

Histologische und genetische Untersuchungen zur Funktion von *headcase* im visuellen System von *Drosophila melanogaster*

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Albert Dowejko aus Regensburg

im Jahr 2004

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.07.04

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Wirth (Vorsitzender)

Prof. Dr. Schneuwly (Erstgutachter)

Prof. Dr. Förster (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Sterner (dritter Prüfer)

Meiner kleinen und großen Familie.

„Im Anfang war das Wort, und das Wort war bei Gott, und Gott war das Wort. Dasselbe war im Anfang bei Gott. Alle Dinge sind durch dasselbe gemacht, und ohne dasselbe ist nichts gemacht, was gemacht ist. In ihm war das Leben, und das Leben war das Licht der Menschen.

Und das Licht scheint in der Finsternis, und die Finsternis hat's nicht ergriffen.“

(Bibel, Johannes-Evangelium Kapitel 1, Verse 1-5)

1 ZUSAMMENFASSUNG	6
2 EINLEITUNG	8
2.1 DER MODELLORGANISMUS <i>DROSOPHILA MELANOGLASTER</i>	10
2.2 DAS VISUELLE SYSTEM VON <i>DROSOPHILA</i>	11
2.2.1 Struktur und Entwicklung des Komplexauges	11
2.2.2 Aufbau der adulten optischen Loben	15
2.2.3 Die Entwicklung der optischen Ganglien	16
2.2.4 Die Bedeutung von Gliazellen in der Entwicklung des visuellen Systems	20
2.3 AXONALE WEGFINDUNG	21
2.3.1 Allgemeine Mechanismen	21
2.3.2 Die axonale Zielfindung im optischen System von <i>Drosophila</i>	22
2.4 DAS HEADCASE GEN	27
2.5 ZIELE DER ARBEIT	30
3 MATERIAL UND METHODEN	31
3.1 FLIEGENSTÄMME	32
3.2 ANTIKÖRPER	33
3.3 ANGEWANDTE METHODEN	34
3.3.1 Immunhistochemie und Fluoreszenz an larvalen Ganzhirnpräparaten	34
3.3.2 Zellkern-Markierung (DAPI-Färbung)	35
3.3.3 S-Phasenmarkierung (BrdU-Färbung)	36
3.3.4 Immunhistochemie und Fluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten	36
3.3.5 Semidünnschnitte	37
3.3.6 β -Galaktosidasefärbung	37
3.3.7 Mosaikanalyse	38
4 ERGEBNISSE	39
4.1 ISOLIERUNG VON MUTANTEN MIT DEFEKTER RETINALER PROJEKTION	40
4.2 GENETISCHE UND HISTOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER HEADCASE MUTANTE	42

FUNKTIONSANALYSE	47
4.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION VON HEADCASE	48
4.3.1 <i>Die Enhancer-Trap-Linie hdc^{B5}</i>	48
4.3.2 <i>Expressionsanalyse mit dem monoklonalen anti-HEADCASE-Antikörper</i>	53
4.3.2.1 Lokalisation von HEADCASE im Gewebe.....	53
4.3.2.2 Subzelluläre Lokalisierung von HEADCASE.....	56
4.4 MOSAIKANALYSE ZUR LOKALISATION DER <i>HDC</i> -FUNKTION.....	58
4.4.1 <i>EGUF/hid-induzierte hdc⁵⁰-Mosaiken</i>	59
4.4.1.1 Larvale hdc ⁵⁰ -Mosaiken	59
4.4.1.2 Adulte hdc ⁵⁰ -Mosaiken	62
4.4.2 <i>Hitzeschock-induzierte hdc⁵⁰-Mosaiken</i>	66
4.5 SPEZIFISCHE RETTUNG DES <i>HDC</i> -PHÄNOTYPs.....	68
4.6 DETAILLIERTE ANALYSE DES MUTANTEN HEADCASE-PHÄNOTYPs	73
4.6.1 Axonale Marker.....	73
4.6.2 Faszikulation	78
4.7 UNTERSUCHUNG DER ZIELREGION RETINALER PROJEKTION.....	80
4.7.1 <i>Proliferation neuronaler Vorläuferzellen</i>	81
4.7.2 <i>Differenzierung der Laminaneurone</i>	83
4.7.3 <i>Beteiligung von Gliazellen am hdc-Phänotyp</i>	86
5 DISKUSSION	93
5.1 DIE MUTANTE HEADCASE ZEIGT FEHLERHAFTES RETINALE PROJEKTIONEN	94
5.2 HEADCASE BEEINFLUSST DIE PR-DIFFERENZIERUNG UND DIE FASZIKULATION IHRER AXONALEN PROJEKTIONEN	97
5.3 HEADCASE IST AN DER PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG VON LAMINANEURONEN UND LAMINAGLIA BETEILIGT	103
5.4 DIE BEDEUTUNG VON HEADCASE FÜR DIE REORGANISATION DES VISUELLEN SYSTEMS WÄHREND DER METAMORPHOSE	109
6 LITERATURANGABEN	114

Abbildungen

Abb. 1: Die Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Abb. 2: Zelluläre Architektur eines Ommatidiums anhand schematischer Längs- und Querschnitte.....	10
Abb. 3: Schematische Darstellung der Photorezeptorentwicklung in der Augenscheibe	14
Abb. 4: Horizontalschnitte des visuellen System von <i>Drosophila</i>	15
Abb. 5: Larvale Entwicklung des optischen Lobus.....	17
Abb. 6: Schematische Darstellung der Laminadifferenzierung	19
Abb. 7: Übersichtsdarstellung des ontogenetischen Urprungs von Lamina- und Gliazellen	20
Abb. 8: Genomische Region des <i>headcase</i> Gens, inklusive der Insertionsloci relevanter P-Elemente, der <i>hdc</i> mRNA, der Defizienz <i>hdc</i> ⁵⁰ sowie der zwei HDC Proteine.....	42
Abb. 9: Phänotypische Charakterisierung der <i>headcase</i> Mutante im larvalen Stadium	45
Abb. 10: Phänotypische Charakterisierung der <i>headcase</i> Mutante im adulten Stadium.....	46
Abb. 11: Expressionsmuster der Enhancer-Trap-Linie <i>hdc</i> ^{B5} im larvalen Gewebe	49
Abb. 12: Expression von <i>headcase</i> in Gliazellen und Neuronen des larvalen visuellen Systems	50
Abb. 13: Expressionsmuster der <i>hdc</i> ^{B5} -Linie im adulten optischen System	52
Abb. 14: Expression von HEADCASE in der Augenscheibe von Wildtyp und <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutante	53
Abb. 15: Expression von <i>headcase</i> im larvalen Augen-Hirn-Komplex von Wildtyp, <i>hdc</i> ^{B5} -Linie und <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutante	54
Abb. 16: Keine HEADCASE-Expression im optischen System des adulten Wildtyps	55
Abb. 17: Subzelluläre Verteilung des HEADCASE-Proteins in larvalen Augenscheiben	56
Abb. 18: Subzelluläre Expression des <i>headcase</i> -Gens in der Augenscheibe der <i>hdc</i> ^{B5} -Linie	57
Abb. 19: Semiquantitative Analyse EGUF/ <i>hid</i> -induzierter <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mosaiken im optischen System von Larven	60
Abb. 20: Phänotyp des visuellen Systems adulter EGUF/ <i>hid-hdc</i> ⁵⁰ Mosaikfliegen.....	63
Abb. 21: Analyse der Retinamorphologie adulter EGUF/ <i>hid-hdc</i> ⁵⁰ Mosaikfliegen.....	65
Abb. 22: Statistische Auswertung der Rhabdomeranzahl pro Ommatidium in der Retina von EGUF/ <i>hid-hdc</i> ⁵⁰ Mosaiktieren	66
Abb. 23: Analyse der adulten Retina Hitzeschock-induzierter <i>hdc</i> ⁵⁰ -Augenmosaike	67
Abb. 24: Phänotyp des adulten visuellen Systems Hitzeschock-induzierter <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mosaiktiere	68
Abb. 25: Schema der gerichteten Genexpression in <i>Drosophila</i> mit Hilfe des GAL4/UAS Systems.....	69
Abb. 26: Partielle Rettung des <i>hdc</i> ⁵⁰ -Phänotyps durch eine photorezeptorspezifische Expression der <i>hdc</i> -cDNA.....	71
Abb. 27: Spezifische Färbung der Photorezeptoraxone R2-R5 im larvalen optischen Lobus von <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutanten.....	74
Abb. 28: Spezifische Färbung der Photorezeptoren R1-R6 und deren Axone im adulten visuellen System von <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutanten.....	76
Abb. 29: Spezifische Färbung der R8-Photorezeptoren und deren Axone im adulten visuellen System von <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutanten.....	77
Abb. 30: Expression der Zelladhäsionsmoleküle FASCICLIN II, FASCICLIN III und ROUGHEST im larvalen visuellen System von <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutanten.....	79

Abb. 31: Proliferation im larvalen optischen Lobus der <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutante	82
Abb. 32: Frühe Differenzierung der Laminaneurone in <i>hdc</i> ⁵⁰ -mutanten Larven	84
Abb. 33: Frühe Differenzierung der Laminaneurone in <i>hdc</i> ⁵⁰ -EGUF-Mosaik-Larven	85
Abb. 34: Struktur und Differenzierung von Gliazellen im larvalen optischen System der <i>hdc</i> ⁵⁰ -Mutante.....	87
Abb. 35: Doppelfärbungen von Gliazellen und Photorezeptoraxonen im optischen Lobus von <i>hdc</i> ⁵⁰ -Larven.....	89
Abb. 36: Doppelfärbungen der subretinalen Gliazellen und der Photorezeptoren mit ihren Axonen in Augenscheibe und im optischen Stiel von <i>hdc</i> ⁵⁰ -Larven	90
Abb. 37: Doppelfärbungen der subretinalen Gliazellen und der Photorezeptoren mit ihren Axonen in Augenscheibe und im optischen Stiel von <i>hdc</i> ⁵⁰ -Larven mit extremem Phänotyp	91
Abb. 38: Struktur und Differenzierung REPO-positiver Glia im larvalen optischen Lobus von <i>hdc</i> ⁵⁰ -EGUF-Mosaiktieren.....	92

Tabellen

Tab. 1: Die Genotypen der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme	32-33
Tab. 2: Antikörper	33-34
Tab. 3: Komplementationskreuzungen mit <i>hdc</i> relevanten Linien	43
Tab. 4: Eine augenspezifische Überexpression von <i>headcase</i> verursacht Defekte im visuellen System....	72

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der histologischen, genetischen und funktionellen Charakterisierung des Gens *headcase* (*hdc*) innerhalb der Entwicklung des visuellen Systems von *Drosophila melanogaster*. Die Bedeutung von *headcase* für das optische System wurde im Rahmen einer Suche nach neuen Mutanten mit defekter retinaler Projektion innerhalb einer Sammlung letaler P-Elementstämme (Deak et al., 1997) entdeckt. Dabei zeigte die lebensfähige Linie 75/04 grobe Störungen im Projektionsmuster der Photorezeptoraxone (PR-Axone), deren P-Element im zytogenetischen Bereich von *headcase* inseriert war. Die angeforderte *headcase* Deletionsmutante *hdc*⁵⁰ bestätigte die beobachteten Defekte und Komplementationskreuzungen mit 75/04 wiesen den kausalen Zusammenhang zwischen der P-Elementinsertion und dem mutanten Phänotyp nach. Die pupal letale *hdc*⁵⁰-Mutante zeigte ein komplexes Störungsmuster innerhalb des visuellen Systems: Larval traten besonders Faszikulierungsdefekte und eine gestörte Topographie in den ersten beiden optischen Ganglien hervor, wobei die Augenscheibe kaum gestört war; im fast adulten Zustand zeigten nicht nur die optischen Ganglien, sondern auch die Retina starke Defekte, mit dem prominenten Bypass-Phänotyp der retinalen Projektionen in der Medulla.

