

**Lokalisation und Verteilung von Synapsen
auf identifizierten Zellen
im Zentralen Nervensystem
von *Drosophila melanogaster***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Robert Löhr
geb. in Mainz, 10.05.1967
Mainz, 2002

Jahr der Prüfung: 2003

	<u>Seite</u>
1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	9
2.1 Die Bedeutung des Zentralen Nervensystems und von Synapsen	9
2.2 Vorzüge des Modellsystems <i>Drosophila melanogaster</i>	11
2.3 Synaptogenese in <i>Drosophila</i>	14
2.4 Ziel der Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
<u>3.1.1 Antikörper</u>	18
<u>3.1.2 Fliegenstämme</u>	19
<u>3.1.3 Chemikalien und Lösungen</u>	20
<u>3.1.4 Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien</u>	22
<u>3.1.5 Dokumentation und Bildbearbeitung</u>	23
3.2 Methoden	24
<u>3.2.1. Fliegenhaltung</u>	24
<u>3.2.2 Balancieren von Mutationen</u>	25
<u>3.2.3 Sammeln von jungfräulichen Fliegen</u>	25
<u>3.2.4 Kreuzung und Rekombination von für Transplantationen benötigten <i>Drosophila</i>-Stämmen</u>	25
3.2.4.1 Spender für Transplantation wildtypischer Zellen	25
3.2.4.2 Spender für Transplantation <i>kak</i> -mutanter Zellen	26
<u>3.2.5 Transplantation</u>	29
3.2.5.1 Eiablagen	31
3.2.5.2 Vorbereitung der Embryonen	31
3.2.5.3 Transplantation der Zellen	34
3.2.5.4 Weiterbehandlung der Embryonen	35

<u>3.2.6 UAS/Gal4-System</u>	35
3.2.6.1 Präparation von UAS/Gal4-Larven	36
<u>3.2.7 Antikörperfärbung</u>	37
3.2.7.1 Blocken	39
3.2.7.2 Inkubation der primären Antikörper	40
3.2.7.3 Inkubation der sekundären Antikörper	40
3.2.7.4 Nachweisreaktionen	40
<u>3.2.8 Einbetten der Präparate</u>	41
<u>3.2.9 Dokumentation</u>	42
<u>3.2.10 Quantitative Analyse</u>	42
4 Ergebnisse	44
4.1 Strukturierter Aufbau des Nervensystems von <i>Drosophila melanogaster</i>	43
4.2 Expression synaptischer und neuritischer Marker mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems	46
<u>4.2.1 Gal4-Linien</u>	46
<u>4.2.2 Verwendete UAS-Konstrukte</u>	49
<u>4.2.3 UAS-Konstrukte synaptischer Proteine liegen in neuronalen Zellen in ektopischer Verteilung vor</u>	456
<u>4.2.4 Lokalisation neuritischer Marker in <i>Drosophila</i> Neuronen</u>	60
4.2.4.1 HOMER ist nicht spezifisch für postsynaptische Neuriten	60
4.2.4.2 Ektopisch exprimiertes TAU lokalisiert in potentiell präsynaptischen Neuriten führt aber auch zu aberrantem Wachstum	65
4.3 Transplantationsexperimente	68
<u>4.3.1 Experimentelle Grundlagen</u>	71
4.3.1.1 Verwendung eines geeigneten Gal4-Treibers in den Spender-Embryonen	71
4.3.1.2 Wahl eines geeigneten präsynaptischen Markers	74
<u>4.3.2 Neurale Transplantations-Klone wildtypischer Zellen</u>	75
4.3.2.1 Die Verteilung präsynaptischer Regionen in neuronalen Zellstammbäumen ist reproduzierbar	77

4.3.2.2 Output-Synapsen in Zellstammbäumen des ZNS sind auf spezifische Regionen des Neuropils beschränkt	81
<u>4.3.2.2.1 Zellstammbäume mit dorso-ventraler Beschränkung der Output-Synapsen</u>	81
<u>4.3.2.2.2 Zellstammbäume mit ipsilateral-kontralateraler Beschränkung der Output-Synapsen</u>	85
<u>4.3.2.2.3 Zellstammbäume mit antero-posteriorer Beschränkung der Output-Synapsen</u>	85
<u>4.3.2.2.4 Zellstammbäume mit medio-lateraler Beschränkung der Output-Synapsen</u>	85
4.3.2.3 Output-Synapsen sind reproduzierbar auf neuritische Kompartimente beschränkt	89
4.3.2.4 Die Seitenneuriten vieler Motorneurone sind frei von Output-Synapsen	90
<u>4.3.3 Neuronale Transplantationsklone <i>kakapo</i>-mutanter Zellen</u>	94
<u>4.3.4 Identifikation der neuralen Zellstammbäume</u>	98
4.3.4.1 VUM	101
4.3.4.2 MNB	103
4.3.4.3 MP1	106
4.3.4.4 NB1-1	106
4.3.4.5 NB2-1	109
4.3.4.6 NB2-2	112
4.3.4.7 NB2-4	116
4.3.4.8 NB3-1	116
4.3.4.9 NB3-2	122
4.3.4.10 NB3-3	126
4.3.4.11 NB4-1	128
4.3.4.12 NB4-2	129
4.3.4.13 NB5-1	131
4.3.4.14 NB5-2	135
4.3.4.15 NB5-3	140
4.3.4.16 NB6-1	142
4.3.4.17 NB6-2	145
4.3.4.18 NB7-1	149

4.3.4.19 NB7-2	151
4.3.4.20 NB7-4	152
5 Diskussion	156
5.1 In <i>Drosophila</i> sind Output-Synapsen auf Neuriten von zentralnervösen Neuronen kompartmentiert.	156
5.2 Seitenäste efferenter Neuronen im <i>Drosophila</i> Bauchmark sind homolog oder analog zu Dendriten von Vertebraten	159
5.3 Vor- und Nachteile der verwendeten Markierungs-Strategien	162
5.4 Welche Mechanismen könnten die Kompartimentierung bewirken?	167
5.5 Zukunftsperspektiven	168
6 Referenzen	171
Anhänge	
I. Häufig verwendete Abkürzungen	179
II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	180

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, Synapsen im Zentralen Nervensystem (ZNS) von *Drosophila melanogaster* zu lokalisieren und wiedererkennbar darzustellen. Dabei sollten eventuell vorhandene, grundlegende Gesetzmäßigkeiten der Verteilung von zentralnervösen Synapsen aufgedeckt und näher charakterisiert werden.

Um dies zu erreichen, wurden zwei verschiedene methodische Ansätze getestet, die beide auf dem Prinzip der Mosaik-Analyse beruhen. Der erste Ansatz beinhaltete die künstliche Expression von molekular markierten synapsenspezifischen Proteinen. Diese Expression erfolgte in bekannten, reproduzierbaren Neuronen mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems. Wir beobachteten reproduzierbare Muster, in denen diese Proteine auf neuritischen Fortsätzen lokalisieren und, die vermutlich Synapsen repräsentieren.

Als zweite Methode der Mosaikanalyse wurde eine zuvor etablierte Technik zur Transplantation neuraler Vorläuferzellen verwendet. Bei dieser Methode werden genetisch markierte Einzelzellen aus dem Neuroektoderm wildtypischer Embryonen ins Neuroektoderm von Empfängerembryonen transplantiert. Bei gelungener Transplantation bringen die transplantierten Zellen im Wirtstier neurale Zellstammbäume hervor, deren reproduzierbare zelluläre Elemente für das ventrale Bauchmark bereits detailliert beschrieben worden sind. Modifikationen im Bezug auf den Genotyp von Spender- und Empfängerembryo erlaubten uns, intrinsische synaptische Proteine auf den Fortsätzen individuell identifizierbarer Neuronen darzustellen. Diese Technik zeigt, dass die Lokalisation und Verteilung intrinsischer, synapsenspezifischer Proteine (und damit auch die von Synapsen) reproduzierbar ist.

Unsere Versuche zeigen, dass die beiden verwendeten Strategien ihre spezifischen Nachteile und Vorteile haben, aber in jedem Fall nützlich sind, um Synapsen im Bauchmark gezielt darzustellen. Die präsentierten Ergebnisse legen nahe, dass die Neuriten der ZNS-Neurone mindestens drei unterschiedliche Kompartimente aufweisen:

- 1) Primäre, häufig transversal verlaufende Neurite, ohne Output-Synapsen
- 2) Seitenneurite von vermutlich rein postsynaptischer Natur
- 3) Seitenneurite, die präsynaptisch spezialisierte Regionen aufweisen.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die im ZNS verbleibenden Seitenneurite vieler Motorneurone zur Gruppe der vermutlich rein postsynaptischen Neuriten gehören. Diese Vermutung wird gestützt durch die Gal4-getriebene Expression von Proteinen wie TAU und HOMER, die spezifisch in prä- beziehungsweise postsynaptischen Neuriten lokalisieren. Diese Beobachtungen veranlassen uns zu der Hypothese, dass motorneuronale Seitenneuriten in *Drosophila* homolog oder analog zu Dendriten bei Vertebraten-Neuronen sein könnten.

Zusätzlich haben wir Analysen zentralnervöser Synapsen von Embryonen durchgeführt, die Mutationen im *kakapo*-Gen tragen. *kakapo*-Mutationen führen an der Neuromuskulären Verbindung zu einer Reduktion synaptischer Kontakte. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei unseren Transplantationsexperimenten mit *kakapo*-mutanten Spenderzellen im ZNS kein vergleichbarer Phänotyp. Sowohl die Anzahl als auch die Verteilung von Synapsen in *kakapo*-mutanten Zellklonen stimmten mit der in wildtypischen Zellklonen überein. Dies legt nahe, dass zwischen der Entwicklung von Synapsen an der Neuromuskulären Verbindung und im ZNS klare Unterschiede bestehen. Des Weiteren demonstrieren diese Versuche mit *kakapo* das Potential dieser Technik für weiterführende Versuche, insbesondere der Mutantenanalyse.

2 Einleitung

2.1 Die Bedeutung des Zentralen Nervensystems und von Synapsen

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist das komplexeste Organ in der Tierwelt. Es erfüllt vielfältige Aufgaben, wie die Ausübung motorischer Kontrolle und die Integration und Verarbeitung von Sinneswahrnehmungen. Auch komplexe Prozesse wie Verhalten, Lernen und Erinnerung werden vom ZNS ermöglicht. Um diese Aufgaben zu bewältigen bestehen Nervensysteme aus einem Netzwerk von Zellen, Glia und Neuronen, die miteinander kommunizieren. Dabei wirken diese Zellen regulierend aufeinander ein. Von Glia-Zellen ist erst seit wenigen Jahren bekannt, dass auch sie an der Vermittlung und Verarbeitung von Prozessen innerhalb des Nervensystems beteiligt sind (zusammengefasst in Araque et al., 1999). Der Hauptanteil dieser Vorgänge geschieht jedoch in und zwischen Neuronen. Deshalb stehen diese Zellen seit Jahrzehnten im Mittelpunkt neurologischer Forschung.

Um Signale empfangen und weiterleiten zu können, bilden Neurone im Laufe ihrer Entwicklung hochspezifische synaptische Verbindungen mit ihren Zielzellen aus. Diese Zielzellen sind wiederum Neurone, Drüsen- oder Muskelzellen. Das elektrische Signal, das weitergegeben werden soll, wird an der Synapse meist in ein chemisches umgewandelt und dann in der Zielzelle wieder zurück in ein elektrisches. Bei diesem Vorgang wird das Signal aber nicht nur weitergegeben, sondern oft moduliert oder gefiltert. Diese Signal-verändernden Eigenschaften chemischer Synapsen sind eine wesentliche Voraussetzung für die Funktion des Nervensystems und liegen essentiellen Eigenschaften wie dem Erinnerungsvermögen oder der Fähigkeit zu lernen zugrunde. Das Studium von Synapsen und ihrer Entwicklung ist deshalb von fundamentaler Bedeutung für unser Verständnis des Nervensystems.

Bei der Entwicklung von Synapsen müssen drei grundlegende Kriterien neuronaler Verschaltung präzise reguliert werden:

1. Die richtigen Partnerzellen müssen miteinander in Kontakt treten. Dies beinhaltet die axonale Wegfindung und das Erkennen und Kontaktieren der Zielzelle.
2. Auf beiden Seiten der Synapse (post- und präsynaptisch) muss gewährleistet sein, dass Kommunikation erfolgen kann. So muss zum Beispiel einer

präsynaptischen Endigung (Output-Synapse), an der ein bestimmter Neurotransmitter ausgeschüttet wird, auch eine Postsynapse (Input-Synapse) gegenüberliegen, die mit Rezeptoren für diesen spezifischen Neurotransmitter bestückt ist.

3. Die Stärke der Synapsen muss reguliert werden, d.h. wenn eine Zelle gleichzeitig exzitatorische und inhibitorische Signale empfängt, muss sie diese gemeinsam auswerten. Das Verhältnis zwischen den Amplituden des exzitatorischen und des inhibitorischen Signals entscheidet darüber, ob eine Weiterleitung des empfangenen exzitatorischen Signals erfolgt oder nicht.

Um die Entwicklung und Funktion des Nervensystems zu verstehen ist es unabdingbar, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die diesen Eigenschaften zugrunde liegen. Dazu ist es erstens nötig die strukturellen und molekularen Komponenten zu identifizieren, die an der sich entwickelnden Synapse benötigt werden. Zweitens müssen die Signalisierungsmechanismen aufgeklärt werden, die zur Bildung einer Synapse führen. Drittens ist es nötig die genregulatorischen Vorgänge zu verstehen, die dafür sorgen, dass die benötigten molekularen Komponenten zur Verfügung stehen. Voraussetzung für solche Studien ist es jedoch, Modellsysteme zu etablieren, in denen Struktur und Funktion von Synapsen in Kombination mit experimentellen und genetischen Manipulationen analysiert werden können.

Bedeutende Modellsynapsen bei Vertebraten, die in den letzten Jahren erfolgreich etabliert und für Studien genutzt wurden, sind die Neuromuskuläre Verbindung (NMJ vom Englischen: **neuromuscular junction**; zusammengefasst u.a. in Lee und Sheng, 2000; Sanes und Lichtmann, 1999), glutamaterge Synapsen im ZNS (zusammengefasst u.a. in Garner et al., 2002; Lee und Sheng, 2000) und sogenannte Ribbon-Synapsen in der Retina (siehe z.Bsp. Allwardt et al., 2001; Ruether et al., 2000; Schmitz et al., 1996; Schmitz et al., 2000). Aber auch bei Invertebraten wurden sehr effiziente Modellsynapsen erarbeitet, so etwa die NMJ beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (zusammengefasst u.a. in Keshishian et al., 1996; Prokop, 1999; Riddle et al., 1997).

2.2 Vorzüge des Modellsystems *Drosophila melanogaster*

Die Komplexität von Vertebratengehirnen erschwert experimentelle Ansätze. So wurden die meisten Informationen zu glutamatergen ZNS-Synapsen *in vitro*, also in Zellkultur-Experimenten gewonnen. Die auf Grund ihrer exponierten Lage leichter zugänglichen Ribbon-Synapsen unterscheiden sich in zahlreichen Punkten von konventionellen Synapsen (zusammengefasst in von Gersdorff, 2001). Auch die Untersuchung von Mutationen und ihren Auswirkungen gestaltet sich in Vertebraten häufig als langwieriger und mühseliger Prozess. In der Vergangenheit hat sich immer wieder gezeigt, dass zusätzlich zu Vertebraten- auch geeignete Invertebraten-Modellsysteme sinnvoll und nützlich sind. Die unterschiedlichen Ansätze können sich gegenseitig ergänzen. Ein Paradebeispiel für die erfolgreiche Kombination von Vertebraten- und Invertebraten-Modellen zeigt sich bei der axonalen Wegfindung. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Moleküle beschrieben, die regulierend auf das axonale Wachstum und die axonale Wegfindung Einfluss haben. Dies ist hauptsächlich das Ergebnis zweier experimenteller Ansätze: In Vertebraten-Gewebe wurden Proteine biochemisch aufgereinigt die Zell-Adhäsion und axonales Wachstum fördern und in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* führte man genetische Screens durch, bei denen Mutationen identifiziert und charakterisiert wurden die sich auf axonale Projektionsmuster auswirken (zusammengefasst in Albright et al., 2000; Chisholm und Tessier-Lavigne, 1999; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

Modellsynapsen und die Modellorganismen, in denen sie vorkommen, sollen möglichst vielen methodischen Ansätzen - morphologischen, genetischen, molekularen, elektrophysiologischen, etc. - zugänglich sein. Dank einer Vielzahl etablierter und standardisierter molekularbiologischer, manipulativ-experimenteller und analytischer Techniken bietet sich *Drosophila* für all diese Ansätze an (siehe u.a. Ashburner, 1989; Goldstein und Fyrberg, 1994).

Zu den Vorteilen von *Drosophila* gehören die einfachen Zuchtbedingungen, die schnelle Embryonalentwicklung und die rasche Generationenfolge sowie die klassischen genetischen Möglichkeiten. Durch einfaches Verkreuzen und genetische Rekombination ist es möglich, Nachkommen mit Kombinationen von Mutationen und/oder Transformationen relativ leicht zu erzeugen und Fliegenstämme zu

etablieren, in denen diese genetische Kombination auch in folgenden Generationen stabil erhalten bleibt (zusammengefasst in Greenspan, 1997).

Von besonderem Interesse ist *Drosophila* auch wegen der großen Anzahl an bekannten Mutationen, Markerstämmen und transformanten Fliegenstämmen (siehe u.a. Lindsley und Zimm, 1992). Sie sind meist über sogenannte Stock-Centers einfach und schnell zu beziehen und schon ausführlich in allgemein zugänglichen Internet-Datenbanken beschrieben:

Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu/>

The Interactive Fly: <http://sdb.bio.purdue.edu/fly/aimain/1aahome.htm>

Auf Grund all dieser Vorzüge eignet sich *Drosophila* für verschiedenste Fragestellungen in der biologischen Forschung. Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass sich die technisch-methodischen Vorteile verbinden lassen mit einem relativ simplen Nervensystem mit individuell identifizierbaren Neuronen.

Abb. 2.1 Neurogenese bei *Drosophila*

A: Schematische Darstellung der Anlagenkarte eines *Drosophila*-Embryos bei beginnender Gastrulation (Stadium 6; Embryonalstadien nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997)(; verändert nach Technau und Campos-Ortega, 1985). Links: Laterale Ansicht, anterior links, dorsal oben. Rechts: Querschnitt, dorsal oben. MES: Mesektoderm, DE: Dorsales Ektoderm. T1: erstes thorakales Segment. A1: erstes abdominales Segment.

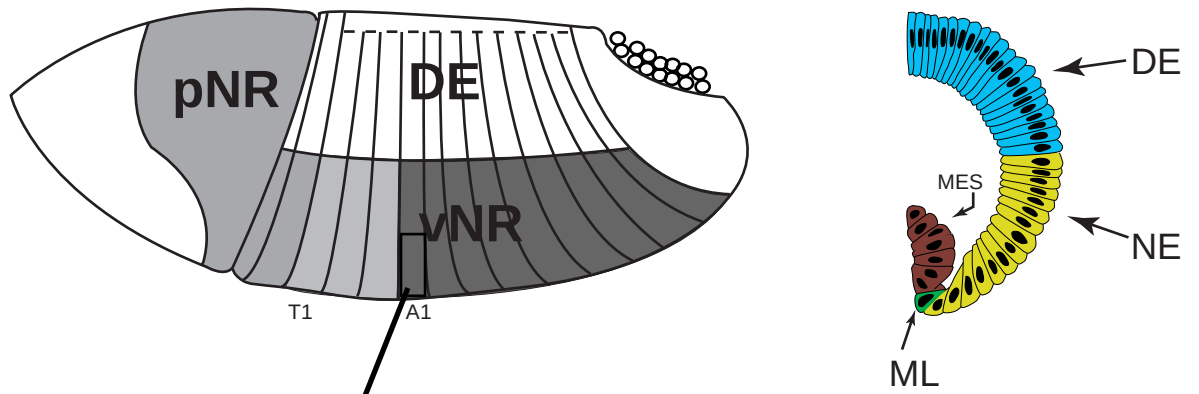
Das ZNS von *Drosophila* geht aus dem Bereich hervor, der als neurogene Region bezeichnet wird und sich aus der Mittellinie (ML) und dem Neuroektoderm (NE) zusammensetzt (Technau, 1987; Technau und Campos-Ortega, 1985). Das Gehirn geht aus Zellen der procephalen neurogenen Region (pNR) hervor, das Bauchmark aus Zellen der ventralen neurogenen Region (vNR).

B: Neuroblastenkarte im Stadium 11 (verändert nach Schmidt et al., 1997). Dorsale Aufsicht, anterior links, lateral oben. Nach der Beschränkung neurogener Fähigkeiten auf die vNR, die unter dem Einfluss dorso-ventraler Kontrollfaktoren erfolgt (zusammengefasst in Bier, 1997), führt der nächste Schritt in Richtung Neurogenese zur Auswahl von etwa 30 Zellen pro Hemisegment, die als NBs aus der vNR ins Innere des Embryos segregieren, während ihre Nachbarzellen in der Peripherie verbleiben und einen epidermalen Schicksalsweg einschlagen. Die Identifizierbarkeit der NBs anhand ihres Segregationszeitpunktes, ihrer Position und bestimmter genetischer Marker ermöglichte die Erstellung einer Neuroblastenkarte für *Drosophila* (Broadus et al., 1995; Doe, 1992) in Analogie zur Nomenklatur der NBs der Heuschrecke *Schistocerca* (Bate, 1976; Doe und Goodman, 1985). Die Mittellinienvorläufer sind nicht dargestellt, weil sie von ihrer Position her nicht eindeutig sind.

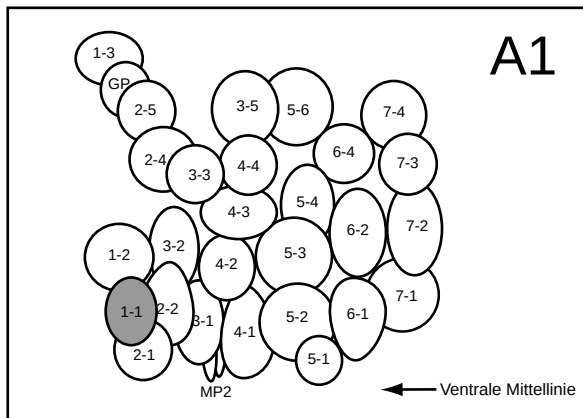
C: Exemplarische Darstellung des Zellstammbaums von NB1-1. In der Regel teilen sich NBs nach ihrer Determinierung im Stammzellmodus, dabei wird eine Kette kleinerer Gangliennutterzellen gebildet, die sich genau einmal teilen. Die Teilungsprodukte differenzieren sich dann zu Neuronen und/oder Glia-Zellen (Udolph et al., 1998). Nach diesem Modus werden in jedem Hemisegment etwa 350 Neurone und 30 Gliazellen generiert.

Abb. 2.1

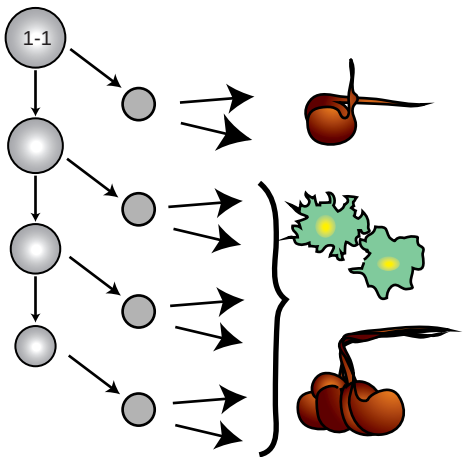
A



B



C



Der metamere und spiegelsymmetrische Aufbau des Bauchmarks aus wiederkehrenden Untereinheiten, den sogenannten Hemineuromeren und die überschaubare Anzahl von neuronalen Vorläuferzellen, sogenannten Neuroblasten (NBs; Wheeler, 1891), aus denen es hervorgeht, ermöglicht eine im Vergleich zu Vertebraten relativ leichte Erforschung der hochkomplexen Mechanismen, die für die Bildung des Bauchmarks notwendig sind. Die hieraus gewonnenen Daten bieten einen Einblick in die Entwicklung neuraler Strukturen und in grundlegende Entwicklungsvorgänge, die zur unterschiedlichen Determination und Differenzierung von Zellen und Zellgruppen gleicher Herkunft führen (siehe Abb. 2.1; zusammengefasst in Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Dies ist inzwischen so weit gediehen, dass die größtenteils invarianten Zellstammbäume der NBs im Bauchmark beschrieben sind (Bossing und Technau, 1994; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997) und die meisten Zellen oder Zellgruppen auf Grund ihrer Projektionsmuster und anderer Daten individuell identifiziert werden können. Ebenso detailliert sind Beschreibungen über einzelne Motorneurone, ihr exaktes Projektionsmuster und ihre Zielzellen in der Peripherie (Landgraf et al., 1997) sowie über die Projektionsmuster sensorischer Neurone ins ZNS (Schrader und Merritt, 2000). Folglich können im spätembryonalen Bauchmark identifizierbare Neurone ihrem Zell-Stammbaum und damit ihrer ursprünglichen Herkunft zugeordnet werden. Es sollte also möglich sein mit klonaler Analyse von neuronalen Zellstammbäumen frühe Determinationsvorgänge und spätere Differenzierungsmechanismen integrativ zu betrachten.

2.3 Synaptogenese in *Drosophila*

Seit knapp drei Jahrzehnten dient die larvale NMJ von *Drosophila* als Modellsystem für die Untersuchung von Synapsen. Zunächst als physiologisches Testsystem etabliert und für die Analyse von Kanalprotein-Mutationen verwendet (Jan und Jan, 1976; Jan et al., 1977), hat sich die NMJ inzwischen auch als exzellentes Modellsystem für Synaptogenese etabliert (zusammengefasst u.a. in Budnik und Gramates, 1999; Featherstone und Broadie, 2000; Keshishian et al., 1996; Prokop, 1999).

Am Modellsystem *Drosophila*-NMJ wurden zahlreiche Moleküle identifiziert, die für die Zielfindung der Axone notwendig sind (siehe u.a. Chiba und Rose, 1998; Rose et al., 1997; vanVactor et al., 1993). Untersuchungen zur Adhäsion zwischen prä- und postsynaptischer Seite konnten durchgeführt und erste Kandidatenmoleküle identifiziert werden, die diese Adhäsion vermitteln (Broadie und Bate, 1993; Prokop et al., 1996; Prokop et al., 1998a; Schuster et al., 1996). Verschiedene Mutationen wurden gefunden, die Auswirkungen auf die Differenzierung der Neuromuskulären Endplatte haben, wie *late bloomer* (Kopczynski et al., 1996), *futsch* (Hummel et al., 2000) oder *kakapo* (Prokop et al., 1998b). Ebenso konnte eine Reihe von Molekülen identifiziert werden, die bei der Bildung und späteren Plastizität der eigentlichen Synapse eine Rolle spielen (siehe u.a. Sone et al., 2000; Thomas et al., 1997a; Wan et al., 2000). An der *Drosophila* NMJ gewonnene Daten wurden schon mehrfach für Forschung an Vertebraten-Synapsen genutzt (Schaefer und Nonet, 2001).

Solche Einblicke wurden ermöglicht, weil NMJs an relativ exponierter Stelle auf den leicht identifizierbaren Muskeln liegen und daher individuell angesprochen werden können. Durch Arbeiten von Landgraf (Landgraf et al., 1997) und Schmid (Schmid et al., 1999) ist bekannt, dass bestimmte Muskeln immer von den gleichen Neuronen des ZNS innerviert werden. Die NMJ eignet sich deshalb hervorragend für elektrophysiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen (zusammengefasst u.a. in Broadie und Bate, 1993; Prokop, 1999). Insbesondere sind Untersuchungen an der *Drosophila* NMJ zu jedem Zeitpunkt embryonaler und larvaler Entwicklung möglich und deshalb kombinierbar mit sogar embryonal letalen Mutationen.

Die Forschung über die axonale Wegfindung und die Entwicklung der NMJ hat nicht zuletzt auch zur Identifizierung einer Vielzahl von neuritisches oder synaptisch lokalisierten Proteinen geführt. Gegen zahlreiche dieser Proteine existieren inzwischen gute Antikörperserien oder genetische Konstrukte, bei denen das gewünschte Protein mit einem detektierbaren anderen Protein fusioniert wurde.

Trotz aller Erfolge darf nicht übersehen werden, dass die synaptogenetische Forschung an der *Drosophila* NMJ begrenzt ist. Erstens sind die postsynaptischen Zellen in diesem System Muskeln und keine Nervenzellen. Deshalb können neuronale postsynaptische Mechanismen nicht untersucht werden. Zweitens ist, abgesehen von einigen wenigen Neuropeptiden und Neuromodulatoren, Glutamat der einzige Transmitter an der NMJ. Im ZNS hingegen finden sich zahlreiche

Synapsen mit einer Vielfalt von unterschiedlichen Transmittern (zusammengefasst in Prokop, 1999). Daher ist es erstrebenswert, auch zentralnervöse Synapsen als Modellsystem zu etablieren.

Arbeiten zur Lage und Verteilung von Synapsen auf zentralnervösen Neuronen wurden schon in größeren Insekten durchgeführt. Neben Schabe, Stabheuschrecke, Grille und Gottesanbeterin dient die Heuschrecke *Schistocerca* seit langem als Modellorganismus (zusammengefasst in Burrows, 1996). Der größte Teil der Untersuchungen bei *Schistocerca* wurde elektronenmikroskopisch an Mikroschnittserien vorgenommen. Deshalb wurde häufig nur ein kleiner als repräsentativ angesehenen Teil der Projektionen identifizierter Neurone im Detail betrachtet. Dabei wurden für Inter- und Motorneurone innerhalb der Ganglien Projektionen beschrieben, auf denen sich Output- und Input-Synapsen vermischen (siehe u.a. Watson und Burrows, 1982; Watson und Burrows, 1983; Watson und Burrows, 1985) sowie Projektionen, die rein postsynaptisch sind (Killmann et al., 1999; Watson und Burrows, 1988; Watson et al., 1985). Trotz dieser morphologischen Vorarbeiten eignet sich *Schistocerca* nur bedingt als Modellorganismus für intensivere Untersuchungen zur Synaptogenese, denn zahlreiche der oben aufgezählten Vorteile des Modells *Drosophila* kann *Schistocerca* nicht erfüllen.

In *Drosophila* gibt es bisher allerdings nur wenige Studien die sich mit ZNS-Synapsen beschäftigen. Meist erfolgten diese in der späten Larve, der Puppe oder dem adulten Tier (Allen et al., 1998; Allen et al., 1999; Ito et al., 1997; Jacobs et al., 2000). Untersuchungen zur ZNS-Synapsenentwicklung während der Embryogenese, also in einem Zeitraum, in dem *de novo* Synapsen entstehen, gibt es bisher nur auf elektrophysiologischer Basis (Baines und Bate, 1998; Baines et al., 1999). Die Gründe dafür sind einfach. Die ZNS-Synapsen liegen dicht gedrängt in einer zellkörperfreien, als Neuropil bezeichneten Region. Obwohl reproduzierbare Projektionen individueller ZNS-Neurone bis ins Detail bekannt sind, ist es nicht möglich, die Lage einzelner oder distinkter Gruppen von Synapsen auf diesen Projektionen zu bestimmen. Damit entziehen sie sich aber auch gleichzeitig reproduzierbaren Experimenten.

2.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Grundlagen zu schaffen, damit das embryonale Bauchmark von *Drosophila* als Modellsystem für die Synaptogenese von ZNS-Synapsen etabliert werden kann. Dafür ist es nötig, einzelne oder kleine Gruppen von Synapsen individuell identifizierbar zu machen. Wir wollten einen möglichst universalen Ansatz finden, um Synapsenverteilung auf Fortsätzen individueller Neurone sichtbar machen zu können. Dazu nutzen wir das detaillierte Wissen über den Aufbau des Bauchmarks (Bossing und Technau, 1994; Bossing et al., 1996; Landgraf et al., 1997; Schmidt et al., 1997) und modifizierten die etablierten Techniken des UAS/Gal4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) und der Einzelzelltransplantation neuraler Vorläuferzellen (Prokop und Technau, 1993). Die mit Hilfe dieser Techniken gewonnenen Daten helfen Prinzipien bei der Verteilung von Synapsen zu verstehen. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit Modellkonstellationen von zentralnervösen Synapsen geschaffen, die in Kombination mit experimentellen und genetischen Manipulationen analysiert werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Primäre Antikörper:

Antikörper	empfohlene Verdünnung	Hersteller/Referenz
α - β -GALACTOSIDASE aus Kaninchen	1:2000	Cappel
α -mCD8 aus Ratte	1:10	Caltag
α -HÄMAGGLUTININ aus Ratte	1:100	Roche Diagnostics
α -FASCICLIN2 aus Maus	1:10	DSHB
α -SYNAPSIN aus Maus	1:10	(Klagges et al., 1996)
α -SYNAPTOTAGMIN aus Ratte	1:1000	(Littleton et al., 1999)
α -MYC aus Maus	1:20	Calbiochem
α -REPO aus Kaninchen	1:200	(Halter et al., 1995)
α -ELAV aus Ratte	1:2500	DSHB

Sekundäre Antikörper:

Antikörper	Hersteller
Ziege- α -Kaninchen, Biotin-gekoppelt	Jackson
Ziege- α -Kaninchen, Cy2-gekoppelt	Jackson
Ziege- α -Kaninchen, Cy3-gekoppelt	Jackson
Ziege- α -Kaninchen, Cy5-gekoppelt	Jackson
Ziege- α -Maus, Cy3-gekoppelt	Jackson
Ziege- α -Maus, Cy5-gekoppelt	Jackson
Ziege- α -Ratte, Cy3-gekoppelt	Jackson
Ziege- α -Ratte, Cy5-gekoppelt	Jackson

Alle sekundären Antikörper wurden im Verhältnis 1:200 eingesetzt.

3.1.2 Fliegenstämme

Wildtyp Oregon R (Lindsley und Zimm, 1992)

Gal4-Stämme:

<i>Mz1407-Gal4</i>	(Luo et al., 1994)
<i>nervana-Gal4</i> (<i>nerv-Gal4</i>)	(Sun et al., 1999)
<i>tubulinP-Gal4</i> (<i>tubP-Gal4</i>)	(Lee, 1999)
<i>elav-Gal4</i>	(Luo et al., 1994)
<i>apterous-Gal4</i> (<i>ap-Gal4</i>)	(Calleja et al., 1996)
<i>even skipped</i> ^{RRK} - <i>Gal4</i> (<i>eve</i> ^{RRK} - <i>Gal4</i>)	(Baines et al., 1999)
<i>even skipped</i> ^{RRC} - <i>Gal4</i> (<i>eve</i> ^{RRC} - <i>Gal4</i>)	(Baines et al., 1999)
<i>Dopadecarboxylase-Gal4</i> (<i>DDC-Gal4</i>)	(Li et al., 2000)
<i>MzVUM-Gal4</i>	(Ito et al., 1995)

UAS-Stämme

<i>UAS-mCD8-GFP-LL6</i>	(Lee, 1999)
<i>UAS-mCD8-GFP-LL4</i>	(Lee, 1999)
<i>UAS-Tau-Myc</i>	(Thor et al., 1999)
<i>UAS-Synaptotagmin-Hämagglutinin (UAS-Syt-HA)</i>	(Robinson et al., 2002)
<i>UAS-n-Synaptobrevin-GFP13,6 (UAS-n-Syb-GFP)</i>	(Ito et al., 1998)
<i>UAS-SAP97⁰²-GFP</i>	(Thomas et al., 1997b)
<i>UAS-SAP97⁰¹-GFP</i>	(Thomas et al., 1997b)
<i>UAS-SAP90⁰²-GFP</i>	(Thomas, unveröffentlicht)
<i>UAS-homer-Myc</i>	(Diagana et al., 2002)

mutante Stämme

<i>synapsin⁹⁷ (syn⁹⁷)</i>	(Klagges et al., 1996)
<i>Synaptotagmin^{AD4} (Syt^{AD4})</i>	(Broadie et al., 1994)
<i>kakapo^{SF20} (kak^{SF20})</i>	(Prokop et al., 1998b)
<i>kakapo^{Df(2R)MK1} (kak^{Df(2R)MK1})</i>	(Prokop et al., 1998b)

3.1.3 Chemikalien und Lösungen

Apfelagarplatten:

1 l handelsüblicher Apfelsaft wird mit 27-28 g Agar-Agar (Roth) versetzt und erhitzt. Nach kurzem Aufkochen wird das Apfelsaft-Agar-Agar-Gemisch in Petrischalen gegossen. Erkalte Apfelagarplatten werden auf 4°C gelagert.

Fixative:

4%iges Paraformaldehyd gelöst in A&B-Phosphatpuffer. Dieses Fixativ kann auf Vorrat angesetzt und in kleinen Aliquots bei -20°C eingefroren werden. Das Auftauen sollte bei über 40°C erfolgen, da sonst kleine Mengen an Paraformaldehyd wieder ausfallen.

0,25%iges Glutardialdehyd in B&B-Puffer. Dieses Fixativ wird immer frisch angesetzt.

Phosphatpuffer:

A&B:

Lösung A: 28,39g Na_2HPO_4 in 1000ml H_2O

Lösung B: 27,6g NaH_2PO_4 in 1000ml H_2O

Eine Mischung von 36ml Lösung A und 14ml Lösung B wird mit H_2O auf 100ml aufgefüllt. Die resultierende Pufferlösung hat den pH 7,2.

B&B (Broadie und Bate):

3,95g NaCl , 0,19g MgCl_2 , 0,145g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,573g TES, 0,185g KCl und 6,16g Saccharose werden in 500ml Wasser gelöst.

PBS (20x):

75,97 g NaCl , 4,14 g Na_2HPO_4 und 9,94 g NaH_2PO_4 werden mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt und gut gemischt. Der pH wird durch Zugabe von HCl bzw. NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Stammlösung wird zur weiteren Verwendung 1:20 mit Bidest verdünnt.

PBT:

0,3% Triton (Riedel-de Haën) in PBS (1x)

Blocking-Lösung:

9 ml PBT + 1 ml Kalbserum (GIBCO) + 1%BSA (SIGMA). Längere Aufbewahrung erfordert die Zugabe von 0,1% Natrium-Acid.

DAB-Stammlösung:

10 mg 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (SIGMA) werden in 30 ml PBT gelöst. Aufbewahrung erfolgt aliquotiert in 1ml-Eppendorf-Gefäßen bei -20°C .

Heptankleber

Als Rohmasse dient der Kleber Cello 31.39 (Beiersdorf), der mit Heptan verdünnt wird.

Weitere Chemikalien

Aceton (Merck), Heptan (Merck), Glycerol (50% und 70%; SIGMA), Voltalef 10S Öl (Lehmann und Voss), Nagellack, Chromschwefelsäure (Merck), Vectashield Mounting Medium H-1000 (Vectashield), 38%ige Formaldehydlösung.

3.1.4 Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

Objektträger, kleine (22x22) und große (40X60) Deckgläser, doppelseitiges Klebeband, Präpariernadeln, Pinzetten (Dumont Nr. 5), Skalpell, Schere, Mikroschere (SB534-08), Glasblockschälchen, Buchbinderfolie, 1ml Einwegspritzen, Polyethylenschlauch ($\varnothing$ 5mm), Pasteur- und Eppendorfpipetten, handelsübliche Laborflaschen, kleine mit Sylgard ausgegossene Petrischalen, Insektennadeln, große Petrischalen und Knetgummi zur Aufbewahrung der Kapillaren.

Kapillaren

Borosilikat-Glaskapillaren (Meterware; Hilgenberg) (Außendurchmesser: 1 mm; Innendurchmesser: 0,8 mm) werden mit dem vertikalen Mikropipetten-Puller P30 (Sutter Instruments) ausgezogen. Durch Veränderung der Parameter am Mikropipetten-Puller kann die Form Kapillarenspitze verändert werden. Da sich diese Parameter verändern, wenn eine neue Heizspirale eingesetzt wird, wird auf nähere Angaben verzichtet (näheres siehe Prokop und Technau, 1993). Die Kapillaren werden anschließend in einem Winkel von 35° für 2,5 bis 3 Minuten auf einem Kapillaren-Schleifer (Bachhofer) geschliffen, bis der Außendurchmesser ihrer Spitze etwa 10-12 μ m beträgt.

Nach Schleifen der Kapillare wird diese direkt mit Aceton gereinigt, wobei die Flüssigkeit mit Hilfe einer Einwegspritze und eines Polyethylenschlauch mehrmals

aufgesaugt und wieder herausgedrückt wird. Auf diese Weise wird ein Anhaften von Glaspartikeln verhindert.

Mehrfache Benutzung der Kapillaren ist bei entsprechender Reinigung möglich. Zur Entfernung von Geweberesten an Transplantationskapillaren werden Aceton und Chromschwefelsäure benutzt.

Der Außendurchmesser der Injektions- und Transplantationskapillare wird am Mikroskop mit Hilfe eines Skalenokulars (Zeiss) bestimmt.

3.1.5 Dokumentation und Bildbearbeitung

optische Geräte:

Binokulare:

Wild M8, Okulare: 20x/13

Wild M3Z, Okulare: 10x/21B

Mikroskope:

Zur Transplantation:

Inverses Mikroskop Fluovert (Leica) mit Fluoreszenzfilter für Fluorescein (I3) Okulare: Periplan GF 10/20, Objektive: Floutar 40x, 100x.

Zur Anfertigung der Photographien:

Aufrechtes Mikroskop Axiophot der Firma Zeiss mit Kamera ProgRes 3012 der Firma Kontron Elektronik

Plan Neofluar Objektive: 10x, 20x, 40x, 63x (Immersionsölobjektiv), 100x (Immersionsölobjektiv)

Okulare: PI 10x/25

Optovar: 1,25x, 1,6x, 2,0x, 2,5x.

Skalen-Okular: PI 10x/20

Zur Aufnahme der Fluoreszenzpräparate:

Konfokales Mikroskop Leica DM RE

Plan Neofluar Objektive: 10x, 20x, 40x (Immersionsölobjektiv), 63x (Immersionsölobjektiv), 100x (Immersionsölobjektiv)

Okulare: PI 10x/25

Mikromanipulator

Mikromanipulator Leica M (mechanisch)

Computer

Macintosh I-Mac (Apple)

Macintosh Powermac G-4 (Apple)

PC

Software

Photoshop 6 (Adobe)

ProgRes 3.03 und 4.0 (Kontron Elektronik)

Adobe Illustrator 8

Scanware (Leica)

3.2 Methoden

3.2.1. Fliegenhaltung

Die Fliegen werden auf *Drosophila*-Standardmedium in Kulturgefäßen (Ø50mm) bei 25°C gehalten. Zur Verbreiterung der Fliegen werden die Kulturgefäße alle drei Tage abgeschüttelt, und auf neue Gefäße gesetzt. Die Generationsdauer unter diesen Bedingungen beträgt 220 Stunden (Ashburner, 1989).

Werden Versuche geplant, so werden die Fliegen drei Tage vor der gewünschten Eiablage mit Trockenhefe (Kaufhausware) angefüttert.

3.2.2 Balancieren von Mutationen

Um bei Fliegenstämmen mit homozygot letaler Mutation zu verhindern, daß die Mutation durch Rekombination oder Auskreuzen verloren geht, werden diese balanciert. Hierzu benutzt man sogenannte Balancer-Chromosomen (z. Bsp. CyO, Pm; Lindsley und Zimm, 1992), die aufgrund von vielfältigen Abberationen Rekombination unterdrücken und ihrerseits Letalfaktoren tragen. So bleibt die Stabilität des Stammes gewährleistet, da immer nur heterozygote Nachkommen überleben.

3.2.3 Sammeln von jungfräulichen Fliegen

Für Kreuzungszwecke werden von einem der beiden zu verkreuzenden Stämme jungfräuliche Fliegenweibchen benötigt. Zu diesem Zweck lässt man den Stamm einige Tage Eier in Aufzuchtsgefäßen ablegen. Dann werden alle Adultfliegen entfernt und die Verpuppung der neuen Generation abgewartet. Nach dem Schlupf aus den Verpuppungskokoons werden die Tiere mit CO₂ betäubt und die Weibchen aussortiert. Um zu gewährleisten, dass die Weibchen nicht von den gleichzeitig mit ihnen schlüpfenden Männchen besamt werden, wird dieser Vorgang des Aussortierens bei Haltung auf 25°C alle sechs Stunden bzw. bei Haltung auf 18°C alle zwölf Stunden durchgeführt.

3.2.4 Kreuzung und Rekombination von für Transplantationen benötigten *Drosophila*-Stämmen

3.2.4.1 Spender für Transplantation wildtypischer Zellen

Für Transplantationsexperimente benötigten wir Spenderembryonen, deren Zellen genetisch markiert sind. Wir entschieden uns für mCD8-GFP als Marker (siehe 4.2.2). Vor Transplantationsexperimenten wurden *UAS-mCD8-GFP*-Männchen mit *tubP-Gal4*-Jungfrauen verkreuzt:

$$\frac{UAS-mCD8-GFP}{UAS-mCD8-GFP} \quad \times \quad \frac{tubP-Gal4}{CyO}$$

Nach den mendelschen Regeln sind 50% aller Nachkommen vom Genotyp *tubulinP-Gal4/UAS-mCD8-GFP*.

3.2.4.2 Spender für Transplantation *kak*-mutanter Zellen

Für die Transplantation *kak*-mutanter Zellen benötigten wir Spenderembryonen, deren Zellen sowohl homozygot mutante waren, als auch einen geeigneten Oberflächenmarker exprimierten. Für die Mutation entschieden wir uns für eine nicht lebensfähige Kombination zweier *kak*-Allele: *kak*^{SF20} und *kak*^{Df(2R)MK1}. Um sicher zu stellen, dass wir nach erfolgter Transplantation *kak*-mutante von wildtypischen Zellklonen unterscheiden können, entschieden wir uns, die Expression des Markermoleküls mCD8 direkt mit dem homozygoten *kak*-Genotyp zu verknüpfen. Dazu war es erforderlich, jeweils eines der beiden *kak*-Allele mit *UAS-mCD8-GFP* bzw. mit *tubP-Gal4* zu rekombinieren. Als Beispiel wird hier nur eines der beiden hierfür nötigen Kreuzungsschema angegeben. Alle Kreuzungen erfolgten im *white*-Hintergrund (*w*). Diese Mutation führt in der adulten Fliege zu weißer anstatt roter Augenfarbe. Die Konstrukte *UAS-mCD8-GFP* und *tubP-Gal4* tragen allerdings zusätzlich ein sogenanntes *miniwhite*-Gen (*w*⁺), das diesen Phänotyp behebt. Fliegen mit diesem Konstrukt haben also rote Augen, obwohl das genomische *white*-Gen Defekt ist. Deshalb kann man anhand der Augenfarbe leicht erkennen, ob eines der beiden Konstrukte in einer Nachkommenfliege vorhanden ist oder nicht.

$$1. \quad \frac{(w^-) \quad UAS-mCD8-GFP \quad (w^+)}{(w^-) \quad UAS-mCD8-GFP \quad (w^+)} \quad \times \quad \frac{Y}{(w^-)}; \frac{kak^{SF20}}{CyO}$$

Für den nächsten Kreuzungsschritt wurden weibliche Nachkommen verwendet (nur in der Keimbahn weiblicher Fliegen kommt es zur Rekombination), die nicht das Balancerchromosom CyO trugen und mit einem Doppelbalancerstamm verkreuzt:

$$2. \quad \frac{(w^-)}{(w^-)}; \frac{UAS-mCD8-GFP (w^+)}{kak^{SF20}} \times \frac{Y}{(w^-)}; \frac{CyO(Roi)}{Pm}$$

Zufällig kann bei dieser Kreuzung Rekombination erfolgen. Alle rotäugigen weiblichen Nachkommen ($UAS-mCD8-GFP (w^+)$) aus dieser Kreuzung, wurden einzeln mit Fliegen eines anderen kak -mutanten Stammes verkreuzt, um zu testen, ob $UAS-mCD8-GFP$ mit kak^{SF20} rekombiniert hat ($?(kak^{SF20})?$):

$$3. \quad \frac{(w^-)UAS-mCD8-GFP (w^+), ?(kak^{SF20})?}{(w^-)}; \frac{CyO(Roi)}{CyO} \times \frac{Y}{(w^-)}; \frac{CyO}{kak^{Df(2R)MK1}}$$

Auf dem Balancer CyO sitzt unter anderem eine Markermutation, die gebogene Flügel verursacht. Anhand dieses Markers können Fliegen ohne CyO gegen Fliegen mit CyO abgegrenzt werden. Bei Einzelkreuzungen, in denen geradflügelige Nachkommen schlüpften, mussten diese von folgendem Genotyp sein.

$$\frac{UAS-mCD8-GFP (w^+)}{kak^{Df(2R)MK1}}$$

Also hatte in den Weibchen, die für diese Kreuzungen verwendet wurden keine Rekombination stattgefunden. Bei Einzelkreuzungen, in denen alle Nachkommen CyO -Phänotyp zeigten, hatte offensichtlich Rekombination stattgefunden, da kak^{SF20} über $kak^{Df(2R)MK1}$ nicht lebensfähig ist. Dies war bei 18 von 431 angesetzten Einzelkreuzungen der Fall.

Über Selektion gegen den Marker (Roi) konnten aus den Nachkommen der Kreuzung 3. die Fliegen mit der Rekombination $UAS-mCD8-GFP (w^+)$, kak^{SF20} gewonnen werden und als Stamm etabliert werden.

Analog wurde $tupP-Gal4$ mit $kak^{Df(2R)MK1}$ rekombiniert. Hier wurden in 372 angesetzten Einzelkreuzungen 11 Rekombinationsvorgänge festgestellt.

Für Transplantationsexperimente wurden die beiden rekombinanten Stämme verkreuzt und Eiablagen gemacht.

$$\frac{UAS-mCD8-GFP, kak^{SF20}}{CyO} \times \frac{tupP-Gal4, kak^{Df(2R)MK1}}{CyO}$$

Die als Spenderembryonen benutzten Nachkommen aus dieser Kreuzung hatten folgende Genotypen:

1. $\frac{UAS-mCD8-GFP, kak^{SF20}}{CyO}$
2. $\frac{tupP-Gal4, kak^{Df(2R)MK1}}{CyO}$
3. $\frac{CyO}{CyO}$
4. $\frac{tupP-Gal4, kak^{Df(2R)MK1}}{UAS-mCD8-GFP, kak^{SF20}}$

Nur bei Zellentnahme aus Spendern des 4. Genotyps, waren die sich im Wirtstier entwickelnden neuronalen Zellstammbäume in der Lage das Markermolekül mCD8 zu exprimieren. So wurde sichergestellt, dass alle durch Antikörperfärbung gegen mCD8 detektierbaren Zellstammbäume bei diesen Transplantationsexperimenten auch wirklich *kak*-mutant waren.

3.2.5 Transplantation

Grundlage ist die Technik der Einzelzelltransplantation (Prokop und Technau, 1993). sie beruht auf der Möglichkeit, durch Vitalfarbstoffe gekennzeichnete Zellen aus Neuroektoderm von *Drosophila*-Embryonen (Spender-Embryonen) im Stadium 7 (Embryonalstadien nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) zu entnehmen und in andere Embryonen (Wirtsembryonen) des gleichen Stadiums wieder einzusetzen. Bei gelungener Transplantation entwickelt sich die Zelle zu einem neuronalen Vorläufer, dessen Zellstammbaum nach Ausdifferenzierung über die Vitalfärbung dargestellt und analysiert werden kann. Wir haben diese Methode in Hinsicht auf den genetischen Marker der Transplantationszellen, den Genotyp des Wirtsembryos und den Analysezeitpunkt modifiziert. Statt eine Vitalfärbung zu verwenden wurden genetisch markierte Zellen transplantiert. Die Zellen wurden in Wirtsembryonen transplantiert, die mutant für ein oder zwei präsynaptische Proteine waren. Im späten Stadium 17 wurden an Bauchmarks von Wirtsembryonen Antikörperfärbungen gegen den genetischen Marker der Transplantationszelle und die entsprechenden präsynaptischen Proteine vorgenommen. Da das Wirtstier mutant für diese präsynaptischen Proteine war, konnten wir dann auf den Zellen des Transplantationsklons die intrinsische Verteilung dieser Proteine beobachten und analysieren. Die modifizierte Methode (ohne technische Einzelheiten) ist in Abb. 3.1 zusammengefasst.

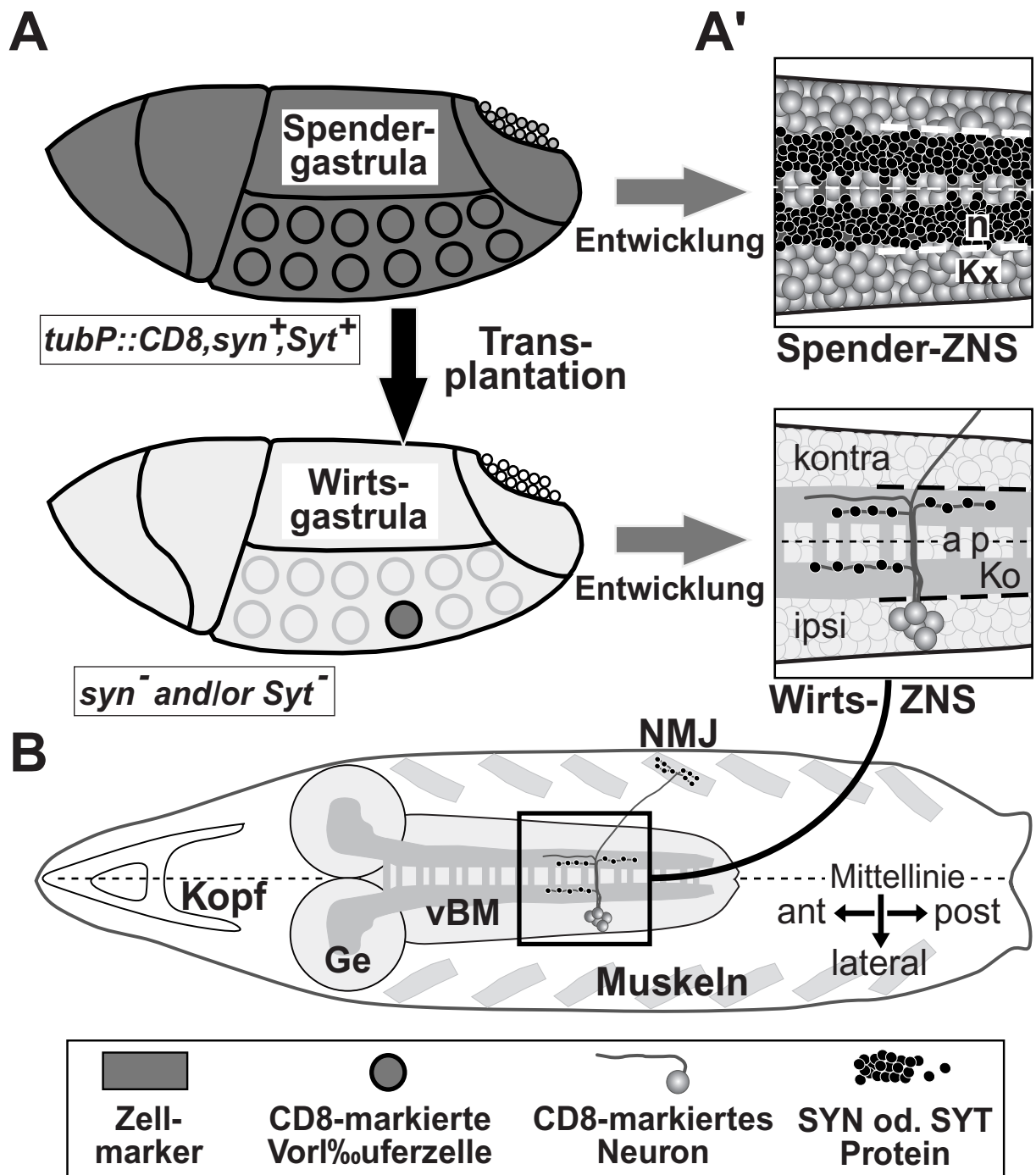
Abb. 3.1 Das Prinzip der modifizierten Transplantationstechnik

A: Vorläuferzellen (graue Kreise) aus der abdominalen neurogenen Region der Gastrula eines genetisch markierten Spenders (Markierung: CD8) entnommen und isotopisch in die Gastrula eines Wirtsembryos eingesetzt (schwarzer Pfeil). Das Wirtsembryo ist mutant für bestimmte synaptische Proteine (*syn⁻* oder *Sy^f*).

A': Am Ende der Embryonalentwicklung sind im Zentralen Nervensystem (ZNS) des Spendertieres (oben) alle Zellen im Kortex (Kx) genetisch markiert (grau schattierte Kreise). Die synaptischen Proteine SYN und SYT (schwarze Punkte) sind im gesamten Neuropil (n) lokalisiert. Im ZNS des Wirtstieres exprimieren nur die Tochterzellen der transplantierten Vorläuferzelle den genetischen Marker (grau schattierte Kreise). Nur auf den Projektionen (dunkelgraue Linien) dieser Zellen finden sich die synaptischen Proteine, für die das Wirtstier mutant ist (schwarze Punkte). ipsi: ipsilateral (Seite auf der sich die Zellkörper des Transplantations-Zellklons befinden); kontra: kontralateral (Seite gegenüber den Zellkörpern des Transplantations-Zellklons); a: anteriore Kommissur, p: posteriore Kommissur, Ko: Konnektiv.

B: Position der in A' gezeigten Strukturen im späten Embryo oder der Larve. Synapsen finden sich im Neuropil und auf der neuromuskuläre Verbindung (NMJ). ant: anterior; Ge: Gehirn; vBM: ventrales Bauchmark; ant: anterior; post: posterior.

Abb. 3.1



3.2.5.1 Eiablagen

Zur Eiablage werden die Tiere in Ablageröhrchen überführt, und mit der Öffnung auf eine Apfelagarplatte gestellt. Die Agarplatte wurde vorher mit etwas Hefe bestreut. Zur Ventilation des Ablageröhrchens ist an der oberen Öffnung ein Drahtnetz angebracht. Damit die gelegten Eier ungefähr denselben Entwicklungszustand haben, wird der Zeitintervall der Eiablage kurz gewählt. Verwendet wurden Ablagen von 60 Minuten Dauer. Die erste Ablage eines Tages wird nicht benutzt, da die Eier in der Regel in sehr heterogenem Alter sind. Die Eiablage, die benutzt werden soll, wird für eine weitere Stunde bei 25°C kultiviert.

3.2.5.2 Vorbereitung der Embryonen

Auf einen Objektträger werden zwei Agarblöckchen in solchem Abstand gelegt, dass ein mit doppelseitigem Klebeband beklebtes Deckgläschen genau diesen Abstand überbrückt. Man beginnt mit den Spenderembryonen. Von der Ablage werden mit einem stumpfen Skalpell vorsichtig die Embryonen aufgehoben und auf das Klebeband überführt. Danach werden die Embryonen mit einer Präpariernadel vorsichtig hin und her bewegt, bis das Chorion aufplatzt. Die Embryonen können dann einzeln auf das Agarblöckchen überführt werden. Sie werden so positioniert, dass anterior nach unten weist und die dorsale Seite nach rechts. Ein großes Deckglas wird mit einem Tropfen Heptankleber beschichtet, indem man diesen mit einem weiteren Deckglas als dünnen Film ausstreicht. Nach kurzem Antrocknen des Klebers ist das so präparierte Deckglas benutzbar.

Die positionierten Spenderembryonen werden nun auf das Deckglas überführt, indem man das kleberbeschichtete Deckglas vorsichtig auf die Embryonen herablässt, ohne diese dabei zu quetschen. Durch zu hohen Druck wird die Rate an missgebildeten Embryonen erhöht werden. Da beim Aufkleben die Orientierung invertiert wird, liegen die Embryonen nun mit anterior nach oben. Das Deckglas wird dann in einer feuchten Kammer aufbewahrt, bis man auch die Empfänger positioniert hat.

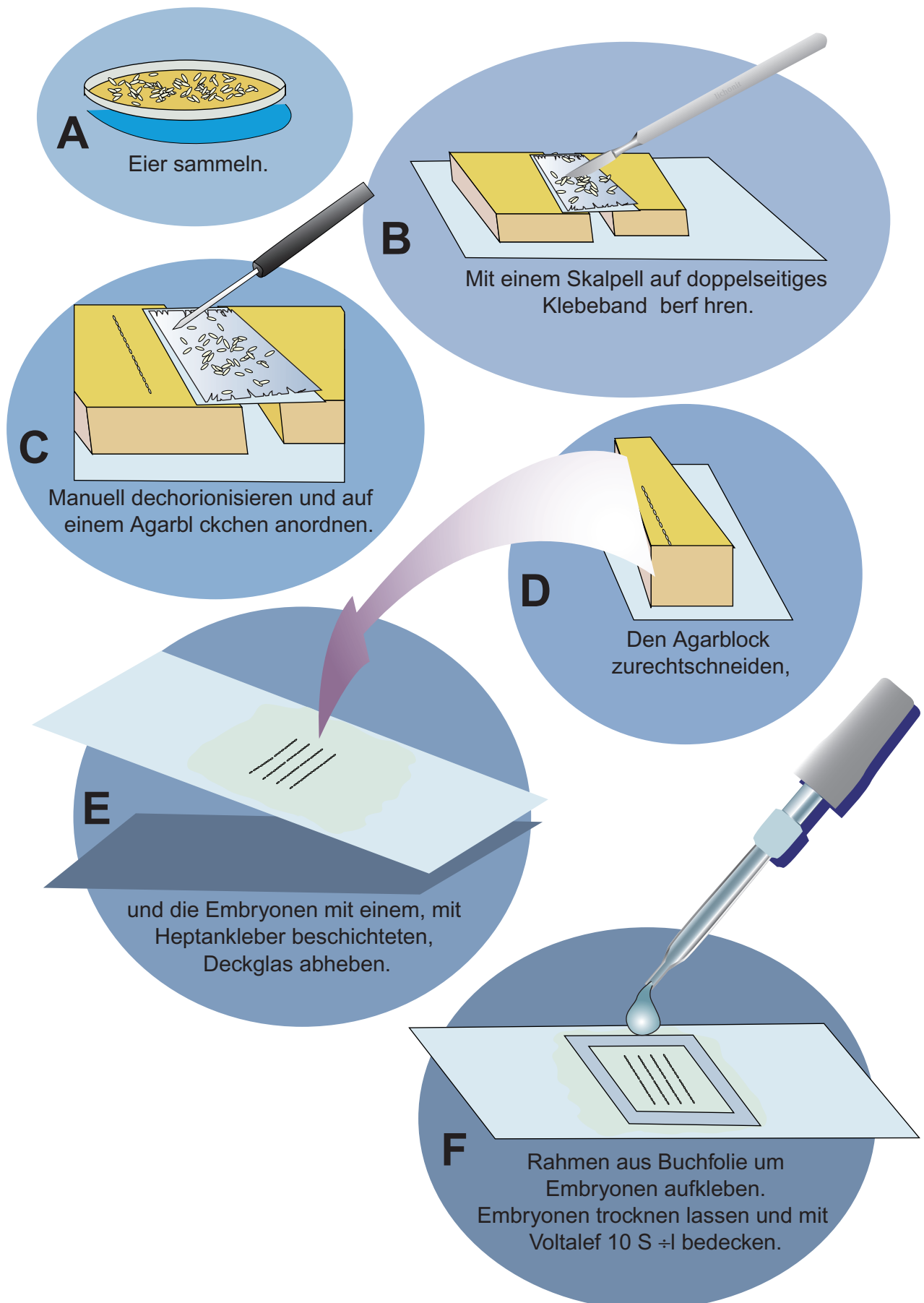
Empfängerembryonen werden wie Spenderembryonen dechorionisiert und dann anterior nach unten, aber dorsal nach links auf einem Agarblöckchen

positioniert. Beim nachfolgenden Aufkleben auf das Deckgläschen ist zu beachten, dass man es genauso hält, wie beim Aufkleben der Spender. Um beide Embryonengruppen wird nun ein kleiner, rechteckiger Rahmen aus Buchfolie geklebt.

