltyp die größten Ähnlichkeiten zu Y3, die Arborisierung in der Lobula erscheint jedoch völlig anders und diejenige in der Medulla ist auf die Schicht M10 beschränkt, während Y3 bis in M8 verzweigt.

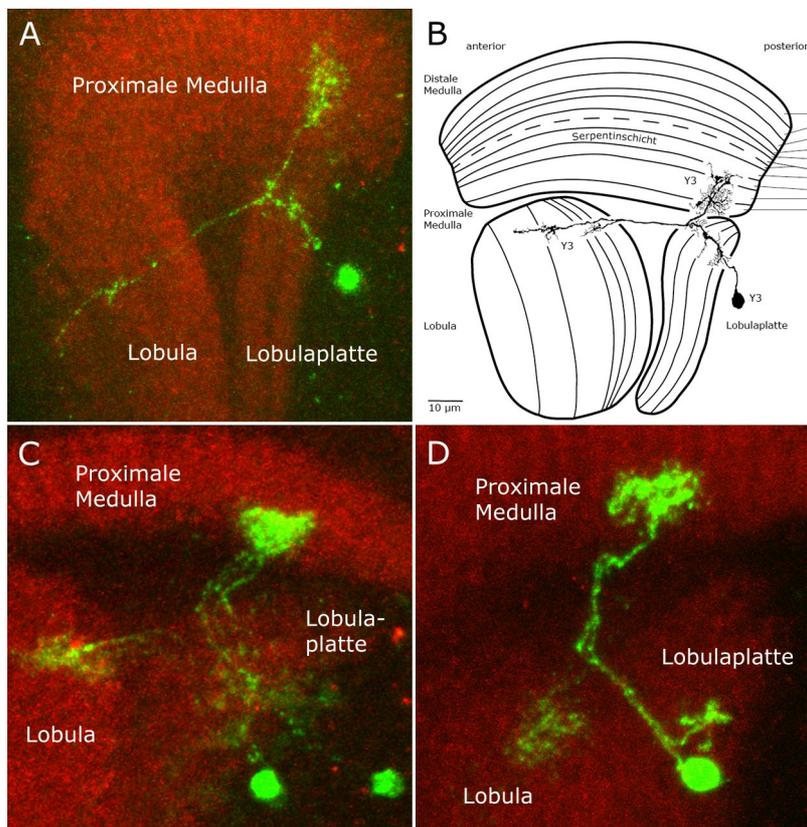


Abbildung 31:

A: Projektion einer Y3-Zelle in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst.

Hitzeschock 79-96h (L3a), P60. **B:** Vergleich zu Y3 aus der Golgi-Analyse.

C-D: Projektionen zweier putativer Y-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock jeweils 78-96h (L3a), P70. Dieses Neuron entspricht vermutlich keinem der von Fischbach und Dittrich 1989 bestimmten Zellen.

Auffallend ist vor allem in Abbildung 31D, daß das Axon der mutmaßlichen Y-Zelle wie bei einer T4-Zelle von der Medulla wieder zurück zum Lobulakomplex zu verlaufen scheint (dies ist nicht zweifelsfrei festzustellen). Die Arborisierung in der Lobula schließt die Zuordnung als T4-Zelle jedoch aus. Eine Möglichkeit ist, daß es sich hier nicht um eine Y-Zelle, sondern um überlappende T4- und T5-Zellen handelt. Die eindeutige Bestimmung des Zelltyps ist also nicht möglich. Gefunden wurde dieses Neuron nach Hitzeschocks während des L2- und des L3a-Stadiums.

4.1.5.10 Zellen, die die Lobulaplatte mit der Lobula verbinden

Eindeutig konnte die Translobulaplatte-Zelle (TLP-Zelle) TLP5 identifiziert werden. Sie trat in sechs Gehirnen nach Hitzeschocks im L2- oder L3-Stadium auf (Abbildung 32A). Bei MARCM-Präparationen der Linie Herpes, die ebenfalls auf NP2044 basiert (siehe Kapitel 4.2), wurde TLP5 häufig markiert.

Schwieriger ist die Unterscheidung zwischen den Neuronen TLP3 und TLP4. Insgesamt wurden diese beiden Typen in drei Gehirnen markiert, nach Hitzeschocks im L3-Stadium. Diese Zelltypen sind sehr ähnlich (siehe Abbildung 32F). Eine eindeutige Zuordnung kann aufgrund der geringen Zahl an markierten Zellen nicht durchgeführt werden. Das Neuron in Abbildung 32B gleicht eher TLP4, die Zelle in Abbildung 32C eher TLP3, u.a. da sie sich in der Lobulaplatte mehr posterior zu verzweigen scheint.

Hat ein Zelltyp keine einfach identifizierbare Form, sind für eine Bestimmung größere Mengen an gefärbten Zellen notwendig. Sehen dann beispielsweise neun Neurone ähnlich wie TLP3 aus und nur eines ähnelt stärker TLP4, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß es sich in allen Fällen um TLP3 handelt.

Desweiteren wurden Zellen gefunden, die auf den ersten Blick dem Typ T5 gleichen, jedoch nicht in der für dieses Neuron typischen Weise in der Lobulaplatte arborisieren. Zwei Beispiele sind in den Abbildungen 32D und 32E dargestellt. Es könnte sich entweder um T5-Zellen handeln, die noch nicht vollständig ausgebildet sind oder alternativ um einen TLP-Typ, der von Fischbach und Dittrich nicht beschrieben wurde. Andere Neurone ähneln zum selben Zeitpunkt ihrer adulten Form bereits sehr stark. Dies spricht dafür, daß es sich um TLP-Zellen handelt, die nur sehr schwach in der Lobulaplatte arborisieren und auf kleinem Raum posterior in der Lobula terminieren. Da in der Linie Herpes T5-Zellen markiert wurden (Abbildung 60), ist es jedoch wahrscheinlicher, daß es

sich auch hier um T5-Zellen handelt.

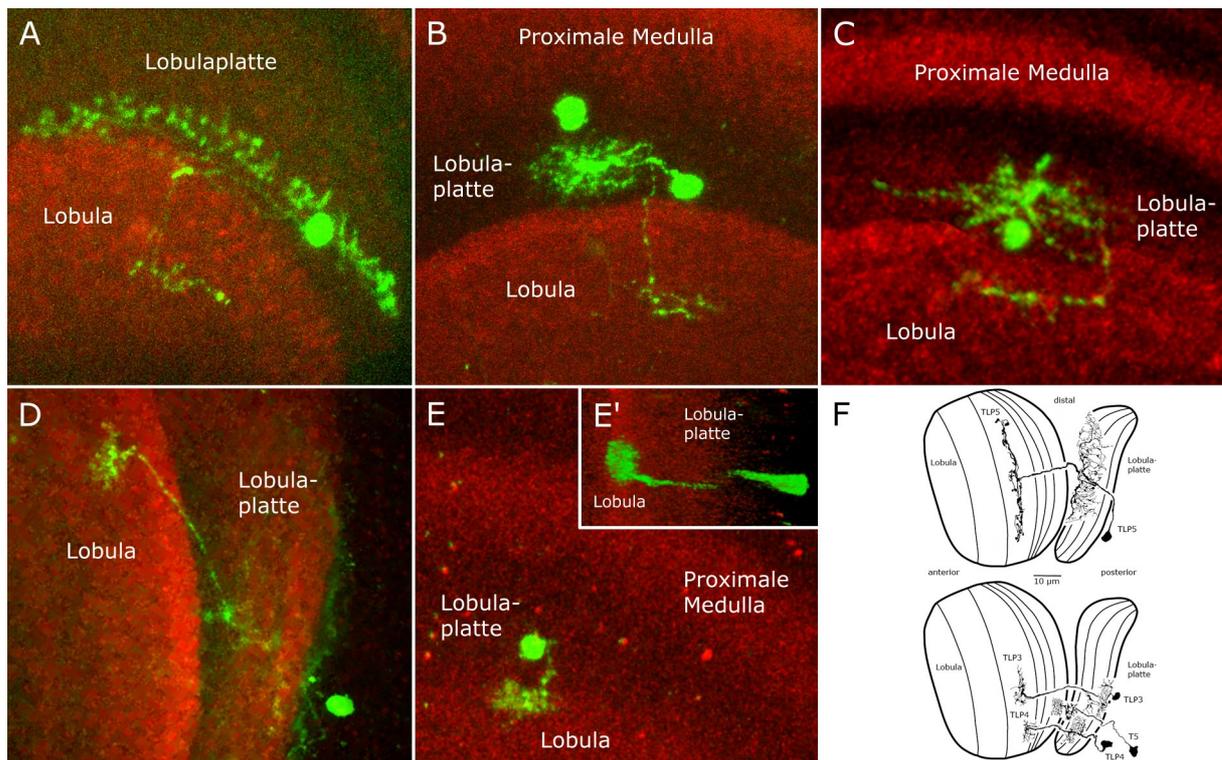


Abbildung 32: **A:** Projektion einer TLP5-Zelle in der Linie NP2044; grün: mCD8-GFP, rot: Rst. Hitzeschock 48-72h (L2), Präparation P70. **B:** Projektion einer TLP4-Zelle in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 117-121h (L3b), Präparation P60. **C:** Projektion einer TLP3-Zelle in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 79-96h (L3a), Präparation P60. Um zu zeigen, welcher Teil der Zelle in welchem Neuropil arborisiert, wurden zwei Projektionen aus unterschiedlichen Ebenen zusammengesetzt. **D-E:** Projektionen weiterer TLP- oder T5-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock für D 6-22h (embryonal), für E 52-70h (L2), Präparation P70. **E':** *Voltex*-3D-Rekonstruktion der Zelle aus E. **F:** Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse.

4.1.5.11 Zellen, die die Lobula mit dem Zentralhirn verbinden (LC-Zellen)

Von Fischbach und Dittrich wurden 1989 sieben verschiedene kolumnare Neurone beschrieben, die die Lobula mit dem Zentralhirn verbinden. Otsuna und Ito haben 2006 eine neue Aufstellung mit acht Zelltypen veröffentlicht, bei denen sie jedoch nur zwei Neurone mit den Zellen von Fischbach und Dittrich zur Deckung bringen konnten. Da Fischbach und Dittrich nur die Verzweigungen der Neurone in der Lobula beschrieben haben, jedoch nicht die Projektionen ins

Zentralhirn, wurden die Zellen hier nach Otsuna und Ito bestimmt.

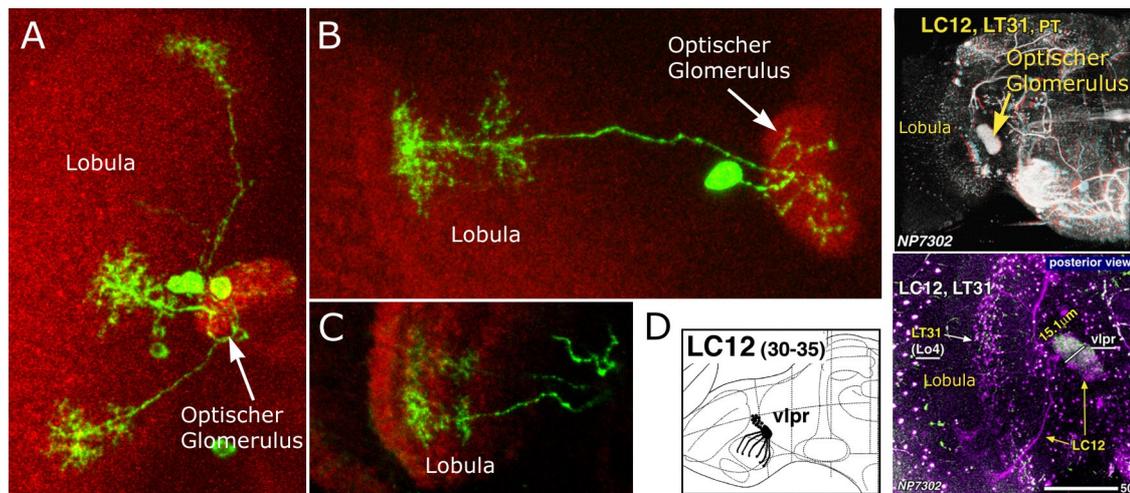


Abbildung 33: A-C: Projektionen von LC12-Zellen in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. A und B Hitzeschock 79-96h (L3a), P60; C Hitzeschock 95-102h (L3b), P75. **D:** Vergleich zu LC12 aus der Analyse von Otsuna und Ito.

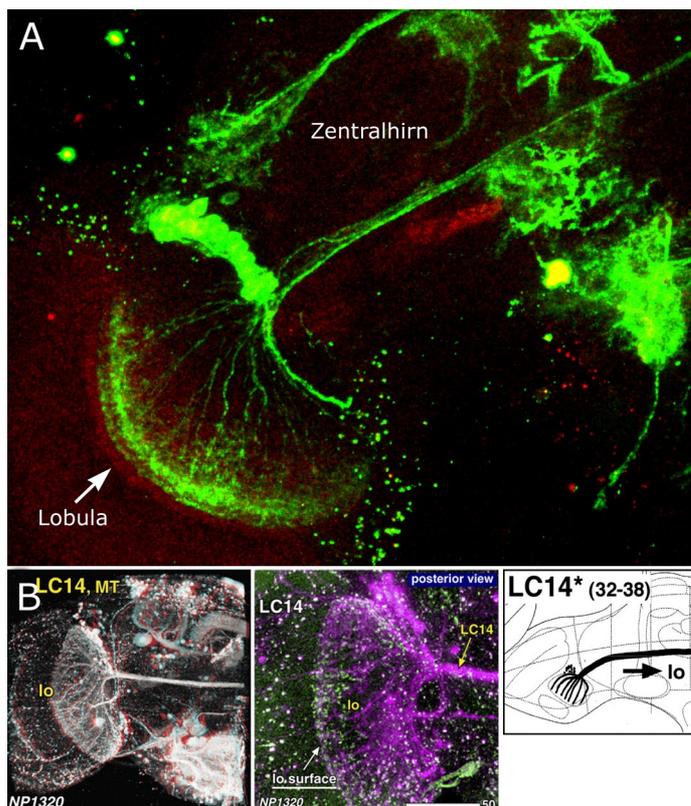


Abbildung 34: A: Projektion einer LC14-Zellgruppe in der Linie NP2044; grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 21-30h (L1), Präparation P70. Die grüne Färbung im Zentralhirn oberhalb und unterhalb des Axonbündels gehört vermutlich zu anderen Zellen. Dies konnte jedoch nicht mit Sicherheit beurteilt werden. Daher wurde bei der Nachbearbeitung die gesamte grüne Färbung im Bild belassen. **B:** Vergleich zu LC14 aus der Analyse von Otsuna und Ito.

Der am häufigsten markierte Zelltyp, LC12, kann v.a. aufgrund der Lokalisierung des Zellkörpers am Rande des Zentralhirns und der Position des optischen Glomerulus, in dem er terminiert, identifiziert werden. Dieser befindet sich ganz lateral im ventrolateralen Protocerebrum, siehe Abbildung 33. LC12 wurde in 14

Gehirnen identifiziert; die Zelle arborisiert in den Lobulaschichten Lo3 und Lo4 (Abbildung 33C). Die Form der Arborisierung ähnelt sehr stark der von Fischbach und Dittrich bestimmten Zelle LCN4. Diese verzweigt jedoch in den Schichten Lo2 und Lo3 und terminiert in einem anderen Glomerulus.

Außerdem wurde in einem Fall eine Gruppe von LC14-Neuronen markiert, die durch ihre charakteristischen Axone auffallen, die durch die große Kommissur verlaufen. In Abbildung 34A ist nur ein optischer Lobus dargestellt, das Faserbündel kann jedoch bis zur kontralateralen Lobula verfolgt werden. Übereinstimmend mit den Aufnahmen von Otsuna und Ito ist auch in diesem Fall die Position der Zellkörper. Bei MARCM-Präparationen der Linie Herpes, die ebenfalls auf NP2044 basiert (siehe Kapitel 4.2), wurde LC14 in zwei weiteren Gehirnen markiert.

LC12-Zellen wurden nach Hitzeschocks im L3-Stadium häufig gefärbt, die LC14-Gruppe nach einem Hitzeschock im L1-Stadium. In der Linie Herpes wurde LC14 nach einem Hitzeschock im Embryonalstadium gefunden.

4.1.5.12 Lobula- und Lobulaplattenintrinsicische Zellen (LI/LPI-Zellen)

Es wurden sowohl in der Lobula als auch in der Lobulaplatte in drei bzw. zwei Fällen Zellen markiert, die keine erkennbare Verbindung zu einem anderen Neuropil haben, also intrinsicische Amakrinzellen darstellen (Abbildung 35). Die LI-Zellen wurden bei Hitzeschocks im L1- und L3a-Stadium markiert, die LPI-Zellen im L1- und L2-Stadium. Bei der Analyse der Linie Herpes, die auf NP2044 basiert (siehe Kapitel 4.2), wurde in mehreren Gehirnen eine weitere LI-Zelle gefärbt, die posterior in der Lobula arborisiert (Abbildung 59A).

4.1.5.13 Tangentialzellen

Tangentialzellen wurden nur in einem einzigen Gehirn markiert, nach einem Hitzeschock zum Zeitpunkt 21-30h (L1). Dies kann sowohl damit zusammenhängen, daß Tangentialzellen generell viel seltener sind als Kolumnarzellen (bis zu einem Verhältnis von 1:750) als auch damit, daß die Hitzeschocks primär in späteren Larvalstadien durchgeführt wurden (Tangentiale Zellen bilden sich vor kolumnaren, siehe auch Kapitel 2.3.2.2). Die Zelle in Abbildung 36A mit ihrer Verzweigung in der Serpentschicht (M7) konnte keiner der von Fischbach und Dittrich bestimmten Neurone zugeordnet werden. Das Neuron in Abbildung 36B hat große Ähnlichkeit mit einer LT7-Zelle.

Bei MARCM-Präparationen der Linie Herpes, die ebenfalls auf NP2044 basiert (siehe Kapitel 4.2), wurden nach einem Hitzeschock im Embryonalstadium beide tangentialen Zelltypen erneut markiert. Darüber hinaus wurden Hinweise auf die Existenz weiterer Tangentialzellen geliefert (Abbildung 59D).

4.1.5.14 Glia

Kolumnar aufgebaute Gliazellen im äußeren optischen Chiasma wurden oft markiert (zehn Gehirne), unabhängig vom Zeitpunkt des Hitzeschocks (Abbildung 37A-B). Sie liefern ein besonders intensives GFP-Signal. Darüber hinaus wurden in drei Gehirnen Gliazellen unterhalb der Lamina (Abbildung 37D) gefärbt.

Abbildung 37C zeigt eine Zelle am Rande des Lobus, die nicht bestimmt werden kann. Es ist möglich, daß es sich um eine Gliazelle handelt, die mit einer weiteren Zelle überlappt.

Bei MARCM-Präparationen der Linie Herpes, die ebenfalls auf NP2044 basiert (Kapitel 4.2), wurde nach einem Hitzeschock im L3b-Stadium auch eine Gruppe kolumnarer Gliazellen im inneren Chiasma markiert (Abbildung 59C).

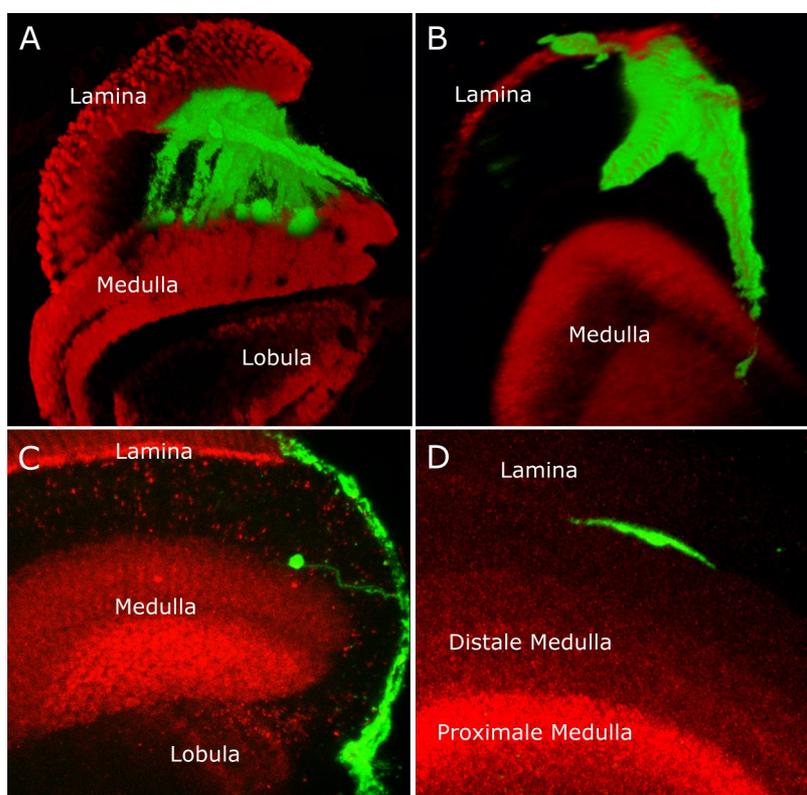


Abbildung 37: Gliazellen in der Linie NP2044.

A: *Voltex*-3D-Rekonstruktion einer Gruppe von Gliazellen im äußeren optischen Chiasma. Grün: mCD8-GFP, rot: NC82. Hitzeschock 30-48h (L1), P65. **B:** *Voltex*-3D-Rekonstruktion einer Gliazelle im äußeren optischen Chiasma. Grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 6-22h (Embryo), Präparation P70. **C:** Projektion einer Zelle am Rande des optischen Lobus.

Grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 28-46h (L1), Präparation P60. Möglicherweise handelt es sich um eine Gliazelle. **D:** Projektion einer Gliazelle am proximalen Rand der Lamina. Grün: mCD8, rot: Rst. Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70.

4.1.6 Zelltypen der Linie NP2273

4.1.6.1 Retinulazellen (R-Zellen)

Auch für die Linie NP2273 ist bekannt, daß bei Präparationen im L3-Stadium durch *gal4^{NP2273}*-getriebenes GFP Photorezeptoren markiert werden (Küffner 2006). Es wurde jedoch in dieser Analyse nur in einem Gehirn eine R1-R6-Zelle und in einem anderen Lobus eine R8-Zelle gefunden; jeweils nach einem Hitzeschock im L3a-Stadium (Abbildung 38).