Die folgenden Expressionsstudien gaben erste Hinweise auf den Wirkort von *headcase*. Es stellte sich heraus, dass HDC fast ubiquitär im larvalen bzw. fröhlpupalen, aber nicht mehr im adulten visuellen System exprimiert wird. Es konnte auch nicht im Neuropil, sondern nur im Zytoplasma von Neuronen, Glia und anderen Zellen im Hirn und im Auge nachgewiesen werden. Die Untersuchung von Mosaiktieren, in denen *hdc*⁵⁰-mutante Photorezeptoraxone in ein wildtypisches Hirn projizieren, zeigte die funktionelle Notwendigkeit von *headcase* für die Entwicklung der Retina und des optischen Lobus. Eine partielle Rettung der Projektionsdefekte von *hdc*⁵⁰ durch eine photorezeptorspezifische Expression der *headcase*-cDNA bestätigte die Mosaikexperimente und damit die ubiquitäre Notwendigkeit der *headcase*-Funktion für die Entwicklung des optischen Systems. Diese Aussagen manifestierten sich in der weiteren Detailuntersuchung des pleiotropen *hdc*⁵⁰-Phänotyps. Spezifische Markierungen der PR-Axone belegten, dass alle acht Photorezeptortypen die *hdc*-Funktion für ihre korrekte Projektion ins Hirn benötigen. Ferner lässt die Fehlexpression von Zelladhäsionsmolekülen in *hdc*⁵⁰-mutanten PR-Axonen darauf schließen, dass *headcase* mitbeteiligt ist an deren wildtypischer Faszikulierung. Des Weiteren bewies eine Untersuchung der Zielregion retinaler Projektionen die Notwendigkeit von *headcase* sowohl für die wildtypische Verteilung von Gliazellen zur korrekten Terminierung der PR-Axone, als auch für eine geordnete Proliferation von Neuroblasten im optischen Lobus im Hinblick auf eine normale Entwicklung des ersten optischen Ganglions.

2 Einleitung

Ein wesentliches Merkmal des Lebens ist die Kommunikation (Gitt, 1986). Eine erfolgreiche Kommunikation bedarf neben einem Sender und einem Empfänger vor allem eines intakten Informationsweges zwischen beiden. Daher trägt die korrekte Vernetzung lebender Systeme entscheidend zu ihrer Entwicklung und Stabilität bei, wie an der menschlichen Gesellschaft als dem komplexesten Beziehungsgeflecht in der sichtbaren Welt abzulesen ist. Doch eine Gesellschaft von Organismen hätte keinen Bestand, wenn die Organismen selbst keine funktionstüchtigen Informationswege zwischen ihren funktionalen Einheiten, den Organen, aufwiesen. Somit ist die Bildung dieser Verknüpfungen während der Ontogenese von Individuen grundlegend wichtig zum Überleben einer ganzen Art. Das exemplarische Studium der Entwicklung solcher Verbindungen an experimentell leicht zugänglichen Modellorganismen kann Erkenntnisse liefern, welche zum Verstehen dieser komplizierten Vernetzung auch in anderen Systemen, wie dem Menschen, beiträgt.

Das besondere Kennzeichen von höheren Metazoen im Tierreich ist die Vernetzung neuronaler Zellen, welche Lebewesen in die Lage versetzt, aktiv auf Umweltreize zu reagieren. Zu Sinneszellen spezialisierte Neurone können dabei physikalische und chemische Umgebungsreize in elektrische Signale umwandeln und diese kodierte Information über axonale und dendritische Verbindungen zu entsprechenden Empfängerzellen leiten. Am Zielort werden die Informationen dekodiert und entweder an andere Zellen weitergeleitet oder in eine spezifische Zellreaktion umgesetzt.

Dieser Informationsfluss kann am hochgeordneten visuellen System von Dipteren, wie den Fruchtfliegen der Art *Drosophila melanogaster* (Abb. 1), detailliert beobachtet und die Entstehung der neuronalen Verbindungen zwischen den lichtempfindlichen Photorezeptoren der Komplexaugen und den signalverarbeitenden Ganglien bis zur molekularen Ebene hin verfolgt werden.

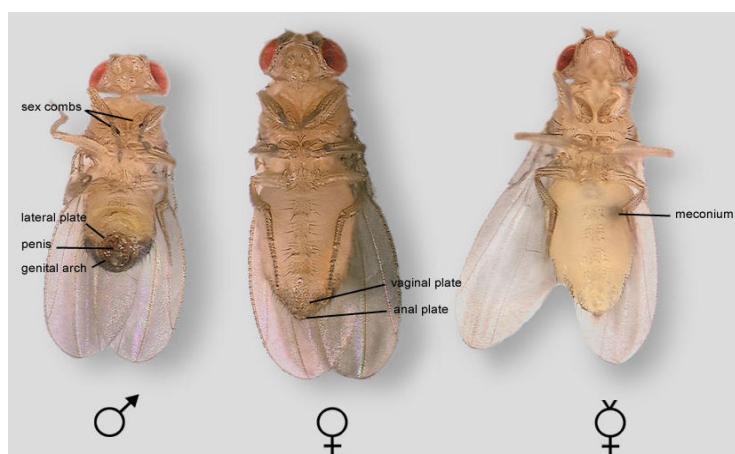


Abb. 1: Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Die zur Ordnung Diptera und Familie Drosophilidae gehörende, 2,5 - 3 mm große Frucht- oder Taufliege von ventral. Männchen und Weibchen bzw. Jungfrauen lassen sich zur Durchführung von Kreuzungen anhand charakteristischer Merkmale leicht voneinander unterscheiden (Abbildung aus FlyMove: Weigmann et al., 2003).

2.1 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Die Erforschung der Fruchtfliege *D. melanogaster* hat eine lange Tradition und reicht zurück bis an den Anfang des 19. Jahrhunderts. Der landläufig wohl bekannteste „Drosophilist“ ist Thomas H. Morgan, welcher anhand genetischer Studien die Chromosomen als Träger der Erbinformation identifiziert hat und dafür 1933 mit dem Nobelpreis belohnt wurde. Er entdeckte mit *white eye* auch die erste für *Drosophila* beschriebene Mutation (Oliver, 1976).

Bis auf den heutigen Tag hat dieser unscheinbare Invertebrat nichts von seiner Faszination als viel beschriebener Modellorganismus eingebüßt. Die leichte Manipulierbarkeit seines Genoms durch Mutagenesen, welche vielfältige und gut sichtbare Phänotypen hervorrufen, und die Verfügbarkeit zahlreicher genetischer Techniken, machen *Drosophila* hervorragend geeignet für die Untersuchung komplexer biologischer Fragen, wie der Entwicklung eines dreidimensionalen Organismus aus einer befruchteten Eizelle.

Dabei sind die grundlegenden Prinzipien der Entwicklung von Wirbellosen auch für Wirbeltiere gültig, wie vergleichende Studien immer wieder bestätigten. Diese Allgemeingültigkeit von Grundbauplänen zeigte sich auf vielen Ebenen, angefangen von der frühembryonalen Entwicklung (Holley und Ferguson, 1997) und allgemeinen Organbildung (Gehring, 1992), über den Aufbau neuronaler Strukturen samt dem Prozeß axonaler Wegfindung (Hirth und Reichert, 1999; Chisholm und Tessier-Lavigne, 1999), bis hin zu spezifischen Stoffwechselwegen (Guarnieri und Heberlein, 2003).

Besonders die Veröffentlichung der gesamten Genomsequenz von *Drosophila* (Adams et al., 2000) und vom Menschen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001) bestätigte die Vergleichbarkeit von grundsätzlichen Bauplänen dieser auf den ersten Blick völlig verschiedenen Organismen. Das äußert sich in der Konservierung zahlreicher, auch pathologisch bedeutsamer, menschlicher Gene in dem Genom von *Drosophila* (Shulman et al., 2003; Rubin et al., 2000), das übrigens mit 13 500 Genen nur etwa dreimal so klein ist wie das menschliche.

Zu den konservierten Genen zählt u.a. auch das humane Homolog zum *Drosophila headcase* Gen (Makino et al., 2001), welches beim Menschen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung spielt und in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des visuellen Systems von *Drosophila* eingehend untersucht wurde.

Die Bedeutung des visuellen Systems als Untersuchungsobjekt lässt sich vielleicht daran ermessen, dass frühere Schätzungen zweidrittel aller vitalen *Drosophila*-Gene als essentiell für die normale Assemblierung und neuronale Konnektivität des Komplexauges ansehen

(Thaker und Kankel, 1992). Das heißt jedoch nicht, dass derartige Gene ausschließlich die Entwicklung des Auges und seiner Projektionen steuern; sie üben vielmehr multiple Funktionen innerhalb unterschiedlicher Entwicklungsprozesse aus. Mutationen dieser Gene betreffen daher nicht nur das Auge, sondern auch weitere Gewebe und Organe (Clandinin und Zipursky, 2002; Kumar, 2001; Thaker und Kankel, 1992), wie die vorliegenden Untersuchungen von *headcase* ebenfalls bestätigten. Diese pleiotrope Wirkungsweise von Genen bei *Drosophila*, aber auch beim Menschen, könnte u.a. erklären, weshalb ein relativ kleines Genom, imstande ist die Information für den Aufbau von derart komplexen Lebensformen zu liefern.

Ein bedeutsamer Vorteil des visuellen Systems, dessen Entwicklung mit zu den besterforschten Modellen in der Fruchtfliege gehört (Meinertzhagen und Hanson, 1993), ist ferner seine Überschaubarkeit. Das *Drosophila*-Hirn besitzt ca. 200 000 Nervenzellen, von denen etwa 50 000 Neurone pro Hirnhemisphäre auf das optische System entfallen (Reichert und Boyan, 1997; Hofbauer und Campos-Ortega, 1990). Dieses ist zwar immer noch eine komplexe Struktur, besitzt aber im Vergleich zu Vertebraten bedeutend weniger Nervenzellen.

Aufgrund der dargelegten Vorzüge ist *Drosophila* als Modellorganismus für umfassende zelluläre, molekulare und genetische Analysen neuronaler Entwicklung nahezu unangefochten.

2.2 Das visuelle System von *Drosophila*

Das adulte visuelle System der Fruchtfliege besteht aus dem Komplexauge und den optischen Loben. Die Entwicklung dieser Strukturen hinsichtlich des *headcase*-Gens sind Gegenstand dieser Arbeit und sollen daher im Folgenden näher beschrieben werden.

2.2.1 Struktur und Entwicklung des Komplexauges

Das *Drosophila*-Komplexauge ist aufgebaut aus ca. 800 repetitiven Einheiten, den Facetten oder Ommatidien. Jedes Ommatidium beinhaltet acht Photorezeptorneurone (R1-R8) und 18 nicht-neuronale Zellen, von denen einige mit benachbarten Ommatidien geteilt werden.