Da die Embryonen einen Innendruck haben, würden sie direkt auslaufen, wenn man sie mit einer Transplantationskapillare ansticht. Deshalb ist es unbedingt notwendig, die Embryonen in einen geeigneten Trocknungszustand zu bringen. Die Embryonen werden zur Trocknung für einige Minuten unter dem Binokular liegen gelassen. Es ist notwendig ständig optisch zu kontrollieren, ob der ideale Trocknungszustand erreicht ist. Hierzu kann zu Hilfe gezogen werden, inwieweit sich die Vitellinmembran in Falten gelegt hat, was einen Turgorabfall nach außen darstellt. Die Dauer der Trocknung ist unter anderem von der Außentemperatur und der Luftfeuchtigkeit abhängig. Bei zu großer Trocknung ist die Wahrscheinlichkeit der Fehlentwicklung oder des Absterbens erhöht. Normalerweise sollte man warten, bis die Mehrzahl der Embryonen leichte Falten zeigt. Ist der Idealzustand erreicht, so werden die Embryonen mit Voltalef 10S Öl überschichtet. Dies ist ein Spezialöl aus der Flugzeugindustrie, dass die Eigenart besitzt, zwar luft- aber nicht wasserdurchlässig zu sein, wodurch ein weiteres Austrocknen der Embryonen verhindert wird, aber deren Entwicklung weiter fortschreiten kann. Die Embryonen sind nun bereit zur Transplantation. Der Rahmen aus Buchfolie verhindert, dass das Öl davonläuft.

Die Vorbereitung der Embryonen wird als Übersicht noch einmal in Abb. 3.2 dargestellt.

Abb. 3.2



3.2.5.3 Transplantation der Zellen

Vorbereitungen zur Transplantation: Am Mikromanipulator wird eine Transplantationskapillare eingespannt, die über einen Polyethylen Schlauch mit einer 5ml Einwegspritze verbunden ist. Die Transplantation erfolgt mit 40x- oder 50x-Immersionsölobjektiv am inversen Mikroskop. Das Alter der Tiere wird optisch bestimmt. Alle Transplantationen (Zellentnahme und Zelleinsetzen) werden an Embryonen mit gerade beginnender Gastrulation vorgenommen. Ist dieser Zeitpunkt erreicht wird das Mikroskop so eingestellt, dass der ventralste Bereich der Embryonen und die dort sitzenden Zellen scharf zu sehen sind. Mit Hilfe des Feintriebs am Mikromanipulator wird die Spitze der Transplantationskapillare auf dieselbe Ebene eingestellt, eingestochen und ca. 10-12 Zellen aus der ventralen Seite entnommen. Dabei wird darauf geachtet, möglichst nahe der ventralen Mittellinie zu entnehmen, um die Anzahl der unterschiedlichen neuronalen Vorläuferzellen einzuschränken (siehe Abb. 2.1). Nachdem genügend Zellen abgesaugt wurden, wird die Kapillare zurück gefahren und etwas Öl in die Spitze aufgesaugt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Die Kapillare wird dann aus dem Öl genommen. Danach werden die Empfängertiere unter das Objektiv bewegt. Nachdem ein Empfänger in geeignetem Alter gefunden wurde, wird wieder der ventralste Bereich fokussiert, und die Kapillare einjustiert. Die Zellen in der Kapillare werden durch leichten Druck bis zur Spitze der Kapillare geführt. Erfahrungsgemäß ist die erste Zelle meist so geschädigt, dass sie nicht überlebt, weshalb immer mindestens zwei Zellen abgesetzt werden. Die Kapillare wird in den Embryo gebracht und zwar ein wenig weiter, als der eigentliche Implantationsort sein soll. Dann werden während des Zurückfahrens der Kapillare aus dem Embryo durch leichten gleichmäßigen Druck die Zellen aus der Kapillare entlassen und so in die gewollte Position gebracht. Würde man nicht die Kapillare beim Absetzen nach hinten bewegen, so würden die abgesetzten Zellen zerquetscht oder im Dotter abgesetzt werden. Auf einem Protokollzettel wird notiert, aus welchem Spenderembryo in welchen Wirtsembryo Zellen implantiert wurden.

3.2.5.4 Weiterbehandlung der Embryonen

Die Spenderembryonen werden bei wildtypischen Transplantationen verworfen. Bei Transplantationen aus mutanten Spendern, lässt man die Spender sich parallel zu den Empfängern entwickeln. Anhand von Markern (im Fall der *kak*-mutanten Spender Expression von mCD8-GFP) kann man erkennen, welche Spender mutant waren. Da auf einem Protokollzettel Spender und dazugehörige Empfänger notiert wurden, braucht man Empfänger wildtypischer Zellen nicht weiter zu behandeln. Im Zweifelsfall ist es allerdings angeraten, lieber ein Präparat mehr zu machen, als wertvolle Zellklone zu verwerfen.

Die Empfängerembryonen sollen sich bis kurz vor Schlupf entwickeln. Um eine stärkere Expression des Gal4-kontrollierten Zellmarkers mCD8 zu erreichen, werden sie die letzten zwei bis vier Stunden auf 29°C gehalten.

Vollständig entwickelte Embryonen, die kurz vor Schlupf stehen oder gerade geschlüpfte L1-Larven werden mit einer Pinzette in ein Glasblockschälchen mit B&B-Puffer überführt. Mit zwei Pinzetten greift man die Embryonen/Larven am Kopfbereich und etwa in der Mitte des Abdomens und reißt sie vorsichtig auseinander. Dabei wird normalerweise das Bauchmark freigelegt. Sind alle Larven derart präpariert, wird der B&B-Puffer vorsichtig mit einer ausgezogenen Glaspipette so weit wie möglich abgezogen. Danach wird 4% Paraformaldehyd über die Embryonen gegeben und für eine Stunde fixiert.

Nach dem Abziehen des Fixativs werden die Embryonen dreimal mit PBT gespült und dann für eine Stunde in PBT gewaschen. Der Waschschrift erfolgt auf einem laborüblichen Schüttler, der aber nicht zu stark eingestellt werden darf, damit die Embryonen nicht an den Rand des Blockschälchens geraten und dort austrocknen. Nach dieser Prozedur kann die Antikörperfärbung erfolgen (siehe 3.2.7).

3.2.6 UAS/Gal4-System

Das UAS/Gal4-System ist eine schon länger zur Aufklärung entwicklungs- und zellbiologischer Fragestellungen bei *Drosophila* verwendete Methode, die auch

schon zahlreiche Modifizierungen erfahren hat (siehe u. a. Baines et al., 1999; Brand und Perrimon, 1993, Lee, 1999 #113; Rajagopalan et al., 2000).

Man verwendet dafür einerseits transgene Fliegenstämme, die transposoninduzierte Insertionen tragen, auf denen sich das Gen für den Transkriptionsfaktor Gal4 aus Hefe befindet. *Gal4* steht dort unter der Kontrolle gewebes- oder zellspezifischer Enhancer. Andererseits verwendet man transgene Fliegenstämme mit ebenfalls transposoninduzierten Insertionen gewünschter Gene die unter der Kontrolle mehrerer Kopien der *UAS*-Sequenz (vom Englischen **u**pstream **a**ctivating **s**equen**ce**) stehen. Gal4 bindet spezifisch an *UAS* und kann damit nachgeschaltete Gene aktivieren. Diesen Effekt erhält man, wenn man *UAS*- und *Gal4*-Stämme miteinander verkreuzt. Die unter *UAS*-Kontrolle stehenden Gene werden dann in einem zeit- und zellspezifischen Muster exprimiert, das dem der Gal4-Expression entspricht. Das Gal4/*UAS*-System erlaubt Studien zur Lokalisation von Proteinen, aber auch deren Überexpression oder die Studie von Mutationen (siehe auch Abb. 3.3).

3.2.6.1 Präparation von *UAS/Gal4*-Larven

Wir haben das *UAS/Gal4*-System benutzt um synaptische oder neuritische Marker in kleinen Gruppen zentralnervöser Neurone in *Drosophila*-Larven zu exprimieren. Dies wurde in allen Larvalstadien durchgeführt. Die Bauchmarkpräparation erfolgt in jedem Larvalstadium fast gleich. Man überführt die lebenden Larven in B&B-Puffer. Mit zwei Pinzetten hält man die Larve am Kopf und im mittleren oder hinteren Abdomenbereich. Durch Auseinanderziehen wird das Bauchmark freigelegt.

Um zusätzlich zum Bauchmark auch die NMJ zu untersuchen war es in einigen Fällen nötig, vollständige Tiere zu präparieren. Bei L1-Larven wurde dies von Andreas Prokop nach etablierter Methode durchgeführt (Broadie, 2000). L3-Larven wurden auf eine mit Sylgard ausgegossene Petrischale überführt. Das Sylgard wird mit B&B-Puffer überdeckt. Mit einer Insektennadel wird dicht hinter den Mundwerkzeugen in den Kopf der Larve eingestochen und dieser fixiert. Genauso verfährt man mit einer weiteren Nadel an der Analplatte, wobei der Larvenkörper zwischen den beiden Nadeln leicht gespannt sein sollte und die Dorsalseite nach oben zeigt. Mit einer Mikroschere wird nun nahe der Analplatte ein Schnitt quer zur

Körperlängsachse durch die dorsale Epidermis geführt. In diesen Schnitt führt man die untere Schneide der Schere ein und eröffnet nun die Körperhöhle der Larve, indem man entlang der dorsalen Mittellinie bis in den Kopfbereich schneidet. Vorsichtig entfernt man den kompletten Verdauungstrakt inklusive der Speicheldrüsen. Nun greift man etwa auf Höhe des Bauchmarks mit einer Pinzette die dorsale Epidermis an der rechten Schnittkante und zieht diese nach rechts. Dabei sollte nur leichte Spannung auf die Epidermis und die darunter liegenden Muskeln ausgeübt werden. Man fixiert die Epidermis mit Hilfe einer Insektennadel. Analog verfährt man mit der linksseitigen Epidermis und wiederholt den ganzen Vorgang dann auf mittlerer Höhe des Abdomens, so dass am Schluss die Epidermis der Larve von jeweils zwei Insektennadeln nach rechts und links aufgespannt wird.

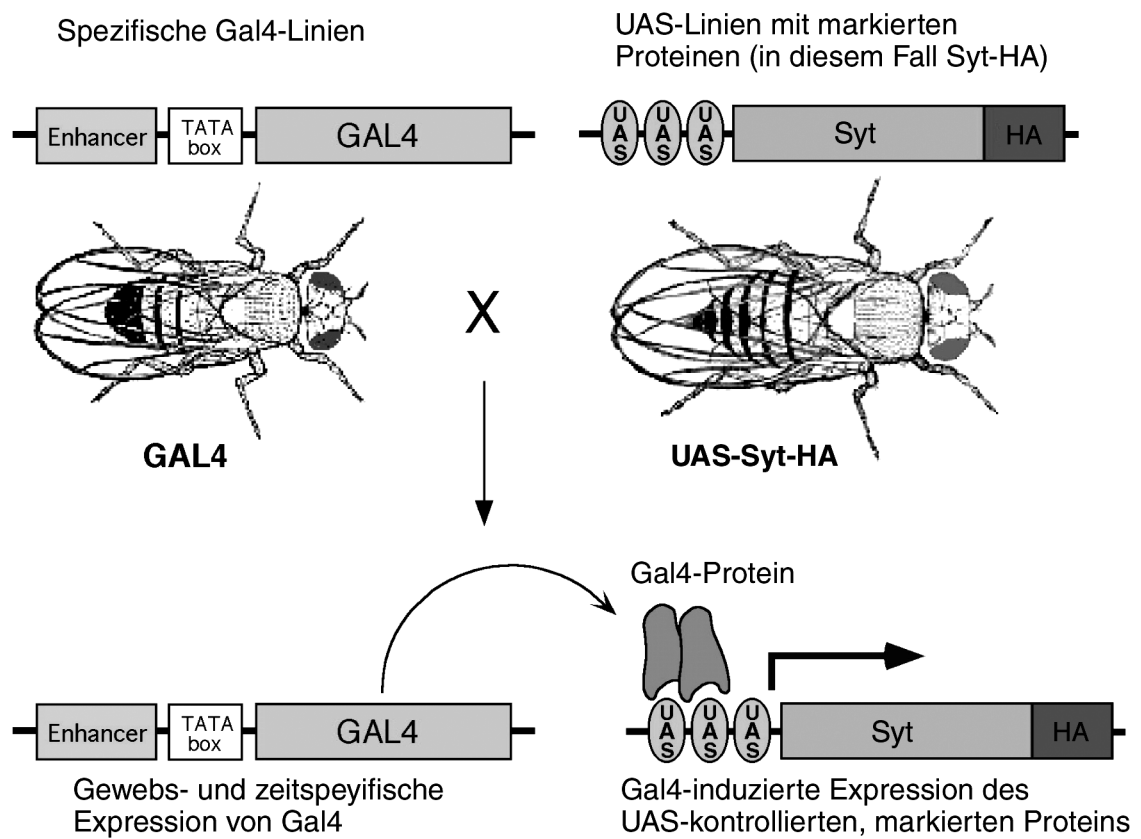
Sind alle Larven präpariert (etwa sechs Stück finden auf einer kleinen Petrischale Platz) wird der B&B-Puffer zweimal durch frischen ersetzt, um die bei der Präparation aus der Larve entfernten Organe von der Petrischale zu schwemmen. Danach werden die Larven für 1 Stunde in 4%-Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Abziehen des Fixativs werden die Larven dreimal mit PBT gespült und dann für eine Stunde in PBT gewaschen. Der Waschschrift erfolgt auf einem laborüblichen Schüttler. Anschließend kann die Antikörperfärbung erfolgen.

3.2.7 Antikörperfärbung

Es fanden zwei verschiedene Antikörpertechniken Verwendung: Antikörper mit fluoreszierenden Markern und Meerrettichperoxidase-Reaktion (HRP, vom Englischen **H**orse **R**addish **P**eroxidase) mit vorhergehender Verstärkung durch Avidin-Biotin-System.

Abb. 3.3 Das UAS/Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993).

In *Gal4*-Linien steht das Gen *Gal4* aus der Hefe unter die Kontrolle gewebes- oder zellspezifischer Enhancer. In *UAS*-Linien steht ein Gen von Interesse (in diesem Fall *Synaptotagmin* (Syt)) unter der Kontrolle des *UAS*-Enhancers. Das von diesem Gen codierte Protein kann markiert sein, damit man es später besser lokalisieren kann (in diesem Fall mit Hämagglutinin (HA)). *Gal4*-Linien und *UAS*-Linien werden miteinander verkreuzt. Bei den Nachkommen dieser Kreuzung bindet in Zellen und Geweben, in denen *GAL4* exprimiert wird, das GAL4-Protein an den *UAS*-Enhancer und aktiviert diesen. Dadurch wird die Expression des nachgeschalteten Gens ermöglicht. Die Expression des *UAS*-kontrollierten Gens erfolgt also in genau demselben zell- und zeitspezifischen Muster, wie die Expression von GAL4.

Abb. 3.3

HRP:

Häufige Verwendung um Antikörperfärbungen zu verstärken findet das Avidin-Biotin-System. Für diese Arbeit wurde das ABC-Kit (Vector Laboratories) mit biotinyliertem HRP verwendet.

Biotingekoppelte sekundäre Antikörper können Avidin binden, und das mit einer höheren Affinität, als die besten Bindungsaffinitäten von Antikörpern zu ihren Antigenen. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, kann also weitere Biotinmoleküle binden. Gibt man zu biotingekoppelten Antikörpern ein Gemisch aus Avidin und biotinyliertes HRP, so bilden sich große HRP-Biotin-Avidin-Komplexe, die eine erhebliche Signalverstärkung bewirken können (Lidell und Weeks, 1996).

Als Substrat für HRP dient Diaminobenzidin (DAB). Bei der Reaktion, die unter Zusatz von H_2O_2 stattfindet, entsteht ein braunes Präzipitat.

Fluoreszenzmarker:

Fluoreszierende Antikörper haben Konjugate (in dieser Arbeit verwendet Cy2, Cy3 und Cy5), die durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge zur Emission angeregt werden. Die Möglichkeiten zur Dokumentation von Fluoreszenzantikörperfärbungen wurden durch Einführung der konfokalen Laserscanmikroskopie so weit verbessert, dass sich der Einsatz von fluoreszierenden Antikörpern zur Untersuchung von Verteilungen und Feinstrukturen in jedem Fall lohnt.

3.2.7.1 Blocken (nur bei HRP-Färbung)

Vor der Antikörperfärbung werden die Präparate 30 Minuten in Blocking-Lösung bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Die in der Blocking-Lösung enthaltenen Proteine sättigen unspezifische Epitope der Antikörper ab, wodurch die Hintergrundfärbung erniedrigt wird.

3.2.7.2 Inkubation der primären Antikörper

Ist nachfolgend eine HRP-Reaktion geplant, so werden die Antikörper in Blocking-Lösung inkubiert. Werden fluoreszierende sekundäre Antikörper benutzt, werden die Antikörper in PBT inkubiert. Die Inkubation erfolgt bei der entsprechenden Konzentration der Antikörper unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C. Es folgt dreimaliges Spülen und eine Stunde Waschen in PBT.

3.2.7.3 Inkubation der sekundären Antikörper

Die sekundären Antikörper werden in der erforderlichen Konzentration für 3-4h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird dreimal mit PBT gespült.

Bei der Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern empfiehlt es sich, die Blockschälchen sowohl bei der Inkubation, als auch beim nachfolgenden Waschen in einer mit Aluminiumfolie abgedunkelten feuchten Kammer durchzuführen, damit die Fluoreszenz nicht schon durch einstrahlendes Licht ausgebleicht wird.

3.2.7.4 Nachweisreaktionen

Fluoreszenzmarker:

Für fluoreszenzgekoppelte Antikörper ist keine weitere Nachweisreaktion nötig.

HRP:

Zu 300µl PBT werden jeweils 4 µl der Lösungen A (Avidin-Lösung) und B (Lösung mit biotinyliertem HRP) aus dem ABC-Kit gegeben und für 30-60 min leicht geschüttelt. Danach wird diese Lösung auf die Präparate gegeben und für eine weitere Stunde auf den Schüttler gelegt. Es folgt dreimaliges Spülen und 5 Minuten Waschen in PBT.

250µl DAB-Stammlösung werden mit 250µl PBT verdünnt und 0,5µl H₂O₂ zugegeben. Diese Lösung wird sofort auf die Präparate aufgegeben. Die

Färbungsreaktion setzt meist unmittelbar ein und kann an einer Rotfärbung der Präparate erkannt werden. Ist die Färbung stark genug, wird die DAB/PBT-Lösung abgezogen 450µl PBT und 50µl 38%iges Formaldehyd zum Abstoppen der Färbereaktion zugegeben. Nach 5 Minuten folgt dreimaliges Spülen und 5 Minuten Waschen in PBT.

3.2.8 Einbetten der Präparate

Fluoreszenzpräparate:

Die Larven werden in 70%iges Glycerol überführt. Im Glycerol werden sie auf Objektträger überführt. Interessiert nur das Bauchmark, werden alle anderen Gewebe mit Hilfe feiner Präpariernadeln entfernt. Jedes einzelne Bauchmark wird dann vorsichtig aus dem Glycerol geschoben und so ausgerichtet, dass die dorsale Seite nach oben zeigt.

Präparate vollständiger Larven werden so hingelegt, dass sie alle die gleiche Orientierung haben. Unter Umständen empfiehlt es sich, das Bauchmark aus seiner Position in der geöffneten Larve zu entfernen und oberhalb von ihr zu positionieren.

Danach wird das Glycerol abgesaugt und durch kleine Tropfen des Anti-Quenching-Mediums von Vectashield ersetzt. Dann wird ein Deckglas auf die Präparate gelegt. Überschüssiges Einbettungsmedium wird vorsichtig mit etwas Toilettenpapier oder einem Stück Papiertaschentuch abgesaugt. Das Deckgläschen wird an seinem Rand mit handelsüblichem Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

Fluoreszenzpräparate sollten immer in einer nicht transparenten Box im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Andere Präparate:

Die Präparate werden ebenfalls in 70%iges Glycerol überführt und dann genauso bearbeitet wie Fluoreszenzpräparate. Nur die Überführung in Vectashield Anti-Quenching-Medium unterbleibt. Die fertigen Präparate können bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.2.9 Dokumentation

Mikroskopische Bilder von HRP-Präparaten wurden digitalisiert und auf einem McIntosh Computer mit Adobe Photoshop weiter bearbeitet. Hierbei wurden mehrere Focusebenen des gleichen Präparats aufgenommen, in einem Bilddokument montiert und zusammengefasst.

Fluoreszenzpräparate wurden am konfokalen Laserscanmikroskop dokumentiert. Die digitalen Bilder wurden dann entweder mit Leica-Scanware oder mit Adobe Photoshop weiter bearbeitet. Hierbei wurden meistens zahlreiche Focusebenen des gleichen Präparats aufgenommen und in einem Bilddokument kombiniert. Leica Scanware bietet auch die Möglichkeit, die digitalen Bilder so zu verarbeiten, dass dreidimensionale Modelle des gescannten Präparats entstehen. Für manche Bilder wurde diese Funktion verwendet um verschiedene Ansichten auf das gleiche Präparat zu ermöglichen.

3.2.10 Quantitative Analyse

Um die Anzahl der Output-Synapsen bei wildtypischen und *kak*-mutanten Transplantationsklonen zu vergleichen, wurden in den Transplantationsklonen Regionen ausgewählt, in denen Output-Synapsen nicht zu dicht beieinander lagen. Leica Scanware wurde benutzt, um jede einzelne der konfokalen Ebenen, mit denen die Transplantationsklone dokumentiert wurden, zu analysieren. Die Region, in der die Output-Synapsen gezählt wurden, wurde nachfolgend in Adobe Photoshop mit dem Auswahlwerkzeug umfahren und die Anzahl der in ihr enthaltenen Pixel über die Histogramm-Funktion festgestellt. Um diese Daten zu normalisieren wurde diese Zahl durch die Anzahl der Pixel geteilt, die man erhält, wenn man die Pixellänge des Neuropildurchmessers in den jeweiligen Präparaten quadriert.

4 Ergebnisse

4.1 Strukturierter Aufbau des Nervensystems von *Drosophila melanogaster*

Das Bauchmark von *Drosophila* ist ein durchgehendes Gewebe, das sich aus Neuronen und Gliazellen zusammensetzt. Die ursprünglich segmentale Organisation dieses Gewebes lässt sich auch im späten Embryo noch erkennen. So finden sich pro Neuomer, dem einem Segment entsprechenden Abschnitt des Bauchmarks, zwei Kommissuren und eine je nach Nomenklatur variierende aber von Segment zu Segment gleiche Anzahl von Nervenwurzeln.

Auch auf zellulärer Ebene ist jedes Neuomer fast gleichartig aufgebaut. In jedem Neuomer findet sich eine nahezu identische Anzahl von Neuronen, von denen jedes eine typische Position einnimmt und auf reproduzierbare Art und Weise mit einem einzigen Fortsatz, also unipolar, ins Neuropil (zellkörperfreie Region des ZNS) projiziert.

Ähnlich wie die Position der Zellen im Kortex, ist der Verlauf ihrer Fortsätze oder Neuriten im Inneren des Neuropils reproduzierbar. Festgelegt wird dieser Verlauf unter anderem durch Adhäsionsmoleküle, die dafür sorgen, dass sich bestimmte Neuriten finden und gemeinsam, als so genannte Faszikel durch das Neuropil verlaufen. Ein solches Adhäsionsmolekül ist FASCICLIN2 (FAS2; Harrelson und Goodman, 1988). Dieses Molekül findet sich auf mehreren Faszikeln, die longitudinal durch das ganze Bauchmark laufen (siehe Abb. 4.1C - C").

Das Neuropil ist die Region des Bauchmarks, in der sich Synapsen finden. Um festzustellen, ob die reproduzierbare organisatorische Struktur des Bauchmarks auf zellulärer Ebene sich auch in der Organisation synaptischer Regionen niederschlägt, wurde die Lokalisation präsynaptischer Proteine an wildtypischen Bauchmarken analysiert. Die Proteine SYNAPSIN (SYN) und SYNAPTOTAGMIN (SYT) sind mit Vesikeln assoziiert, den membranumhüllten subzellulären Organellen, die Transmitter zur aktiven Zone der Output-Synapse befördern. Antikörperfärbungen gegen diese beiden Proteine zeigen, dass präsynaptische Strukturen im gesamten Neuropil des Bauchmarks in großer Zahl und hoher Dichte vorkommen (Abb. 4.1A, B). Die Doppelfärbungen von SYN und SYT geben dabei Anlass zu der Vermutung, dass sich in allen SYN-positiven Strukturen auch SYT nachweisen lässt und umgekehrt. In

dieser scheinbar homogenen Färbung lassen sich jedoch auch segmental wiederholte Strukturen erkennen, in denen keiner der beiden präsynaptischen Marker nachzuweisen ist. So finden sich kleine Löcher im ventralen Anteil des Neuropils ebenso wie transversale Lücken (Abb. 4.1A). Des Weiteren lassen sich longitudinale Kanäle erkennen, die ebenfalls keinen der beiden präsynaptischen Marker exprimieren (Abb. 4.1B).

Aufschluss über die Natur dieser longitudinalen Kanäle gibt ein weiteres Experiment. Eine Doppelfärbung gegen FAS2 und SYT zeigt keinerlei oder kaum Überlagerung dieser beiden Proteine entlang der longitudinalen FAS2-Faszikel (Abb. 4.1C - C"). Dies zeigt, dass FAS2-positive longitudinale Faszikel nur rein präsynaptische und/oder Synapsen-freie Neuriten enthalten.

Das Vorhandensein reproduzierbar präsynapsenfreier Strukturen im Neuropil zeigt, dass es bestimmte Neuriten oder Abschnitte auf Neuriten gibt, die frei von Output-Synapsen sind. Es gibt also Regionen, in denen über intrinsische oder extrinsische Informationen die Bildung von Output-Synapsen auf Neuriten unterdrückt oder ermöglicht wird. Diese Beschränkung von Output- und/oder Input-Synapsen auf bestimmte Regionen der Projektionen einzelner Neuronen oder Neuronengruppen wird im Folgenden als Kompartimentierung bezeichnet.

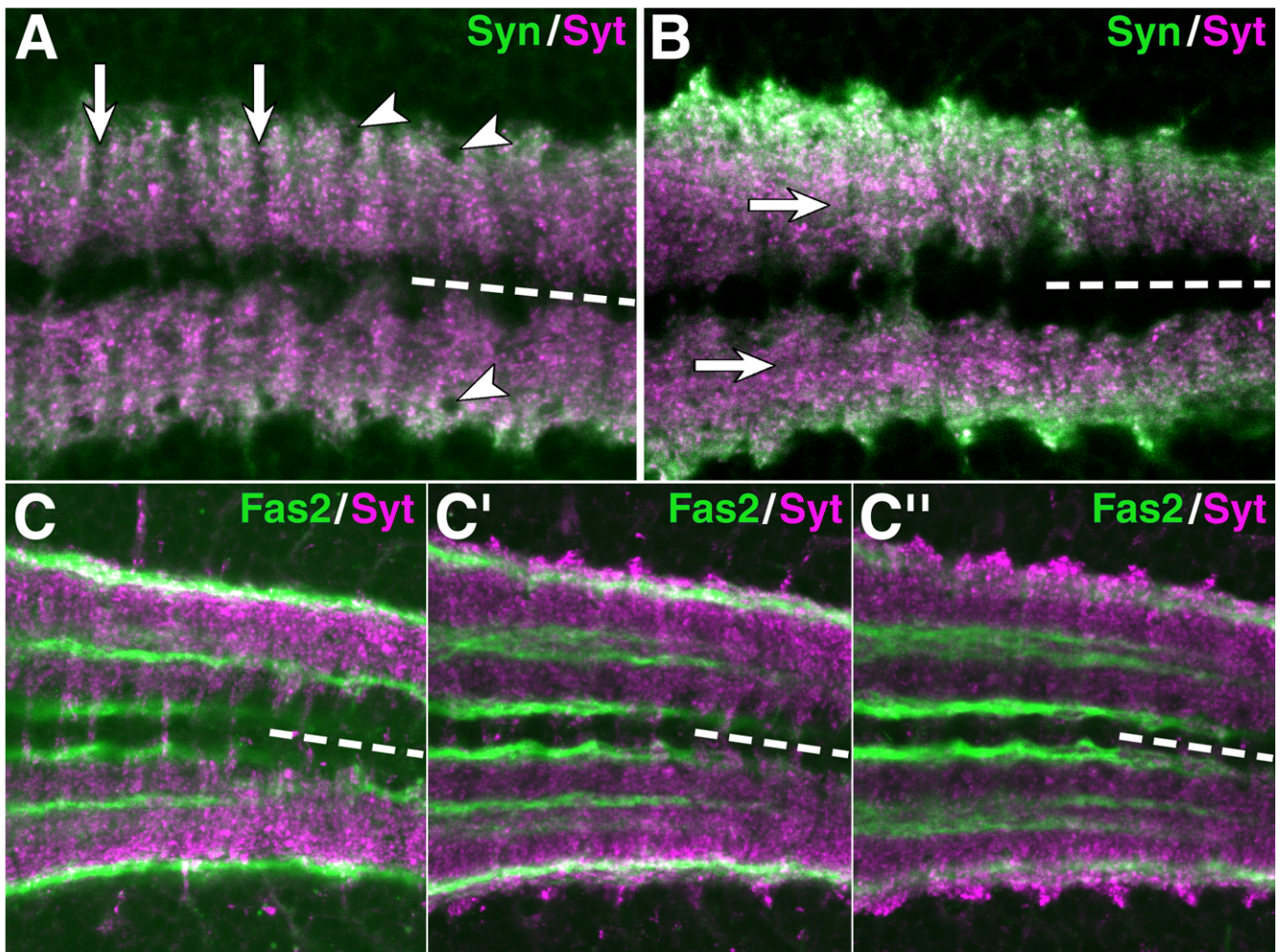
In den folgenden Abschnitten werden teils sehr detaillierte Beschreibungen über die Lage von Zellen, Neuriten und Synapsen innerhalb des Bauchmarks bzw. des Neuropils gemacht. Die hierfür verwendete Nomenklatur wird in Abb. 4.2 erläutert.

Abb. 4.1 Verteilung von Synapsen im Neuropil von *Drosophila*.

A - C": Dorsale Aufsicht auf Bauchmarks von Embryonen im späten Stadium 17. Dorsale Aufsicht, anterior links, lateral oben. Weiße unterbrochene Linie: Mittellinie. Antikörperfärbungen gegen SYT (magenta) in A - C", SYN (grün) in A, B und FAS2 (grün) in C - C".

Die Muster der beiden präsynaptischen Marker SYN und SYT zeigen bis auf Intensitätsunterschiede fast völlige Übereinstimmung (A, B). Innerhalb des Neuropils treten sich segmental wiederholende Strukturen auf, die nicht gefärbt sind. So lassen sich im ventralen Neuropilbereich Löcher (weiße Pfeilköpfe in A) und transversale Spalten (weiße Pfeile in A) entdecken. Zusätzlich sind auch schwer darstellbare longitudinale Kanäle zu erkennen (z. Bsp. weiße Pfeile in B). Diese finden sich in allen dorso-ventralen Abschnitten des Neuropils und exprimieren das Adhäsionsmolekül FAS2 (gezeigt für drei verschiedene Ebenen aus dem dorsalen Neuropilbereich in C - C"). Scheinbare Überlagerung von SYT und FAS2 in Teilen dieser Kanäle betreffen meist die Peripherie oder sind durch die Darstellung bedingt.

Abb. 4.1



4.2 Expression synaptischer und neuritischer Marker mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems

Um auf zellulärem Niveau festzustellen, ob eine Kompartimentierung innerhalb der Neuriten erfolgt, verwendeten wir zunächst das UAS/Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993). Für diese Methode nutzt man sogenannte *Gal4*-Stämme und *UAS*-Stämme von *Drosophila*. In *Gal4*-Linien ist das Gen für den Transkriptionsfaktor GAL4 aus Hefe eingebracht worden und steht unter der Kontrolle zellspezifischer Enhancer. In *UAS*-Linien ist wiederum ein Gen von Interesse (wie zum Beispiel ein Marker für Output-Synapsen) eingebracht, der unter der Kontrolle des ebenfalls aus der Hefe stammenden *UAS*-Enhancers steht. Der *UAS*-Enhancer wird aktiviert, wenn GAL4 an ihn bindet. Verkreuzt man *UAS*- und *Gal4*-Stämme miteinander, resultiert dies in einer spezifischen Expression des *UAS*-kontrollierten Gens in allen Zellen, in denen GAL4 exprimiert wird. Diese Methode erlaubt also die gezielte Expression von Genen in bestimmten Zellen (siehe 3.2.6).

Über die Expression markierter synaptischer Proteine mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems erhofften wir prä- und/oder postsynaptische Strukturen auf den Neuriten einzelner Neurone sichtbar zu machen (siehe 4.2.2, 4.2.3).

Eine Möglichkeit vollständige Neuriten auf synaptische Spezialisierung zu untersuchen, bot die Expression von Markern, die sich bevorzugt in post- oder präsynaptisch spezialisierten Zellfortsätzen finden (siehe 4.2.4).

4.2.1 Gal4-Linien

Für diese Versuche war es zunächst wichtig, geeignete *Gal4*-Linien zu finden. Diese sollten in möglichst wenigen Zellen im ZNS von späten *Drosophila*-Embryonen exprimieren. Hierbei offenbart sich schon ein Nachteil dieser Methode, denn wir konnten nur wenige Linien finden, die diese Bedingung erfüllen.

Folgende Linien wurden für die Expression unterschiedlicher synaptischer Marker verwendet:

- *apterous-Gal4* (*ap-Gal4*; Calleja et al., 1996) ist eine *Gal4*-Linie die nur in Interneuronen GAL4 exprimiert und zwar in zwei bis drei Zellen pro abdominales Hemineuromer. Die Neurone liegen lateral im Kortex und projizieren

über ihren primären Neuriten ins Neuropil. Im Abdomen gehen von den primären Neuriten im lateralen und intermediären Bereich des Neuropils kleine longitudinale Seitenneuriten ab, bevor sie sich im medialen Bereich in einem longitudinalen Faszikel bündeln. Einige Neuriten projizieren auch nach kontralateral (O'Keefe et al., 1998).

- *even skipped^{RRK}-Gal4* (*eve^{RRK}-Gal4*) transgene Fliegen tragen ein Konstrukt, bei dem das *Gal4*-Gen unter die Kontrolle spezifischer Promotor-Elemente des *eve*-Gens gestellt wurde (Baines et al., 1999). In diesen Tieren wird GAL4 deshalb nicht in allen ZNS-Zellen exprimiert, die *eve* exprimieren sondern nur in einer Teilmenge von drei Neuronen pro Hemisegment. Es handelt sich dabei um die Motorneurone aCC und RP2 sowie das Interneuron pCC. Die Expression in pCC ist dabei häufig schwächer, als in den Motorneuronen (Abb. 4.3A).
- *even skipped^{RRC}-Gal4* (*eve^{RRC}-Gal4*) ist eine weitere Linie, in deren Genom ein ähnliches Konstrukt integriert ist wie in *eve^{RRK}-Gal4* (Baines et al., 1999). Auch diese Linie wurde getestet, aber da die Expression in ihr im Allgemeinen schwächer und pCC viel seltener nachweisbar war (Abb. 4.3B), beschränkten wir unsere Versuche auf *eve^{RRK}-Gal4*.

Abb. 4.2 Positionsangaben im Bauchmark von *Drosophila*

A: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des embryonalen/larvalen Bauchmarks von *Drosophila*. Dorsale Aufsicht, anterior ist links. Kortex (Zellkörperregion) in dunkelgrau, Neuropil in Hellgrau. Beispielhaft sind zwei neuronale Somata (graue Kreise) mit ihren Neuriten (schwarz, durchnummeriert von 1 bis 5) eingezeichnet. PK: posteriore Kommissur. AK: anteriore Kommissur. DVC: Dorsoventralkanal.

Ein Neurit heißt ipsilateral, wenn er in der gleichen Bauchmark-Hälfte verläuft, in der auch ihre Ursprungszelle liegt. Ein Neurit heißt kontralateral, wenn er in die dem Neuron gegenüberliegende Hälfte des Bauchmarks projiziert. In Bezug auf die eingezeichneten Neuronen liegen die Neuriten 1 und 4 ipsilateral, die Neuriten 2, 3 und 5 kontralateral.

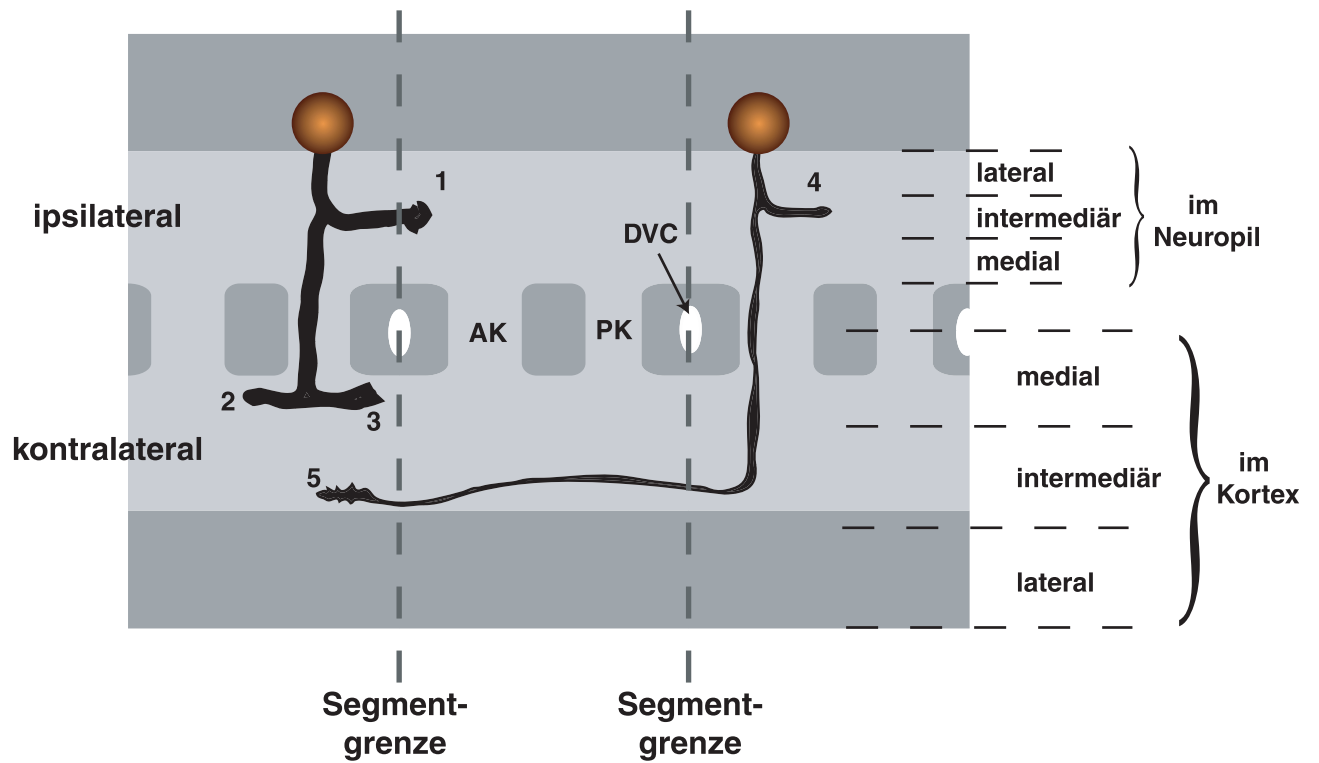
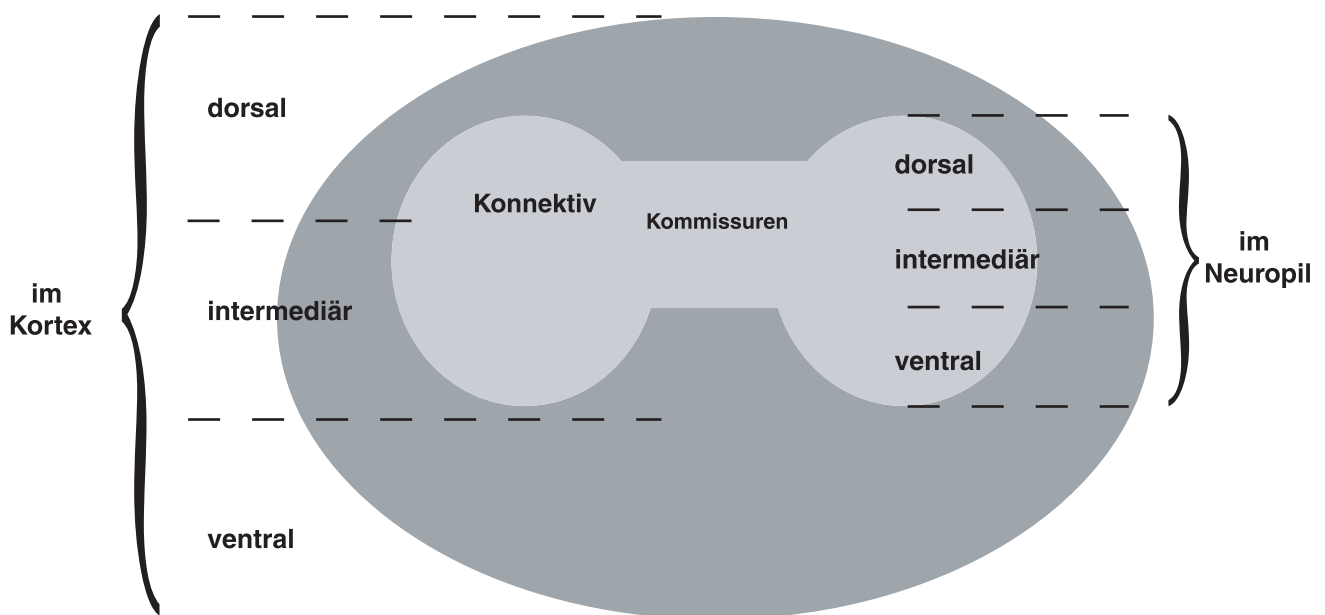
Ein Neurit heißt lokal, wenn er in dem Segment seiner Ursprungszelle verbleibt. Ein Neurit heißt intersegmental, wenn er über Segmentgrenzen hinweg projiziert. 2, 3 und 4 sind lokale Neuriten. 1 und 5 sind intersegmentale Neuriten.

Zur Angabe der medio-lateralen Lage von Neuriten wird das Neuropil in drei Bereiche eingeteilt: lateral, intermediär und medial. Analog wird zur Angabe der medio-lateralen Lage von Zellen im Kortex verfahren. Der Kortex wird in laterale, intermediäre und mediale Bereiche unterteilt.

B: Schematische Darstellung des embryonalen/larvalen Bauchmarks von *Drosophila*. Frontale Aufsicht, dorsal ist oben. Kortex in dunkelgrau, Neuropil in hellgrau.

Zur Angabe der dorso-ventralen Lage von Neuriten wird das Neuropil in drei Bereiche eingeteilt: dorsal, intermediär und ventral. Analog wird zur Angabe der medio-lateralen Lage von Zellen im Kortex verfahren. Der Kortex wird in dorsal, intermediär und ventral unterteilt.

Abb. 4.2

A**B**

- *Dopadecarboxylase-Gal4 (DDC-Gal4)* ist ein Konstrukt, bei dem das *Gal4*-Gen unter die Kontrolle spezifischer Promotor-Elemente des *Dopadecarboxylase*-Gens gestellt wurde (Li et al., 2000). Es exprimiert in fünf Motorneuronen pro Hemisegment, darunter befindet sich zumindest in den Segmenten T3 bis A4 ein efferentes Neuron (Prokop, in Vorbereitung).
- *MzVUM-Gal4* ist ein *Gal4*-Stamm, der bei einem Versuch in Mainz erzeugt wurde (Ito et al., 1995). Er exprimiert in mehreren Neuronen pro Hemisegment, darunter befinden sich auch die VUM-Motorneurone (Prokop, in Vorbereitung).

4.2.2 Verwendete UAS-Konstrukte

In unseren Experimenten wollten wir Synapsen auf Neuriten von einzelnen Zellen darstellen. Um sich einen Überblick über die Verteilung dieser Synapsen zu verschaffen war es jedoch unerlässlich, auch die gesamte Zelloberfläche mit allen Projektionen sichtbar zu machen. Deshalb war es zunächst notwendig Markermoleküle für eine Oberflächenmarkierung zu finden. Ein geeigneter Oberflächenmarker sollte es erlauben, einen Zellklon, der sich aus der transplantierten Zelle entwickelt, inklusive seiner feingliedrigen Fortsätze so gut wie möglich morphologisch darzustellen, ohne dabei Fehlentwicklungen zu verursachen. Marker, die zu ähnlichen Zwecken in *Drosophila* bereits eingesetzt wurden, sind die (Fusions-) Proteine TAU-LAC-Z, TAU-MYC, CD2 und mCD8-GFP. Gegen all diese Proteine existieren sehr gute kommerziell erhältliche Antikörper (siehe 3.1.1).

Die Marker TAU und CD2 schlossen wir allerdings von vornherein aus. Frühere Beobachtungen (zusammengefasst in Craig und Banker, 1994) und unsere eigenen Ergebnisse aus 4.2.4.2 zeigen, dass TAU aus vielen potenziell postsynaptischen Seitenästen ausgeschlossen wird. Ebenso bestätigten unsere Versuche die Beobachtungen von Williams et al. (Williams et al., 2000), dass ektopische Expression von TAU zu aberrantem Neuritenwachstum führen kann. Deshalb kann TAU als zuverlässiger genereller morphologischer Marker ausgeschlossen werden. CD2 ist ein Transmembranprotein aus der Ratte. Wir führten einige Versuche mit der Expression von *UAS-CD2* (Dunin-Borkowski und Brown, 1995) in *eve^{RRK}-Gal4* durch, die jedoch nicht zu einer nachweisbaren Expression führten (deshalb nicht gezeigt).

Ein weiteres Konstrukt, das für ein Fusionsprotein codiert, das als Zelloberflächenmarker genutzt werden kann, ist *UAS-mCD8-GFP* (Lee, 1999). mCD8-GFP repräsentiert eine mit GFP fusionierte Transmembrandomäne des CD8-Proteins aus Maus. Einerseits kann die Verteilung von mCD8 über die Fluoreszenz des GFP festgestellt werden. Eine weitaus sensitivere Möglichkeit zum Nachweis bietet jedoch ein sehr guter und kommerziell erhältlicher Antikörper gegen die mCD8 Transmembrandomäne. Von dem *UAS-mCD8-GFP*-Konstrukt existieren erst-, zweit- und drittchromosomale Insertionen in *Drosophila*, es ist also leicht kombinierbar mit anderen Insertionen oder Mutationen über klassisch genetische Kreuzungen. Ein Nachteil, der bei zu hoher Expression des Konstruktes auftritt, sind filopodiale Auswüchse vor allem von Seitenästen im ZNS und motorneuronalen Endigungen. Diese wurden vor allem in Larven beobachtet (A. Prokop, pers. Mitteilung), für embryonale Präparate haben wir jedoch keine derartigen Hinweise gefunden.

Um die Eigenschaften von *UAS-mCD8-GFP* als Zellmarker zu testen, kreuzten wir es in *eve^{RRK}-Gal4* ein und untersuchten die Expression von mCD8 im Bauchmark von L1-Larven. Die Färbung erwies sich als intensiv genug, um sowohl die Zellkörper als auch Axone und Neuriten deutlich zu erkennen (Abb. 4.4). Es bleibt allerdings zu bedenken, dass dieses Experiment keine Sicherheit bietet, dass mCD8 wirklich alle neuritischen Strukturen markiert.

Abb. 4.3 Vergleich der Expressionsmuster von *even-skipped-Gal4*-Linien

A, B: Dorsale Aufsicht auf Bauchmarks von Embryonen im späten Stadium 17. Anterior links, lateral oben. Antikörperfärbung gegen β -Galactosidase (Expressionsprodukt von *lacZ*). Schwarze unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Schwarze gebogene Pfeile: motorneuronale Faszikel von aCC und RP2; schwarze Pfeilköpfe: Seitenäste des primären Neuriten von aCC.

In *eve^{RRK}-Gal4/UAS-Tau-lacZ* (A) sind aCC und RP2 regelmäßig gefärbt. pCC ist nicht in allen Hemisegmenten zu sehen. In *eve^{RRC}-Gal4/UAS-Tau-lacZ* (B) ist nur aCC regelmäßig gefärbt. RP2 ist in den meisten Hemisegmenten zu sehen, pCC nur selten.

Abb. 4.4 mCD8 als Zelloberflächenmarker

A - C: Dorsale Aufsicht auf das Bauchmark von *Drosophila*-Larven. Anterior links, lateral oben. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie.

A: Expression von mCD8 im Bauchmark von L1-Larven von *eve^{RRK}-Gal4/UAS-mCD8-GFP*. Deutlich sind sowohl die Zellkörper von aCC und RP2 als auch die efferenten primären Projektionen (weiße gebogene Pfeile) sowie deren Seitenneuriten (weiße Pfeile) gefärbt.

B, C: Expression von mCD8 im Bauchmark von L1- (B) und L3-Larven (C) von *ap-Gal4/UAS-mCD8-GFP*. Alle Projektionen exprimieren stark mCD8. Die medialen longitudinalen Neuriten ("L") sind schon in L1-Bauchmarks stark ausgeprägt. Die intermediären und lateralen Neuriten entwickeln sich zum Großteil erst in späteren Larvalstadien (vergleiche weiße Pfeilköpfe und Pfeile in B und C).

Abb. 4.3

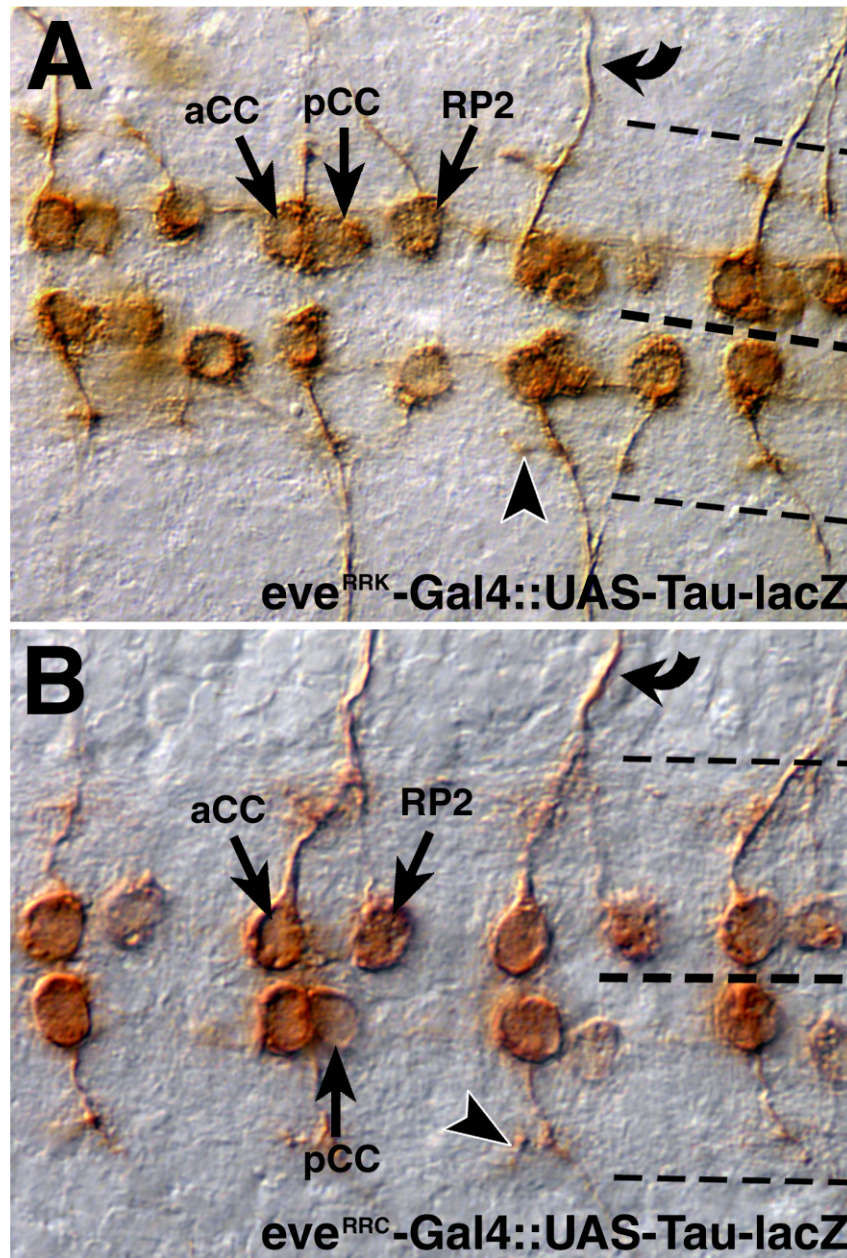
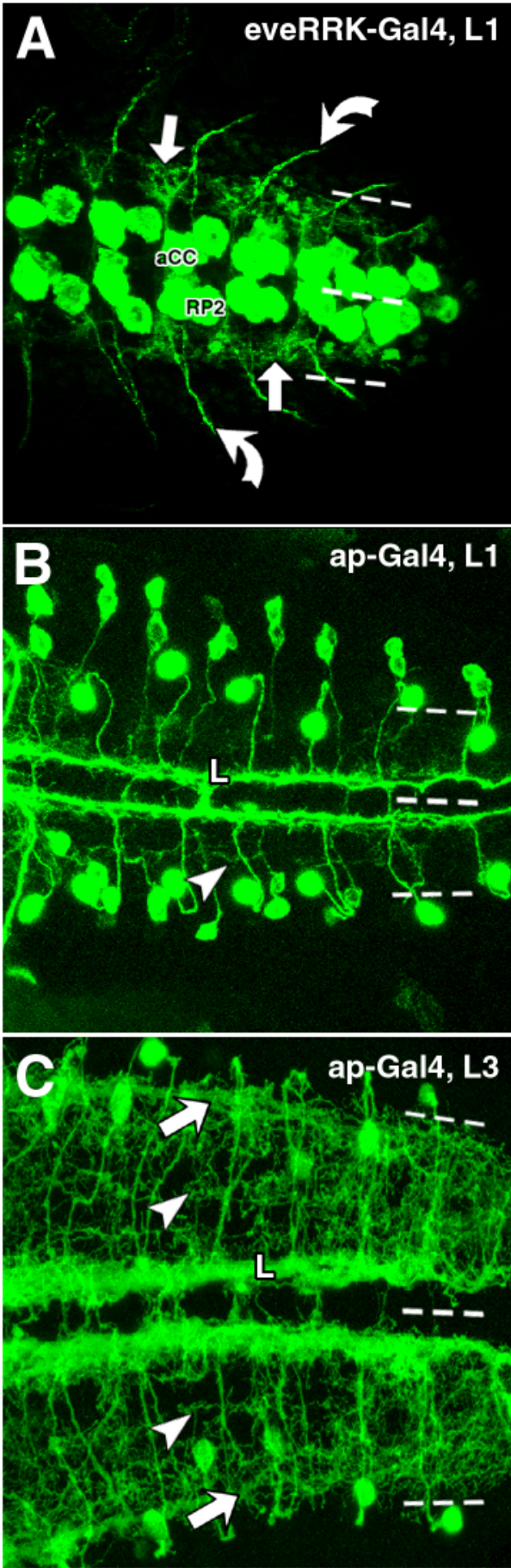


Abb. 4.4



Zur Expression synaptischer Proteine in neuronalen Zellen wurden mehrere Fliegenstämme mit UAS-Konstrukten benutzt. Die Konstrukte kodieren jeweils für ein Fusionsprotein aus einem synaptischen Protein und einem Markerprotein, das die Lokalisation des Gesamtproteins über eine Antikörperfärbung oder Eigenfluoreszenz ermöglicht. Zum einen verwendeten wir dabei Konstrukte, die schon zuvor für die Darstellung von Synapsen an der neuromuskulären Verbindung (NMJ, vom Englischen **neuromuscular junction**) oder im adulten Zentralen Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* benutzt worden waren. Zum anderen testeten wir eine Gruppe neuartiger Konstrukte auf ihre Verwendbarkeit in derartigen Fragestellungen.

Das erste verwendete Konstrukt war *UAS-Synaptotagmin-Hämagglutinin* (*UAS-Syt-HA*; Robinson et al., 2002). Das intrinsische SYNAPTOTAGMIN-Protein (SYT) wird rein präsynaptisch exprimiert. Es ist an der präsynaptischen Membran und der Membran synaptischer Vesikel lokalisiert, für deren Fusion es von Bedeutung ist (Pennetta et al., 1999). In *UAS-Syt-HA* ist das *Syt*-Gen mit dem Gen für das murine Hämagglutinin (HA) fusioniert. Der Nachweis des künstlich induzierten SYT-Proteins kann deshalb über Antikörperfärbung gegen HA erfolgen und auf dieser Weise von intrinsischem SYT unterschieden werden.

Als zweites Konstrukt stand *UAS-n-Synaptobrevin-GFP13,6* (*UNG13,6*) zur Verfügung. *UNG13,6* codiert für ein Fusionskonstrukt des synaptischen Vesikelproteins n-SYNAPTOBREVIN (n-SYB) mit dem **G**rün fluoreszierenden **P**rotein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Der Nachweis von n-SYB kann deshalb direkt über Fluoreszenzanregung erfolgen. Dieses Konstrukt wurde schon erfolgreich in ähnlichen Experimenten benutzt, bei dem es in adulten Pilzkörpern oder Riesen-Neuronen exprimiert wurde (Blagburn et al., 1999; Ito et al., 1998).

Des Weiteren wurde eine Gruppe von Konstrukten für **S**ynapsen-**a**ssoziierte **P**roteine (SAP) aus der Maus auf ihre Verwendbarkeit für die Darstellung von Synapsen im larvalen ZNS von *Drosophila* getestet: *UAS-SAP97⁰²-GFP*, *UAS-SAP97⁰¹-GFP* (Thomas et al., 1997b) und *UAS-SAP90⁰²-GFP* (Thomas, unveröffentlicht). SAP97 und SAP90 aus der Maus sind dem synaptischen *Drosophila* Protein DISCS LARGE (DLG) homolog und durch ektopische Expression dieser Proteine können *dlg*-mutante Phänotypen gerettet werden (Thomas et al., 1997b). Durch die Fusionierung mit GFP kann SAP direkt über Fluoreszenzanregung nachgewiesen werden.

Um zu testen, welches SAP-Konstrukte sich am ehesten für unsere Versuche eignet, wurden sie zunächst in *Mz1407-Gal4* eingekreuzt, einen Enhancer-Trap Stamm, der nahezu ubiquitär im embryonalen und larvalen ZNS exprimiert wird (Luo et al., 1994).

In *UAS-SAP90⁰²-GFP/Mz1407-Gal4* und in *UAS-SAP97⁰¹-GFP/Mz1407-Gal4* können neben einer Färbung im Neuropil auch zahlreiche gefärbte Zellkörper erkannt werden (Abb. 4.5A, B). In *UAS-SAP97⁰²-GFP/Mz1407-Gal4* dagegen ist nur eine schwache Hintergrundfärbung im Kortex vorhanden. Die Färbung im Neuropil erscheint gleichmäßig stark und spezifisch (Abb. 4.5C). Für unsere weiteren Versuche zur Darstellung von Synapsen fand auf Grund dieser Ergebnisse nur der *UAS-SAP97⁰²-GFP*-Stamm Verwendung.