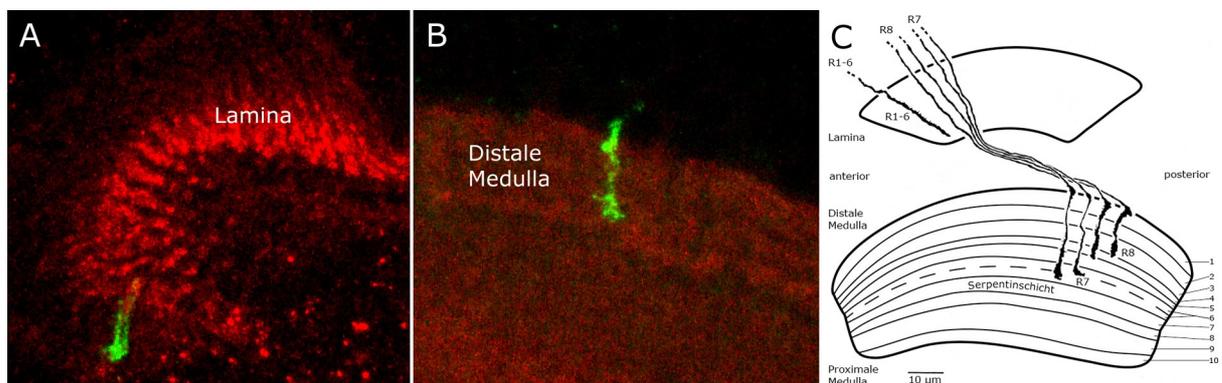


Abbildung 38: **A:** Projektion einer R1-R6-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70. **B:** Projektion einer R8-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 74-96h (L3a), Präparation P60. **C:** Vergleich zu Retinulazellen aus der Golgi-Analyse.

4.1.6.2 Laminamonopolarzellen (L-Zellen)

Laminamonopolarzellen stellen auch für NP2273 die am häufigsten markierte Zellgruppe dar (Abbildung 39).

Die Neurone L1 und L4 wurden sehr oft identifiziert, L3 seltener (drei Gehirne), L5 nie. Es wurde keine L2-Zelle eindeutig bestimmt. Es gibt jedoch einen Grenzfall, bei dem es sich um eine L2-Zelle handeln könnte. In Abbildung 39J sind zwei Termini von L-Zellen dargestellt. Rechts ist klar eine L1-Zelle zu erkennen, links davon ein einzelner Terminus einer weiteren L-Zelle. Dieser entspricht in seiner Form dem Terminus von L3; er befindet sich jedoch in der Schicht M2, in der L2 terminiert. Die Färbung der Arborisierung der Zelle in der Lamina ist qualitativ nicht hochwertig genug, um daran eine Unterscheidung zwischen L2 und L3 treffen zu können.

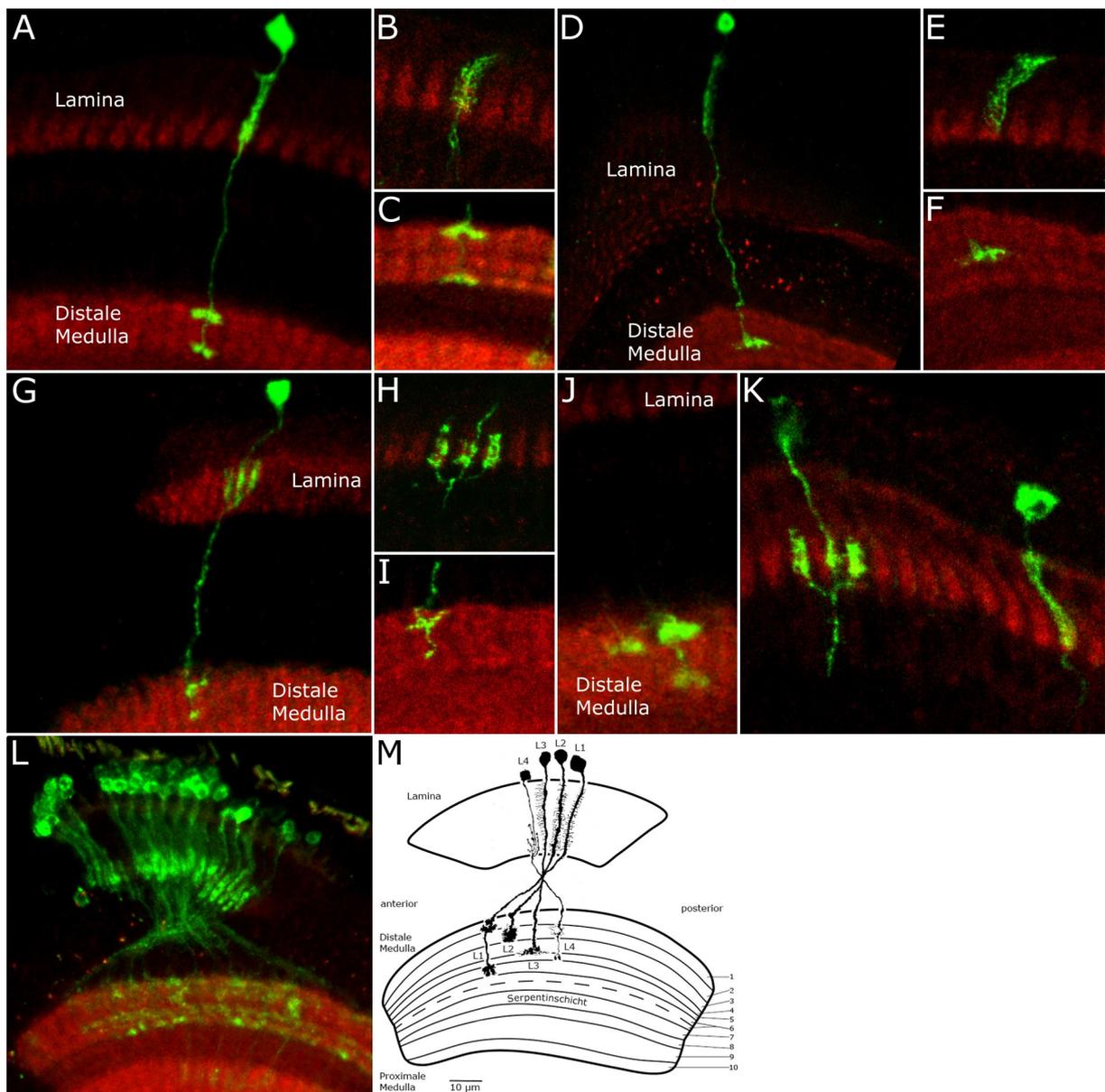


Abbildung 39: Projektionen von L-Zellen in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Für A, C, J, G, K Hitzeschock 99-117h (L3b) und Präparation P60; für B, E, H, I Hitzeschock 74-96h (L3a), P60; für D, F Hitzeschock 52-70h (L2), P70; für L Hitzeschock 21-30h (L1), P70. **A:** L1-Zelle. **B:** Detailaufnahme einer L1-Zelle in der Lamina. **C:** Detailaufnahme einer L1-Zelle in der Medulla. **D:** L3-Zelle. **E:** Detailaufnahme einer L3-Zelle in der Lamina. **F:** Detailaufnahme einer L3-Zelle in der Medulla. **G:** L4-Zelle. **H:** Detailaufnahme einer L4-Zelle in der Lamina. **I:** Detailaufnahme einer L4-Zelle in der Medulla. Ihr unterer Terminus liegt zwischen der dritten und vierten durch Anti-Kirre stark markierten Schicht. **J:** Darstellung des Terminus einer möglichen L2-Zelle in der Medulla (links) neben einer L1-Zelle (rechts). **K:** Kolokalisierung der Arborisierung einer L1-Zelle (rechts) und der Kollateralen einer L4-Zelle (links) mit den Kirre-positiven Säulen der Lamina. **L:** Eine Gruppe von L1- und L4-Zellen mit ihren Axonen im äußeren optischen Chiasma. **M:** Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse.

In Abbildung 39K ist sichtbar, daß die Verzweigungen von L1-Zellen und die Kollateralen von L4-Zellen in der Lamina mit den Kirre-positiven Säulen kolokalisieren. Das hellste Antikörper-Signal beschränkt sich auf die L4-Kollateralen.

Aus der Abbildung 39F geht hervor, daß die dritte Schicht der Kirre-Immunreaktivität in der distalen Medulla mit dem Terminus von L3 kolokalisiert, also der Schicht M3 entspricht. Der untere Terminus von L4 liegt zwischen der dritten und vierten stark Kirre-positiven Schicht (Abbildung 39I).

Abbildung 39L zeigt die Axone einer L-Zellgruppe im äußeren optischen Chiasma.

4.1.6.3 Zellen, die die distale Medulla mit der Lamina verbinden

Nur ein einziges Mal wurde eine T1-Zelle markiert, der Hitzeschock wurde im L3a-Stadium gegeben (Abbildung 40).

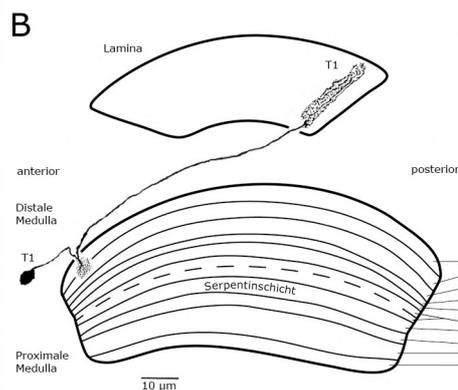
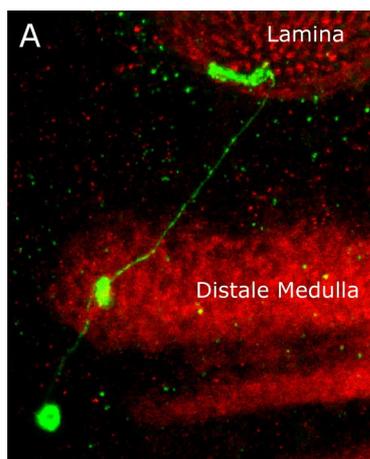


Abbildung 40:

A: Projektion einer T1-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70.
B: Vergleich zu einer T1-Zelle aus der Golgi-Analyse.

4.1.6.4 Zellen, die die distale und die proximale Medulla miteinander verbinden (MI-Zellen)

Es wurde in vier Gehirnen der leicht identifizierbare Zelltyp MI1 nach Hitzeschocks im Embryonal- oder L3-Stadium markiert (Abbildung 41).

Abbildung 42 zeigt eine Zelle, die nicht bestimmt werden konnte. Sie scheint ausschließlich in dem von Kirre nur schwach markierten zentralen Bereich der Medulla zu arborisieren (M6-M8); der Zellkörper liegt anterior der Medulla. Es ist keine Verbindung zum Zentralhirn erkennbar, weshalb es keine Medulla-Tangentialzelle sein kann. Theoretisch ist möglich, daß die Verbindung zum Zentralhirn nicht gefärbt wurde oder zum Zeitpunkt der Präparation (P70) noch nicht ausgebildet war; beides ist jedoch unwahrscheinlich. Darum scheint es sich

um ein medullaintrinsisches Neuron zu handeln, auch wenn keine der bekannten Zellen ihm ähnelt.

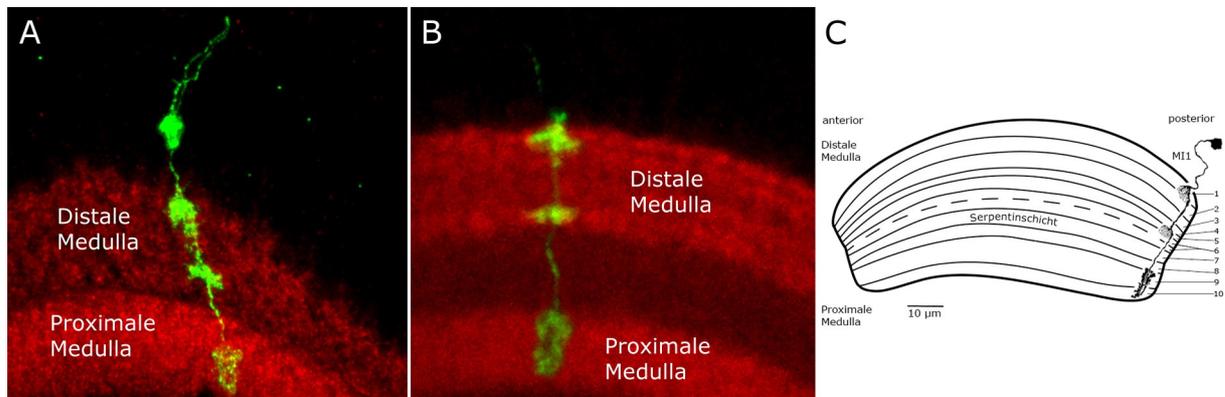


Abbildung 41: Projektionen von MI1-Zellen in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. **A:** MI1-Zelle, Hitzeschock 6-22h (embryonal), Präparation P70.

B: Arborisierung einer MI1-Zelle in der Medulla, Hitzeschock 99-117h (L3b), P60.

C: Vergleich zu einer MI1-Zelle aus der Golgi-Analyse.

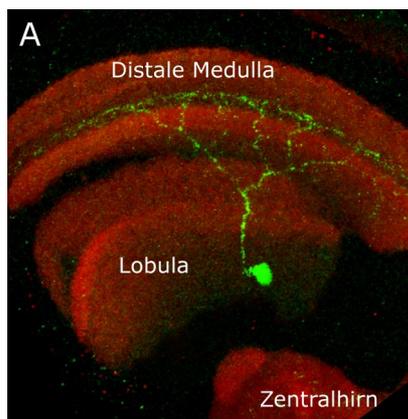


Abbildung 42: Projektion einer unbekannten MI-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 52-70h (L2), Präparation P70.

4.1.6.5 Zellen, die die distale Medulla mit der Lobula verbinden (TM-Zellen)

Auch bei den Transmedullazellen ist die Situation ähnlich wie bei NP2044 (Abbildung 43). Sie werden sehr häufig markiert und oft in Gruppen gefärbt, was die Identifizierung der Zellen in vielen Fällen schwierig macht. Es ist daher davon auszugehen, daß sich in dieser Gruppe weitere Neurone mit *gal4^{NP2273}*-Expression befinden, die in dieser Arbeit noch nicht bestimmt wurden.

Die Zelle TM1 wurde bei Hitzeschocks im Embryonal-, L1-, L2-, oder L3-Stadium gefunden. Dies ist der am häufigsten identifizierte TM-Zelltyp (16 Gehirne).

Ebenfalls oft markiert wurden TM2 (9 Gehirne) und TM3 (7 Gehirne), nach Hitzeschocks im L2- oder L3-Stadium. In vier Gehirnen wurde TM4 identifiziert, wobei die Hitzeschocks im L1- oder L3-Stadium gegeben wurden.

In den Abbildungen 43C und 43F läßt sich erkennen, daß sowohl TM1 als auch TM2 in der durch Kirre am stärksten gefärbten Schicht der Lobula terminieren, diese also die Lobulaschichten Lo1 und Lo2 markiert.

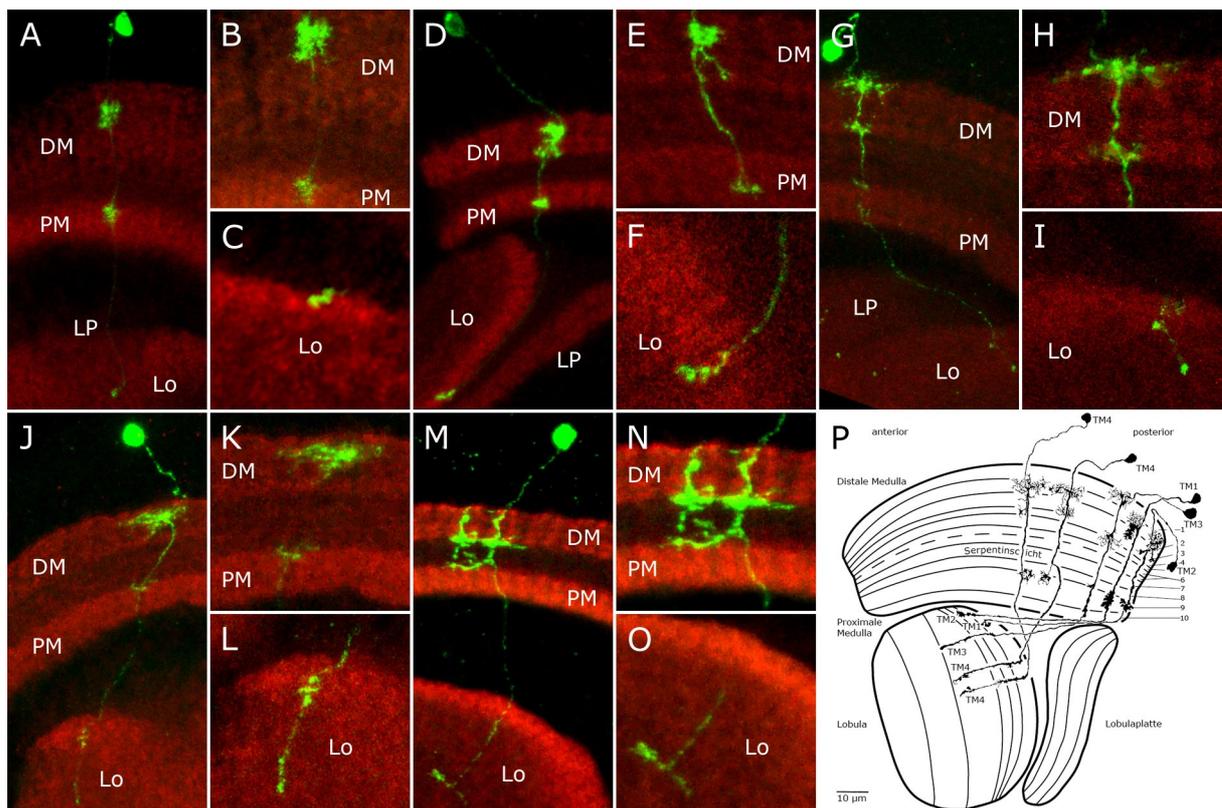


Abbildung 43: Projektionen von Transmedullazellen in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Für A, B, M, N, O Hitzeschock 99-117h (L3b) und Präparation P60; für C Hitzeschock 52-70h (L2) und Präparation P70; für D Hitzeschock 104-121h (L3b) und Präparation P70; für E, F, G, H, I, J, K, L Hitzeschock 78-96h (L3a) und Präparation P70. DM = Distale Medulla, PM = Proximale Medulla, Lo = Lobula, LP = Lobulaplatte. **A:** TM1-Zelle. Die Lobula liegt in dieser Ansicht am unteren Bildrand über der Lobulaplatte. **B:** Detailaufnahme einer TM-Zelle in der Medulla. **C:** Detailaufnahme einer TM1-Zelle in der Lobula. **D:** TM2-Zelle. **E:** Detailaufnahme einer TM2-Zelle in der Medulla. **F:** Detailaufnahme einer TM2-Zelle in der Lobula. **G:** TM3-Zelle. **H:** Detailaufnahme einer TM3-Zelle in der Medulla. **I:** Detailaufnahme einer TM3-Zelle in der Lobula. **J:** TM4-Zelle. **K:** Detailaufnahme einer TM4-Zelle in der Medulla. **L:** Detailaufnahme einer TM4-Zelle in der Lobula. **M:** Unbekannte TM-Zelle. **N:** Detailaufnahme der unbekanntenen TM-Zelle in der Medulla. **O:** Detailaufnahme der unbekanntenen TM-Zelle in der Lobula. **P:** Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse.

Die Abbildungen 43M-O zeigen eine TM-Zelle, die mit keiner der von Fischbach und Dittrich beschriebenen übereinstimmt. Es bestehen Ähnlichkeiten zu TM8, die hier dargestellte Zelle arborisiert in der Medulla jedoch viel distaler. Die Zelle verzweigt sich in der M1-Schicht, arborisiert dann in beiden Ästen in der M5-Schicht und vereinigt sich wieder in der M8-Schicht. Der Terminus liegt relativ tief in der Lobula, vermutlich in der Schicht Lo4, die Gegenfärbung erlaubt hier keine exakte Bestimmung.

4.1.6.6 Zellen, die die proximale Medulla mit der Lobulaplatte verbinden (T4-Zellen)

Nur in einem Gehirn wurde eine T4-Zelle identifiziert (nach einem Hitzeschock im L3a-Stadium). In Abbildung 44A überlappen die Färbungen von Lobula und Lobulaplatte, die Lobula hebt sich jedoch durch seine leicht stärker gefärbte posteriore Schicht von der Lobulaplatte ab. Der Terminus der Zelle liegt also in der Lobulaplatte.

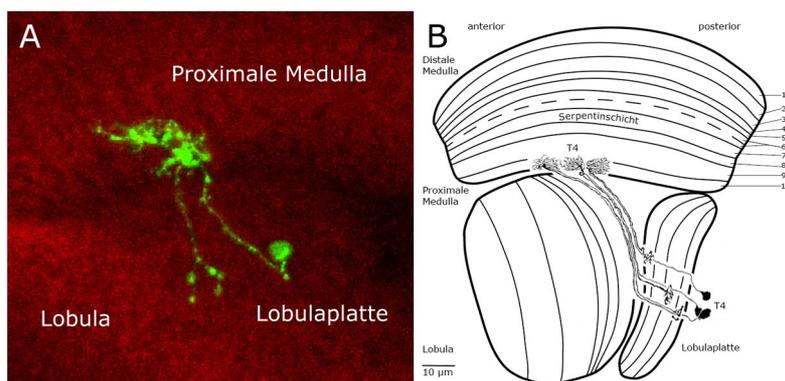


Abbildung 44: **A:** Projektion einer T4-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70. **B:** Vergleich zu T4-Zellen aus der Golgi-Analyse.