Die acht Photorezeptorneurone formieren den Kern des Ommatidiums und bergen ein trapezoides Muster von Rhabdomeren, den lichtsensitiven Organellen. Dabei umgeben die Rhabdomere der sechs äußeren Photorezeptoren R1-R6 die beiden übereinander stehenden Rhabdomere der inneren Photorezeptorzellen R7 und R8 (Abb. 2).

Funktional sind die äußeren Photorezeptoren für die Detektion von Bewegung zuständig, während die inneren vermutlich an der Farbwahrnehmung beteiligt sind (Cook, 2003). Sie unterscheiden sich daher bezüglich ihrer Ausstattung mit photosensitiven Opsinen (Chou et al., 1999) und ihrer axonalen Projektionsmuster in die optischen Ganglien.

Die 18 nicht-neuronalen Zellen komplettieren das Ommatidium; sie gliedern sich in vier Kristallkegel-, 11 Pigment- und 3 mechanosensorische Borstenzellen. Die Kegelzellen und zwei primäre Pigmentzellen sezernieren die Linse, wohingegen die sechs sekundären und drei tertiären Pigmentzellen das Ommatidium optisch isolieren (Hsiung und Moses, 2002).

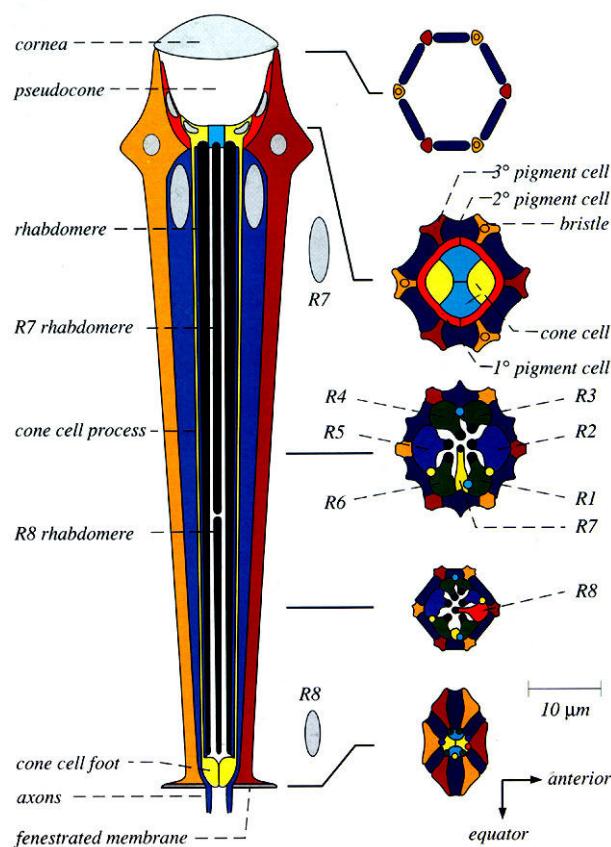


Abb. 2: Zelluläre Architektur eines Ommatidiums anhand schematischer Längs- und Querschnitte. Im Kern eines Ommatidiums befinden sich die Photorezeptorneurone (*R cells*), die ihre lichtsensitiven Rhabdomere ins zentrale Lumen aussenden. Über dem Lumen liegen vier Kristallkegelzellen (*cone cells*), welche das Material für die Linse (*cornea* und *pseudocone*) sezernieren. Die Photorezeptoren und die Kristallkegelzellen werden von Pigmentzellen (1° , 2° und 3° *pigment cells*) umgeben, um das Ommatidium optisch zu isolieren. Zwischen den 2° Pigmentzellen befinden sich die mechanosensorischen Borsten (*bristles*). (Abbildung aus Wolff und Ready, 1993).

Der hochgeordnete Aufbau des Komplexauges ist das Ergebnis eines sehr präzisen Entwicklungsprozesses, welcher bereits in der Embryonalphase mit der Differenzierung von einigen Blastodermzellen zu Augen-Antennenscheiben beginnt (Yamamoto, 1996). In der frühen Larve stellen diese paarigen Imaginalscheiben einschichtige Epithelien dar, die über eine Brücke bestehend aus Zellen und Axonen (optischer Stiel) mit dem zentralen Nervensystem funktional verbunden sind. Durch den optischen Stiel zieht bereits der sogenannte Bolwig-Nerv, welcher die axonalen Projektionen des larvalen Lichtsinnesorgans enthält (Wolff und Ready, 1993).

Die undifferenzierten Zellen der Imaginalscheiben proliferieren ohne erkennbares Muster bis in die Mitte des dritten Larvenstadium; dann setzt die Differenzierung ein und jeder retinale Zelltyp wird aus einem pluripotenten Pool an retinalen Vorläuferzellen sequenziell und stereotyp rekrutiert. Die Transformation von Vorläuferzellen in spezialisierte Neurone ist gekennzeichnet durch eine dorso-ventrale Einsenkung, die sog. Morphogenetische Furche (MF), welche am Ansatz des optischen Stiels startet, sich über die gesamte Breite der Augenscheibe ausdehnt und diese innerhalb von zwei Tagen von anterior nach posterior durchquert (Abb. 3). Die MF selbst resultiert aus einer Konstriktion des apikalen Zytoskelettrings und einer basalen Verlagerung der Zellkerne. Gleichzeitig findet eine Inhibierung der Zellteilung statt, wodurch die Zyklen aller beteiligten Zellen synchronisiert werden (Cook, 2003; Hsiung und Moses, 2002; Yamamoto, 1996)

Posterior der Morphogenetischen Furche assemblieren die Zellen schrittweise zu Ommatidien, wobei sich die Photorezeptoren in einem sequenziellen Prozess differenzieren. Dieser Prozess umfasst eine Vielzahl komplexer molekularer Mechanismen und miteinander verwobener Signalwege.

Anterior der MF befindet sich die proneurale Region, aus welcher die ersten ommatidialen Cluster selektiert werden. Dabei vermittelt der Transmembranrezeptor Notch die Stimulierung des Transkriptionsfaktors Atonal in bestimmten proneuralen Zellgruppen und beschränkt anschließend mittels lateraler Inhibition die Atonal-Expression auf einzelne Zellen, die R8-Vorläuferneurone. Diese R8-Gründerzelle rekrutiert nacheinander zunächst die Rezeptorneurone R2/R5 und R3/R4 zu einem Fünf-Zell-Precluster. Zu diesem Zeitpunkt schließen alle undifferenzierten Zellen ihre S-Phase koordiniert ab und vollziehen eine weitere Mitose, die als sog. „zweite mitotische Welle“ bezeichnet wird.

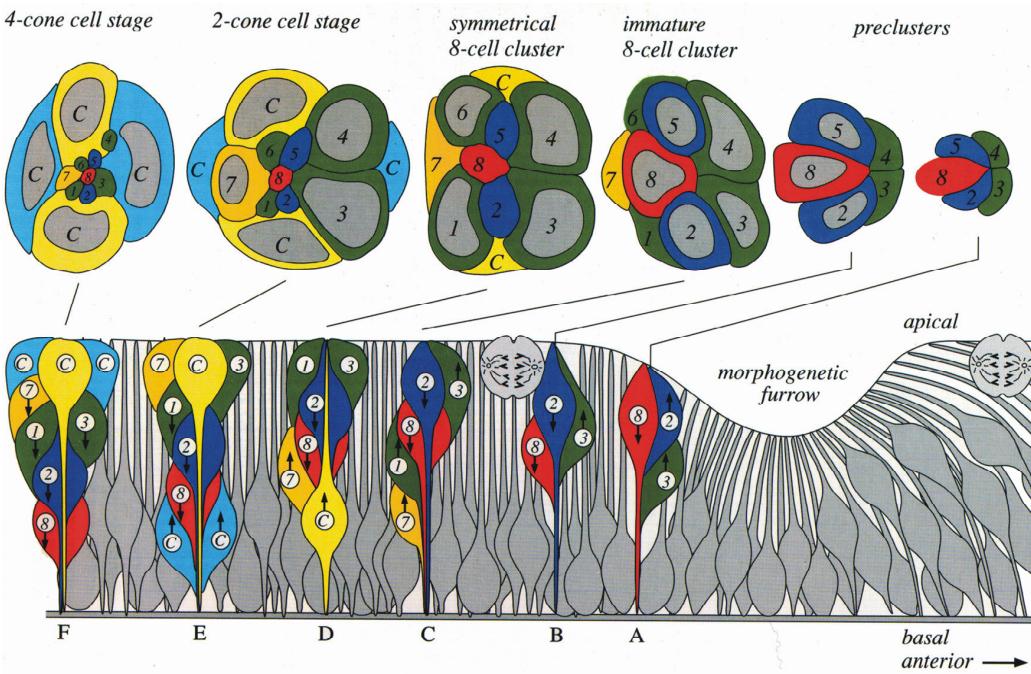


Abb. 3: Schematische Darstellung der Photorezeptorentwicklung in der Augenscheibe. Die Seitenansicht und die Querschnitte korrespondieren mit sechs Stadien (A-F) der ommatidialen Entwicklung. Innerhalb der Morphogenetischen Furche (*morphogenetic furrow*) verkürzen sich die Zellen und verlagern ihre Kerne basal, womit die Differenzierung der Photorezeptoren eingeleitet wird. Mehrere Zellen assemblieren zu sog. *Preclustern* (A und B), welche fünf Photorezeptoren sukzessive differenzieren, beginnend mit R8, dann die Paare R2/R5 und R3/R4. Eine zweite Mitose leitet die Differenzierung von R1/R6 und R7, sowie der Kegelzellen ein. Diese Zellen vergrößern nacheinander das *Precluster* zunächst zum frühen 8 Zellstadium (*immature 8-cell cluster*; C), welches zusammen mit Kegelzellen symmetrisch wird (*symmetrical 8-cell cluster*; D) und letztlich apikal von ihnen dominiert wird (2- und 4-cone cell stage; E und F). Der horizontale Pfeil markiert die Bewegungsrichtung der MF von posterior nach anterior, während die vertikalen Pfeile die Verlagerung der Zellkerne kennzeichnen (Abbildung aus Wolff und Ready, 1993).

Danach werden R1/R6 und schließlich R7 dem Precluster zugefügt. Nachdem die Photorezeptoren spezifiziert sind, folgt die Differenzierung der nicht-neuronalen Zelltypen des Ommatidiums, angefangen mit den Kristallkegelzellen und gefolgt von primären, sekundären und tertiären Pigmentzellen. Zuletzt werden die überschüssigen Zellen durch Apoptose eliminiert und damit die sog. neurokristalline Struktur des entstehenden Komplexauges verfeinert, welches sich nun etwa in der Hälfte der pupalen Phase befindet (Voas und Rebay, 2004; Yamamoto, 1996).

Neben Notch und Atonal sind eine Reihe weiterer Signale an der Initiierung oder Progression der MF beteiligt, z.B. der Notch-Ligand Delta, der sekretierte Signalfaktor Hedgehog, das morphogene Protein Decapentaplegic oder die Rezeptortyrosinkinase DER, das Drosophilahomolog zum Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors EGF. Letzteres ist u.a. essentiell wichtig für die Spezifizierung aller Augenzellen, außer des R8-Neurons (Dominguez et al., 1998). Darüber hinaus sind eine Vielzahl anderer Signale für die Differenzierung

ommatidialer Zellen notwendig, wobei die Induzierung von R7 durch *boss* und *sevenless* die prominenteste Signalkaskade darstellt (Zipursky und Rubin, 1994; Rubin, 1991).