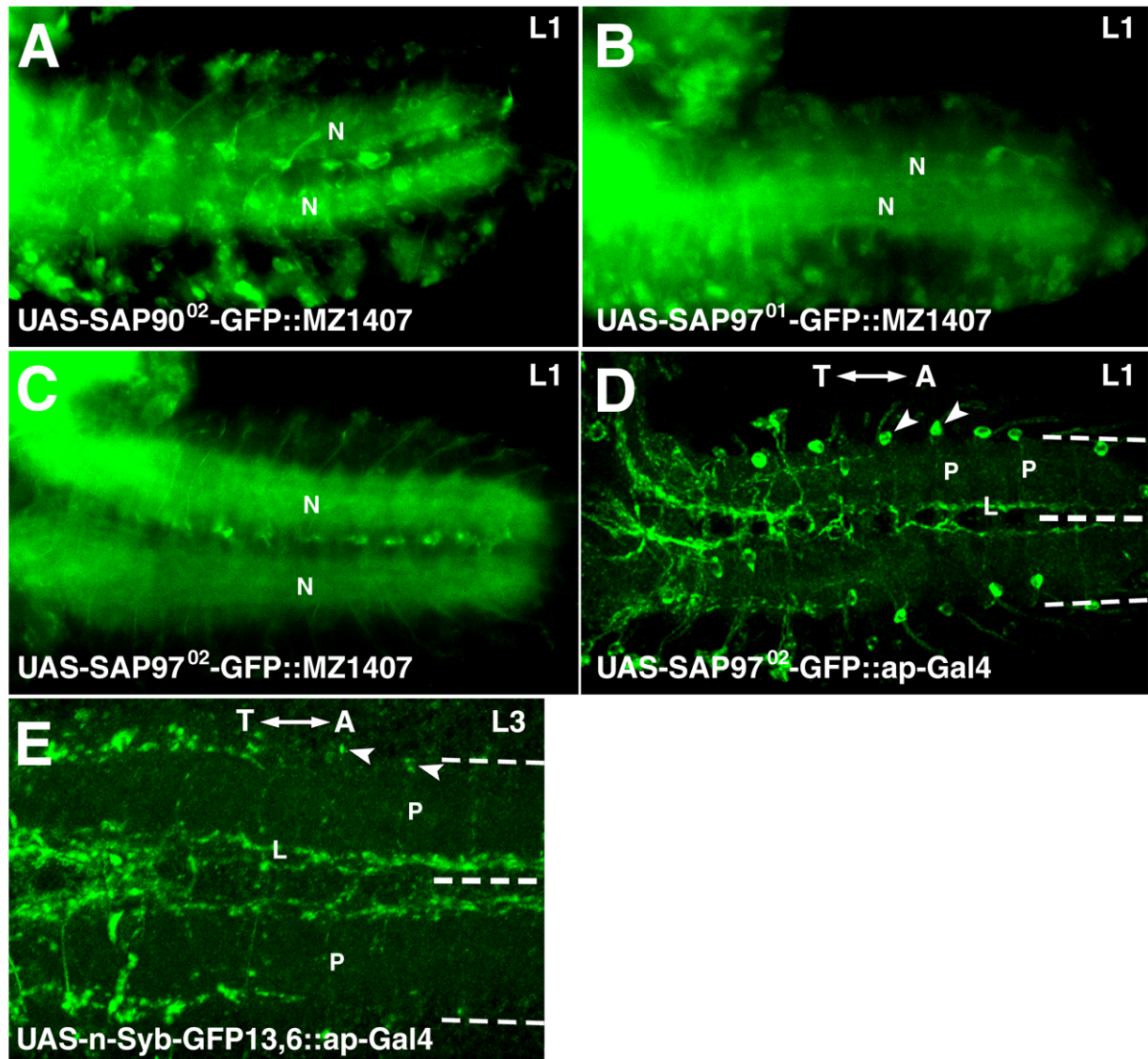
Abb. 4.5 Verteilung ektopisch exprimierter synaptischer Proteine im Neuropil

A - E: Dorsale Aufsicht (in B leicht nach lateral gekippt) auf Bauchmarks von L1- (A - D) und L3-Larven (E). Expressionsnachweis der synaptischen Proteine über Eigenfluoreszenz des fusionierten GFPs. Anterior links, lateral oben. Unterbrochene Linien in D und E markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. "T": Thorax; "A": Abdomen.

SAP90⁰¹ und *SAP97⁰¹* exprimieren in der annähernd panneuralen *Gal4*-Linie *MZ1407* im Neuropil ("N"), aber auch im umgebenden Kortex sind gefärbte Zellen auszumachen (A, B). *SAP97⁰²* exprimiert in *MZ1407* nur im Neuropil stark. Der Kortex ist schwach und homogen gefärbt (C). Bei Expression von *SAP97⁰²* in *ap-Gal4* (D), sind sowohl einzelne Zellen (weiße Pfeilköpfe), als auch die medialen longitudinalen Neuriten ("L") deutlich gefärbt. Die transversal verlaufenden primären Neuriten ("P") sind dagegen nur schwach GFP-positiv. Lateral und intermediär verlaufende longitudinale Neuriten sind im abdominalen Bauchmark nicht gefärbt (in diesem Stadium allerdings auch nur selten ausgeprägt, vergleiche Abb. 4.4B und C).

Bei der Expression von *n-SYB* in *ap-Gal4* (E) sind die Zellkörper nur schwach GFP-gefärbt, aber es gibt immer noch kleine Akkumulationen des ektopischen Proteinkonstrukts (weiße Pfeilköpfe) in ihnen. Die medialen longitudinalen Neuriten ("L") sind deutlich gefärbt. Die transversal verlaufenden primären Neuriten ("P") sind nur schwach GFP-positiv. Lateral und intermediär verlaufende longitudinale Neuriten sind im abdominalen Bauchmark nicht gefärbt (vergleiche Abb. 4.4C).

Abb. 4.5



4.2.3 UAS-Konstrukte synaptischer Proteine liegen in neuronalen Zellen in ektopischer Verteilung vor

Ziel unserer Versuch war es die Verteilung von Synapsen auf den Neuriten einzelner Neuronen im ZNS von *Drosophila* sichtbar zu machen. Dazu nutzten wir das UAS/Gal4-System und exprimierten markierte synaptische Proteine in bestimmten Neuronen. Die Markierung erlaubte uns das synaptische Protein über Antikörperfärbung oder Eigenfluoreszenz nachzuweisen.

Antikörperfärbungen von *UAS-Syt-HA* in *eve^{RRK}-Gal4* und *ap-Gal4* wurden zunächst mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Verstärkerkits und nachfolgender Diaminobenzidin-Färbung (DAB-Färbung) an Larven durchgeführt, die bei 26°C herangezogen wurden (Details siehe 3.2.7). Dabei zeigte sich im Bauchmark junger Larven (L1-Larve kurz nach Schlupf) keine spezifische Verteilung von SYT. Sowohl die Zellkörper als auch die Neuriten der *Syt-HA* exprimierenden Neurone weisen eine scheinbar homogene Verteilung des Fusionsproteins über Zellkörper, Axon und Seitenneuriten auf (Abb. 4.6A, H), obwohl wildtypisches SYT im ZNS nur im Neuropil und nicht im Zellkörper oder Axon nachweisbar ist (Abb. 4.1A).

Die ektopische Expression von Proteinen unter *Gal4*-Kontrolle, kann dazu führen, dass das ektopische Protein in zu großer Menge erzeugt wird und sich deshalb auf den gesamten Zellkörper verteilt. Das Volumen der Zellen nimmt im Laufe der Entwicklung zu und dies könnte zu einer spezifischeren Verteilung des Proteins führen. Deshalb wurde überprüft, wie sich die Verteilung von ektopischem SYT-HA in späteren Larvalstadien bei *eve^{RRK}-Gal4/UAS-Syt-HA*-Tieren verhält. In L2-Larven beobachtet man eine deutlich schwächere Färbung als in L1-Larven. Am prominentesten ist sie aber auch in diesem Stadium in den Zellkörpern und in den Axonen (Abb. 4.6C). In den axonalen Seitenneuriten ist sie hingegen nur noch selten sichtbar (Abb. 4.6C). In L3-Larven hingegen sind im Bauchmark nur noch Zellkörper SYT-HA-positiv (Abb. 4.6E).

Neben dem Alter hat auch Temperatur einen Einfluss auf die Stärke der Expression in UAS/Gal4-Systemen (Prokop, pers. Mitteilung). Deshalb wurden zusätzliche Antikörperfärbungen an *eve^{RRK}-Gal4/UAS-Syt-HA* Larven vorgenommen, die bei 18°C und 29°C aufgezogen wurden. Dabei fand sich bei einer Temperatur von 18°C keine feststellbare Färbung. Offensichtlich ist das *eve^{RRK}-Gal4*-Konstrukt bei dieser Temperatur zu schwach für eine nachweisbare Expression. Bei 29°C

wurden im ZNS von L1-, L2- und L3-Larven kaum Unterschiede zu den Ergebnissen bei 25°C festgestellt (Abb. 4.6B, C, F). In L2-Larven waren Seitenneuriten bei 29°C etwas deutlicher zu erkennen (Abb. 4.6C) und in L3-Larven konnten in manchen Hemisegmenten zusätzlich zu den Zellen die primären Neuriten gesehen werden (Abb. 4.6F).

Auch die Methode der Antikörperdetektion kann das Ergebnis beeinflussen. So besteht gerade bei DAB-Färbungen immer das Risiko einer Überfärbung. Deshalb wurde SYT-HA in einem weiteren, wiederum mit *eve^{RRK}-Gal4/UAS-Syt-HA* durchgeführten Versuch über fluoreszierende sekundäre Antikörper sichtbar gemacht. Auch bei dieser Färbung sind Zellkörper und Axone im Bauchmark von L1-Larven deutlich gefärbt (Abb. 4.6G). Allerdings erscheinen die Axone nicht so homogen wie in den DAB-Färbungen. Im Neuropil lassen sich in den motorneuronalen Seitenästen bei starker Vergrößerung zahlreiche punktförmige SYT-Färbungen erkennen. Die starke Färbung der Zellkörper und der Axone macht es jedoch auch hier unmöglich, echte präsynaptische Regionen von vermutlich durch die SYT-Überproduktion verursachten Artefakten zu unterscheiden.

Ein weiterer Faktor, der einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Ergebnisse von Antikörperfärbungen haben kann, ist die Wahl des Fixativs. Deshalb wurden bei *ap-Gal4/UAS-Syt-HA* neben mit Paraformaldehyd fixierten auch mit Glutardialdehyd fixierte Präparate analysiert. Die Art der Fixierung führte aber nicht zu unterschiedlichen Ergebnissen der Antikörperfärbung (vergleiche Abb. 4.6H und 4.5I).

Abb. 4.6 Verteilung von SYT-HA in neuronalen Zellen

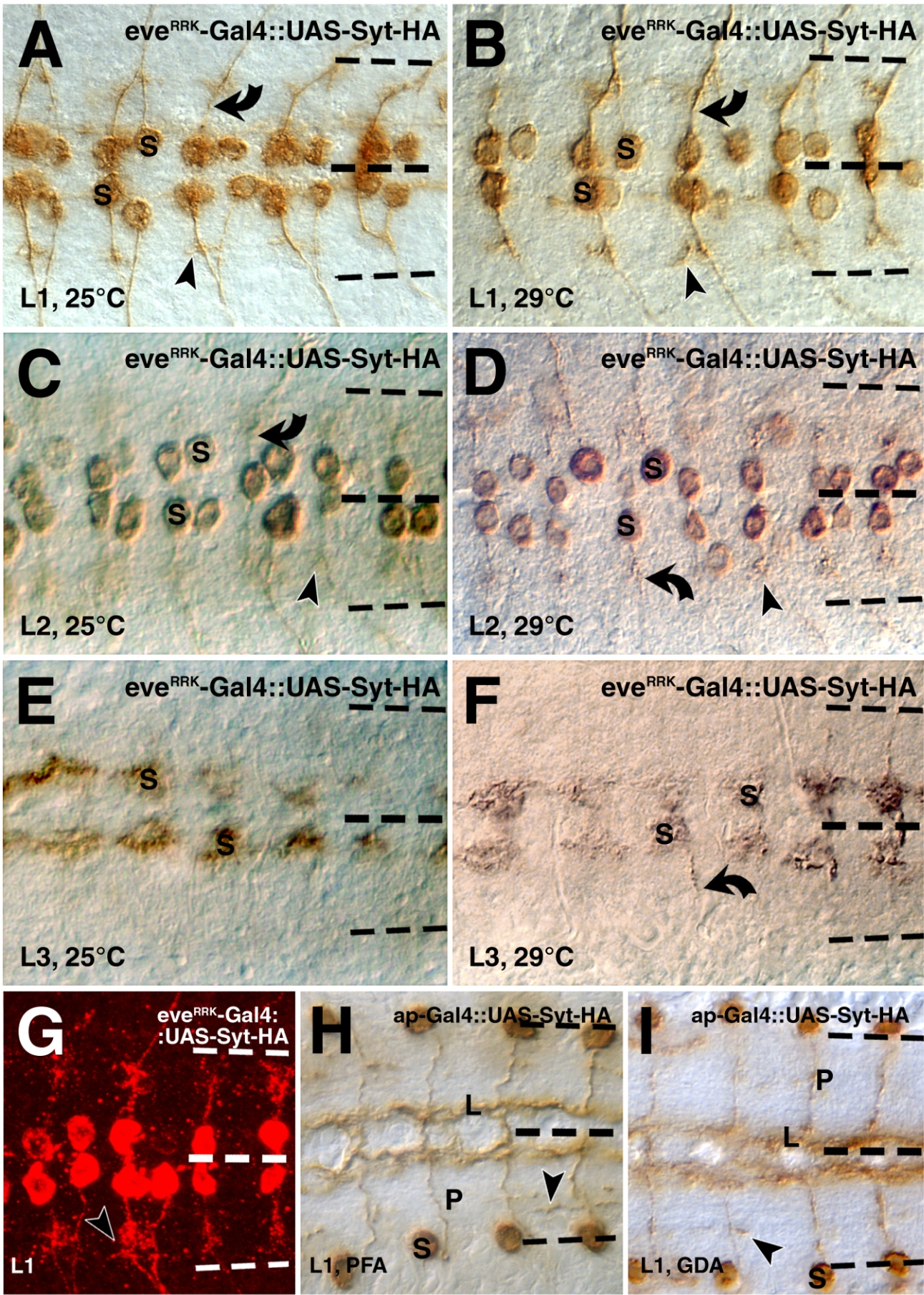
A - I: Dorsale Aufsicht auf Bauchmarks von *Drosophila*-Larven. Anterior links, lateral oben. Expressionsnachweis von SYT-HA in *eve^{RRK}-Gal4* (A - G) und *ap-Gal4* (H, I) über Antikörperfärbung gegen HA. Unterbrochene Linien in D und E markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie.

Die Verteilung von SYT-HA ist unabhängig von der Art des Antikörpernachweis (vergleiche HRP/DAB in A mit Fluoreszenz in G) und dem verwendeten Fixativ (Paraformaldehyd (PFA) vs. Glutardialdehyd (GDA); vergleiche H mit I). Eine Veränderung der Temperatur, bei der die Larven aufgezogen wurden hat ebenfalls nur geringfügige Unterschiede zur Folge (25°C vs. 29°C; vergleiche A, C, E mit B, D, F).

A - G: In *eve^{RRK}-Gal4* sind während aller Larvalstadien die Zellkörper deutlich gefärbt ("S"). Die primären Neuriten sind in L1- und L2-Larven meistens SYT-HA-positiv, in L3-Larven sind sie nur selten zu sehen (schwarze gebogene Pfeile). Seitenneuriten, die aus den primären Neuriten hervorgehen, sind nur in L1- und L2-Larven an den Ansätzen gefärbt (schwarze Pfeilköpfe; vergleiche Abb. 4.4A). In L3-Larven sind sie selbst bei 29°C nicht mehr zu sehen.

H, I: In *ap-Gal4* sind im Bauchmark von L1-Larven die Zellkörper ("S"), die transversalen primären Neuriten ("P") und die medialen longitudinalen Neuriten ("L") SYT-HA-gefärbt. Laterale und intermediäre longitudinale Neuriten sind hingegen nur gelegentlich zu beobachten (schwarze Pfeilköpfe, vergleiche Abb. 4.4B).

Abb. 4.6



Ähnliche Ergebnisse erhielten wir, wenn wir *UAS-SAP97⁰²-GFP* mit *ap-Gal4* verkreuzten. Dabei zeigt die GFP-Fluoreszenz klare Färbung im Zellkörper sowie entlang der primären Neuriten (Abb. 4.5D). Die stärkste Färbung tritt in den Neuriten auf, die longitudinal im medialen Neuropilbereich verlaufen, während die lateralen und intermediären Seitenneuriten keine *SAP97⁰²-GFP*-Färbung zeigen.

Scheinbar widerspricht sich dieses Ergebnis mit der Beobachtung, die bei der Verkreuzung von *UAS-SAP97⁰²-GFP* mit *Mz1407-Gal4* gemacht wurden. Dabei beobachteten wir starke GFP-Fluoreszenz nur im Neuropil und keine auffällige Färbung der Zellkörper (siehe 4.2.2). Grund für diesen scheinbaren Widerspruch könnte sein, dass in *UAS-SAP97⁰²-GFP /Mz1407-Gal4* das Neuropil durch seine kompakte Struktur so stark gefärbt erscheint, weil zahlreiche *SAP97⁰²*-positive Regionen sehr dicht beieinander liegen. Vor diesem starken Signal erscheint die Färbung der Zellkörper nur wie ein Hintergrundleuchten. In *UAS-SAP97⁰²/ap-Gal4* hingegen sind nur relativ wenige Neuriten zu sehen, deren Färbung insgesamt natürlich weniger intensiv ist. Deshalb könnte die Färbung der Zellkörper in diesem Fall deutlicher erkennen.

Die Expression von *UNG13,6* unter der Kontrolle von *ap-Gal4* im Bauchmark von L3-Larven zeigte ebenfalls eine starke Akkumulation von n-SYB-GFP in dem medialen longitudinalen Faszikel (Abb. 4.5E). Auch in den primären Neuriten außerhalb sowie innerhalb des Neuropils und in den Zellkörpern können vereinzelte n-SYB-GFP-Färbepunkte ausgemacht werden, jedoch weniger als mit den übrigen Konstrukten in L1-Larven. Wie mit den anderen Konstrukten bleiben die lateralen und intermediären Seitenneuriten frei von n-SYB-GFP.

Die ektopische Lokalisation synaptischer Protein-Konstrukte bei Expression über das UAS/Gal4-System macht es schwer, eindeutige Aussagen über synaptische Regionen zu machen. Trotzdem geben die Ergebnisse Anlass zu ersten Vermutungen. So ist das präsynaptische Konstrukt SYT-HA in L3-Larven von *eve^{RRK}-Gal4* nicht in den axonalen Seitenästen von aCC und RP2 vorhanden, aber an der NMJ von L3-Larven eindeutig in Output-Synapsen lokalisiert (Prokop pers. Mitteilung). Dies spricht dafür, dass es sich bei diesen motorneuralen Seitenästen um postsynaptische Strukturen handelt. Umgekehrt könnten die medialen longitudinalen Neuriten der *ap*-Neurone präsynaptisch sein. Darauf weist die starke Akkumulation von n-SYB-GFP und SYT-HA in diesen Strukturen hin. Postsynaptischer Natur könnten hingegen die weniger auffälligen lateralen und

intermediären longitudinalen Neuriten der *ap*-Neurone sein. Für diese Annahme spricht, dass in L3-Larven in diesen Strukturen kein n-SYB-GFP nachgewiesen werden konnte. Zu Bedenken bleibt, dass auch SAP97⁰²-GFP nicht in diesen Neuriten detektiert wurde, allerdings wurden die entsprechenden Versuche an L1-Larven durchgeführt, in denen diese Neuriten ohnehin nur geringfügig vorhanden sind.

4.2.4 Lokalisation neuritischer Marker in *Drosophila* Neuronen

Weiteren Aufschluss über die Verteilung von Synapsen in einzelnen Neuronen erhofften wir uns durch die Expression von Markermolekülen, von denen vermutet wird, dass sie sich bevorzugt in post- oder präsynaptisch spezialisierten Zellfortsätzen finden. Dazu benutzten wir die Konstrukte *UAS-homer-Myc* (Diagana et al., 2002) und *UAS-Tau-Myc* (Thor et al., 1999).

4.2.4.1 HOMER ist nicht spezifisch für postsynaptische Neuriten

Proteine der Homer-Familie werden in Vertebraten mit Synaptogenese, Signalweiterleitung und axonaler Wegfindung in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Xiao et al., 2000). Auch in *Drosophila* existiert ein HOMER-Homolog (Xiao et al., 1998). Diagana et al. (Diagana et al., 2002) kreuzten das Fusionskonstrukt *UAS-homer-Myc* in *eveRRC-Gal4* (vergleiche 4.2.1) und zeigten in L1-Larven, dass HOMER sich spezifisch in den vermutlich postsynaptischen Seitendendriten von aCC anreichert. Auch unsere Versuche zur Expression präsynaptischer Marker in *eve^{RRK}-Gal4* haben auf die vermutlich postsynaptische Natur dieser Seitenneuriten hingewiesen (siehe 4.2.3). Mit der Expression von HOMER-MYC in *eve^{RRK}-Gal4* wollten wir dieses Ergebnis weiter testen.

Unsere vorherigen Versuche lassen vermuten, dass bei ektopischer Expression über das UAS/Gal4-System Proteine um so spezifischer lokalisieren, je länger man dem Nervensystem Zeit lässt, sich zu entwickeln (siehe 4.2.3). Deshalb betrachteten wir die Verteilung von HOMER-MYC in Bauchmarks von L3-Larven. Um außerdem die Ergebnisse bei verschieden starker Expression miteinander vergleichen zu

können, wurden Larven bei unterschiedlichen Temperaturen aufgezogen. Für den schwachen Treiber *eve^{RRK}-Gal4* (siehe 4.2.3) wurden bei 25°C und bei 29°C aufgezogene Larven verwendet. Indem zusätzlich zu *UAS-homer-Myc* auch *UAS-mCD8-GFP* in die *Gal4*-Linien eingekreuzt wurde, konnte durch Antikörper-Doppelfärbung gegen mCD8 und MYC das vollständige Projektionsmuster der GAL4-positiven Neurone sichtbar gemacht werden und mit der Verteilung des HOMER-MYC-Proteins verglichen werden.

In *eve^{RRK}-Gal4* war bei 25°C nur in wenigen Zellen HOMER-MYC oder mCD8 nachweisbar. Gemeinsame Expression beider Proteine sahen wir fast ausschließlich in nicht segmental wiederholten Zellen des terminalen Neuromers (nicht gezeigt). Die Expression war deutlich stärker bei 29°C, deshalb werteten wir nur diese Präparate bezüglich der Verteilung von HOMER aus (Abb. 4.7A, A'). Interessanterweise gab es auch bei diesen Präparaten aCC-Neurone, in denen nur HOMER aber kein mCD8 nachweisbar exprimiert wurde. In manchen Präparaten sind auch die Projektionen von pCC HOMER-positiv, wogegen sie nie mCD8-gefärbt waren. Allerdings waren ebenso mCD8-positive Neuriten zu sehen, die kein HOMER exprimierten.

In *eve^{RRK}-Gal4* kann HOMER im Zellkörper von aCC, im primären Neuriten, im efferenten Axon und in den Seitenneuriten nachgewiesen werden (Abb. 4.7 A, A'). Im Widerspruch zu den von Diagana et al. (Diagana et al., 2002) gemachten Beobachtungen konnten wir in keinem Fall eine spezifische Lokalisation von HOMER in den aCC-Seitenneuriten feststellen. Im Gegenteil: Bei vereinzelt auftretenden Strukturen, die mCD8- aber keine HOMER-Färbung zeigen, handelt es sich um Seitenneuriten von aCC. Gegen die postulierte rein postsynaptische Lokalisierung von HOMER spricht auch, dass wir HOMER in den terminalen Verästelungen des Axons und den Synapsen der NMJ von aCC nachweisen konnten (Abb. 4.8A).

Um zu kontrollieren, ob die von Diagana et al. (Diagana et al., 2002) gemachten Beobachtungen sich vielleicht auf einen früheren Zeitpunkt beschränken, wurden auch Bauchmarks von *eve^{RRK}-Gal4/UAS-homer-Myc* L1-Larven untersucht. Auch in diesem Stadium war HOMER-MYC im Zellkörper und allen Neuriten von aCC und RP2 zu finden ebenso wie an den NMJs (Abb. 4.8E - F').

Um die Allgemeingültigkeit dieser Befunde zu testen, haben wir *UAS-homer-myc* und *UAS-mCD8* auch in anderen *Gal4*-Stämmen getestet. Auch in *ap-Gal4* und *MzVUM-Gal4* sind die meisten Neuriten sowohl CD8- als auch HOMER-positiv (Abb. 4.7B - C', F - G'). Einige Neuriten sind allerdings deutlich intensiver HOMER- als

mCD8-gefärbt. Wie auch in *eve^{RRK}-Gal4* konnte in den terminalen Verästelungen und an den NMJs der Motorneurone von *MzVUM-Gal4* HOMER nachgewiesen werden (Abb. 4.8C, D).

Nur bei *DDC-Gal4* können Strukturen beobachtet werden, die eindeutig frei von HOMER sind (Abb. 4.7D - E'). Dies betrifft vor allem die 18°C-Präparate, in denen die meisten Seitenneuriten im Neuropil und die efferenten Axone keine oder nur schwache HOMER-Färbung aufweisen (Abb. 4.7E, E'). Einige wenige, medial gelegene Neuriten sind stark HOMER-positiv. Bei ihnen handelt es sich vermutlich um die Seitenneuriten der *DDC-Gal4*-Motorneurone (A. Prokop, pers. Mitteilung). Die terminalen Verästelungen der DDC-Motorneurone sind ebenfalls nur schwach gefärbt. Im Gegensatz dazu sind die NMJs eindeutig HOMER-positiv (Abb. 4.8B).

Abb. 4.7 (Teil I und Teil II) Lokalisation von HOMER-MYC auf Neuriten des Bauchmarks in L3-Larven

A - G': Dorsale Aufsicht auf Bauchmarks von *Drosophila* L3-Larven. Anterior links, lateral oben. Antikörperfärbung gegen HOMER-MYC (magenta) und mCD8 (grün). Apostrophisierte und nicht apostrophisierte Abbildungen mit gleichem Buchstaben zeigen dasselbe Präparat. Nicht apostrophisierte Abbildung zeigt die Doppelfärbung, apostrophisierte Abbildung nur die HOMER-Färbung. Larven wurden bei unterschiedlichen Temperaturen aufgezogen (wie unten links angegeben). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie (aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in der apostrophisierten Abbildung). Weiße Symbole verweisen auf doppelt markierte Neuriten, schwarze Symbole verweisen auf Neuriten, denen einer der beiden Marker fehlt.

A, A': In *eve^{RRK}-Gal4* liegt im Zellkörper, in den primäre Neuriten (weiße gebogene Pfeile) und in den meisten Seitenneuriten (weiße Pfeilköpfe) HOMER-MYC-Färbung vor. In manchen Segmenten sieht man nur mCD8-gefärbte Seitenneuriten (schwarze Pfeile), obwohl die entsprechenden Zellen doppelt gefärbt sind. Projektionen von pCC sind immer nur HOMER-MYC-gefärbt (schwarze Pfeilköpfe). Einige Zellen exprimieren HOMER aber kein mCD8 (schwarzer gebogener Pfeil).

B - C': In *ap-Gal4* sind alle Zellkörper und Neuriten doppelt gefärbt. Allerdings unterscheiden sie sich in der Färbungsintensität. In den medialen longitudinalen Neuriten ("L") ist HOMER-MYC viel deutlicher als in den intermediären longitudinalen Neuriten (weiße Pfeilköpfe). Unter den lateralsten Neuriten sind einige zu entdecken, deren mCD8-Färbung kaum nachweisbar ist, während sie deutlich HOMER-MYC-positiv sind (besonders auffällig in 26°C-Präparaten, schwarze Pfeilköpfe).

D - E': In *DDC-Gal4* exprimieren die Axone und primären Neurite (weiße gebogene Pfeile) in beiden Präparationen nur sehr schwach HOMER-MYC. In den zahlreichen Seitenneuriten und interneuronalen Neuriten gibt es hingegen deutliche Unterschiede zwischen den 25°C- und den 18°C-Präparaten. Bei 25°C sind sie eindeutig mCD8- und HOMER-MYC-gefärbt, wobei letztere intensiver ist (weiße Pfeilköpfe in D, D'). Bei 18°C sind diese Neuriten bis auf wenige, medial gelegene Ausnahmen (weiße Pfeilköpfe in E, E') nur mCD8-positiv (schwarze Pfeile in E, E'). Bei den medialen, HOMER-positiven Neuriten handelt es sich vermutlich um motorneuronalen Seitenneuriten (A. Prokop, unveröffentlicht).

F - G': In *MzVUM-Gal4* sind die meisten Strukturen doppelt gefärbt (weiße Pfeilköpfe und weiße gebogene Pfeile). Insbesondere bei den 25°C-Präparaten fallen reproduzierbar einige transversale und longitudinale Neuriten auf, die nur HOMER-MYC-positiv sind (schwarze Pfeilköpfe).

Abb. 4.7
Teil I

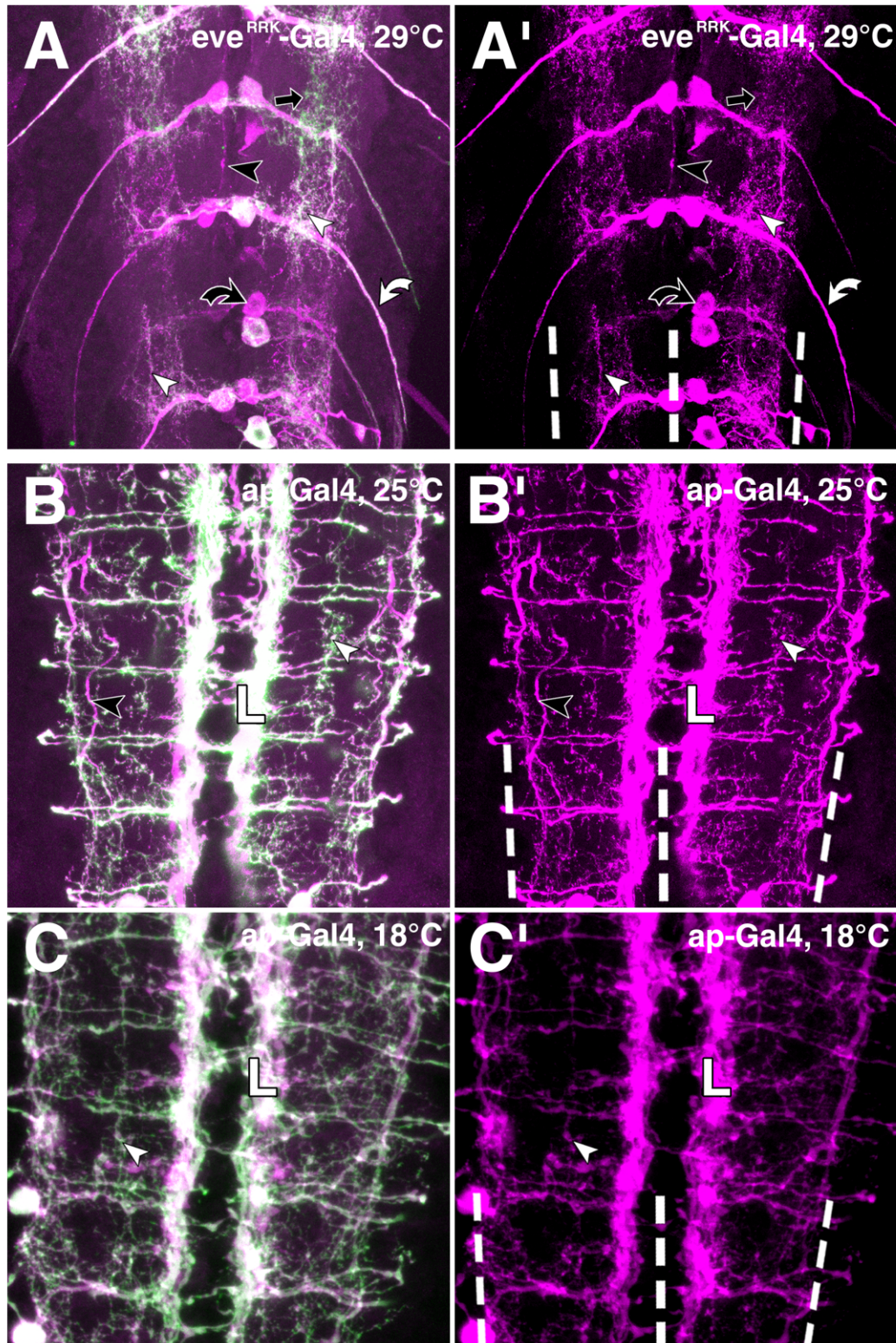
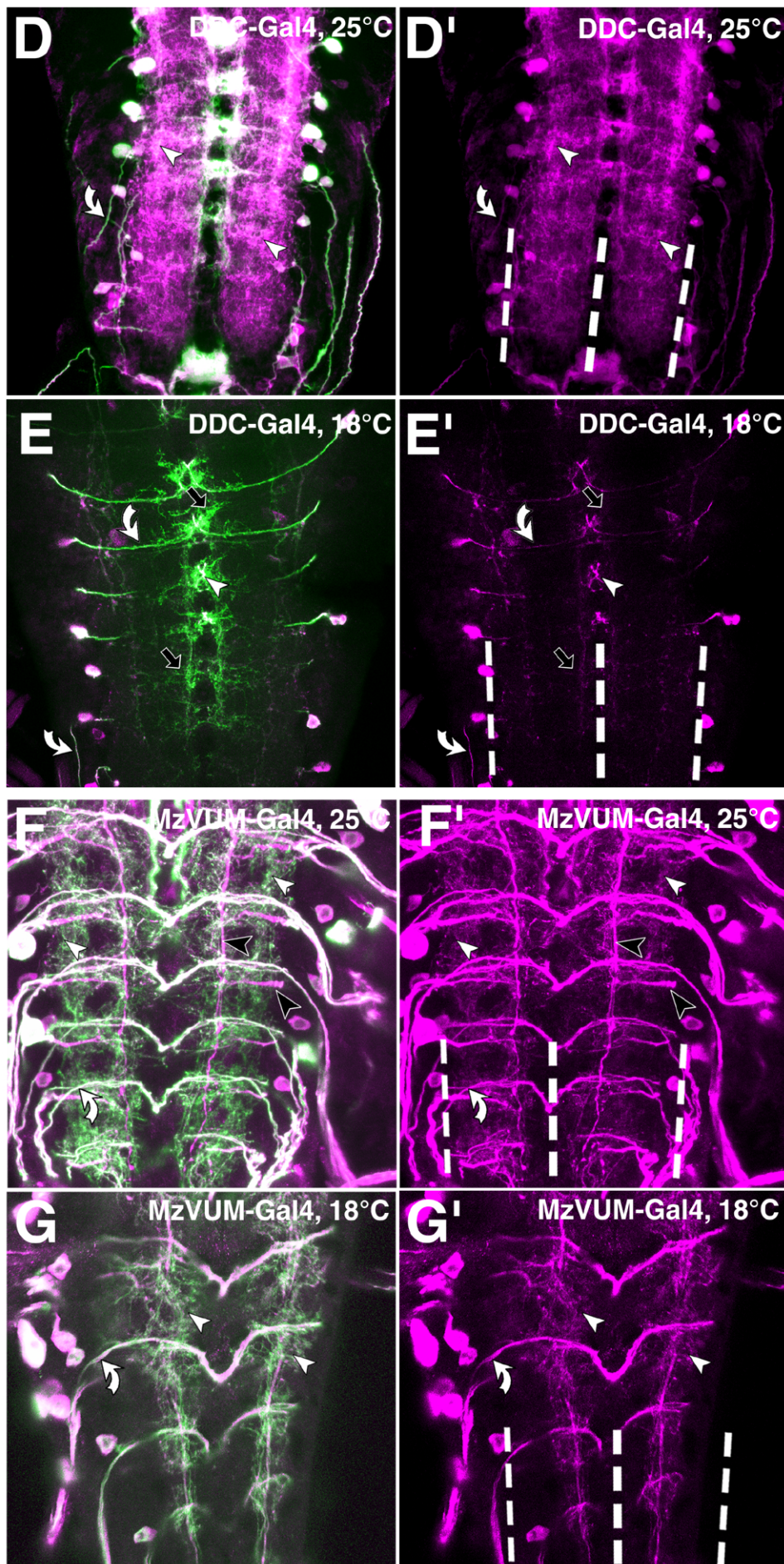


Abb. 4.7 Teil II



Diese Ergebnisse zeigen, dass zumindest in unseren Versuchen HOMER nicht spezifisch in potentiell postsynaptischen Neuriten lokalisiert. Wir konnten es im Gegenteil sogar in efferenten Axonen und präsynaptisch spezialisierten NMJs nachweisen. Als Marker für spezifische Neuriten eignet sich HOMER deshalb nicht. Da aber zumindest in L3-Larven spezifische neuritische Strukturen beobachtet wurden, die zwar HOMER aber kein mCD8 exprimierten, stellt sich die Frage, ob man nicht besser HOMER statt mCD8 als morphologischer Marker für Zellen einsetzt.

4.2.4.2 Ektopisch exprimiertes TAU lokalisiert in potentiell präsynaptischen Neuriten führt aber auch zu aberrantem Wachstum

TAU ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das sich auf Zellfortsätzen findet, aber auch im Zellkörper in ausreichender Menge vorhanden ist, um diesen bei Antikörperfärbungen sichtbar zu machen. Von Vertebraten ist bekannt, dass TAU nur in Axonen und nicht in Dendriten vorkommt (zusammengefasst in Craig und Banker, 1994). Eine ähnliche Kompartimentierung in Neuronen von Invertebraten kann nicht ausgeschlossen werden. Wir wollten testen ob TAU sich als spezifischer Marker für präsynaptische Neuriten in *Drosophila* eignet.

Zu diesem Zweck wurden *UAS-Tau-Myc*-Fliegen mit *eve^{RRK}-Gal4*- und *ap-Gal4*-Fliegen verkreuzt. Bei *eve^{RRK}-Gal4* wollten wir feststellen, ob TAU-MYC von den potentiell präsynaptischen Seitenneuriten des aCC-Motorneurons ausgeschlossen ist. Bei *ap-Gal4* interessierte uns die Verteilung von TAU-MYC auf die potentiell postsynaptischen intermediären bzw. lateralen und die potentiell präsynaptischen medialen longitudinalen Neuriten.

Analog zu 4.2.4.1 wurden bei unterschiedlichen Temperaturen aufgezogene L3-Larven untersucht (18°C und 25°C bei *ap-Gal4* bzw. 25°C und 29°C bei *eve^{RRK}-Gal4*). Auch hier zeigten sich bei den 25°C-Präparaten von *eve^{RRK}-Gal4* ähnliche Effekte wie bei HOMER-Expression. Fast alle gefärbten Zellen waren entweder nur mCD8-positiv oder nur TAU-MYC-positiv. Gemeinsame Expression von TAU-MYC und mCD8 sahen wir fast ausschließlich in nicht segmental wiederholten Zellen des terminalen Neuromers (nicht gezeigt). Deshalb waren die 25°C-Präparate von *eve^{RRK}-Gal4* nicht zur Auswertung geeignet.

Ebenfalls wie in 4.2.4.1 wurde *UAS-Tau-Myc* und *UAS-mCD8-GFP* in die *Gal4*-Linien eingekreuzt.

In *UAS-mCD8-GFP/UAS-Tau-Myc/ap-Gal4* fällt zunächst auf, dass die lateral und intermediär gelegenen longitudinalen Seitenäste der *ap-Gal4*-Neurone im Vergleich zum Wildtyp (WT) nur schwach ausgebildet sind (vergleiche Abb. 4.9A'' und B'' mit 4.8D). Vermutlich ist dieses aberrante Wachstum auf die Expression von TAU zurückzuführen. Solche Fälle von aberrantem Wachstum von Neuriten bei ektopischer Expression von TAU wurden schon zuvor festgestellt (Williams et al., 2000). Die medial gelegenen longitudinalen Neuriten scheinen von diesem Effekt nicht betroffen zu sein. Auch die axonalen Seitenneuriten von aCC in *UAS-mCD8-GFP/UAS-Tau-Myc/eve^{RRK}-Gal4* zeigen keine bemerkbaren Wachstumsstörungen (vergleiche Abb. 4.9C'' mit 4.8E).

Ein weiterer Unterschied zwischen medialen, intermediären und lateralen longitudinalen Neuriten der *ap-Gal4*-Neurone ergibt sich wenn man die Intensität der mCD8- und der TAU-MYC-Färbung vergleicht. Während TAU-MYC in den medialen und wenn vorhanden auch in den lateralen Neuriten genauso intensiv oder intensiver als mCD8 erscheint, ist das Verhältnis in den wenigen verbleibenden intermediären Seitenneuriten umgekehrt (Abb. 4.9A - B''). Ein vergleichbarer, aber weitaus auffälligerer Effekt ist bei *UAS-mCD8-GFP/UAS-Tau-Myc/eve^{RRK}-Gal4* zu beobachten. Während der Zellkörper und der primäre Neurit von aCC intensive TAU-MYC-

Abb. 4.8 Lokalisation von HOMER-MYC auf efferenten Projektionen

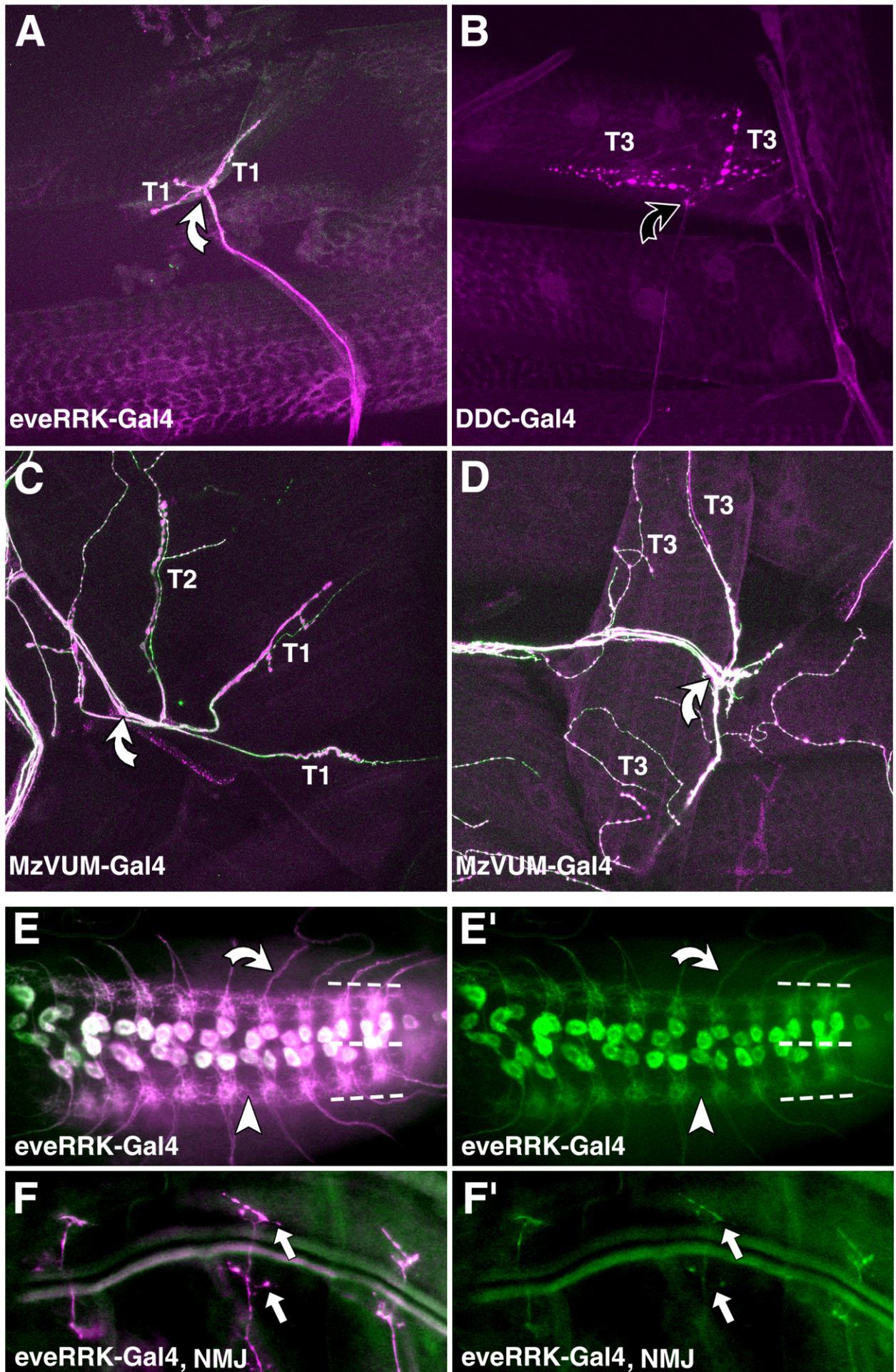
A - D: Lokalisation von HOMER-MYC an der NMJ von L3-Larven. Anterior links, dorsal oben. Antikörperfärbung gegen HOMER-MYC (magenta) und mCD8 (grün) in *eve^{RRK}-Gal4* (A), *DDC-Gal4* (B) und *MzVUM-Gal4* (C, D). Larven wurden bei 29°C (*eve^{RRK}-Gal4*) bzw. 25° C (sonst) aufgezogen.

NMJ's werden auf Grund morphologischer Kriterien in verschiedene Typen eingeteilt (T1, T2, T3 Budnik und Gramates, 1999). HOMER-MYC und mCD8 können in allen drei NMJ-Typen nachgewiesen werden. Auch die terminale Arborisation ist in *eve^{RRK}-Gal4* (A) und *MzVUM-Gal4* doppelt gefärbt (weiße gebogene Pfeile, schwächer in *eve^{RRK}-Gal4*). In *MzVUM-Gal4* ist HOMER-MYC nur noch sehr schwach auf der terminalen Arborisation feststellbar, mCD8 kann hier nicht nachgewiesen werden (schwarzer gebogener Pfeil in B).

E, E': Lokalisation von HOMER-MYC auf Neuriten im Bauchmark von L1-Larven von *eve^{RRK}-Gal4* (vergleiche Abb. 4.7A, A' für HOMER-Färbung in L3). Dorsale Aufsicht aufs Bauchmark. Anterior links, lateral oben. Antikörperfärbung gegen HOMER-MYC (magenta) und mCD8 (grün). Abb. E und Abb. E' zeigen jeweils die gleiche Ansicht, jedoch in E als Doppelfärbung und in E' nur die mCD8-Färbung. Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Larven wurden bei 29°C aufgezogen. Seitenneurite der motorneuronalen Projektionen (weiße Pfeilköpfe) sowie die Axone (weiße gebogene Pfeile) sind doppelt gefärbt.

F, F': Lokalisation von HOMER-MYC an der NMJ in L1-Larven von *eve^{RRK}-Gal4*. Abb. F und Abb. F' zeigen jeweils die gleiche Ansicht, jedoch in F als Doppelfärbung und in F' nur die mCD8-Färbung. Anterior links, dorsal oben. HOMER-MYC wird an den NMJs sehr viel intensiver exprimiert als mCD8 (weiße Pfeile).

Abb. 4.8



Färbung zeigen, sind die Seitenneuriten bis auf wenige Ausnahmen frei von TAU-MYC (Abb. 4.9C - C").

In manchen Präparaten können die longitudinalen Projektionen von pCC gesehen werden. Analog zum bei HOMER-MYC beobachteten Expressionsmuster (siehe 4.2.4.1), sind sie TAU-positiv aber niemals mCD8-gefärbt.

Trotz der offensichtlichen Wachstumsstörungen, von denen einige Neuriten bei Expression von TAU betroffen sind, erweist sich TAU-MYC als hilfreicher Marker. Die Experimente zeigen, dass TAU-MYC auch in Invertebraten-Neuronen differentiell exprimiert wird. Es lagert sich verstärkt im primären Neuriten von aCC und den *ap-Gal4*-Neuronen sowie den medialen und lateralen longitudinalen Seitenneuriten der *ap-Gal4*-Neurone an. Von anderen Seitenneuriten bleibt es nahezu ausgeschlossen. In Vertebraten findet man TAU nur in axonalen Strukturen, nicht in Dendriten. Die hier präsentierten Ergebnisse unterstützen deshalb unsere Vermutung, dass die medialen longitudinalen Neuriten in *ap-Gal4*-Neuronen präsynaptisch und die intermediären Seitenneuriten postsynaptisch sind. Analog sprechen diese Ergebnisse auch für die postsynaptische Natur der axonalen Seitenneuriten von aCC. Keine Aussage lässt sich über die lateralen longitudinalen Neuriten in *ap-Gal4* machen, von denen wir auch vermuten, dass sie postsynaptisch sind, in denen TAU-MYC aber exprimiert wurde.

4.3 Transplantationsexperimente

Ein Problem mit dem wir uns beim Einsatz der UAS/Gal4-Methode konfrontiert sahen, war das wir nicht die Verteilung intrinsischer sondern die ektopisch exprimierter synaptischer Proteine betrachteten. Die Tatsache, dass wir dabei synaptische Proteine im normalerweise synapsenfreien Kortex beobachten konnten (siehe 4.2.3), ließ Zweifel zu, ob diese Experimente Rückschlüsse auf die natürliche Verteilung von Synapsen im *Drosophila*-ZNS zulassen. Des Weiteren schränkte die geringe Anzahl an geeigneten *Gal4*-Stämmen den Nutzen dieses Systems weiter ein (siehe dazu auch 5.3).

Die Methode der Einzelzelltransplantation (Prokop und Technau, 1993) erlaubt es hingegen, die Verteilung von synaptischen Proteinen zu untersuchen, die unter natürlicher, intrinsischer Kontrolle exprimiert werden (siehe 3.2.5; Abb. 3.1). Des

Weiteren ist man bei diesen Experimenten nicht auf bestimmte Zellen des ZNS beschränkt, da jede neurale Zelle sich über Transplantation gewinnen lässt.

Um die Transplantationsmethode für unsere Zwecke zu nutzen, mussten wir Spenderembryonen verwenden, die einen genetischen Oberflächenmarker exprimieren, und mutante Empfängerembryonen, denen bestimmte präsynaptische Proteine fehlen. Nach Transplantation sollten dann nur die implantierten Zellen den genetischen Oberflächenmarker und das bestimmte präsynaptische Protein exprimieren (siehe 3.2.5). Über Antikörperfärbungen stellten wir den Oberflächenmarker und das spezifische synaptische Protein (und damit seine Verteilung entlang der Neuriten) auf Transplantationsklonen in Bauchmarks der Empfängerembryonen dar.

Abb. 4.9 Lokalisation von TAU-MYC auf Neuriten des Bauchmarks in L3-Larven

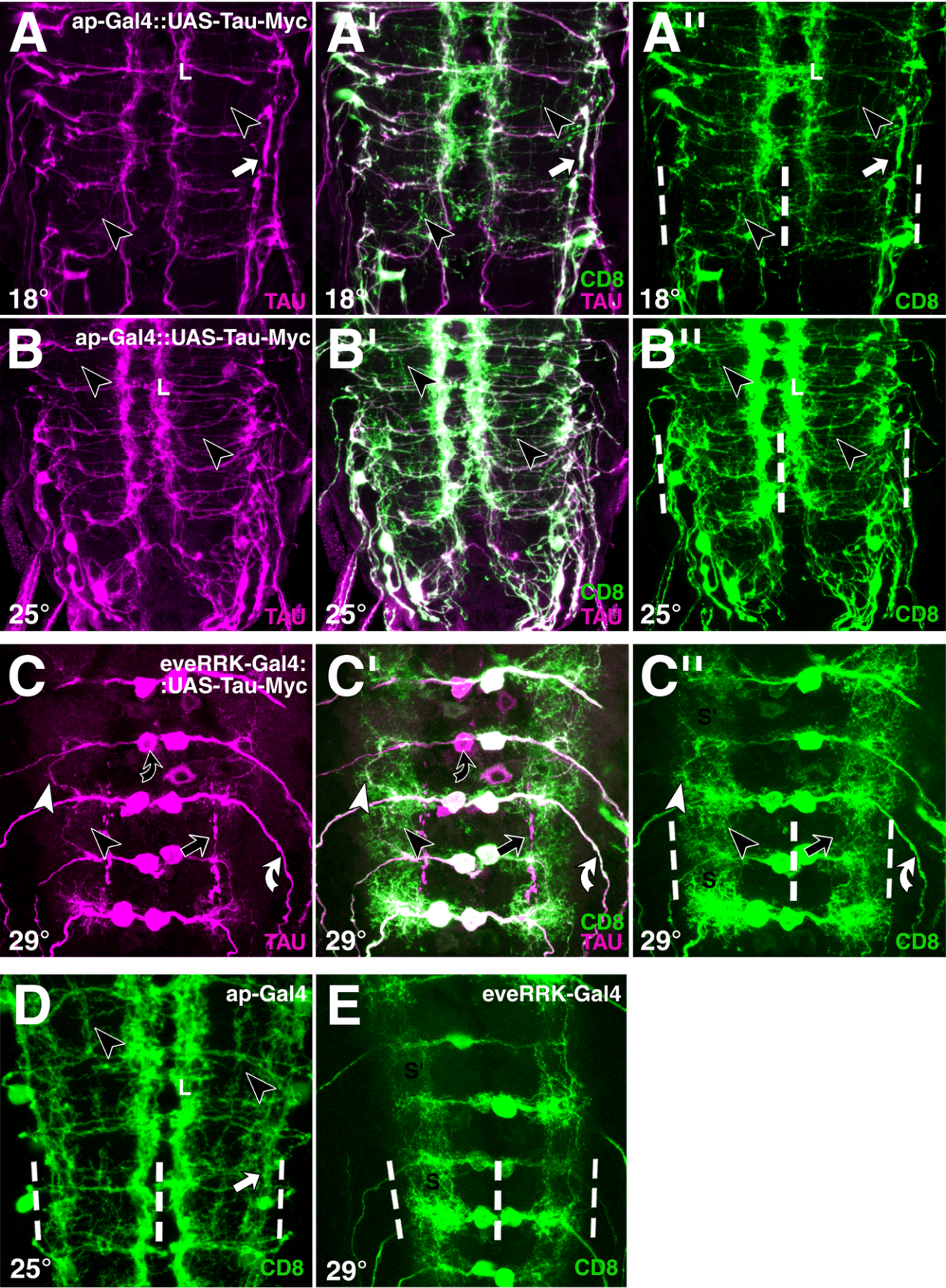
A - E: Dorsale Aufsicht auf das Bauchmark von *Drosophila*-Larven. Anterior oben, lateral rechts und links. Antikörperfärbung gegen TAU-MYC (magenta) und mCD8 (grün). Apostrophierte und nicht apostrophierte Abbildungen mit gleichem Buchstaben zeigen dasselbe Präparat. Nicht apostrophierte Abbildung zeigt die TAU-MYC-Färbung, apostrophierte Abbildung die Doppelfärbung und doppelt apostrophierte Abbildung die mCD8-Färbung. Larven wurden bei unterschiedlichen Temperaturen aufgezogen (wie unten links angegeben). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie (aus Gründen der Übersichtlichkeit jeweils nur in einer Darstellung eines Präparats). Weiße Symbole verweisen auf doppelt markierte Neuriten, schwarze Symbole verweisen auf Neuriten, denen einer der beiden Marker fehlt.

A - B'': In *ap-Gal4* sind die medialen longitudinalen Neuriten ("L") und, wenn vorhanden, die ganz lateralen longitudinalen Neuriten (weiße Pfeile) TAU-MYC-positiv. Intermediäre Seitenneuriten exprimieren TAU-MYC dagegen nur schwach oder gar nicht (schwarze Pfeilköpfe). Intermediäre und laterale longitudinale Neuriten sind bei Expression von TAU-MYC reduziert (vergleiche schwarze Pfeilköpfe und weiße Pfeile in A'', B'' mit D). Die medialen longitudinalen Neuriten sind von diesem Effekt nicht oder schwächer betroffen (vergleiche "L" in A'', B'' mit D).

C - C'': In *eve^{RRK}-Gal4* sind mit Ausnahme der primären efferenten Projektionen (weiße gebogene Pfeile) nur wenige Neuriten TAU-MYC-positiv (z. Bsp. weiße Pfeilköpfe). Die meisten der Seitenneuriten, die aus der primären efferenten Projektion hervorgehen, exprimieren kein TAU-MYC (schwarze Pfeilköpfe). In einigen Segmenten sind auch mit mCD8 keine Seitenneuriten erkennbar (vergleiche S' mit S in C''). Dies scheint jedoch kein Effekt der TAU-MYC-Expression zu sein, denn dieser Effekt ist auch in Bauchmarks von *eve^{RRK}-Gal4*-L3-Larven ohne TAU-MYC zu beobachten (vergleiche S, S' in C'' mit E). Die longitudinalen Projektionen des pCC Interneurons sind TAU-MYC-positiv, exprimieren aber kein mCD8 (schwarze Pfeile in C - C''). Einige Zellen exprimieren nur TAU-MYC aber kein mCD8 (schwarzer gebogener Pfeil).

D, E: Kontrollpräparate, in denen kein TAU-MYC exprimiert wurde. Die Symbole verweisen auf entsprechende Strukturen in A-C''.

Abb. 4.9



4.3.1 Experimentelle Grundlagen

4.3.1.1 Verwendung eines geeigneten Gal4-Treibers in den Spender-Embryonen

Als Oberflächenmarkierung entschieden wir uns wie schon bei den UAS/Gal4-Experimenten für Antikörperfärbung gegen genetisch (über GAL4) exprimiertes mCD8 in den Spenderembryonen, weil mCD8 in unseren Tests eine recht vollständige Färbung auch feiner Fortsätze erlaubt (siehe 4.2.2). Neben dieser Vollständigkeit der Färbung auf subzellulärem Niveau musste jedoch auch sichergestellt werden, dass möglichst alle Zellen den Marker exprimieren, um nach Transplantation alle Neurone der resultierenden Zellstammbäume analysieren zu können. Deshalb musste ein geeigneter panneuraler Gal4-Treiber gefunden werden, über den *UAS-mCD8-GFP* dann gezielt exprimiert werden konnte. Dabei war zu beachten, dass dieser Treiber vor allem in spätembryonalen Stadien exprimieren sollte, in denen unsere Transplantationsanalysen durchgeführt wurden.

In der engeren Auswahl standen einige angeblich panneural GAL4-exprimierende Stämme zur Verfügung: *Mz1407* (Luo et al., 1994), *nervana-Gal4* (*nerv-Gal4*; Sun et al., 1999), *tubulinP-Gal4* (*tubP-Gal4*; Lee, 1999) und *elav-Gal4* (Luo et al., 1994).

Die *elav-Gal4*-Treiberlinie ist ein oft genutzter panneuronaler Marker, wird aber nicht in Gliazellen exprimiert (Luo et al., 1994). Da Gliazellen aber ein nützliches Merkmal bei der Identifizierung neuronaler Zellklone darstellen (Schmidt et al., 1997) und diese Identifikation eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung unserer Experimente sein würde, wurde *elav-Gal4* nicht als geeigneter Treiber für Transplantationsexperimente in Betracht gezogen.

Wie schon weiter oben erwähnt (4.2.2) exprimiert *Mz1407* nur nahezu ubiquitär. Auch hier hätte das Fehlen einzelner, unter Umständen charakteristischer Zellen, in Transplantationsklonen die Identifikation derselben erschweren können. Deshalb kam auch *Mz1407* nicht als Treiber in Frage.

Zur Kontrolle, ob *tubP-Gal4* und *nerv-Gal4* tatsächlich in allen Zellen des ZNS exprimiert werden, wurden sie mit drittchromosomalen *UAS-mCD8-GFP*-Fliegenstämmen verkreuzt. Antikörperfärbungen gegen mCD8 und das neuronale Markerprotein ELAV sollten zeigen, ob die UAS/Gal4-Expression in allen Neuronen

erfolgt. Analog dazu wurden Antikörperfärbungen gegen mCD8 und den glialen Marker REPO vorgenommen, um die Expression in Gliazellen zu kontrollieren.

Während *tubP-Gal4/UAS-mCD8-GFP* in allen ELAV-positiven Zellen auch mCD8-Färbung zeigt, gibt es in *nerv-Gal4/UAS-mCD8-GFP* eine nicht tolerierbare Anzahl an Zellen, in denen keine Co-Expression von mCD8 und ELAV nachgewiesen werden kann (Abb. 4.10A - B'). Außerdem exprimieren viele Zellen in *nerv-Gal4* nur sehr schwach (vergleiche Abb. 4.10A und B). In *tubP-Gal4* hingegen exprimieren alle Neurone relativ einheitlich und gut detektierbar (Abb. 4.10C, C').

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Doppelfärbungen gegen mCD8 und REPO (Abb. 4.10D, E). In *nerv-Gal4* sind zahlreiche REPO-gefärbte Zellen nicht mCD8-gefärbt. Dagegen sind in *tubP-Gal4* alle REPO-positiven Zellen auch mCD8-gefärbt.

Aufgrund der weitestgehend ubiquitären und zudem recht starken GAL4-Expression entschieden wir uns also für *tubP-Gal4* als geeigneten GAL4-Treiber in unseren Transplantationsversuchen.

Abb. 4.10 Vergleich der Expressionsmuster in *nerv-Gal4* und *tubP-Gal4*

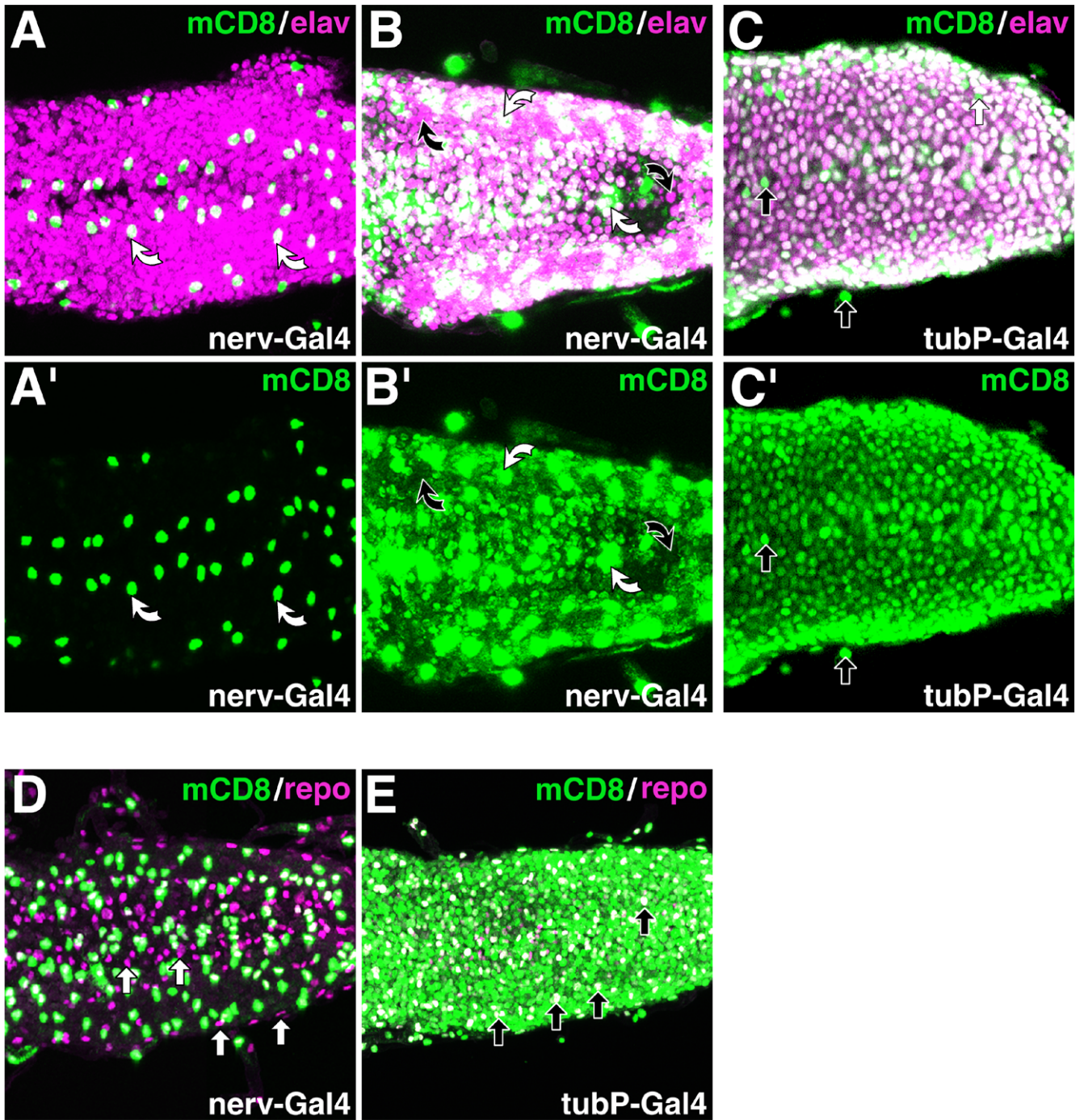
A - C': Dorsale Aufsicht auf das Bauchmark von L1-Larven. Anterior links, lateral oben. Expressionsdomäne von *nerv-Gal4* (A - B') und *tubP-Gal4* (C, C') dargestellt durch Expression von *UAS-mCD8-GFP*. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün) und den neuronalen Marker ELAV (magenta). Apostrophiierte und nicht apostrophiierte Abbildungen mit gleichem Buchstaben zeigen dasselbe Präparat. Nicht apostrophiierte Abbildung zeigt die Doppelfärbung, apostrophiierte Abbildung nur die mCD8-Färbung. A, A' und C, C' sind bei gleicher Detektionssensitivität am konfokalen Mikroskop aufgenommen. Bei B, B' wurde die Detektionssensitivität im grünen Kanal stark erhöht. In A, A' sieht man in *nerv-Gal4* nur in sehr wenigen neuronalen Zellen auch mCD8-Expression (angedeutet durch weiße gebogene Pfeile in A, A'). Bei erhöhter Detektionssensitivität sind in *nerv-Gal4* sehr viel mehr doppelt gefärbte Zellen auszumachen (B, B'). Allerdings leuchtet das mCD8-Signal in einigen Zellen so stark, dass es benachbarte Zellen überstrahlt (weiße gebogene Pfeile in B, B'). Andere Neurone wiederum zeigen immer noch kein oder nur ein sehr schwaches mCD8-Signal (schwarze gebogene Pfeile). *nerv-Gal4* exprimiert also sehr inhomogen in den neuronalen Zellen des Bauchmarks.