4.1.6.7 Zellen, die die proximale Medulla mit Lobula und Lobulaplatte verbinden (Y-Zellen)

Ebenfalls nur einziges Mal wurde in der Linie NP2273 eine Zelle markiert, die einem Y-Neuron gleicht (nach einem Hitzeschock im L3a-Stadium). Da die Färbung nur schwach ist, kann die Zelle nicht sicher identifiziert werden. Sie ähnelt unter den bekannten Zellen am meisten Y1. Die Verzweigung in der Lobulaplatte ist jedoch deutlich weniger ausgeprägt und in der Lobula sind zwei Termini erkennbar. Vermutlich handelt es sich bei einem von beiden um das Signal einer anderen Zelle, die ebenfalls nicht vollständig erkennbar ist. Welcher der beiden Termini zu der in Abbildung 45A dargestellten Zelle gehört, läßt sich

nicht entscheiden.

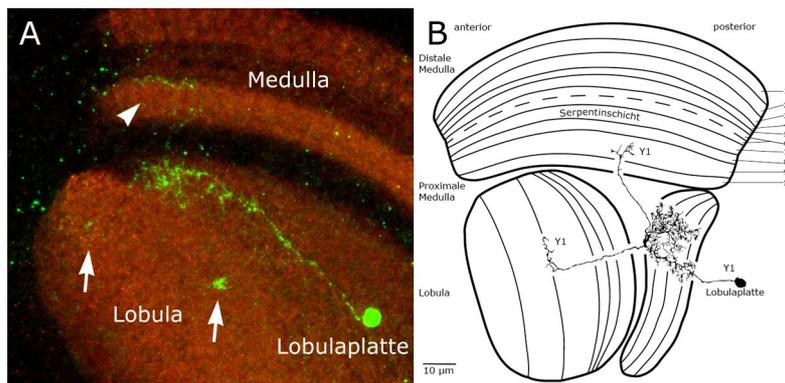


Abbildung 45: A: Projektion einer Y-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70. In der Lobula sind zwei Termini zu erkennen (Pfeile), es läßt sich jedoch nicht entscheiden, welche zu der abgebildeten Zelle gehört. Die Arborisierung in der Medulla ist mit einer Pfeilspitze markiert.

B: Vergleich zu einer Y1-Zelle aus der Golgi-Analyse.

4.1.6.8 Zellen, die die Lobulaplatte mit der Lobula verbinden

Im Gegensatz zur Linie NP2044 konnten in NP2273 keine eindeutigen TLP-Zellen gefunden werden. Nach einem Hitzeschock im L1-Stadium wurde jedoch in einem Fall ein TLP-Neuron markiert, vermutlich TLP3. Dies ist jedoch nicht sicher zu entscheiden, da das GFP-Signal sehr schwach ist (Abbildung 46C-D).

Außerdem wurde nach einem Hitzeschock im L2-Stadium in einem Gehirn eine LCCN1-Gruppe markiert (Abbildung 46A-B). Diese kolumnaren Neurone verbinden Lobulaplatte und Lobula mit dem Zentralhirn. Die Zellkörper sind in Abbildung 46A am Rande des Zentralhirns zu erkennen, die Termini in einem optischen Glomerulus anterior des optischen Glomerulus von LC12-Zellen. Es könnte sich hierbei um den selben Glomerulus handeln, der in Abbildung 59E-F durch Anti-Rst markiert wurde.

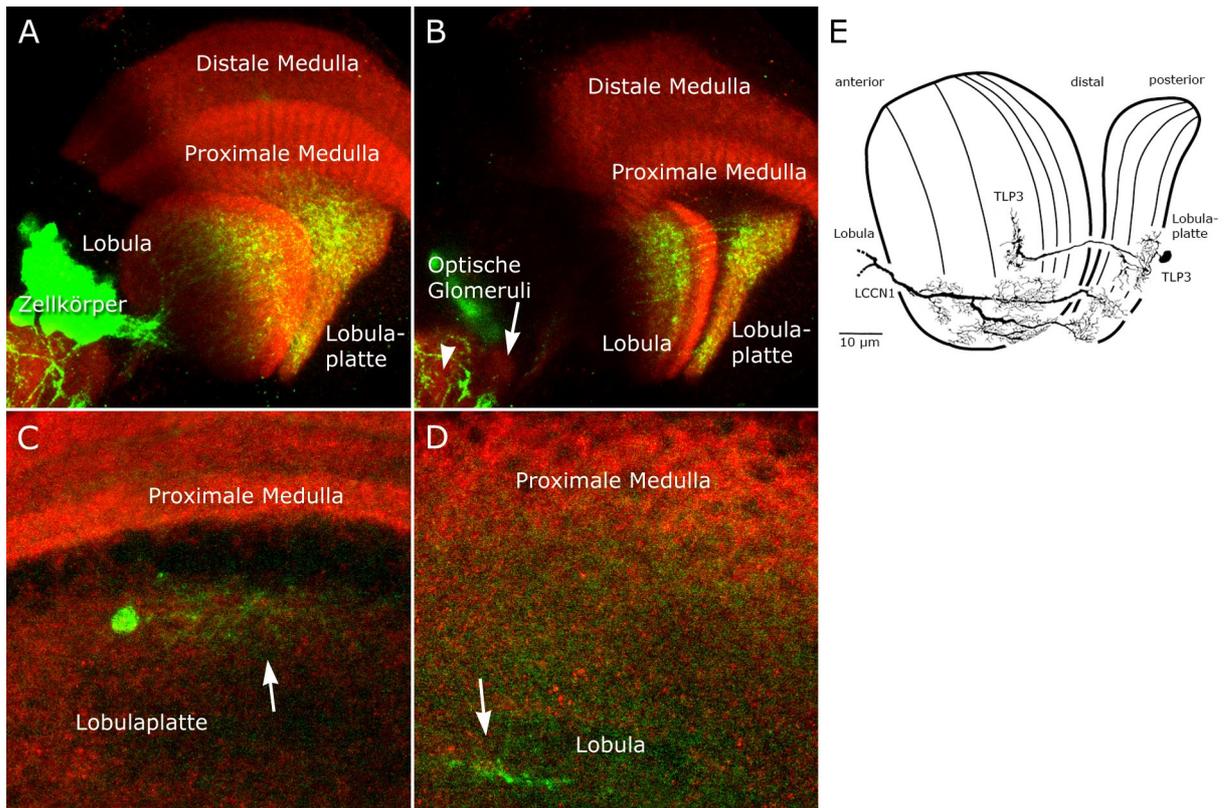


Abbildung 46: A-B: Projektionen einer LCCN1-Gruppe in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 52-70h (L2), Präparation P70. In B sind weniger Z-Ebenen für die Projektion verwendet worden als in A. Am Rande des Zentralhirns sind die Zellkörper und der optische Glomerulus mit den Termini der Zellen erkennbar (Pfeilspitze). Der Pfeil markiert den optischen Glomerulus von LC12-Zellen.

C-D: Projektionen einer TLP-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8-GFP, rot: Kirre. Hitzeschock 24-48h (L1), P70. Das GFP-Signal wurde hier nicht durch den Antikörper gegen mCD8 verstärkt. Aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses konnten die verschiedenen Teile der Zelle nicht zu einer Projektion zusammengefügt werden. C zeigt den Zellkörper und die Verzweigung in der Lobulaplatte (Pfeil) und D den Terminus in der Lobula (Pfeil). **E:** Vergleich zu diesen Zelltypen aus der Golgi-Analyse.

4.1.6.9 Zellen, die die Lobula mit dem Zentralhirn verbinden (LC-Zellen)

In zwei Fällen wurden nach einem Hitzeschock im L3a-Stadium LC-Zellen markiert (Abbildung 47). Aufgrund der Position ihrer Zellkörper und des charakteristischen Bogens ihres Zellkörperfadens kann davon ausgegangen werden, daß es sich wie bei NP2044 um LC12-Zellen handelt. Diese Identifizierung ist jedoch schwierig, da in beiden Gehirnen die Gegenfärbung des optischen Glomerulus fehlt.

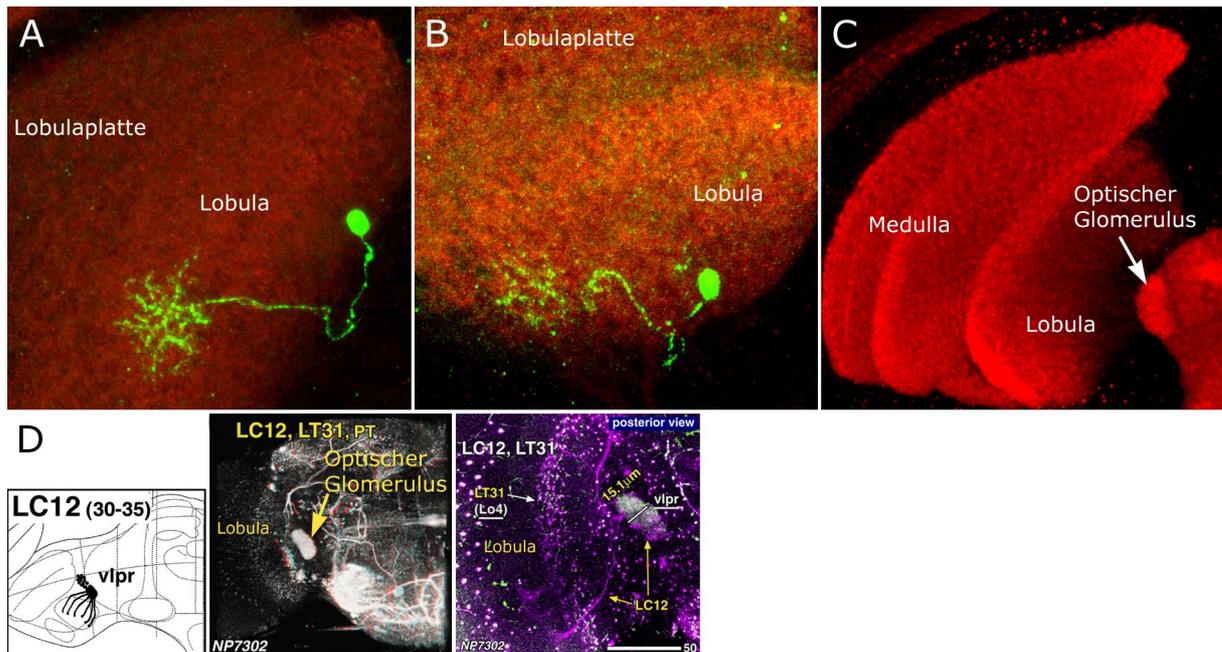


Abbildung 47: **A-B:** Projektionen von LC12-Zellen in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 78-96h (L3a), P70. **C:** Projektion eines optischen Lobus, der die Markierung des optischen Glomerulus der LC12-Zellen durch Kirre-Immunreaktivität zeigt, P70. **D:** Vergleich zu LC12-Zellen aus der Analyse von Otsuna und Ito.

Nur in drei Aufnahmen konnte der Glomerulus von LC12-Zellen in einer Kirre-Färbung gefunden werden. Diese Gehirne (Abbildung 47C) wurden ebenso wie diejenigen mit markierten LC-Zellen (Abbildung 47A-B) zum Zeitpunkt P70 präpariert. Wie in Kapitel 3.7.6 dargelegt, besteht eine Unsicherheit von mehreren Stunden bei der Angabe des Präparationszeitpunkts. Es besteht die Möglichkeit, daß die Kirre-Immunreaktivität in diesem optischen Glomerulus zeitlich sehr eng reguliert ist.

4.1.6.10 Lobula- und Lobulaplatteintrinsische Zellen (LI/LPI-Zellen)

Es wurde in einem Gehirn eine Gruppe von LI-Zellen markiert (Hitzeschock im L3b-Stadium), in einem anderen Fall wurde ein LPI-Neuron gefärbt (Hitzeschock im L3a-Stadium) (Abbildung 48). Der Zellkörper der LPI-Zelle liegt sehr weit anterior, auf der Höhe des Beginns der Lobula (Abbildung 48A).

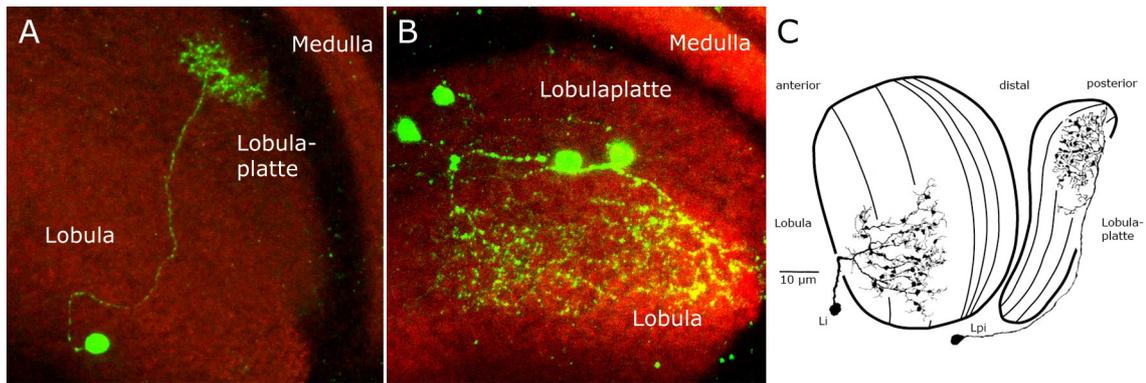


Abbildung 48: **A:** Projektion einer LPI-Zelle in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 78-96h (L3a), Präparation P70. **B:** Projektion einer Gruppe von LI-Zellen in der Linie NP2273; grün: mCD8, rot: Kirre. Hitzeschock 99-117h (L3b), Präparation P60. **C:** Vergleich zu den entsprechenden Zellen aus der Golgi-Analyse.

4.1.6.11 Tangentialzellen

In einer Präparation ohne Antikörper gegen mCD8 wurden nach einem Hitzeschock im L1-Stadium zwei identische Tangentialzellen in der proximalen Medulla markiert (Abbildung 49). Es sind jedoch nur die Zellkörper proximal der Medulla, der Ansatz einer Verzweigung in der proximalen Medulla und der Beginn der Axone, die Richtung Zentralhirn laufen, zu erkennen.

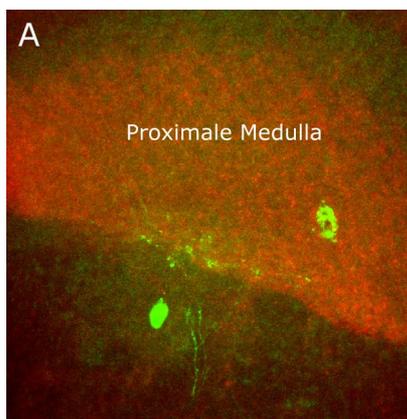


Abbildung 49: Projektion einer Tangentialzelle in der Linie NP2273; grün: mCD8-GFP, rot: Kirre. Hitzeschock 24-48h (L1), Präparation P70.

4.1.6.12 Glia

Eine Gliazelle im äußeren optischen Chiasma wurde nach einem Hitzeschock im L3b-Stadium in einem Gehirn gefärbt (Abbildung 50A). Glia direkt oberhalb der distalen Medulla und oberhalb der Lamina wurden jeweils einmal markiert, nach Hitzeschocks im L3b-Stadium (Abbildung 50B-C).

In der *Voltex*-3D-Rekonstruktion des schräg angeschnittenen Lobus in Abbildung 50B kann man in der linken Bildhälfte die kolumnare Organisation der Medulla und auf der rechten Seite die entsprechende Schichtung erkennen.

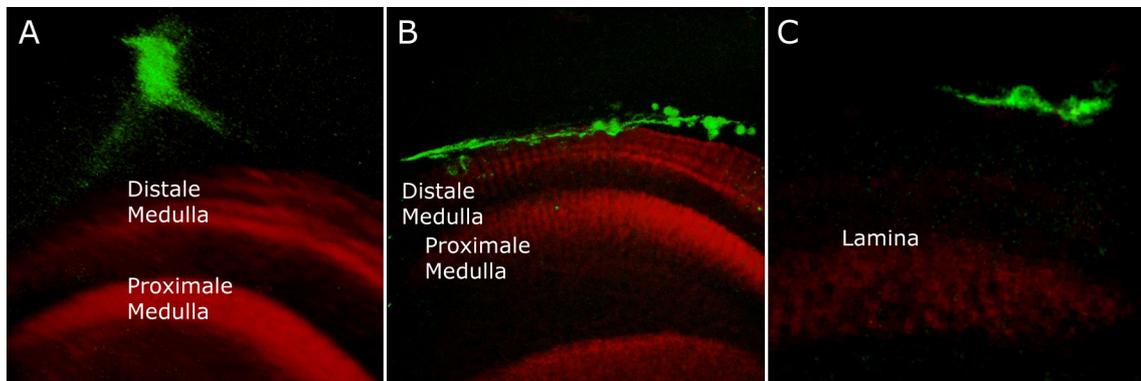


Abbildung 50: **A:** *Voltex*-3D-Rekonstruktion einer Gliazelle im äußeren optischen Chiasma in der Linie NP2273; grün: mCD8-GFP, rot: Kirre. Hitzeschock 119-117h (L3b), Präparation P60. **B:** *Voltex*-3D-Rekonstruktion von Gliazellen distal der Medulla in der Linie NP2273; grün: mCD8-GFP, rot: Kirre. Hitzeschock 119-117h (L3b), P60. **C:** Projektionsansicht einer Gliazelle distal der Lamina in der Linie NP2273; grün: mCD8-GFP, rot: Kirre. Hitzeschock 114-120h (L3b), Präparation P70.

4.1.7 Zusammenfassung und Vergleich der beiden Linien

Die mit dieser Methode am häufigsten auftretenden Zelltypen der Linien NP2044 und NP2273 wurden identifiziert. Da es sich bei MARCM um eine stochastische Methode handelt, kann kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden (siehe auch Diskussion Abschnitt 5.1).

Alle in NP2044 sicher bestimmten Zelltypen sind in Abbildung 51A-C dargestellt. Die am häufigsten identifizierten Zelltypen sind L1, L4, TM1, PM1, T4 und LC12. Die ersten fünf traten bei Hitzeschocks während der gesamten präpupalen Entwicklung auf, LC12 im L3-Stadium. Diese Neurone wurden jeweils in mehr als zehn Gehirnen eindeutig bestimmt. Darüber hinaus waren sie auch bei MARCM-Präparationen mit dem Stamm Herpes die häufigsten Zelltypen. Herpes basiert auf NP2044 (siehe Kapitel 4.2). In Abbildung 51G sind die Schichten dargestellt, in denen diese Zellen verzweigen.

Nach Hitzeschocks im L2- und L3-Stadium treten die o.g. Zellen durchgehend auf, bei Hitzeschocks im Embryonal- und L1-Stadium werden dagegen eher Tangentialzellen markiert.

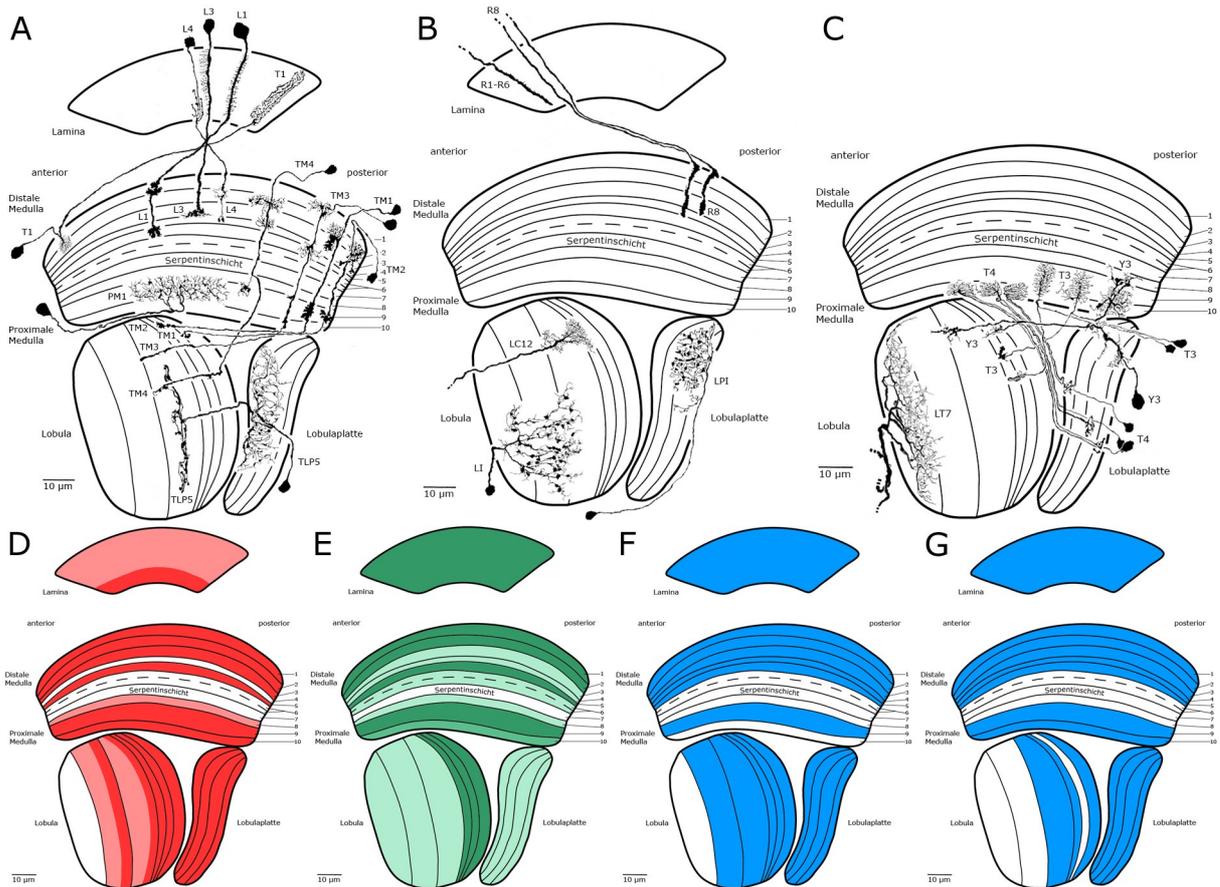


Abbildung 51: **A-C:** Übersicht aller in der Linie NP2044 sicher identifizierten Zelltypen. Es fehlen LC14 (es existiert keine Golgi-Zeichnung dieses Neurons) und die Gliazellen. **D:** Schematische Darstellung der Rst-Immunreaktivität. **E:** Schematische Darstellung der *gal4*-Expression in der Linie NP2044. **F:** Darstellung der Schichten, die vermutlich die Termini der in NP2044 gefundenen Neurontypen enthalten. **G:** Darstellung der Schichten, in denen die am häufigsten identifizierten Zellen arborisieren (L1, L4, TM1, PM1, T4 und LC12). Der Schwellenwert lag bei zehn Gehirnen pro Zelltyp.

Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Hitzeschocks und der Anzahl pro Gehirn markierter Zellen festgestellt (siehe auch Diskussion Abschnitt 5.2).

Anhand der Darstellungen 51D-G können die Immunreaktivität von Rst (51D), das *gal4^{NP2044}*-Expressionsmuster (51E) und die hier identifizierten Neurone verglichen werden. Eine vollständige Deckung der beiden Muster mit den putativen Termini aller sicher bestimmten Zellen (Abbildung 51F) oder den Arborisierungen der häufigsten Neurone (Abbildung 51G) gibt es nicht. Die Ähnlichkeit ist jedoch in beiden Fällen hoch. Ein auffälliger Unterschied ist die Schicht M3, in der eine Arborisierung der sehr häufig markierten Zelle TM1 liegt,

die jedoch von *gal4^{NP2044}*-getriebenem GFP nur schwach gefärbt wird. Hierauf wird im Abschnitt 5.3 der Diskussion eingegangen. Das Fehlen der Rst-Färbung in der Schicht M4 wird im Abschnitt 5.8 diskutiert.

Die in NP2273 sicher bestimmten Zelltypen sind in Abbildung 52A-C dargestellt. Die am häufigsten identifizierten Zelltypen sind L1, L4 und TM1. Sie werden während der gesamten präpupalen Entwicklung durch Hitzeschocks markiert. In Abbildung 52G sind die Schichten dargestellt, in denen diese Zellen verzweigen. Im Vergleich zu NP2044 gab es in NP2273 deutlich mehr Gehirne ohne markierte Zellen, daher ist auch die Gesamtausbeute an Zellen niedriger.

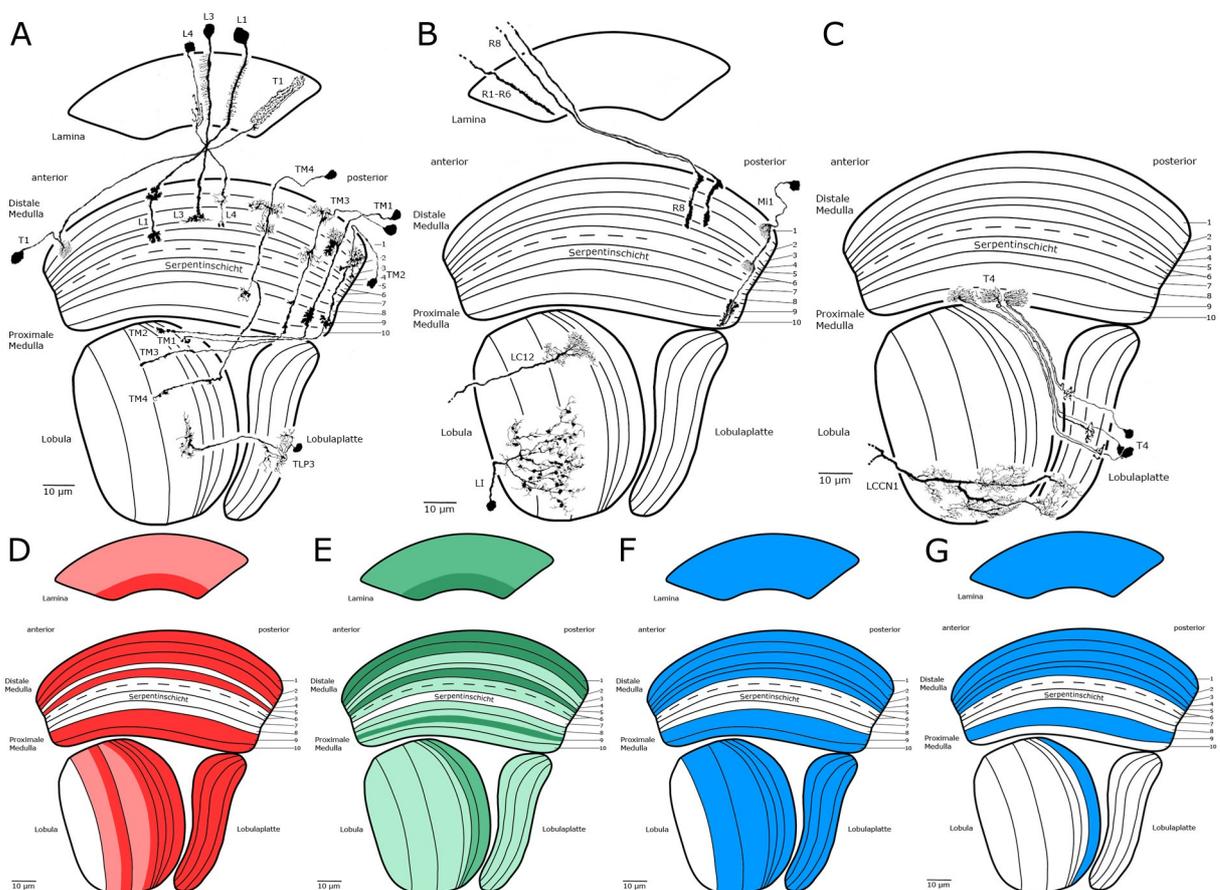


Abbildung 52: **A-C:** Übersicht aller in der Linie NP2273 sicher identifizierten Neuronentypen. Es fehlen die Gliazellen. **D:** Schematische Darstellung der Kirre-Immunreaktivität. **E:** Schematische Darstellung der *gal4*-Expression in der Linie NP2273. **F:** Darstellung der Schichten, die vermutlich die Termini der in NP2273 gefundenen Neuronentypen enthalten. **G:** Darstellung der Schichten, in denen die am häufigsten identifizierten Zellen arborisieren (L1, L4 und TM1); der Schwellenwert lag bei zehn Gehirnen pro Zelltyp.

In den Abbildungen 52D-G werden die Kirre-Immunfärbung (52D), das Expressionsmuster von *gal4*^{NP2273} (52E) und die hier identifizierten Neurone miteinander verglichen. In Abbildung 52F sind die putativen Termini aller sicher bestimmten Zellen dargestellt, in 52G die Verzweigungen der häufigsten Neurone. Die Darstellung aller mutmaßlichen Termini deckt sich verhältnismäßig gut mit der Kirre-Immunreaktivität. Wie im Fall von Anti-Rst in NP2044 gibt es einen deutlichen Unterschied in der Schicht M4, in der L4-Zellen präsynaptische Termini haben könnten. Die Übereinstimmung zwischen den Schichten mit der stärksten *gal4*^{NP2273}-Expression und den Arborisierungen der häufigsten Zelltypen ist bis auf die Schichten M3 und M4 ebenfalls gut.

Der Vergleich der in den beiden Stämmen identifizierten Zelltypen zeigt große Ähnlichkeiten. In Bezug auf Laminamonopolarzellen und Transmedullazellen gleichen sich die gefundenen Neurone in beiden Linien sehr stark.

Die auffälligsten Unterschiede sind die in der Linie NP2273 fehlenden PM-Neurone sowie die deutlich seltener markierten LC- und T3/T4-Zellen. Außer MI1 und LCCN1 gab es keine Zellen, die sicher in NP2273 gefunden wurden und in NP2044 fehlen.

4.2 Analyse der Linie Herpes

4.2.1 Kreuzung der Linie

Die Linie *Herpes* ist das Produkt aus einer Kreuzung der Stämme 2044FRT (NP2044, FRT19A; X-Chromosom) und Hbs-ECD (*UAS-hbs-ECD*; 2. Chromosom). Sie ist homozygot für den Gal4-Aktivator NP2044 vor *rst*, eine FRT-Sequenz für die FLP-Rekombination und ein *UAS-hbs-ECD*-Konstrukt. Dieses Konstrukt kodiert für die extrazelluläre Domäne von Hibris inklusive der Transmembrandomäne. Das Kreuzungsschema ist in Abbildung 53 dargestellt.

In diesem Stamm wird also die extrazelluläre Domäne von Hibris in allen *gal4*^{NP2044}-exprimierenden Zellen produziert. Der aus der Kreuzung hervorgegangene Stamm wurde dementsprechend *Herpes* getauft, was für „*Hibris Extracellular domain in Roughest Positive cells misExpression Strain*“ steht.

Rst und Hbs sind während der Augenentwicklung in der Membran benachbarter Zellen lokalisiert und interagieren *in trans* (Bao und Cagan 2005). Auch in den optischen Loben ist eine Interaktion zwischen den extrazellulären Domänen der beiden Proteine wahrscheinlich, mit Hilfe des neuen Stammes soll dies genauer untersucht werden.

Mit *Herpes* kann durch MARCM die *hbs-ECD* in einzelnen Zellklonen innerhalb einer wildtypischen Umgebung fehlexprimiert werden.

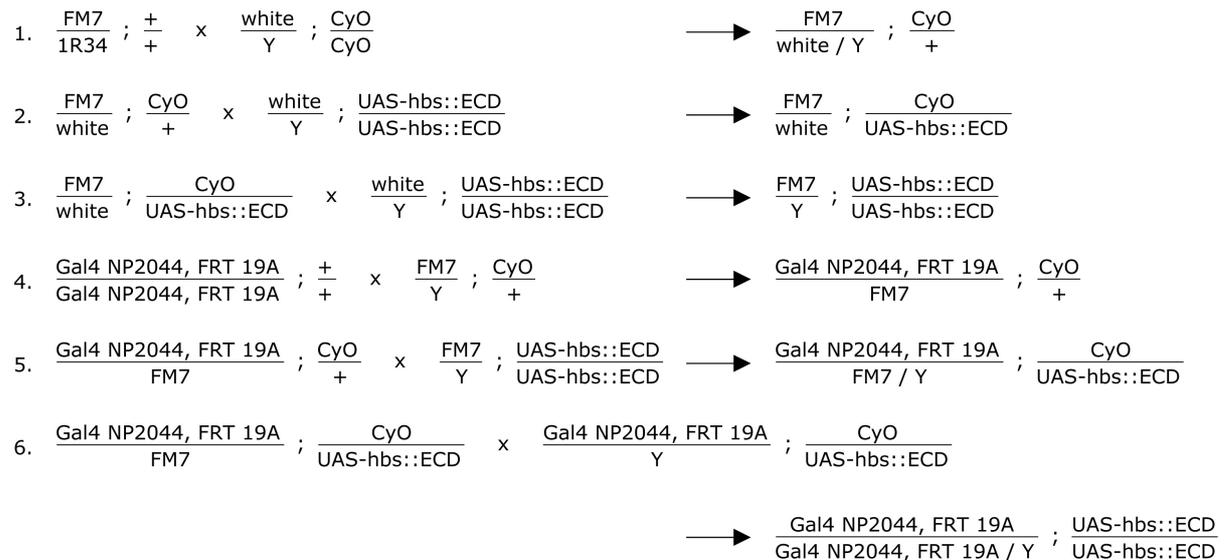


Abbildung 53: Kreuzungsschema zur Etablierung des homozygoten Stammes *Herpes*.

1R34 in Schritt 1 dient lediglich als rezessiv letales Allel. Die eingesetzten Stämme sind: 102 und 306 in Schritt 1, 649 in Schritt 2 und 3 sowie 384 in Schritt 4 (Stammnummern aus der Stammsammlung Labor Fischbach, vergleiche mit 3.1.9).

4.2.1.1 Überprüfung der Homozygotie der Insertionen

Herpes-Fliegen haben raue Augen (siehe Abschnitt 4.2.2.1). Der Phänotyp variiert jedoch stark, weshalb nicht ausgeschlossen werden konnte, daß der Stamm für eine der beiden Insertionen nur heterozygot ist.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Einzelkreuzung aus einer Herpes-Jungfrau und einem Herpes-Männchen angesetzt, beide hatten stark raue Augen.

Unter den Nachkommen dieser Kreuzung wurde in einer Stichprobe von über 50 Männchen kein wildtypisches Auge gefunden, das X-Chromosom ist also homozygot.

Zur Überprüfung des zweiten Chromosoms wurden fünf Wildtyp-Jungfrauen mit

fünf Herpes-Männchen gekreuzt (Abbildung 54). Der Erwartung entsprechend hatten alle überprüften männlichen Nachkommen wildtypische Augen. Da auch alle 85 weiblichen Nachkommen rauhe Augen hatten, muß auch die Insertion auf dem zweiten Chromosom homozygot vorliegen.

Der für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendete Herpes-Stamm besteht nur aus Nachkommen der verifizierten Einzelkreuzung.

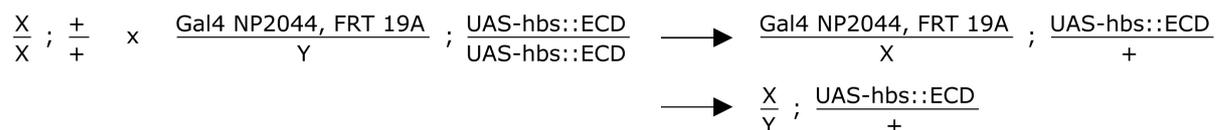


Abbildung 54: Kreuzung zur Kontrolle der Homozygotie des zweiten Chromosoms der Herpes-Fliegen. Wenn die für die Kreuzung verwendeten Männchen den hier angegebenen Genotyp haben, haben in der F1-Generation alle Weibchen rauhe Augen und alle Männchen erscheinen wildtypisch.

4.2.2 Charakterisierung der Linie

4.2.2.1 Phänotyp der Augen

Bereits unter dem Binokular ist sichtbar, daß die Herpes-Fliegen (männliche und weibliche) rauhe Augen und Defekte in der Anordnung der sensorischen Borsten haben. Die Rauheit der Augen variiert von schwach bis stark rauh, es ist jedoch immer ein deutlicher Unterschied zu wildtypischen Augen zu erkennen.

Ein rauher Phänotyp der Augen tritt bei der Fehlexpression und Mutation von IRM-Genen häufig auf. Er entsteht durch Fehler bei der Zellsortierung während der Entwicklung der Ommatidien (siehe Kapitel 2.4.2.1; Reiter *et al.* 1996; Bao und Cagan 2005).

Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop bestätigen die Defekte in der Augenentwicklung (Abbildung 55). Zusätzlich zur Unregelmäßigkeit in der Anordnung der Ommatidien sind überzählige oder fehlende Borsten sowie in Einzelfällen fusionierte Einzelaugen zu erkennen.

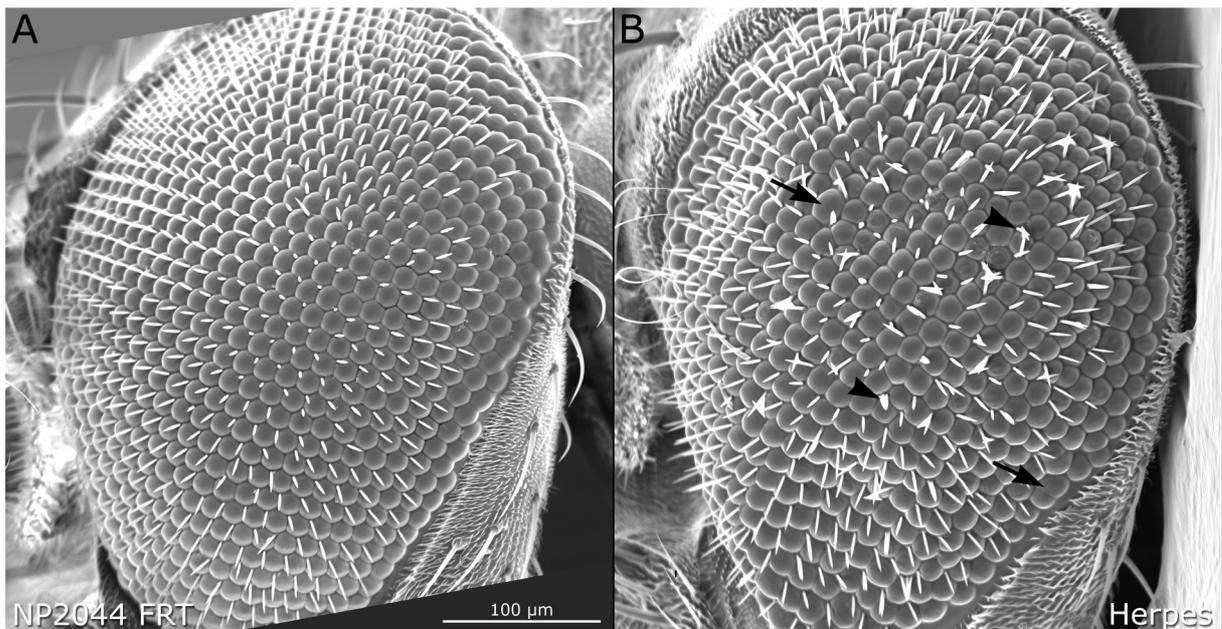


Abbildung 55: Augen-Phänotyp der Linie Herpes. **A:** Nahezu wildtypisches Auge des Stammes 2044FRT. Dieser wurde zur Kreuzung der Linie Herpes verwendet. **B:** Im Vergleich zu 2044FRT erscheint das Herpes-Auge in B deutlich rauh. Die Ommatidien sind unregelmäßig angeordnet und in vielen Fällen sind überzählige oder fehlende Borsten zu erkennen. Vereinzelt treten fusionierte Ommatidien auf. Die Pfeilspitzen zeigen zwei Beispiele für überzählige Borsten, die Pfeile verschmolzene Ommatidien.

4.2.2.2 Mutante Phänotypen in adulten Gehirnen

In Immunfärbungen von Puppengehirnen war kein eindeutig mutanter Phänotyp zu erkennen (Daten nicht gezeigt), darum wurden Kragenschnitte adulter Gehirne angefertigt.

Durchgängig fallen in den adulten optischen Loben leichte Störungen auf. In der proximalen Medulla gibt es eine Schicht mit regelmäßig auftretenden Löchern (Abbildung 56). Diese könnten durch die Degeneration von Zellen entstanden sein. Die Grenze zwischen Lobulaplatte und innerem optischen Chiasma wirkt oft etwas verschwommen (Abbildung 56A).

In Einzelfällen wurden deutliche Fehler wie ektopische Bündel (Abbildung 56A, Abbildung 57) und in einem Gehirn eine völlig falsch platzierte Lamina gefunden (Abbildung 58A). Gelegentlich wirkt das innere optische Chiasma ausgefranst (Abbildung 58B-C), wie es auch bei *hbs-FL*-Fehlexpression verstärkt auftritt (*hbs-FL* kodiert für das komplette Protein; siehe Abbildung 7E-F).

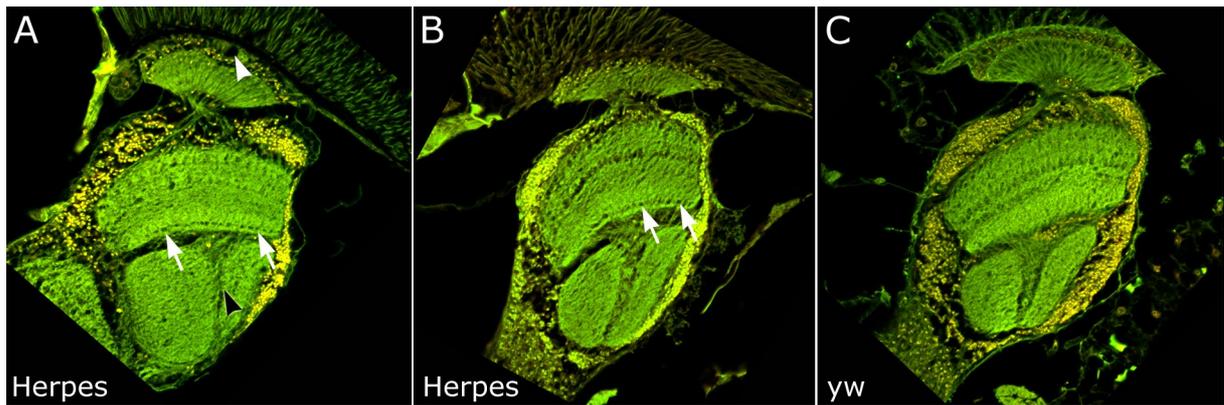


Abbildung 56: Horizontale Kragenschnitte von Herpes-Fliegen (A-B) und einer yw-Kontrolle (C). Weiße Pfeile in A und B kennzeichnen eine Schicht mit regelmäßig auftretenden Löchern in der proximalen Medulla. Die weiße Pfeilspitze in A zeigt auf ein ektopisches Faserbündel im Laminakortex. Die schwarze Pfeilspitze in A zeigt auf die etwas verschwommen wirkende Grenze zwischen Lobulaplatte und innerem Chiasma.

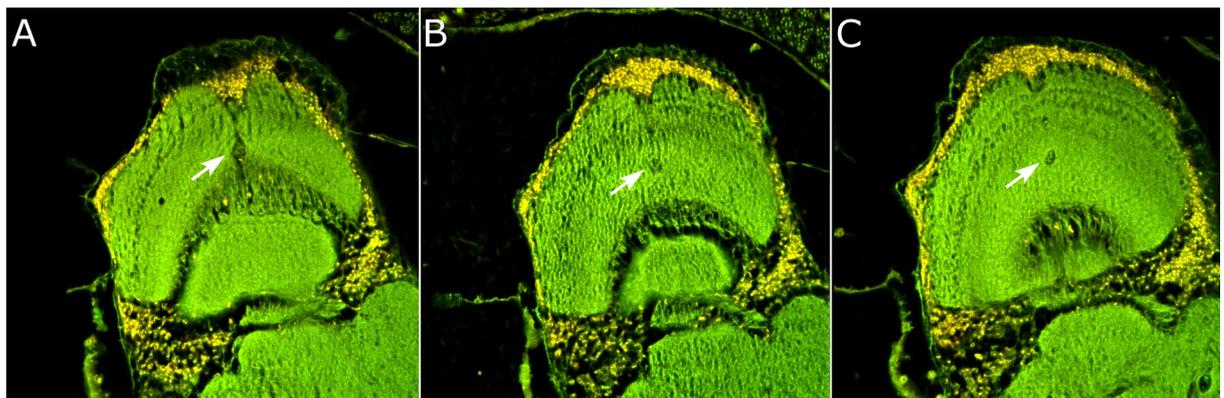


Abbildung 57: Frontaler Kragenschnitt einer Herpes-Fliege. Der Pfeil zeigt auf ein ektopisches Faserbündel in der Medulla in verschiedenen Ebenen desselben Gehirns.