Sobald die Photorezeptoren differenziert sind, beginnt ihr axonales Wachstum und zwar entsprechend der Reihenfolge ihrer ommatidialen Reifung; das R8-Axon wandert als erstes aus, gefolgt von R1-R6-Axonen und zuletzt R7, wobei die Axone eines Ommatidiums zunächst ein Faszikel bilden (Clandinin und Zipursky, 2002).

2.2.2 Aufbau der adulten optischen Loben

Das Zielgebiet retinaler Projektionen sind die optischen Loben, welche die signalverarbeitenden Ganglien bergen. Es können grundsätzlich drei optische Neuropile, d.h. Bereiche dichter synaptischer Verschaltung unterschieden werden: Die Lamina, die Medulla und der Lobula-Komplex, der sich in Lobula und Lobulaplatte gliedert. Jedes Neuropil ist assoziiert mit einem peripheren Kortex aus Zellkörpern, der distal von Lamina und Medulla und posterior von der Lobulaplatte liegt (Abb. 4)

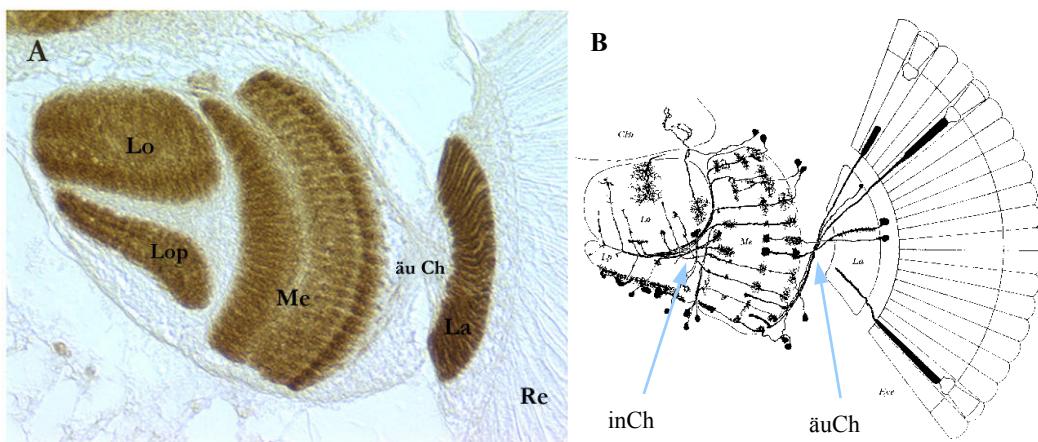


Abb. 4: Horizontalschnitte des visuellen System von *Drosophila*. (A) Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper mAb 49, welcher spezifisch an das synaptische Protein CSP (*cystein-string protein*, Zinsmeier et al., 1990) bindet und damit die Neuropilregionen als Bereiche dichter synaptischer Verschaltung kennzeichnet. Die Abbildung wurde freundlicherweise von J. Botella-Muñoz zur Verfügung gestellt. (B) Die Schemazeichnung eines Horizontalschnitts stellt einen Teil der im visuellen System vorhandenen Neuronen und deren Projektionen dar. In der Retina sind die drei Klassen von Photorezeptoren hervorgehoben, welche in die ersten beiden optischen Ganglien projizieren, die Lamina und die Medulla. Das innere (inCh) und das äußere Chiasma (äuCh) sind durch blaue Pfeile markiert. (Abbildung nach Fischbach und Heisenberg, 1984). Re:Retina, La:Lamina, Me:Medulla, Lo:Lobula, Lop/Lp:Lobulaplatte, CBr:Zentralhirn.

Die Neuropilstrukturen rekapitulieren den modularen Aufbau des Komplexauges, d.h. sie zeigen ein säulenartiges Muster, das mit der Anordnung der Ommatidien korrespondiert. Am

deutlichsten ist diese retinotopie Säulenstruktur in der Lamina (als Cartridges) und Medulla (als Columnen) zu erkennen.

Die Axone der äußenen Photorezeptoren R1-R6 terminieren in der Lamina, dem ersten optischen Ganglion. Dabei ziehen Axone von Photorezeptoren benachbarter Ommatidien mit gleicher optischer Achse zum selben Cartridge und nehmen dort synaptischen Kontakt mit den Axonen der Laminamonopolarzellen auf. Dieses Verschaltungsprinzip der neuralen Superposition sichert ein optimales Signal/Rausch-Verhältnis (Clandinin und Zipursky, 2002).

Die Projektionen der inneren Photorezeptoren R7 und R8 ziehen durch die Lamina ohne Verschaltung hindurch und enden gemeinsam mit den Axonen der Laminaneurone im zweiten optischen Ganglion, der Medulla. Dabei terminieren die Wachstumskegel von R8 kurz vor den R7-Axonkegeln, die näher an der sog. Serpentinenschicht stoppen, welche den distalen vom proximalen Teil der Medulla trennt (Meinertzhagen und Hanson, 1993). Der Lobula-Komplex erhält keine direkten retinalen Eingänge, sondern ist das Zielgebiet sekundärer Neurone.

Lamina und Medulla verbindet ein äußeres Chiasma, was dazu führt, dass die anterioren Photorezeptoren in die posteriore Medulla und vice versa projizieren. Zwischen Medulla und dem Lobulakomplex besteht ferner ein inneres Chiasma.

2.2.3 Die Entwicklung der optischen Ganglien

Die adulten optischen Loben werden von zwei epithelialen Plakoden generiert, der inneren (IOA) und äußeren optischen Anlage (OOA), welche im Laufe der embryonalen Entwicklung der procephalen Region des Neuroektoderms entstammen (Meinertzhagen und Hanson, 1993). Der ontogenetische Ablauf, welcher zur Generierung von Lamina und Medulla aus der OOA bzw. des Lobulakomplexes aus der IOA führt, wird im Folgenden kurz erläutert (Nassif et al., 2003; Meinertzhagen und Hanson, 1993; Hofbauer und Campos-Ortega, 1990; Abb. 4). Gegen Ende des ersten Larvenstadiums wird die OOA durch fortschreitende Proliferation sichelförmig und mit Beginn des zweiten Larvenstadiums folgt die IOA dieser Formgebung (Abb. 5A bis C). Im späten zweiten Larvenstadium produziert die IOA das Primordium (*plug*) des Lobulakomplexes (Lb), das sich zwischen die beiden optischen Anlagen schiebt und sie auseinanderweichen lässt (Abb. 5D).

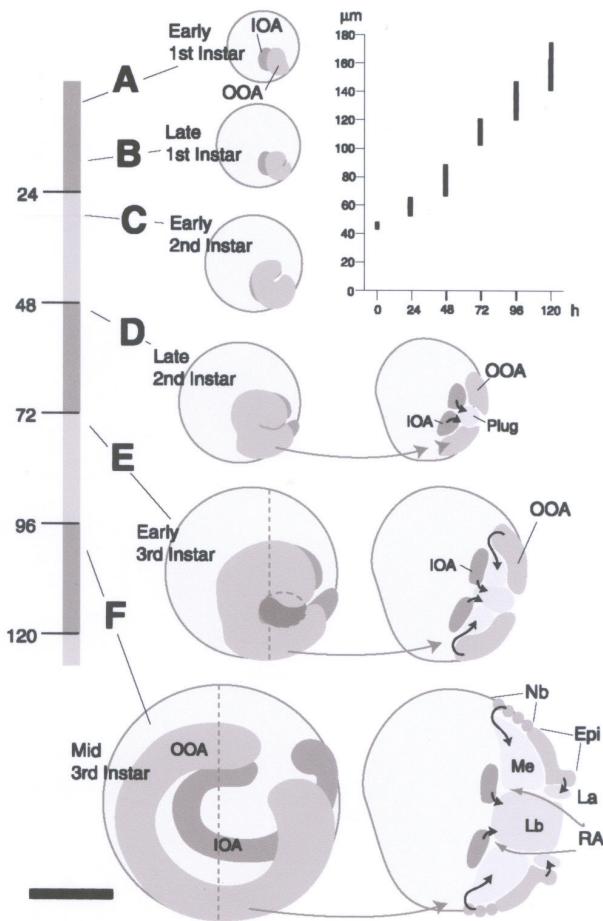


Abb. 5: Larvale Entwicklung des optischen Lobus. Die Zeitachse gibt die Entwicklungsdauer in Stunden bei 22°C nach dem Schlüpfen der Larve aus dem Ei an. Die mittleren Schemazeichnungen zeigen die Hirnhemisphären zu verschiedenen Zeitpunkten von lateral (A bis F), wobei ab Zeitpunkt D die Hirne auch im Querschnitt zu sehen sind (rechte Schemata). Das Diagramm oben rechts stellt die Zunahme des Hirndurchmessers in Abhängigkeit von der Zeit dar; die Länge der vertikalen Balken gibt dabei die Variationsbreite der einzelnen Messungen an. Weitere Angaben siehe Text unter Punkt 2.2.3.

IOA und OAA: innere und äußere optische Anlage, Epi: Epithelium der OAA, Nb: mediale Neuroblasten, La: Lamina (entsteht aus lateralen Nb der OAA), Me: Medulla (entsteht aus medialen Nb der OAA), Lb: Lobulakomplex, Plug: Primordium des Lb, RA: retinale Axone. Maßstabsbalken: 50 µm (Abbildung aus Nassif et al., 2003).

Mit Beginn der dritten Larve hat die epitheliale Oberfläche (Epi) der OAA ihre maximale Ausdehnung erreicht und beginnt am lateralen und medialen Rand aus Neuroblasten (Nb) auch Ganglienmutterzellen und Ganglienzellen hervorzubringen. Die Nachkommen der medialen Neuroblasten ziehen zwischen OAA und IOA und bilden die spätere Medulla (Me). Am lateralen Rand hingegen entsteht das sog. äußere Proliferationszentrum (OPC), aus dem ab der Mitte des dritten Larvenstadiums rund um den Eingang des Bolwignerls ein Kranz proliferierender Zellen entsteht, die Laminavorläuferzellen (LPC). Diese erhalten induktive Signale von einwachsenden Photorezeptoraxonen und reifen daraufhin zu Laminaneuronen (Abb. 5E bis F).

Einwachsende retinale Axone (RA) und erste Fortsätze des entstehenden optischen Lobus formen das Lamina- und das Medullaneuropil, wobei Letzteres sich keilförmig zwischen Medulla- und Lobulaneuronen ausbildet. Die reifenden Lobulaneurone projizieren ihre Axone medial, wo sie das Lobulaneuropil gestalten.

In der dritten Larve formen die PR-Axone ein und des selben Ommatidiums ein einzelnes Faszikel, dessen R1-R6 Axone vorübergehend zwischen zwei Gliazellreihen (*intermediate*

targets) terminieren, wie unter Punkt 2.2.4 eingehender beschrieben wird. Der entstehende Laminaplexus besitzt zu diesem Zeitpunkt eine streng anatomische Retinotopie, welche die Anordnung der Ommatidien in der Augenscheibe widerspiegelt. Mit Beginn der Verpuppung reorganisieren sich die Terminalien zu einer neuen, von der Funktion der Photorezeptoren geprägten Topographie, welche das räumliche Sehfeld im ersten optischen Ganglion rekonstruiert. Dabei defaszikulieren die PR-Axone aus ihrem ursprünglichen, ommatidialen Bündel und ziehen quer über die Laminaoberfläche zu ihren finalen synaptischen Partnern. Schließlich treffen sich alle Axone, deren Photorezeptoren in jeweils unterschiedlichen Ommatidien den gleichen Punkt im Raum „sehen“, im selben Laminacartridge. Es entsteht ein axonales Verknüpfungsmuster, das die bereits erwähnte neurale Superposition in der Verarbeitung der eingehenden Lichtsignale ermöglicht.