In *tubP-Gal4* zeigen alle ELAV-positiven Zellen auch ein weitgehend homogenes mCD8-Signal. *tubP-Gal4* exprimiert also relativ gleichmäßig in vermutlich allen neuronalen Zellen des Bauchmarks. Einige Zellen sind nur mCD8-positiv (schwarze Pfeile), wahrscheinlich handelt es sich um Glia.

D, E: Dorsale Aufsicht auf das Bauchmark von L1-Larven. Anterior links, lateral oben. Expressionsdomäne von *nerv-Gal4* (D) und *tubP-Gal4* (E) dargestellt durch Expression von *UAS-mCD8-GFP*. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün) und den glialen Marker REPO (magenta). Detektionssensitivität im grünen Kanal wie in A und C.

In *nerv-Gal4* kann in zahlreichen Gliazellen kein mCD8 nachgewiesen werden (angedeutet durch weiße Pfeile in D). In *tubP-Gal4* sind hingegen alle REPO-positiven Zellen mCD8 gefärbt (angedeutet durch schwarze Pfeile in E).

Abb. 4.10



4.3.1.2 Wahl eines geeigneten präsynaptischen Markers

Um präsynaptische Strukturen der durch Transplantation erzeugten Zellstammbäume darzustellen, wollten wir uns der intrinsischen Genregulation präsynaptischer Gene bedienen. Dadurch sollten die Probleme von Überproduktion der Markerproteine verhindert werden, wie sie bei Anwendung des UAS/GAL4-Systems aufgetreten waren (siehe 4.2.3). Durch die Transplantation können genetische Mosaikre erzeugt werden, in denen die implantierten Zellen wildtypisch für ein synaptisches Gen und dessen intrinsische Regulation sind, wohingegen dem Empfängerewebe das entsprechende Gen oder Genprodukt fehlt. Die gewünschte Kombination wäre also eine Protein-Nullmutation für ein synaptisches Gen, welche das Wirtsgewebe morphologisch nicht beeinträchtigt, und ein gutes Antiserum gegen das entsprechende wildtypische Protein. Von den publizierten Genen für *Drosophila* kommen in dieser Kombination mehrere Gene in Frage: *n-Syb* (Deitcher et al., 1998; Wu et al., 1999), *Syn* (Klagges et al., 1996) und *Syt* (Littleton et al., 1999). Die erste Kombination erschien uns nicht geeignet wegen der schlechten Qualität des Antiserums (Sánchez-Soriano, persönliche Mitteilung). Das anti-SYT-Antiserum gibt ausgezeichnete Färbungen (siehe z. Bsp. Abb. 4.1A), ist jedoch polyklonal und daher nur in begrenztem Volumen zu beziehen. Zudem ist die *Syt^{AD4}*-Nullmutation embryonal letal, und gemäß mendelschen Regeln ist daher nur ein Viertel der Embryonen mutant und die Ausbeute an interpretierbaren Präparaten empfindlich erniedrigt. SYT wurde daher nur in einigen Kontrollexperimenten verwendet (siehe 4.3.2.1).

Ideale Voraussetzungen bot das *Syn*-Gen. Zum einen gibt es eine Protein-Nullmutation *syn⁹⁷*, bei der bisherige lichtmikroskopische, ultrastrukturelle und physiologische Untersuchungen keinen feststellbaren Phänotyp ergaben (E. Buchner, pers. Mitteilung). Zudem ist die *syn⁹⁷*-Mutation homozygot lebensfähig, so dass 100% der Empfängerembryonen bei unseren Versuchen ausgewertet werden können. Drittens existiert gegen SYN ein monoklonaler Antikörper, der in ausreichender Menge zur Verfügung steht und ausgezeichnete Färbungen ergibt (siehe z. Bsp. Abb. 4.1 C).

4.3.2 Neurale Transplantations-Klone wildtypischer Zellen

Für unsere Transplantations-basierten Mosaikanalysen wurden also vornehmlich anti-SYN-Antikörper in Kombination mit *syn*⁹⁷-mutanten Empfängerembryonen verwendet und zu einem geringeren Teil anti-SYT-Antikörper in Kombination mit *Syt*^{AD4}-mutanten Empfängerembryonen. Aus solchen Transplantationen sind insgesamt 185 neurale Klone hervorgegangen. Infolge von Ungenauigkeiten beim Transplantieren kamen gelegentlich zwei unmittelbar benachbarte neurale Klone im selben Bauchmark vor. Dies betraf 52 Klone in 26 Empfängerembryonen. Von diesen konnten zwölf auf Grund von Ähnlichkeiten mit anderen Klonen eindeutig identifiziert werden. Von den restlichen 135 Zellklonen konnten 59 nicht identifiziert werden, hauptsächlich aufgrund von Fehlentwicklungen beim Zellwachstum. Die übrigen 70 Klone konnten einem bekannten Zellstammbaum zugeordnet werden. Insgesamt wurden also 82 Zellklone identifiziert. Sie verteilten sich auf 20 der 35 bekannten neuronalen Zellstammbäume (siehe Tabelle 4.1). Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Zellstammbäume und der Kriterien, nach denen sie identifiziert wurden erfolgt in 4.3.4. Im Folgenden soll zunächst auf grundsätzliche Aussagen eingegangen werden, die wir aus der Analyse der Transplantationspräparate ableiten konnten.

Tab. 4.1 Wildtypische Transplantationsklone

Insgesamt konnten 82 Transplantationsklone identifiziert werden und 20 der bekannten Zellstammbäume zugeordnet werden. **Name:** Name des neuronalen Zellstammbaums, dem die Transplantationsklone zugeordnet wurden. **n (wt):** Anzahl der wildtypischen Transplantationsklone. **Kapitel/Abbildung:** Verweis auf Textabschnitte und Abbildungen, in denen die jeweiligen Zellklone detailliert beschrieben werden.

Zahlreiche Klone zeigten spezifische Verteilung von Output-Synapsen. Die Beschränkung von Output-Synapsen konnte dorso-ventral (**DV**), kontralateral-ipsilateral (**KI**), anterior-posterior (**AP**) oder medial-lateral (**ML**) sein (siehe dazu 4.3.2.2.1 – 4.3.2.2.4). In manchen Zellstammbäumen war außerdem eindeutig Kompartimentierung (**komp.**) individueller Neuriten in Bezug auf die Verteilung von Output-Synapsen zu erkennen (siehe dazu 4.3.2.2.5). Bei vielen Klonen mit efferenten Neuronen beziehungsweise Motoneuronen (**EN/MN**) wurde beobachtet, dass Seitenneuriten dieser Neurone frei von Output-Synapsen waren (siehe dazu 4.3.2.3). In der Tabelle wurden nur bei denjenigen Zellstammbäumen eine entsprechende Verteilung von Output-Synapsen angezeigt (**X**), wenn diese reproduzierbar festgestellt wurde (n>2).

Zellstammbäume			Verteilung der Output-Synapsen						Bemerkungen
Name	n (wt)	Kapitel/ Abbildung	DV	KI	AP	ML	komp.	EN/ MN	
VUM	8	4.3.4.1/ Abb. 4.19	X					X	
MNB	2	4.3.4.2/ Abb. 4.20	X					X	
MP1	1	4.3.4.3/ Abb. 4.21							keine SYN- Färbung
NB1-1	2	4.3.4.4/ Abb. 4.22		X				X	
NB2-1	2	4.3.4.5/ Abb. 4.23	X			X	X		
NB2-2	2	4.3.4.6/ Abb. 4.24							keine SYN- Färbung
NB2-4	1	4.3.4.7/ Abb. 4.25							
NB3-1	3	4.3.4.8/ Abb. 4.26	X			X	X	X	
NB3-2	14	4.3.4.9/ Abb. 4.27		X			X	X	
NB3-3	1	4.3.4.10/ Abb. 4.28							
NB4-1	1	4.3.4.11/ Abb. 4.29							
NB4-2	1	4.3.4.12/ Abb. 4.30							
NB5-1	1	4.3.4.13/ Abb. 4.31							
NB5-2	19	4.3.4.14/ Abb. 4.32	X				X	X	
NB5-3	3	4.3.4.15/ Abb. 4.33	X	X			X	X	
NB6-1	4	4.3.4.16/ Abb. 4.34			X		X		
NB6-2	13	4.3.4.17/ Abb. 4.35			X	X	X		
NB7-1	2	4.3.4.18/ Abb. 4.36					X	X	
NB7-2	1	4.3.4.19/ Abb. 4.37		X					keine SYN- Färbung
NB7-4	1	4.3.4.12/ Abb. 4.30							

Tab. 4.1

4.3.2.1 Die Verteilung präsynaptischer Regionen in neuronalen Zellstammbäumen ist reproduzierbar

Eines der wichtigsten Ergebnisse aus den Transplantationsexperimenten ist, dass Zellstammbäume, die mehrfach durch Transplantation gewonnen werden konnten, reproduzierbare Verteilung von SYN zeigen (siehe unten für Details). Kleinere Variationen, die gelegentlich auftreten, können dabei entweder tatsächliche Zustände bei der Zusammensetzung und Entwicklung der Zellklone reflektieren oder sie zeigen die Grenzen unseres experimentellen Ansatzes auf.

Die Reproduzierbarkeit der SYN-Verteilung war ein wichtiges Resultat unserer Analysen. Wir wollten zudem wissen, ob SYN das vollständige Muster aller Output-Synapsen darstellt. Aus Analysen an NMJs wussten wir, dass zumindest eine peptiderge efferente Projektion auf Muskel VL1 kein SYN exprimiert, obwohl andere präsynaptische Proteine normal vorhanden sind (A. Prokop, persönliche Mitteilung). Ähnliches könnte auch für das ZNS zutreffen. Um dies zu testen, wurden zunächst Doppelfärbungen gegen SYN und SYT an wildtypischen ZNS vorgenommen (Abb. 4.1A, B). Dabei wiesen beide Proteine eine nicht zu unterscheidende Koexpression in dichtgepackten, punktförmigen Strukturen, den potenziellen Output-Synapsen auf.

Um dieses Ergebnis auch im Kontext der Transplantationsversuche zu bestätigen, wurden mehrere Transplantationen in Embryonen vom Genotyp *Syt^{AD4};syn⁹⁷* vorgenommen. Auf den resultierenden neuronalen Zellklonen konnte in allen SYN-positiven Regionen auch SYT nachgewiesen werden (Abb. 4.11A - B''). Umgekehrt gab es einige wenige SYT-Punkte, die keine Doppelfärbung mit SYN aufwiesen. Allerdings traten die nicht kolokalisierten SYT-Punkte immer in Bereichen auf, in denen nahebei auch doppelt gefärbte Punkte zu sehen waren. Das prinzipielle Muster präsynaptischer Regionen zeigte also keinen Unterschied zwischen der SYN- und der SYT-Färbung.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass mit Hilfe von SYN Output-Synapsen zuverlässig dargestellt werden können. Diese Interpretation wurde anhand einiger Zellstammbäume gestützt, die ausschließlich mit anti-SYT gefärbt worden waren. Solche Präparate wiesen sehr ähnliche Verteilungen des Proteins auf, wie andere Beispiele des gleichen Zellstammbaumes, die nur mit anti-SYN markiert wurden (Abb. 4.11C D'). Der beobachteten reproduzierbaren Verteilung von SYN liegt also eine reproduzierbare Verteilung von Output-Synapsen zugrunde.

Abb. 4.11 Kolokalisation von SYN und SYT auf Transplantationsklonen

A - B'': Spätembryonale neurale Zellstammbäume in *syn/syt*-mutanten Empfängerembryonen. Dorsale Aufsicht aufs Bauchmark. Anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (blau), SYT (rot). Apostrophierte und nicht apostrophierte Abbildungen mit gleichem Buchstaben zeigen dasselbe Präparat mit unterschiedlicher Zusammenstellung der Farbkanäle (wie oben rechts angegeben). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Die meisten SYN- und SYT-Markierungen kolokalisieren. Ein paar SYT-Markierungen weisen keine Doppel-Markierung auf (weiße Pfeile).

C - D': Neurale Transplantationsklone des NB5-2 Zellstammbaums in *syt*-mutantem (C, C') und *syn*-mutantem (D, D') Empfängerembryo (spätes Stadium 17). Dorsale Aufsicht aufs Bauchmark. Anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYT bzw. SYN (magenta). Abb. C' bzw. D' zeigen nur ventrale Fokusebenen desselben Präparats wie in C bzw. D. Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Die Verteilung der SYT-Markierungen in C, C' entspricht der Verteilung der SYN-Markierungen in D, D' bis ins Detail. Insbesondere fällt die Akkumulation von SYT- bzw. SYN-Punkten am Ende eines ventral liegenden transversalen Neuriten auf (weiße Pfeile). Netzartig verteilte Dendriten im ventralen Neuropilbereich (weißer Stern in C', D') sind in beiden Präparaten frei von präsynaptischen Markern.

Abb. 4.12 Zellstammbäume mit dorso-ventral spezifischer Verteilung von Output-Synapsen I

A - B': Spätembryonale neurale Zellstammbäume in *syn*-mutanten Empfängerembryonen. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Unterbrochene Linien in A und B markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie.

A, A': Zwei Ansichten eines MNB-Transplantationsklons aus verschiedenen Blickwinkeln. Dorsale Aufsicht, anterior ist links (A). Laterale Ansicht, anterior ist links, dorsal ist oben (A'). Weißer gebogener Pfeil: Zellkörper des MNB-Klons. Dorsal gelegene motorneuronale Projektionen (schwarze Pfeile) sind frei von SYN-Markierung. Auf den ventral lokalisierten, interneuronalen Projektionen (weiße Pfeile) sind zahlreiche Output-Synapsen.

B, B': Zwei Ansichten eines VUM-Transplantationsklons aus verschiedenen Blickwinkeln. Dorsale Aufsicht, anterior ist links (B). Frontale Ansicht, dorsal ist oben (B'). Die dorsal gelegenen motorneuronalen Projektionen (schwarze Pfeile) sind frei von SYN-Markierung. Auf den ventral lokalisierten, interneuronalen Projektionen (weiße Pfeile) sind zahlreiche Output-Synapsen.

Abb. 4.11

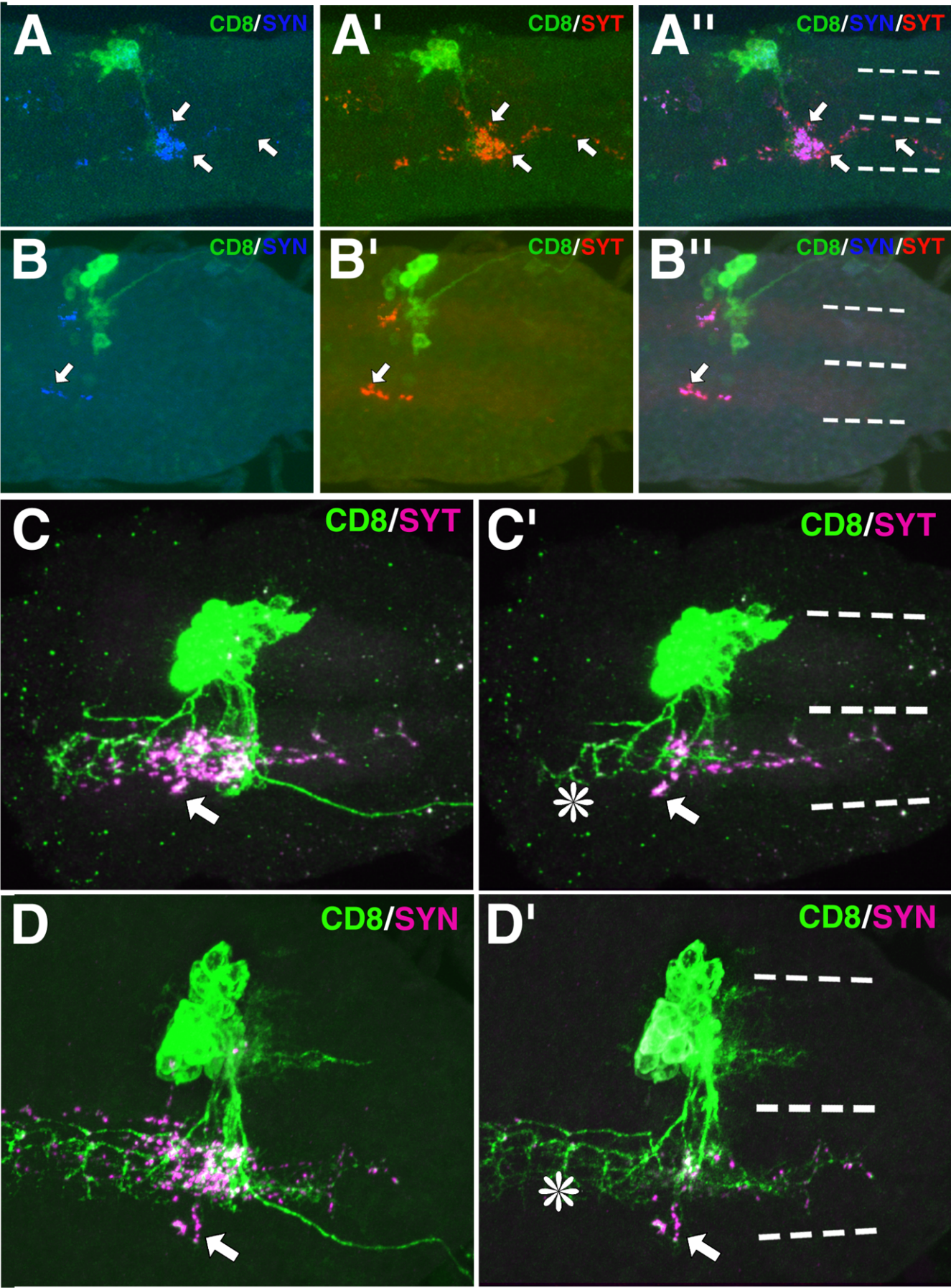
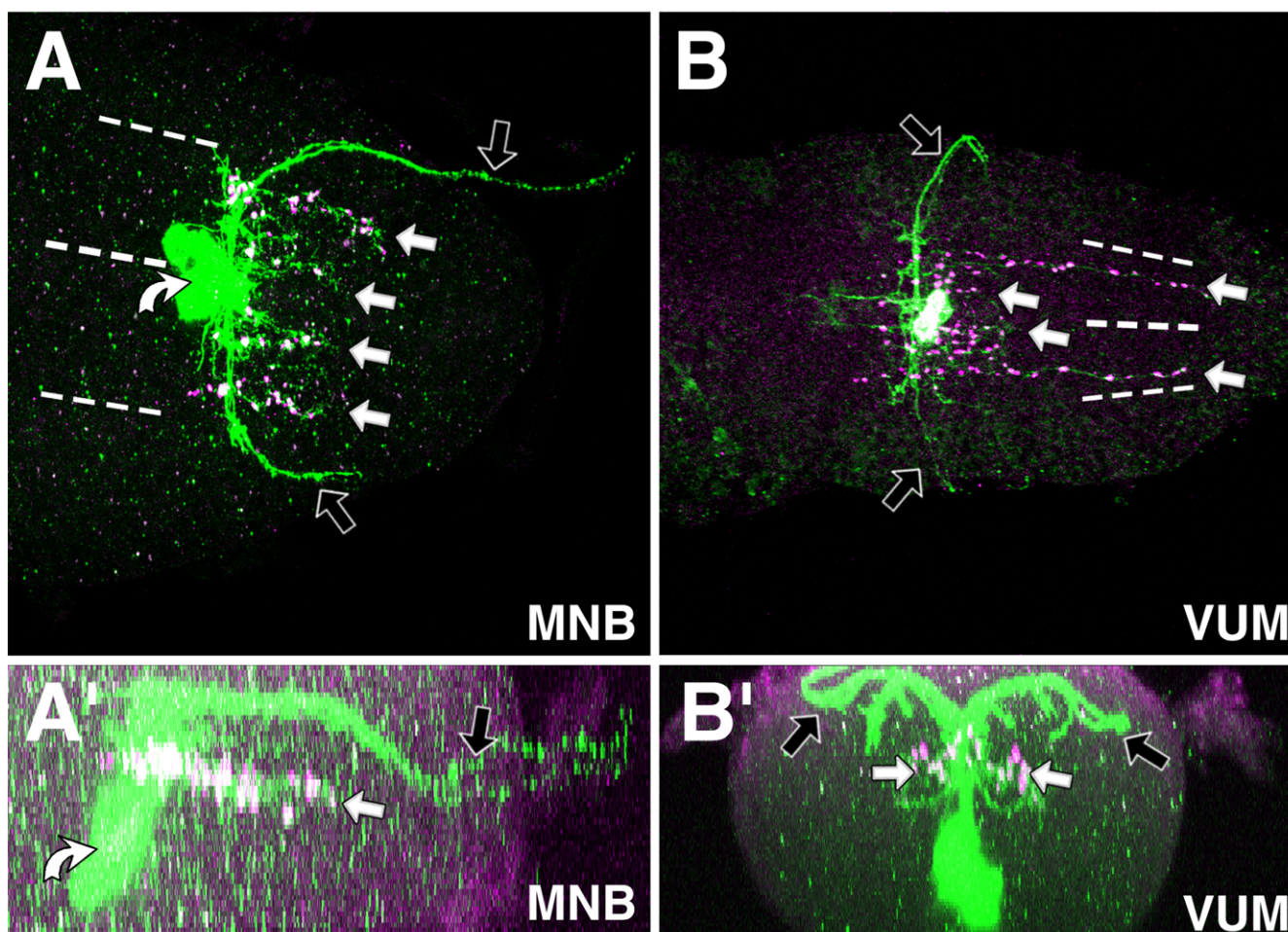


Abb. 4.12



4.3.2.2 Output-Synapsen in Zellstammbäumen des ZNS sind auf spezifische Regionen des Neuropils beschränkt

Die präsynaptischen Regionen innerhalb eines Zellstammbaums können hinsichtlich der dorso-ventralen, ipsilateral-kontralateralen, antero-posterioren oder der medio-lateralen Dimension spezifisch verteilt auftreten (siehe Tabelle 4.1). Im Folgenden soll auf diese spezifischen Verteilungen näher eingegangen werden, wobei aber nur Zellstammbäume betrachtet werden, bei denen die Verteilung von Output-Synapsen schon reproduzierbar nachgewiesen wurde.

4.3.2.2.1 Zellstammbäume mit dorso-ventraler Beschränkung der Output-Synapsen

Zu den neuralen Klonen mit eindeutig dorso-ventraler Einschränkung präsynaptischer Bereiche zählen VUM- und MNB-Zellklone (Abb. 4.12). In beiden sind die ventral gelegenen, longitudinal verlaufenden Neuriten mit zahlreichen präsynaptischen Spezialisierungen versehen. Dagegen zeigen die dorsalen motorneuronalen Axone mit ihren kurzen Seitenneuriten keinerlei präsynaptische Markierung.

Im NB2-1-Zellklon sind auf der kontralateralen Seite zwei übereinander liegende transversale Projektionen bis zum lateralen Neuropilbereich vorhanden. Nur die ventrale hat SYN-Markierungen (Abb. 4.13 A - A").

Im NB3-1-Zellklon sind auf der ipsi- und der kontralateralen Seite im dorsalen Neuropil nur Seitenneurite der Motorneurone und deren efferentes Faszikel zu beobachten. Ventral davon sind vermutlich nur interneuronale longitudinale Projektionen. Während die dorsalen Neuriten SYN-frei sind, finden sich auf den ventralen Projektionen präsynaptische Regionen (Abb. 4.13 B - B").

Reproduzierbar sind dorso-ventrale Beschränkungen auch beim NB5-2-Zellklon. Auf der ipsilateralen Seite finden sich nur sehr wenige SYN-Punkte, die immer im ganz dorsalen Neuropilbereich liegen. Ventraler liegende Neuriten sind dagegen SYN-frei. Auf der kontralateralen Seite sind die zahlreichen, netzartig verteilten Seitenneuriten, die im ganz ventralen Neuropilbereich liegen, frei von Output-Synapsen. Alle dorsaler liegenden ipsilateralen Neuriten sind SYN-markiert (Abb. 4.13C - C").

Im NB5-3-Zellklon liegen zwei nach kontralateral projizierende Faszikel vor. Das anteriore davon liegt ventral und auch seine Seitenneuriten liegen ventral im Neuropil. Das posteriore Faszikel liegt dorsal und seine Seitenneuriten liegen medial bis dorsal. Nur die dorsaler gelegenen Seitenneuriten des posterioren Faszikels zeigen SYN-Markierungen (Abb. 4.13D - D'').

Abb. 4.13 Zellstammbäume mit dorso-ventral spezifischer Verteilung von Output-Synapsen II

A - D'': Spätembryonale neurale Zellstammbäume in *syn*-mutanten Empfängerembryonen. Dorsale Aufsicht, anterior ist links. Antikörperfärbung gegen MCD8 (grün), SYN (magenta). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Apostrophierte und nicht apostrophierte Abbildungen mit gleichem Buchstaben zeigen dasselbe Präparat. Nicht apostrophierte Abbildungen zeigen eine Vereinigung aller fokalen Ebenen des Präparats. Apostrophierte Abbildungen zeigen entsprechend der Angabe rechts oben nur die Vereinigung mehrerer dorsaler, medialer oder ventraler Fokusebenen des Neuropils.

A - A'': NB2-1-Transplantationsklon. Der NB2-1 hat eine ventral und eine dorsal gelegene transversale Projektion ins kontralaterale Neuropil (weißer gebogener Pfeil). Die ventral gelegene hat an ihrem lateralen Ende eine Akkumulation von Output-Synapsen. Die dorsal gelegene ist frei von Output-Synapsen.

B - B'': NB3-1-Transplantationsklon. Im ventralen Neuropilbereich verläuft eine longitudinale interneuronale Projektion mit zahlreichen SYN-Markierungen (weiße Pfeile). Auch auf der kontralateralen Seite befinden sich ein paar SYN-Markierungen im ventralen Neuropil (gebogene weiße Pfeile). Das efferente motorneurone Faszikel liegt im dorsalen Neuropilbereich und hat dort zahlreiche, fächerartig verteilte Seitenneuriten ohne Output-Synapsen (schwarze Pfeile). Mindestens eines der Motorneurone hat auch auf der kontralateralen Seite Seitenneuriten. Sie liegen ebenfalls im dorsalen Neuropilbereich und sind frei von Output-Synapsen (schwarze Pfeilköpfe). Eine wirklich vollständige Trennung dorsaler SYN-freier und ventraler SYN-markierter Strukturen ist in diesem Präparat nicht möglich. Die ventralsten Ausläufer der motorneuronalen Seitenneurite sind deshalb noch in B' zu sehen (schwarze Pfeile) und ein paar SYN-Markierungen, die auf Ausläufern ventraler Neuriten sitzen, sind in B'' sichtbar (weiße Pfeilköpfe).

C - C'': NB5-2-Transplantationsklon. Im ventralsten Neuropilbereich erstreckt sich kontralateral ein Netz von Neuriten nach anterior (schwarze Pfeile). Es ist frei von SYN-Markierungen. Dorsal von diesem Netz liegen zahlreiche Neuriten mit Output-Synapsen (weiße Pfeile). Auf der ipsilateralen Seite des Zellklons sind nur im dorsalsten Bereich des Neuropils einige SYN-Markierungen auszumachen (z. Bsp. weißer Pfeilkopf). Alle etwas ventraler liegenden ipsilateralen Neuriten sind frei von Output-Synapsen.

D - D'': NB5-3-Transplantationsklon. Zwei transversale Faszikel projizieren nach kontralateral. Das anteriore von den beiden Faszikeln (schwarzer Pfeil) liegt ventral im Neuropil und die kurzen im kontralateralen Konnektiv von ihm abgehenden Seitenäste (schwarzer Pfeilkopf) sind frei von SYN-Markierungen. Das posteriore Faszikel liegt dorsal (weißer Pfeil) und auf seinen kontralateralen Seitenneuriten finden sich zahlreiche SYN-Markierungen (weiße Pfeilköpfe).

Abb. 4.14 Zellstammbäume mit ipsilateral-kontralateral spezifischer Verteilung von Output-Synapsen

A - D': Spätembryonale neurale Zellstammbäume in *syn*-mutanten Empfängerembryonen. Dorsale Aufsicht, anterior ist links. Antikörperfärbung gegen MCD8 (grün), SYN (magenta). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen werden durch weiße Pfeile, ohne Output-Synapsen durch schwarze Pfeilköpfe angedeutet.

Der NB1-1-Zellstammbaum (A) hat nur auf seinen ipsilateralen Neuriten Output-Synapsen. In den Zellstammbäumen von NB3-2 (B), NB5-3 (C) und NB7-1 (D) beschränken sich Output-Synapsen auf die kontralaterale Seite.

Abb. 4.13

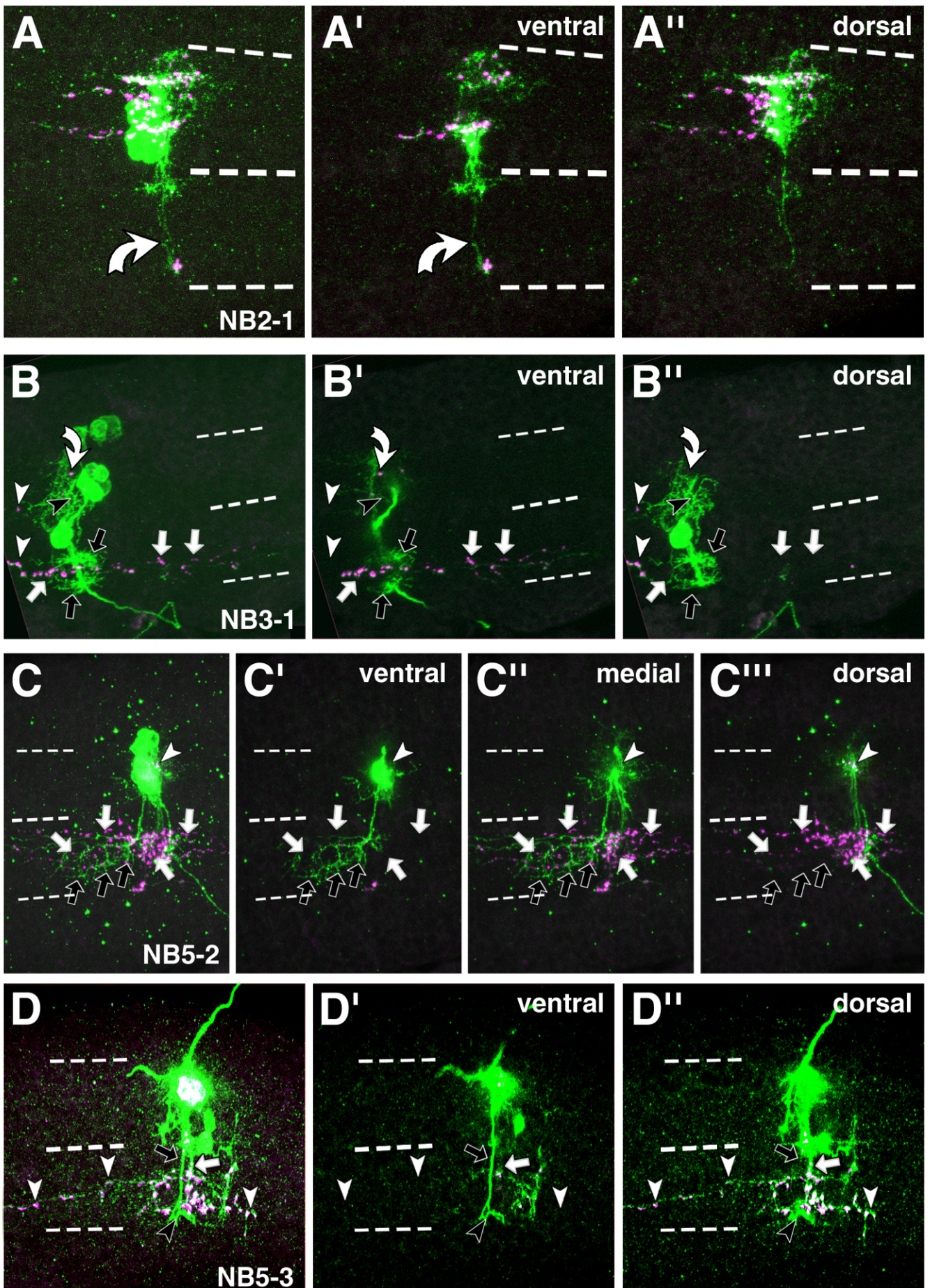
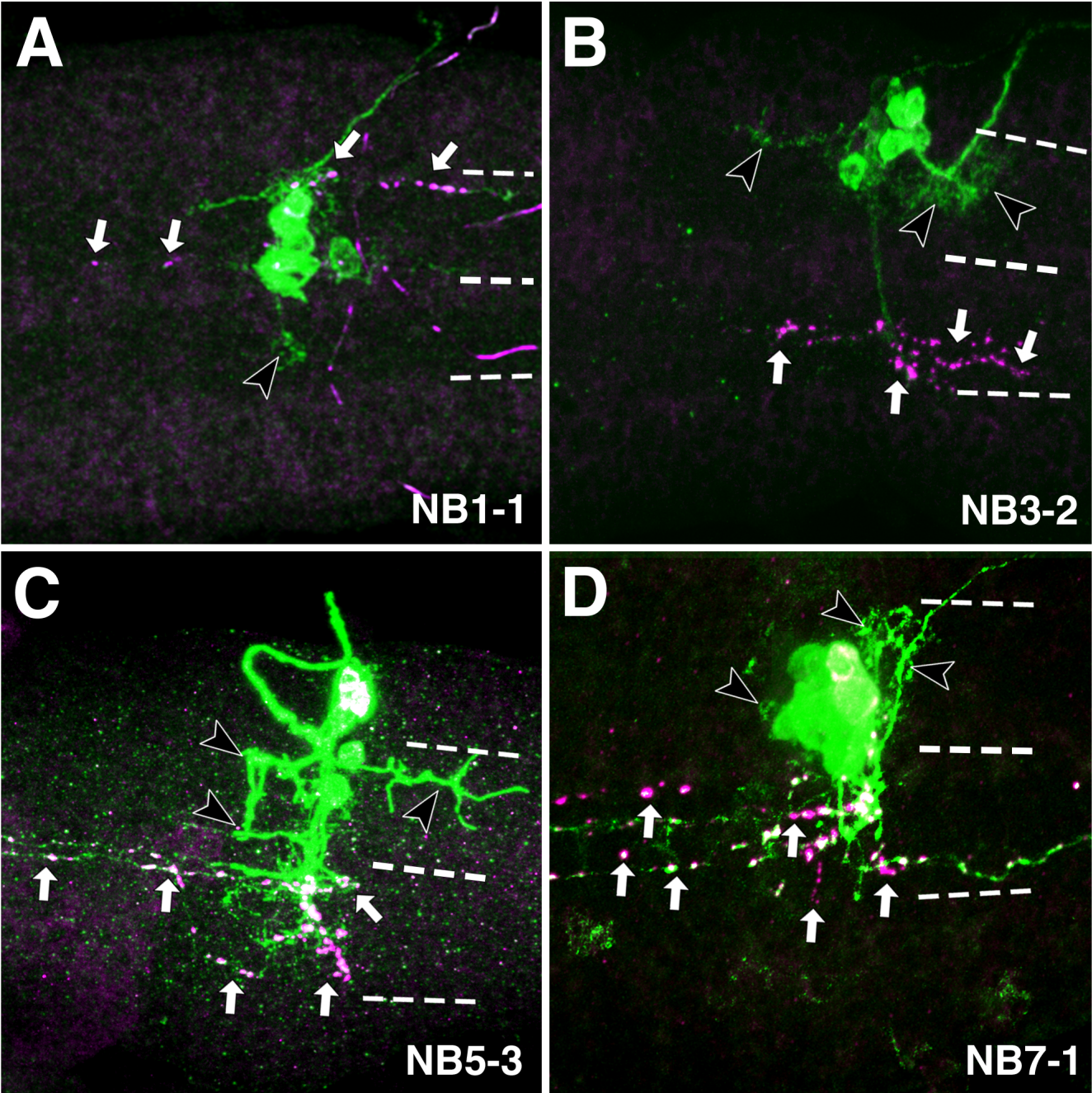


Abb. 4.14



4.3.2.2.2 Zellstammbäume mit ipsilateral-kontralateraler Beschränkung der Output-Synapsen

Zu den Zellstammbäumen, die ihre Output-Synapsen auf die ipsilaterale oder kontralaterale Seite beschränken, gehören die Klone von NB1-1, NB3-2, NB5-3 und NB7-1. Im Fall von NB1-1 sind präsynaptische Regionen auf das ipsilaterale Neuropil beschränkt (Abb. 4.14A). Bei den drei anderen Zellstammbäumen hingegen sind sie nur kontralateral zu finden (Abb. 4.14B - D).

4.3.2.2.3 Zellstammbäume mit antero-posteriorer Beschränkung der Output-Synapsen

Der Zellstammbaum des NB6-1 hat intersegmentale longitudinale Neuriten nach anterior und posterior auf beiden Seiten des Neuropils. Während die Projektionen auf der kontralateralen Seite bis auf wenige Ausnahmen SYN-positiv sind, zeigen auf der ipsilateralen Seite nur die posterioren Projektionen SYN-Punkte. Die ipsilateralen Projektionen nach anterior sind frei von präsynaptischen Regionen (Abb. 4.15A).

Ein noch deutlicheres Beispiel liefert der NB6-2-Zellklon. Seine Neurone haben ipsi- und kontralaterale Projektionen und auf beiden Seiten können präsynaptische Regionen festgestellt werden. Auf der kontralateralen Seite wenden sich die meisten Projektionen nach posterior und man erkennt eine scharfe Trennlinie, posterior von der sich Output-Synapsen befinden. Mit Ausnahme von einer einzelnen konzentrierten Ansammlung von SYN sind die anterioren kontralateralen Neuriten des NB6-2 Zellklons frei von SYN (Abb. 4.15B).

4.3.2.2.4 Zellstammbäume mit medio-lateraler Beschränkung der Output-Synapsen

Die Zellstammbäume von NB2-1, NB3-1 und NB6-2 zeigen eine medio-lateral-spezifische Verteilung von Output-Synapsen.

Im NB2-1-Zellklon finden sich zwei transversale kontralaterale Projektionen. Die ventralere dieser beiden Projektionen hat im medialen und im lateralen Bereich des kontralateralen Neuropils kurze Verzweigungen. Während die medialen

Verzweigungen in einem der beiden erhaltenen Klone gar keine SYN-Färbung und in dem zweiten nur einen einzelnen kleinen Punkt zeigen, ist die lateral gelegene Verzweigung eindeutig mit präsynaptischen Strukturen ausgestattet (Abb. 4.16A).

Die im NB3-1-Zellklon auf dorso-ventraler Ebene gemachten Beobachtungen lassen sich genauso auf die medio-laterale Ausrichtung übertragen. Die kontralateralen SYN-freien Seitenneuriten der motorneuronalen Projektion liegen im lateralen und medialen Neuropil. Die SYN-positiven etwas ventraler gelegenen longitudinalen Neuriten befinden sich im intermediären Neuropil-Bereich (Abb. 4.16B).

Ähnlich wie im NB2-1-Zellstammbaum gibt es im NB6-2-Zellstammbaum eine transversale Projektion nach kontralateral, die nur an ihrem Ende im lateralen Neuropil SYN-Markierungen aufweist. Medial aus dieser transversalen Projektion hervorgehende Seitenneuriten haben dagegen keine Output-Synapsen (Abb. 4.16C). Des Weiteren ist in über der Hälfte der NB6-2-Zellklone ipsilateral eine SYN-freie intermediäre Projektion nach anterior zu beobachten. Weitere Projektionen nach anterior sind medialer gelegen und zeigen ausnahmslos SYN-Färbung (Abb. 4.16C).

Abb. 4.15 Zellstammbäume mit anterior-posterior spezifischer Verteilung von Output-Synapsen

A - B : Spätembryonale neurale Zellstammbäume in *syn*-mutanten Empfängerembryonen Dorsale Aufsicht, anterior ist links. Antikörperfärbung gegen MCD8 (grün), SYN (magenta). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen werden durch weiße Pfeile, ohne Output-Synapsen durch schwarze Pfeilköpfe angedeutet.

Auf der ipsilateralen Seite des NB6-1-Zellstammbaums (A) finden sich nur posterior vom Zellklon Output-Synapsen. Auf der kontralateralen Seite des NB6-2-Zellstammbaums (B) sind bis auf eine auffällige Akkumulation von SYN-Markierungen (weißer gebogener Pfeil) alle Output-Synapsen auf nach posterior gerichteten Neuriten zu finden.

Abb. 4.16 Zellstammbäume mit medio-lateral-spezifischer Verteilung von Output-Synapsen

A - C : Spätembryonale neurale Zellstammbäume in *syn*-mutanten Empfängerembryonen Dorsale Aufsicht, anterior ist links. Antikörperfärbung gegen MCD8 (grün), SYN (magenta). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie.

Im NB2-1- und NB6-2-Zellstammbaum (A bzw. C) findet sich jeweils am lateralen Ende einer transversalen kontralateralen Projektion eine Akkumulation von SYN-Markierungen (weiße gebogene Pfeile). Weiter medial können an diesen transversalen Projektionen SYN-freie Seitenneuriten ausgemacht werden (schwarze Pfeile).

In vielen NB6-2-Zellstammbäumen findet sich ipsilateral eine intermediäre Projektion nach anterior, die keine Output-Synapsen hat (schwarzer Pfeilkopf). Medial von dieser Projektion finden sich SYN-markierte longitudinale Projektionen (weiße Pfeile).

Im NB3-1-Zellstammbaum gehen auf der kontralateralen Seite im medialen und im lateralen Neuropilbereich zahlreiche kurze, vermutlich rein postsynaptische Seitenneurite aus dem motorneuronalen Faszikel hervor (schwarze Pfeilköpfe). Im intermediären Bereich des kontralateralen Konnektivs verlaufen interneuronale Projektionen, die zahlreiche SYN-Markierungen tragen (weiße Pfeile).

Abb. 4.15

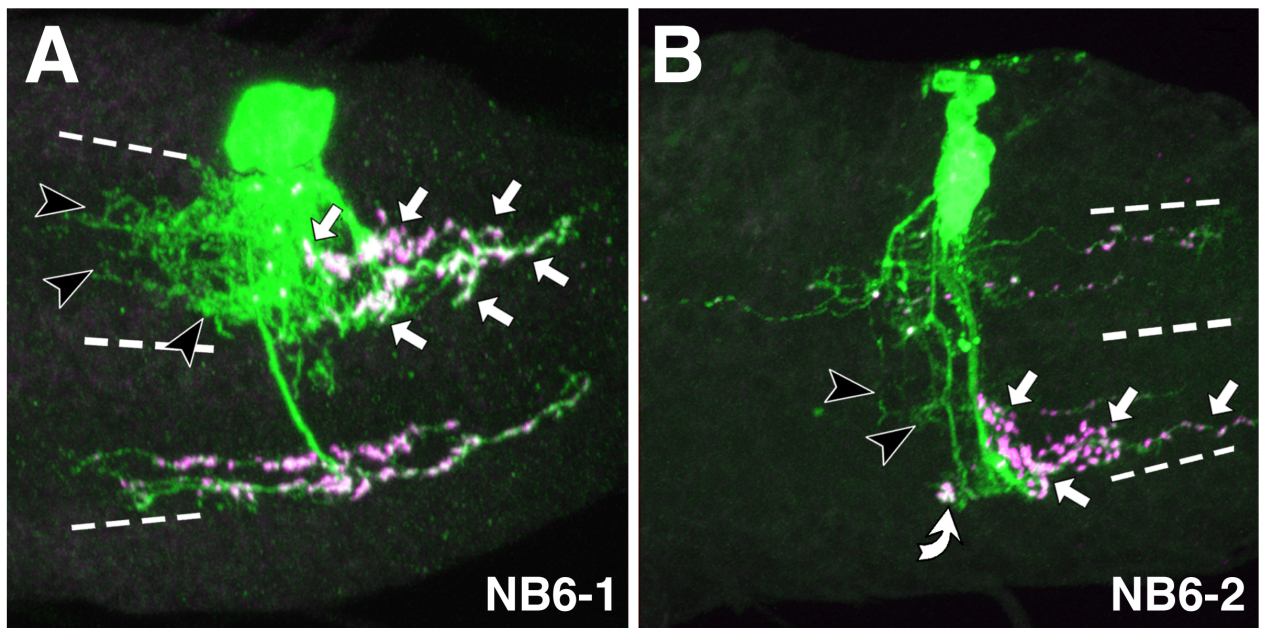
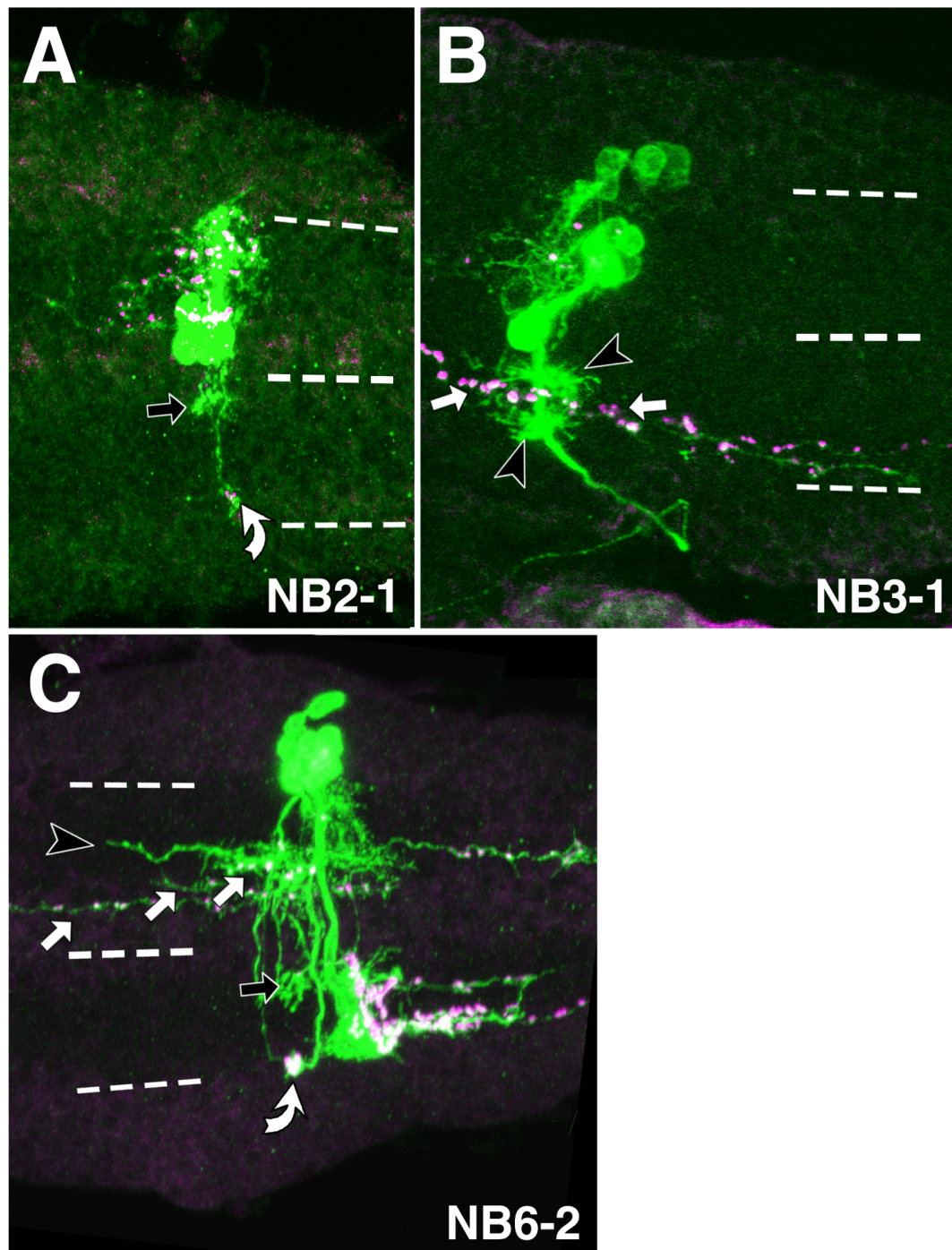


Abb. 4.16

4.3.2.3 Output-Synapsen sind reproduzierbar auf neuritische Kompartimente beschränkt

Bei oberflächlicher Betrachtung der Ergebnisse aus den Transplantationen kann man zunächst die Erkenntnis gewinnen, dass es neuronale Fortsätze gibt, die Output-Synapsen tragen und solche die keine tragen. Eine genauere Betrachtung zeigt, dass in den von uns untersuchten Zellstammbäumen die präsynaptischen Regionen häufig auf reproduzierbare Kompartimente der Neuriten beschränkt sind. So gilt für fast alle Zellstammbäume, die nach kontralateral projizieren, dass auf den transversalen, primären Neuriten keine SYN-Färbung zu beobachten ist. Gleiches gilt für transversale Neuriten im ipsilateralen Neuropilbereich, ist in den Abbildungen allerdings nicht so offensichtlich, da primäre Neuriten dort häufig von Zellen überdeckt werden.

Besonders auffällig ist die Kompartimentierung in den Zellstammbäumen von NB2-1 und NB6-2. In diesen Zellstammbäumen können mehr oder weniger isolierte, transversal projizierende Fortsätze beobachtet werden, die nur an ihrem lateralen Ende Anhäufungen präsynaptischer Strukturen haben (siehe Abb. 4.16A, C). Ähnliche Phänomene lassen sich bei anderen Zell-Stammbäumen erkennen, wenn man die am konfokalen Mikroskop aufgenommenen verschiedenen fokalen Ebenen der Präparate einzeln betrachtet. Vereinigt man die Ebenen jedoch zu einem Gesamtbild, werden Strukturen häufig von auf anderen Ebenen gelegenen Output-Synapsen überlagert oder scheinen zumindest nicht mehr isoliert vorzuliegen (z. Bsp. Zellstammbaum des NB5-2, vergleiche weißer Pfeil in Abb. 4.11C und C'). In den Beispielen des NB2-1-Zellstammbaums und des NB6-2-Zellstammbaums sind die präsynaptischen Strukturen auf kleine Bereiche beschränkt und befinden sich im gleichen Segment wie die Zellen des Klons. Es handelt sich scheinbar um Output-Synapsen lokaler Interneurone.

Auch bei intersegmentalen Neuronen kann das Phänomen der Kompartimentierung von Output-Synapsen beobachtet werden. Ein gutes Beispiel bietet erneut der Zellstammbaum von NB6-2. Dort ist ipsilateral eine laterale oder intermediäre intersegmentale Projektion nach posterior zu beobachten. In vier Klonen ist der lokale Anteil dieser Projektion frei von Synapsin-Färbung, während in den nachfolgenden Segmenten Output-Synapsen auftreten (siehe schwarze Sterne in Abb. 4.35).

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass bei manchen longitudinalen intersegmentalen Projektionen segmental wirkende Abstände zwischen prominenten SYN-positiven Strukturen vorliegen (siehe offene weiße Pfeile in Abb. 4.19, Abb. 4.22 und Abb. 4.25). Dies verstärkt den Eindruck, dass es exakt definierte Regionen entlang der Neuriten geben muss, an denen diese präsynaptische Strukturen ausbilden können. In den meisten untersuchten Zellstammbäumen konnten auf den stets transversal verlaufenden primären Neuriten keine Output-Synapsen beobachtet werden. Auch andere transversale Neuriten sind meist frei von präsynaptischen Strukturen. Auffällige und reproduzierbare Ausnahmen sind von uns bisher nur im NB5-2- und im NB6-2-Zellstammbaum beobachtet worden. Im NB5-2-Zellstammbaum finden sich Output-Synapsen innerhalb der Kommissuren auf einer transversal verlaufenden Projektion (siehe 4.3.4.15, weiße Pfeile in Abb. 4.32). Im NB6-2-Zellstammbaum gibt es kontralateral eine auffällig große präsynaptische Region, die sich zum Grossteil aus einem Netz von in die verschiedensten Richtungen projizierenden Seitenneuriten zusammensetzt (siehe 4.3.4.18; weiße Sterne in Abb. 4.35). Aber zumindest einige der dort beobachteten Output-Synapsen liegen auf prominenteren transversalen Neuriten. In den meisten Zellstammbäumen finden sich präsynaptische Strukturen jedoch nur entlang longitudinaler lokaler oder intersegmentaler Neuriten.

Zusammen genommen zeigen die Analysen der neuralen Zellstammbäume, dass Output-Synapsen auf reproduzierbare Kompartimente individueller Neuriten beschränkt sind.

4.3.2.4 Die Seitenneuriten vieler Motoneurone sind frei von Output-Synapsen

Die Zellstammbäume von VUM, MNB, NB1-1, NB3-1, NB3-2, NB5-2, NB5-3 und NB7-1 enthalten Motoneurone, deren primäre Neuriten vom Neuropil durch die segmentalen Nerven zum Muskel projizieren. Landgraf et al. (Landgraf et al., 1997) haben die meisten dieser Neurone identifiziert und ihr Projektionsverhalten im Stadium 16 detailliert beschrieben. Aus den primären Neuriten der betreffenden Zellstammbäume gehen innerhalb des Neuropils kurze, meist lokale Seitenneuriten hervor. Bei unseren Transplantationsexperimenten stellten wir fest, dass diese

Seitenneuriten in allen Fällen, die sich klar interpretieren ließen, keine präsynaptischen Strukturen aufweisen.

Bei VUM- und MNB-Zellstammbäumen sind diese Seitenneuriten kurz, dick und eher unauffällig. Sie sind nach dorsal deutlich abgesetzt von den anderen interneuronalen Projektionen innerhalb ihrer Zellstammbäume. In keinem Fall konnten auf ihnen Output-Synapsen gefunden werden (vergleiche 4.3.2.2.1; siehe Abb. 4.12).

Das aCC-Motorneuron des NB1-1-Zellstammbaums projiziert mit einem Seitenneurit nach kontralateral und ipsilateral gehen aus dem axonalen Neurit dorsolateral ein paar kurze Seitenneuriten hervor (Landgraf et al., 1997). Die UAS/Gal4-Experimente veranlassten uns schon zu der Vermutung, dass die aCC-Seitenneuriten postsynaptischer Natur sind (siehe 4.2.3; 4.2.4.2). Die Ergebnisse der Transplantationsexperimente stützen diese Vermutung. Der kontralaterale Seitenneurit von durch Transplantation erzeugten aCC-Neuronen zeigt auf seinen zahlreichen Verzweigungen keine Output-Synapsen. Die ipsilateralen Seitenneuriten zeigen in einem der beiden erhaltenen Klone keinen Hinweis auf Output-Synapsen (Abb. 4.17 A, A'). In dem anderen Klon liegen ein paar Output-Synapsen im ventralen Bereich der ipsilateralen Seitenneuriten. Allerdings ist selbst bei Betrachtung der einzelnen fokalen Ebenen die Trennung zwischen den axonalen Seitenneuriten und etwas ventraler liegenden Neuriten von Interneuronen desselben Zellstammbaums nicht ganz eindeutig (deshalb nicht gezeigt). Auf Grund der Beobachtungen in dem anderen Zellklon und unserer Ergebnisse von den UAS/Gal4-Experimenten, erscheint es uns wahrscheinlich, dass auch in diesem NB1-1-Zellklon keine präsynaptischen Strukturen auf den aCC-Seitenneuriten vorliegen.

Das axonale Faszikel des NB3-1-Zellstammbaums setzt sich aus den kontralateralen Projektionen der vier Motorneurone RP1, RP3, RP4 und RP5 zusammen. Aus diesem Faszikel gehen im medialen und lateralen kontralateralen Neuropil fächerförmig zahlreiche Seitenneuriten hervor. Diese Seitenneuriten sind frei von Output-Synapsen (vergleiche 4.3.2.2.1; siehe Abb. 4.13B, B''). Aus einem oder beiden dorsal gelegenen Motorneurone RP1 und RP4 verzweigen auch nach ipsilateral Seitenneuriten, die ebenfalls frei von SYN-Färbung sind (vergleiche 4.3.2.2.1; siehe Abb. 4.13B''). Zumindest RP3 hat ebenfalls auf der ipsilateralen Seite kurze Seitenneuriten (Landgraf et al., 1997), die in unseren NB3-1-Zellklonen

jedoch nicht eindeutig zu identifizieren waren. Deshalb können wir keine Aussage bezüglich ihrer prä- oder postsynaptischen Natur machen.

Der NB3-2-Zellstammbaum hat zwei efferente Faszikel, die sich aus den Projektionen von bis zu sechs Motorneuronen bilden und ipsilateral das Neuropil verlassen. Die efferenten Projektionen der NB3-2-Motorneurone haben im Stadium 16 nur ipsilaterale Seitenneuriten (Landgraf et al., 1997). In NB3-2-Zellklonen sind aber normalerweise nur kontralateral Output-Synapsen auszumachen (vergleiche 4.3.2.2.2; siehe Abb. 4.14B). Folglich sind die motorneuronalen Seitenneuriten im NB3-2-Zellstammbaum frei von präsynaptischen Strukturen und deshalb vermutlich postsynaptisch.

Der NB5-2-Zellstammbaum hat ein Motorneuron, das bis zum Stadium 16 nur ipsilateral axonale Seitenneuriten entwickelt (Landgraf et al., 1997). In sechs von zwölf Klonen sind diese Seitenneuriten mit großer Sicherheit frei von Output-Synapsen (beispielhaft dargestellt in Abb. 4.17B, B'). In den anderen Klonen waren die axonalen Seitenneuriten nicht ganz so deutlich von ventraler gelegenen SYN-positiven Neuriten zu trennen. Trotzdem entsteht auch bei diesen Klonen der Eindruck, dass die axonalen Seitenneuriten wenn überhaupt nur auf ihren ventralsten Ausläufern Output-Synapsen tragen.

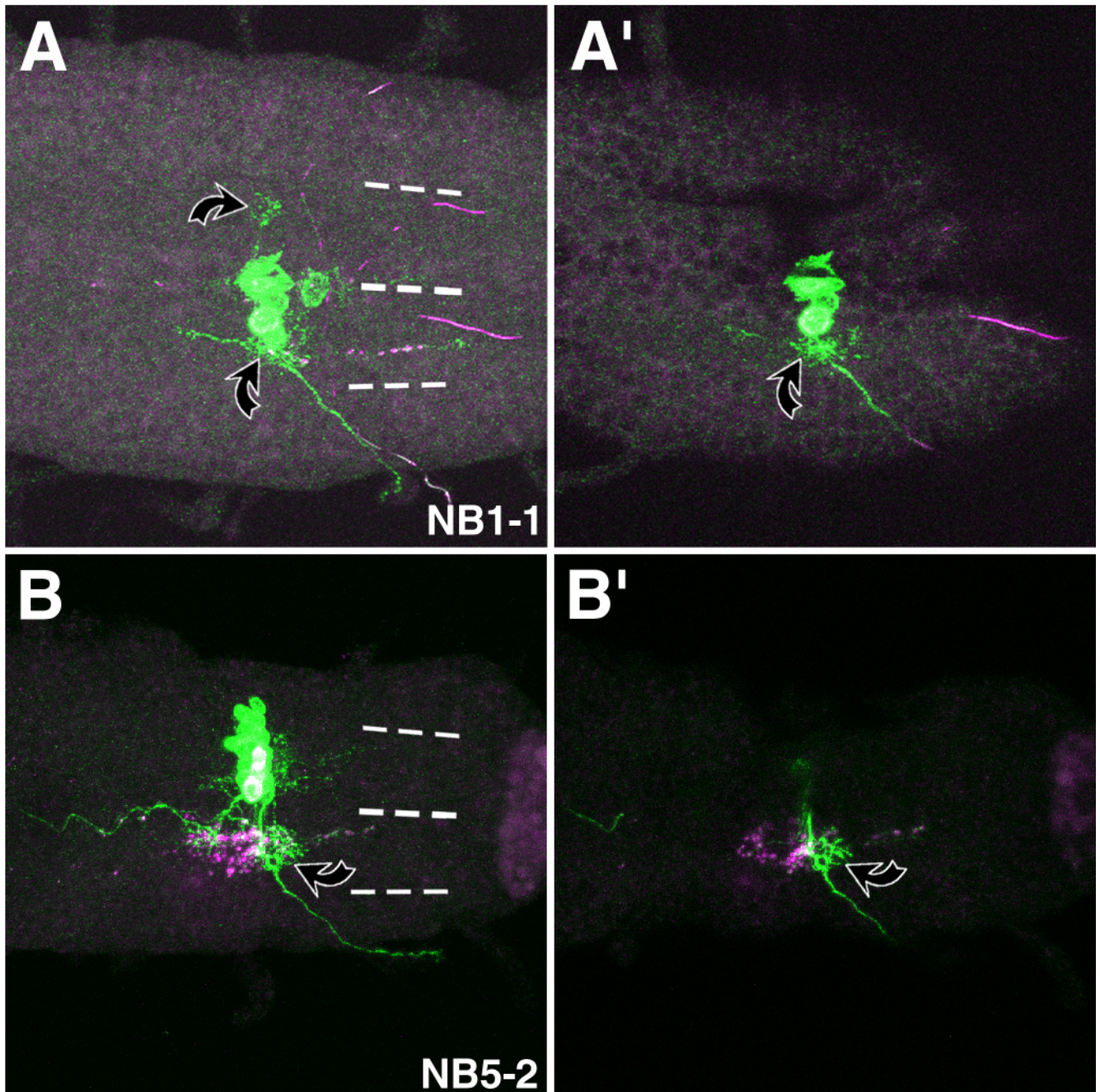
Der NB5-3-Zellstammbaum hat ein einzelnes Motorneuron, das ipsilateral projiziert. Bis ins frühe Stadium 17 sind keine kontralateralen Seitenneuriten für das NB5-3-Motorneuron beschrieben worden (Schmid et al., 1999). Die ipsilaterale Seite des Zellstammbaums ist frei von Output-Synapsen (vergleiche 4.3.2.2.2; siehe Abb. 4.14C). Also sind auch die axonalen Seitenneuriten im NB5-3-Zellstammbaum frei von Output-Synapsen sind.