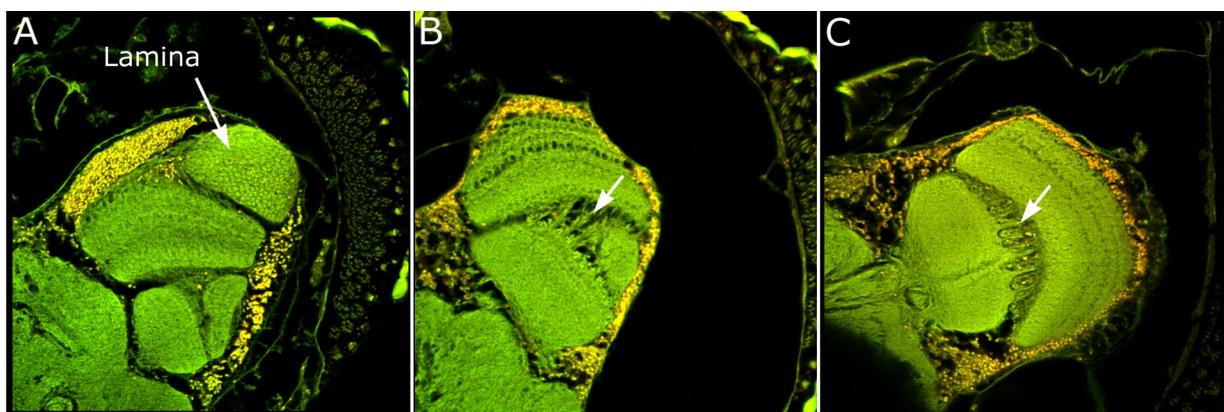


Abbildung 58: Horizontale (A) und frontale (B-C) Kragenschnitte von Herpes-Fliegen. **A:** Abnormal ausgebildete Lamina (siehe Abbildung 56 zum Vergleich). **B und C:** Ausgefranste innere Chiasmen (Pfeile).

4.2.3 MARCM-Analyse

Ziel dieser Analyse war es, mögliche zellautonome Effekte der *hbs-ECD*-Fehlexpression in axonaler Wegfindung oder axonaler Terminierung auf der Ebene einzelner Zellen zu identifizieren.

Die MARCM-Methode wurde wie bei der Analyse der Linien NP2044 und NP2273 angewendet. Es wurden 57 Gehirne präpariert, davon wurde bei fünf Tieren der Hitzeschock im Embryonalstadium durchgeführt, bei zehn im Stadium L3a und bei 42 in L3b.

Defekte in der axonalen Wegfindung können gut an Laminamonopolar- und Transmedullazellen untersucht werden. Laminamonopolarzellen durchqueren das äußere optische Chiasma, Transmedullazellen das innere. Aus den Versuchen mit der Linie NP2044 war bekannt, daß L- und TM-Zellen am häufigsten durch Hitzeschocks im L3-Stadium markiert werden. Daher wurde hauptsächlich dieser Zeitraum für die Hitzeschocks gewählt.

Die Mehrheit der gefärbten Neurone erscheint wildtypisch, sie entsprechen weitestgehend den Zellen, die mit der MARCM-Methode in der Linie NP2044 identifiziert wurden. Auffällige und ungewöhnliche Phänotypen werden in den folgenden Kapiteln gezeigt.

Ein Problem für die Analyse der Zellen war, daß in 44 der 57 Gehirne derart große Zellpopulationen angefärbt wurden, daß eine genaue Betrachtung der einzelnen Zellen nicht möglich war (nach Hitzeschocks in L3a und L3b; Abbildung 59A-B). Mögliche Gründe hierfür werden in Kapitel 5.10 diskutiert.

4.2.3.1 Markierte Zelltypen

In den Gehirnen, in denen sehr große Zellgruppen markiert waren, dominierten Laminamonopolarzellen (L1 und L4), Transmedullazellen (TM1, TM3, TM4), PM-Zellen und LC12-Zellen. Diese vier Zellgruppen traten innerhalb aller 44 Gehirne mit massiver Färbung deutlich sichtbar auf. Oft wurden auch TLP5, T4 und T5 markiert. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Analyse der Zelltypen in NP2044. In mehreren Fällen wurde eine LI-Zelle markiert, die bei der Untersuchung von NP2044 nicht gefärbt worden war (Abbildung 59A).

Bemerkenswert ist, daß in einem Fall eine Gruppe kolumnarer Gliazellen im inneren optischen Chiasma markiert wurde, bei der Analyse von NP2044 wurden derartige Gliazellen nur im äußeren Chiasma gefunden (Abbildung 59C).

In den fünf nach einem Hitzeschock im Embryonalstadium untersuchten Gehirnen wurden weniger Zellen gefärbt, Zelltypen waren Tangentialzellen in Lobula und Medulla (u.a. die in NP2044 beobachteten), LC14, sowie in einem Fall Retinulazellen R1-R6.

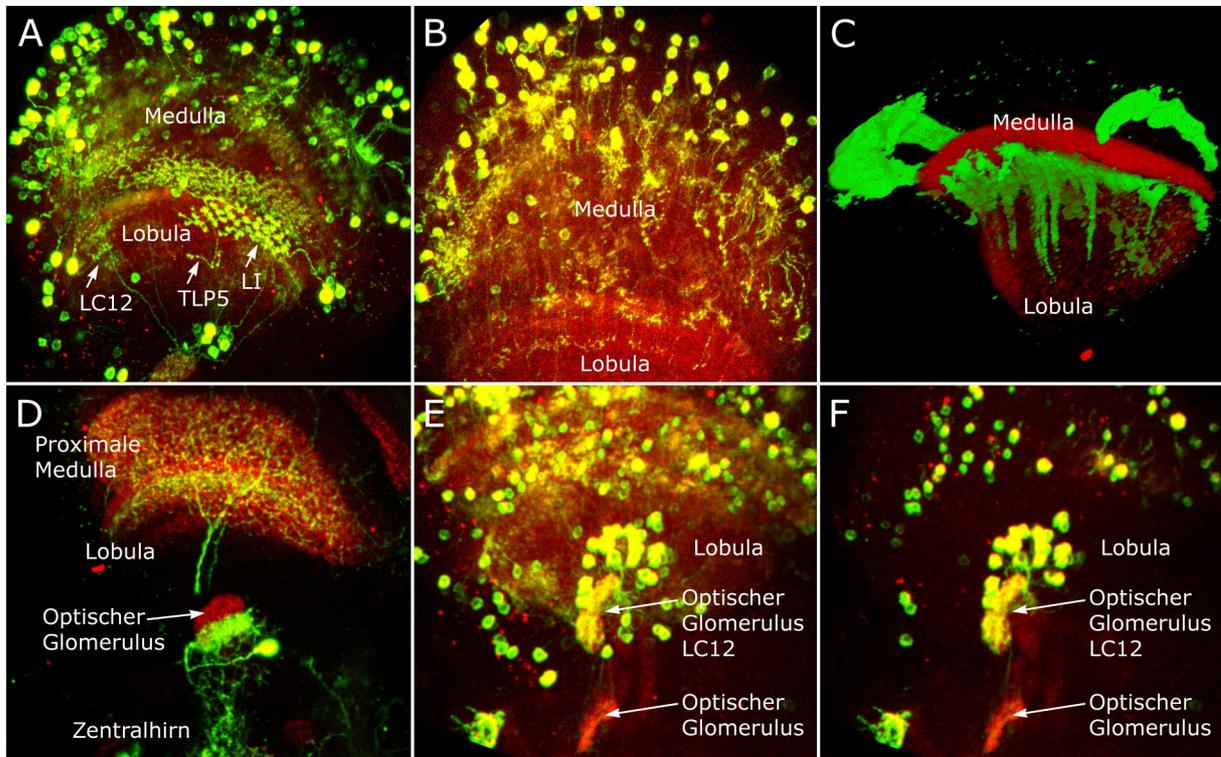


Abbildung 59: Zellen in der Linie Herpes; grün: mCD8, rot: Rst. Die gelbe Färbung der Neurone kommt dadurch zustande, daß zum Scannen des schwachen Anti-Rst-Signals eine so hohe Laserintensität notwendig war, daß das Anti-mCD8-Signal mitgescannt wurde. **A:** Typisches Beispiel für ein Gehirn, in dem große Mengen an Zellen markiert sind. Erkennbar sind u.a. TM-, TLP5-, LI- und LC12-Zellen; Projektionsansicht, Hitzeschock 95-102h AEL (L3b), Präparation P75. **B:** Ein weiteres Beispiel für ein Gehirn, in dem sehr viele Zellen markiert sind, in diesem Ausschnitt primär TM-Zellen; Projektionsansicht, Hitzeschock 100-119h AEL (L3b), Präparation P75. **C:** *Voltex*-3D-Rekonstruktion von Gliazellen im inneren und äußeren optischen Chiasma; Hitzeschock 98-115h AEL (L3b), Präparation P70. **D:** Projektionsansicht des anterioren Bereichs eines Lobus. Neben einer Tangentialzelle mit Arborisierungen in proximaler Medulla und Lobula ist eine Zelle sichtbar, die anterior des optischen Glomerulus von LC12 im Zentralhirn liegt. Ihre dichte Verzweigung ähnelt der Form der Rst-Immunreaktivität des Glomerulus. Hitzeschock 6-22h AEL (Embryonal), Präparation P70. **E-F:** Projektionsansichten des anterioren Bereichs eines Lobus. Anterior des optischen Glomerulus für LC12 ist ein weiterer durch Anti-Rst markierter Glomerulus erkennbar, einige dünne Axone ziehen zu ihm. F beinhaltet weniger Z-Ebenen als E. Hitzeschock 118-124h AEL (L3b), P70.

Der optische Glomerulus, in dem LC12-Zellen terminieren, wurde in den meisten Gehirnen deutlich markiert. Es wurde beobachtet, daß dieser auch noch im Stadium P85 durch Anti-Rst gefärbt wird. In diesem Stadium ist die Rst-Immunreaktivität im gesamten Gehirn bereits sehr schwach geworden. In zwei Fällen wurde eine Zelle des Zentralhirns markiert, deren Arborisierung in Ihrer Form der Rst-Färbung des Glomerulus stark ähnelt. Diese Arborisierung ist jedoch zu dem Glomerulus leicht versetzt (Hitzeschock embryonal; Abbildung 59D). Darüber hinaus ist in zwei Gehirnen ein möglicher weiterer optischer Glomerulus durch Anti-Rst und GFP-positive Neurone gefärbt (Abbildung 59E-F). Dieser liegt anterior des Glomerulus der LC12-Zellen. Hierbei könnte es sich um den Glomerulus handeln, in dem LCCN1-Neuronen terminieren (vergleiche mit Abbildung 46).

4.2.3.2 Mutante Phänotypen aus der MARCM-Analyse

Defekte der axonalen Wegfindung wurden in keinem untersuchten Gehirn beobachtet. In den 44 stark angefärbten Gehirnen ist eine detaillierte Untersuchung der Arborisierungen und Axone einzelner Zellen nicht möglich, da sich zu viele verschiedene Zelltypen überlagern. Unter diesen Umständen wurden in diesen Gehirnen mit einer Ausnahme keine sicher von NP2044 abweichenden Phänotypen festgestellt.

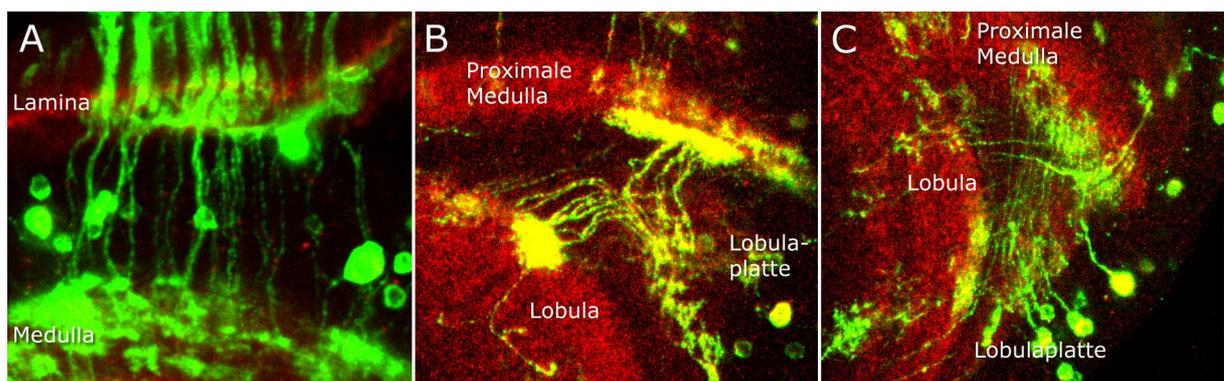


Abbildung 60: Projektionsansichten von Zellen der Linie Herpes, grün: mCD8, rot: Rst.

A: Laminamonopolarzellen im äußeren optischen Chiasma. Es sind keine Störungen erkennbar. Hitzeschock 120-125h AEL (L3b), Präparation P70.

B: Wildtypisch erscheinende T4- und T5-Zellen, die das innere optische Chiasma durchqueren. Hitzeschock 100-119h AEL, Präparation P75.

C: Weitere T4- und T5-Zellen, die keine fehlerhaften Phänotypen zeigen. Hitzeschock 95-102h AEL, Präparation P75.

Auch die im Embryonalstadium markierten Neurone wirken wildtypisch. Abbildung 60 zeigt Beispiele für Axone im äußeren und inneren Chiasma. Diese zeigen keine Wegfindungsstörungen oder erkennbare Abweichungen zu den entsprechenden Zellen in der Linie NP2044. Die Neurone scheinen in ihren korrekten Säulen zu verlaufen, insofern sich dies bei der großen Menge an gefärbten Zellen beurteilen läßt.

Es gibt jedoch in einem der massiv gefärbten Gehirne eine Gruppe von Laminamonopolarzellen, deren Axone im äußeren Chiasma faszikulieren (Abbildung 62D). Die Axone treten beim Erreichen der Medulla wieder aus dem Faszikel aus, die Zellen terminieren getrennt voneinander.

Es standen nur vier Gehirne zur Verfügung, die den Hitzeschock im L3-Stadium erhalten haben, und in denen eine geringe Zahl an Laminamonopolarzellen oder Transmedullazellen gefärbt ist. Hier war eine genauere Untersuchung der Form der Zellen möglich. L4, T1 und T4 treten in diesen Gehirnen als Einzelzellklone auf und erscheinen wildtypisch. Bei TM-Zellen (TM3 und TM4) konnten jedoch in zwei von drei Gehirnen Auffälligkeiten beobachtet werden.

Der deutlichste Phänotyp ist in Abbildung 61 gezeigt. Es handelt sich hier um eine Gruppe von fünf Neuronen, deren Arborisierungen sich in der distalen Medulla überlappen. Unter ihnen befinden sich drei TM3- und eine TM4-Zelle. Die TM4-Zelle links bildet auf der Höhe ihrer Arborisierung in der proximalen Medulla eine ektopische Verbindung mit der benachbarten TM3-Zelle aus. Außerdem faszikulieren zwei benachbarte TM3-Zellen nach Verlassen der Medulla im inneren optischen Chiasma. Die beiden Axone trennen sich beim Erreichen der Lobula wieder. Im Wildtyp verlaufen die kolumnaren Neuronen stets durch ihre Säule und überlappen nicht mit den Axonen aus benachbarten Säulen. Abbildung 61B zeigt eine 3D-Rekonstruktion, so daß sichtbar wird, daß sich die beiden Axone auch in der Z-Achse nicht voneinander abheben. In Abbildung 61C werden die Querverbindung und die Faszikulierung zwischen den Neuronen schematisch dargestellt.

Weitere mögliche Unregelmäßigkeiten können bei den Neuronen in Abbildung 62A-C erkannt werden. Zu sehen sind (in 62A von links nach rechts) eine TM4- über einer TM3-Zelle in derselben Säule, eine T4-, ein bis drei Y3- und eine TM3-Zelle. Die TM4-Zelle überlappt in der Medulla völlig mit der linken TM3-Zelle. Die beiden Neurone sind in der Projektionsansicht nicht zu unterscheiden, bis sich die

Axone im inneren Chiasma klar voneinander trennen (62A und C). Oberhalb der Trennlinie sind die Axone bei Betrachtung der einzelnen Z-Ebenen getrennt voneinander erkennbar, verlaufen jedoch sehr nahe übereinander. Die Zellen scheinen also in der Medulla in der selben Säule zu arborisieren und in der Lobula in unterschiedlichen. In Abbildung 62B ist der Terminus der beiden Neurone in der Lobula dargestellt. Nach Erreichen der Lobula gibt es eine ektopische Querverbindung zwischen den beiden Zellen.

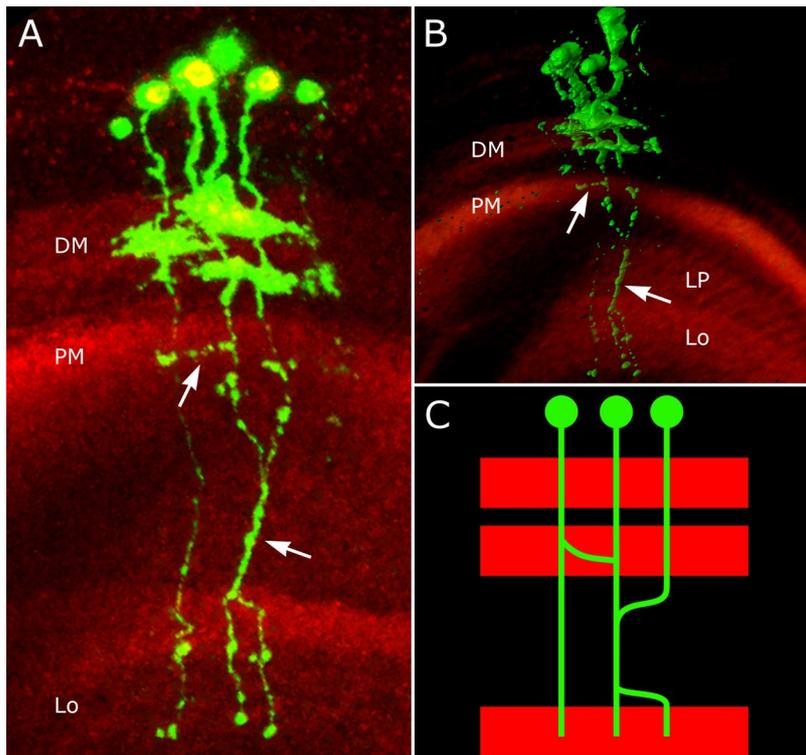


Abbildung 61: MARCM-Klone in der Linie Herpes, grün: mCD8, rot: Rst. DM = Distale Medulla, PM = Proximale Medulla, Lo = Lobula, LP = Lobulaplatte. Hitzeschock 98-115h AEL (L3b), Präparation P70.

A: Projektionsansicht einer Gruppe aus fünf Neuronen, darunter eine TM4- (links) und drei TM3-Zellen (rechts). Es besteht eine ektopische Querverbindung zwischen dem TM4- und dem benachbarten TM3-Neuron in der proximalen Medulla (linker Pfeil). Die Axone zweier TM3-Zellen faszikulieren im inneren Chiasma (rechter Pfeil) und trennen sich wieder in der Lobula.

B: *IsoSurface*-3D-Rekonstruktion derselben Zellen. Gegenfärbung *Voltex*-3D-

Rekonstruktion. **C:** Modell der Fehlbildungen. Die Querverbindung geht wahrscheinlich von einer Arborisierung der TM4-Zelle aus.

Am rechten Bildrand der Abbildungen 62A und C überlappt eine TM3-Zelle mit Y3-Zellen. Die Situation läßt sich aufgrund der Überlappung nicht völlig klar erkennen, aber Unregelmäßigkeiten liegen nahe. Auch um wieviele Y-Zellen es sich handelt, ist schwer zu beurteilen; es können ein bis drei Zellen vorliegen. Nur ein Zellkörper der Y3-Zelle(n) ist erkennbar, aus der Lobulaplatte ziehen jedoch drei Axone von der Y-Arborisierung zur proximalen Medulla. Das linke Axon endet in der für Y3-Zellen charakteristischen Verzweigung in der M9-Schicht. Das rechte Axon bildet keine solche Arborisierung aus, sondern zieht in

der M8-Schicht lateral zu der linken Arborisierung herüber und quert dabei die TM3-Zelle. Das mittlere Axon überlappt mit dem Axon der TM3-Zelle, die beiden Axone trennen sich im inneren Chiasma. In der M8-Schicht zieht das mittlere Axon ebenfalls lateral zur linken Verzweigung. Möglicherweise bildet also eine Y3-Zelle zwei zusätzliche Axone aus, die sich in der Medulla wieder vereinigen. Andernfalls liegen drei Y-Zellen vor, von denen zwei in der Medulla nicht korrekt arborisieren.

In der Summe deuten die in Abbildung 62A-C gezeigten ungewöhnlichen Verzweigungen darauf hin, daß in diesem Lobus ein mutanter Phänotyp im Bereich zwischen der proximalen Medulla und der Lobula vorliegt.