Das Medullaneuropil erfährt während der Pupalphase eine Drehung, so dass sich zwischen Lamina und Medulla ein Chiasma bildet, durch welches neben R7 und R8 Axonen auch Projektionen monopolarer Laminaneurone ziehen. Sobald die ersten PR-Axone mit ihnen in Kontakt treten, beginnt ihr axonales Wachstum in Richtung Medulla (Hofbauer und Campos-Ortega, 1990).

An diesem komplexen Geschehen der Musterbildung im visuellen System sind eine Vielzahl miteinander verknüpfter Prozesse beteiligt, welche sowohl im Auge als auch im optischen Lobus ablaufen und miteinander räumlich und zeitlich koordiniert werden müssen.

Der kausale Zusammenhang zwischen der Differenzierung von Photorezeptoren und dem ersten optischen Ganglion wurde besonders durch die Arbeit von Hofbauer und Campos-Ortega (1990) manifestiert, welche die Proliferationsmuster der optischen Loben von *Drosophila* untersuchten. Es stellte sich heraus, dass eine Mitosewelle nicht nur über die Augenscheibe zieht, sondern zeitlich verzögert auch über die Lamina und zwar mit korrespondierender Geschwindigkeit und Richtung (von posterior nach anterior). Dabei liegt zwischen den letzten ommatidialen Mitosen und der initialen Bildung von Laminacartridges ein Zeitraum von 15 Stunden, was genau der Migrationsdauer der ersten Axone (R8) vom Auge ins Hirn entspricht.

In den folgenden Jahren bewiesen eine Reihe von Veröffentlichungen die Notwendigkeit retinaler Projektionen für die Bildung einer intakten Lamina. Dabei offenbarte sich ein kompliziertes Wechselspiel aus induktiven Prozessen zwischen Photorezeptoraxonen, Laminaneuronen und auch Gliazellen, das die synchrone Entwicklung von Auge und optischem Lobus koordiniert.

Einige der wichtigsten Mitspieler und Vorgänge in der Laminadifferenzierung sollen nun näher betrachtet werden. Abbildung 6 stellt diese Prozesse schematisch dar.

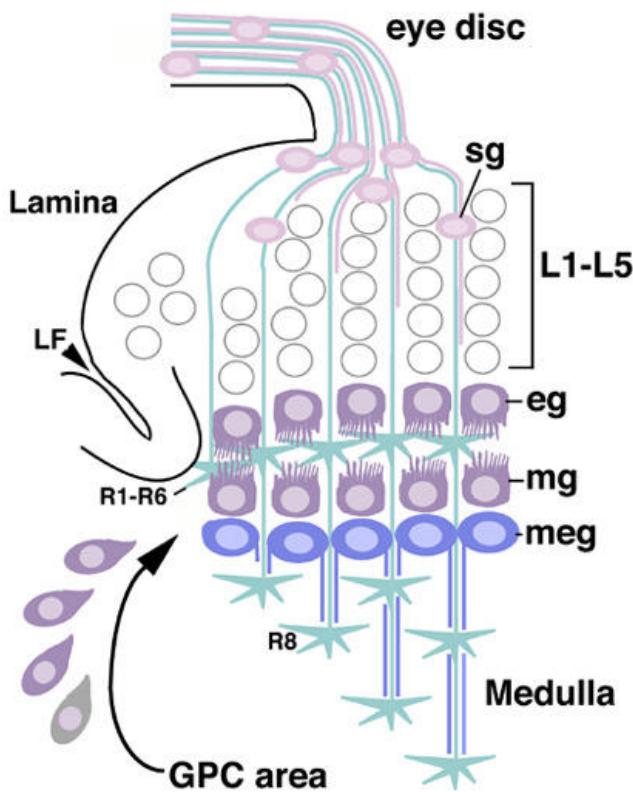


Abb. 6: Schematische Darstellung der Laminadifferenzierung. Geleitet durch subretinale Gliazellen treten die Photorezeptoraxone aus der Augenscheibe durch den optischen Stiel in das Hirn ein. Die Axonkegel von R1-R6 passieren die Satellitenglia (sg) und terminieren zwischen den epithelialen (eg) und marginalen Gliazellen (mg), während R8 und später R7 Axone, an den medullären Gliazellen (meg) vorbei, in die Medulla ziehen. Die Vorläufer der Laminaglia (eg und mg) wandern aus ihren glialen Anlagen (GPC area) in die Lamina ein. Die synaptischen Partner der PR-Axone, die Lamina-monopolarzellen (L1-L5), proliferieren und differenzieren aus den Laminavorläuferzellen, die posterior zur Laminafurche (LF) liegen. Einlaufende PR-Axone sezernieren dabei das Signalprotein Hedgehog und setzen die LPC aus ihrem G1-Arrest frei, welche daraufhin in die S-Phase eintreten und ihre letzte Mitose vollziehen. Die Laminamonopolarzellen erhalten für ihre Reifung und Anordnung innerhalb der Laminacartridges weitere Signale. (Abbildung aus Poeck et al., 2001).

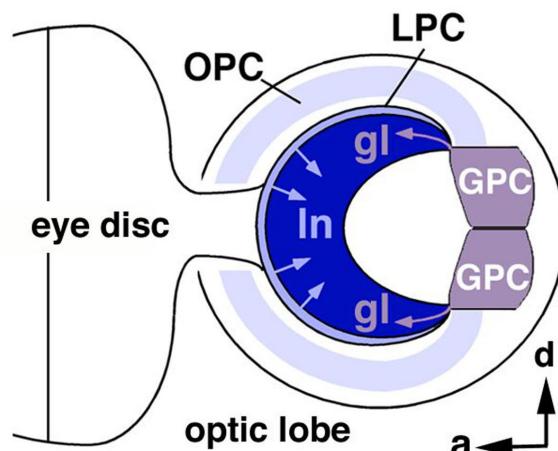
Wie erwähnt generiert das OPC die Laminavorläuferzellen, welche zwei Mitosen durchlaufen bevor sie zu Laminaneuronen differenzieren. Die Zellteilungen finden entlang der sog. Laminafurche statt, die als Einfaltung an der Hirnoberfläche sichtbar wird. Nach der ersten Mitose bleiben die LPC im G1-Arrest, aus dem sie durch einwandernde retinale Axone wieder freigesetzt werden (Selleck und Steller, 1991). Dabei treten die PR-Axone in den optischen Lobus posterior zur Laminafurche ein und sezernieren das Protein Hedgehog, welches den Übergang der LPC von der G1- in die S-Phase induziert und damit ihre letzte Mitose einleitet (Huang und Kunes, 1996, 1998). Die anschließende frühe Differenzierung der Laminaneurone ist gekennzeichnet durch die Expression des Kernproteins Dachshund (Mardon et al., 1994) und des Drosophila EGF-Rezeptors (Huang et al, 1998). Ein weiteres von retinalen Axonen sekretiertes Protein, der EGF-Rezeptorligand Spitz, initiiert die terminale Differenzierung der Neurone und deren säulenförmige Assemblierung zu Laminacartridges. Dieser späte Differenzierungsschritt wird durch die Expression des neuronalen Kernproteins ELAV markiert (Huang et al., 1998).

2.2.4 Die Bedeutung von Gliazellen in der Entwicklung des visuellen Systems

Einen besonderen Stellenwert in der Etablierung retinaler Projektionen besitzen die Gliazellen des visuellen Systems. Auf ihrem Weg in den optischen Lobus werden die Photorezeptoraxone immerzu von Gliazellen begleitet, welche auch als Zwischenziele, sog. *intermediate targets*, von den Axonen angesteuert werden (siehe auch Abb. 6). Das initiale PR-Axonwachstum in Richtung des optischen Stiels ist abhängig von Interaktionen mit den subretinalen Gliazellen (auch *retinal-basal Glia* (RBG) genannt). Die RBG haben ihren Ursprung im optischen Stiel und wandern in die Augenscheibe ein, sobald die PR-Differenzierung eingeleitet ist, wobei sie dem Lauf der Mogenetischen Furche folgen, ohne die jüngsten PR-Axone zu überholen (Taylor und Garrity, 2003; Hummel et al., 2002). Eine blockierte RBG-Gliawanderung aufgrund der Expression der dominant-negativen GTPase Ras verhindert das Einwachsen der PR-Axone in den optischen Siel (Rangarajan et al., 1999). Gleicherweise folgen die retinalen Axone den falschen Migrationspfaden der RBG-Glia in *hedgehog*- oder *gish*-Mutanten (Hummel et al., 2002).

Nach dem Wachstum durch den optischen Stiel treten die Photorezeptoraxone in das Hirn ein, wo die Axonkegel von R1-R6 zwischen epithelialen und marginalen Gliazellreihen der Laminaregion vorläufig stoppen (Abb. 6). Unterhalb der Laminaglia sind die Medullaglia positioniert, welche ihre langen Fortsätze um die Axone von R7 und R8 wickeln und mit ihnen gemeinsam in das Medullaneuropil wandern (Poeck et al., 2001).

Abb. 7: Übersichtsdarstellung des ontogenetischen Urprungs von Lamina- und Gliazellen. Wie unter Punkt 2.2.3 erwähnt generiert das äußere Proliferationszentrum (OPC) die Laminavorläuferzellen (LPC), die als reife Neurone (In) die Laminaregion formieren. Gliazellen (gl) entstehen in zwei glialen Anlagen (*glial precursor cells*, GPC) an den posterioren Rändern der Lamina und wandern von dort aus in den Laminaplexus ein. a: anterior, d: dorsal; laterale Ansicht. (Abbildung aus Poeck et al., 2001).



Ontogenetisch entstammen die Laminaglia zwei glialen Anlagen (*glial precursor cells* (GPC)) an den posterioren Enden der Lamina (Abb. 7). Von dort aus migrieren die Gliazellen in die

Laminavorläuferregion ein (Perez und Steller, 1996). Dabei ist die Proliferation der Laminaglia unabhängig von retinaler Innervation und der Präsenz differenzierter Laminaneurone, während für die spätere Differenzierung und Migration dieser Gliazellen retinale Projektionen benötigt werden (Huang und Kunes, 1998; Winberg et al., 1992). So wird in PR-Axonen u.a. die Untereinheit des COP9-Signalosomkomplexes Jab1/CSN5 gebraucht, um die korrekte Migration der Laminaglia zu induzieren (Suh et al., 2002). In Mutanten von *Jab1/CSN5* als auch von *nonstop*, welches in Gliazellen eine Ubiquitin spezifische Protease exprimiert, ist die Anzahl der Laminaglia reduziert, wodurch viele R1-R6 Axone nicht mehr in der Lamina stoppen, sondern ektopisch in die Medulla ziehen (Poeck et al., 2001).

Im Rahmen einer funktionalen Analyse zeigt die vorliegende Arbeit auch eine Beteiligung von *headcase* an der korrekten Positionierung von Gliazellen im visuellen System von *Drosophila*, wie im Ergebnis- und Diskussionsteil ausführlich dargelegt wird.