Abb. 4.17 Motorneuronalen Seitenneurite

A - B': Spätembryonale neurale Zellstammbäume in *syn*-mutanten Empfängerembryonen. Dorsale Aufsicht, anterior ist links. Antikörperfärbung gegen MCD8 (grün), SYN (magenta). Unterbrochene Linien markieren die ungefähren Ränder des Neuropils und dazwischen die Mittellinie. Apostrophierte und nicht apostrophierte Abbildungen mit gleichem Buchstaben zeigen dasselbe Präparat. Nicht apostrophierte Abbildung zeigen eine Komposition aller Fokusebenen, apostrophierte Abbildungen nur eine Komposition der dorsalsten Fokusebenen.

Die Seitenneurite (schwarze gebogene Pfeile) der motorneuronalen Projektionen des NB1-1-Zellstammbaums (A, A') und des NB5-2-Zellstammbaums (B, B') sind frei von Output-Synapsen.

Abb. 4.17



Der NB7-1-Zellstammbaum hat drei bis sechs ipsilateral projizierende Motorneurone (Schmid et al., 1999). Die ipsilaterale Seite des Klons ist frei von Output-Synapsen, was den Schluss zulässt, dass auch die motorneuronalen Seitenneuriten ipsilateral keine präsynaptischen Strukturen aufweisen (vergleiche 4.3.2.2.2; siehe Abb. 4.14D). Allerdings ist zumindest für ein vermutliches NB7-1-Motorneuron beschrieben, dass es im Stadium 16 einen nach kontralateral projizierenden Seitenneurit besitzt (Landgraf et al., 1997). Dieser konnte mit den vorhandenen Daten über NB7-1-Zellklone im Stadium 17 jedoch nicht von anderen, interneuronalen Neuriten unterschieden werden. Deshalb kann zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass sich auf dieser kontralateralen motorneuronalen Projektion Output-Synapsen finden. Die bisher an dieser Stelle präsentierten Ergebnisse, lassen uns jedoch das Gegenteil vermuten.

Zusammengefasst, ergeben die bisherigen Daten, dass die Seitenneuriten zahlreicher Motorneurone keine Output-Synapsen haben. In einigen Fällen kann dies nicht sicher ausgeschlossen werden, es wurden aber in keinem Fall eindeutig identifizierbare motorneuronale Seitenäste mit Output-Synapsen gefunden. Diese Ergebnisse lassen Vermutungen über die Funktion von Motorneuronen und ihre Feinstruktur in Insekten zu. Es könnte sein, dass motorneuronale Seitenneuriten in Analogie zu Dendriten bei Vertebraten als reine Input-Regionen fungieren. Präsynaptische Regionen wären dann ausschließlich auf das Ende des efferenten Axons beschränkt. Demnach wären Motorneurone reine Integratoren zentraler Information und Übermittler in die Peripherie. Innerhalb des ZNS würde ihnen daher keine regulierende Funktion zukommen.

4.3.3 Neuronale Transplantationsklone *kakapo*-mutanter Zellen

Ein Genprodukt, das eine Funktion bei der kompartimentierten Verteilung von Output-Synapsen im ZNS haben könnte, ist das Zytoskelett-assoziierte Protein KAKAPO (KAK). Zumindest bei der präsynaptische Entwicklung an der NMJ spielt KAK eine wichtige Rolle, denn in *kak*-mutanten Embryonen sind die NMJs signifikant verkleinert (Prokop et al., 1998b). Außerdem zeigen sich bei *kak*-Mutationen auch Defekte im ZNS wie reduzierte Neuriten und Kompartimentierungsdefekte bei FAS2 und dem Mikrotubuli-assoziierten Protein FUTSCH (Prokop et al., 1998b).

Um mögliche Funktionen von KAK während der Entwicklung von Präsynapsen im ZNS mit Hilfe der Transplantationstechnik zu untersuchen, wurden rekombinante Fliegenstämme vom Genotyp *kak*^{SF20}, *UAS-mCD8-GFP/CyO* und *kak*^{Df(2R)MK1}, *tubP-Gal4/CyO* durch genetische Rekombination hergestellt (Details siehe 3.2.4). Verkreuzt man diese beiden Stämme, so exprimieren nur diejenigen Embryonen der F1-Generation mCD8-GFP, die homozygot mutant für *kak* sind.

Aus den Transplantationsexperimenten mit *kak*-mutanten Spendern wie oben beschrieben konnten zwölf neuronale Transplantations-Klone gewonnen werden. Von diesen Zellklonen konnten sechs nicht sicher identifiziert werden und einer zeigte deutliche Zeichen von Fehlentwicklung. Die fünf restlichen Klone konnten jedoch eindeutig identifiziert werden. Es handelte sich um jeweils einen Klon der neuronalen Zellstammbäume von MNB, NB1-1, NB3-2, NB5-2 und NB6-2. Die Morphologie der identifizierten *kak*-Klone und die Verteilung präsynaptischer Regionen auf ihren Neuriten unterschied sich nicht von den bei homologen wildtypischen Zellstammbäumen gemachten Beobachtungen (siehe Tabelle 4.2). Nur beim NB6-2-Zellstammbaum wurden mehrere Unterschiede festgestellt. Ob es sich dabei um Effekte der *kak*-Mutation handelt oder um anderweitig bedingte Fehlentwicklung kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Eine detaillierte Beschreibung der *kak*-mutanten Zellstammbäume erfolgt parallel zur Beschreibung der wildtypischen Klone in einem späteren Kapitel (siehe entsprechende Unterkapitel in 4.3.4).

Tab. 4.2 Synapsen und ihre Verteilung auf wildtypischen und *kakapo*-mutanten Transplantationsklonen

Zellstammbäume: Name des Zellstammbaums, dem die entsprechenden Transplantationsklone zugeordnet wurden. **Synapsenanzahl:** Anzahl individueller SYNAPSIN-(SYN-)Punkte auf wildtypischen (**wt**) oder *kakapo*-mutanten (**kak**) Transplantationsklonen. **n:** Anzahl der wildtypischen Transplantationsklone, die analysiert wurden. **MW:** Mittelwert. **Stabw:** Standardabweichung. (MW und Stabw nur angegeben, wenn n>2). Die Anzahl der Synapsen wurde anhand der konfokalen Bildserien bestimmt und auf spezifische Regionen beschränkt, in denen die einzelnen SYN-Punkte gut voneinander zu unterscheiden waren. Diese Regionen waren: MNB: vollständige präsynaptische Region; NB1-1: alle posterioren ipsilateralen SYN-Punkte; NB3-2: vollständige präsynaptische Region; NB5-2: alle kontralateralen SYN-Punkte, anterior von der charakteristischen transversalen Projektion (in Abb. 4.32 durch weiße gebogene Pfeile gekennzeichnet). **Ausbreitung der präsynaptischen Verzweigungen:** Regionen, in denen sich die gezählten SYN-Punkte befanden. Die angegebenen Werte repräsentieren die Größe dieser Region im Vergleich zu einem Quadrat mit dem Durchmesser des jeweiligen Neuropils als Seitenlänge. Auf die Angabe von Synapsenanzahl und Ausbreitung der präsynaptischen Verzweigungen für den NB6-2-Zellstammbaum wurde verzichtet, da dieses Präparat ungewöhnliche Projektionen zeigte und außerdem beschädigt war.

Zellstammbäume	Synapsenanzahl		Ausbreitung der präsynaptischen Verzweigungen	
	wt (n) MW±Stabw	<i>kak</i>	wt MW±Stabw	<i>kak</i>
MNB	33 & 64 (2)	37	0,4 & 0,46	0,51
NB1-1	13 & 26 (2)	16	0,1 & 0,06	0,1
NB3-2	39 bis 81 (8) 57,3±13,72	52	0,1 bis 0,21 0,14±0,033	0,19
NB5-2	24 bis 56 (10) 40,7±10,35	37	0,16 bis 0,33 0,25±0,063	0,21

Tab. 4.2

Die Analyse der *kak*-mutanten neuronalen Zellstammbäume zeigt allenfalls im Bezug auf die Oberfläche oder Dicke der Neuriten einen Phänotyp. mCD8-gefärbte Axone und Neuriten wirken in fast allen Zellklonen (Ausnahme siehe 4.3.4.18, Abb. 4.35I) nicht mehr wie durchgehende Stränge sondern erscheinen als immer wieder unterbrochene Strukturen. Axone erhalten dadurch ein Erscheinungsbild, als wären sie an zahlreichen Stellen gerissen (siehe z. Bsp. Abb. 4.20C), einige Neuriten im Neuropil sind nur noch als punktförmige, perlschnurartig aneinandergereihte Strukturen nachweisbar (Abb. 4.22C) und andere sind nur noch als diffuse Färbung, die sich wenig von der Hintergrundfärbung abhebt zu erkennen (Abb. 4.27I). Auch für Dil-markierte *kak*-mutante Neuronen wurde berichtet, dass die Zellmembran Änderungen ihres Erscheinungsbildes aufweist (Prokop et al., 1998b). KAK könnte also eine Rolle bei der Organisation des corticalen Zytoskeletts spielen.

Im Gegensatz zur CD8- war die SYN-Färbung bei allen *kak*-mutanten Klonen stark. In Bezug auf die Verteilung präsynaptischer Regionen zeigt sich kein auffälliger Phänotyp. Bei den identifizierbaren Klonen stimmte die Verteilung der SYN-Punkte sowie ihre Anzahl mit den aus entsprechenden wildtypischen Zellklonen bekannten Daten überein (Tabelle 4.2). Dies war überraschend, da doch für die gleiche genotypische Konstellation starke Effekte auf die Synaptogenese an der NMJ schon gezeigt wurden (Prokop et al., 1998b). Zur Kontrolle führten wir mit homozygot *kak*-mutanten Embryonen des von uns für die Transplantationen verwendeten Stammes Antikörperfärbungen gegen SYN an der NMJ durch. Erwartungsgemäß stellten wir stark reduzierte NMJs fest (Abb. 4.18C, D)

Scheinbar spielt KAK, zumindest in dieser genotypischen Konstellation, eine wichtige Rolle bei der Synaptogenese an der NMJ ist jedoch nicht von solch weitreichender Bedeutung im ZNS. Gewisse Einflüsse muss KAK jedoch auch auf Synapsen im ZNS haben. Dies zeigt ein Vergleich der Verteilung von Synapsen im WT und in *kak*-mutanten Tieren bei SYN-Antikörperfärbungen des gesamten Bauchmarks. Die weiter oben schon beschriebenen segmental wiederholten Löcher im Färbemuster des präsynaptischen Markers (siehe 4.1) sind im WT auf den ventralen Teil des Neuropils begrenzt, in *kak*-mutanten Tieren, sind die Löcher hingegen auch noch im dorsalen Neuropilbereich vorhanden (Abb. 4.18A, B).

Der unterschiedliche Einfluss von KAK auf Synaptogenese an der NMJ bzw. im Bauchmark beweist, dass offensichtlich Unterschiede zwischen NMJ- und ZNS-

Synaptogenese bestehen. Dies zeigt auch, dass die NMJ als Modellsystem für Synaptogenese nicht ausreichend ist.

Des Weiteren zeigen die präsentierten Ergebnisse, dass die Transplantationstechnik in Kombination mit den von uns gemachten Beschreibungen wildtypischer NB-Zellstammbäume für eine detaillierte Analyse von Mutanten und Tests zur Zellautonomie von Proteinen genutzt werden kann.

4.3.4 Identifikation der neuralen Zellstammbäume

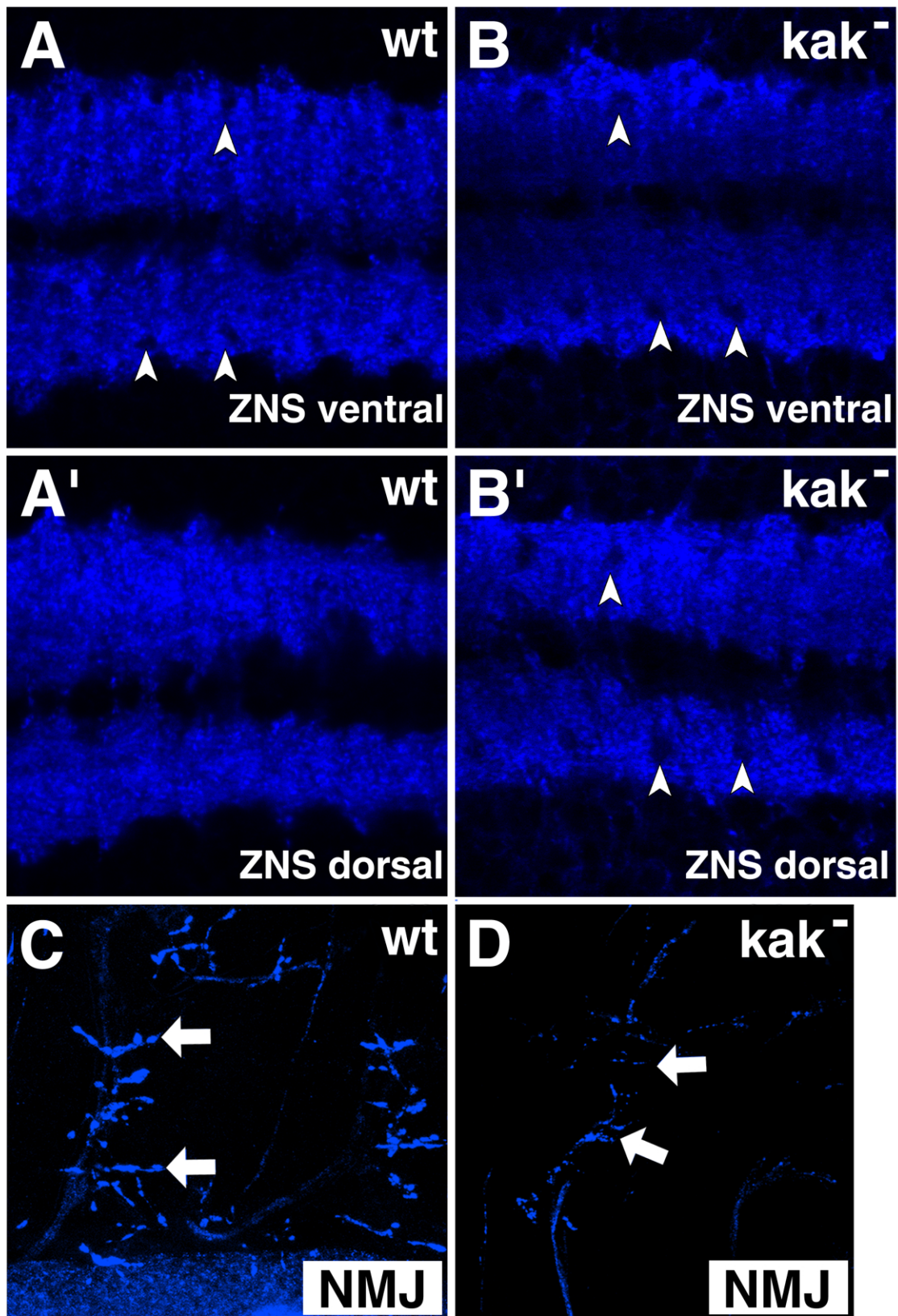
In unseren Experimenten wollten wir die Verteilung von Synapsen auf Zellstammbäumen darstellen. Dies ist natürlich nur zu einem Zeitpunkt möglich, in dem Synapsen ausdifferenziert sind. Synaptische Marker, wie zum Beispiel SYT werden im Stadium 16 der Embryonalentwicklung von *Drosophila* im Bauchmark nur schwach exprimiert. Erst im Verlauf des Stadiums 17 verstärkt sich diese Expression (A. Prokop, pers. Mitteilung). SYN-Expression erfolgt noch später, als SYT-Expression (A. Prokop, pers. Mitteilung). Erste Aktionspotentiale in *Drosophila*-ZNS-Neuronen sind ebenfalls erst im frühen Stadium 17 feststellbar (Baines und Bate, 1998). Wir entschieden uns deshalb dafür, Zellstammbäume im späten Stadium 17, also kurz vor Schlupf der Larve, zu untersuchen, denn zu diesem Zeitpunkt kann man davon ausgehen, dass synaptische Schaltkreise innerhalb des ZNS schon voll entwickelt sind. Allerdings erschwerte dies die Identifizierung der neuralen Zellstammbäume.

Abb. 4.18 Auswirkungen der *kakapo*-Mutation

A - B': Dorsale Aufsicht auf das Bauchmark von *Drosophila*-Embryonen (spätes Stadium 17). Anterior links, lateral oben. Antikörperfärbung gegen SYN (blau). Apostrophierte und nicht apostrophierte Abbildungen mit gleichem Buchstaben zeigen dasselbe Präparat. Nicht apostrophierte Abbildungen sind eine Komposition mehrere ventraler Fokusebenen, apostrophierte Abbildungen eine Komposition mehrere dorsaler Fokusebenen. Segmental wiederholte, lochartige Strukturen (weiße Pfeilköpfe) sind im WT (A, A') nur im ventralen Neuropil zu finden. Im *kak*-mutanten Bauchmark ((B, B')) sind diese Löcher auch im dorsalen Neuropilbereich.

C, D: Aufsicht auf NMJs (spätes Stadium 17). Anterior links, dorsal oben. Antikörperfärbung gegen SYN (blau). Im Vergleich zum WT (C) sind an *kak*-mutanten NMJs (D) die Synapsen (weiße Pfeile) stark reduziert.

Abb. 4.18



Diese Zellstammbäume der Neuroblasten (NBs) im ventralen Bauchmark von *Drosophila* wurden für das späte Stadium 16 (ca. 16 Stunden Entwicklung bei Raumtemperatur) der Embryonalentwicklung bereits ausführlich beschrieben (Bossing und Technau, 1994; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Schmid et al. erweiterten diese Daten durch Beschreibungen im frühen Stadium 17 (ca. 19 Stunden Entwicklung bei Raumtemperatur; Schmid et al., 1999). Von diesem Zeitpunkt bis zum Schlupf der Larve erfahren die Zellen weitere starke Veränderungen. Neue Neuriten werden gebildet, schon bestehende Neuriten verlängern sich und verzweigen sich komplex. Des Weiteren verschiebt sich die Position vieler Zellen im Bauchmark bedingt durch dessen Kontraktion, die schon im Stadium 12 beginnt und erst im späten Stadium 17 beendet ist. Viele der charakteristischen Merkmale zur Klonerkennung verändern sich also zum Teil erheblich und lassen sich nur schwer im späten Stadium 17 wiedererkennen.

Ein weiteres Kriterium, das normalerweise zur Identifizierung neuronaler Klone herangezogen wird, konnte ebenfalls nicht genutzt werden: Der Verlauf kontralateraler Projektionen durch die anteriore oder posteriore Kommissur. Zum einen werden die Konnektive und die einzelnen Kommissuren durch die Kontraktion des Bauchmarks näher aneinandergerückt. Insbesondere die Unterscheidung von anteriorer und posteriorer Kommissur fällt nicht mehr so leicht wie im Stadium 16 oder im frühen Stadium 17. Zum anderen wurde bei zahlreichen Präparaten Vectashield-Mounting-Medium (siehe 3.2.8) als Einbettungsmedium verwendet. Vectashield bietet den Vorteil, dass die Fluoreszenz der sekundären Antikörper nicht so leicht ausbleicht, ermöglicht also bei der konfokalen Analyse eine stärkere Laserleistung und ein häufigeres Scannen des Präparats und damit eine bessere Darstellung der fluoreszierenden Zellen und ihrer Fortsätze. Nachteil dieses Einbettungsmediums ist jedoch, dass das Gewebe bei lichtmikroskopischer Betrachtung konturlos wirkt, so dass sich Neuropil und Kortex nur noch schwer auseinander halten lassen. Somit sind auch die Kommissuren nur selten zu erkennen. Eine Ursache für dieses unscharfe Erscheinungsbild scheint der gegenüber anderen Einbett-Medien veränderten Lichtbrechungsindex sein.

Aus all diesen Gründen war also die Identifikation der aus transplantierten Vorläuferzellen hervorgegangenen Zellklone im späten Stadium 17 erschwert. Sorgfältiger Vergleich der Transplantationsklone mit publizierten sowie teilweise noch unveröffentlichten Daten aus unserem Labor erlaubte es jedoch in den meisten

Fällen, sie ihren Vorläuferzellen zuzuordnen. Die genauen Kriterien, welche zur Identifikation der verschiedenen Zellstammbäume Verwendung fanden, ihre Morphologie sowie die Verteilung präsynaptischer Strukturen innerhalb dieser Zellklone werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

4.3.4.1 VUM

Beim VUM (**V**entral **U**npaired **M**edian NB) handelt es sich um eine aus der Mittellinie stammende neurale Vorläuferzelle. Die Neurone des VUM-Zellstammbaums liegen ganz ventral im Bauchmark an der Mittellinie. Der VUM-Zellklon besteht aus zwei, vier oder sechs Zellen, die je zur Hälfte Motorneurone und Interneurone sind. Jede Zelle hat eine nach ipsi- und kontralateral bifurkierende Projektion. Im Fall von vier oder sechs Zellen kommt es vor, dass die Axone verschiedener Motorneurone das Neuropil durch unterschiedliche Nervenwurzeln verlassen. Bezüglich der Mittellinie weisen VUM-Zellklone eine fast spiegelbildliche Symmetrie auf (siehe Grafik in Abb. 4.19; Bossing und Technau, 1994).

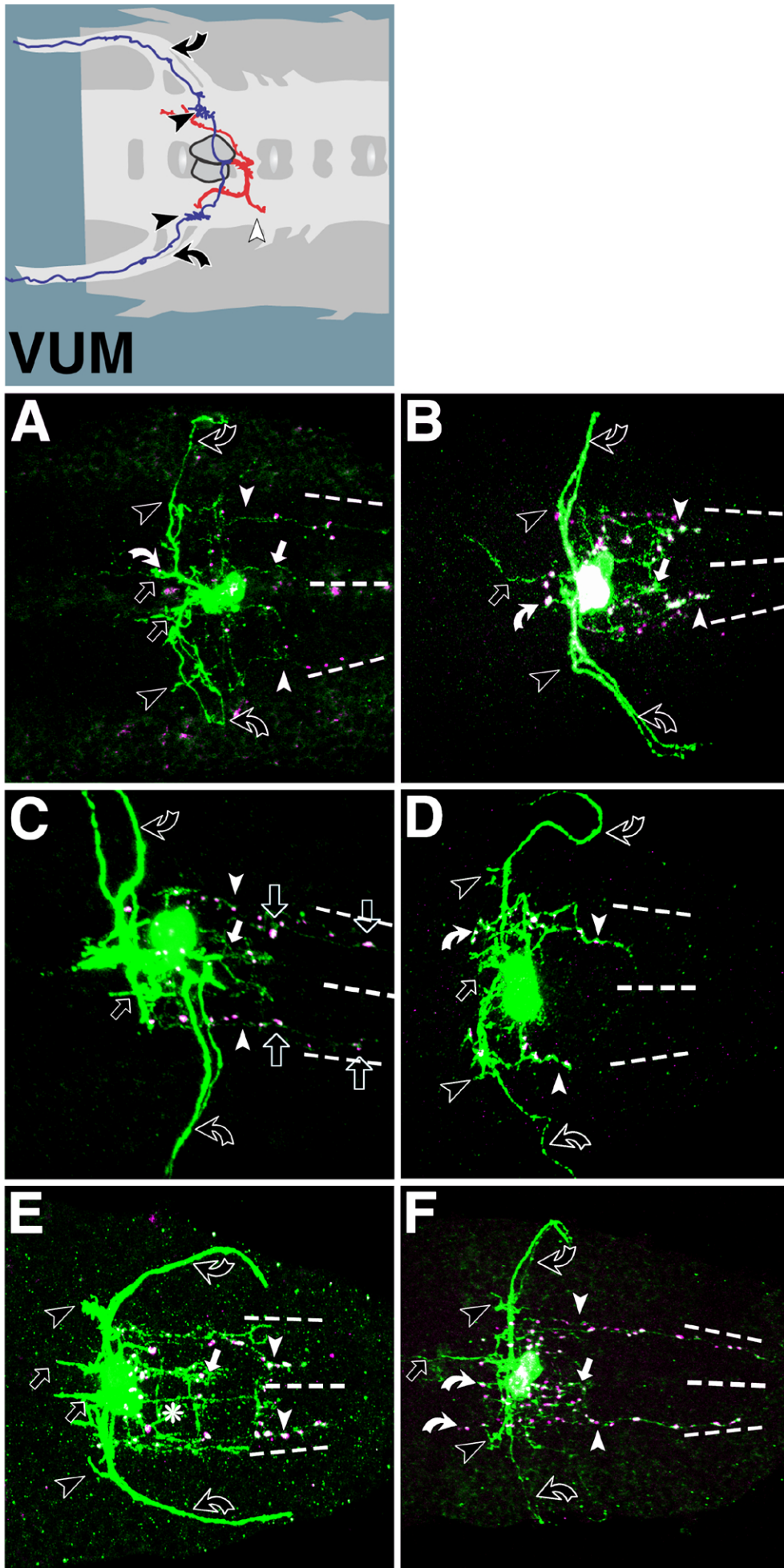
Abb. 4.19 Beschreibung spätembryonaler VUM-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines VUM-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing und Technau, 1994); mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen VUM-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A - F).

A - F: Spätembryonale VUM-Zellstammbäume. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Die Axone der Motorneurone projizieren durch die dorsale Region des Neuropils (gebogene schwarze Pfeile). Median lässt sich jeweils ein Seitenneurit feststellen, der lokal nach anterior auswächst (teilweise angedeutet durch schwarze Pfeile). Lateral im Neuropil lassen sich kurze, dicke Seitenneuriten beobachten, die nach anterior und ventral projizieren (schwarze Pfeilköpfe). Die Axone und ihre Seitenneuriten weisen keinerlei Syn-Färbung auf.

Vermutlich interneuronale Projektionen finden sich in der ventralen Region des Neuropils (weiße Pfeile, weiße Pfeilköpfe und gebogene weiße Pfeile). Auf all diesen Neuriten können Output-Synapsen beobachtet werden. In vier Zellklonen (alle außer D) projizieren ein oder mehrere vermutlich lokale Neuriten medial nach posterior (teilweise durch weiße Pfeile angedeutet). In allen Klonen projizieren lateral ein oder mehrere Neuriten intersegmental nach posterior (weiße Pfeilköpfe). Auf den lateralen interneuronalen Projektionen ist eine beeindruckende Symmetrie festzustellen. In offenbar segmentalem Abstand finden sich auffällige SYN-Punkte (zu sehen in A, C, E, F markiert durch offene weiße Pfeile nur in F). In vier Fällen konnten auch schwach gefärbte, manchmal nur anhand von SYN-Punkten identifizierbare kurze Projektionen nach anterior beobachtet werden (teilweise angedeutet durch gebogene weiße Pfeile). Diese lagen in zwei Fällen medial (A, B). Im dritten Fall lagen die anterioren Neuriten lateral und verblieben im Segment (D). Im letzten Fall lagen sowohl medial als auch lateral kurze Neuriten nach anterior vor (F). In vier Klonen sind in posterior zum Zellklon liegenden Segmenten eine oder mehrere transversale Projektionen zu beobachten (B, C, E, F; am deutlichsten zu sehen rechts und links des weißen Sterns in F).

Abb. 4.19

Anhand dieser Kriterien ließen sich unter den Transplantationspräparaten acht VUM-Zellstammbäume identifizieren. Davon lag einer direkt neben einem anderen neuralen Transplantationsklon, ein weiterer Klon zeigte keine SYN-Färbung weshalb diese beiden bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Von den sechs betrachteten VUM-Klonen hatte einer zwei Zellen (Abb. 4.19D), die restlichen jeweils vier Zellen (Abb. 4.19A, B, C, E, F). In allen Beispielen reichen nur die motorneuronalen Projektionen bis ins dorsale Neuropil hinauf, während sämtliche interneuronalen Projektionen in ventraleren Bereichen des Neuropils verbleiben. Ähnliches war schon für jüngere VUM-Zellstammbäume beschrieben worden (Bossing und Technau, 1994). Nur die interneuronalen Projektionen tragen Output-Synapsen. Der VUM-Zellstammbaum weist also eine dorso-ventral spezifische Verteilung von Synapsen auf (siehe 4.3.2.2.1). Auf den motorneuronalen Projektionen im dorsalen Neuropilbereich lassen sich mehrere nur wenig verzweigte Seitenneuriten feststellen, die jedoch keine SYN-Markierung tragen. Diese Beobachtung unterstützt unsere Annahme, dass motorneuronalen Seitenäste überwiegend postsynaptischer Natur sind (siehe 4.3.2.4).

4.3.4.2 MNB

Beim MNB handelt es sich wie beim VUM um eine aus der Mittellinie stammende neurale Vorläuferzelle. Wie beim VUM-Zellstammbaum liegen die Tochterzellen des MNB an der ventralen Mittellinie des Bauchmarks und umfassen bifurkierende Motorneurone und Interneurone (siehe Grafik in Abb. 4.20; Bossing und Technau, 1994). MNB- und VUM-Zellstammbäume lassen sich jedoch anhand zweier Kriterien unterscheiden: Während die 2-4 Tochterzellen des VUM-Vorläufers immer zur Hälfte aus efferenten und Interneuronen bestehen, enthält der MNB-Zellstammbaum grundsätzlich nur ein efferentes Motorneuron zusammen mit vier bis sieben Interneuronen. Zweitens liegen die Zellkörper des MNB-Zellstammbaums in der Regel nicht an der ventralen Oberfläche des Bauchmarks wie die VUM-Neurone sondern etwas dorsaler (Bossing und Technau, 1994).

Anhand dieser Kriterien ließen sich unter den Transplantationspräparaten ein *kak*-mutanter (Abb. 4.20C) und zwei wildtypische (Abb. 4.20A, B) MNB-Zellstammbäume identifizieren. Der *kak*-mutante Klon ist nicht wesentlich

verschieden von den wildtypischen Beispielen und wird hier nicht weiter erwähnt. In allen Beispielen reichen nur die efferenten Projektionen bis ins dorsale Neuropil hinauf, während sämtliche interneuronalen Projektionen in ventraleren Bereichen des Neuropils verbleiben. Ähnliches war schon an den VUM-Klonen beobachtet (siehe 4.3.4.1) und für jüngere Zellstammbäume des MNB beschrieben worden (Bossing und Technau, 1994). Ähnlich den Befunden zum VUM-Zellstammbaum tragen nur die interneuronalen Projektionen Output-Synapsen. Auch der MNB-Zellstammbaum weist also eine dorso-ventral spezifische Verteilung von Synapsen auf (siehe 4.3.2.2.1). Zudem zeigen die efferenten Projektionen im dorsalen Neuropil recht grobe, kaum verzweigte Seitenneuriten, die jedoch keine SYN-Markierung tragen. Diese Beobachtungen am MNB unterstützen also ebenfalls unsere Annahme, dass Seitenäste efferenter Neurone sehr wahrscheinlich postsynaptischer Natur sind (siehe 4.3.2.4).

Abb. 4.20 Beschreibung spätembryonaler MNB-Zellstammbäume

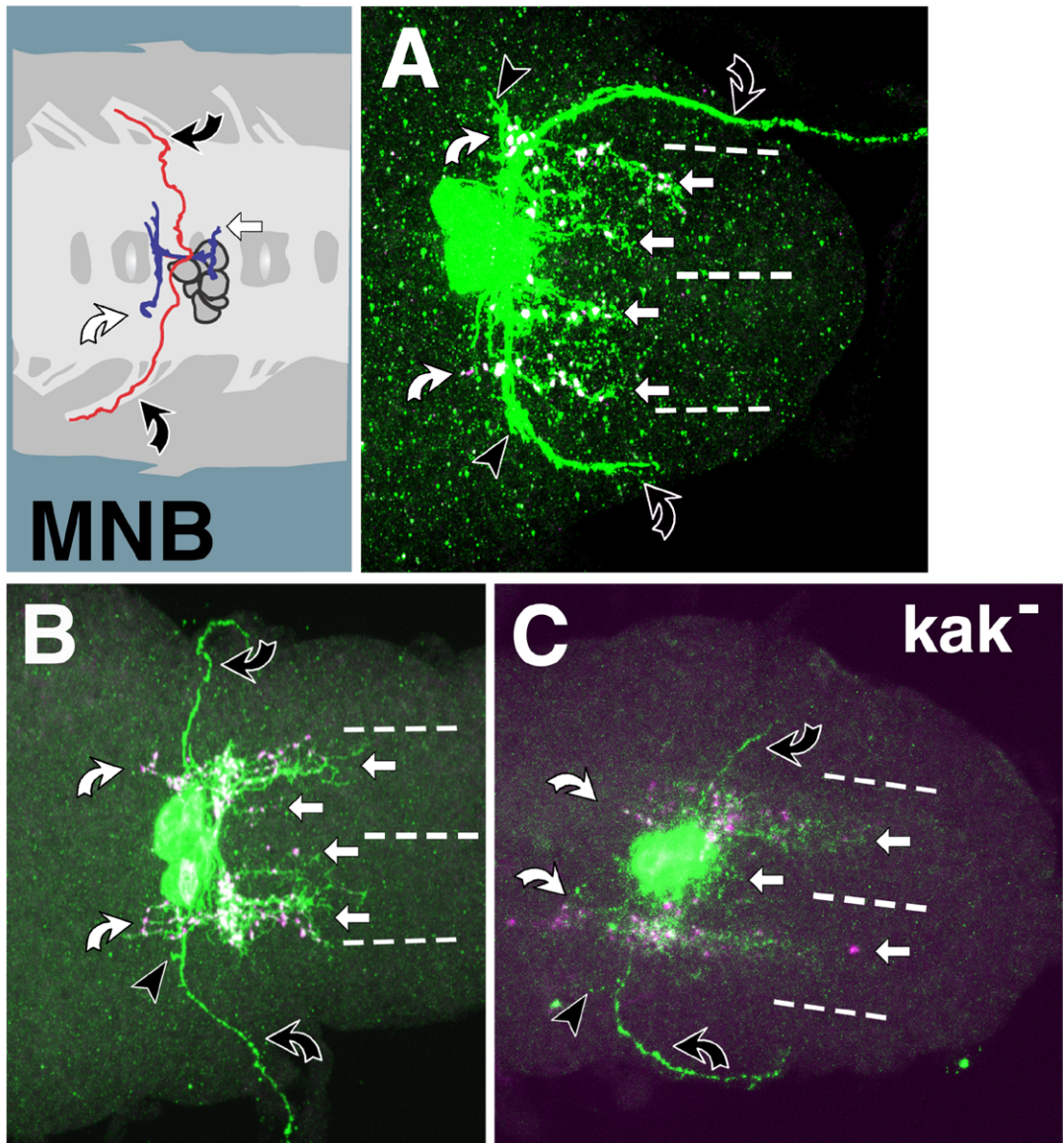
Grafik: schematische Darstellung eines MNB-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing und Technau, 1994); mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen MNB-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A-C).

A - C : Spätembryonale MNB-Zellstammbäume (wildtypisch: A, B; *kak*-mutant: C). Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

A, B : Wie bei den VUM Motoneuronen projiziert das Axon des MNB Motoneurons durch die dorsale Region des Neuropils (gebogene schwarze Pfeile). Zwar sind kurze Seitenneuriten zu sehen, doch sind sie bei den beiden Klonen zu unterschiedlich, um auf ein bestimmtes Projektionsverhalten schließen zu lassen (schwarze Pfeilköpfe). Die Axone der Motoneurone sowie die aus ihnen entspringenden kurzen Seitenneuriten zeigen keine SYN-Färbung. Stattdessen beschränken sich potenzielle Output-Synapsen ausschließlich auf die ventraleren, vermutlich interneuronalen Neuriten (weiße Pfeile, gebogene weiße Pfeile; vgl. ähnliche Beobachtung für VUM-Klone, Abb. 4.19). Darunter lassen sich nur wenige kurze, anteriore Projektionen im lateralen Neuropilbereich erkennen (weiße gebogene Pfeile). Posteriore Projektionen liegen medial und lateral, sind stark verästelt und erstrecken sich z.T. über etwa zwei Segmente (weiße Pfeile).

C : Der *kak*-mutante MNB weist dieselbe charakteristische Morphologie und SYN-Verteilung auf wie die wildtypischen Beispiele. Im Gegensatz zu den zwei wildtypischen MNBs wirken seine efferenten Axone sehr dünn (gebogene schwarze Pfeile). Die Färbung ist nicht durchgängig, so dass der Eindruck einer immer wieder unterbrochenen Linie entsteht. Insbesondere vom nach rechts abgehenden Axon ist nur die erste Hälfte der noch im Bauchmark befindlichen Projektion zu erkennen. Die im WT beobachteten kurzen Seitenneuriten, die im Neuropil von den Axonen abgehen, scheinen vorhanden, sind aber ebenfalls nur schlecht zu erkennen (schwarzer Pfeilkopf). Die ventraleren, vermutlich interneuronalen Projektionen sind im *kak*-mutanten MNB-Stammbaum nur als diffuse, schwache Färbung nachweisbar (weiße Pfeile, gebogene weiße Pfeile). Durchgehende Neuritenäste sind nicht zu erkennen.

Abb. 4.20



4.3.4.3 MP1

Beim MP1 (**M**edian **P**aired 1) handelt es sich ebenfalls um eine aus der Mittellinie stammende neurale Vorläuferzelle. Der MP1-Zellstammbaum besteht aus zwei Interneuronen, die rechts und links der Mittellinie am ventralen Rand des Neuropils zu liegen kommen. Eines der beiden Neurone projiziert ins rechte Konnektiv, das andere ins linke. Die Projektionen bifurkieren jeweils im medialen Bereich des entsprechenden Konnektivs und verlaufen intersegmental nach anterior und posterior (siehe Grafik in Abb. 4.21; Bossing und Technau, 1994).

Anhand dieser Kriterien ließ sich unter den Transplantationspräparaten ein vermutlicher MP1-Zellklon identifizieren, bei dem aber die Antikörper-Färbung gegen SYN nicht funktionierte (Abb. 4.21A). Von der Morphologie hat sich der MP1-Zellstammbaum zwischen Stadium 16 und Ende Stadium 17 kaum verändert. Diese Beobachtung kann allerdings bis zur Beschreibung weiterer Stadium 17 MP1-Zellstammbäume nur vorläufig sein.

4.3.4.4 NB1-1

Der abdominale Zellstammbaum des NB1-1 besteht aus drei glialen Zellen, den beiden prominenten und vom Restklon nach dorsal abgesetzten Neuronen aCC und pCC sowie einer Gruppe von Interneuronen, die als 1-1I bezeichnet werden. Eine der Gliazellen ist ventral und die beiden anderen sind dorsal positioniert. aCC ist ein dorsal des Neuropils und nahe der Mittellinie liegendes Motorneuron, das ipsilateral aus dem Bauchmark heraus projiziert, aber auch einen sehr kurzen kontralateralen Fortsatz aufweist. pCC liegt ebenfalls dorsal des Neuropils dicht hinter aCC und projiziert medial über mehrere Segmente nach anterior. Die 1-1I-Neurone liegen ventral des Neuropils und projizieren ebenfalls ipsilateral lateral nach posterior. Bis auf die kontralaterale Projektion von aCC verlaufen also alle Projektionen des NB1-1-Zellstammbaums auf der ipsilateralen Seite (siehe Grafik in Abb. 4.22; Bossing et al., 1996).

Hauptsächlich anhand des dorsal gelegenen aCC-Motorneurons (in Abb. 4.22 nicht markiert, da von anderen Zellen verdeckt) ließen sich unter den Transplantationspräparaten ein *kak*-mutanter (Abb. 4.22C) und zwei wildtypische

NB1-1-Zellstammbäume (Abb. 4.22A, B) identifizieren. Zwar gibt es auch in NB3-1- und NB4-2-Zellstammbäumen Motorneurone dorsal des Neuropils, doch unterscheiden sich diese schon aufgrund ihres motorneuronalen Projektionsmusters von aCC. Im NB3-1-Zellklon projizieren die Motorneurone nach kontralateral und im NB4-2-Zellklon gibt es zwei distinkte motorneuronale Faszikel, die durch verschiedene Nervenwurzeln nach ipsilateral projizieren.

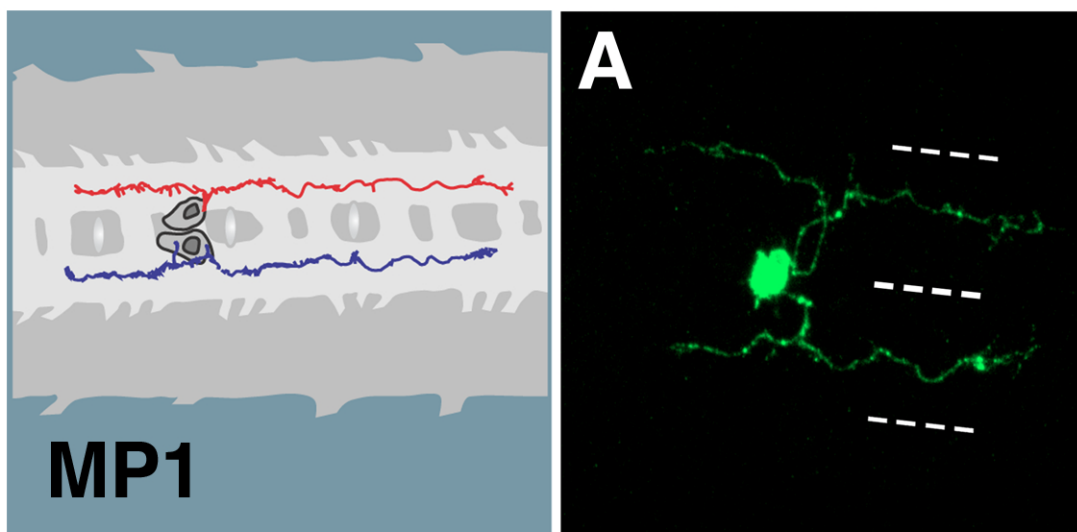
Bei den beiden wildtypischen NB1-1-Klonen waren jedoch aus früheren Stadien bekannte Bestandteile des normalen Zellstammbaums nicht sichtbar. So waren in einem Klon nur drei im anderen sogar nur zwei 1-1I-Neurone über den genetischen Marker mCD8 erkennbar, während normalerweise zwischen sechs und 14 dieser Neurone vorhanden sein sollten (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). Das Fehlen dieser Neurone könnte einerseits durch Zelltod erklärt werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die 1-1I-Neurone alle vorhanden sind, in einigen von ihnen aber das *tupP-Gal4*-Konstrukt nicht exprimiert wird. Gegen beide Vermutungen spricht allerdings die Tatsache, dass in dem *kak*-mutanten NB1-1-Zellstammbaum mindestens acht 1-1I-Neurone mCD8-gefärbt waren. Ansonsten gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem *kak*-mutanten und den wildtypischen NB1-1-Zellstammbäumen.

Das Projektionsmuster der Neurone verändert sich beim NB1-1-Zellklon zwischen Stadium 16 und Ende Stadium 17 nur geringfügig. Die kontralaterale Projektion von aCC verzweigt sich stark und im ipsilateralen Neuropilbereich gehen aus der axonalen Projektion lateral mehrere Seitenneuriten hervor. Die Projektionen von aCC im Neuropil sind vermutlich frei von SYN-Markierung. Diese Beobachtungen am NB1-1 unterstützen unsere Annahme, dass Seitenäste efferenter Neurone sehr wahrscheinlich postsynaptischer Natur zu sind (siehe 4.3.2.4). Ventral von den ipsilateralen Projektionen des aCC finden sich einige kurze Neuriten. Sie gehen vermutlich auf die 1-1I-Neurone zurück und tragen im Gegensatz zu den aCC-Neuriten SYN-Markierung. Der NB1-1-Zellstammbaum ist also auch ein Beispiel für

Abb. 4.21 Spätembryonaler MP1-Zellstammbaum

Grafik: schematische Darstellung eines MP1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing und Technau, 1994)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links.

A: Spätembryonaler MP1-Zellstammbaum. Dorsale Aufsicht, anterior links. Zelloberflächenmarker mCD8 grün. Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Die Morphologie der Zellen unterscheidet sich nicht von der im Stadium 16.

Abb. 4.21

die dorso-ventral-spezifische Verteilung von Synapsen (siehe 4.3.2.2.1). Außerdem zeigt der NB1-1-Zellstammbaum auch noch ipsilateral-kontralaterale Beschränkung in der Verteilung von Synapsen (siehe 4.3.2.2.2). Er ist der einzige unter den in dieser Arbeit beschriebenen Zellstammbäumen, bei dem sich die SYN-Markierung auf die ipsilaterale Seite beschränkt, die kontralateralen Neuriten also frei von Output-Synapsen sind.

4.3.4.5 NB2-1

Der NB2-1 hat einen interneuronalen Zellstammbaum aus acht bis 16 Zellen, die im medialen und intermediären Bereich des Bauchmarks liegen. Die mediansten Zellen liegen fast auf der Mittellinie. Alle Zellen liegen unterhalb des Neuropils im ventralen und intermediären Kortex-Bereich. Die Interneurone haben im Stadium 16 und frühen Stadium 17 kurze lokale Projektionen auf der ipsilateralen Seite und ein Faszikel von Neuriten projiziert transversal nach kontralateral, um dort im lateralen Neuropilbereich kurze longitudinale Projektionen nach anterior und posterior auszubilden (siehe Grafik in Abb. 4.23; Bossing et al., 1996). Nur der NB5-1-Zellstammbaum weist vergleichbar kurze Projektionen auf, doch besteht er aus weniger Zellen und diese liegen nur im medialen, aber nicht im intermediären Bereich des Kortex (siehe 4.3.4.13; Bossing et al., 1996).

Die Transplantationsexperimente ergaben zwei NB2-1 Zellklone (Abb. 4.23A, B), die über die Lage ihrer Zellen und die sehr kurzen longitudinalen Projektionen identifiziert wurden.

Auf der kontralateralen Seite der NB2-1-Zellstammbäume finden sich zwei transversale Projektionen. Beide projizieren über die Mittellinie bis ganz nach lateral. Die erste dieser Projektionen verläuft ventral und hat Output-Synapsen. Die zweite kontralaterale Projektion liegt dorsal und weist keine SYN-Markierung auf. Der NB2-1-Zellklon weist also dorso-ventral-spezifische Verteilung von Synapsen auf (siehe 4.3.2.2.1). Des Weiteren ist der NB2-1-Zellstammbaum ein Beispiel für medio-dorsal-spezifische Verteilung von Output-Synapsen, denn auf der kontralateralen Seite findet sich nur auf den lateralen Projektionen SYN-Färbung, während die medialen Projektionen nicht oder nur schwach SYN-markiert sind (siehe 4.3.2.2.4).

Abb. 4.22 Beschreibung spätembryonaler NB1-1-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines abdominalen NB1-1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996); (mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB1-1-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A-C).

A - C: Spätembryonale NB1-1-Zellstammbäume (wildtypisch: A, B; *kak*-mutant: C). Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

A, B: Die kontralaterale Projektion des aCC-Motoneurons weist mehrere vermutlich intersegmentale Seitenneuriten auf, die in alle Richtungen projizieren (schwarze Pfeilköpfe). Bevor das Axon von aCC auf der ipsilateralen Seite das Neuropil verlässt (schwarze gebogene Pfeile), gehen im dorsalen Neuropilbereich ebenfalls mehrere Seitenneuriten aus ihm hervor (schwarze Pfeile). Diese projizieren medial und lateral intersegmental nach posterior. In einem der beiden Klone ist auch eine prominente mediale Projektion eines aCC-Seitenneuriten nach anterior auszumachen, die mindestens bis ins nächste Segment reicht (schwarzer Stern in B). Die Seitenneuriten von aCC sind vermutlich frei von Synapsin (im Bereich der durch schwarze Pfeile gekennzeichnet wird überdeckt durch weiter ventral liegende Synapsin-Punkte, siehe dazu 4.3.2.2.1 und 4.3.2.4).

Im dorsalen oder mediodorsalen Neuropilbereich sind ein paar nicht genau zu erkennende längere Projektionen nach posterior. Sie exprimieren nur schwach mCD8 und lassen sich deshalb auch nicht auf ihre Ursprungszelle(n) zurückverfolgen. Sie weisen sowohl auf Höhe des Klons als auch ein Stück weiter posterior SYN-Punkte auf (weiße Pfeile). Im Vergleich zu publizierten Beschreibungen des Klons sind dies Neuriten der 1-1I-Neurone (Bossing et al., 1996; Udolph et al., 1993). Genau ventral von diesen Neuriten ist eine weitere intersegmentale, laterale Projektion nach posterior zu beobachten, die etwa im nachfolgenden Segment SYN-Punkte aufweist. Diese Projektion ist in beiden Klonen eindeutig auf die 1-1I-Neurone zurückzuführen (ebenfalls weiße Pfeile).

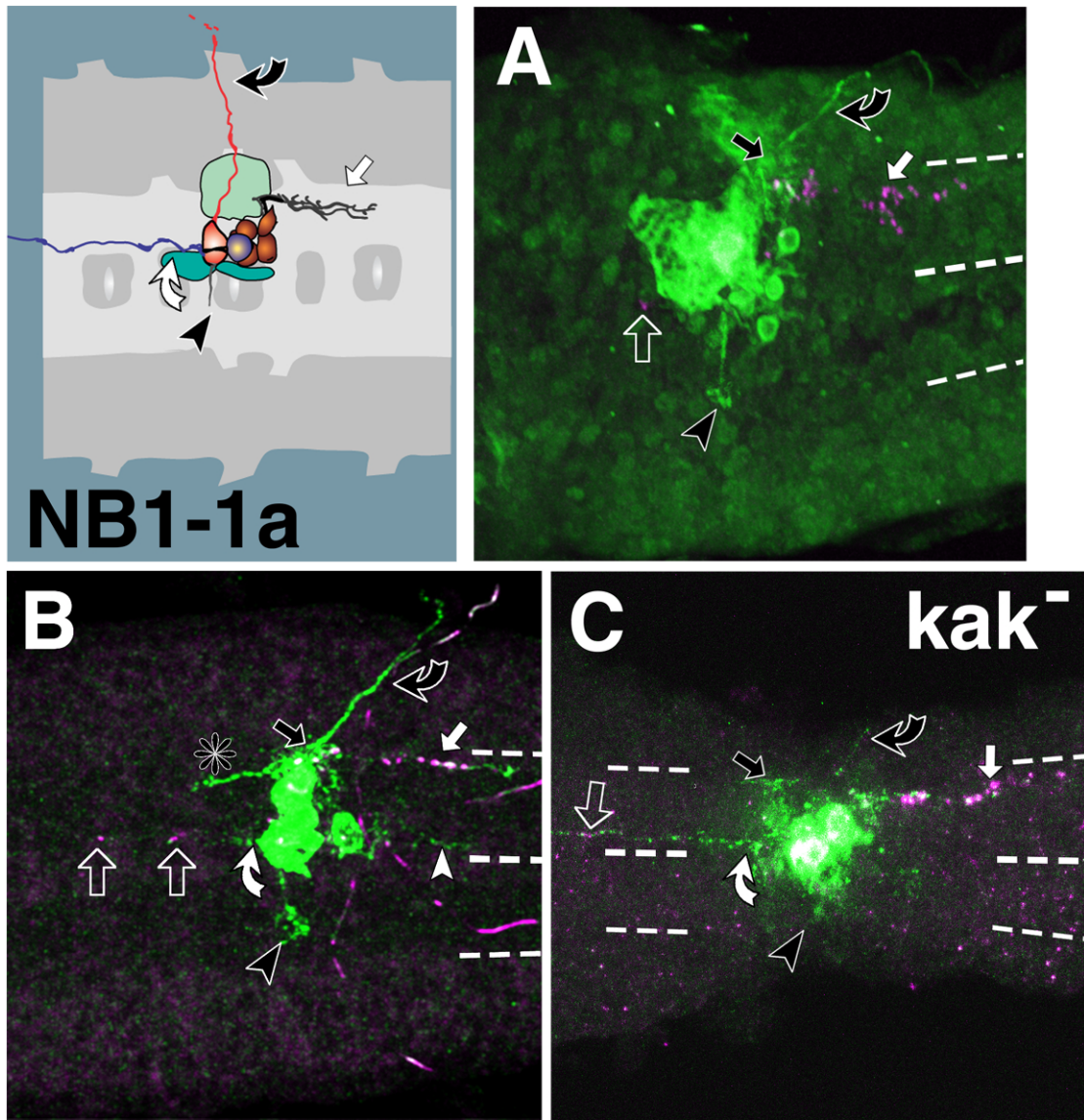
Die ipsilaterale mediane Projektion des pCC nach anterior ist nur bei einem der beiden Klone (gebogener weißer Pfeil in B) zu erkennen. Sie liegt bei diesem Klon im ventralen Neuropilbereich, allerdings geringfügig dorsaler, als die eben erwähnten Projektionen der 1-1I-Neurone. Sie weist in den Segmenten anterior des Klons zwei scheinbar segmental wiederholte SYN-Punkte auf (offene weiße Pfeile in B). In dem anderen Klon ist ein einzelner SYN-Punkt dort zu sehen, wo die pCC-Projektion zu vermuten wäre (offener weißer Pfeile in A).

In B ist zusätzlich zur anterioren Projektion von pCC noch eine ipsilaterale Projektion nach posterior zu sehen, die ebenfalls medial verläuft, aber ein klein wenig ventraler (weißer Pfeilkopf B). Auf dieser Projektion ist kein SYN vorhanden.

C: Der *kak*-mutanter NB1-1-Zellstammbaum weist annähernd die gleiche charakteristische Morphologie und SYN-Verteilung auf wie die wildtypischen Beispiele. Während die Zellen des *kak*-mutanten NB1-1-Zellklons gut gefärbt sind, sind die Projektionen teilweise nur sehr schlecht zu erkennen. Das von aCC stammende motoneuronale Axon kann nur erahnt werden. Die anti-mCD8-Färbung offenbart einige wenige Punkte, die in der gleichen Fokusebene des Präparats liegen und miteinander verbunden eine Linie bilden würden, die der axonalen Projektion von aCC in den wildtypischen Klonen entsprechen würde. Also stellen diese Punkte mit größter Wahrscheinlichkeit kurze Abschnitte des Axons dar (schwarze gebogene Pfeile). Die ipsilateralen dorsalen Neuriten, die im WT beobachtet wurden und vermutlich Seitenäste der motoneuronalen Projektion darstellen (schwarzer Pfeil) und die kontralaterale Projektion von aCC sind ebenfalls nur undeutlich zu erkennen (schwarzer Pfeilkopf). Wie im WT NB1-1-Zellklon sind in den Bereichen, in denen die Neuriten von aCC liegen oder liegen sollten, keine SYN-Färbungen festzustellen.

Deutlich sichtbar ist der Neurit, der im WT NB1-1-Zellklon von pCC aus medial nach anterior projiziert (gebogener weißer Pfeil). Auf ihm finden sich zwei schwache SYN-Punkte (offener weißer Pfeile). Ebenfalls gut zu sehen sind die lateral gelegenen und nach posterior gerichteten Neuriten des NB1-1-Zellklons, die den 1-1I-Neuronen zugeschrieben werden (Udolph et al., 1993). Allerdings zeigen auch sie keine durchgehenden Neuritenstränge sondern bestehen aus unterbrochenen, perlschnurartigen Anreihungen von Färbepunkten, die das vom WT-Zellklon her bekannte Projektionsmuster nachbilden (weißer Pfeil). Wie auch im WT NB1-1-Zellklon finden sich auf diesen Projektionen mehrere SYN-Punkte.

Abb. 4.22



Die exponierte Lage der SYN-Markierungen auf den lateralen Verzweigungen des kontralateralen Neuriten ist außerdem ein offensichtliches Beispiel dafür, dass Output-Synapsen reproduzierbar auf neuritische Kompartimente beschränkt sind (siehe 4.3.2.3).

4.3.4.6 NB2-2

Der NB2-2-Zellstammbaum besteht aus zwei bis drei Motorneuronen und 10-19 Interneuronen. Die medio-laterale Position der Zellen reicht von medial bis intermediär und dorso-ventral liegen sie von ganz ventral bis direkt unterhalb des Neuropils. Die Motorneurone projizieren in einem gemeinsamen Faszikel nach ipsilateral. Ebenfalls ipsilateral findet sich lateral im Neuropil eine kurze Projektion nach anterior. Mehrere Neurone projizieren in einem oder zwei Faszikeln über die Mittellinie bis an die laterale Grenze des kontralateralen Konnektivs. Von diesen Faszikeln projizieren mehrere prominente Neuriten longitudinal nach anterior. Ein Neurit geht nach posterior. Er ist intermediär bis lateral gelegen (siehe Grafik in Abb. 4.24; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). Der einzige Klon, der dem NB2-2-Klon ähnlich genug ist, um zu Verwechslungen zu führen, ist der des NB7-1. NB7-1-Zellklone projizieren allerdings über zwei Kommissuren nach kontralateral (siehe auch 4.3.4.18).

Anhand dieser Kriterien konnten unter den Transplantationspräparaten zwei NB2-2-Zellstammbäume identifiziert werden (Abb. 4.24A, B), wobei allerdings die SYN-Färbung in beiden Experimenten nicht funktionierte. Deshalb kann hier nur das gegenüber dem frühen Stadium 17 geringfügig veränderte Projektionsmuster beschrieben werden, während keinerlei Aussage über präsynaptische Regionen möglich ist (siehe Text zur Abb. 4.24).

Abb. 4.23 Beschreibung spätembryonaler NB2-1-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines NB2-1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB2-1-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A, B).

A, B: Spätembryonale NB2-1-Zellstammbäume. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Trotz ihrer kurzen Projektionen weisen die NB2-1 Klone auf der ipsilateralen Seite ein komplexes Muster von Neuriten auf. Ein prominentes Faszikel durchzieht transversal das Neuropil in diesem Konnektiv. Aus diesem Faszikel gehen zahlreiche kürzere lokale und ein paar intersegmentale Projektionen hervor, die longitudinal verlaufen. Von den lokalen Projektionen zeigen einige SYN-Färbung, andere nicht. Die intersegmentalen Projektionen hingegen sind alle SYN-positiv und verlaufen ausnahmslos nach anterior (weiße Pfeilköpfe). Die dorsalste von ihnen liegt intermediär im Neuropil. Etwas ventraler folgt dann eine medial gelegene und schon ganz im ventralen Bereich eine weitere, ebenfalls medial gelegene Projektion.

Auf der kontralateralen Seite finden sich zwei transversale Projektionen, die von dorsal betrachtet übereinander liegen und deshalb in der Darstellung nicht unterschieden werden können. Beiden projizieren über die Mittellinie bis zum lateralen kontralateralen Konnektiv. Die erste dieser Projektionen liegt fast ventral und weist im medialen und lateralen Neuropilbereich zahlreiche kurze Verzweigungen auf. Die medialen Verzweigungen zeigen in einem Klon gar keine, im anderen einen einzelnen SYN-Punkt (vergleiche schwarzer Pfeil in A und weißer Pfeil in B). Die lateralen Verzweigungen sind dagegen in beiden NB2-1 Klonen eindeutig SYN-positiv (weiße Pfeile). Die zweite kontralaterale Projektion liegt dorsal und weist ebenfalls medial kurze Verzweigungen auf. Diese dorsale kontralaterale Projektion weist keine SYN-Markierung auf (siehe auch 4.3.2.2.1).

Abb. 4.24 Beschreibung spätembryonaler NB2-2-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines abdominalen NB2-2-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB2-2-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A, B).

A, B: Spätembryonale abdominale NB2-2-Zellstammbäume. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Ipsilateral weist der NB2-2-Zellklon am Ende des Stadiums 17 mehrere longitudinale Projektionen auf. Die erste findet sich ganz dorsal im lateralen Neuropilbereich und projiziert nach anterior (schwarze Pfeile). Sie ist scheinbar ein Seitenast der motorneuronalen Projektionen (gebogene schwarze Pfeile). Eher medial finden sich dann im intermediären Neuropilbereich zwei prominentere intersegmentale Neuriten nach anterior und schließlich ventral im medialen Neuropilbereich mehrere lokale longitudinale Neuriten, die nach anterior und posterior projizieren (weiße Pfeile). Bis auf die Seitenneuriten des motorneuronalen Faszikels gehen alle longitudinalen ipsilateralen Neuriten aus einem prominenten transversalen Faszikel hervor, das von medial bis lateral das Neuropil durchläuft.

Auch auf der kontralateralen Seite finden sich zwei prominente, transversal bis in den lateralen kontralateralen Neuropilbereich verlaufende Faszikel, die eng beieinander liegen. Aus ihnen gehen mehrere intersegmentale Neuriten nach anterior hervor (weiße Pfeilköpfe). Deren dorso-ventrale Lage ist intermediär. Medio-lateral verlaufen sie sowohl lateral als auch intermediär oder medial. Die von Schmid (Schmid et al., 1999) beschriebene prominente kontralaterale laterale Projektion nach posterior konnte nur in einem der beiden Klone beobachtet werden (weißer Stern in A). Auch ihre dorso-ventrale Lage ist intermediär.