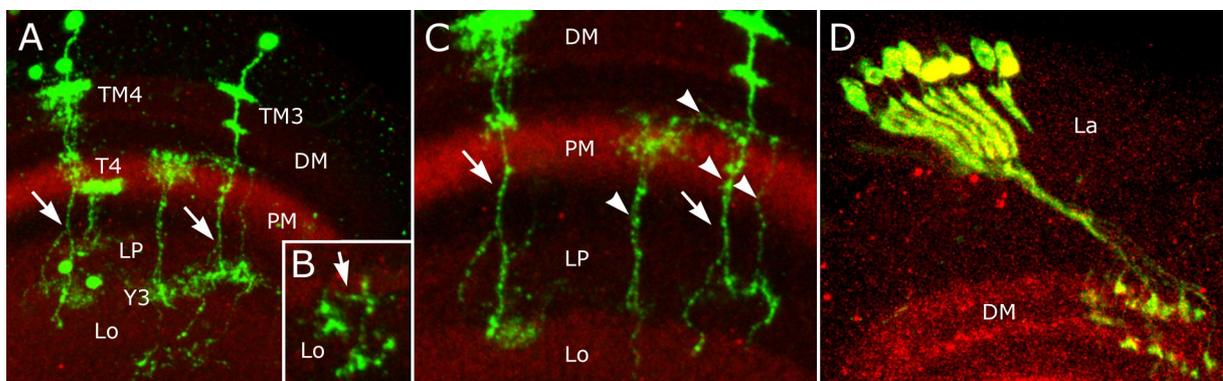


Abbildung 62: Projektionsansichten von Zellen der Linie Herpes, grün: mCD8, rot: Rst. La = Lamina, DM = Distale Medulla, PM = Proximale Medulla, Lo = Lobula, LP = Lobulaplatte. A-C: Hitzeschock 120-125h AEL, Präparation P70. **A:** Erkennbar ist ganz links eine TM4-Zelle, die eine TM3-Zelle überdeckt, daneben ein T4-Neuron. Es folgen ein bis drei Y3-Zellen und schließlich ein weiteres TM3-Neuron. Die TM4-Zelle liegt über dem linken TM3-Neuron, die Axone trennen sich im inneren Chiasma (linker Pfeil). In der rechten Bildhälfte befinden sich eine TM3-Zelle und Y3-Zelle(n). Ein Y3-Axon überlappt stark mit dem TM3-Axon, sie trennen sich im inneren Chiasma (rechter Pfeil). **B:** Detailaufnahme der Termini der TM4-Zellen in der Lobula. Es besteht eine ektopische Querverbindung (Pfeil). **C:** Detailaufnahme des inneren Chiasmas des optischen Lobus aus A. Es sind weniger Z-Ebenen für die Erstellung der Projektionsansicht verwendet worden. Die möglicherweise faszikulierten Axone sind mit Pfeilen markiert, die Axone der Y3-Zelle(n) und die laterale Querverbindung in der M8-Schicht mit Pfeilspitzen. **D:** Laminamonopolarzellen (L1), deren Axone im äußeren Chiasma faszikulieren. Hitzeschock 78-96h AEL, Präparation P80.

5 Diskussion

Seit 1990 ist bekannt, daß die Mutation oder Fehlexpression von IRM-Genen in der Regel starke Phänotypen im optischen Lobus von *D. melanogaster* hervorruft (Boschert *et al.* 1990; Bonengel 2002). Die Ursachen für diese Fehlbildungen konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Unter anderem aus der Augenentwicklung und der Muskelfusion ist bekannt, daß die IRM-Zelladhäsionsmoleküle IrreC-Rst (Rst), Kirre, SNS und Hibris miteinander homo- und heterophil interagieren können (Strünkelnberg *et al.* 2001; Bao und Cagan 2005). Eine Interaktion zwischen diesen Proteinen während der Entwicklung der optischen Loben liegt also nahe, wurde jedoch bisher nicht entschlüsselt. Eine offene Frage ist auch, inwiefern die Paraloge Rst und Kirre im optischen Lobus eine unterschiedliche Rolle spielen.

Es wird vermutet, daß IrreC-Rst neben der Rolle in axonaler Wegfindung im Chiasma auch für die Synaptogenese oder die Terminierung von Neuronen in der korrekten Neuropilschicht relevant ist (Ramos *et al.* 1993; Schneider *et al.* 1995). Dies könnte das deutliche Schichtungsmuster der Rst- und Kirre-Immunreaktivität in den Neuropilen erklären.

Vom IrreC-Rst-Homolog in *C. elegans*, SYG-1, ist eine Rolle in der Synaptogenese bekannt (Shen und Bargmann 2003). Die Synaptogenese beginnt in *D. melanogaster* in der zweiten Hälfte der Puppenentwicklung, nachdem die Axone der Neurone ihr Ziel erreicht haben (Meinertzhagen und Hanson 1993). Im selben Zeitraum nimmt die Rst-Immunreaktivität ab. Dies spricht gegen eine Rolle von Rst in der Synaptogenese und für eine Rolle in axonaler Terminierung. Eine aktuelle Veröffentlichung gibt weitere Hinweise darauf (Bazigou *et al.* 2007). Die Retinulazelle R8 terminiert in der Schicht M3 der distalen Medulla. Fehlt die Rezeptor-Tyrosinkinase Alk in der Medulla oder ihr Ligand Jelly Belly in R8-Zellen, werden IrreC-Rst und Kirre in der M3-Schicht der Medulla herunterreguliert. R8-Zellen zeigen in diesem Fall Projektionsdefekte, sie terminieren oft in falschen Schichten oder in benachbarten Säulen (Bazigou *et al.* 2007). Ob die Herunterregulierung von Rst/Kirre die Ursache für die Fehlprojektionen darstellt oder umgekehrt, ist hierbei noch unklar.

Die MARCM-Methode bietet die Möglichkeit, IRM-Proteine und ihre mutmaßlichen intrazellulären Interaktionspartner in einzelnen Zellklonen fehlzuexprimieren oder durch RNAi herunterzuregulieren. Dabei wird die Genexpression einzelner

Neurone verändert, während die Umgebung wildtypisch bleibt. Dies liefert eine nie zuvor dagewesene Präzision für die Untersuchung zellautonomer Effekte.

Um fehlerhafte Phänotypen finden zu können, muß zunächst der Wildtyp genau untersucht sein. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Zellpopulationen charakterisiert, die in den Linien NP2044 und NP2273 durch die MARCM-Methode markiert werden. NP2044 trägt eine *gal4*-Insertion in der regulatorischen Sequenz stromaufwärts von *irreC-rst*, NP2273 stromaufwärts von *kirre*. Beide Linien spiegeln die *irreC-rst*- bzw. *kirre*-Expression in einem Großteil des optischen Lobus wieder (Abbildungen 19 und 20).

5.1 Vollständigkeit der Liste identifizierter Zelltypen

MARCM ist eine stochastische Methode, d.h. es hängt vom Zufall ab, welche Zellen gefärbt werden. Folglich ist es wahrscheinlicher, daß eine kolumnare Zelle markiert wird, die 750 Mal pro optischem Lobus vorkommt, als eine Tangentialzelle, die es eventuell nur ein einziges Mal pro Gehirn gibt.

Unter diesen Voraussetzungen kann diese Studie keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

Zunächst muß bedacht werden, daß nur in den Gehirnen, in denen ein Antikörper gegen mCD8 verwendet wurde, eindeutige Aussagen über die vorliegenden Zelltypen getroffen werden konnten. Die übrigen Gehirne konnten nur als Ergänzung hinzugezogen werden. Dies reduziert die Zahl an effizient untersuchten Gehirnen auf 74 (von 179) Gehirnen für NP2044 und 66 (von 183) Gehirnen für NP2273.

Innerhalb dieser Gehirne traten manche Zelltypen regelmäßig und häufig auf. Andere Neurone wurden zum Teil nur in einem einzigen Gehirn markiert. Dies läßt den Schluß zu, daß es noch weitere Zellen gibt, die aufgrund des Zufalls bisher nicht gefärbt wurden.

Die Linie Herpes basiert ebenfalls auf NP2044. Im Zuge ihrer Analyse konnten die meisten der in NP2044 gefundenen Zelltypen bestätigt werden. Es traten jedoch auch Zelltypen auf, die bei der allgemeinen Untersuchung von NP2044 nicht gefunden worden waren. Dies zeigt, daß die Liste der Zelltypen durch weitere Analysen noch komplettiert werden könnte. Vor allem bei Hitzeschocks im Embryonalstadium besteht noch Potential für die Entdeckung zusätzlicher Tangentialzellen.

Die Feststellung, welche Zelltypen in beiden Linien besonders häufig markiert

werden, ist jedoch für die Anwendung der hier gewonnenen Erkenntnisse wichtiger als die Vollständigkeit der Liste. An den in dieser Arbeit bestimmten Zellen sollen die Effekte von Modifizierungen der Expression der IRM-Gene untersucht werden. Dafür ist es notwendig, sich auf die Betrachtung von Zelltypen zu konzentrieren, die verlässlich markiert und leicht identifiziert werden können. Mehrere Gruppen dafür geeigneter Neurone wurden bestimmt.

5.2 Auswirkungen des Zeitpunkts der Hitzeschockgabe

Bis zur Mitte des L2-Stadiums teilen sich im optischen Lobus nur Neuroblasten (Meinertzhagen und Hanson 1993), erst danach differenzieren sich die Neurone. Findet die mitotische Rekombination in einem Neuroblasten statt, ist als Folge eine große Zahl an markierten Zellen zu erwarten.

Bemerkenswert ist, daß bei Hitzeschocks im Embryonal-, L1-, und L2-Stadium dennoch nicht mehr Zellen markiert wurden als im L3-Stadium, das Gegenteil ist der Fall.

Eine naheliegende Erklärung ist, daß die Zellteilungsaktivität im optischen Lobus im L3-Stadium deutlich höher ist als in früheren Stadien. Dadurch steigt bei einem Hitzeschock während des L3-Stadiums die Wahrscheinlichkeit an, eine Zelle während einer Mitose zu treffen. Dieser Effekt ist stärker als die Rekombination in einem einzelnen Neuroblasten während früherer Stadien.

Auswirkungen hatte der Zeitpunkt des Hitzeschocks dagegen in einem gewissen Maße auf die Art der markierten Zelltypen. So wurden während des Embryonal- und L1-Stadiums Tangentialzellen gefärbt, die zu späteren Zeitpunkten nicht beobachtet wurden. Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß sich Tangentialzellen vor kolumnaren Neuronen entwickeln (Meinertzhagen und Hanson 1993).

5.3 Unterschiedlich starke *gal4*-Expression in verschiedenen Neuronen

Je nach Zelltyp ist die Identifizierung mehr oder weniger einfach. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen wieder. Deutlich wird dies, wenn man z.B. die Laminamonopolarzellen (L-Zellen) betrachtet. L-Zellen wurden oft in Gruppen markiert. Sie sind kolumnare Neurone, alle Subtypen kommen gleich häufig vor, ein Mal pro Säule.

Innerhalb einer Gruppe von Zellen sind L1 und L4 sehr einfach zu identifizieren, L1 durch seine Termini in der Medulla und L4 durch seine Kollateralen in der Lamina. L3 dagegen ist in der Lamina außer bei sehr hochwertigen Färbungen von L1 nicht zu unterscheiden. In der Medulla kann der einzelne Terminus von L3 innerhalb von Zellgruppen nicht so leicht bestimmt werden wie L1. Das trägt dazu bei, daß L1 und L4 deutlich häufiger gefunden wurden als L3.

Dies muß jedoch nicht der einzige Grund für die geringe Zahl an L3-Zellen sein. Betrachtet man die GFP-Färbungen in Abbildung 21, so wird deutlich, daß das GFP-Signal in der M3-Schicht viel schwächer ist als oberhalb und unterhalb von ihr. Dies ist die Terminierungsschicht der L3-Neurone.

Gal4^{NP2044} inseriert stromaufwärts in der regulatorischen Sequenz von *irreC-rst* und spiegelt das Expressionsmuster eines oder mehrerer seiner Enhancer wieder. Dies entspricht wahrscheinlich jedoch nur einem Teil des vollständigen Expressionsmusters von *irreC-rst*. Für NP2273 und *kirre* verhält sich die Situation analog.

Es ist also möglich, daß in den NP-Linien die *gal4*-Expression in allen L1/L4-Zellen stark getrieben wird und in L3-Zellen schwächer oder nur in einer Teilgruppe von L3-Zellen.

L2-Zellen wurden in NP2044 nie gefunden, in NP2273 wahrscheinlich nicht. Für diesen Befund spricht das starke GFP-Signal in der Schicht M2, in der diese Neuronen terminieren (Abbildung 21). Wenn die Intensität des GFP-Signals die Intensität oder die Häufigkeit der Färbung von Zelltypen widerspiegelt, sollte L2 also genauso häufig und stark markiert wie L1 anzutreffen sein. Dies ist mit Sicherheit nicht der Fall. Die Konsequenz ist, daß sich L2 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im *gal4*-Expressionsprofil von NP2044 und NP2273 befindet.

Ein weiteres Beispiel für den Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Identifizierung einer Zelle und ihrer Form bietet TM1. TM1 stellt in beiden Linien die am häufigsten gefundene TM-Zelle dar. Wird eine Gruppe von Zellen in der Medulla gefärbt, dann sticht TM1 in der Regel am deutlichsten hervor. TM2 ist der einzige andere Zelltyp mit einer ähnlichen Arborisierung. Die obere Verzweigung von TM1 liegt genau in dem durch GFP nur schwach markierten Bereich. Es ist also unwahrscheinlich, daß TM1 häufiger markiert wird als z.B. TM3, deren Arborisierungen in den intensiv gefärbten Schichten der Medulla liegen (Abbildungen 21, 29 und 43).

Betrachtet man die Abbildungen 51G und 52G, wird deutlich, daß schon alleine die Aborrisierungen der am häufigsten markierten Zellen ausreichen würden, um die distale Medulla einheitlich stark zu färben. Dies setzt jedoch voraus, daß alle Zelltypen gleich häufig markiert werden. Das unterschiedlich starke GFP-Signal kann also nur dadurch erklärt werden, daß nicht in allen Zelltypen, die sich im NP2044/NP2273-Expressionsmuster befinden, *gal4* gleich stark getrieben wird.

5.4 Die geringe Zahl an markierten Retinulazellen

Bei Untersuchungen von Gehirnen von L3-Larven wurde gezeigt, daß sich Retinulazellen im Expressionsprofil von *gal4*^{NP2044} und *gal4*^{NP2273} befinden (Küffner 2006). Dennoch wurden Retinulazellen in dieser Analyse nur in Einzelfällen markiert.

Aus Wolff und Ready 1993 geht hervor, daß sich die Retinulazellen im L3-Stadium bilden. Die identifizierten R-Zellen wurden in Gehirnen angefärbt, die den Hitzeschock im L3-Stadium erhalten haben. Da unter diesen Bedingungen die meisten Gehirne untersucht wurden, ist es unwahrscheinlich, daß der Mangel an R-Zellen auf eine unzureichende Anwendung der Methode zurückzuführen ist. Vermutlich besteht der Grund darin, daß sich auch die Retinulazellen nicht komplett im Expressionsmuster der beiden Linien befinden. Bei einer GFP-Färbung, die die gesamte *gal4*-Expression widerspiegelt, überlagert sich das Signal der einzelnen Zellen. Dadurch ist auch eine verhältnismäßig kleine Zahl an markierten Neuronen deutlich erkennbar. Wären z.B. nur 5 % aller Retinulazellen

markiert, entspräche dies immer noch ca. 300 Zellen ($\frac{750 \cdot 8}{20}$). In den MARCM-

Versuchen ist bereits das Axon einer einzelnen gefärbten Zelle erkennbar.

MCD8-GFP ist in der Membran verankert. Wird die Zellmembran erneuert, geht das GFP verloren. Findet also in einer Zelle eine besonders aktive Erneuerung der Zellmembran statt, könnte mCD8-GFP bis zum Präparationszeitpunkt in späten Puppenstadien schon größtenteils abgebaut sein. Dies stellt eine alternative Erklärung für die geringe Zahl an identifizierten Photorezeptoren dar.

5.5 Übereinstimmung der Expression von *gal4* mit *rst* und *kirre*

Um die Auswirkungen der Fehlexpression von IRM-Genen in Einzelzellen untersuchen zu können, reicht die Bestimmung der am häufigsten markierten

Zelltypen der Linien NP2044 und NP2273 aus.

Für die Fragestellung, ob Rst und Kirre in der Entwicklung des optischen Lobus unterschiedliche Rollen spielen, ist es jedoch interessant, die Zellpopulationen beider Linien miteinander zu vergleichen. Hierfür muß zunächst untersucht werden, wie zuverlässig die beiden *gal4*-Insertionen die Expressionsmuster von *rst* und *kirre* widerspiegeln.

Schon die Betrachtung der Abbildungen 19 und 20 zeigt, daß es keine vollständige Übereinstimmung gibt.

In NP2044 gibt es Schichten, die starke Rst-Immunaktivität zeigen und nur ein schwaches GFP-Signal. Dies sind z.B. M3/4 in der Medulla sowie die meisten Schichten der Lobula. In der proximalen Medulla gibt es sowohl ein starkes Rst- als auch ein starkes GFP-Signal. Gleichzeitig wurde eine große Zahl an Zellen identifiziert, die dort arborisieren. In anderen Schichten mit hoher Rst-Immunreaktivität ist also ebenso ein starkes GFP-Signal zu erwarten. Da dies nicht der Fall ist, ist es wahrscheinlich, daß *gal4*^{NP2044} nicht in allen Rst-positiven Zellen exprimiert wird. Die o.g. Betrachtungen zu L3-, TM1- und R-Zellen liefern weitere Hinweise für diese Vermutung.

In NP2273 ist die Diskrepanz zwischen Kirre-Antikörperfärbung und GFP-Signal noch deutlicher. Das GFP-Signal ist im gesamten proximalen Bereich des Lobus, der aus der inneren optischen Anlage hervorgeht, nur sehr schwach. Da die Kirre-Immunreaktivität in diesen Neuropilen stark ist, kann davon ausgegangen werden, daß es einen deutlichen Unterschied zwischen den Expressionsprofilen von *gal4*^{NP2273} und *kirre* gibt.

Die Spezifität des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers gegen die intrazelluläre Domäne von Kirre konnte aufgrund des Fehlens einer Nullmutante bisher nicht unabhängig von Rst untersucht werden. Es existiert auch ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Kirre (Menon *et al.* 2005). Dessen Färbung wurde mit der des intrazellulären Antikörpers verglichen (Abbildung 18A-B). Es sind keine grundsätzlichen Unterschiede zu erkennen. Dadurch konnte Sicherheit darüber gewonnen werden, daß die im Vergleich zu GFP großflächigere Färbung von Anti-Kirre nicht aus einer unspezifischen Bindung heraus resultiert.

Dies bestätigt, daß *gal4*^{NP2273} mit hoher Wahrscheinlichkeit nur einen Teil der Expression von *kirre* widerspiegelt.

Der Grund für die bessere Übereinstimmung von *gal4*^{NP2044} mit *rst* als von

gal4^{NP2273} mit *kirre* könnte darin liegen, daß die Insertion *gal4^{NP2273}* weiter entfernt von *kirre* liegt als *gal4^{NP2044}* von *rst* (Abbildung 8).

In mehreren Fällen wurden Glia-Zellen im äußeren optischen Chiasma markiert (Abbildungen 37 und 50). Dies war sowohl aus der Rst/Kirre-Immunfärbung als auch aus dem GFP-Signal heraus nicht zu erwarten. Da die Gliazellen das gesamte Chiasma ausfüllen, ist wahrscheinlich, daß deren Färbung im Vergleich zu den klar definierten Schichten in den Neuropilen bisher als unspezifischer Hintergrund eingestuft und übersehen wurde.

Es ist bisher nicht bekannt, daß *irreC-rst* in vielen Neuronen des Zentralhirns exprimiert wird. Bei den MARCM-Analysen fielen jedoch gelegentlich auch große Zellklone im Zentralhirn auf. In wie weit dies tatsächlich der *rst*-Expression entspricht oder eine über Rst-positive Zellen hinausgehende Expression von *gal4^{NP2044}* darstellt, muß in Zukunft geklärt werden.

5.6 Unterschiede zwischen den beiden Linien

Schon beim Vergleich der GFP-Färbungen in den Abbildungen 19 und 20 ist offensichtlich, daß sich die Expressionsmuster von *gal4^{NP2044}* und *gal4^{NP2273}* unterscheiden.

Die Analyse der Zelltypen hat dies klar bestätigt. In den Abbildungen 51 und 52 werden diese Abweichungen verdeutlicht.

Ein exemplarischer Unterschied ist das vollständige Fehlen von PM-Zellen in NP2273. Aus der schwachen GFP-Färbung in der proximalen Medulla in Abbildung 21 läßt sich schließen, daß hierfür nicht die stochastische Natur der MARCM-Methode verantwortlich ist. Viel wahrscheinlicher ist, daß sich PM-Zellen tatsächlich nicht im Expressionsprofil von *gal4^{NP2273}* befinden.

Viele Neuronen im Bereich des Lobulakomplexes wurden in NP2273 nur in einem einzigen Gehirn markiert, während sie in NP2044 öfter auftreten.

MI1 ist der einzige Zelltyp, der in NP2273 in mehreren Gehirnen gefärbt wurde und in NP2044 nie markiert war.

Zusammengefaßt legen die Ergebnisse nahe, daß die *gal4^{NP2273}*-Expression im proximalen Lobus zwar vorhanden, aber sehr schwach ist und hierbei nur einem Teil der *kirre*-Expression entspricht. Gleichzeitig entsteht der Eindruck, daß die in NP2273 markierten Zellen einer Untergruppe der in NP2044 gefärbten Zellen entsprechen.

Die geringen Unterschiede sind nicht sonderlich überraschend, wenn man die

Antikörperfärbungen der Abbildungen 17 und 18 vergleicht. Sie entsprechen in fast allen Bereichen einander. Die Lobulaplatte wird vom Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von Kirre nur schwammig gefärbt, der extrazelluläre Antikörper zeigt jedoch klare Schichten wie Anti-Rst. Nur zwei Unterschiede konnten festgestellt werden. In der Medulla färbt Anti-Rst im Stadium P60 schwach die Schicht M8, Anti-Kirre nicht. In der Lobula beinhaltet die Rst-Färbung fünf hellere Schichten, die Kirre-Färbung nur vier. Es wurden keine Zellen gefunden, die diese Unterschiede eindeutig erklären können. Kandidaten für die Immunreaktivität der M8-Schicht sind MI- und Y3-Zellen (Abbildungen 26 und 31).

Der optische Glomerulus von LC12-Zellen wurde in Rst-Färbungen häufiger beobachtet als in Kirre-Färbungen. Die Kirre-Immunreaktivität in der Umgebung des Glomerulus ist allgemein höher. Ob der Glomerulus dadurch weniger auffällt oder die Kirre-Expression zeitlich enger reguliert ist, muß in Zukunft geklärt werden.

5.7 Aufstellung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen den markierten Zelltypen

Die in NP2044 identifizierten Zelltypen liegen über den gesamten optischen Lobus verteilt.