2.3 Axonale Wegfindung

2.3.1 Allgemeine Mechanismen

Die retinalen Projektionen im optischen System von *Drosophila* basieren auf grundlegenden axonalen Wegfindungsmechanismen, die innerhalb der Tierreichs hochkonserviert sind. Selbst relativ einfach aufgebaute Invertebraten, wie der Nematode *Caenorhabditis elegans* oder die Fruchtfliege weisen erstaunliche Übereinstimmungen mit Wirbeltieren bezüglich den molekularen Prozessen in der axonalen Wegfindung auf (Chisholm und Tessier-Lavigne, 1999).

Die Entstehung neuronaler Netzwerke beruht auf der Fähigkeit von Axonen und Dendriten ihren synaptischen Partner zu lokalisieren und zu erkennen. Das Neuron sendet sein Axon oft über eine relativ große Entfernung in Richtung seiner Zielregion, wobei der Wachstumskegel, als hochdynamische Leitstruktur an der Spitze des Axons, auf abstoßende und anziehende Signale seiner Umgebung reagiert und so durch das embryonale Gewebe geleitet wird. Diese extrazellulären Signale können entweder lokal via direktem Kontakt wirken (*short range cues*) oder über eine weite Distanz mittels chemotaktischer Gradienten operieren (*long range cues*). Zu den prominentesten *short range cues* gehören die membranständigen Semaphorine,

Cadherine und Ephrine, während die diffusiblen Netrine und Slitproteine zu den bekanntesten *long range cues* gehören (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

Die wegweisenden Signale (*guidance cues*) werden über Rezeptoren wahrgenommen und aktivieren intrazellulär spezifische Signaltransduktionskaskaden, die über einen dynamischen Umbau des Zytoskeletts im Axonkegel die Wachstumsrichtung des Nervenfortsatzes kontrollieren. Dabei weist die Transduktionsmaschinerie eine erstaunliche Plastizität auf, die es dem Axonkegel ermöglicht auf ein und dasselbe Signal entweder attraktiv oder repulsiv zu reagieren, in Abhängigkeit vom zellulären Kontext (Dickson, 2002). Diese Bifunktionalität ist im Ansatz verstanden und beruht wohl auf vielfältigen Modulationen der beteiligten Moleküle. Im Einzelnen bestimmt u.a. die Zusammensetzung der zytoplasmatischen Untereinheiten der betreffenden Signalrezeptoren (Bashaw und Goodman, 1999) und deren Interaktion (Stein und Tessier-Lavigne, 2001) die Antwort des Axonkegels auf ein *guidance cue*. Ferner sind die intrazellulären Komponenten der Signaltransduktionskaskade (cAMP, cGMP, Ca^{2+} bzw. Proteinkinase A und G) wichtige Determinanten in der Richtungsgebung des Axons, da deren Konzentration bzw. Aktivitätsstärke die anziehende Wirkung eines Signals konvertieren kann und vice versa (Dickson, 2002; Cooper, 2002).

Eine Schlüsselstellung in der Signalintegration nehmen die GTPasen der Rho-Familie ein (z.B. Rac, Rho, Cdc42), bei denen sich die vielfachen Transduktionswege zu bündeln scheinen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Generierung bestimmter Zytoskelettstrukturen und setzen damit die wegweisenden Signale der Membranrezeptoren in eine Aktin-vermittelte Bewegung des Wachstumskegels um (Giniger, 2002; Dickson, 2001).

2.3.2. Die axonale Zielfindung im optischen System von *Drosophila*

Der Aufbau des topographischen Musters von Photorezeptoraxonen in den optischen Ganglien kann als dreistufiger Prozess angesehen werden: Erstens, die Wegweisung des Axons in die Zielregion, zweitens, die Wahl der spezifischen Zielzellen durch den Axonkegel und drittens, die Ausbildung funktionaler Synapsen mit den Zielneuronen (Clandinin und Zipursky, 2002). Die Prinzipien der axonalen Wegfindung (siehe Punkt 2.3.1) und der Synaptogenese sind bereits gut verstanden. Dagegen ist relativ wenig über den zweiten Punkt bekannt, d.h. der Auswahl des korrekten synaptischen Partners, nachdem das Axon sein Zielgewebe (den optischen Lobus) erreicht hat.

Welche Faktoren veranlassen die PR-Axone sich während der larvalen Phase geordnet zu faszikulieren, R1-R6 in der Lamina stoppen zu lassen, um sie nach der pupalen Defaszikulierung ihren korrekten Laminacartridges zuzuordnen, aber die R7- und R8-Axone durch die Lamina hindurch in die Medulla zu schleusen?

Die Bedeutung der Gliazellen für das erste Einwachsen der PR-Axone in den optischen Lobus und für das Stoppen von R1-R6 Axonkegel in der Lamina wurde bereits unter Punkt 2.2.4 dargestellt. Neuere Untersuchungen öffneten durch ungerichtete Mutagenesen bzw. die anschließende genaue Analyse des visuellen Systems der Mutanten, als auch mittels genetischer Interaktionsstudien weitere Einblicke in die zellulären und molekularen Mechanismen, welche die hohe Spezifität und Präzision der retinalen Projektionen kontrollieren.

Es stellte sich zunächst heraus, dass die korrekte Zielfindung nicht nur abhängig ist von der Interaktion zwischen dem Axon und seinen Zielneuronen, sondern auch von Wechselwirkungen zwischen den Afferenzen selbst. Eine genetische Ablation von bestimmten R1-R6 Subtypen hat zur Folge, dass die verbliebenen R1-R6 Axone falsche Laminacartridges wählen (Clandinin und Zipursky, 2000). Ferner zeigten die Autoren anhand von Mutantenanalysen, dass sogar die genaue Position des Axone innerhalb des einlaufenden ommatidialen Faszikels die synaptische Spezifität von R1-R6 beeinflusst.

Die Interaktionen zwischen den R1-R6 Axonen spielen, neben den Gliazellen, vermutlich auch eine wichtige Rolle beim initialen Erkennen der Lamina als ihren Zielort. In Mutanten des Gens *brakeless* (*bks*), welches für einen Transkriptionsfaktor codiert, projizieren nahezu alle R1-R6 Axone durch die Lamina in die Medulla, obwohl das restliche visuelle System normal erscheint, auch bezüglich der Laminaglia (Senti et al., 2000; Rao et al., 2000). Interessanterweise fanden Kaminer et al. (2002) heraus, dass Brakeless spezifisch in R2 und R5 die Expression von Runt reprimiert, welches gewöhnlich nur in R7 und R8 Rezeptoren exprimiert wird. In *bks*-Mutanten kommt es also zu einer ektopischen Expression von Runt in R2 und R5, was dazu führt, dass nicht nur R2 und R5 Axone, sondern auch R1, R3, R4 und R6 ohne Laminastopp in die Medulla ziehen. Damit wird zweierlei deutlich: Erstens spielen die Interaktionen zwischen R2 und R5 mit den anderen Axonen der R1-R6 Klasse eine kritische Rolle in der Laminaterminierung ihrer Wachstumskegel; zweitens kontrollieren *bks* und *runt* vermutlich Gene, welche bestimmte Signalsysteme im Axonkegel zur Erkennung von gliären Stoppsignalen regulieren (Clandinin und Zipursky, 2002).

Weitere Daten belegen, dass neben nukleären Faktoren vor allen auch Zellmembran-gebundene Proteine eine wichtige Funktion in der axonalen Zielerkennung ausüben. Einen

sehr ähnlichen, wenn auch vergleichsweise schwächeren, mutanten Phänotyp wie *brakeless* zeigen Mutationen in Genen, welche für die Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen Lar und PTP69D codieren; diese Proteine sind u.a. in der Zellmembran aller Photorezeptoraxone lokalisiert (Clandinin et al., 2001; Garrity et al., 1999). Die relativ schwachen R1-R6 Projektionsfehler dieser Mutanten zeigen, dass Lar bzw. PTP69D hier keine instruktive, sondern lediglich eine permissive oder redundante Aufgabe in der Zielfindung von R1-R6 Axonen übernehmen, ähnlich ihrer Rolle in der axonalen Wegfindung von Motoneuronen (Desai et al., 1996).

Ein weiteres Zellmembranprotein, das Adhäsionsmolekül N-Cadherin, das in allen PR-Axonen und auch deren Zielneuronen in Lamina und Medulla exprimiert ist (Lee et al., 2001), reguliert zellautonom die korrekte Laminacartridge-Wahl von R1-R6 Axonen. Entfernt man selektiv die Cadherin-Funktion in R1 und R6, so vermögen deren Axone nicht mehr über die Laminaoberfläche zu ihren wildtypischen synaptischen Partnern auszuwachsen (Clandinin et al., 2001). Die Autoren vertreten die Ansicht, dass N-Cadherin hier weniger die Interaktion zwischen den PR-Axonen vermittelt, sondern vielmehr die zwischen den Axonen und ihren Zielzellen (Clandinin und Zipursky, 2002). Diese Theorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein selektiver Verlust der N-Cadherin Aktivität in R7-Rezeptoren dessen Axone in der Medullaschicht von R8 ektopisch terminieren lässt (Lee et al., 2001; Clandinin et al., 2001), d.h. aufgrund des N-Cadherin-Mangels wird kein stabiler Kontakt zwischen dem R7-Axonkegel und dem Neuropil des R7-Zielgebietes aufgebaut. N-Cadherin vermittelt also auch Interaktionen zwischen den R7-Axonen und ihren spezifischen Schichten im Medullaneuropil.

Auch die Phänotypen von *Lar*-mutanten R1-R6 und R7 Rezeptoren, deren Axone in wildtypisches Zielgebiet projizieren, sind diesbezüglich nicht von den N-Cadherin-Mutanten zu unterscheiden (Clandinin et al., 2001; Maurel-Zaffran et al., 2001). Lar könnte demnach die Interaktionen von N-Cadherinen modulieren oder aber parallel dazu eine ähnliche Funktion ausüben. Für beide Annahmen gibt es Hinweise. Aufgrund biochemischer Studien in Vertebraten kann einmal gefolgert werden, dass die Rezeptor-Tyrosine-Phosphatase Lar positiv die N-Cadherin-vermittelte Adhäsion reguliert, in dem sie das Protein β -Catenin dephosphoryliert, welches an der zytoplasmatischen Domäne von N-Cadherin gebunden ist und es mit dem Zytoskelett verbindet (Taylor und Garrity, 2003; Clandinin und Zipursky, 2002; Kypta et al., 1996). Die Verbindung zum Zytoskelett könnte Lar aber auch über andere Signalwege herstellen, beispielsweise über die Actin-regulierenden Proteine Enabled und Trio, mit denen es genetisch interagiert (Maurel-Zaffran et al., 2001) und damit einen parallelen Weg in der Kontrolle der R7-Terminierung beschreiten (Taylor und Garrity, 2003).

Clandinin und Zipursky (2002) favorisieren jedoch das Cadherin-basierende Zelladhäsions-system als einen zentralen Mechanismus in dem Aufbau hochgradig spezifischer Zell-Zellverbindungen, wie sie sich gerade in dem visuellen System von *Drosophila* etablieren müssen.