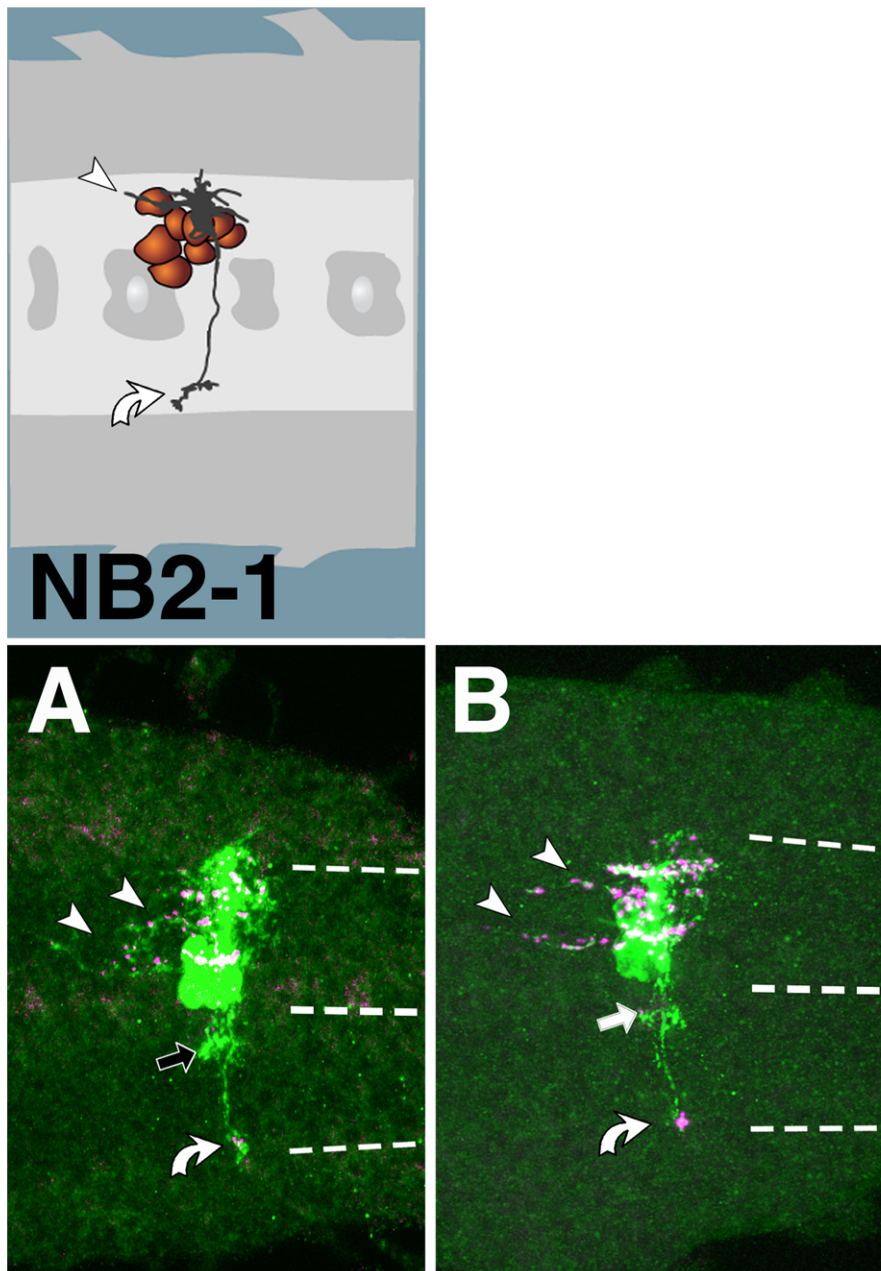
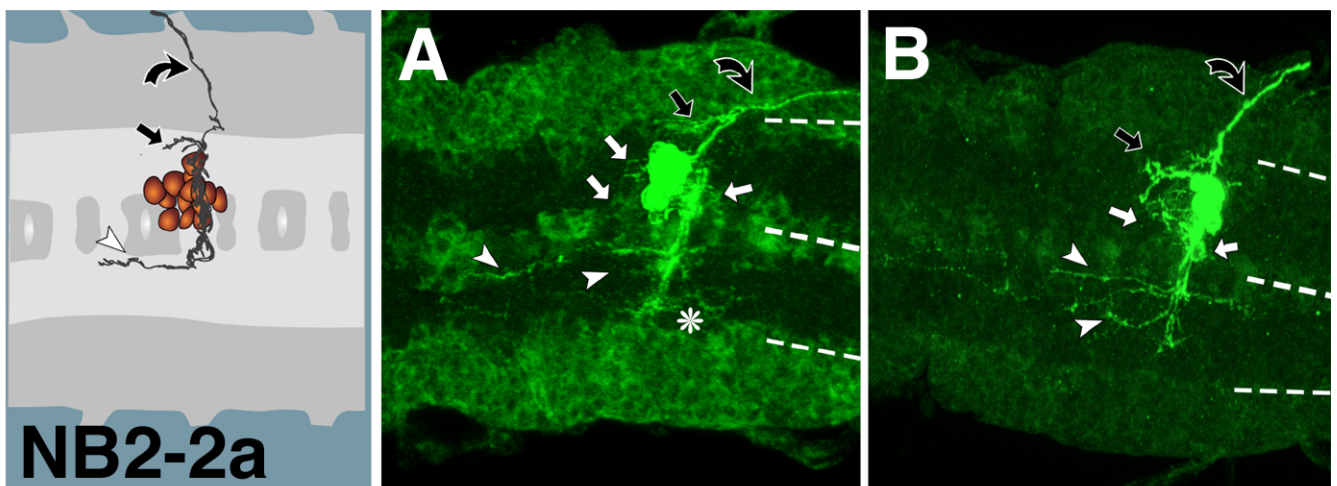
Abb. 4.23

Abb. 4.24



4.3.4.7 NB2-4

Der NB2-4-Zellstammbaum besteht aus ein bis zwei kontralateral projizierenden Motoneuronen und sieben bis zehn Interneuronen. Die Zellen liegen alle ventral vom Neuropil und die meisten von ihnen sind im lateralen Kortex-Bereich positioniert. Zwei einzelne Zellen sind etwas abgesetzt und liegen dorsal über dem Neuropil im intermediären Kortex-Bereich. Bei ihnen handelt es sich laut Schmidt et al. (siehe Grafik in Abb. 4.25; Schmidt et al., 1997) um Motoneurone, laut Schmid et al. (Schmid et al., 1999) um ein Motoneuron und ein Interneuron. Im Stadium 16 wurde ipsilateral eine lokale Projektion nach posterior beschrieben, die von den lateral gelegenen Interneuronen ausgeht. Sonst wurden außer dem motorneuronalen Faszikel keine weiteren Projektionen gesehen (siehe Grafik in Abb. 4.25; Schmidt et al., 1997). Im frühen Stadium 17 wurde beschrieben, dass eine kurze ipsilaterale Projektion nach posterior von dem isolierten Interneuron ausgeht, während die anderen Interneurone in einem Faszikel nach kontralateral projizieren, das sich im lateralen Bereich des kontralateralen Konnektivs nach anterior fortsetzt (Schmid et al., 1999).

Die Transplantationsexperimente ergaben einen Zellklon, bei dem es sich um den NB2-4-Zellstammbaum handeln könnte (Abb. 4.25A). Ausschlaggebend für diese Zuordnung war die kontralaterale motorneuronale Projektion (schwarze gebogene Pfeile in Abb. 4.25) und die dorsale Position der zwei abgesetzten Zellen (schwarze Sterne in Abb. 4.25). Wie weiter oben schon ausgeführt können Angaben zur Morphologie des NB2-4-Zellstammbaums und zur Synapsenverteilung in diesem Klon (siehe Text zur Abb. 4.25) deshalb nur vorläufiger Natur sein. Diese Daten bedürfen noch einer Bestätigung durch weitere Arbeiten, müssen unter Umständen aber ergänzt oder revidiert werden.

4.3.4.8 NB3-1

Der NB3-1-Zellstammbaum setzt sich aus vier prominenten Motoneuronen (RP1, RP3, RP4 und RP5) und vier bis 18 Interneuronen zusammen, die alle kontralateral projizieren. Die medio-laterale Position der Zellkörper ist im Stadium 16 medial, im frühen Stadium 17 verschieben sich die Interneurone leicht nach intermediär (siehe Grafik in Abb. 4.26; Bossing und Technau, 1994; Schmid et al., 1999). Die

Motorneurone liegen im Stadium 16/17 ganz dorsal (RP1, RP4) oder befinden sich auf gleicher Höhe mit dem Neuropil (RP3, RP5), während die Interneurone sich vom unteren Rand des Neuropils bis zum ventralen Kortextrand erstrecken (Bossing und Technau, 1994; Landgraf et al., 1997). Die Motorneurone projizieren in einem gemeinsamen Faszikel nach kontralateral. Bis zum frühen Stadium 17 sind an diesem Faszikel keine auffälligen Seitenneuriten zu beobachten. Die Interneurone projizieren in bis zu drei eng beieinander liegenden Faszikeln nach kontralateral. Diese Faszikel bifurkieren im lateralen kontralateralen Konnektiv und projizieren longitudinal nach anterior und posterior (Bossing und Technau, 1994; Schmid et al., 1999).

Als Identifikationsmerkmale für NB3-1-Klone diente die kontralaterale Projektion des axonalen Faszikels (schwarze gebogene Pfeile in Abb. 4.26) und die dorsale, mediale Lage von zwei der Motorneurone (weiße Sterne in Abb. 4.26). Trotz dieser Merkmale stellte sich die Identifikation des spätembryonalen NB3-1-Zellstammbaums zunächst als schwierig heraus, da am Ende des Stadiums 17 der Eindruck von drei räumlich distinkten Zellgruppen entsteht (Abb. 4.26A, B, C). Im Vergleich mit anderen Zellklonen, die (abgesehen von wenigen bekannten Ausnahmen) eng zusammen-

Abb. 4.25 Beschreibung eines spätembryonalen NB2-4-Zellstammbaums

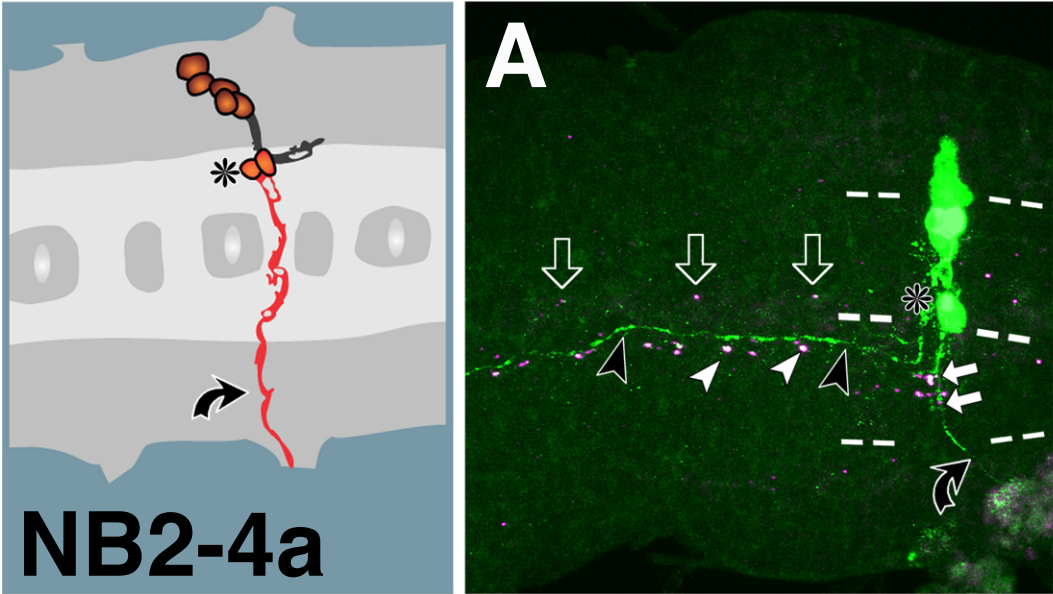
Grafik: schematische Darstellung eines abdominalen NB2-4-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Schmidt et al., 1997)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB2-4-Zellstammbaum noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A).

A: Spätembryonaler abdominaler NB2-4-Zellstammbaum. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Schwarze Sterne: Nach medial und dorsal vom Restklon abgesetzte, charakteristische Zellen des NB2-4-Zellstammbaums. Schwarze gebogene Pfeile: kontralaterale motorneuronale Projektion. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Auf der ipsilateralen Seite konnten in dem NB2-4-Zellstammbaum über mCD8-Färbung keine Projektionen ausgemacht werden. Im medialen Neuropilbereich finden sich allerdings ein paar SYN-Punkte, die wie auf einer longitudinalen Linie angeordnet liegen und etwa segmentalen Abstand voneinander haben (offene weiße Pfeile). Dafür, dass es sich um präsynaptische Regionen auf einer longitudinalen Projektion handelt, spricht die Tatsache, dass sich auch auf der kontralateralen Seite deutliche Hinweise auf das Vorhandensein von Projektionen finden, deren mCD8-Färbung zu schwach ist um sie darüber nachzuweisen (s.u.).

Kontralateral findet sich eine Projektion, die im medialen Bereich des Konnektivs intersegmental longitudinal nach anterior projiziert (schwarze Pfeilköpfe). Diese Projektion weist kein SYN auf. Parallel zu dieser longitudinalen Projektion ein kleines Stück mehr intermediär befindet sich vermutlich eine weitere, deren mCD8-Färbung allerdings zu schwach ist um sie darzustellen. Offensichtlich wird das Vorhandensein dieser Projektion durch die zahlreichen, wie auf einer Linie aneinander gereihten SYN-positiven Punkte (weiße Pfeilköpfe). Im lateralen Bereich des kontralateralen Konnektivs finden sich einige intersegmentale longitudinale Projektionen, die ebenfalls SYN-Punkte aufweisen (weiße Pfeile).

Abb. 4.25



hängende Gruppen von Zellen haben, entstand der Eindruck, es liege eine Fehlentwicklung vor. Nur das Vorhandensein der dorsal gelegenen kontralateral projizierenden Motorneurone weist auf Ähnlichkeiten mit dem bekannten NB3-1 Zellstammbaum hin. Erst das mehrfache Auftreten dieser verblüffenden Zellkonstellation rechtfertigte die Vermutung, dass es sich bei diesen Zellstammbäumen tatsächlich um einen der bekannten neuronalen Zellstammbäume und nicht um eine Fehlentwicklung handelt.

Anhand der oben aufgeführten Kriterien konnten unter den Transplantationspräparaten drei NB3-1-Zellklone identifiziert werden, von denen allerdings nur einer ohne Einschränkungen ausgewertet werden konnte (Abb. 4.26A). Bei einem weiteren Klon war die SYN-Färbung sehr schwach (Abb. 4.26B) und der dritte Klon befand sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem weiteren Transplantationsklon, bei dem es sich vermutlich um einen VUM-Zellstammbaum handelte (Abb. 4.26C). Bei diesem Präparat waren die beobachteten Neuriten nicht eindeutig den beiden Zellklonen zuzuordnen. Ein Vergleich mit den beiden anderen NB3-1- und VUM-Zellklonen macht jedoch deutlich, dass die Verteilung der Neuriten und Output-Synapsen auf diesem NB3-1-Zellklon mit der bei den beiden anderen gut übereinstimmt.

Die vier Motorneurone des NB3-1 haben ipsi- und kontralateral innerhalb des Neuropils zahlreiche Projektionen, die aus den primären Neuriten hervorgehen. So weit sie eindeutig zu identifizieren waren, sind diese Seitenneuriten frei von Output-Synapsen. Dies unterstützt unsere Vermutung, dass Seitenäste efferenter Neurone sehr wahrscheinlich postsynaptischer Natur sind (siehe 4.3.2.4). Die motorneuralen Neurite verlaufen fast alle dorsal. Ventral von ihnen finden sich auf beiden Seiten des Neuropils SYN-markierte, vermutlich interneuronale Projektionen. Also weist der NB3-1-Zellstammbaum auch eine dorso-ventral-spezifische Verteilung von Synapsen auf (siehe 4.3.2.2.1). Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (s.o.) fanden wir auf der kontralateralen Seite nicht laterale sondern intermediäre longitudinale interneuronale Projektionen. Diese Projektionen tragen Output-Synapsen. Die kontralateralen, SYN-freien Seitenneurite der Motorneurone liegen im medialen und lateralen Neuropilbereich. Der NB3-2-Zellstammbaum ist also auch ein Beispiel für medio-laterale spezifische Verteilung von Synapsen (4.3.2.2.4).

Abb. 4.26 Beschreibung spätembryonaler NB3-1-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines NB3-1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB3-1-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A, B, C).

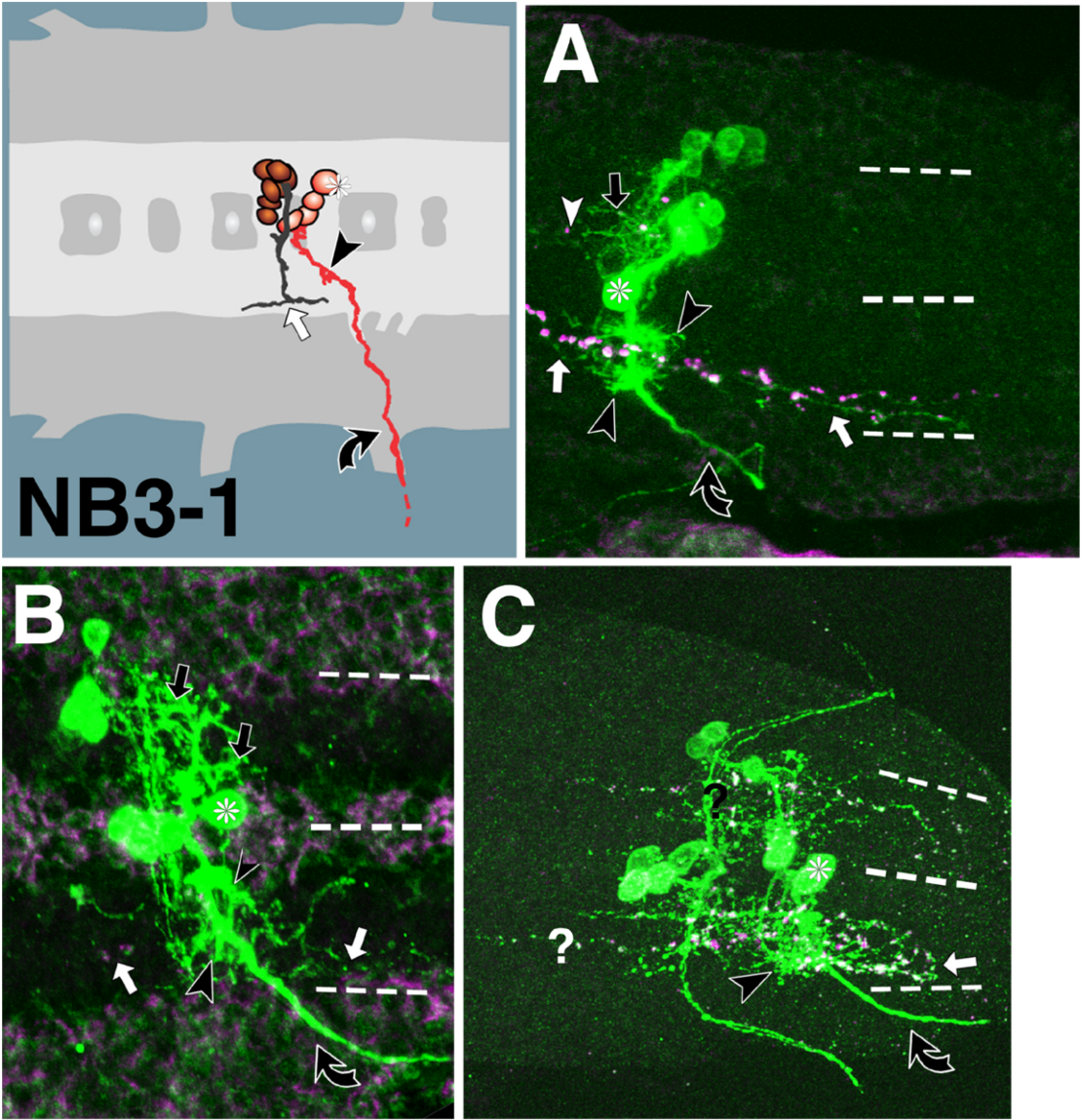
A - C: Spätembryonale NB3-1-Zellstammbäume. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet. In C liegt anterior vom NB3-1-Zellklon noch ein VUM-Zellklon.

Der Zellklon des NB3-1 zerfällt im Stadium 17 in drei distinkte Zellgruppen. Die lateralste dieser Zellgruppen, liegt am lateralen Rand des intermediären Neuropilbereichs und befindet sich ganz ventral. Bei den drei erhaltenen Transplantations-Klonen bestand sie aus fünf bis elf Zellen. Vermutlich handelt es sich nur um Interneurone. Die zweite Zellgruppe liegt etwas weiter posterior als die erste und ist eher medial oder sogar direkt über der Mittellinie positioniert. Ihre dorso-ventrale Lage ist intermediär. Sie besteht aus drei bis sechs Zellen, bei denen es sich wahrscheinlich um einige Interneurone und die durch die Kondensation des Neuropils in Richtung ventral verschobenen Motoneurone RP3 und RP5. Die dritte Zellgruppe liegt wiederum ein Stück weiter posterior und ist ebenfalls medial oberhalb der Mittellinie beziehungsweise fast kontralateral positioniert (weißer Stern). Es sind zwei Zellen, bei einem der Transplantationsklone (B) nur eine, die ganz dorsal dem Neuropil aufliegen. Hierbei handelt es sich um die Motoneurone RP1 und RP4. Ob in dem Fall, bei dem nur eine dorsale Zelle festzustellen war, das zweite Motoneuron in Richtung ventral verschoben oder nicht vorhanden war, konnte nicht festgestellt werden.

Das motoneuronale Faszikel projiziert auf der kontralateralen Seite ganz dorsal durchs Neuropil (schwarze gebogene Pfeile). Sowohl medial als auch lateral gehen von ihm fächerförmig Seitenneuriten ab (schwarze Pfeilköpfe). Diese Seitenneuriten sind frei von SYN. Etwas ventraler sind ein bis zwei transversale Projektionen zu erkennen, die bis zum intermediären Bereich des kontralateralen Neuropils reichen (weiße Pfeile). Dort bifurkieren sie in einem Fall (A) und projizieren intersegmental nach anterior und posterior. Im zweiten Klon (B) wenden sie sich nur nach posterior, im dritten Klon (C) ist eine Projektion nach posterior vorhanden, eine Projektion nach anterior ist jedoch nicht eindeutig dem NB3-1Zellklon zuzuordnen (Fragezeichen in C), was auf die Vermischung mit den Neuriten des anterior liegenden VUM-Klons zurückzuführen ist. Allen drei Klonen ist gemeinsam, dass sich auf diesen kontralateralen longitudinalen Projektionen SYN findet.

Auf der ipsilateralen Seite des Zellklons finden sich dorsal zahlreiche lokale Neuriten, die sich netzartig verteilen und wahrscheinlich auf eines oder beide der dorsalen Motoneurone zurückgehen (schwarze Pfeile in A, B; in C nicht eindeutig zu identifizieren, schwarzes Fragezeichen). Auf ihnen ist kein SYN festzustellen. Weiter medial und ventral finden sich in einem Klon lokale Neuriten, die zumindest zum Teil von den Projektionen der ventralen Interneurone abzweigen (weißer Pfeilkopf in A). Auf ihnen finden sich vereinzelte SYN-Punkte.

Abb. 4.26



4.3.4.9 NB3-2

Der NB3-2-Zellstammbaum setzt sich aus drei bis sechs Motorneuronen und sieben bis 16 Interneuronen zusammen. Die Zellen erstrecken sich vom lateralen bis zum dorsolateralen Kortextbereich und sind in zwei Zellgruppen unterteilt. Die kleinere und posteriore Zellgruppe besteht aus bis zu sechs Zellen. In beiden Zellgruppen sind Interneurone und Motorneurone vorhanden. Die primären Neuriten der Motorneurone der anterioren Zellgruppe projizieren ipsilateral in einem gemeinsamen Faszikel und verlassen über eine anterior vom Zellklon gelegene Nervenwurzel das Bauchmark. Die primären Neuriten der Motorneurone der posterioren Zellgruppe projizieren ebenfalls in einem gemeinsamen Faszikel zunächst nach posterior um dann ipsilateral das Bauchmark durch eine posterior vom Zellklon gelegene Nervenwurzel zu verlassen. Die Interneurone beider Zellgruppe projizieren im Stadium 16 in bis zu drei eng beieinander liegenden transversalen Faszikeln bis in den lateralen Bereich des kontralateralen Neuropils (siehe Grafik in Abb. 4.27; Bossing und Technau, 1994). Im Stadium 17 bifurkieren diese Faszikel und projizieren nach anterior bzw. posterior (Schmid et al., 1999).

Als Identifikationsmerkmale für spätembryonale NB3-2-Klone dienten die zwei prominenten ipsilateralen axonalen Projektionen und die Lage der Zellkörper. Nur ein weiterer abdominaler neuronaler Zellklon, NB4-2, hat zwei voneinander getrennte ipsilaterale axonale Projektionen doch unterscheidet er sich insbesondere durch die Anordnung der Motorneurone vom NB3-2-Zellklon (siehe 4.3.4.12).

Anhand dieser Kriterien konnten unter den Transplantationspräparaten ein *kak*-mutanter (Abb. 4.27I) und 14 wildtypische NB3-2-Zellklone identifiziert werden. Der *kak*-mutante Klon ist nicht wesentlich verschieden von den wildtypischen Beispielen und wird hier nicht weiter erwähnt. Von den 14 wildtypischen Klonen wurden acht detailliert analysiert (siehe Abb. 4.27A-H und Text dazu). Zwei der restlichen NB3-2-Zellstammbäume hatten einen weiteren Zellklon in ihrer direkten Nachbarschaft liegen, bei zwei weiteren Klonen hatte die SYN-Färbung nicht funktioniert. Zwei Klone unterschieden sich auffällig aber in fast übereinstimmender Art und Weise von den restlichen Zellklonen, erfüllten jedoch ebenfalls die Kriterien zur Identifikation von NB3-2-Zellstammbäumen. Sie werden gesondert beschrieben (siehe Abb. 4.27J, K und Text dazu).

Die efferenten Projektionen der NB3-2-Motorneurone haben im ipsilateralen Neuropilbereich zahlreiche, zum Teil fächerförmig verteilte Seitenneuriten. Diese sind alle frei von Output-Synapsen. Dies unterstützt unsere Vermutung, dass Seitenäste efferenter Neurone sehr wahrscheinlich postsynaptischer Natur sind (siehe 4.3.2.4). Außerdem ist der NB3-2-Zellstammbaum auch ein Beispiel für ipsilateral-kontralaterale Beschränkung von Output-Synapsen, denn SYN-Markierung findet sich (bis auf die schon erwähnten Ausnahmen Abb. 4.27J, K) immer nur auf der kontralateralen Seite (siehe auch 4.3.2.2.2).

Abb. 4.27 Beschreibung spätembryonaler NB3-2-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines NB3-2-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB3-2-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A - K).

A - K: Spätembryonale NB3-2-Zellstammbäume (wildtypisch: A - H; *kak*-mutant: I; wildtypisch mit abweichender Morphologie: J, K). Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet. Schwarze gebogene Pfeile: efferente motorneuronale Faszikel.

A - H: Im dorsolateralen Neuropilbereich gehen aus dem posterioren motorneuronalen Faszikel zahlreiche Seitenneuriten hervor, die sich netzförmig über fast den gesamten medio-lateralen Durchmesser des ipsilateralen Neuropils ausbreiten (schwarze Pfeilköpfe). Dorso-ventral erstrecken sie sich über drei Viertel des ipsilateralen Neuropildurchmessers, wobei sie von ganz dorsal bis fast in ventrale Neuropilbereiche projizieren. Auch am anterioren motorneuronalen Faszikel lassen sich im dorso-lateralen Neuropilbereich Seitenäste beobachten. Sie verteilen sich jedoch nicht netzartig sondern haben eher den Charakter einer longitudinalen Projektion mit zahlreichen sehr kurzen Seitenneuriten (schwarze Pfeile). Auch von dem prominenten transversalen Faszikel, das vermutlich den Interneuronen zuzuschreiben ist, gehen ipsilateral kürzere Seitenneuriten nach anterior und posterior ab (häufig von Zellen überdeckt und deshalb nicht gezeigt). Auf keinem ipsilateralen Neuriten der hier beschriebenen acht NB3-2 Klone ist SYN zu finden. Auffällig ist, dass bei allen beobachteten NB3-2 Zellklonen die Stelle, an der das anteriore axonale Faszikel das Bauchmark verlässt nicht mehr anterior sondern posterior von den Zellen zu finden ist (vergleiche schwarze gebogene Pfeile in Grafik und A - H). Dieser Effekt ist auf die starke Kontraktion des Bauchmarks im späten Stadium 17 zurückzuführen.

Das transversal verlaufende Neuritenbündel der Interneurone nach kontralateral ist in allen Klonen deutlich zu erkennen. Eine Unterscheidung in mehrere Faszikel ist anhand der mCD8-Färbung jedoch nicht möglich. Die von dem transversalen Faszikel im kontralateralen Konnektiv abgehenden Projektionen nach anterior und posterior sind jedoch in vielen Fällen kaum nachweisbar. Da sie jedoch in allen Fällen, in denen die SYN-Färbung funktioniert hat, zahlreiche SYN-Punkte zeigen, ist es trotzdem möglich, sie genauer zu beschreiben (weiße Pfeilköpfe). In allen NB3-2-Zellklonen kann im kontralateralen Neuropil mindestens eine, intermediär gelegene intersegmentale longitudinale Projektion nach posterior beobachtet werden. Manchmal sind weitere, ebenfalls intermediär oder lateral gelegene Projektionen nach anterior zu beobachten. Die dorso-ventrale Position dieser Projektionen liegt im intermediären bis ventralen Neuropilbereich. Nach posterior verlaufen in den meisten Fällen eine lateral und eine intermediär gelegene intersegmentale Projektion. Manchmal ist ganz am lateralen Neuropilrand noch eine dritte, meist kürzere Projektion nach posterior zu erkennen. Die posterioren Projektionen liegen im ventralen Neuropilbereich. In den Fällen, in denen die mCD8-Färbung kräftig genug war, um auch die longitudinalen Seitenneuriten auf der kontralateralen Seite der NB3-2 Zellklone sichtbar zu machen, wurden keine SYN-freien Seitenneuriten gefunden.

I: Im *kak*-mutanten NB3-2Zellklon kann beobachtet werden, dass die motorneuronalen Projektionen dünner erscheinen, als in wildtypischen Zellklonen (schwarze gebogene Pfeile). Insbesondere die anteriore efferente Projektion erscheint nicht durchgehend, sondern wirkt wie eine immer wieder unterbrochene Linie.

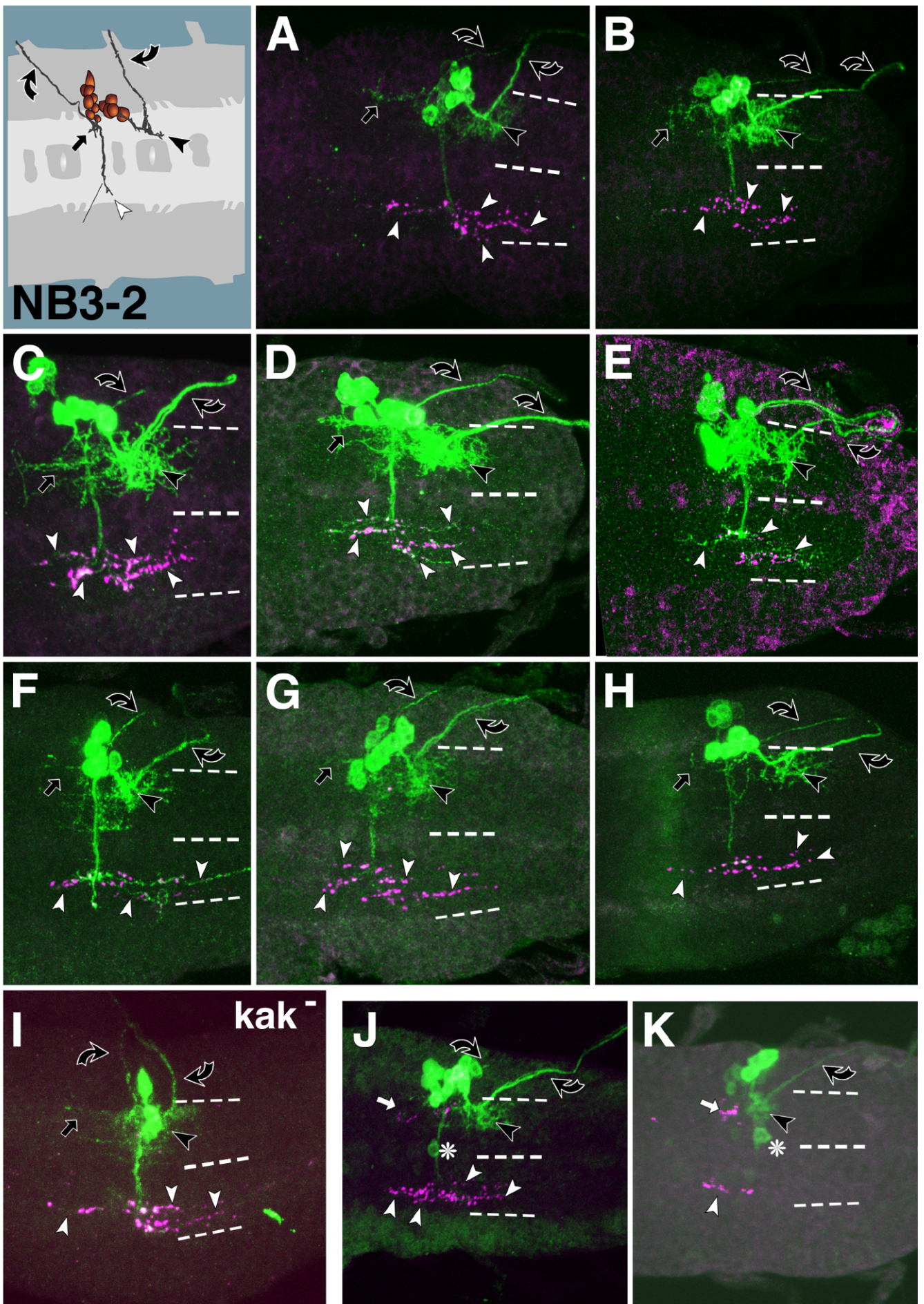
Sowohl die anterioren als auch die posterioren Seitenneuriten der efferenten Faszikel sind im *kak*-mutanten NB3-2-Zellklon nur als diffuse, schleierartige Struktur zu erkennen (schwarzer Pfeil, schwarzer Pfeilkopf). Die Ausdehnung dieser Strukturen entspricht allerdings etwa der im wildtypischen NB3-2-Zellstammbaum. Sie breiten sich ebenfalls über fast den gesamten medio-lateralen Bereich des ipsilateralen Neuropils aus und dorso-ventral erstrecken sie sich konservativ geschätzt über mindesten drei Fünftel des ipsilateralen Neuropildurchmessers.

Demgegenüber steht die prominente transversale Projektion nach kontralateral, die im *kak*-Klon zwar auch etwas diffus wirkt, aber eine ähnlich starke oder sogar stärkere Färbung aufweist wie ihr Gegenstück in einigen schlechter gefärbten WT-Präparate (vergleiche zum Beispiel mit G).

Die auf der kontralateralen Seite befindlichen longitudinalen Projektionen nach anterior und posterior sind im *kak*-mutanten Klon kaum zu erkennen, was allerdings auch häufig im wildtypischen NB3-2 zu beobachten war (weiße Pfeilköpfe). Die SYN-Färbung auf diesen Projektionen entspricht allerdings in Quantität und Verteilung in etwa der vom wildtypischen NB3-2-Zellklon bekannten. Deshalb ist davon auszugehen, dass diese kontralateralen longitudinalen Projektionen im *kak*-mutanten NB3-2-Zellklon etwa dieselbe longitudinale Ausdehnung haben, wie im entsprechenden wildtypischen Zellklon.

J, K: Nur einer der beiden Klone hat deutlich erkennbar zwei motorneuronale Faszikel (vergleiche schwarze gebogene Pfeile in J und K), in K konnte das anteriore Faszikel nicht eindeutig identifiziert werden. Abgesehen davon stimmen die erkennbaren Projektionen (schwarze Pfeilköpfe) und insbesondere die Verteilung der SYN-Punkte (weiße Pfeile) auf der kontralateralen Seite mit „normalen“ NB3-2 Zellklonen größtenteils überein. Im Unterschied zu diesen findet sich bei den beiden hier beschriebenen Zellklonen eine einzelne medial positionierte, wahrscheinlich interneuronale Zelle, die dorsal dem Neuropil aufliegt (weiße Sterne). Zusätzlich findet sich bei den beiden Klonen lateral im ventralen ipsilateralen Neuropilbereich eine SYN-positive Projektion nach anterior (weiße Pfeile).

Abb. 4.27



4.3.4.10 NB3-3

Der NB3-3 hat einen interneuronalen Zellstammbaum, der aus sieben bis 13 Neuronen besteht. Die Zellkörper liegen ventral im lateralen Kortex-Bereich. Ipsilateral sind nur sehr kurze intersegmentale Neuriten zu erkennen. Dafür sind mehrere transversal verlaufende Faszikel vorhanden, die eng beieinanderliegend nach kontralateral projizieren, um dann medial oder intermediär intersegmental nach anterior zu wachsen (siehe Grafik in Abb. 4.27; Schmidt et al., 1997). Ein ähnliches Projektionsmuster haben der NB4-4-Zellstammbaum und der NB6-2-Zellstammbaum im Stadium 16. Aus dem NB4-4 geht allerdings noch eine Gruppe von peripheren Sinneszellen hervor. Diese projizieren im Bereich des zentralnervösen Klonanteils ins Bauchmark. Diese Projektion sollte von daher zu sehen sein. (Schmidt et al., 1997). Der NB6-2-Zellstammbaum unterscheidet sich von dem des NB3-3 durch zwei deutlich voneinander distinkte kontralaterale Projektionen, von denen eine sich im kontralateralen Neuropil nach posterior wendet (siehe 4.3.4.17; Bossing und Technau, 1994).

Auf Grund dieser Kriterien konnte unter den Transplantationspräparaten ein vermutlicher NB3-3-Zellstammbaum identifiziert werden (Abb. 4.28). Wie weiter oben schon ausgeführt können Angaben zur Morphologie des NB3-3-Zellstammbaums und zur Synapsenverteilung in diesem Klon (siehe Text zur Abb. 4.28) deshalb nur vorläufiger Natur sein. Diese Daten bedürfen noch einer Bestätigung durch weitere Arbeiten, müssen unter Umständen aber ergänzt oder revidiert werden.

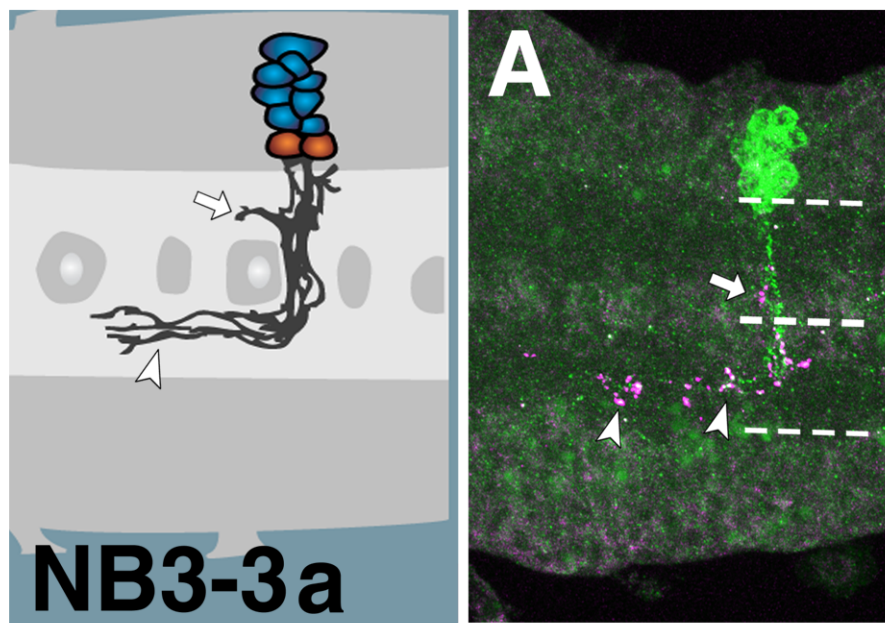
Abb. 4.28 Beschreibung eines spätembryonalen NB3-3-Zellstammbaums

Grafik: schematische Darstellung eines abdominalen NB3-3-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Schmidt et al., 1997)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB3-3-Zellstammbaum noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A).

A: Spätembryonaler abdominaler NB3-3-Zellstammbaum. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Die Lage des Zellklons ist fast dorsal im Kortex, was ihn von den für Stadium 16 und frühes Stadium 17 beschriebenen NB3-3-Zellklonen unterscheidet. Die medio-laterale Position der Zellen lateral vom Neuropil stimmt hingegen wieder mit beschriebenen NB3-3-Zellklonen überein. Gleiches gilt für das Projektionsmuster der longitudinalen Neuriten, das sich von dem von Stadium 16 NB3-3-Zellklonen in keiner Weise unterscheidet: Ipsilateral findet sich medial eine lokale Projektion nach anterior (weißer Pfeil), kontralateral sind mehrere intersegmentale Projektionen nach anterior zu beobachten (weiße Pfeilköpfe). SYN wurde auf allen erkennbaren longitudinalen Projektionen gefunden.

Abb. 4.28



4.3.4.11 NB4-1

Der NB4-1 Zellstammbaum ist ebenfalls rein interneuronal und besteht aus 12 bis 18 Zellen. Der Klon liegt medial bis intermediär ventral vom Neuropil. Im Stadium 16 weist eine ipsilaterale intersegmentale Projektion medial nach anterior. Mehrere kontralaterale Projektionen verlaufen durch die anteriore und die posteriore Kommissur. Sie projizieren medial intersegmental nach posterior, intermediär lokal nach posterior und anterior sowie lateral intersegmental nach anterior (siehe Grafik Abb. 4.29; Bossing et al., 1996). Zu diesen Projektionen kommt im frühen Stadium 17 ipsilateral noch eine lateral verlaufende Projektion nach anterior dazu (Schmid et al., 1999). Andere Zellklone, mit denen der NB4-1-Zellstammbaum verwechselt werden könnten, sind die von NB2-1 und der NB6-2. Bei ihnen liegen die Zellkörper allerdings deutlich lateraler, als im NB4-1-Zellstammbaum.

Die Transplantationsexperimente ergaben einen Zellklon, bei dem es sich vermutlich um den NB4-1-Zellstammbaum handelt. Dafür spricht die Lage seiner Zellen, die zahlreichen kontralateralen Projektionen und das Projektionsmuster, das noch große Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Zellstammbaum im Stadium 16 hat (vergleiche Grafik und A in Abb. 4.29). Da nur ein NB4-1-Zellklon identifiziert wurde, kann die Beschreibung des spätembryonalen NB4-1-Zellstammbaums nur vorläufiger Natur sein. Diese Daten können sich als nützlich für die Identifizierung weiterer NB4-1-Klone in zukünftigen Experimenten erweisen, müssen unter Umständen aber auch revidiert werden.

Alle längeren nach anterior verlaufenden, longitudinalen Neuriten des NB4-1-Zellstammbaums tragen Output-Synapsen. Dagegen sind die nach posterior verlaufenden longitudinalen Neuriten frei von SYN-Markierung. Der NB4-1-Zellstammbaum weist also eine anterior-posterior-spezifische Verteilung von Output-Synapsen auf (siehe auch 4.3.2.2.3). Wie oben schon ausgeführt, müssen diese Beobachtungen aber zunächst noch reproduziert werden.

4.3.4.12 NB4-2

Der NB4-2-Zellstammbaum besteht aus drei bis vier Motorneuronen und 15 bis 20 Interneuronen. Auffälligstes Merkmal sind die zwei motorneuralen Projektionen die durch verschiedene Nervenwurzeln das Bauchmark verlassen. Dies ist eine morphologische Eigenart, die sonst nur beim NB3-2-Zellklon auftritt (siehe 4.3.4.9). Vom NB3-2 Zellklon unterscheidet sich der NB4-2-Klon hauptsächlich durch das Auftreten von zwei Neuronen, dem großen RP2 Motorneuron und dessen kleinerer Schwesterzelle, dem Neuron RP2sib. Diese beiden Neurone liegen fast auf der Mittellinie dorsal dem Neuropil auf und sind zusätzlich auch noch ein wenig anterior von den restlichen Zellen des Klons positioniert. Letztere bilden eine von intermediär bis lateral reichende Zellgruppe, die sich dorso-ventral über den ganzen Kortex erstreckt. Während die axonale Projektion des RP2 Motorneurons ipsilateral nach anterior verläuft und dann das Bauchmark über eine Nervenwurzel verlässt, verläuft die axonale Projektion der anderen Motorneurone ipsilateral nach posterior, um dort über eine Nervenwurzeln aus dem Bauchmark hervorzutreten. Die Interneurone der größeren Zellgruppe projizieren in einem Faszikel nach kontralateral und bifurkieren intermediär nach anterior und posterior (siehe Grafik Abb. 4.30; Bossing et al., 1996, Schmid, 1999 #269). Der Zellstammbaum der NB4-2 kann eigentlich nur mit dem des NB3-2 verwechselt werden, da dies die beiden einzigen neuralen Zellklone mit zwei voneinander getrennten Faszikeln efferenter Projektionen sind. Allerdings hat der

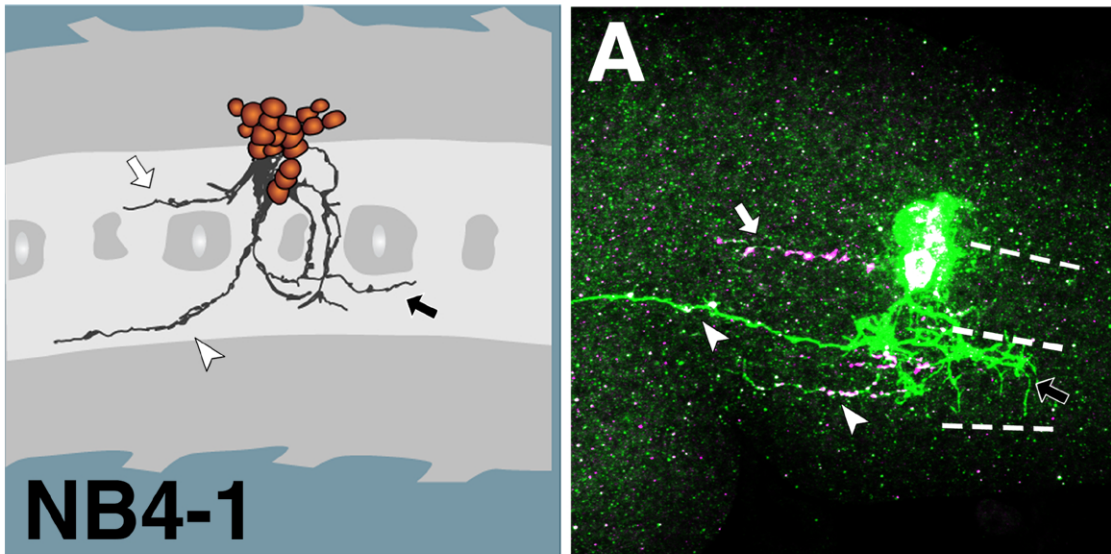
Abb. 4.29 Beschreibung eines spätembryonalen NB4-1-Zellstammbaums

Grafik: schematische Darstellung eines NB4-1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB4-1-Zellstammbaum noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A).

A: Spätembryonaler NB4-1-Zellstammbaum. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Ipsilateral kann in dem NB4-1-Zellklon nur eine intersegmentale Projektion nach anterior beobachtet werden (weißer Pfeil). Sie verläuft medial und zeigt mehrere SYN-positive Regionen. Auch einige kurze lokale Projektionen sind ipsilateral vorhanden, sie sind aber größtenteils frei von SYN (von Zellen überdeckt, deshalb nicht gezeigt).

Mehrere transversale Projektionen verlaufen durch vermutlich verschiedene Kommissuren nach kontralateral. Von einer der anterior gelegenen transversalen Projektionen gehen zwei longitudinale intersegmentale Neuriten nach anterior ab (weiße Pfeilköpfe). Einer liegt medial, der andere lateral und beide sind SYN-positiv. Sowohl von den anterioren als auch von den posterioren transversalen Projektionen gehen Neuriten nach posterior ab, die zunächst medial longitudinal verlaufen, sich dann aber stark in verschiedene Richtungen verzweigen (schwarzer Pfeil). Diese posterioren kontralateralen Neuriten sind frei von SYN.

Abb. 4.29

NB3-2-Zellstammbaum keinen dorsal des Neuropils gelegenen motorneuronalen Zellkörper.

Die Transplantationsexperimente ergaben einen Zellklon, bei dem es sich um den NB4-2-Zellstammbaum handeln könnte. Identifiziert wurde der vermutliche NB4-2-Zellklon über das Vorhandensein von zwei motorneuronalen Projektionen (schwarze gebogene Pfeile in Abb. 4.30A), die durch verschiedene Nervenwurzeln das Bauchmark verlassen und die dorsale Lage eines Motorneurons, bei dem es sich um RP2 handeln könnte (schwarzer Stern in Abb. 4.30A). Allerdings lag dieses Motorneuron nicht anterior, sondern posterior vom restlichen Zellklon; vermutlich eine Folge der Bauchmark-Kontraktion. RP2sib konnte nicht beobachtet werden. Da nur ein entsprechender Zellklon identifiziert wurde, kann die Beschreibung des spätembryonalen NB4-2-Zellstammbaums nur vorläufiger Natur sein (siehe Abb. 30A und Text dazu). Diese Daten können sich als nützlich für die Identifizierung weiterer NB4-2-Klone in zukünftigen Experimenten erweisen, müssen unter Umständen aber ergänzt oder revidiert werden.

4.3.4.13 NB5-1

Der NB5-1-Zellklon besteht aus zwei bis neun Interneuronen, die ganz ventral im medialen Bereich des Kortex liegen. Die Neurone projizieren in einem gemeinsamen Faszikel transversal nach kontralateral. Dieses Faszikel bifurkiert im intermediären bis lateralen Neuropilbereich lokal nach anterior und posterior (siehe Grafik in Abb. 4.31; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). Nur der abdominale NB2-1-Zellstammbaum weist vergleichbar kurze Projektionen auf, doch besteht er aus mehr Zellen und diese liegen im medialen und intermediären Bereich des Bauchmarks (siehe 4.3.4.4; Bossing et al., 1996).

Auf Grund dieser Kriterien konnte unter den Transplantationspräparaten ein vermutlicher NB5-1-Zellstammbaum identifiziert werden (Abb. 4.31A). Die Angaben zur Morphologie des NB5-1-Zellstammbaums und zur Synapsenverteilung in diesem Klon (siehe Text zur Abb. 4.31A) können deshalb nur vorläufiger Natur sein. Diese Daten bedürfen noch einer Bestätigung durch weitere Arbeiten, müssen unter Umständen aber ergänzt oder revidiert werden.

Die Verteilung von Output-Synapsen beschränkt sich in diesem Zellklon auf das kontralaterale Neuropil. Sollte sich diese Beobachtung bei weiteren NB5-1-Zellklonen bestätigen, so wäre auch der NB5-1-Zellstammbaum ein Beispiel für ipsilateral-kontralaterale Beschränkung von Output-Synapsen (siehe auch 4.3.2.2.2).

Abb. 4.30 Beschreibung eines spätembryonalen NB4-2-Zellstammbaums

Grafik: schematische Darstellung eines NB4-2-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB4-2-Zellstammbaum noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitragen (vergleiche entsprechende Symbole in A).

A: Spätembryonaler NB4-2-Zellstammbaum. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet. Die weißen Sterne kennzeichnen die beiden Enden, an denen die anteriore efferente Projektion vermutlich bei der Präparation gerissen ist.

Aus den beiden efferenten Projektionen (schwarze gebogene Pfeile) der NB4-2-Motorneurone treten ipsilateral intermediär fächerartig mehrere Seitenneuriten hervor (breite schwarze Pfeilköpfe). Im dorsalen Bereich des Neuropils sind diese Seitenäste frei von SYN. Mehr im medialen Neuropilbereich treten dann einige SYN-Markierungen (offenen weiße Pfeilköpfe) auf, die vielleicht den axonalen Seitenneuriten zuzuordnen sind. Ebenso gut könnten sie aber auf schwach mCD8 gefärbten interneuronalen Projektionen liegen. Ebenfalls im medialen Neuropilbereich, verläuft eine einzelne Projektion durch ein mediales Faszikel intersegmental nach anterior, deren zellulärer Ursprung nicht festzustellen ist (weißer Pfeil). Auch auf dieser Projektion sind SYN-Punkte auszumachen.

Zwei voneinander unterscheidbare Faszikel projizieren nach kontralateral. Das posteriore Faszikel liegt ein wenig mehr dorsal und bifurkiert im medialen kontralateralen Faszikel lokal nach anterior und posterior (langgezogene schwarze Pfeilköpfe). Auf diesen kurzen Projektionen ist kein SYN festzustellen. Vom anterioren und etwas ventraler gelegenen transversalen Faszikel geht intermediär jeweils eine intersegmentale Projektion nach anterior und nach posterior (schwarze Pfeile). Die anteriore Projektion ist frei von Output-Synapsen. Die Projektion nach posterior scheint auf ihrem lokalen Anteil einige wenige SYN-Markierungen zu haben. In den weiter posterior gelegenen Segmenten ist sie hingegen ebenfalls frei von Output-Synapsen. Aus demselben transversalen Faszikel gehen lateral wiederum eine intersegmentale Projektion nach anterior und posterior hervor (weiße Pfeilköpfe). Diese sind beide SYN-positiv.

Abb. 4.31 Beschreibung eines spätembryonalen NB5-1-Zellstammbaums

Grafik: schematische Darstellung eines NB5-1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links.

A: Spätembryonaler NB5-1-Zellstammbaum. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Der NB5-1 Klon hat drei Zellen, die im ventralen Kortex liegen. Sie projizieren in einem gemeinsamen Faszikel ins ipsilaterale Neuropil. Intermediär gehen einige sehr kurze Seitenneuriten aus diesem Faszikel hervor, die nach anterior, posterior und dorsal weisen(schwarzer Pfeilkopf). Das Faszikel trennt sich kurz vor der Mittellinie in zwei Projektionen, die beide transversal nach kontralateral gehen. Die ventralere der beiden Projektionen verläuft transversal bis in den intermediären Neuropilbereich und bifurkiert dort lokal nach anterior (weißer Pfeilkopf) und posterior (schwarzer Pfeil). Nur auf den nach anterior gerichteten Neuriten sind SYN-Markierungen feststellbar. Die dorsalere von dem ipsilateralen Faszikel ausgehende Projektion wendet sich sofort nach Überqueren der Mittellinie nach anterior (weißer Pfeil). Auf dieser intersegmentalen Projektion sind mehrere SYN-Punkte etwa ab der anterioren Segmentgrenze zu beobachten.

Abb. 4.30

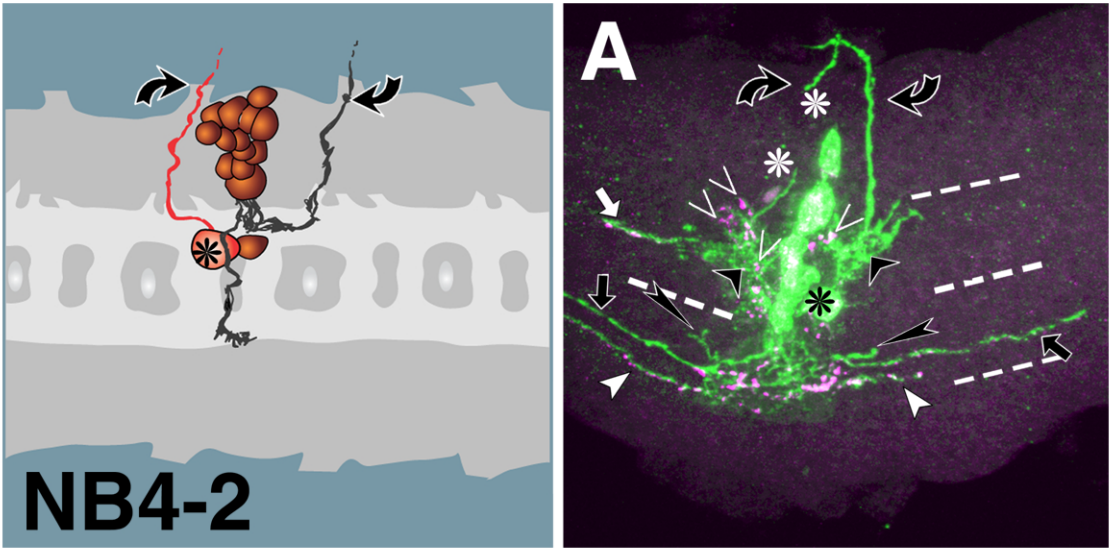
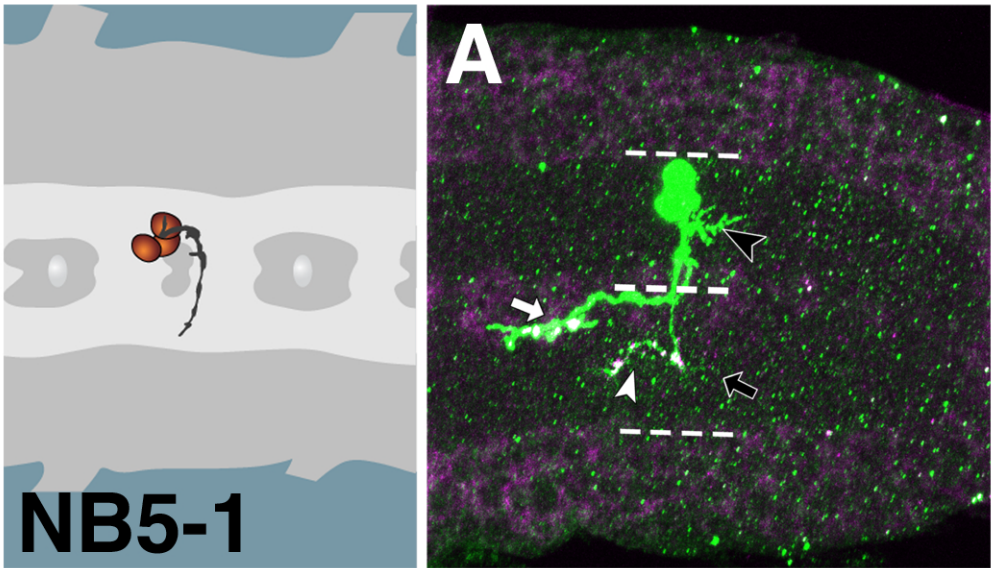


Abb. 4.31



4.3.4.14 NB5-2

Der NB5-2-Zellstammbaum besteht aus 16-38 Neuronen, darunter ein kontralateral projizierendes Motorneuron. Die dorso-ventrale Lage der Zellen reicht von fast ventral bis intermediär. Ihre medio-laterale Ausrichtung reicht von ganz medial bis intermediär. Die meisten Interneurone projizieren nach kontralateral. Ein besonders prominentes Faszikel läuft dabei durch die posteriore Kommissur und wendet sich im lateralen Neuropil nach anterior. Durch die anteriore Kommissur verlaufen drei Projektionen. Eine verläuft entlang der anterioren Grenze der Kommissur und wendet sich dann im medialen Konnektiv intersegmental nach anterior. Die beiden anderen verlaufen entlang der posterioren Grenze der Kommissur. Medial wendet sich die eine intersegmental nach anterior, die andere intersegmental nach posterior (siehe Grafik in Abb. 4.32; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). In etwa 25% aller Klone wurde außerdem ipsilateral eine intermediär nach anterior verlaufende intersegmentale Projektion beobachtet (Schmid et al., 1999). Neben dem NB5-2-Zellstammbaum haben nur zwei weitere neurale Zellklone kontralaterale efferente Projektionen; der NB2-4- und der NB3-1-Zellstammbaum. Beide haben allerdings wesentlich weniger Zellen als der NB5-2-Zellklon und außerdem jeweils zwei vom Restklon isolierte Zellen, die dorsal des Neuropils liegen.

Auf Grund dieser Kriterien ließen sich unter den Transplantationspräparaten ein *kak*-mutanter und 19 wildtypische NB5-2-Zellklone identifizieren. Der *kak*-mutante Klon (Abb. 4.32M) ist nicht wesentlich verschieden von den wildtypischen Beispielen und wird hier nicht weiter erwähnt. Von den wildtypischen Klonen wurden zwölf detailliert untersucht und beschrieben (siehe Abb. 4.32A - L und Text dazu). Von den restlichen Klonen lagen drei in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem weiteren Transplantationsklon. Bei vier weiteren Klonen war entweder die mCD8-Färbung der longitudinalen Neuriten oder die SYN-Färbung zu schlecht für eine Auswertung.

Auf der ipsilateralen Seite der NB5-2-Zellstammbäume sind zahlreiche lokale Neuriten zu finden. Diese zeigen nur im dorsalsten Teil des Neuropils einige wenige SYN-Markierungen. Alle ventraler gelegenen ipsilateralen Neuriten sind frei von Output-Synapsen. Bei den kontralateralen Neuriten des NB5-2-Zellstammbaums sind hingegen die dorsalsten Neuriten frei von Output-Synapsen, während sich auf allen ventraler gelegenen Neuriten SYN-Markierungen finden. Der NB5-2-Zellstammbaum

weist also dorso-ventral-spezifische Verteilung von Synapsen auf (siehe 4.3.2.2.1). Das Motorneuron des NB5-2-Zellstammbaums projiziert nach kontralateral und im kontralateralen Neuropil gehen aus dem primären Neuriten zahlreiche Seitenneuriten hervor. In der Hälfte der betrachteten spätembryonalen NB5-2-Zellklone sind diese Seitenneuriten mit großer Sicherheit frei von SYN-Markierung. In den anderen Klonen konnte dies nicht mit Sicherheit bestätigt werden, doch sind auch hier mit Sicherheit große Teile der motorneuronalen Seitenneuriten frei von Output-Synapsen. Diese Beobachtung unterstützt unsere Vermutung, dass Seitenäste efferenter Neurone sehr wahrscheinlich postsynaptischer Natur sind (siehe 4.3.2.4). Auch für unsere Beobachtung, dass Output-Synapsen reproduzierbar auf neuritische Kompartimente beschränkt sind, ist der NB5-2-Zellklon ein Beispiel (siehe 4.3.2.3). Auf der kontralateralen Seite verläuft im ventralen Neuropilbereich eine transversale Projektion bis nach ganz lateral. An diesem lateralen Ende finden sich zahlreiche Output-Synapsen, während der Rest des Neuriten frei von präsynaptischen Strukturen ist.