Die gefärbten TM-Zellen arborisieren auf begrenztem Raum in der Medulla und terminieren eher posterior in der Lobula. Großflächig über mehrere Säulen hinweg arborisierende TM-Zellen sowie sämtliche TMY-Zellen fehlen. Auffällig ist auch das weitgehende Fehlen von MI-Zellen. Es ergibt Sinn, daß sowohl TMY- als auch MI-Zellen größtenteils fehlen, da sich das typische Arborisierungsmuster der beiden Zellgruppen ähnelt (Bausenwein *et al.* 1992).

Schon von Schneider *et al.* wurde 1995 im Hinblick auf das Schichtenmuster der Rst-Immunreaktivität angeregt, daß ein funktioneller Signalübertragungsweg zwischen den *rst*-exprimierenden Zellen aufgestellt werden könnte.

Aus den hier identifizierten Zelltypen läßt sich tatsächlich eine Verbindung vom Auge bis ins Zentralhirn bilden. Dies könnte jedoch auch ein Zufallseffekt sein, da sich viele Arborisierungen der markierten Zellen überlappen.

Von Bausenwein *et al.* wurden 1992 drei Signalübertragungswege im optischen Lobus vorgeschlagen, zwei für Bewegungswahrnehmung und einer für Farbsehen. Neurone, die beim Farbsehen eine Rolle spielen, konvergieren in

den Schichten M8 und der anterioren Hälfte der Lobula. Diese Bereiche zeigen jeweils nur schwache oder keine Rst/Kirre-Immunreaktivität. Außerdem arborisieren TM-Zellen, die eine Rolle in der Bewegungswahrnehmung spielen, eher auf engem Raum, um eine hohe Raumauflösung zu gewährleisten (Bausenwein *et al.* 1992). Alle hier identifizierten TM-Neurone erfüllen dieses Kriterium. Eine Rolle der in NP2044 und NP2273 bestimmten Neurone in der Bewegungswahrnehmung liegt also nahe.

Beide von Bausenwein *et al.* für die Bewegungswahrnehmung postulierten Signalwege lassen sich aus identifizierten Neuronen rekonstruieren.

Aus einem Teil der in NP2273 identifizierten Zelltypen läßt sich der Übertragungsweg 1 zusammensetzen:

Die Photorezeptoren R1-R6 übertragen ihr Signal in der Lamina auf L1. MI1 übernimmt dieses Signal in den Schichten M1 und M5 und terminiert in M10, von wo aus T4-Zellen in die Lobulaplatte ziehen.

Eine Variation des Übertragungswegs 2 läßt sich durch eine Teilgruppe der Zelltypen aus NP2044 rekonstruieren:

R1-R6 terminieren in der Lamina. Dort übermitteln sie ihr Signal an T1. T1 terminiert in der Schicht M2 und ist dort präsynaptisch. TM2 und TM4 sind in M2 postsynaptisch und arborisieren in M9, wo PM-Zellen Neuronen untereinander verschalten. TM2 und TM4 terminieren in der posterioren Lamina, von wo aus das Signal durch LC12-Zellen ins Zentralhirn übermittelt wird.

L4-Zellen sind in der Lamina sowohl prä- als auch postsynaptisch (Meinertzhagen und O'Neil 1991). Ihre Termini in der Medulla wurden bisher nicht genauer untersucht. Die Vermutung liegt jedoch nahe, daß L4 in M2 präsynaptische Termini hat. L4-Zellen könnten also im Signalweg 2 eine zusätzliche Verbindung zwischen Lamina und Medulla bilden.

5.8 Rückschlüsse auf die Lokalisierung von Rst/Kirre innerhalb der Zellen

Eine interessante Fragestellung ist, in welchem Bereich der Zellen Rst und Kirre akkumulieren. Im Laufe der Entwicklung verschwindet die Immunreaktivität von Rst aus den Axonen und konzentriert sich in Puppenstadien auf einzelne Schichten der Neuropile (Schneider *et al.* 1995). Ob dort postsynaptische Verzweigungen oder präsynaptische Termini markiert werden, ist unklar.

In dieser Arbeit konnten Hinweise auf die Kollokalisierung von präsynaptischen

Termini mit Bereichen starker Rst/Kirre-Immunfärbung gefunden werden. Laminamonopolarzellen terminieren in den kräftig gefärbten Schichten der distalen Medulla und TM-Zellen in der deutlich markierten posterioren Lobula. Im Fall von Rst fallen außerdem die PM-Zellen in der hell leuchtenden M9-Schicht und die Termini von LC12-Zellen in ihrem deutlich markierten optischen Glomerulus auf.

Fast alle Bereiche der Rst/Kirre-Färbung können durch die putativen Termini der hier identifizierten Zellen erklärt werden (Abbildungen 51D und F sowie 52D und F). Da davon ausgegangen werden kann, daß die beiden *gal4*-Insertionen nicht dem kompletten Expressionsprofil der Gene folgen, sind die geringen Unterschiede kein Gegenargument.

Die Schicht M10 zeigt eine deutliche Rst-Immunreaktivität. Es wurde jedoch in NP2044 keine Zelle gefunden, die dort terminiert. MI1, die einzige Zelle, die in NP2273 in mehreren Gehirnen identifiziert wurde und in NP2044 in keinem, terminiert in M9 und M10. Es ist nicht auszuschließen, daß sich MI1 zwar nicht im Expressionsprofil von *gal4*^{NP2044} befindet, aber dennoch Rst-positiv ist. Dies könnte unter der Annahme, daß Rst in die axonalen Terminalien lokalisiert, die Rst-Färbung der Schicht M10 erklären.

Die wenigen markierten Tangentialzellen unterstützen die Hypothese, daß Rst und Kirre in den axonalen Terminalien akkumulieren. Sie scheinen im Fall von NP2044 in den Schichten M7 und Lo6 zu arborisieren (Abbildung 36), wo jeweils praktisch keine Rst-Immunreaktivität zu beobachten ist (Abbildung 17, Schneider *et al.* 1995). Bei Tangentialzellen kann davon ausgegangen werden, daß sie im optischen Lobus primär post- und im Zentralhirn präsynaptisch sind. Für die Tangentialzellen der Lobulaplatte wurde gezeigt, daß sie im optischen Lobus ausschließlich postsynaptische Spezialisierungen ausbilden (Raghu *et al.* 2007). Hierbei muß jedoch auch bedacht werden, daß es wahrscheinlich ist, daß Schichten mit Arborisierungen vieler kolumnarer Elemente stärker gefärbt werden als Schichten mit den Verzweigungen einzelner Tangentialzellen.

Noch deutlichere Argumente für eine präsynaptische Lokalisierung von Rst liefert der ab dem Stadium P60 durch Rst sehr stark und durch Kirre leicht gefärbte optische Glomerulus der LC12-Zellen im Zentralhirn (Abbildung 33). Diese Zellen sind postsynaptisch in der Lobula und präsynaptisch im optischen Glomerulus (Otsuna und Ito 2006). LC12-Zellen wurden sehr häufig markiert und kolokalisieren in der Lobula nur begrenzt mit den Schichten starker Rst-Färbung.

Der Glomerulus dagegen stellt ab dem Stadium P60 einen der durch Anti-Rst am deutlichsten markierten Bereiche des Gehirns dar.

Die Rst/Kirre-Immunreaktivität in der M3-Schicht der Medulla entspricht einer dünnen Linie, die exakt mit den Termini von L3-Zellen kolokalisiert (Abbildung 39F). Die postsynaptischen Arborisierungen von TM1- und TM2-Zellen füllen dagegen die gesamten Schichten M2 und M3 aus. Es liegt also nahe, daß die Färbung die präsynaptischen Termini von L3 markiert und nicht die postsynaptischen Dendriten von TM1/TM2.

In der Lamina ist die Rst/Kirre-Immunreaktivität in frühen Puppenstadien hoch und nimmt in P49 deutlich ab (Schneider *et al.* 1995). Die Photorezeptoren wachsen in frühen Puppenstadien aus, haben also in den hier betrachteten Stadien bereits ihr Ziel erreicht und beginnen, Synapsen zu bilden (Wolff und Ready 1993). Wenn Rst/Kirre eine Rolle in axonaler Terminierung spielen, werden sie also zum Zeitpunkt P49 in diesen Zellen nicht mehr benötigt und herunterreguliert.

L4-Zellen haben in der Lamina präsynaptische Spezialisierungen (Meinertzhagen und O'Neil 1991). Die L4-Kollateralen in der Lamina entsprechen dem Bereich der stärksten Kirre-Immunfärbung (Abbildung 39H, K). Die Rst-Färbung kolokalisiert jedoch nicht, sie markiert die Lamina nur basal (Abbildung 24D).

Ungewöhnlich erscheint, daß der untere Terminus von L4-Zellen mit keiner der stark Rst/Kirre-positiven Linien kolokalisiert (Abbildung 39I). Der obere Terminus in M2 dagegen entspricht der Schicht mit Rst/Kirre-Immunreaktivität. Es ist nicht sicher, aber wahrscheinlich, daß L4-Zellen in der Schicht M4 präsynaptisch sind. Da L4-Zellen in der Lamina laterale Inhibition vermitteln, könnten sie auch in M2 oder M4 inhibitorische Synapsen ausbilden. Es ist denkbar, daß Rst und Kirre nicht in allen Formen präsynaptischer Spezialisierungen akkumulieren.

Von Raghu *et al.* wurde zur Untersuchung von Tangentialzellen die MARCM-Methode mit Markern für prä- und postsynaptische Strukturen kombiniert (Raghu *et al.* 2007). Der präsynaptische Marker ist eine Fusion des Vesikelmembranproteins nSyb (neuronales Synaptobrevin) mit dem fluoreszierenden Protein mRed (monomeres DsRed). Der Marker für inhibitorische postsynaptische Strukturen wurde aus Rdl, einer Untereinheit eines Subtyps von GABA-Rezeptoren, und dem Protein HA fusioniert, das durch Anti-HA detektiert werden kann (Raghu *et al.* 2007).

Die von Shamprasad Varija Raghu verwendeten Fliegenstämme wurden uns

freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Linie mit dem postsynaptischen Marker trägt eine *UAS-rdl::HA*-Insertion homozygot auf dem zweiten Chromosom. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Fliegen analog zum Kreuzungsschema von Herpes (Abbildung 53) mit den Stämmen 2044FRT und 2273FRT gekreuzt und stehen jetzt zur Verfügung. Der postsynaptische Markerstamm trägt *UAS-nSyb::mRed* homozygot auf dem X-Chromosom. Daher konnte er nicht mit 2044FRT und 2273FRT gekreuzt werden. Shamprasad Varija Raghu hat uns jedoch den Originalvektor zur Verfügung gestellt, so daß mit diesem erneut Fliegen transformiert werden können. Insetiert das Konstrukt auf dem zweiten oder dritten Chromosom, kann auch *UAS-nSyb::mRed* in die NP-Linien eingekreuzt werden.

Mit Hilfe dieser neuen Stämme kann detailliert untersucht werden, welche Verzweigungen der Neurone des optischen Lobus prä- und welche postsynaptische Spezialisierungen enthalten. Außerdem erlauben sie es teilweise, inhibitorische von anregenden Synapsen zu unterscheiden. Auf diese Weise können die Termini der L4-Zellen analysiert werden. Möglich ist, daß der untere Terminus eine bestimmte Form inhibitorischer Synapsen ausbildet, in denen Rst und Kirre nicht akkumulieren.

5.9 Variabilität im Phänotyp von Herpes-Fliegen

Für die Etablierung des Stammes Herpes wurde die Linie NP2044 mit Fliegen gekreuzt, die die Insertion *UAS-hbs-ECD* tragen (Abbildung 53). Die Nachkommen der Kreuzung zeigen rauhe Augen und Defekte in adulten Gehirnen (Abbildungen 56-58). Diese Fehlbildungen ähneln den typischen Phänotypen bei der Fehlexpression oder Mutation von IRM-Genen (Abbildungen 6 und 7).

Die Penetranz des Phänotyps variiert deutlich. Die Augen verschiedener Fliegen sind in unterschiedlichem Maße rauh und nur ein Teil der betrachteten adulten Gehirne zeigte erkennbare Defekte.

Rst und Kirre verhalten sich in der Muskelfusion und der Augenentwicklung redundant (Strünkelberg *et al.* 2001; Alexander Hertenstein, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch in der Entwicklung der optischen Loben ist also eine Redundanz der IRM-Proteine wahrscheinlich. Diese Redundanz stellt eine attraktive Erklärung für die Variabilität des Phänotyps dar. Die Zelladhäsion ist durch die Fehlexpression der *hbs-ECD* in Rst-positiven Zellen nicht völlig gestört. Andere Proteine federn den Phänotyp ab und können in vielen Fällen

ausgleichend wirken.

Hinzu kommt, daß die *hbs*-ECD nicht global fehlexprimiert wurde, sondern nur in den Zellen mit *gal4^{NP2044}*-Expression. Dadurch können nicht-zellautonome Effekte die Konsequenzen der Fehlexpression abmildern. Außerdem liegt die Vermutung nahe, daß *gal4^{NP2044}* nicht in allen Zellen mit *rst*-Expression getrieben wird (siehe Abschnitt 5.5).

5.10 Interpretation der Gehirn-Phänotypen von Herpes-Fliegen

Der mutante Phänotyp im inneren Chiasma ist bei 1369-Gal4>*UAS-hbs*-Fehlexpression deutlich stärker als im Fall von NP2044-Gal4>*UAS-hbs-ECD* (Abbildungen 7E-F und 58B-C). 1369-Gal4 treibt die Expression ubiquitär im Gehirn und in allen Imaginalscheiben von L3-Larven. Durch diese massive Fehlexpression ist ein stärkerer Phänotyp zu erwarten als bei der Fehlexpression in nur einigen Neurontypen. Eine Interpretation der Unterschiede kann jedoch auch sein, daß die intrazelluläre Domäne für die Funktion von Hbs eine entscheidende Rolle spielt. Die ICD von Hbs könnte nach dem Kontakt eines Liganden mit der Hbs-ECD eine Signalkaskade starten. Deren Effekte könnten Zelladhäsion, axonale Wegfindung und axonale Terminierung beeinflussen. Fehlt die ICD, so wird die Signalkaskade nicht aktiviert und die Fehlexpression bleibt in der Zelle ohne Folgen. Die beobachteten vergleichsweise milden Effekte der Fehlexpression der ECD entstehen dann, weil Moleküle benachbarter Zellen an das fehlexprimierte Hbs binden können.

Rst und Hbs interagieren bei der Augenentwicklung (Bao und Cagan 2005). Dies könnte auch bei der Entwicklung des optischen Lobus der Fall sein. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Konstrukt ist die in Rst-positiven Zellen fehlexprimierte Hbs-ECD in der Zellmembran verankert. Die Folge könnte sein, daß die *rst*- und *hbs-ECD*-exprimierenden Zellen miteinander interagieren und z.B. faszikulieren.

Unter den in dieser Untersuchung gefärbten Gehirnen gab es nur eine sehr geringe Ausbeute an verwertbaren Präparaten. In den allermeisten Gehirnen war eine derart große Menge an Zellen gefärbt, daß der Verlauf ihrer Axone und die Position ihrer Arborisierungen nicht im Detail analysiert werden konnten.

Der Hitzeschock für die Herpes-Linie wurde unter denselben Bedingungen gegeben wie bei NP2044 und NP2273. Vermutlich durch eine besonders hohe Zahl an Larven in den Herpes-Fliegengläsern war die Entwicklung der Tiere

verzögert (siehe Kapitel 3.7.1). Bei NP2044 konnte keine Tendenz festgestellt werden, daß Hitzeschocks während früherer Stadien zur Markierung größerer Zellgruppen führen. Daher ist es möglich, daß das Verhältnis von extrem vielen Larven zu relativ wenig Futterbrei die Effizienz des Hitzeschocks im Vergleich zu NP2044 verstärkt hat.

Mutante Phänotypen wurden am ehesten in Zellen vermutet, deren Axone eines der optischen Chiasmen durchqueren. Dies prädestiniert Laminamonopolar-, Transmedulla- und T-Zellen als ideale Kandidaten für eine solche Analyse.

In den stark angefärbten Gehirnen erschienen die Axone im inneren Chiasma wildtypisch, soweit sich dies beurteilen ließ (Abbildung 60B-C). Auch im äußeren Chiasma war dies in der Regel der Fall (Abbildung 60A), in einem Gehirn sind jedoch die Axone von L-Zellen faszikuliert (Abbildung 62C).

Unter den drei Gehirnen, in denen nur kleine Gruppen an TM-Zellen gefärbt sind, wurden in zwei Gehirnen Auffälligkeiten beobachtet. Eindeutig ist dies für die Zellen in Abbildung 61. Die Axone zweier TM-Zellen faszikulieren im inneren optischen Chiasma und trennen sich nach dem Erreichen der Lobula. In der proximalen Medulla gibt es eine ektopische Querverbindung zwischen den Neuronen. Entsprechendes wurde bei der Analyse der Linien NP2044 und NP2273 nicht beobachtet. Der Phänotyp unterstützt die oben formulierte Hypothese, daß Neurone, bei denen sich Rst und Hbs in der Zellmembran befinden, miteinander interagieren. Als Folge projizieren Axone zu den Zellen benachbarter Säulen und faszikulieren oder bilden Querverbindungen mit ihnen aus.

Es ist weder überraschend, daß dieser Phänotyp keine vollständige Penetranz hat, noch daß er primär im Bereich des inneren Chiasmas auftritt. Auch der Phänotyp der Fehlexpression der kompletten *hbs*-cDNA beschränkt sich auf das innere Chiasma (Abbildung 7E-F).

Die korrekte Entwicklung des optischen Lobus von *D. melanogaster* wird durch die Redundanz von Zelladhäsionsmolekülen sichergestellt. Dadurch führt der Verlust oder die Fehlexpression eines einzelnen Moleküls in der Regel zu keinem Totalausfall der neuronalen Organisation. Die Rolle verschiedener Proteine bei der Terminierung von Retinulazellen in der korrekten Schicht der Medulla wurde in letzter Zeit mehrfach untersucht. In Alk-Mutanten projizieren 9 % der R8-Zellen in benachbarte Säulen, in Jelly Belly-Mutanten 6 %, in Capricious-Mutanten 23 % (Shinza-Kameda *et al.* 2006; Bazigou *et al.* 2007). Phänotypen, die zu denen aus der Herpes-MARCM-Analyse vergleichbar sind, traten in diesen

Studien also nur in einem geringen Prozentsatz der betrachteten Zellen auf.

Es stellt sich die Frage, welche Natur die ektopische Querverbindung zwischen den Neuronen hat. Die Bindung zwischen den beiden Zellen könnte durch Zelladhäsion stabilisiert werden, ohne daß eine weitere Interaktion stattfindet. Darüber hinaus könnte es aber auch zur Bildung von Synapsen oder gar zur Fusion der beiden Axone kommen. Bestätigt sich in Zukunft, daß bei den Querverbindungen immer beide Partner gefärbt sind, spricht dies für eine Fusion der Axone. Für eine reine Zelladhäsion würde die Fehlexpression der *hbs-ECD* in einem der beiden Neurone ausreichen. Sind trotzdem immer beide Zellen markiert, wird das mCD8-GFP vermutlich von einer Zelle auf die andere übertragen. Unterstützt wird die Möglichkeit einer Fusion der Axone durch die Tatsache, daß IRM-Proteine essentiell für die Muskelfusion sind. Kirre interagiert dort mit der extrazellulären Domäne von SNS, einem zu Hbs homologen Protein (Galletta *et al.* 2004).

Natürlich lassen sich aufgrund der begrenzten Zahl an deutlichen Phänotypen in dieser Arbeit nur vorsichtige Schlußfolgerungen ziehen. Dennoch bietet die eben genannte Hypothese zur Fusion von Axonen auch eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die ungewöhnlich hohe Zahl an in Herpes-Gehirnen markierten Zellen. Würde durch ektopische Querverbindungen zwischen Neuronen mCD8-GFP von einer Zelle auf die nächste übertragen, würde als Resultat eine deutlich höhere Zahl an gefärbten Zellen sichtbar werden. Hinweise auf ektopische Querverbindungen ergaben sich auch in den massiv gefärbten Gehirnen, diese waren jedoch durch die große Zahl überlappender Zellen nur schwer zu visualisieren.

Eine dritte Hypothese zur Erklärung der großen Menge an gefärbten Zellen bieten Befunde aus der Augenentwicklung. Hier interagiert Rst mit Hbs bei der präapoptotischen Sortierung von Interommatidialzellen. Wenn *rst* fehlexprimiert oder die Interaktion von Rst und Hbs verhindert wird, findet in diesen Zellen keine Apoptose statt (Reiter *et al.* 1996; Bao und Cagan 2005; Grzeschik und Knust 2005). Es gibt keine Hinweise auf eine Rolle von IRM-Proteinen bei der Regulierung der Apoptose im optischen Lobus. Dennoch sollte auch diese Erklärungsmöglichkeit bei zukünftigen Experimenten im Hinterkopf behalten werden.

Die Tatsache, daß sich die faszikulierten Axone der beiden Zellen nach dem Eintritt in die Lobula wieder trennen, spricht dafür, daß in den Neuropilen noch

weitere Faktoren die axonale Wegleitung steuern. Im inneren Chiasma können sich die Wachstumskegel der Axone freier bewegen als in den Neuropilen. Daher könnte es hier leichter zum Übertritt in eine benachbarte Säule kommen als in den Neuropilen. Interessant ist in diesem Kontext, daß in *rst*-Mutanten Neurone, deren Axone starke axonale Wegfindungsstörungen zeigen, dennoch in der richtigen Schicht der Neuropile terminieren (Boschert *et al.* 1990). Es gibt also weitere Faktoren, die die korrekte Terminierung Rst-positiver Zellen in den Neuropilen beeinflussen.

Um die hier präsentierten Ergebnisse aus der Herpes-MARCM-Analyse zu verifizieren und statistisch abzusichern, muß sie mit größeren Mengen an Gehirnen fortgeführt werden.