Zwei unlängst veröffentlichte Drosophilastudien über Flamingo (Fmi), einem weiteren Cadherin-verwandten Protein, scheinen diese Aussage zu untermauern (Lee et al., 2003; Senti et al., 2003). Das membrangebundene Flamingo-Protein vermittelt dabei im visuellen System die homotypische Interaktionen zwischen afferenten PR-Axonen, welche entscheidend zu ihrer korrekten Zielwahl beitragen. Das zeigt sich darin, dass selektiv *fmi*-mutante R1-R6 Axone auch hier ihre wildtypischen Laminacartidges verfehlten und abnorme Projektionsmuster ausbilden. Ferner zeigen spezifisch *fmi*-mutante R8-Axone Störungen der lokalen Topographie ihrer Terminalien und eine unwildtypische Bündelung in der larvalen Medulla. Damit könnte Flamingo in der R8-Terminierung eine ähnliche Funktion ausüben wie N-Cadherin bei R7.

Zu den wichtigen Mechanismen in der axonalen Wegfindung von *Drosophila* gehört auch ein konservierter Signaltransduktionsweg, der innerhalb des Wachstumskegels der Photorezeptor-axone auf das Zytoskelett einwirkt und so die Projektionen vorwärtstreibt. Die Komponenten dieser Signalkaskade sind *dreadlocks* (*dock*), das Drosophilahomolog zum humanen Adaptorprotein Nck, ferner die p21-aktivierbare Kinase *Pak* und schließlich *Trio*, ein zur Rho-Familie gehörender Guanidin Exchange Faktor (GEF) für die Drosophila Rac-GTPase (Garrity et al., 1996; Hing et al., 1999; Newsome et al., 2000). Mutationen in diesen Genen verursachen gleichwertig komplexe Phänotypen mit stark gestörten retinalen Projektionen in die optischen Ganglien, einschließlich abnormer lokaler Topographie und fehlerhafter Zielspezifität.

Über das Zusammenspiel dieser Faktoren hat man folgende mechanistische Vorstellung: Auf ein bislang unbekanntes Signal hin wird *Trio* in Zellmembrannähe aktiviert, welches über seine GEF-Domäne wiederum die Rac-GTPase aktiviert. Als Antwort auf ein anderes, ebenfalls unbekanntes Signal bindet *Dock* an *Pak* und rekrutiert es zur Zellmembran. Nur am Ort der Koinzidenz beider Signale kann GTP-gebundenes Rac an eine Untereinheit von *Pak* binden und so ihre Kinaseaktivität stimulieren. Aktiviertes *Pak* beeinflusst über die Regulation anderer Kinasen letztlich die Dynamik des Actin-Zytoskeletts und steuert gemäß der eingehenden Signale das Auswachsen des Axonskegels (Newsome et al., 2000).

Während der Mechanismus innerhalb des Wachstumskegels retinaler Axone in *Drosophila* gut erforscht ist, so ist die Kenntnis über die Rezeptoren, welche die wegweisenden Signale

empfangen und an Dock bzw. Trio weiterleiten, recht dürftig. Jedoch werden neuerdings zwei interessante Zellmembranproteine, der Insulin-Rezeptor (Song et al., 2003) und Dscam (Neves et al., 2004; Wang et al., 2002; Clandinin und Zipursky, 2002; Schmucker et al., 2000), als sog. *guidance receptors* in *Drosophila* diskutiert, welche beide an Dock binden.

Dscam ist ein Drosophilahomolog zum humanen Down-Syndrome-Zell-Adhäsionsmolekül, einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Zusammen mit Dock und Pak reguliert es die axonale Wegfindung im embryonalen ZNS und des Bolwignervs. Bisher unveröffentlichte Studien deuten an, dass Dscam auch für die korrekte Projektion von R1-R6 und R7 benötigt wird (Clandinin und Zipursky, 2002). Das bemerkenswerteste an Dscam ist jedoch seine außerordentliche molekulare Diversität. Seine über 100 Exons können durch alternatives Spleißen in rund 38.000 (!) verschiedene Proteine translatiert werden. Diese extreme Diversität könnte eine Strategie sein, um viele verschiedene Zelloberflächen zu markieren und damit trotz einer relativ beschränkten Genzahl den unzähligen Nervenzellen ihre spezifische Identität zu verleihen. Neves et al. (2004) wiesen kürzlich die Expression einer spezifischen Kollektion von Dscam-Isoformen in bestimmten Photorezeptoren von *Drosophila* nach. Beispielsweise exprimieren die R3/R4 Photorezeptorzellen nur 14 bis 50 Dscam mRNAs, selektiert aus einem Spektrum von Tausenden von möglichen Spleißvarianten. Die Autoren errechneten ferner, dass die Kombination von 3 Exons in den Photorezeptoren ausreicht, um etwa 19.000 verschiedene Zellen individuell zu kennzeichnen. Diese Ergebnisse vermitteln eine Vorstellung, wie die hohe Spezifität der retinalen Verbindungen im optischen Systems der Fruchtfliege erreicht werden kann.

Nicht minder überraschend sind die Daten bezüglich des Insulin-Rezeptors, welcher bislang nicht mit der Entwicklung des visuellen Systems von *Drosophila* in Verbindung gebracht wurde. Song et al. (2003) bewiesen, dass der Insulin-Rezeptor notwendig ist für die Wegfindung und Zielwahl der Photorezeptoraxone während ihrer Projektion ins Hirn. Insulin-Mutanten zeigen abnorme retinotopie Verbindungen unterschiedlichster Art. Die Autoren vermuten, dass der Insulin-Rezeptor auf ein extrazelluläres Signal hin Dock rekrutiert und damit seine Autophosphorylierung stimuliert. Damit scheint der Drosophila Insulin-Rezeptor sich im visuellen System als ein echter *guidance receptor* zu erweisen, welcher in der bekannten Signalkette oberhalb von Dock positioniert ist.

2.4 Das *headcase* Gen

Das in dieser Arbeit untersuchte Gen *headcase* (*hdc*) besitzt in *Drosophila* eine breite biologische Wirksamkeit. Die hierzu veröffentlichten Daten sind zwar dünn gesät, weisen aber dennoch in zwei Hauptrichtungen. Zum einen scheint *hdc* für die Differenzierung imaginaler Strukturen notwendig zu sein, zum anderen ist es an der Ausbildung der Tracheen beteiligt. Bislang nicht charakterisiert ist die Bedeutung von *headcase* für den Aufbau des visuellen Systems, welche in der vorliegenden Dissertation zum erstenmal beschrieben wird. Im Folgenden werden die wichtigsten bekannten Fakten zu *headcase* kurz erläutert und im weiteren Verlauf dieser Arbeit punktuell aufgegriffen und vertieft.

Ursprünglich wurde *headcase* während eines sog. *enhancer trap screens* bei der Suche nach Genen identifiziert, welche putativ von homeotischen Faktoren des Bithorax-Komplexes reguliert werden (Weaver and White, 1995). Dabei zeigte die *lacZ*-Linie B5 eine spezifische Expression in allen imaginalen Zellen des dritten Larvenstadiums und eine einzelne Insertion des P[*lacZ*;ry⁺]-Transposons an der zytogenetischen Position 99F. Das für dieses Expressionsmuster verantwortliche Gen wurde *headcase* genannt, da Deletionsmutationen in diesen genomischen Bereich vor allem die Entwicklung des Fliegenkopfes beeinträchtigen, was sich in einem kompletten Verlust der Kopfkapsel oder Duplikation der Kopfkutikula bzw. der Antennen äußern kann. Aber auch eine Vielzahl anderer adulter Strukturen sind in der *hdc*-Deletion massiv gestört, wie interne Kopfstrukturen (inkl. ZNS, Muskulatur, tracheale Gewebe) und bestimmte Körperanhänge (Flügel, Haltere, Beine).

Weaver und White (1995) zeigten ferner, dass die Expression des zytoplasmatischen und extrem basischen HDC-Proteins bereits ab dem 13. Embryonalstadium beginnt, sich auf alle proliferierenden Imaginalzellen ausdehnt und schließlich mit Beginn der Pupalphase endet. Die *headcase*-Expression zeichnet quasi den Wiedereintritt imaginaler Zellen in den mitotischen Zyklus vor und hält bis zur finalen Zellteilung an, d.h. bis die adulten Vorläufergewebe ihr Wachstum eingestellt haben. Da die larvalen Imaginalscheiben der pupal letalen *hdc*-Mutanten in Form und Größe wildtypisch bleiben, vermuten die Autoren, dass *hdc*-defizierte Imaginalzellen sich während der Metamorphose nicht mehr korrekt in adulte Strukturen differenzieren.

Als besonderes Merkmal besitzt *headcase* die Fähigkeit für zwei überlappende Polypeptide zu kodieren, ein langes mit 125 kDa und ein kurzes mit 70 kDa. Das wird möglich durch die Existenz eines zusätzlichen internen Stoppkodons im *headcase*-Gen (Steneberg et al., 1998;

White et al., 1995), welches durch einen neuartigen Mechanismus während der Translation überlesen werden kann. Dieses Überlesen scheint jedoch unabhängig von einem bestimmten Stoppkodon und damit auch unabhängig von spezifischen Suppressor tRNAs zu sein. Steneberg und Samakovlis (2001) identifizierten in der *hdc*-mRNA eine 80 bp lange Nukleotidsequenz unmittelbar stromabwärts des Stoppkodons, welche eine putative Haarnadelstruktur auszubilden vermag. Diese Haarnadelstruktur hat sich als notwendig und ausreichend für die Suppression des Terminationssignals erwiesen, wobei die einzelnen Komponenten zur Kontrolle dieses Suppressionsmechanismus noch unbekannt sind. *headcase* ist unter den eukaryotischen Genen damit das bislang einzige Beispiel, wo ein derartiges Überlesen eines Stoppkodons ein funktionales Protein generiert (Steneberg und Samakovlis, 2001).

Die Unterdrückung des Stoppkodons ist notwendig für die zweite Hauptfunktion von *headcase*, d.h. der Mitbeteiligung an der korrekten Ausbildung des Tracheensystems in *Drosophila*. Steneberg et al. (1998) identifizierten eine Mutante, *Fusion-6*, welche die Anzahl der unizelluläre Zweige des dorsalen Tracheenastes erhöht. Es stellte sich heraus, dass *Fusion-6* allelisch zum bereits bekannten *headcase*-Gen ist, womit für *hdc* eine weitere Funktion entdeckt war. Das HDC-Protein ist dabei in speziellen Zellen exprimiert, die im Begriff sind feine Ausläufer zu bilden, um die Tracheenäste zu einem Netzwerk zu fusionieren. Dabei verhindert *headcase*, dass Nachbarzellen sich gabeln und terminale, unizelluläre Zweige bilden. Diese Funktion übt *hdc* nicht autonom aus, sondern ist auf die Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor *escargot* angewiesen.

Die Autoren bewiesen nun, dass die Stoppkodon-Unterdrückung notwendig für die inhibitorische *hdc*-Funktion ist, da die Expression des langen HDC-Polypeptids den mutanten Tracheenphänotyp retten konnte. Weiterhin zeigten Steneberg und Samakovlis (2001), dass die inhibitorische Aktivität des langen HDC-Proteins proportional mit seiner Menge zunimmt, und dass seine relative Menge das Ausmaß des Lumens von Zellausläufern bestimmt. Das kurze HDC-Protein besitzt eine nur geringe Aktivität, ist jedoch viermal höher konzentriert als das lange. Somit könnte das Überlesen des Stoppkodons ein Mechanismus sein, um die zelluläre Extension und das Lumenwachstum von Trachealzellen präzise zu regeln.