Abb. 4.32 (Teil I und Teil II) Beschreibung spätembryonaler NB5-2-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines NB5-2-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996); mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB5-2-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A - K).

A - M: Spätembryonale NB5-2-Zellstammbäume (wildtypisch: A - L; *kak*-mutant: M). Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), Output-Synapsen-Marker SYT (in L, magenta) bzw. SYN (sonst, magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

In den nun folgenden Beschreibungen wird detailliert auf die verschiedenen beobachteten Projektionen eingegangen. Bei den auftretenden Variationen sollte immer bedacht werden, dass sie auch auf schwache mCD8-Färbung in einzelnen Neuriten zurückzuführen sein können. Das Beispiel der kontralateralen longitudinalen Projektionen bei NB3-2 (siehe 4.3.4.10) hat schon verdeutlicht, dass Projektionen die in einem Klon sehr prominent und auf Grund ihrer mCD8-Färbung gut sichtbar sind, unter Umständen in anderen Klonen mit mCD8 überhaupt nicht nachgewiesen werden können. In manchen Fällen beweisen vorhandene SYN-Punkte, dass diese Projektionen trotzdem vorhanden sind. Auch bei den NB5-2-Klonen waren ähnliche Effekte zu beobachten.

A - L: Übereinstimmend haben alle NB5-2-Zellklone eine kontralaterale motorneuronale Projektion (schwarze gebogene Pfeile) und in den meisten Fällen können im lateralen kontralateralen Neuropil kleine Seitenneurite beobachtet werden, die von dieser efferenten Projektion abgehen (schwarze Pfeilköpfe). Bei allen Klonen wurden kontralateral ein oder zwei sehr lange und prominente Projektionen beobachtet, die in einem ventro-medialen Faszikel nach anterior verlaufen (weiße Pfeilköpfe). Dorsal von diesen Projektionen liegen zahlreiche SYN-Markierungen, die sich von medial bis lateral erstrecken. Vermutlich liegen sie auf nicht mCD8-gefärbt longitudinalen Neuriten. Ein weiteres gemeinsames Merkmal aller NB5-2-Zellklone ist eine Akkumulation von Output-Synapsen, die am Ende eines vermutlich durch die anteriore Kommissur projizierenden kontralateralen Neuriten liegt (gebogene weiße Pfeile). Die auffällige Struktur liegt im lateralen ventralen Neuropilbereich. Bis auf einen Klon (I) haben alle ein bis mehrer kontralaterale longitudinale Projektionen nach posterior, die im ventralen Neuropilbereich verlaufen (weiße offene Pfeilköpfe). Diese Projektionen tragen zahlreiche SYN-Markierungen. Auf der kontralateralen Seite in den einzelnen Klonen unterschiedlich ausgeprägt ist ein weit verzweigtes Netz von ventral gelegenen Neuriten (schwarze Sterne), dass

wenn vorhanden von einer der beiden schon erwähnten prominenten intersegmentalen Projektionen nach anterior ausgeht. Dieses Neuritennetz ist frei von SYN-Markierungen.

Auf der ipsilateralen Seite können in allen Klonen zahlreiche lokale longitudinale Neuriten beobachtet werden (nicht dargestellt, da von Zellen überdeckt). Bis auf einige wenige, ganz dorsal gelegene SYN-Markierungen sind diese Neuriten frei von Output-Synapsen. In einigen Klonen gibt es des weiteren intersegmentale SYN-freie Projektionen nach anterior und/oder posterior (schwarze Pfeile).

Mehrere NB5-2-Zellklone haben Output-Synapsen auf einer transversalen Projektion, die durch eine Kommissur anterior vom Zellklon verläuft (weiße Pfeile). Diese Output-Synapsen befinden sich so nah an der Mittellinie, dass sie vermutlich schon innerhalb der Kommissuren liegen. Der NB5-2-Zellstammbaum ist der einzige von uns untersuchte, bei dem SYN-Markierungen in dieser Region des Neuropils beobachtet wurden.

M: Das motorneurone Axon des *kak*-mutanten NB5-2-Klons ist kaum zu erkennen. Die Anti-mCD8-Färbung offenbart einige wenige Punkte die etwa auf der Linie liegen, in der man die axonale Projektion erwarten würde (gebogener schwarzer Pfeil). Mit größter Wahrscheinlichkeit stellen diese Punkte kurze Abschnitte des Axons dar. Entsprechend den Beobachtungen im WT erstrecken sich auf der kontralateralen Seite longitudinale intersegmentale Neuriten nach anterior (weiße Pfeilköpfe). Der längste von ihnen erstreckt sich am medialen Rand des Neuropils. Wie in den wildtypischen NB5-2-Zellstammbäumen gibt es auch mindestens einen kontralateralen Neuriten nach posterior (offene weißer Pfeilkopf). Auch auf der ipsilateralen Seite sind diffuse Projektionen nach anterior zu erkennen.

Wie in den wildtypischen Klonen hat der *kak*-mutante NB5-2-Zellklon fast nur auf den kontralateralen Neuriten SYN-positive Regionen. Viele dieser SYN-Punkte liegen auf Höhe des Klons, wenige in longitudinalen Linien angeordnete Punkte auf Projektionen nach anterior oder posterior. Die Verteilung stimmt mit der im WT gesehenen überein. Auch die im wildtypischen NB5-2-Zellklon gesehenen kontralaterale Akkumulation von Output-Synapsen, die sich nach lateral etwas von den anderen SYN-Punkten abhebt, ist im *kak*-mutanten NB5-2-Zellklon sichtbar (gebogener weißer Pfeil). Genau wie beim WT gehören sie zu den am ventralsten im Neuropil gelegenen präsynaptischen Regionen des NB5-2-Zellstammbaums.

Abb. 4.32
Teil I

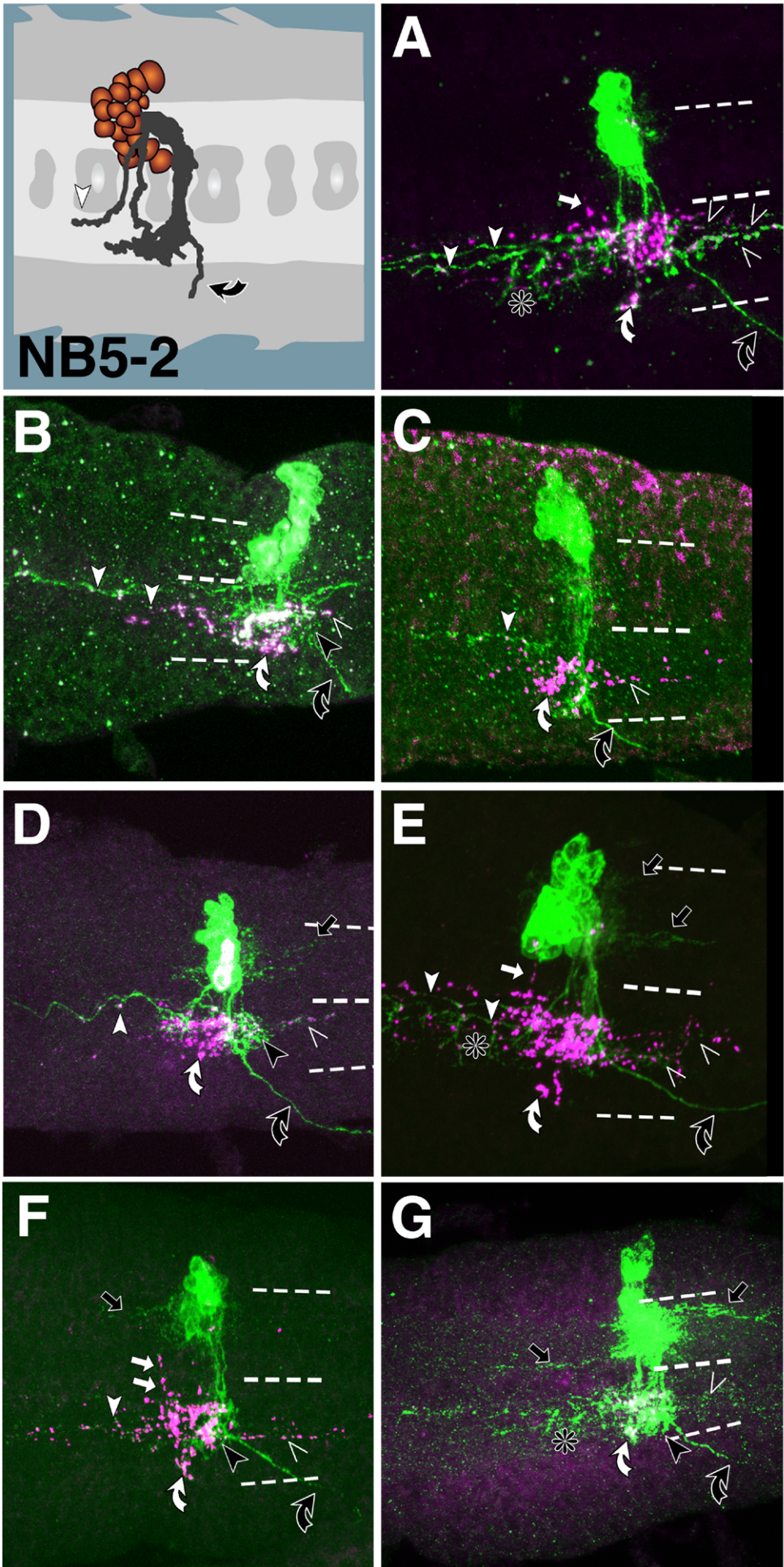
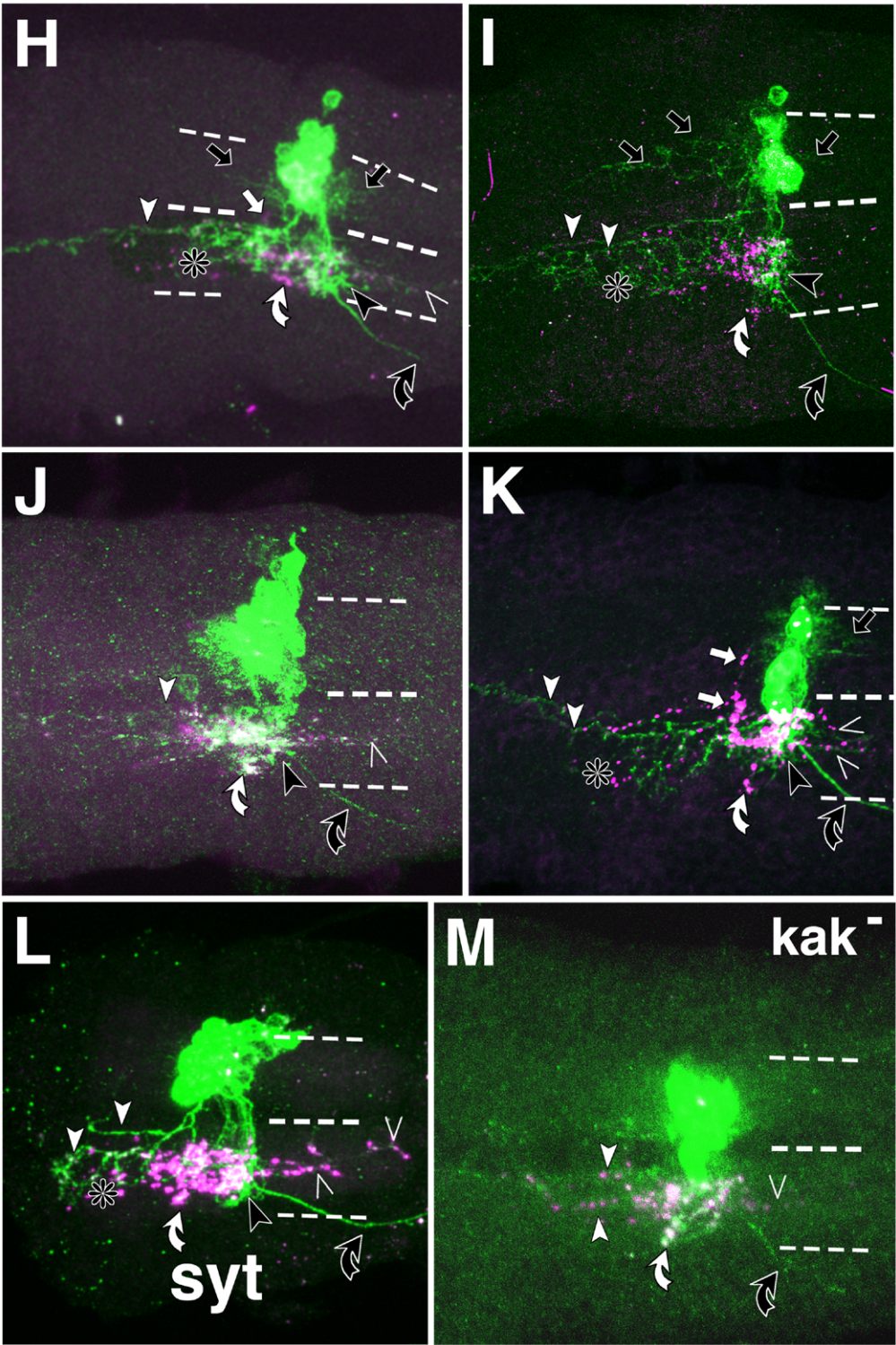


Abb. 4.32
Teil II



4.3.4.15 NB5-3

Der NB5-3-Zellklon besteht aus 5-19 Zellen die sich in zwei distinkte Gruppen unterteilen. Die größere Zellgruppe liegt im lateralen Kortex und enthält ein ipsilaterales Motorneuron. Die zweite Zellgruppe besteht aus ein bis drei Interneuronen und liegt medial im Kortex, dorso-lateral vom Neuropil. Die Interneurone der beiden Zellgruppen projizieren über zwei Faszikel nach kontralateral. Eine Projektion geht durch die anteriore, die andere durch die posteriore Kommissur (siehe Grafik in Abb. 4.33; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Die durch die anteriore Kommissur verlaufende Projektion liegt dabei ventraler als die durch die posteriore und projiziert im medialen Neuropilbereich dann intersegmental nach anterior. Die posteriore kontralaterale Projektion verläuft dagegen bis zum lateralen Rand des Neuropils und projiziert dann lokal anterior. (C. Rickert, unveröffentlichte Daten). Ein wenig abweichende Ergebnisse präsentierten Schmid et al. (Schmid et al., 1999). Demnach verlaufen die kontralateralen Projek-

Abb. 4.33 Beschreibung spätembryonaler NB5-3-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines NB5-3-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Schmidt et al., 1997); mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB5-3-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A - C).

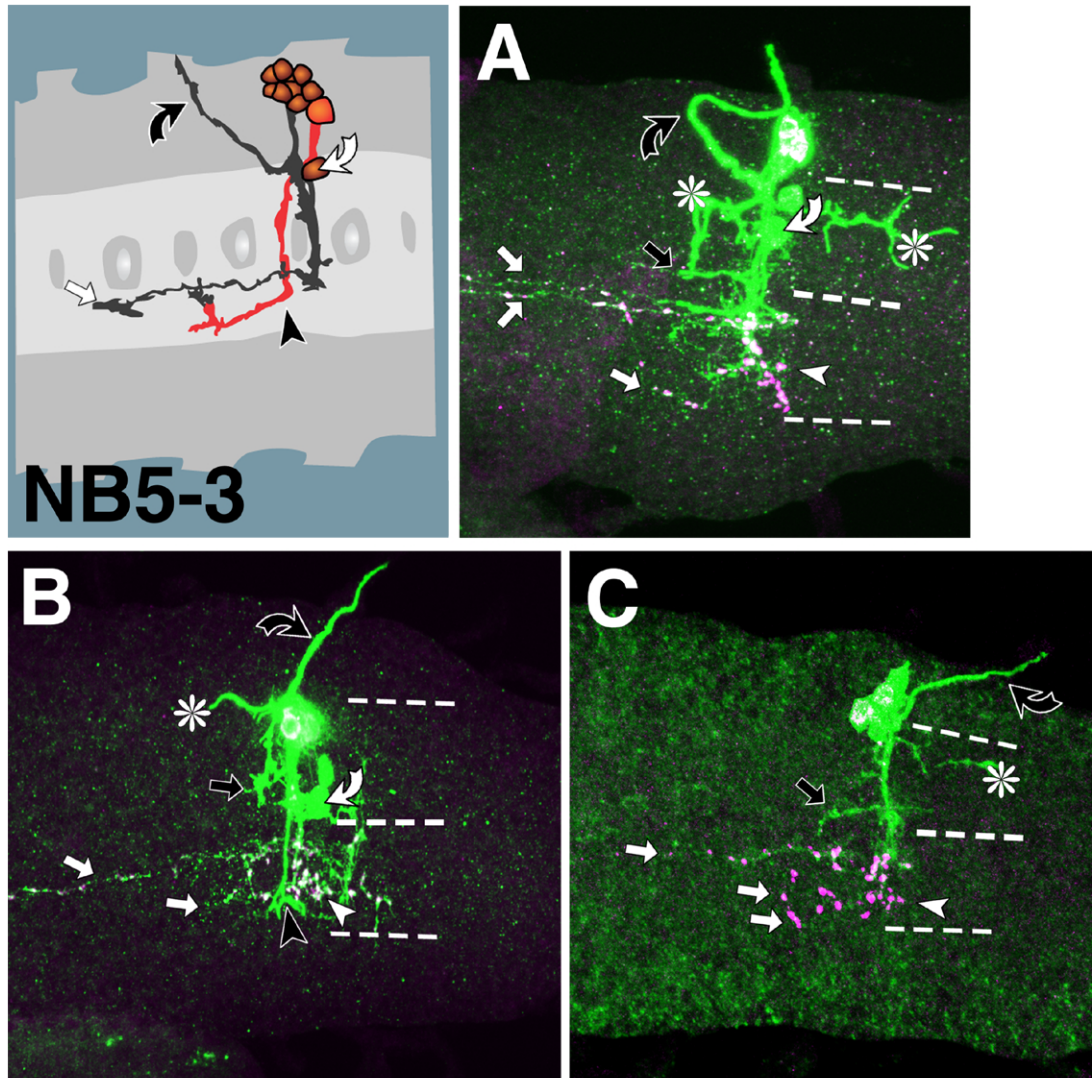
A - C: Spätembryonale NB5-3-Zellstammbäume. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet. Weiße gebogene Pfeile: nach medial abgesetzte Zellgruppe (nicht in C).

Ipsilateral haben alle analysierten NB5-3-Zellklone eine motorneuronale Projektion (schwarze gebogene Pfeile) mit kleinen Seitenneuriten (nicht dargestellt, da größtenteils von Zellen überstrahlt). Außerdem ist in allen drei Klonen eine lokale Projektion zu beobachten, die ganz dorsal im medialen Neuropilbereich nach anterior verläuft (schwarzer Pfeil). Auf keiner ipsilateralen Projektion sind Output-Synapsen.

Nach kontralateral projizieren jeweils zwei transversale Faszikel. Aus dem posterioren und dorsaleren der beiden Faszikel gehen mehrere prominente SYN-markierte Projektionen hervor. Einige projizieren intersegmental nach anterior (weiße Pfeile), andere sind lokal nach anterior oder posterior gerichtet (weiße Pfeilköpfe). Aus dem anterioren und ventraleren Faszikel (nur in Darstellung B offensichtlich erkennbar, schwarzer Pfeilkopf) gehen nur lokale longitudinale Neuriten hervor, die frei von SYN-Markierung sind.

In zwei Klonen sind auf der ipsilateralen Seite im lateralen Neuropilbereich prominente Projektionen zu beobachten, die von ihrer Morphologie her fast an gliale Fortsätze erinnert (weiße Sterne in A + B). Bisher wurden allerdings keine glialen Zellen in NB5-3 Klonen festgestellt. Auch der dritte Klon hat eine prominente Projektion im lateralen Neuropilbereich, sie ist aber von ihrer Morphologie her nicht ganz so auffällig (weißer Stern in C).

Abb. 4.33



tionen beide durch die posteriore Kommissur und das Motorneuron ist nur in thorakalen und den ersten abdominalen Segmenten vorhanden. Die Zellstammbäume von NB5-4 und NB2-5 ähneln dem des NB5-3. Sie sind ähnlich lokalisiert, haben jeweils eine motorneuronale Projektion und eine oder mehrere medial vom Restklon abgesetzte Zellen. Der NB5-4-Zellklon besteht allerdings aus meist aus nicht mehr als vier Zellen und projiziert zumindest bis ins frühe Stadium 17 nicht nach kontralateral. Der NB2-5-Zellklon hat zusätzlich zu seinen kontralateralen Projektionen eine prominente intersegmentale Projektion nach anterior auf der ipsilateralen Seite.

Auf Grund dieser Kriterien ließen sich unter den Transplantationspräparaten drei NB5-3-Zellstammbäume identifizieren (Abb. NNB5-3A - C). Einem dieser Klone (Abb. NNB5-3C) fehlt die kleinere, medialer gelegene Zellgruppe, aber er zeigt weitgehende Übereinstimmung mit den anderen oben genannten Kriterien.

Aus dem primären Neuriten des NB5-3-Motorneurons gehen im lateralen Bereich des ipsilateralen Konnektivs einige unscheinbare Seitenneuriten hervor. Im ipsilateralen Konnektiv finden sich auf dem NB5-3-Zellstammbaum aber keine Output-Synapsen. Diese Beobachtungen unterstützen unsere Annahme, dass Seitenäste efferenter Neurone sehr wahrscheinlich postsynaptischer Natur sind (siehe 4.3.2.4). Außerdem ist der NB5-3-Zellstammbaum ein Beispiel für ipsilateral-kontralateral spezifische Verteilung von Synapsen, denn nur auf seinen kontralateralen Neuriten sind SYN-Markierungen (siehe 4.3.2.2.2). Zusätzlich zeigt der NB5-3-Zellklon auch noch dorso-ventral-spezifische Verteilung: Nur dorsal bis intermediär gelegene Neuriten auf der kontralateralen Seite sind SYN-markiert (siehe 4.3.2.2.1).

4.3.4.16 NB6-1

Der NB6-1 Zellklon besteht aus zehn bis zwanzig Interneuronen. Die Zellen liegen ventral im medialen Kortextbereich. Ipsilateral lassen sich mehrere sehr kurze Projektionen nach anterior und einige intersegmentale Projektionen nach posterior beobachten. Nach kontralateral projiziert ein großes Faszikel, das im intermediären und lateralen Neuropilbereich in mehrere intersegmental nach anterior und posterior

wachsende Projektionen zerfällt (siehe Grafik in Abb. 4.34; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999).

Unter den Transplantationspräparaten konnten vier NB6-1-Zellklone identifiziert werden (Abb. 4.34A - D). Abgesehen davon, dass die ipsilateralen anterioren Projektionen sich verlängern, verändert sich der Zellklon zwischen Stadium 16 und spätem Stadium 17 kaum. Deshalb war es leicht, ihn anhand seines charakteristischen Projektionsmusters zu identifizieren. Der NB6-1-Zellstammbaum zeigt eine anterior-posterior-spezifische Verteilung von Synapsen (4.3.2.2.3). Während die posterior gerichteten ipsilateralen Neuriten zahlreiche SYN-Markierungen haben, sind die nach anterior auswachsenden ipsilateralen Neuriten frei von Output-Synapsen.

Abb. 4.34 Beschreibung spätembryonaler NB6-1-Zellstammbäume

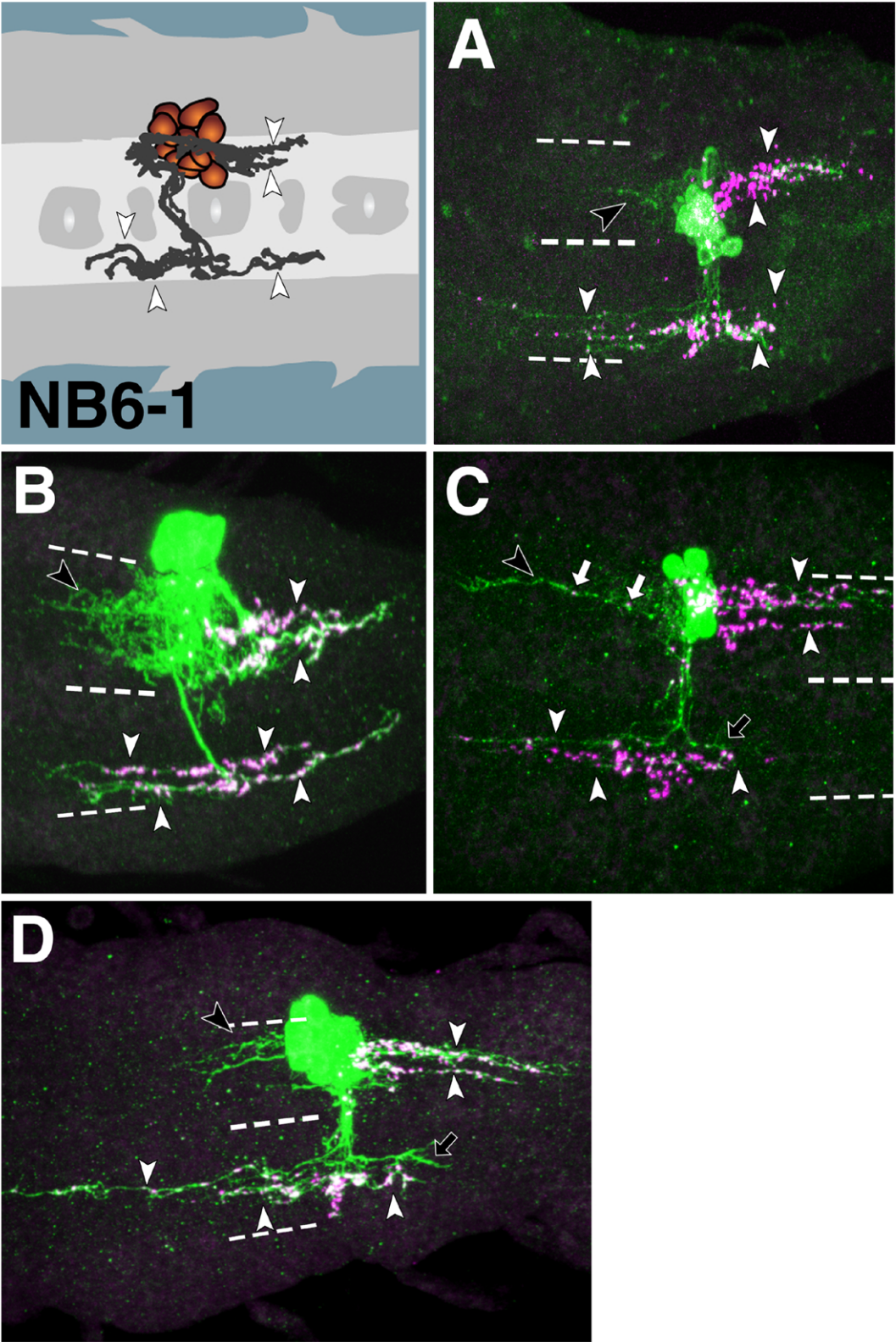
Grafik: schematische Darstellung eines NB6-1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996); mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB6-1-Zellstammbaum noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A - D).

A - D: Spätembryonale NB6-1-Zellstammbäume. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Alle vier Klone zeigen übereinstimmend mehrere intersegmentale Projektionen nach posterior auf der ipsilateralen Seite und jeweils zwischen zwei und drei Projektionen nach anterior bzw. posterior auf der kontralateralen Seite (weiße Pfeilköpfe). Bis auf zwei Ausnahmen (schwarze Pfeile in C + D) sind auf diesen Neuriten zahlreiche Output-Synapsen zu finden.

Im Unterschied zu den bis zum frühen Stadium 17 beschriebenen NB6-1-Zellklonen finden sich bei den vier Transplantationsklonen auch ipsilateral eine oder mehrere intersegmentale Projektionen nach anterior (schwarze Pfeilköpfe). Diese Projektionen zeigen in drei Klonen überhaupt kein SYN und in einem Klon zwei vereinzelte SYN-Punkte (weiße Pfeile in C).

Abb. 4.34



4.3.4.17 NB6-2

Der NB6-2-Zellklon besteht aus acht bis 24 Interneuronen, deren Zellkörper lateral bis intermediär im Neuropil liegen. Ihre dorso-ventrale Lage ist von intermediär bis fast dorsal. Im frühen Stadium 16 haben NB6-2-Zellklone ipsilateral nur eine kurze Projektion nach anterior die im lateralen Neuropilbereich verläuft. Zwei Faszikel projizieren in der gleichen Kommissur (aber deutlich voneinander getrennt) nach kontralateral. Beide Faszikel verlaufen transversal bis in den lateralen Neuropilbereich. Dort wendet sich das anteriore Faszikel nach anterior, das posteriore nach posterior (Bossing et al., 1996). Im frühen Stadium 17 (Schmid et al., 1999) hat sich die kurze kontralaterale Projektion nach posterior zu einer intersegmentalen verlängert. Nach anterior haben sich mehrere, auch intermediär und medial gelegene Projektionen herausgebildet, die ebenfalls intersegmental sind. Bei NB6-2-Zellklonen im ersten thorakalen Segment wurde ein ipsilaterales Motorneuron festgestellt (Schmid et al., 1999). Große Ähnlichkeit besteht zwischen den Zellstammbäumen von NB6-2 und NB2-1. Im NB2-1-Zellstammbaum liegt allerdings ein prominentes isoliertes Neuron mit auffälliger Projektion vor, das auch im frühen Stadium 17 noch deutlich erkennbar ist (TB-Neuron; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). Auch der NB4-1-Zellklon hat gewisse Ähnlichkeit mit den NB6-2-Zellklon, seine Zellkörper liegen allerdings deutlich medialer.

Auf Grund dieser Kriterien ließen sich unter den Transplantationspräparaten ein *kak*-mutanter und 13 wildtypische NB6-2-Zellklone identifizieren. Von den wildtypischen Klonen wurden acht detailliert untersucht und beschrieben (siehe Abb. 4.35A - H und Text dazu). Die restlichen fünf wildtypischen Zellklone lagen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem weiteren Transplantationsklon. Der *kak*-mutante Zellklon zeigte in seiner Morphologie ein paar Abweichungen gegenüber dem wildtypischen NB6-2-Zellklon (siehe Abb. 4.35I und Text dazu). Die Verteilung seiner Synapsen stimmte aber trotzdem weitgehend mit der im wildtypischen Zellklon überein. Ob die Abweichungen ein Resultat der *kak*-Mutation waren oder eine anders bedingte Fehlentwicklung, kann mit den vorliegenden Daten allerdings nicht geklärt werden.

Auf der kontralateralen Seite des NB6-2-Zellstammbaums wenden sich die meisten Neuriten nach posterior und zeigen dann zahlreiche SYN-Markierungen. Mit Ausnahme einer einzelnen Akkumulation von Output-Synapsen sind alle nach

anterior gerichteten Neuriten frei von SYN-Markierung. Der NB6-2-Zellstammbaum zeigt also anterior-posterior spezifische Verteilung von Synapsen (siehe 4.3.2.2.3). Aber auch medio-lateral ist in der Mehrzahl der NB6-2-Zellklone spezifische Synapsenverteilung zu beobachten (siehe 4.3.2.2.4): Eine SYN-freie, ipsilaterale, intermediäre Projektion nach anterior ist in sechs der acht Klone vorhanden. Weitere Projektionen nach anterior liegen medialer und zeigen ausnahmslos SYN-Markierungen. Des Weiteren kann im NB6-2-Zellstammbaum ein isolierter, transversal projizierender Fortsatz beobachtet werden, der an seinem lateralen Ende eine Anhäufung präsynaptischer Strukturen hat. Deshalb ist der NB6-2-Zellklon auch ein Beispiel für die reproduzierbare Beschränkung von Output-Synapsen auf neuritische Kompartimente (siehe 4.3.2.3).

Abb. 4.35 Beschreibung spätembryonaler NB6-2-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines NB6-2-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB5-2-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A - I).

A - I: Spätembryonale NB6-2-Zellstammbäume (wildtypisch: A - H; *kak*-mutant: I). Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

A - H: Ipsilateral konnte in allen Klonen eine lateral oder intermediär gelegene, intersegmentale Projektion nach posterior beobachtet werden (weiße Pfeile auf ipsilateraler Seite). Diese Projektion trug in sieben Klonen SYN-Markierungen (Ausnahme siehe D). In vier Klonen waren diese SYN-Markierungen vom lokalen Anteil der Projektion ausgeschlossen (schwarze Sterne in A, B, C, F). Ebenfalls ipsilateral nach posterior aber medial und lokal sind bei sieben Klonen eine oder zwei ebenfalls SYN-positive Projektion zu beobachten (weiße Pfeilköpfe auf der ipsilateralen Seite; nicht feststellbar in H).

Die prominenteste Projektion nach kontralateral ist die schon im Stadium 16 vorhandene posteriore. Sie verläuft ganz ventral und bis in den lateralen Bereich des kontralateralen Neuropils. Dort folgt sie der Krümmung des Neuropils bis fast dorsal. Über den ganzen Bereich, indem das transversale Faszikel das Neuropil durchläuft, gehen kurze Seitenneuriten aus ihm hervor, die nach dorsal und posterior projizieren. In der Dorsalaufsicht entsteht deshalb der Eindruck einer starken Verdickung des Faszikels in diesem Bereich (weiße Sterne). Diese Seitenneuriten zeigen zahlreiche SYN-Punkte. Diese SYN-positiven Bereiche liegen bei fast allen Klonen posterior vom eigentlichen Faszikel (Ausnahme in denen diese SYN-Punkte auch posterior liegen siehe F). Neben diesen kurzen Seitenästen gehen aus dem prominenten Faszikel auch noch mehrere intersegmentale Projektionen lateral nach posterior und eine weitere intermediär nach posterior (weiße Pfeilköpfe auf kontralateraler Seite, nicht zu sehen in H). Diese Projektionen zeigen ebenfalls zahlreiche SYN-Punkte.

Direkt anterior von diesem prominenten kontralateralen Faszikel verläuft das zweite Faszikel nach kontralateral, das schon im Stadium 16 vorhanden ist. (Auch hier bildet F eine Ausnahme, hier liegt zwischen diesen beiden kontralateralen Faszikeln eine weitere kontralaterale Projektion (schwarzer offener Pfeilkopf)). Dieses kontralaterale Faszikel verläuft ganz dorsal und zeigt in zahlreichen Klonen noch auf der ipsilateralen Seite ein auffälliges Identifizierungsmerkmal. Im medialen Neuropilbereich lassen sich in den meisten Klonen mehrere wie eine Federbüschel wirkende, nach anterior gerichtete Seitenneuriten erkennen (schwarze Pfeilköpfe auf ipsilateraler Seite), dieselbe Struktur wiederholt sich im medialen kontralateralen Konnektiv (schwarze Pfeilköpfe auf kontralateraler Seite). Die Projektion verläuft dann weiter transversal bis zum lateralen Rand des Neuropils, macht dort einen Knick nach anterior und folgt dabei der Krümmung des Neuropils nach

dorsal. An der dorsolateralen Grenze des Neuropils endet sie in einer SYN-positiven Verdickung (weiße gebogene Pfeile auf kontralateraler Seite). Abgesehen von dieser Verdickung gibt es in keinem der beobachteten Klone auf der anterioren kontralateralen Seite SYN-positive Regionen.

Größere Unterschiede zwischen den Projektionsmustern der analysierten NB6-2-Zellstammbäume konnten im ipsilateralen anterioren Bereich beobachtet werden. In sechs von acht Klonen ist eine SYN-freie, ipsilaterale intermediäre Projektion nach anterior zu finden, die frei von Synapsin ist. Medial liegen in den meisten Klonen manchmal lokale (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht markiert) manchmal intersegmentale (weiße gebogene Pfeile auf ipsilateraler Seite) Projektionen nach anterior vor, die ausnahmslos SYN-Markierungen tragen.

Zusätzlich zu den beiden schon aus Stadium 16 und frühem Stadium 17 bekannten Faszikeln nach kontralateral haben sich in sechs der acht NB6-2-Zellklone (Ausnahme G + H) zusätzliche kontralaterale Projektionen herausgebildet, die meistens anterior vom Klon liegen (Ausnahmen A + F).

Die Anzahl der zusätzlich gebildeten kontralateralen Projektionen ist von Klon zu Klon verschieden. Bei fünf Klonen wurde eine ganz anterior liegende Projektion beobachtet, die ipsilateral aus der Zellgruppe hervorgeht, diagonal nach anterior verläuft und etwa im medialen ipsilateralen Neuropilbereich eine leichte Krümmung nach transversal erfährt (weiße offene Pfeilköpfe). Danach kreuzt diese Projektion die Mittellinie und löst sich entweder im medialen und intermediären Neuropilbereich in verschiedenen Seitenästen auf oder projiziert weiter bis in den lateralen Neuropilbereich, ohne dass erkennbare Seitenäste gebildet werden (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht markiert).

Besondere Abweichungen zeigten sich bei zwei Klonen. Bei einem waren eine dorsale und eine ventrale Gliazelle vorhanden (schwarzer gebogener Pfeil in H), bei dem anderen wurde eine ipsilaterale Motorprojektion beobachtet (schwarzer gebogener Pfeil in G).

I: Das Präparat des *kak*-mutanten NB6-2-Zellstammbaums unterscheidet sich von den Präparaten anderer *kak*-mutanter NB-Klone durch die deutliche anti-mCD8-Färbung der Projektionen, die von ihrer Intensität denen gut gefärbter wildtypischer Klone entspricht. Diffuse Strukturen, die man nur als Neuriten deuten kann, weil man sie schon vom wildtypischen Präparat her kennt, sind beim *kakapo*-mutanten NB6-2 Zellklon nicht vorhanden (vergleiche 4.3.4.2, 4.3.4.4, 4.3.4.10 und 4.3.4.15).

Übereinstimmend mit den wildtypischen NB6-2-Zellstammbäumen zeigt der *kak*-mutante Zellklon ipsilateral mehrere Synapsin-positive Projektionen nach posterior (weißer Pfeil und weißer Pfeilkopf) und einige Projektionen nach anterior, deren Verlauf jedoch nicht genau bestimmt werden kann, da das Präparat hier beschädigt ist (weißes Fragezeichen). Ebenso finden sich mindestens drei kontralaterale Projektionen, von denen die anteriorste transversal bis nach lateral verläuft und dort in einer Akkumulation von Output-Synapsen endet (gebogener weißer Pfeil). Die posteriorste Projektion verläuft ebenfalls transversal bis ganz lateral. Aus ihr gehen über die ganze Breite des kontralateralen Konnektivs kurze Seitenneurite hervor (weißer Stern).

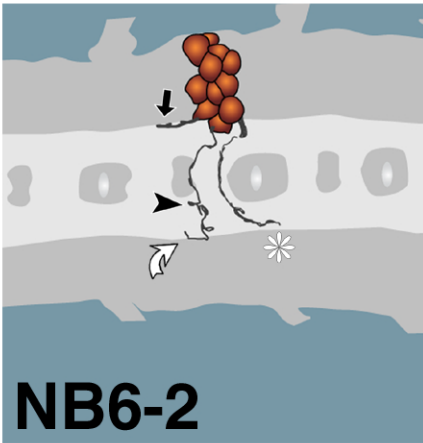
Beim dargestellten *kak*-mutanten NB6-2-Zellklon gibt es auch Abweichungen von der wildtypischen Morphologie. Es fehlen die lang gestreckten prominenten Projektionen nach posterior, die aus der posterioren kontralateralen Projektion hervorgehen (vergleiche X in I mit weißen Pfeilen auf kontralateraler Seite in A - H). Das Netz aus kurz projizierenden Neuriten, das im wildtypischen NB6-2-Zellklon nach posterior gerichtet ist, ist hier anterior vom transversalen Projektionsbündel zu finden (vergleiche weißer Stern in I mit weißen Sternen in A - H).

Weitere Unterschiede zum wildtypischen NB6-2-Zellklon sind weniger auffällig. Die mediale ipsilaterale Projektion nach posterior (weißer Pfeilkopf) hat ihren Ursprung im lateralen Neuropilbereich. Sie verläuft dann zunächst leicht diagonal nach posterior, bevor sie sich in einem medialen Faszikel endgültig nach posterior wendet.

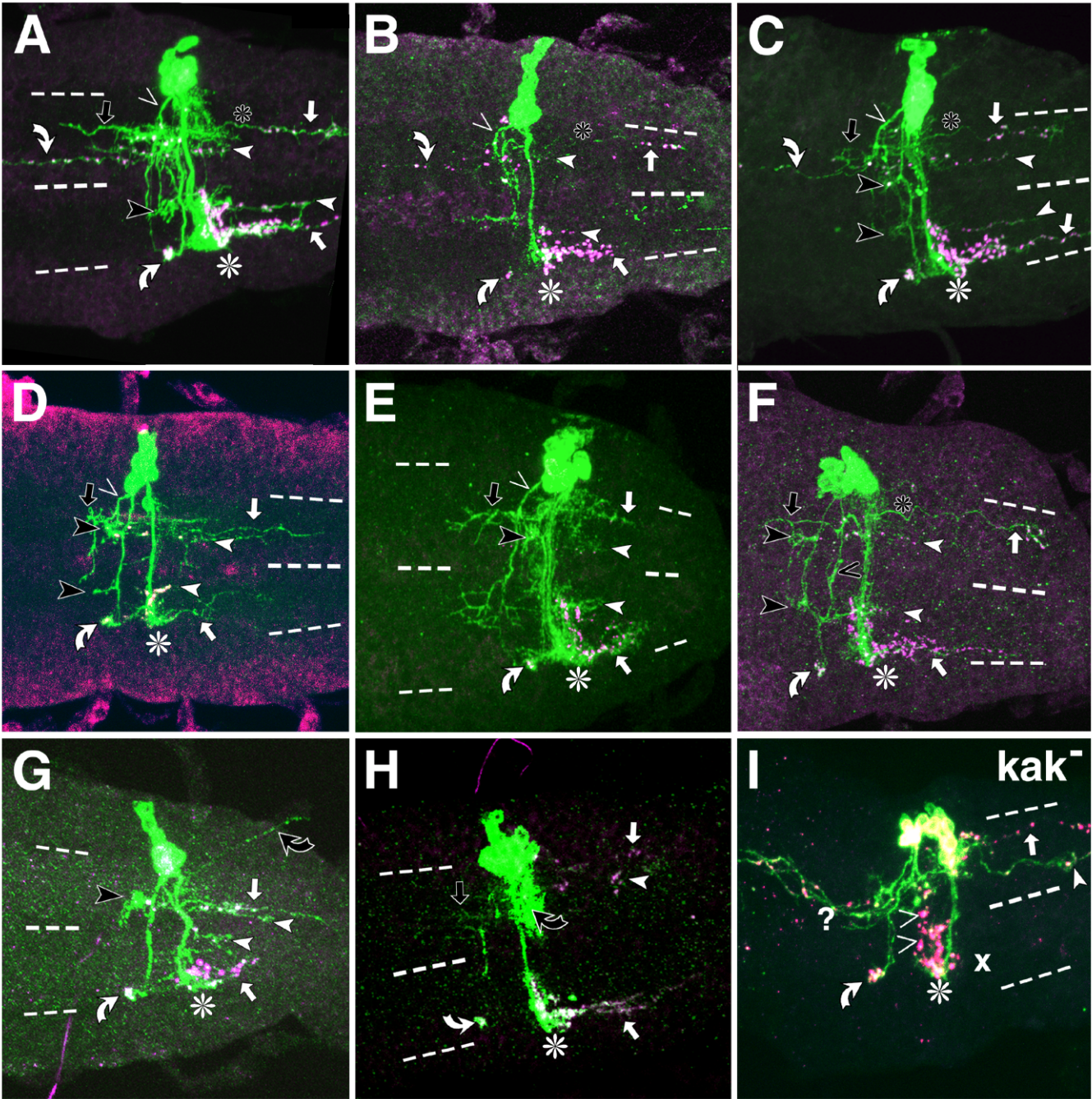
Zwischen der posterioren und der anterioren Projektion nach kontralateral ist im *kak*-mutanten NB6-2-Klon eine weitere kontralaterale Projektion zu beobachten (offene weiße Pfeilköpfe). Sie zeigt zahlreiche SYN-Markierungen, während im wildtypischen Klon in dieser Region in keinem Fall präsynaptische Spezialisierungen nachgewiesen werden konnten.

Abgesehen von dieser Unregelmäßigkeit stimmt das Muster der SYN-Verteilung im *kak*-mutanten NB6-2-Zellklon mit dem des wildtypischen NB6-2-Klons aber überein. Auch das dendritische Netz, an der posteriorsten kontralateralen Projektion, das sich nach anterior statt posterior erstreckt, zeigt die vom WT bekannte dichte Anhäufung von präsynaptischen Strukturen.

Abb. 4.35



NB6-2



4.3.4.18 NB7-1

Der NB7-1-Zellklon besteht aus drei bis sechs ipsilateralen Motorneuronen und zehn bis 19 Interneuronen. Die Zellen liegen im medialen bis intermediären Kortextbereich. Neben den ipsilateralen Motorprojektionen finden sich zwei kontralaterale Projektionen, die über die anteriore und posteriore Kommissur transversal bis in den lateralen Neuropilbereich projizieren. Das anteriore Faszikel bifurkiert dort lokal nach anterior und posterior, die posteriore bifurkiert auch, projiziert aber nur sehr kurz nach anterior und intersegmental nach posterior (siehe Grafik in Abb. 4.36; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). Der einzige Klon, der dem NB7-1-Klon ähnlich genug ist, um zu Verwechslungen zu führen ist der des NB2-2. Allerdings projiziert der NB2-2-Zellklon nur über eine Kommissur nach kontralateral (siehe auch 4.3.4.5).

Auf Grund dieser Kriterien ließen sich unter den Transplantationspräparaten zwei NB7-1-Zellstammbäume identifizieren (siehe Abb. 4.36A + B). Trotz Übereinstimmungen gibt es zwischen diesen beiden Klonen noch offensichtliche

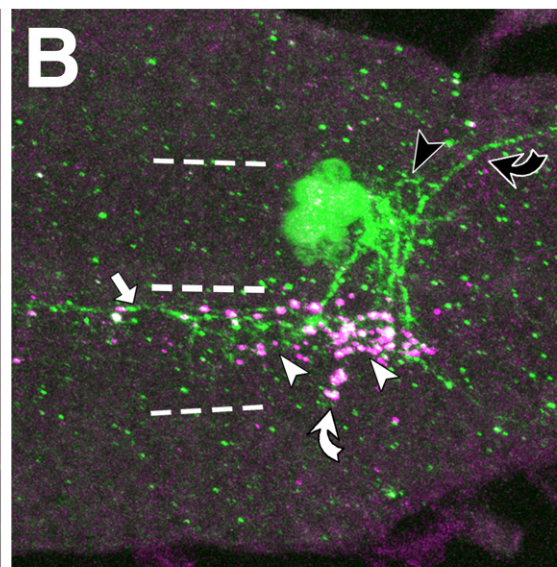
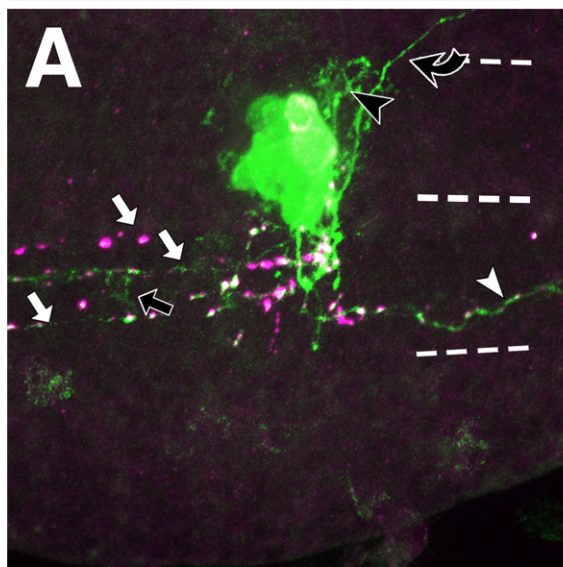
Abb. 4.36 Beschreibung spätembryonaler NB7-1-Zellstammbäume

Grafik: schematische Darstellung eines NB7-1-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in den spätembryonalen NB7-1-Zellstammbäumen noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu deren Identifizierung beitrugen (vergleiche entsprechende Symbole in A + B).

A, B: Spätembryonale NB7-1-Zellstammbäume. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie. Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole, Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet.

Übereinstimmend zeigen beide Klone ipsilateral ein motorneuronales Faszikel (schwarze gebogene Pfeile) und mehrere lokale Neuriten (angedeutet durch schwarze Pfeilköpfe, vielfach von Zellen überdeckt). Alle ipsilateralen Projektionen sind frei von SYN. Beide Klone haben zwei voneinander distinkte kontralaterale Projektionen, deren Fortsetzung im kontralateralen Konnektiv aber unterschiedlich ausfällt. Bei einem Klon sieht man kontralateral drei prominente intersegmentale Projektionen nach anterior (weiße Pfeile in A). Jeweils eine medial, intermediär und lateral. Alle drei Projektionen zeigen SYN-Färbung. Die intermediäre Projektion hat mehrere transversal nach lateral gerichtete Seitenäste, auf denen kein SYN festzustellen ist (z. Bsp. schwarzer Pfeil in A). Eine weitere kontralaterale Projektion verläuft lateral intersegmental nach posterior (weißer Pfeilkopf). Auch sie ist SYN-reaktiv. Es ist nicht klar auszumachen, welche der longitudinalen Projektionen von dem anterioren oder dem posterioren kontralateralen Faszikel ausgehen.

Bei dem zweiten Klon verläuft kontralateral eine einzelne Projektion intersegmental im medialen Neuropilbereich (weißer Pfeil in B). Sie hat mehrere SYN-Punkte. Zwei weitere aber vermutlich lokale Projektionen verlaufen intermediär parallel zu dieser ersten. Sie sind aber nicht über die mCD8-Färbung sondern nur anhand von SYN-Punkten zu erkennen (weiße Pfeilköpfe in B). Projektionen nach posterior sind sehr kurz, lokal, SYN-positiv und ebenfalls im intermediären Bereich zu finden. Ganz ventral im Neuropil fällt eine Struktur ins Auge, die so ähnlich auch in NB5-2-Zellklonen zu beobachten war (siehe 4.3.4.15). Eine transversale Projektion bis in den lateralen Neuropilbereich, die an ihrem Ende eine sehr prominente SYN-Färbung zeigt (weißer gebogener Pfeil).

Abb. 4.36

Unterschiede. Deshalb können auch die detaillierten Beschreibungen (siehe Abb. 4.36A + B und Text dazu) nur ein vorläufiges Bild geben. Zukünftige Transplantationsexperimente sollten es ermöglichen, ein besser standardisiertes Bild des spätembryonalen NB7-1-Zellklons zu entwerfen.

Die efferenten Projektionen der NB7-1-Motorneurone verlaufen in einem gemeinsamen Faszikel ipsilateral durchs Bauchmark. Die zahlreichen Seitenäste, die sich dort erkennen lassen, sind frei von Output-Synapsen. Diese Beobachtungen unterstützen unsere Annahme, dass Seitenäste efferenter Neurone sehr wahrscheinlich postsynaptischer Natur sind (siehe 4.3.2.4). Außerdem sind auch auf den interneuronalen Projektionen des NB7-1-Zellstammbaums im ipsilateralen Neuropilbereich keine SYN-Markierungen zu sehen, während im kontralateralen Konnektiv alle longitudinalen Projektionen Output-Synapsen haben. Damit ist der NB7-1-Zellklon auch ein Beispiel für ipsilateral-kontralateral-spezifische Verteilung von Synapsen (siehe 4.3.2.2.2).

4.3.4.19 NB7-2

Der NB7-2-Zellklon besteht aus acht bis 15 Interneuronen, die im intermediären bis lateralen Neuropilbereich liegen. Dorso-ventral erstrecken sie sich von intermediär bis an den ventralen Rand des Neuropils. Ipsilateral projizieren sie lateral lokal nach anterior und medial intersegmental nach posterior. Ein einzelnes Faszikel wächst nach kontralateral aus, erstreckt sich dort bis in den lateralen Neuropilbereich und bifurkiert (siehe Grafik in Abb. 4.37; Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999).

Auf Grund dieser Kriterien ließ sich unter den Transplantationspräparaten ein NB7-2-Zellstammbaum identifizieren (siehe Abb. 4.37A). Leider hat in diesem Fall die SYN-Antikörperfärbung nicht funktioniert, weshalb nur die Morphologie des Klons beschrieben werden kann. Da nur ein Klon identifiziert wurde, kann diese Beschreibung des Zellstammbaums nur vorläufiger Natur sein. Diese Daten können sich als nützlich für die Identifizierung weiterer NB7-2-Klone in zukünftigen Experimenten erweisen, müssen unter Umständen aber ergänzt oder revidiert werden.

4.3.4.20 NB7-4

Der NB7-4-Zellklon besteht aus acht bis zwölf Interneuronen und fünf bis sechs glialen Zellen. Besonders auffällig an NB7-4-Zellklonen ist die Channel-Glia, zwei Gliazellen, deren Zellkörper sich dorsal bzw. ventral auf dem Kortex befinden und deren Fortsätze über den Dorsoventral-Kanal miteinander in Kontakt treten (Schmidt et al., 1997). Des weiteren finden sich Cellbody-Glia, Gliazellen, die Zellkörper umschließen und Laterale Subperineurial-Glia, die lateral dem Kortex aufliegt. Die Interneurone des NB7-4 Zellklons liegen lateral bis intermediär im dorsalen Bereich des Kortex. Sie projizieren ipsilateral medial bis intermediär lokal nach anterior. Ein prominentes transversales Faszikel überquert die Mittellinie und bifurkiert im

Abb. 4.37 Beschreibung eines spätembryonalen NB7-2-Zellstammbaums

Grafik: schematische Darstellung eines NB7-2-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Bossing et al., 1996)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB7-2-Zellstammbaum noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitragen (vergleiche entsprechende Symbole in A).

A: Spätembryonaler NB7-2-Zellstammbaum. Dorsale Aufsicht, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils und dazwischen den Verlauf der Mittellinie.

Das Projektionsmuster stimmt größtenteils mit dem im Stadium 16 beobachteten überein. Ipsilateral findet sich eine laterale lokale Projektion nach anterior und eine mediale intersegmentale Projektion nach posterior (schwarze Pfeile). Ein transversales Faszikel verläuft bis in den lateralen Bereich des kontralateralen Konnektivs und projiziert dann longitudinal nach posterior (schwarzer Pfeilkopf).

Änderungen gegenüber dem frühen Stadium 17 zeigen sich auf der ipsilateralen Seite in einer medialen lokalen Projektion nach anterior und mehreren lateralen bis intermediären intersegmentalen Projektion nach posterior (weiße Pfeile). Auf der kontralateralen Seite zeigen sich außerdem noch eine intersegmentale Projektion die medial nach posterior weist und eine laterale lokale Projektion nach anterior (weiße Pfeilköpfe).

Abb. 4.38 Beschreibung eines spätembryonalen NB7-4-Zellstammbaums

Grafik: schematische Darstellung eines NB7-4-Zellstammbaums im Stadium 16 (nach Schmidt et al., 1997)(; mit freundlicher Genehmigung von C. Rickert). Dorsale Aufsicht, anterior links. Symbole verweisen auf Strukturen, die auch in dem spätembryonalen NB7-2-Zellstammbaum noch nachgewiesen werden konnten und deshalb zu dessen Identifizierung beitragen (vergleiche entsprechende Symbole in A).

A, A': Spätembryonaler NB7-4-Zellstammbaum. A: Dorsale Aufsicht, anterior links. A': laterale Aufsicht, dorsal oben, anterior links. Antikörperfärbung gegen mCD8 (grün), SYN (magenta). Weiße unterbrochene Linien kennzeichnen in etwa die äußeren Grenzen des Neuropils (A, A') und dazwischen die Mittellinie (A). Neuriten mit Output-Synapsen sind durch weiße Pfeilsymbole Neuriten ohne Output-Synapsen sind durch schwarze Pfeilsymbole gekennzeichnet. Weiße gebogene Pfeile: Channel-Glia.

Ipsilateral und kontralateral sind zahlreiche intersegmentale Projektionen nach anterior zu erkennen, die alle SYN-Punkte aufweisen (weiße Pfeilköpfe). Nach posterior sind mehrer lokale, ebenfalls SYN-positive Projektionen zu sehen (weiße Pfeile). Ventral findet sich im ipsilateralen Konnektiv eine längere, intersegmentale Projektion, die kein SYN aufweist (schwarzer Pfeil).

Abb. 4.37

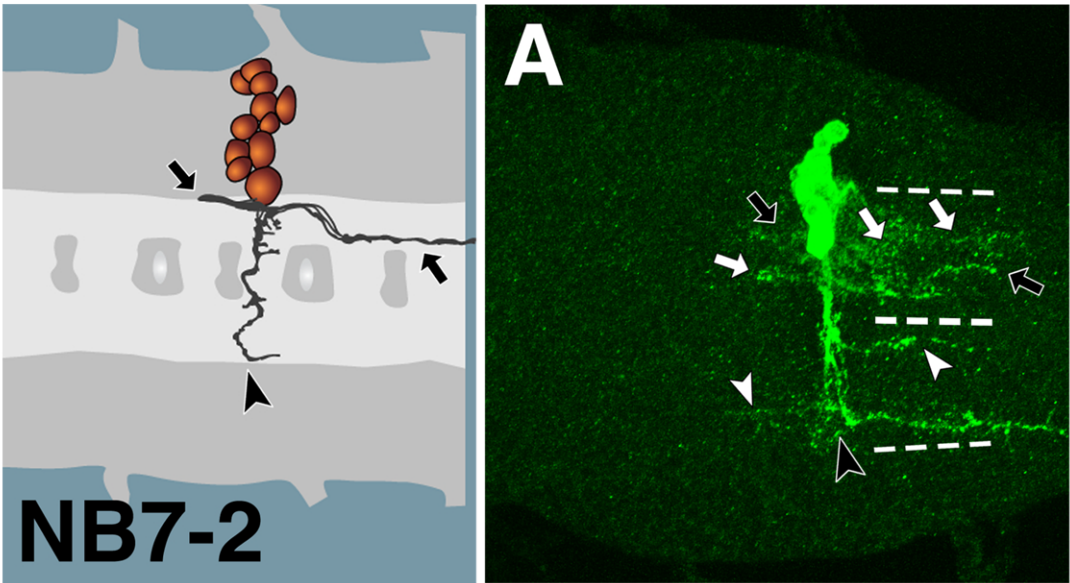
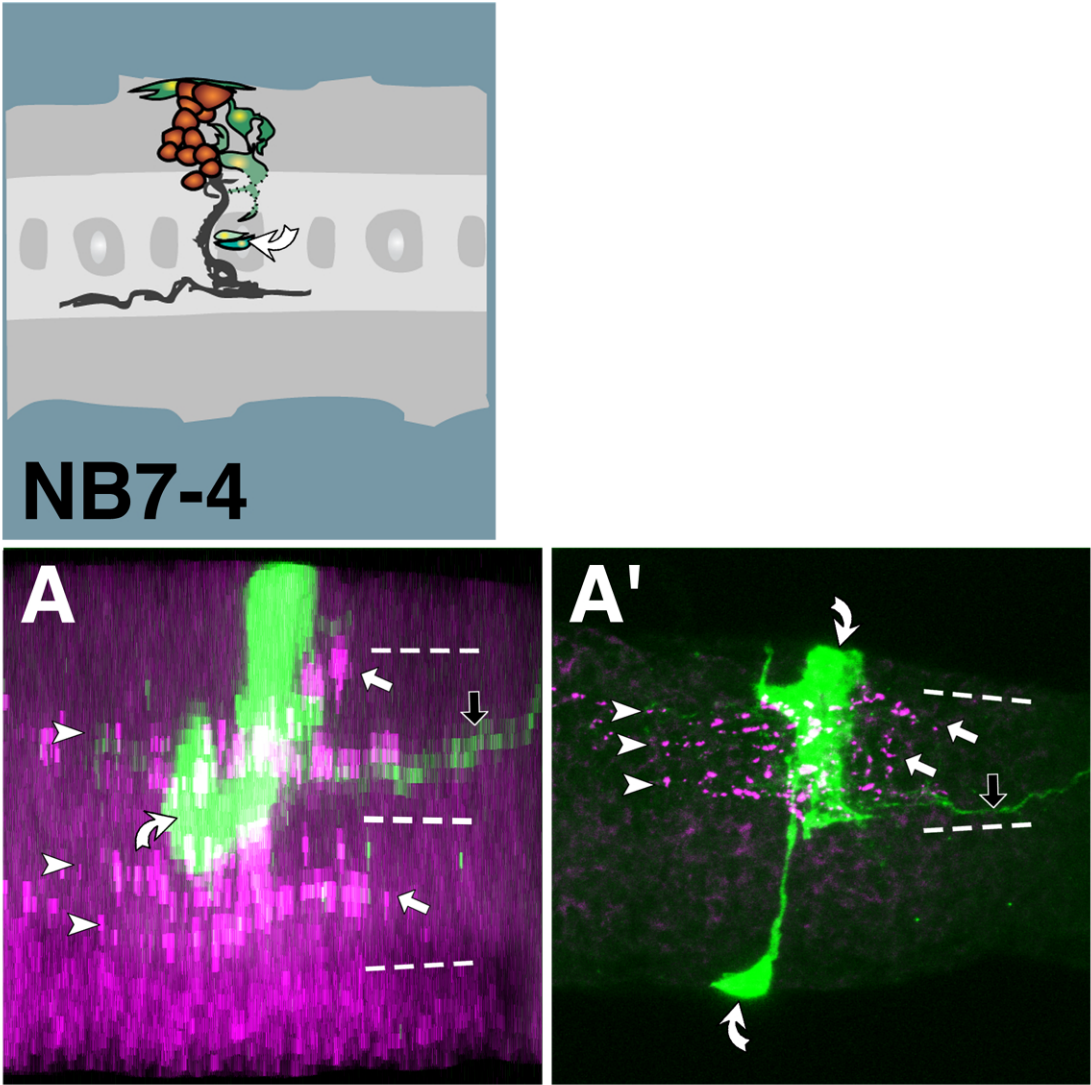


Abb. 4.38



intermediären bis lateralen Bereich des kontralateralen Neuropils intersegmental nach anterior und posterior (siehe Grafik in Abb. 4.38; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997).

Hauptsächlich über das Vorhandensein der Channel-Glia, die mit ihren im Bereich der Mittellinie das Bauchmark durchquerenden Fortsätzen unverwechselbar sind, wurde unter den Transplantationspräparaten ein NB7-4-Zellstammbaum identifiziert. Wie weiter oben schon ausgeführt kann die Beschreibung des NB7-4-Zellklons (siehe Abb. 4.38A und Text dazu) deshalb nur vorläufiger Natur sein. Diese Daten können sich als nützlich für die Identifizierung weiterer NB7-4-Zellklone in zukünftigen Experimenten erweisen, müssen unter Umständen aber ergänzt oder revidiert werden.