5.11 Zukünftige Experimente

Würde die ECD von Hbs segregiert werden, könnte diese leichter in derselben Zelle an Rst binden und dessen ECD absättigen. Dadurch würden die natürlichen Interaktionen von Rst mit den Membranproteinen von anderen Zellen erschwert und die Axone unter Umständen fehlgeleitet werden. Die extrazellulären Domänen von Hbs und SNS sind homolog zueinander. Ein Konstrukt für die Fehlexpression der segregierten Form der ECD von SNS wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits vorbereitet (siehe Kapitel 3.3). Dieses Projekt wird in Zukunft abgeschlossen werden. Dann können die Effekte der Fehlexpression der segregierten Form eines IRM-Proteins untersucht werden.

Um herauszufinden, ob Rst im optischen Lobus auch homophil interagiert, ist die Linie 2044FRT mit *UAS-rst* gekreuzt worden. Dieser Stamm wird nun für MARCM-Analysen eingesetzt werden. Sowohl von Hbs als auch von Rst existieren RNAi-Konstrukte, die die Mengen beider Proteine zu einem Teil reduzieren. Auch diese können in Zukunft für MARCM-Analysen genutzt werden.

Mit Hilfe der prä- und postsynaptischen Markerstämme kann die Lokalisierung von Rst und Kirre innerhalb der Neurone jetzt genauer untersucht werden.

Diese Versuche werden in Zukunft entscheidend dazu beitragen, die Funktion der IRM-Proteine in der Gehirnentwicklung aufzuklären. Durch diese Arbeit wurde der Grundstein gelegt, um effiziente MARCM-Experimente mit den Linien NP2044 und NP2273 zu ermöglichen. Hinweise auf die Lokalisierung von Rst und Kirre in den axonalen Terminalien und auf eine Interaktion von Rst und Hbs während der Entwicklung des optischen Lobus wurden präsentiert.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AEL	nach Eiablage (<i>after egg laying</i>)
Alk	Anaplastic lymphoma kinase
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
ca.	circa
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ddH ₂ O	Deionisiertes, destilliertes Wasser
DM	Distale Medulla
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Extrazelluläre Domäne (<i>extracellular domain</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FRT	Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase (<i>FLP recombinase recognition target</i>)
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde (<i>hora</i>)
Hbs	Hibris

Herpes	<i>Hibris Extracellular domain in Roughest Positive cells misExpression Strain</i>
ICD	Intrazelluläre Domäne (<i>intracellular domain</i>)
IOC	Interommatidialzelle (<i>interommatidial cell</i>)
Ig-Domäne	Immunglobulin-Domäne
IRM	Irre cell Recognition Module
IrreC	Irregular chiasmC
Kirre	Kin-of-Irre
L	Liter
L-Zellen	Laminamonopolarzellen
L1-Stadium	Larvenstadium L1
L2-Stadium	Larvenstadium L2
L3-Stadium	Larvenstadium L3
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (Nährmedium)
LC-Zellen	Lobulakolumnarzellen (<i>lobula columnar</i>)
LCCN-Zellen	Lobulakomplexkolumnarzellen (<i>lobula complex columnar</i>)
LI	lobulaintrinsisch
Lo	Lobula
LP	Lobulaplatte
M	molar
MARCM	Mosaikanalyse mit einem repressiblen Zellmarker (<i>Mosaic Analysis using a Repressible Cell Marker</i>)
MI	medullaintrinsisch
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
N	normal
o.g.	oben genannte
P	Puppenstadium

PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBT	Phosphatpuffer PBS mit Triton X-100
PFA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert
PM	Proximale Medulla
R-Zellen	Retinulazellen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
Rst	Roughest
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SNS	Sticks-and-Stones
STET	TRIS-NaCl-EDTA-Triton-X-100-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TLP-Zelle	Translobulaplattenzelle
TM	Transmembran(-Domäne)
TM-Zellen	Transmedullazellen
NP	NP Konsortium
U	Einheit (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Vereinfachtes Schema der Entwicklungsdauer von <i>D. melanogaster</i> bei 25 °C	Seite 6
Abbildung 2:	Querschnitte durch ein Ommatidium	Seite 7
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Neuropile des optischen Lobus	Seite 8
Abbildung 4:	Darstellung der fünf Laminamonopolarzelltypen	Seite 10
Abbildung 5:	Schema der extrazellulären Domänen von IRM-Proteinen	Seite 12
Abbildung 6:	Vergleich der AS-Identitäten zwischen Rst und Kirre und Abbildung eines rauhen Auges	Seite 15
Abbildung 7:	Mutanten und Fehlexpression verschiedener IRM-Proteine	Seite 16
Abbildung 8:	Die <i>gal4</i> -Insertionen NP2044 vor <i>rst</i> und NP2273 vor <i>kirre</i>	Seite 18
Abbildung 9:	Genotyp nach einer MARCM-Kreuzung	Seite 19
Abbildung 10:	Rekombination bei MARCM	Seite 20
Abbildung 11:	Mögliche Ergebnisse der Rekombination in verschiedenen Zelltypen	Seite 21
Abbildung 12:	Darstellung von PCR- und Ligationsprodukt für die Erstellung des Konstruktes <i>UAS-sns-ECD</i>	Seite 34
Abbildung 13:	Kreuzungsschema für die MARCM-Methode	Seite 39
Abbildung 14:	Veranschaulichung der Überlappung des Anti-Kirre-Signals mit dem Anti-mCD8-Signal	Seite 41
Abbildung 15:	Optische Merkmale bei der Altersbestimmung von Puppen	Seite 42

Abbildung 16:	Veranschaulichung der Nachbearbeitung der Projektionsansichten im Rahmen der MARCM-Analyse	Seite 43
Abbildung 17:	Immunfärbungen von Anti-Rst in den Stadien P60-P70	Seite 48
Abbildung 18:	Immunfärbungen von Anti-Kirre in den Stadien P60-P70	Seite 49
Abbildung 19:	GFP-Färbung des Expressionsmusters der Linie NP2044	Seite 51
Abbildung 20:	GFP-Färbung des Expressionsmusters der Linie NP2273	Seite 52
Abbildung 21:	Vergleich der Expressionsmuster in der Medulla	Seite 53
Abbildung 22:	Übersicht der durchgeführten Präparationen	Seite 54
Abbildung 23:	Retinulazellen in der Linie NP2044	Seite 56
Abbildung 24:	Laminamonopolarzellen in der Linie NP2044	Seite 57
Abbildung 25:	T1-Zellen in der Linie NP2044	Seite 58
Abbildung 26:	MI-Zellen in der Linie NP2044	Seite 59
Abbildung 27:	DM-Zellen in der Linie NP2044	Seite 60
Abbildung 28:	PM-Zellen in der Linie NP2044	Seite 61
Abbildung 29:	Transmedullazellen in der Linie NP2044	Seite 62
Abbildung 30:	T3- und T4-Zellen in der Linie NP2044	Seite 63
Abbildung 31:	Y-Zellen in der Linie NP2044	Seite 64
Abbildung 32:	TLP- und mögliche T5-Zellen in der Linie NP2044	Seite 66
Abbildung 33:	LC12-Zellen in der Linie NP2044	Seite 67
Abbildung 34:	LC14-Zellen in der Linie NP2044	Seite 67

Abbildung 35:	LI- und LPI-Zellen in der Linie NP2044	Seite 69
Abbildung 36:	Tangentialzellen in der Linie NP2044	Seite 69
Abbildung 37:	Gliazellen in der Linie NP2044	Seite 70
Abbildung 38:	Retinulazellen in der Linie NP2273	Seite 71
Abbildung 39:	Laminamonopolarzellen in der Linie NP2273	Seite 72
Abbildung 40:	T1-Zelle in der Linie NP2273	Seite 73
Abbildung 41:	MI1-Zellen in der Linie NP2273	Seite 74
Abbildung 42:	Unbekannte MI-Zelle in der Linie NP2273	Seite 74
Abbildung 43:	Transmedullazellen in der Linie NP2273	Seite 75
Abbildung 44:	T4-Zelle in der Linie NP2273	Seite 76
Abbildung 45:	Y-Zelle in der Linie NP2273	Seite 77
Abbildung 46:	LCCN1- und TLP-Zellen in der Linie NP2273	Seite 78
Abbildung 47:	LC12-Zellen in der Linie NP2273	Seite 79
Abbildung 48:	LI- und LPI-Zellen in der Linie NP2273	Seite 80
Abbildung 49:	Tangentialzelle in der Linie NP2273	Seite 80
Abbildung 50:	Gliazellen in der Linie NP2273	Seite 81
Abbildung 51:	Übersicht aller in der Linie NP2044 identifizierten Zelltypen	Seite 82
Abbildung 52:	Übersicht aller in der Linie NP2273 identifizierten Zelltypen	Seite 83
Abbildung 53:	Kreuzungsschema zur Etablierung des Stammes Herpes	Seite 85
Abbildung 54:	Kreuzung zur Kontrolle der Homozygotie von Herpes	Seite 86

Abbildung 55:	Augen-Phänotyp der Linie Herpes	Seite 87
Abbildung 56:	Mutante Phänotypen in adulten Gehirnen von Herpes Teil 1	Seite 88
Abbildung 57:	Mutante Phänotypen in adulten Gehirnen von Herpes Teil 2	Seite 88
Abbildung 58:	Mutante Phänotypen in adulten Gehirnen von Herpes Teil 3	Seite 88
Abbildung 59:	Mit MARCM markierte Zellen in der Linie Herpes	Seite 90
Abbildung 60:	MARCM-Klone der Linie Herpes in den optischen Chiasmen	Seite 91
Abbildung 61:	Mutante Phänotypen in MARCM-Klonen der Linie Herpes Teil 1	Seite 93
Abbildung 62:	Mutante Phänotypen in MARCM-Klonen der Linie Herpes Teil 2	Seite 94

6.3 Literaturverzeichnis

Artero, R.D., Castanon, I. und Baylies, M.K. (2001). The immunoglobulin-like protein *hibris* functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by *ras* and *notch* signaling.

Development **128**, 4251-4264.

Ashburner 1989a: Ashburner, M. (1989). *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Seiten 159, 175, 176, 190.

Ashburner 1989b: Ashburner, M. (1989). *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Seite 175.

Ashburner 1989c: Ashburner, M. (1989). *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Seite 190.

Ashburner 1989d: Ashburner, M. (1989). *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Abbildung 8.31.

Bainbridge, S.P. und Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **66**, 57-80.

Bao, S. und Cagan, R. (2005). Preferential adhesion mediated by *Hibris* and *Roughest* regulates morphogenesis and patterning in the *Drosophila* eye.

Dev Cell **8**, 925-935.

Bausenwein, B., Dittrich, A.P. und Fischbach, K.F. (1992). The optic lobe of *Drosophila melanogaster* II. Sorting of retinotopic pathways in the medulla.

Cell Tissue Res **267**, 17-28.

Bazigou, E., Apitz, H., Johansson, J., Lorén, C.E., Hirst, E.M.A., Chen, P. und Palmer, R.H. und Salecker, I. (2007). Anterograde Jelly belly and *Alk* receptor tyrosine kinase signaling mediates retinal axon targeting in *Drosophila*.

Cell **128**, 961-975.

- Bonengel, B.** (2002). *D. melanogaster* Roughest, Sticks and Stones and Hibris mediate membrane recognition during muscle and visual system development. Doktorarbeit Labor Fischbach.
- Boschert, U., Ramos, R.G., Tix, S., Technau, G.M. und Fischbach, K.F.** (1990). Genetic and developmental analysis of *irreC*, a genetic function required for optic chiasm formation in *Drosophila*. *J Neurogenet* **6**, 153-171.
- Bour, B.A., Chakravarti, M., West, J.M. und Abmayr, S.M.** (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* **14**, 1498-1511.
- Brand, A.H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Braun, R.** (2004). *Drosophila* *X11L β* , Klonierung und Expressionsstudien. Diplomarbeit Labor Fischbach.
- Donoviel, D.B., Freed, D.D., Vogel, H., Potter, D.G., Hawkins, E., Barrish, J.P., Mathur, B.N., Turner, C.A., Geske, R., Montgomery, C.A., Starbuck, M., Brandt, M., Gupta, A., Ramirez-Solis, R., Zambrowicz, B.P. und Powell D.R.** (2001). Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking Neph1, a novel protein with homology to Neph1. *Mol Cell Biol* **21**, 4829-4836.
- Dworak, H.A., Charles, M.A., Pellerano, L.B. und Sink, H.** (2001). Characterization of *Drosophila* *hibris*, a gene related to human *neph1*. *Development* **128**, 4265-4276.
- Fischbach, K.F. und Dittrich, A.P.M.** (1989). The optic lobe of *Drosophila melanogaster* I. Golgi analysis of wild type structure. *Cell and Tissue Research* **258**, 441-475.
- Galletta, B.J., Chakravarti, M., Banerjee, R. und Abmayr, S.M.** (2004). SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in s2 cells and embryonic myoblasts. *Mech Dev* **121**, 1455-1468.
- Gerke, P., Benzing, T., Höhne, M., Kispert, A., Frotscher, M., Walz, G. und Kretz, O.** (2006). Neuronal expression and interaction with the synaptic protein CASK suggest a role for Neph1 and Neph2 in synaptogenesis. *J Comp Neurol* **498**, 466-475.

- Grzeschik, N.A. und Knust, E.** (2005). IrreC/Rst-mediated cell sorting during *Drosophila* pupal eye development depends on proper localisation of DE-cadherin. *Development* **132**, 2035-2045.
- Heisenberg, M. und Böhl, K.** (1979). Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z. Naturforsch* **34c**, 134-147.
- Küffner, M.** 2006. Etablierung einer Methode, um einzelne Neuronen, die die Gene *irreC-rst* oder *kirre* exprimieren, genetisch zu verändern. Diplomarbeit Labor Fischbach.
- Lee, T. und Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461.
- Lee, T. und Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-254.
- Liu, G., Kaw, B., Kurfis, J., Rahmanuddin, S., Kanwar, Y.S. und Chugh, S.S.** (2003). Neph1 and Neph1rin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* **112**, 209-221.
- Martin-Bermudo, M.D., Alvarez-Garcia, I. und Brown, N.H.** (1999). Migration of the *Drosophila* primordial midgut cells requires coordination of diverse PS integrin functions. *Development* **126**, 5161-5169.
- Meinertzhagen, I.A. und Hanson, T.E.** (1993). The development of the optic lobe. In: The development of *Drosophila melanogaster*. Bate, M. und Martinez-Arias, A.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1363-1491.
- Meinertzhagen, I.A. und O'Neil, S.D.** (1991). Synaptic organization of columnar elements in the lamina of the wild type in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **305**, 232-263.
- Menon, S.D., Osman, Z., Chenchill, K. und Chia, W.** (2005). A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. *J Cell Biol* **169**, 909-920.
- Murase, S. und Schuman, E.M.** (1999). The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 549-553.

- Nie, Z.** 1995. Targeted misexpression of neural cell adhesion molecules in *Drosophila*: Evidence for a specific role of IrreC-Rst in axonal pathfinding. Doktorarbeit Labor Fischbach.
- Otsuna, H. und Ito, K.** (2006). Systematic analysis of the visual projection neurons of *Drosophila melanogaster* I. Lobula-specific pathways. *J Comp Neurol* **497**, 928-958.
- Raghu, S.V., Joesch, M., Borst, A. und Reiff, D.F.** (2007). Synaptic organization of lobula plate tangential cells in *Drosophila*: gamma-aminobutyric acid receptors and chemical release sites. *J Comp Neurol* **502**, 598-610.
- Rajashekhar, K.P. und Shamprasad, V.R.** (2004). Golgi analysis of tangential neurons in the lobula plate of *Drosophila melanogaster*. *J Biosci* **29**, 93-104.
- Ramos, R.G., Igloi, G.L., Lichte, B., Baumann, U., Maier, D., Schneider, T., Brandstätter, J.H., Fröhlich, A. und Fischbach, K.F.** (1993). The irregular chiasm C-roughest locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Genes Dev* **7**, 2533-2547.
- Reddy, V.G., Reiter, C., Shanbhag, S., Fischbach, K.F. und Rodrigues, V.** (1999). Irregular chiasm-C-roughest, a member of the immunoglobulin superfamily, affects sense organ spacing on the *Drosophila* antenna by influencing the positioning of founder cells on the disc ectoderm. *Dev Genes Evol* **209**, 581-591.
- Reiter, C.** 1995. In vivo Funktionsanalyse eines Zellerkennungsmoleküls im visuellen System von *D. melanogaster*: Gezielte Fehlexpression des IrreC-Rst-Proteins. Diplomarbeit Labor Fischbach.
- Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z. und Fischbach, K.F.** (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: The role of the IrreC-Rst protein. *Development* **122**, 1931-1940.
- Schneider, T., Reiter, C., Eule, E., Bader, B., Lichte, B., Nie, Z., Schimansky, T. and Ramos, R G & Fischbach, K F.** (1995). Restricted expression of the IrreC-Rst protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons. *Neuron* **15**, 259-71.

Shen, K. und Bargmann, C.I. (2003). The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*.

Cell **112**, 619-630.

Shen, K., Fetter, R.D. und Bargmann, C.I. (2004). Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1.

Cell **116**, 869-881.

Strünkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L.M., Hertenstein, A., de Couet, H.G., Ramos, R.G. und Fischbach, K.F. (2001). Rst and its paralogue Kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*.

Development **128**, 4229-4239.

Strünkelnberg, M., de Couet, HG., Hertenstein, A. und Fischbach, K.F. (2003). Interspecies comparison of a gene pair with partially redundant function: The *rst* and *kirre* genes in *D. virilis* and *D. melanogaster*. *J Mol Evol* **56**, 187-197.

Walsh, F.S. und Doherty, P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance.

Annu Rev Cell Dev Biol **13**, 425-456.

WebLink1: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/biol3530/db_ch02/fig2_29.jpg

WebLink2:

http://www.neosci.com/demos/10-1201_ap%20lab%207/presentation%20images/tutorials/3.01.jpg

Wolff, T. und Ready, D.F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. In: The development of *Drosophila melanogaster*. Bate, M. und Martinez-Arias, A.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1227-1326.

6.4 Danksagung

Mein größter Dank gilt Karl-Friedrich Fischbach – für die Möglichkeiten, die er mir geboten hat und vor allem für die Begeisterung, die er für mein Thema ausgestrahlt hat. Diese Arbeit basiert vollständig auf seiner beeindruckenden Golgi-Analyse der Neurone des optischen Lobus.

Alex *Zerlot* Hertenstein danke ich für die Betreuung, viele wertvolle Tips und Interpretationshilfen und besonders für die Korrektur meiner ausufernden Arbeit.

Rode *Bakoona* Braun danke ich in erster Linie für seine Hilfe in der Molekularbiologie und den guten Zuspruch bei Rückschlägen. Aber auch die unzähligen Diskussionen über jedes denkbare Thema und die gemeinsamen Wikipedia-Konsultationen waren eine Bereicherung meiner Zeit im Labor. :)

Kokil Chaudhary danke ich jetzt endlich für all die Dinge, die sie mich von ihr klauen ließ. Durch ihre Gesellschaft wurde aber auch so manch anstrengender Präparationsmarathon viel erträglicher.

Bei Margit Böhler und Weronika Brinkmann möchte ich mich für die Hilfe im Hintergrund bedanken, besonders Margit für die vielen gesammelten Jungfrauen.

Lily Finkbeiner war in allen Phasen meiner Diplomarbeit eine große Unterstützung. Von ihr kamen Einblicke in die wunderbare Welt der Würmer, Bakterien, Enzyme und vor allem viele hilfreiche stilistische Verbesserungen des Textes. Ohne sie bestünde diese Diplomarbeit aus fünf langen, durch unzählige Kommas unterteilten Sätzen. Und ja, Verdana ist die schönste Schriftart.

Thessy Kremer und Jing Shi danke ich für Unterstützung, Aufmunterung und Nudelsalat in der Anfangsphase.

Moritz *Maurice* Heß und Gerit *Wing* Linneweber waren eine hervorragende Gesellschaft während vieler produktiver und unterhaltsamer Abende im Labor mit YouTube, Linerider und Slayermusik.

Auch Venera Gashaj stand mir so manches Mal mit Materialien und Tips zur Seite.

Lily Finkbeiner, Anna Nölle und Susanne Reichinnek waren mir monatelang eine erstklassige Gesellschaft in den Mittags- und Kaffeepausen. Ihnen und allen meinen weiteren Freunden danke ich für die schönen Zeiten außerhalb des Labors und den Auftrieb durch mehrere Kurzurlaube.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

Nivona CafeRomatica hat diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht.

Zum Abschluß ein Versuch zu Fliegen

In 'nem Labor in Freiburgs Norden
gibt es große Fliegenhorden,
die leben dort ganz ohne Mühe
in einer gelben Hefebrühe.

An Tieren gibt es jede Menge,
in manchem Glas in großer Enge.
Die einen sind recht dick und rund,
die andern eher ungesund.

All die Fliegen auf den Tischen
kann man zum Kreuzen hübsch vermischen.
Das tut der Forscher mit Bedacht,
damit er keinen Fehler macht.

Sehn die Augen aus wie Nieren,
ist FM Sieben in den Tieren.
Drehn sich die Flügel komisch rauf,
steht auf dem Glas wohl CyO drauf.

Das läuft meist schön geordnet ab,
macht manche Fliege auch mal schlapp.
Doch kann das wirklich alles sein?
Kehrt da nicht Langeweile ein?

Am schönsten ist es – sonnenklar
(und für die Fliege wunderbar)
wenn eine es aus eigener Kraft
mal aus dem Glas nach draußen schafft.

Ist sie nicht allzu sehr mutiert,
mit Borsten ordentlich verziert,
ist sie kaum rau und auch nicht blind,
hat Flügel, die geglättet sind,

wird ihr nicht unerwartet flau
grad über einem Sonnentau,
schafft sie es mit nem bißchen Glück
auch von der letzten Milbe weg,

so findet sie an einem Fleck,
wohl neben etwas Hefedreck,
vielleicht noch eine andre Fliege
und reckt erfreut den Fuß zum Siege!

Dann machen sie, ganz ungestört,
selbst wenn sich das nicht ganz gehört,
auch trotz S1 und CO₂
ein enges Fliegen-Zweierlei.

Obwohl ich's anders besser fände
ist dieses Glück wohl schnell zu Ende
Die eine sagt zur andern trocken:
„Ciao Babe!“ und macht sich auf die Socken.

Drum check die Gläser doch geschwind,
ob alle fest verschlossen sind.
Treib mit den Fliegen keinen Scherz,
sonst brichst du einer noch das Herz...