5 Diskussion

5.1 In *Drosophila* sind Output-Synapsen auf Neuriten von zentral-nervösen Neuronen kompartmentiert.

Das „typische“ Insektenneuron hat nur eine Projektion und wird dementsprechend als uni- oder monopolar bezeichnet. Aus dieser primären Projektion gehen meist zahlreiche Seitenäste hervor. Ein generelles Schema für die Verteilung von Out- und Input-Synapsen auf den Projektionen von Invertebraten-Neuronen konnte bisher nicht gegeben werden (zusammengefasst in Burrows, 1996). In dieser Arbeit wird das erste mal gezeigt, dass Output-Synapsen im Zentralen Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* auf spezifische Kompartimente von Neuriten beschränkt sind und einer reproduzierbaren Verteilung unterliegen. Die präsentierten Ergebnisse geben Grund zu der Vermutung, dass die Neuriten der ZNS-Neurone mindestens drei unterschiedliche Kompartimente aufweisen: Erstens primäre Neuriten, auf denen sich keine Output-Synapsen befinden, zweitens Seitenneurite, die präsynaptisch spezialisierte Regionen aufweisen und drittens Seitenneurite von vermutlich rein postsynaptischer Natur.

Wir vermuten, dass es sich bei den primären, meist transversal verlaufenden Neuriten um hauptsächlich als Transportwege genutzte Projektionen handelt. Dafür sprechen unsere Beobachtungen mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems. Wenn wir UAS-Konstrukte synaptischer Proteine in *even-skipped^{RRK}-Gal4* (*eve^{RRK}-Gal4*) oder *apterous-Gal4* (*ap-Gal4*) exprimierten, konnten wir diese Proteine in allen Fällen in den primären Neuriten der entsprechenden Neurone nachweisen (siehe 4.2.3; Abb. 4.5; Abb. 4.6). Dies ist wahrscheinlich auf die Überproduktion von GAL4-abhängigem Protein zurückzuführen, die zu Akkumulationen auf den Transportwegen führt.

Auch im ZNS von größeren Arthropoden, wie der Heuschrecke *Schistocerca*, dem Hummer und dem Blutegel, sind primäre Neuriten größtenteils frei von Synapsen. In diesen Arthropoden sind primäre Neuriten häufig von Glia ummantelt und/oder sie verlaufen in Faszikeln mit zahlreichen primären Neuriten anderer Neurone (siehe u.a.; Burrows, 1996; King, 1976; Muller und McMahan, 1976). Allerdings gibt es auch Beispiele für primäre Neuriten in *Schistocerca* und Flusskrebs, die sowohl Input- als auch Output-Synapsen tragen. Diese primären Neuriten faszikulieren nicht mit anderen sind aber teilweise von Glia ummantelt. Der

Anteil der ummantelten Oberfläche ist dabei umgekehrt proportional zur Menge an vorhandenen Synapsen (Killmann et al., 1999; Kondoh und Hisada, 1986). In *Drosophila* gibt es solche Glia-Ummantelungen innerhalb des ZNS nicht, aber die meisten primären Neuriten verlaufen zu mehreren in gemeinsamen Faszikeln. Dieser Umstand lässt uns vermuten, dass sich auch keine oder nur wenige Input-Synapsen auf den primären Neuriten von *Drosophila* finden, denn innerhalb dieser Faszikel hat der größte Teil ihrer Oberfläche nur Kontakt mit anderen primären Neuriten. Input-Synapsen in dem einen primären Neuriten hätten dann aber zwangsweise Output-Synapsen im benachbarten primären Neuriten zur Folge.

Uns sind keine Arbeiten bekannt, die zeigen, dass eine Kompartimentierung entlang der Axone/nichtdendritischen Neuriten von Vertebraten-Neuronen stattfindet (Peters et al., 1991), obwohl man vermuten könnte, dass dies der Fall ist. Zum Beispiel projizieren Parallelfasern im Cerebellum zunächst durch die Purkinje-Zellschicht, man könnte jedoch vermuten, dass sie Output-Synapsen erst dann formen, wenn sie die Molekularschicht erreichen. Andererseits zeigen Hippocampus-Neurone in Zellkultur keine offensichtliche Kompartimentierung ihrer Output-Synapsen (siehe z. Bsp. Rao et al., 2000), dies mag allerdings nicht der Situation im intakten Nervengewebe entsprechen.

Präsynaptisch spezialisierte Regionen beobachteten wir fast ausschließlich auf Neuriten, die entweder in longitudinalen Faszikeln liegen oder lokale Verzweigungen ausbilden. Auf den lokalen Verzweigungen liegen die Output-Synapsen immer sehr dicht beieinander (siehe z. Bsp. weiße gebogene Pfeile in Abb. 4.23 und Abb. 4.32), während auf den longitudinalen Neuriten größere Abstände zwischen einzelnen Output-Synapsen auftreten können (siehe z. Bsp. weiße Pfeilköpfe in Abb. 4.32). Nach unseren Beobachtungen liegen die an longitudinalen Neuriten beobachteten Output-Synapsen direkt auf diesen Neuriten. Wir können aber nicht ausschließen, dass sie auf von diesen Neuriten abgehenden, sehr kurzen Fortsätzen, sogenannten Dornen, lokalisieren, deren Darstellung mit den von uns verwendeten Methoden nicht möglich ist. In der Heuschrecke *Schistocerca*, wurden dank intensiver elektronenmikroskopischer Untersuchungen schon zahlreiche innerhalb des ZNS verlaufende Insektenneuriten beschrieben. Darunter waren einige Neuriten, bei denen präsynaptische Spezialisierungen überwiegen (siehe z. Bsp. Watson und Burrows, 1985), aber rein präsynaptische Neuriten wurden unseres Wissens nach bisher nicht gefunden (siehe u.a. Burrows, 1996). Da uns ein geeigneter

postsynaptischer Marker für Transplantationsexperiment bisher nicht zur Verfügung steht, bleibt offen, ob die von uns in *Drosophila* beobachteten Output-Synapsen auf rein präsynaptischen Neuriten liegen oder ob sich in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft auch Input-Synapsen befinden.

Schon die UAS/Gal4-Experimente gaben Anlass zu der Vermutung, dass es rein postsynaptische Neuriten gibt. In *ap-Gal4* waren ektopisch exprimierte präsynaptische Proteine nicht in intermediär und lateral gelegenen longitudinalen Seitenneuriten zu finden (siehe Abb. 4.5E und Abb. 4.6H, I). Wir benutzten zusätzlich den Marker TAU, von dem aus Vertebraten bekannt ist, dass er sich bevorzugt in den postsynaptischen Dendriten findet und stellten fest, dass er zwar in den lateralen, aber nicht in den intermediären Neuriten nachweisbar ist (Abb. 4.9A - B"). Dies veranlasst uns zu der Vermutung, dass es sich zumindest bei den intermediären Seitenneuriten in *ap-Gal4* um rein postsynaptische Strukturen handelt. Wesentlich offensichtlicher waren die Ergebnisse der UAS/Gal4-Experimente in *eve^{RRK}-Gal4*. Während in L3-Larven ektopisch exprimiertes SYNAPTOTAGMIN (SYT) und SYNAPSIN (SYN) an der Neuromuskulären Verbindung (NMJ, vom Englischen **neuromuscular junction**) des Motorneurons aCC nachweisbar ist (Prokop, pers. Mitteilung), findet sich keine Spur davon auf den zahlreichen Seitenneuriten, die innerhalb des Neuropils aus der motorneuronalen Projektion hervorgehen (Abb. 4.6E, F). Die daraus resultierende Vermutung, dass diese Seitenäste rein postsynaptisch sind, wurde vor allem durch die Ergebnisse der Transplantationsexperimente bestätigt. Im Gegensatz zu den UAS/Gal4-Experimenten, bei denen wir ektopisch synaptische Marker exprimierten, beobachteten wir bei den Transplantationen das intrinsische Muster von Synapsen. Dies zeigte uns im Falle des NB1-1-Zellstammbaums, dass sich auf den Seitenneuriten von aCC keine Output-Synapsen befinden. Diese Beobachtung ist jedoch nicht auf aCC beschränkt. Auch auf den Seitenneuriten anderer Motorneurone fanden wir bei den Transplantationspräparaten keine Output-Synapsen (siehe 5.2).

Auch in allen anderen NB-Zellklonen beobachteten wir Neuriten, die vermutlich von rein postsynaptischer Natur sind. Es handelte sich dabei um meist intersegmental verlaufende longitudinale Neuriten (siehe z. Bsp. schwarze Pfeile in Abb. 4.32), um sich häufig fächerartig verteilende Gruppen lokaler Seitenäste (siehe z. Bsp. schwarze Pfeilköpfe in Abb. 4.27 und Abb. 4.35) oder um von longitudinalen

intersegmentalen Neuriten abgehende diagonal oder transversal verlaufende Seitenäste (siehe z. Bsp. schwarze Sterne in Abb. 4.32). Einige der von uns beobachteten rein postsynaptischen Neuriten im *Drosophila* ZNS haben zahlreiche Eigenschaften mit Dendriten von Vertebraten gemeinsam (siehe 5.2). Rein postsynaptische Neuriten wurden auch schon in anderen Insekten, wie zum Beispiel *Schistocerca* und der Fliege *Calliphora erythrocephala* beschrieben (Burrows, 1996; Gauck et al., 1997; Killmann et al., 1999).

Bisher konnte Kompartimentierung von Neuriten nur in repetitiv organisierten neuronalen Geweben beobachtet werden. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass in den optischen Loben von *Drosophila* primäre Neuriten frei von Output-Synapsen sind, wenn sie durch die Synapsen-freie Region zwischen Lamina, Medulla und Lobula projizieren (Hiesinger et al., 1999; Meinertzhagen und Sorra, 2001). Ebenso sind die Output-Synapsen auf den efferenten Projektionen von Motorneuronen auf die NMJ beschränkt. Ob es solche Kompartimentierung von Neuriten auch in nicht so auffällig repetitiv organisierten Geweben gibt, war bisher unklar. Die hier vorgelegte Arbeit zeigt zum ersten Mal und anhand individueller Projektionen, dass Neuronen im Bauchmark von *Drosophila* ihre Neuriten kompartimentieren.

5.2 Seitenäste efferenter Neuronen im *Drosophila* Bauchmark sind homolog oder analog zu Dendriten von Vertebraten

Einer der offensichtlichsten Unterschiede zwischen Vertebraten- und Invertebraten-Neuronen zeigt sich in der Morphologie ihrer Projektionen. Vom Zellkörper des „typischen“ Vertebratenneurons gehen zwei oder mehr Projektion aus. Man spricht deshalb von bi- oder multipolaren Zellen. Eine von diesen Projektionen ist das, bei sensorischen und Motorneuronen von Gliazellen ummantelte Axon, das auch Seitenäste ausbilden kann. An den terminalen Verzweigungen des Axons und seiner Seitenäste finden sich in der Regel hauptsächlich präsynaptische Spezialisierungen. Die anderen vom Zellkörper ausgehenden Projektionen werden als Dendriten bezeichnet. Sie gehen meist in zahlreiche feine Verzweigungen über, an denen die meisten Signaleingänge von anderen Neuronen empfangen werden (zusammengefasst in Kandel et al., 1996). Dendriten sind überwiegend von rein postsynaptischer Struktur (Craig und Banker, 1994).

Bisherige Untersuchungen an Motorneuronen der Heuschrecke *Schistocerca* konnten auf diesen keine einheitliche Verteilung von Synapsen feststellen. Erwartungsgemäß ist die terminale Endigung der efferenten Projektion bisher immer als rein präsynaptisch beschrieben worden, auf ihrem in den Ganglien befindlichen Abschnitt wurden allerdings auch Input-Synapsen gefunden (siehe z. Bsp. Watson et al., 1985). Die von den efferenten Projektionen innerhalb der Ganglien abgehenden Seitenäste trugen in manchen Fällen Output- und Input-Synapsen (Watson und Burrows, 1982) in anderen Fällen nur Input-Synapsen (Watson et al., 1985). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in *Drosophila* die meisten, wenn nicht alle Seitenneuriten larvaler Motorneuronen nicht präsynaptisch aber vermutlich postsynaptisch sind.

Bei unseren UAS/Gal4-Experimenten mit *eve^{RRK}-Gal4*-Fliegen konnten wir in Bauchmarks von L3-Larven beobachten, dass der präsynaptische Marker SYT nicht in den Seitenneuriten des aCC-Motorneurons lokalisiert (Abb. 4.6E, F). Des Weiteren war das Mikrotubuli-assoziierte Protein TAU, das zumindest in Vertebraten-Neuronen nur in präsynaptischen Neuriten exprimiert wird, von den aCC-Seitenneuriten ausgeschlossen (Abb. 4.9 C). Die daraus resultierende Vermutung, dass die Seitenneurite von aCC keine Output-Synapsen tragen, wurde von den Ergebnissen der Transplantationsexperimente bestätigt: Die Seitenneuriten von aCC zeigten in unseren NB1-1-Zellklonen keine Expression des präsynaptischen Markers SYN (Abb. 4.17). Die Transplantationsexperimente erlaubten uns außerdem zu zeigen, dass dies auch für die Seitenneuriten aller anderen efferenten Neurone gilt, die von uns im Rahmen dieser Versuche eingehend analysiert werden konnten (siehe 4.3.2.4). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Seitenneuriten von aCC haben inzwischen auch bestätigt, dass sich Input-Synapsen auf diesen Strukturen finden (R.A. Baines, unveröffentlicht). Also sind die Seitenneuriten der meisten efferenten Projektionen von *Drosophila*-Neuronen mit großer Sicherheit postsynaptisch. Diese Eigenschaft haben sie mit den Dendriten von Vertebraten-Neuronen gemeinsam.

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Dendriten und den Seitenneuriten efferenter Projektionen in *Drosophila* ergibt sich, wenn man den Zeitpunkt ihrer Entstehung betrachtet. Während im Stadium 16 die efferenten Projektionen der *Drosophila*-Motorneurone schon ihre Zielmuskeln kontaktieren, sind nur vereinzelte, kaum verzweigte Seitenneuriten innerhalb des Neuropils zu beobachten (Landgraf et

al., 1997). Im späten Stadium 17 konnten wir aber an den meisten efferenten Projektionen innerhalb des Bauchmarks zahlreiche, sich auffällig verzweigende Seitenneuriten feststellen (siehe 4.3.2.4). Dies bedeutet, dass sich die Seitenneuriten später ausdifferenzieren, als die primäre, efferente Projektion. Auch Vertebraten-Dendriten entwickeln sich später als die axonale Projektion (Craig und Banker, 1994).

Weitere Kriterien, über die in Vertebraten Dendriten von Axonen abgegrenzt werden sind die differentielle Verteilung von **Mikrotubuli-assoziierten Proteinen** (MAPs; Craig und Banker, 1994).

Das MAP TAU lokalisiert in Vertebraten-Neuronen nur im Axon aber nicht in den Dendriten. Unsere Experimente haben schon gezeigt, dass ektopisch in *Drosophila* exprimiertes TAU zumindest im aCC-Motorneuron nur im primären Neuriten und nicht in den Seitenneuriten lokalisiert (s.o.). Genau die gleiche Verteilung von TAU wurde in den Projektionen der Motorneurone der *DDC*- und *VUM-Gal4*-Linien festgestellt (Prokop, unveröffentlicht).

Ein weiteres Protein, von dem wir eine differenzierte Verteilung auf post- und präsynaptische Neuriten erwarteten war HOMER. Diagana et al. (Diagana et al., 2002) hatten beschrieben, dass sich HOMER spezifisch in den Seitenneuriten von aCC findet und deshalb vermutlich nur in postsynaptischen Neuriten lokalisiert. Wir konnten diese Beobachtung nicht bestätigen. In *eve^{RRK}-Gal4* konnten wir HOMER in allen Kompartimenten von aCC feststellen. Auch in den anderen von uns getesteten *Gal4*-Linien war keine spezifische Lokalisation zu beobachten (siehe 4.2.4.1). Insbesondere stellten wir HOMER in der NMJ fest (Abb. 4.8). Dies ist allerdings nicht verwunderlich, denn die NMJs in *Drosophila* sind glutamaterg und HOMER ist in Vertebraten an der Lokalisierung metabotrober Glutamatrezeptoren beteiligt (Naisbitt et al., 1999).

Die Seitenäste efferenter Neurone im *Drosophila* Bauchmark erfüllen also zahlreiche Kriterien, die in Vertebraten zur Charakterisierung von Dendriten verwendet werden. Umgekehrt erfüllt auch das Axon der efferenten *Drosophila*-Neurone zahlreiche Kriterien von Vertebraten-Axonon. Wir vermuten deshalb, dass die Seitenneuriten der efferenten *Drosophila*-Neurone homolog oder analog zu Vertebraten-Dendriten und die primären Axone homolog oder analog zu Vertebraten-Axonon sind.

Diese Beobachtungen haben auch Auswirkungen auf unser Verständnis zur Funktion von Motorneuronen im ZNS von *Drosophila*. Es könnte sein, dass motorneuronalen Seitenneuriten in Analogie zu Dendriten bei Vertebraten als reine Input-Regionen fungieren. Demnach wären Motorneurone reine Integratoren zentraler Information und Übermittler in die Peripherie. Innerhalb des ZNS würde ihnen daher keine regulierende Funktion zukommen. Eine Frage, die sich dabei stellt, ist ob Motorneurone auch direkt auf von sensorischen Neuronen übertragene Reize reagieren, oder ob es noch zwischengeschaltete Interneurone gibt. Detaillierte Untersuchungen der Projektionsmuster sensorischer Neurone haben gezeigt, dass die meisten Mechanorezeptoren und die Neurone des Chordotonalorgans (Propriorezeptoren) mit ihren Fortsätzen ins ventrale Neuropil projizieren (Schrader und Merritt, 2000). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass motorneuronalen Reaktionen auf die Aktivität dieser sensorischen Neuronen indirekt erfolgt, denn die zentralnervösen Seitenneuriten der Motorneurone befinden sich in den meisten der von uns analysierten Fälle im dorsalen Neuropil. Nur drei Gruppen sensorische Neurone pro Segment projizieren direkt ins dorsale Neuropil (vpda, dbd und vbd; siehe Schrader und Merritt, 2000). Bei ihnen handelt es sich um multidendritische Zellen, die als Hitzesensoren dienen. Diese sensorischen Neurone könnten also auf motorneuronalen Seitenneuriten projizieren.

Auch bei Interneuronen konnten wir Neuriten beobachten, die vermutlich rein postsynaptisch sind (siehe 5.1). Zumindest in *ap-Gal4*-Neuronen konnten wir zusätzlich beobachten, dass TAU von manchen Neuriten ausgeschlossen ist. Dies spricht dafür, dass auch einige interneuronale Neuriten in *Drosophila* homolog oder analog zu Vertebraten-Dendriten sind. Eine Aussage über präsynaptische interneuronale Neuriten können wir noch nicht machen, da noch nicht geklärt ist, ob es überhaupt rein präsynaptische Neuriten im *Drosophila*-ZNS gibt (siehe 5.1).

5.3 Vor- und Nachteile der verwendeten Markierungs-Strategien

Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Beschreibungen zu liefern, auf deren Basis das embryonale Bauchmark von *Drosophila* als Modellsystem für Untersuchungen der Entwicklung von ZNS-Synapsen etabliert werden kann. Zu diesem Zweck wollten

wir einzelne oder kleine Gruppen von Synapsen individueller Neurone identifizierbar machen. Dazu verwendeten wir zwei verschiedene Ansätze, die beide auf der Analyse genetischer Mosaik beruhen.

Zum einen modifizierten wir die Technik der Einzelzelltransplantation (Prokop und Technau, 1993) in Bezug auf die Genotypen von Spender- und Wirtsembryonen sowie den Zeitpunkt der klonalen Analyse. Der Kernpunkte dieses Ansatzes ist es, Wirtsembryonen zu benutzen, die homozygot mutant für ein oder mehrere präsynaptische Proteine ist, wie zum Beispiel SYN und/oder SYT. Transplantiert man in dieses Wirtstier einen Neuroblasten (NB) aus einem wildtypischen Spenderembryo, entwickelt sich ein neuraler Zellklon. Nur in dessen Zellen werden im Wirtstier SYN und SYT exprimiert. Über Antikörperfärbungen können diese Proteine auf den Transplantationsklonen sichtbar gemacht werden. Dadurch erhält man eine Darstellung der intrinsischen Expression und Verteilung der präsynaptischen Proteine. Man ist also bei dieser Methode weder von ektopischer Expression (wie z. Bsp. über das UAS/Gal4-System) abhängig, noch benötigt man Konstrukte präsynaptischer Proteine, an die ein Markerprotein fusioniert ist um sie von intrinsischem Protein zu unterscheiden. Eine solche Art von Mosaikanalyse ist mit genetischen Rekombinations-Methoden klonaler Analyse nicht möglich, denn diese erfordern einen heterozygoten Hintergrund (wie z. Bsp. die MARCM-Technik; Lee, 1999).

Unsere modifizierte Transplantationstechnik kann auf verschiedene Art und Weise für weitere Forschung eingesetzt werden. Den Nutzen zur Darstellung und Beschreibung von Output-Synapsen haben wir in dieser Arbeit bereits deutlich gemacht (siehe 4.3).

Wie wir schon im Falle von *kakapo* (*kak*) gezeigt haben (siehe 4.3.3), können entweder Spender- oder Wirtsembryonen Mutationen potentiell synaptogenetisch aktiver Gene tragen. Dies würde erstens ermöglichen Effekte dieser Mutationen auf die Lokalisation von Synapsen darzustellen und zweitens könnte man gleichzeitig feststellen, ob diese Gene bei der Synaptogenese eine intrinsische (zellautonome) oder extrinsische (signalabhängige) Rolle spielen. Man kann auch ein Gen von Interesse im Spender- oder Wirtsembryo über- oder fehlexprimieren und dadurch die Funktion dieses Gens genauer studieren.

Wie frühere Transplantationsexperimente schon gezeigt haben, ist die Anwendung dieser Technik nicht auf ein bestimmtes Stadium beschränkt (Prokop

und Technau, 1991). Das bedeutet, dass man die Entwicklung synaptischer Muster in *Drosophila* vom späten Embryo bis zum 3. Larvalstadium beobachten und analysieren kann. Außerdem ist die Methode auch nicht auf die Analyse synaptischer Gene beschränkt. Die Lokalisation oder Zellspezifität jedes neuronalen Gens kann damit getestet werden, vorausgesetzt, es gibt gute Antikörper und es existieren mutante Allele des Gens, die dazu führen, dass in den Wirtsembryonen kein Antigen mehr vorhanden ist. Dabei ist es unerlässlich, dass diese Mutationen möglichst keinen oder nur einen schwachen Phänotyp im Wirtstier verursachen.

Ein Nachteil der Transplantationsmethode liegt in der Zufälligkeit der transplantierten NBs. Diese kann man nur einschränken, indem man den dorso-ventralen Anteil des Neuroektoderms beschränkt, aus dem die Zellen entnommen werden. Zum Beispiel wurden in dieser Arbeit versucht nur Zellen aus dem ventromedianen Anteil des Neuroektoderms zu entnehmen. Wurde ein Zellstammbaum allerdings erste einmal identifiziert und beschrieben, kann er als Vergleichsvorlage für weitere Studien dienen, wie von uns schon erfolgreich bei der Analyse *kak*-mutanter Zellklone demonstriert. Weitere Nachteile dieser Methode sind der relativ hohe Zeitaufwand und, dass deshalb kein hoher Massendurchsatz möglich ist.

Die auf dem UAS/Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993) basierende Strategie zur Darstellung von Synapsen beruht auf der gezielten Expression synaptischer Proteine in bestimmten Zellen. Dabei wurden synaptische Proteine benutzt, die mit einem Markermolekül fusioniert sind. Dies ermöglicht das Darstellen der betreffenden Proteine entweder durch Antikörperfärbung gegen das entsprechende Markermolekül (wie z. Bsp. HÄMAGGLUTININ (HA)), oder wie im Falle von GFP (**G**rünes **f**luoreszierendes **P**rotein) über die Eigenfluoreszenz des Markermoleküls. Die Stärke dieser Methode liegt in ihrer einfachen Anwendbarkeit und der großen Menge an Daten, die innerhalb von kurzer Zeit gewonnen werden kann (siehe z. Bsp. Ahmari et al., 2000; Blagburn et al., 1999; Ito et al., 1998; Vosshall et al., 2000). Die Methode ist ebenfalls nicht auf synaptische Proteine beschränkt. Wie wir schon für die Proteine TAU und HOMER demonstriert haben, kann man mit ihr die Lokalisation beliebiger Proteine in Neuriten studieren (4.2.4).

Einer der großen Nachteile der Mosaikanalyse mit dem UAS/Gal4-System ist die geringe Anzahl an vorhandenen Gal4-Linien, die im Embryo oder der Larve nur in

einer eng begrenzten Gruppe von Neuronen exprimieren. Neben der daraus resultierenden stark eingeschränkten Zahl an neuronalen Zellen, auf denen man die Verteilung neuritischer und synaptischer Proteine individuell beobachten kann, ergibt sich eine weitere Einschränkung. Ein Gal4-Konstrukt wird schließlich über den ihm vorgeschalteten intrinsisch kontrollierten Enhancer aktiviert. Geschieht dies nur in wenigen Neurone, dann unterscheiden sich diese Neuronen in ihrer Genexpression offensichtlich vom Grossteil aller anderen Neuronen. So sind zum Beispiel die *ap-Gal4*-Neurone peptiderg und spezifisch für das Neuropeptid FMRF (Benveniste et al., 1998). Dies würde aber gleichzeitig bedeuten, dass man über die Gal4-Stämme nur die Verteilung von Proteinen in auf Grund ihrer Genexpression „besonderen“ Neuronen betrachtet. Das „typische“ Neuron, in dem eine standardisierte neuronale Genexpression stattfindet, bliebe in diesem Fall außen vor und man könnte nicht sicher sein, ob sich die Ergebnisse der Sonderfälle generalisieren lassen.

Neben diesem Problem sind wir in unseren Experimenten noch auf eine weitere Schwierigkeit gestoßen, die sich bei der Expression synaptischer Proteine ergibt, nämlich das häufige Auftreten extrasynaptischer Färbung. So konnten wir synaptische Färbung auf Zellkörpern, auf primären Projektionen außerhalb des Neuropils und auf efferenten Projektionen beobachten (Abb. 4.5D, E; Abb. 4.6). im Gegensatz dazu sind intrinsisch regulierte synaptische Proteine auf das Neuropil und die NMJ beschränkt. Wir führen diesen Effekt darauf zurück, dass die ektopische Expression eines Proteins über das UAS/Gal4-System zu einer Überproduktion führt, denn die meisten Gal4-Treiber sind über einen längeren Zeitraum ständig aktiv. Zu dieser Überproduktion an ektopischem Protein kommt noch das vorhandene intrinsische Protein (wie z. Bsp. SYT-HA und SYT). Dies führt vermutlich dazu, dass sich ektopisches und vermutlich auch intrinsisches Protein im Zellkörper und auf den Transportwegen akkumuliert. Eine Möglichkeit, diese Überproduktion zu begrenzen bietet die Expression des UAS-Konstrukts in Tieren, die für das entsprechende synaptische Protein mutant sind. Beispielsweise ist bei Expression von *UAS-syn* in *syn*-mutanten *ap-Gal4*-Fliegen die ektopische Lokalisation von SYN in primären Neuriten der *ap*-Neurone stark reduziert (A. Prokop, unveröffentlicht).

Trotz der ektopischen Lokalisation synaptischer Proteine war es uns möglich, mit dieser Methode im Bauchmark von *ap-Gal4*-Larven potentielle post- bzw. präsynaptische Regionen zu identifizieren (siehe 4.2.3, 4.2.4). In L3-Larven von *UAS-SYT-HA/eve^{RRK}-Gal4* konnten wir auf den Seitenneuriten des Motorneurons

aCC keine Lokalisation des präsynaptischen SYT-HA Proteins feststellen (Abb. 4.6E, F). Wir vermuteten deshalb, dass diese Seitenneurite rein postsynaptisch sind. Diese Vermutung wurde dann von den Ergebnissen unserer Transplantationsexperimente bestätigt (siehe 4.3.2.3). Dies zeigt, dass sich das UAS/Gal4-System trotz der erwähnten Nachteile sinnvoll nutzen lässt und in Kombination mit genetischen oder experimentellen Manipulationen zur Untersuchung von Mutationen eingesetzt werden kann.

Die beiden in dieser Arbeit angewandten Strategien zur Darstellung von Synapsen im ZNS haben gegenüber bisher bei Insekten verwendeten Methoden eindeutige Vorteile. Zur Identifizierung post- und präsynaptischer Regionen auf zentralnervösen Insektenneuronen wurden bisher fast ausschließlich elektronenmikroskopische Methoden angewandt (siehe u.a. Gauck et al., 1997; Hardt und Watson, 1994; Killmann et al., 1999)(; zusammengefasst in Burrows, 1996). Der damit verbundene Arbeitsaufwand führt dazu, dass bisher nur einzelne, auf Grund auffälliger Projektion eindeutig identifizierbare Neurone untersucht wurden. Außerdem kann nur in Ausnahmefällen wirklich das gesamte Neuron mit all seinen Neuriten detailliert analysiert werden (Meinertzhagen, 1996). Auf Grund dessen wurden bisher meist nur Teilabschnitte von Neuriten untersucht und diese Beobachtungen auf das Gesamtneuron übertragen.

Unsere Methoden bieten nun erstmals die Möglichkeit, in einem Insekten-ZNS Synapsen auf jedem beliebigen Neuron und seinen vollständigen Fortsätzen lichtmikroskopisch darzustellen. Dabei ist der Arbeitsaufwand vergleichbar gering und bietet zusätzlich die Möglichkeit experimenteller und genetischer Manipulationen, um nicht nur die Wildtyp-Situation sondern auch mutante Phänotypen zu untersuchen. Im Rahmen unserer Versuche haben wir zahlreiche neuritische Regionen entdeckt, in denen Output-Synapsen in großer Anzahl und Dichte vorkommen. Dies könnten präferentiell präsynaptische Regionen sein, in denen aber auch Input-Synapsen liegen, wie sie schon für größere Insekten beschrieben worden sind (siehe z. Bsp. Watson und Burrows, 1985). Es könnte sich aber auch um bisher nicht beschriebene (s.o.), rein präsynaptische ZNS-Neuriten handeln. Mit Hilfe der Transplantationsmethode sollte sich diese Frage klären lassen, sobald geeignete postsynaptische Marker zur Verfügung stehen.

5.4 Welche Mechanismen könnten die Kompartimentierung bewirken?

Mechanismen, die an der Kompartimentierung von Output-Synapsen auf Neuriten beteiligt sind, müssen von intrazellulären Faktoren abhängig sein, die das Cytoskelett organisieren. In der NMJ von *Drosophila*-Motorneuronen wurde schon gezeigt, dass sich präsynaptische Strukturen auch in Abwesenheit der Zielzelle, in diesem Fall des Muskels, ausbilden können (Prokop et al., 1996). An der NMJ scheint KAK einen solchen Faktor zu repräsentieren, denn es gibt deutliche Hinweise, dass KAK zellautonom funktioniert (Lee, 1999; Prokop et al., 1996). Allerdings konnten wir für mutante *kak*-Allele, die zu einer Reduzierung synaptischer Kontakte an der NMJ führen, keine Auswirkungen auf Synaptogenese im ZNS nachweisen (4.3.3). Entweder werden im ZNS andere Faktoren benötigt, oder es werden dort andere Domänen des KAK-Proteins benötigt, die durch die von uns gewählten Mutationen nicht betroffen sind. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass KAK im ZNS für die Organisation von postsynaptischen Neuriten zuständig ist. So haben wir gezeigt, dass die motorneuronalen Seitenäste von RP3 mit Sicherheit postsynaptisch sind (siehe 4.3.2.4) und in früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass diese Seitenäste in *kak*-Mutanten reduziert sind (Prokop et al., 1998b). Weiter könnte es aber auch sein, dass KAK nur auf die Verteilung bestimmter synaptischer Komponenten Einfluss hat, während Synaptogenese im ZNS nicht generell betroffen ist. Dafür spricht die Tatsache, dass in anderen Untersuchungen beobachtet wurde, dass sich in *kak*-mutanten Bauchmarks die Verteilung von SYT verändert (Prokop, pers. Mitteilung).

In jedem Fall zeigen diese Ergebnisse, dass es Unterschiede zwischen den synaptogenetischen Mechanismen an der NMJ und im ZNS gibt. Diese Erkenntnis ist nicht so überraschend, weiß man doch, dass in *Drosophila* die meisten zentralnervösen Synapsen cholinerg oder GABAerg sind, während die NMJs glutamaterg sind (Johansen et al., 1989; Takagawa und Salvaterra, 1996)(; A. Prokop, unveröffentlicht). Auch von Vertebraten sind Unterschiede zwischen ZNS- und NMJ-Synaptogenese bekannt. So spielt AGRIN eine wichtige Rolle bei der Synaptogenese an NMJs bei Vertebraten. Im ZNS hatte das Fehlen von AGRIN aber keine Auswirkung auf die Differenzierung glutamaterger und GABAerger Synapsen (Serpinskaya et al., 1999).

Intrazelluläre, für die Verteilung von Synapsen bedeutende Komponenten könnten zumindest teilweise von extrazellulären Faktoren abhängig sein. Ähnliches ist von der axonalen Wegfindung her bekannt, in der extrinsische Faktoren für die Organisation des Cytoskeletts eine Rolle spielen (siehe z. Bsp. Atashi et al., 1992; Suter und Forscher, 2001). Es könnte also passieren, dass in Abwesenheit solcher Faktoren Synapsen gebildet werden aber falsch lokalisieren. Ein Beispiel für die Reaktion intrinsischer synaptogenetischer Mechanismen auf extrazelluläre Signale wurde bereits in Zellkultur von Hippocampus-Neuronen beschrieben: Axonale Vesikel, die verschiedene präsynaptische Proteine transportieren, akkumulieren an Stellen, wo das Axon mit Dendriten in Kontakt tritt und dort kommt es zur Ausbildung neuer Präsynapsen (Ahmari et al., 2000). Während die Kontakte zwischen Dendriten und Axonen in Zellkultur zufällig etabliert werden, könnten extrinsische Signale im ZNS nach exakten Schemata verteilt sein, so dass es zu reproduzierbaren neuronalen Verschaltungen in immer den gleichen Regionen kommt. Dies wäre eine Erklärung für die reproduzierbare Verteilung von Output-Synapsen, die wir beobachtet haben (siehe 4.3.2.1).

Eine Möglichkeit ist, dass Mechanismen, die zu einem früheren Zeitpunkt für die strukturierte Organisation des ZNS zuständig sind, auch Einfluss auf die Verteilung von Synapsen nehmen könnten. Zum Beispiel sind Zelloberflächenmoleküle, die bei der axonalen Wegfindung in *Drosophila* eine Rolle spielen, ebenfalls kompartimentiert (Goodman und Doe, 1993; Lin et al., 1994; Rajagopalan et al., 2000). Die Kompartimentierung von Output-Synapsen könnte den gleichen Mechanismen unterliegen, wie die Kompartimentierung solcher Zelloberflächenmoleküle.

5.5 Zukunftsperspektiven

Wir haben zwei Methoden präsentiert, mit deren Hilfe wir die Lokalisation von Synapsen auf Neuriten individueller Neurone darstellen können. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir die Verteilung von Output-Synapsen auf etwa der Hälfte aller neuralen Zellstammbäume des Bauchmarks von *Drosophila* detailliert beschrieben. Abgesehen davon, dass auch die restlichen Zellstammbäume noch auf diese Art und Weise analysiert werden können, bieten sich zahlreiche weitere Möglichkeiten, diese Methoden einzusetzen. Zunächst können verschiedene Faktoren modifiziert werden.

Dies betrifft zum einen die Wahl des Zelloberflächenmarkers (in dieser Arbeit mCD8) und der Gal4-Linie (in dieser Arbeit *tubP-Gal4*). Von größerer Bedeutung ist aber die Auswahl der Proteine, deren Verteilung analysiert werden kann (in dieser Arbeit SYN und SYT). Weitere präsynaptische oder spezifisch auf Neuriten kompartimentierte Proteine, können zusätzlich Einblicke in die Struktur von zentralnervösen Neuronen und ihren Fortsätzen geben. In unserer Arbeitsgruppe wird zur Zeit an der Möglichkeit gearbeitet, postsynaptische Proteine gezielt zu detektieren. Sobald ein solche Methode zur Verfügung steht, kann auch mit Untersuchungen zur Lokalisation von Input-Synapsen begonnen werden.

Wir haben gezeigt, dass die Verteilung von Output-Synapsen im Bauchmark von *Drosophila* auf Kompartimente beschränkt ist, und das Muster der Verteilung auf individuellen Neuriten einen hohen Wiedererkennungswert hat. Dies macht es möglich, die beiden Methoden relativ leicht zur Untersuchung von Mutationen zu verwenden. Für die Transplantationsmethode haben wir dies schon mit unserer Analyse zur Auswirkung von KAK auf Synaptogenese im ZNS gezeigt. Eine große Anzahl von weiteren Genen, die Auswirkungen auf Synaptogenese an der NMJ zeigen (Featherstone und Broadie, 2000; Prokop, 1999), könnte nun auch im ZNS auf ihre synaptogenetische Funktion getestet werden. Die Transplantationsmethode und die UAS/Gal4-Methode könnten interessante Einblicke ermöglichen, wenn mutierte Gene zwar eine Paralyse bei Embryonen oder Verhaltensänderungen bei Larven hervorrufen, an der NMJ jedoch keinen erkennbarer Phänotyp zeigen. Neben der Mutanten-Analyse ist es bei beiden Methoden auch möglich, die Funktion von interessanten Genen auch anhand von Über- oder Fehlexpression zu untersuchen. Die UAS/Gal4-Methode bietet außerdem die Möglichkeit, effiziente Screens nach den Auswirkungen von Mutationen durchzuführen. Dafür wäre es zunächst nötig, synaptische UAS-Konstrukte wie *UAS-Syt-HA* oder *UAS-n-Synaptobrevin-GFP* fest in *Gal4*-Linien einzukreuzen. In diesem Hintergrund ließen sich relativ leicht verschiedenste Mutationen hineinkreuzen. Die Auswirkungen dieser Mutationen könnten direkt über die Verteilung der synaptischen Proteinkonstrukte beobachtet werden. Im Falle von GFP als Marker, könnte dies sogar *in vivo* erfolgen.

Unsere modifizierten Methoden erlauben erstmals einen Einblick in die synaptische Struktur des ZNS und bieten die Möglichkeit genetischer und experimenteller Eingriffe in diese Struktur. Zusammen mit der schon länger etablierten Forschung an den Synapsen der NMJ von *Drosophila* ermöglichen wir

damit parallele Forschung zur zentralnervösen und zur peripheren Synaptogenese. Wir glauben, dass *Drosophila* damit ein Modellorganismus ist, der besonders effizient zur Analyse synaptogenetischer Mechanismen eingesetzt werden kann.

6 Referenzen

- Ahmari, S. E., Buchanan, J. und Smith, S. J.** (2000). Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat. Neurosci.* **3**, 445-451.
- Albright, T. D., Jessell, T. M., Kandel, E. R. und Posner, M. I.** (2000). Neural Science: A Century of Progress und the Mysteries that remain. *Cell/Neuron* **100/25**, S1-S55.
- Allen, M. J., Drummond, J. A. und Moffat, K. G.** (1998). Development of the giant fiber neuron of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* **297**, 519-531.
- Allen, M. J., Shan, X., Caruccio, P., Froggett, S. J., Moffat, K. G. und Murphey, R. K.** (1999). Targeted expression of truncated *glued* disrupts giant fiber synapse formation in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* **19**, 9374-9384.
- Allwardt, B. A., Lall, A. B., Brockerhoff, S. E. und Dowling, J. E.** (2001). Synapse formation is arrested in retinal photoreceptors of the zebrafish *nrc* mutant. *J. Neurosci.* **21**, 2330-2342.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. und Haydon, P. G.** (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**, 208-215.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila: a laboratory handbook* (two volumes). Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Atashi, J. R., Klinz, S. G., Ingraham, C. A., Matten, W. T., Schachner, M. und Manes, P. F.** (1992). Neural cell adhesion molecules modulate tyrosine phosphorylation of tubulin in nerve growth cone membranes. *Neuron* **8**, 831-842.
- Baines, R. A. und Bate, M.** (1998). Electrophysiological development of central neurons in the *Drosophila* embryo. *J. Neurosci.* **18**, 4673-4683.
- Baines, R. A., Robinson, S. G., Fujioka, M., Jaynes, J. B. und Bate, M.** (1999). Postsynaptic expression of tetanus toxin light chain blocks synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **9**, 1267-1270.
- Bate, C. M.** (1976). Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic und abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **35**, 107-123.
- Benveniste, R. J., Thor, S., Thomas, J. B. und Taghert, P. H.** (1998). Cell type specific regulation of the *Drosophila* *FMRF-NH2* neuropeptide gene by Apterous, a LIM homeodomain transcription factor. *Development* **125**, 4757-4765.
- Bier, E.** (1997). Anti-neural-inhibition: a conserved mechanism for neural induction. *Cell* **89**, 681-684.
- Blagburn, J. M., Alexopoulos, H., Davies, J. A. und Bacon, J. P.** (1999). Null mutation in *shaking-B* eliminates electrical, but not chemical, synapses in the *Drosophila* giant fiber system: a structural study. *Journal of Comparative Neurology* **404**, 449.
- Bossing, T. und Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* **120**, 1895-1906.

- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. und Technau, G. M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **179**, 41-64.
- Brand, A. und Perrimon, N.** (1993). Targetted gene expression as a means of altering cell fates und generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Broadie, K. S.** (2000). Electrophysiological approaches to the neuromusculature junction. In *Drosophila Protocols*, (ed. R. S. Hawley), pp. 273-295. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Broadie, K. S. und Bate, M.** (1993). Development of the embryonic neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **13**, 144-166.
- Broadie, K. S., Bellen, H. J., DiAntonio, A., Littleton, T. und Schwarz, T. L.** (1994). Absence of synaptotagmin disrupts excitation-secretion coupling during synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10727-10731.
- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. und Doe, C. Q.** (1995). New neuroblast markers und the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **53**, 393-402.
- Budnik, V. und Gramates, L. S.** (1999). Neuromuscular junctions in *Drosophila*. San Diego London Boston NewYork Sydney Tokyo Toronto: Academic Press.
- Burrows, M.** (1996). The neurobiology of an insect brain. Oxford New York Tokyo: Oxford Univ. Press.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. und Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-255.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin: Springer Verlag.
- Chiba, A. und Rose, D.** (1998). "Painting" the target: How local molecular cues define synaptic relationship. *Bioessays* **20**, 941-948.
- Chisholm, A. und Tessier-Lavigne, M.** (1999). Conservation und divergence of axon guidance mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 603-615.
- Craig, A. M. und Banker, G.** (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 267-310.
- Deitcher, D. L., Ueda, A., Stewart, B. A., Burgess, R. W., Kidokoro, Y. und Schwarz, T. L.** (1998). Distinct requirements for evoked und spontaneous release of neurotransmitter are revealed by mutations in the *Drosophila* gene *neuronal-synaptobrevin*. *J. Neurosci.* **18**, 2028-2039.
- Diagana, T. T., Thomas, U., Prokopenko, S. N., Xiao, B., Worley, P. F. und Thomas, J. B.** (2002). Mutation of *Drosophila* homer disrupts control of locomotor activity und behavioral plasticity. *J. Neurosci.* **22**, 428-436.
- Doe, C. Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts und ganglion mother cells in *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855-863.
- Doe, C. Q. und Goodman, C. S.** (1985). Early events in insect neurogenesis I. Development und segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev. Biol.* **111**, 193-205.
- Dunin-Borkowski, O. M. und Brown, N. H.** (1995). Mammalian CD2 is an effective heterologous marker of the cell surface in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **168**, 689-693.

- Featherstone, D. E. und Broadie, K.** (2000). Surprises from *Drosophila*: Genetic mechanisms of synaptic development und plasticity. *Brain Res. Bull.* **53**, 501-511.
- Garner, C. C., Zhai, R. G., Gundelfinger, E. D. und Ziv, N. E.** (2002). Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* **25**, 243-249.
- Gauck, V., Egelhaaf, M. und Borst, A.** (1997). Synapse distribution on VCH, an inhibitory, motion-sensitive interneuron in the fly visual system. *J. Comp. Neurol.* **381**, 489-499.
- Goldstein, L. S. B. und Fyrberg, E. A.** (1994). *Drosophila melanogaster*: Practical uses in cell und molecular biology. In *Methods in Cell Biology*, vol. 44 (ed. P. Matsudaira), pp. 755. San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto: Academic Press.
- Goodman, C. S. und Doe, C. Q.** (1993). Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In *The Development of Drosophila*, vol. 1 (ed. A. Martínez-Arias), pp. 1131-1206. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Greenspan, R. J.** (1997). Fly pushing: The theory und practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. und Technau, G. M.** (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation und maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317-332.
- Hardt, M. und Watson, A. H. D.** (1994). Distribution of synapses on two ascending interneurons carrying frequency-specific information in the auditory system of the cricket: evidence for GABAergic inputs. *J. Comp. Neurol.* **345**, 481-495.
- Harrelson, A. L. und Goodman, C. S.** (1988). Growth cone guidance in insects: fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* **242**, 700-708.
- Hiesinger, P. R., Reiter, C., Schau, H. und Fischbach, K.-F.** (1999). Neuropil pattern formation und regulation of cell adhesion molecules in *Drosophila* optic lobe development depend on Synaptobrevin. *J. Neurosci.* **19**, 7548-7556.
- Hummel, T., Krukkert, K., Roos, J., Davis, G. und Klämbt, C.** (2000). *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic und axonal development. *Neuron* **26**, 357-370.
- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A. und Schneuwly, S.** (1997). GAL4-responsive UAS-*tau* as a tool for studying the anatomy und development of the *Drosophila* central nervous system. *Cell Tissue Res.* **290**, 1-10.
- Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D. und Strausfeld, N. J.** (1998). The organization of extrinsic neurons und their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn. Mem.* **5**, 52-77.
- Ito, K., Urban, J. und Technau, G. M.** (1995). Distribution, classification und development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic und early larval ventral nerve chord. *Roux's Arch Dev Biol* **204**, 284-307.
- Jacobs, K., Todman, M. G., Allen, M. J., Davies, J. A. und Bacon, J. P.** (2000). Synaptogenesis in the giant-fibre system of *Drosophila*: interaction of the giant fibre und its major motorneuronal target. *Development* **127**, 5203-5212.

- Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1976). Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J. Physiol.* **262**, 189-214.
- Jan, Y., Jan, L. und Dennis, M.** (1977). Two mutations of synaptic transmission in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* **198**, 87-108.
- Johansen, J., Halpern, M. E., Johansen, K. und Keshishian, H.** (1989). Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *J. Neurosci.* **9**, 710-725.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. und Jessell, T. M. H.** (1996). Neurowissenschaften. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Keshishian, H., Broadie, K., Chiba, A. und Bate, M.** (1996). The *Drosophila* neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development und function. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 545-575.
- Killmann, F., Gras, H. und Schurmann, F.** (1999). Types, numbers und distribution of synapses on the dendritic tree of an identified visual interneuron in the brain of the locust. *Cell Tissue Res.* **296**, 645-665.
- King, D. G.** (1976). Organisation of crustacean neuropile. I. Patterns of synaptic connections in lobster stomatogastric ganglion. *J. Neurocytol.* **5**, 207-237.
- Klages, B. R., Heimbeck, G., Godenschwege, T. A., Hofbauer, A., Pflugfelder, G. O., Reifegerste, R., Reisch, D., Schaupp, M., Buchner, S. und Buchner, E.** (1996). Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **16**, 3154-3165.
- Kondoh, Y. und Hisada, M.** (1986). Distribution und ultrastructure of synapses on a premotor local nonspiking interneuron of the crayfish. *J. Comp. Neurol.* **254**, 259-270.
- Kopczynski, C. C., Davis, G. W. und Goodman, C. S.** (1996). A neural tetraspanin, encoded by *late bloomer*, that facilitates synapse formation. *Science* **271**, 1867-1870.
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G. M. und Bate, M.** (1997). The origin, location, und projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **17**, 9642-9655.
- Lee, S. H. und Sheng, M.** (2000). Development of neuron-neuron synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 125-131.
- Lee, T. a. L., L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461.
- Li, H., Chaney, S., Forte, M. und Hirsh, J.** (2000). Ectopic G-protein expression in dopamine und serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **10**, 211-214.
- Lidell, E. und Weeks, I.** (1996). Antikörpertechniken. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lin, D. M., Fetter, R. D., Kopczynski, C., Grenningloh, G. und Goodman, C. S.** (1994). Genetic analysis of Fasciclin II in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation, und altered fasciculation. *Neuron* **13**, 1055-1069.
- Lindsley, D. C. und Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto: Academic Press Inc.

- Littleton, J. T., Serano, T. L., Rubin, G. M., Ganetzky, B. und Chapman, E. R.** (1999). Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I und IV. *Nature* **400**, 757-760.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth und myoblast fusion. *Genes Dev.* **8**, 1787-1802.
- Meinertzhagen, I. A.** (1996). Ultrastructure und quantification of synapses in the insect nervous system. *J. Neurosci. Methods* **69**, 59-73.
- Meinertzhagen, I. A. und Sorra, K. E.** (2001). Synaptic organization in the fly's optic lamina: few cells, many synapses und divergent microcircuits. *Prog. Brain Res.* **131**, 53-69.
- Muller, K. J. und McMahan, U. J.** (1976). The shapes of sensory und motor neurones und the distribution of their synapses in ganglia of the leech: A study using intracellular injection of HRP. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)* **194**, 481-499.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F. und Sheng, M.** (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex und cortactin. *Neuron* **23**, 569-582.
- O'Keefe, D. D., Thor, S. und Thomas, J. B.** (1998). Function und specificity of LIM domains in *Drosophila* nervous system und wing development. *Development* **125**, 3915-3923.
- Pennetta, G., Wu, M. N. und Bellen, H. J.** (1999). Dissecting the molecular mechanisms of neurotransmitter release in *Drosophila*. In *Neurotransmitter release*, vol. 23, pp. 304-351. Oxford New York: Oxford University Press.
- Peters, A., Palay, S. L. und Webster, H. d.** (1991). The fine structure of the nervous system. 3rd. Edition. New York Oxford: Oxford University Press.
- Prokop, A.** (1999). Integrating Bits und Pieces - Synapse Structure und Formation in *Drosophila*. *Cell Tiss. Res.* **297**, 169-186.
- Prokop, A., Landgraf, M., Rushton, E., Broadie, K. und Bate, M.** (1996). Presynaptic development at the *Drosophila* neuromuscular junction: assembly und localization of presynaptic active zones. *Neuron* **17**, 617-626.
- Prokop, A., Martin-Bermudo, M. D., Bate, M. und Brown, N. H.** (1998a). Absence of PS integrins or laminin A affects extracellular adhesion, but not intracellular assembly, of hemiadherens und neuromuscular junctions in *Drosophila* embryos. *Dev Biol* **196**, 58-76.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development* **111**, 79-88.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1993). Cell transplantation. In: *Cellular interactions in development: A practical approach*, 33-57.
- Prokop, A., Uhler, J., Roote, J. und Bate, M.** (1998b). The *kakapo* mutation affects terminal arborization und central dendritic sprouting of *Drosophila* motoneurons. *J Cell Biol* **143**, 1283-1294.

- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. und Dickson, B. J.** (2000). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* **103**, 1033-1045.
- Rao, A., Cha, E. M. und Craig, A. M.** (2000). Mismatched appositions of presynaptic und postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **20**, 8344-8353.
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. und Priess, J. R.** (1997). *C. elegans* II. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Robinson, I. M., Ranjan, R. und Schwarz, T. L.** (2002). Synaptotagmins I und IV promote transmitter release independently of Ca²⁺ binding in the C2A domain. *Nature* **418**, 336-340.
- Rose, D., Zhu, X., Kose, H., Hoang, B., Cho, J. und Chiba, A.** (1997). Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RP3 motoneuron growth cone in *Drosophila*. *Development* **124**, 1561-1571.
- Ruether, K., Grosse, J., Matthiessen, E., Hoffmann, K. und Hartmann, C.** (2000). Abnormalities of the photoreceptor-bipolar cell synapse in a substrain of C57BL/10 mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 4039-4047.
- Sanes, J. R. und Lichtmann, J. W.** (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 389-442.
- Schaefer, A. M. und Nonet, M. L.** (2001). Cellular und molecular insights into presynaptic assembly. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 127-134.
- Schmid, A., Chiba, A. und Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections und muscle targets. *Development* **126**, 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. und Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **189**, 186-204.
- Schmitz, F., Bechmann, M. und Drenckhahn, D.** (1996). Purification of synaptic ribbons, structural components of the photoreceptor active zone complex. *J. Neurosci.* **16**, 7109-7116.
- Schmitz, F., Königstorfer, A. und Südhof, T. C.** (2000). RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* **28**, 857-872.
- Schrader, S. und Merritt, D. J.** (2000). Central projections of *Drosophila* sensory neurons in the transition from embryo to larva. *J. Comp. Neurol.* **425**, 34-44.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. und Goodman, C. S.** (1996). Genetic dissection of structural und functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls synaptic stabilization und growth. *Neuron* **17**, 641-654.
- Serpinskaya, A. S., Feng, G., Sanes, J. R. und Craig, A. M.** (1999). Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. *Dev. Biol.* **205**, 65-78.
- Sone, M., Suzuki, E., Hoshino, M., Hou, D., Kuromi, H., Fukata, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Nabeshima, Y. und Hama, C.** (2000). Synaptic development is controlled in the periaxonal zones of *Drosophila* synapses. *Development* **127**, 4157-4168.

- Sun, B., Xu, P. und Salvaterra, P. M.** (1999). Dynamic visualisation of nervous system in live *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10438-10443.
- Suter, D. M. und Forscher, P.** (2001). Transmission of growth cone traction force through apCAM-cytoskeletal linkages is regulated by Src family tyrosine kinase activity. *J. Cell Biol.* **155**, 427-438.
- Takagawa, K. und Salvaterra, P.** (1996). Analysis of choline acetyltransferase protein in temperature sensitive mutant flies using newly generated monoclonal antibody. *Neurosci. Res.* **24**, 237-43.
- Technau, G. M.** (1987). A single cell approach to problems of cell lineage und commitment during embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Development* **100**, 1-12.
- Technau, G. M. und Campos-Ortega, J. A.** (1985). Fate mapping in wild -type *Drosophila melanogaster*. II. Injections of horseradish peroxidase in cells of the early gastrula stage. *Roux's Arch Dev Biol* **194**, 196-212.
- Tessier-Lavigne, M. und Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133.
- Thomas, U., Kim, E., Kuhlendahl, S., Koh, Y. H., Gundelfinger, E. D., Sheng, M., Garner, C. C. und Budnik, V.** (1997a). Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large und its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron* **19**, 787-799.
- Thomas, U., Phannavong, B., Muller, B., Garner, C. C. und Gundelfinger, E. D.** (1997b). Functional expression of rat synapse-associated proteins SAP97 und SAP102 in *Drosophila dlg-1* mutants: effects on tumor suppression und synaptic bouton structure. *Mech. Dev.* **62**, 161-174.
- Thor, S., Andersson, S. G. E., Tomlinson, A. und Thomas, J. B.** (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motorneuron pathway selection. *Nature* **397**, 76-80.
- Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. und Technau, G. M.** (1993). A common precursor for glia und neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. *Development* **118**, 765-775.
- Udolph, G., Urban, J., Rusing, G., Luer, K. und Technau, G. M.** (1998). Differential effects of EGF receptor signalling on neuroblast lineages along the dorsoventral axis of the *Drosophila* CNS. *Development* **125**, 3292-3299.
- vanVactor, D. V., Sink, H., Fambrough, D., Tsoo, R. und Goodman, C. S.** (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* **73**, 1137-1153.
- von Gersdorff, H.** (2001). Synaptic ribbons: versatile signal transducers. *Neuron* **29**, 7-10.
- Vosshall, L. B., Wong, A. M. und Axel, R.** (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* **102**, 147-159.
- Wan, H. I., DiAntonio, A., Fetter, R. D., Bergstrom, K., Strauss, R. und Goodman, C. S.** (2000). Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **26**, 313-29.
- Watson, A. H. und Burrows, M.** (1982). The ultrastructure of identified locust motor neurones und their synaptic relationships. *J. Comp. Neurol.* **205**, 383-397.

- Watson, A. H. und Burrows, M.** (1983). The morphology, ultrastructure, und distribution of synapses on an intersegmental interneuron of the locust. *J. Comp. Neurol.* **214**, 154-169.
- Watson, A. H. und Burrows, M.** (1985). The distribution of synapses on the two fields of neurites of spiking local interneurons in the locust. *J. Comp. Neurol.* **240**, 219-232.
- Watson, A. H. und Burrows, M.** (1988). Distribution und morphology of synapses on nonspiking local interneurons in the thoracic nervous system of the locust. *J. Comp. Neurol.* **272**, 605-616.
- Watson, A. H., Burrows, M. und Hale, J. P.** (1985). **The morphology und ultrastructure of common inhibitory motor neurones in the thorax of the locust.** *J. Comp. Neurol.* **239**, 341-359.
- Wheeler, W. M.** (1891). Neuroblasts in the arthropod embryo. *J. Morphol.* **4**, 337-343.
- Williams, D. W., Tyrer, M. und Shepherd, D.** (2000). Tau und tau reporters disrupt central projections of sensory neurons in *Drosophila*. *J. Comp. Neurol.* **428**, 630-640.
- Wu, M. N., Fergestad, T., Lloyd, T. E., He, Y., Broadie, K. und Bellen, H. J.** (1999). Syntaxin 1A interacts with multiple exocytic proteins to regulate neurotransmitter release *in vivo*. *Neuron* **23**, 593-605.
- Xiao, B., Tu, J. C., Petralia, R. S., Yuan, J. P., Doan, A., Breder, C. D., Ruggiero, A., Lanahan, A. A., Wenthold, R. J. und Worley, P. F.** (1998). Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* **21**, 707-716.
- Xiao, B., Tu, J. C. und Worley, P. F.** (2000). Homer: a link between neural activity und glutamate receptor function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 370-374.

I. Häufig verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
DAB	Diaminobenzidin
et al.	und weitere
etc.	und so weiter
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
NB	Neuroblast
NMJ	Neuromuskuläre Verbindung
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abb. 2.1 Neurogenese bei <i>Drosophila</i>	13
Abb. 3.1 Das Prinzip der modifizierten Transplantationstechnik	30
Abb. 3.2 Vorbereitung der Embryonen zur Transplantation	33
Abb. 3.3 Das UAS/Gal4-System	38
Abb. 4.1 Verteilung von Synapsen im Neuropil von <i>Drosophila</i> .	45
Abb. 4.2 Positionsangaben im Bauchmark von <i>Drosophila</i>	48
Abb. 4.3 Vergleich der Expressionsmuster von <i>even-skipped-Gal4</i> -Linien	51
Abb. 4.4 mCD8 als Zelloberflächenmarker	52
Abb. 4.5 Verteilung ektopisch exprimierter synaptischer Proteine im Neuropil	55
Abb. 4.6 Verteilung von SYT-HA in neuronalen Zellen	58
Abb. 4.7 (Teil I und Teil II) Lokalisation von HOMER-MYC auf Neuriten des Bauchmarks in L3-Larven	63/64
Abb. 4.8 Lokalisation von HOMER-MYC auf efferenten Projektionen	67
Abb. 4.9 Lokalisation von TAU-MYC auf Neuriten des Bauchmarks in L3-Larven	70
Abb. 4.10 Vergleich der Expressionsmuster in <i>nerv-Gal4</i> und <i>tubP-Gal4</i>	73
Abb. 4.11 Koloalisation von SYN und SYT auf Transplantationsklonen	79
Abb. 4.12 Zellstammbäume mit dorso-ventral spezifischer Verteilung von Output-Synapsen I	80
Abb. 4.13 Zellstammbäume mit dorso-ventral spezifischer Verteilung von Output-Synapsen II	83
Abb. 4.14 Zellstammbäume mit ipsilateral-kontralateral spezifischer Verteilung von Output-Synapsen	84
Abb. 4.15 Zellstammbäume mit anterior-posterior spezifischer Verteilung von Output-Synapsen	87
Abb. 4.16 Zellstammbäume mit medio-lateral-spezifischer Verteilung von Output-Synapsen	88
Abb. 4.17 Motorneurone Seitenneurite	93

Abb. 4.18 Auswirkungen der <i>kakapo</i> -Mutation	99
Abb. 4.19 Beschreibung spätembryonaler VUM-Zellstammbäume	102
Abb. 4.20 Beschreibung spätembryonaler MNB-Zellstammbäume	105
Abb. 4.21 Spätembryonaler MP1-Zellstammbaum	108
Abb. 4.22 Beschreibung spätembryonaler NB1-1-Zellstammbäume	111
Abb. 4.23 Beschreibung spätembryonaler NB2-1-Zellstammbäume	114
Abb. 4.24 Beschreibung spätembryonaler NB2-2-Zellstammbäume	115
Abb. 4.25 Beschreibung eines spätembryonalen NB2-4-Zellstammbaums	118
Abb. 4.26 Beschreibung spätembryonaler NB3-1-Zellstammbäume	121
Abb. 4.27 Beschreibung spätembryonaler NB3-2-Zellstammbäume	125
Abb. 4.28 Beschreibung eines spätembryonalen NB3-3-Zellstammbaums	127
Abb. 4.29 Beschreibung eines spätembryonalen NB4-1-Zellstammbaums	130
Abb. 4.30 Beschreibung eines spätembryonalen NB4-2-Zellstammbaums	133
Abb. 4.31 Beschreibung eines spätembryonalen NB5-1-Zellstammbaums	134
Abb. 4.32 (Teil I und Teil II) Beschreibung spätembryonaler NB5-2-Zellstammbäume	138/139
Abb. 4.33 Beschreibung spätembryonaler NB5-3-Zellstammbäume	141
Abb. 4.34 Beschreibung spätembryonaler NB6-1-Zellstammbäume	144
Abb. 4.35 Beschreibung spätembryonaler NB6-2-Zellstammbäume	148
Abb. 4.36 Beschreibung spätembryonaler NB7-1-Zellstammbäume	150
Abb. 4.37 Beschreibung eines spätembryonalen NB7-2-Zellstammbaums	153
Abb. 4.38 Beschreibung eines spätembryonalen NB7-4-Zellstammbaums	154
 Tab. 4.1 Wildtypische Transplantationsklone	 76
Tab. 4.2 Synapsen und ihre Verteilung auf wildtypischen und <i>kakapo</i> -mutanten Transplantationsklonen	96