Einige jüngst veröffentlichte Studien deuten ferner auf eine Beteiligung von *headcase* in weiteren Funktionszusammenhängen hin, die hier nur am Rande erwähnt werden sollen bzw. in der Diskussion teilweise eine Vertiefung erfahren.

Die Arbeit von Bach et al. (2003) stellt eine Verbindung zwischen *headcase* und dem Signalweg von Jak/Stat (*Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*) her, welcher pleiotrope Effekte auf viele Entwicklungsprozesse in *Drosophila* ausübt, wie z.B. Tracheenbildung, Augenentwicklung und Zellproliferation. Im Rahmen einer Suche nach neuen Regulatoren des Jak/Stat-Signalsystems zeigte sich ein mutantes *headcase*-Allel als ein spezifischer Suppressor des sog. *enlarged-eye* Phänotyps, welcher durch eine ektopische Überexpression des Jak/Stat-Liganden Unpaired in der Augenimaginalscheibe hervorgerufen wird. Die Bedeutung dieses Effekts für die Funktion von *headcase* im visuellen System wird in der Diskussion unter Punkt 5.2 und 5.3 erläutert.

Carlos Estella et al. (2003) hingegen legten dar, dass die Gene *buttonhead* (*btd*) und *Sp1* nicht nur an der Kopfentwicklung beteiligt sind, sondern ebenfalls die Entwicklung der ventralen Imaginalscheiben beeinflussen, aus denen sich die Antennen und Beinpaare herausbilden. Diesen Einfluss üben *btd*/*sp1* u.a. über eine Aktivierung des *headcase*-Gens aus, welchem sie damit in der Signalkette zur Formierung der Imaginalscheiben-Vorläuferzellen übergeordnet stehen. Diese Ergebnisse geben eine mögliche Erklärung für die anfangs erwähnten Entwicklungsstörungen bestimmter adulter Kopfstrukturen und Körperanhänge in *hdc*-Mutanten.

Schließlich präsentierten Giot et al. (2003) kürzlich eine Two-Hybrid-basierende Protein-Interaktionskarte des *Drosophila*-Proteoms. Darin zeigt HEADCASE zwei Interaktionen hoher Zuverlässigkeit (*high-confidence*), einmal mit dem Protein *Unkempt* und ein anderes mal mit CG13966, einem bisher nicht näher annotierten Polypeptid. *Unkempt* dagegen ist bereits bekannt als cytoplasmatisches Protein, welches mitunter an der Augen- und Flügelmorphogenese und der larvalen Entwicklung beteiligt ist (Mohler et al., 1992).

Zuguterletzt ist es erwähnenswert, dass ein humanes Homolog zum Drosophila *headcase*-Gen existiert, mit welchem es in der Proteinsequenz zu 42 % übereinstimmt (Makino et al., 2001; Steneberg et al., 1998). Interessanterweise wird das humane *headcase* in Verbindung gebracht mit der Entstehung von Pankreas- und Nierenzellkrebs, so dass sich die Grundlagenforschung über die *headcase*-Funktion an dem Modellorganismus *Drosophila* auch für den Menschen auszahlen könnte.

Innerhalb dieser breiten Wirkungspalette von *headcase* beschreibt die vorliegende Arbeit fokussiert dessen putative Rolle für die Entwicklung des visuellen Systems in *Drosophila*.

2.5 Ziele der Arbeit

Aus einer Sammlung von Fliegenstämmen mit letalen P-Elementinsertionen sollten neue Mutanten mit defekter retinaler Projektion identifiziert werden (Deak et al., 1997). Die dabei isolierte Mutantenlinie 75/04 wies Defekte im visuellen System auf und zeigte sich allelisch zu der *headcase*-Mutante *hdc*⁵⁰. Der kausale Zusammenhang zwischen Mutationsursache und phänotypischer Ausprägung sollte zunächst durch eine genetische und histologische Charakterisierung der *headcase*-Mutante und ihrer Allele bestimmt werden. Anschließend war beabsichtigt, mittels unterschiedlicher methodischer Ansätze die Funktion von *headcase* innerhalb der Entwicklung des optischen Systems zu analysieren. Dazu sollte zuerst über immunhistochemische Studien und Fluoreszenzfärbungen die Expression von *headcase* im Gewebe lokalisiert werden. Darauffolgend sollten Mosaikanalysen und Rettungsexperimente, durch die Expression einer *hdc* cDNA im mutanten Hintergrund, Aufschluss über den Ort und die Notwendigkeit der *headcase*-Funktion geben. Außerdem war geplant anhand unterschiedlicher Färbetechniken die Pleiotropie des mutanten *hdc*-Phänotyps im Detail zu verstehen, um daraus die Bedeutung von *headcase* für die Etablierung des visuellen Systems ableiten zu können. Dabei standen die retinalen Projektionen selbst, als auch deren Zielgebiete im Fokus des Interesses.

3 Material und Methoden

3.1 Fliegenstämme

Stamm	Erklärung	Herkunft	Literatur
w^{1118}	white Mutante	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
$hdc^{50}/TM3, Sb Ubx$	<i>headcase</i> Allel, Deletion	T.A. Weaver	Weaver und White, 1995
$hdc^{50}/TM6B, Hu Tb$	<i>headcase</i> Allel, Deletion		
$Sp/CyO; hdc^{50}/TM6B, Hu Tb$	<i>headcase</i> Allel, Deletion, balanciert für 2. und 3. Chromosom (Chr.)		
hdc^{B5}	<i>headcase</i> -Allel, <i>P lacZ</i> Insertion	T.A. Weaver	Weaver und White, 1995
75/04/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>headcase</i> -Allel, <i>P lacW</i> Insertion: 99F	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
88/31/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 99F	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
241/33/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 99F	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
238/09/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 67C	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
324/17/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 83B	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
404/06/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 66C	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
890/04/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 67C	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
1003/03/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 99F	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
1075/15/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
1397/05/TM6B, <i>Hu Tb</i>	<i>P lacW</i> Insertion: 67C	Deak et al., 1997	Deak et al., 1997
$w; P[FRT]82B P[Ubi-GFP]/TM6B$	P-Element mit FRT-Sequenz in 82B	Stammsammlung	Stowers und Schwarz, 1999
$w; P[FRT]82B P[Ubi-GFP] hdc^{50}/TM6B$	auf FRT-Chromosom <i>hdc</i> -Deletion rekombiniert		
$w; P[w^+, ey-Gal4] P[UAS-FLP]; P[FRT]82B P[GMR-hid3R] CL3R/TM6B$ Synonym: EGUF/ <i>hid</i>	Gal4 von eyeless-Promotor getrieben und UAS-Flipase gemeinsam auf 2. Chr.; Apoptose-Gen <i>hid</i> von GMR-Promotor getrieben und rezessive <i>cell lethal</i> Mutation gemeinsam auf 3. Chr.	Stammsammlung	Stowers und Schwarz, 1999
$w P[ry^+, hs-FLP]; P[FRT]82B /TM6B$	Flipase vom Hitzeschock-Promotor hsp70 getrieben auf 1. Chr.; P-Element mit FRT-Sequenz in 82B auf 3. Chr.	Stammsammlung	Golic, 1994
$w P[ry^+, hs-FLP]; P[FRT]82B hdc^{50}/TM6B$	auf FRT-Chromosom <i>hdc</i> -Deletion rekombiniert		
$w; UAS-hdc^{short} hdc^{50}/TM3$	kurze <i>headcase</i> cDNA unter UAS-Kontrolle und <i>headcase</i> -Deletion zusammen auf 3. Chr.	C. Samakovlis	Steneberg et al., 1998
$w; UAS-hdc^{GCA}/CyO; hdc^{50}/TM3$ Synonym für <i>hdc^{GCA}:hdc^{long}</i>	lange <i>headcase</i> cDNA unter UAS-Kontrolle auf 2. Chr.; <i>hdc</i> -Deletion auf 3. Chr. in <i>hdc</i> cDNA Stoppkodon UAA durch GCA ersetzt	C. Samakovlis	Steneberg et al., 1998
$w; P[w^+, actin-Gal4]/CyO; D^3/TM6B$	Gal4 von ubiquitären <i>actin</i> -Promotor getrieben auf 2. Chr;	Stammsammlung	Ito et al., 1997

<i>w; P[w⁺, ey-Gal4]/CyO; D³/TM6B</i>	Gal4 vom Augen-spezif. <i>eyeless</i> -Promotor getrieben auf 2 Chr.	Stammsammlung	Bonini et al., 1997
<i>w; P[w⁺, GMR-Gal4]/CyO; D³/TM6B</i>	Gal4 getrieben von einem Photorezeptor-spezifischen Promotor mit 5 Glass-Bindestellen auf 2. Chr	Stammsammlung	Hay et al., 1997
<i>w; P[w⁺, loco-Gal4]/CyO; D³/TM6B</i>	Gal4 getrieben vom Gliazell-spezifischen <i>locomotion defects</i> -Promotor auf 2. Chr.	Stammsammlung	Granderath et al., 1999
<i>w; P[w⁺, UAS-lacZ] III</i>	β -Galaktosidase unter UAS-Kontrolle auf 3. Chr.	Stammsammlung	
<i>w; Ro-τlacZ/CyO</i>	<i>tau</i> - β -Galaktosidase unter Kontrolle des <i>rough</i> -Enhancers auf 2-Chr.; spezifisch für larvale R2-R5 Photorezeptoren	Stammsammlung	Heberlein und Rubin, 1990
<i>w; Ro-τlacZ/CyO; hdc⁵⁰/TM6B</i>	<i>hdc</i> -Deletion auf 3. Chr. gekreuzt		
<i>w; Rh1-τlacZ/CyO</i>	<i>tau</i> - β -Galaktosidase unter Kontrolle des <i>Rhodopsin1</i> -Promotors auf 2. Chr.; spezifisch für adulte R1-R6 Photorezeptoren	Stammsammlung	Chou et al., 1999
<i>w; Rh1-τlacZ/CyO; hdc⁵⁰/TM6B</i>	<i>hdc</i> -Deletion auf 3. Chr. gekreuzt		
<i>w; Rh6-τlacZ/CyO</i>	<i>tau</i> - β -Galaktosidase unter Kontrolle des <i>Rhodopsin6</i> -Promotors auf 2. Chr.; spezifisch für adulte R8 Photorezeptoren	Stammsammlung	Chou et al., 1999
<i>w; Rh6-τlacZ/CyO; hdc⁵⁰/TM6B</i>	<i>hdc</i> -Deletion auf 3. Chr. gekreuzt		
<i>omb-lacZ</i> Synonym: X35	β -Galaktosidase unter Kontrolle des <i>optomotor blind</i> -Promotors auf 1. Chr.; Glia-spezifisch	B. Poeck	Poeck et al., 1993
<i>omb-lacZ; hdc⁵⁰/TM6B</i>	<i>hdc</i> -Deletion auf 3. Chr. gekreuzt		

Tab. 1: Die Genotypen der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme. Literaturangaben für Balancerchromosomen und dominante Marker siehe Lindsley und Zimm (1992).

Die Fliegenstämme wurden auf Standard Hefe-Maismehl-Agar Medium, versetzt mit 3g/l Nipagin, gehalten. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 65% und die Temperatur, welche nur für Hitzeschockexperimente variiert wurde, 25°C.

3.2 Antikörper

Antikörper	Bemerkung	Herkunft	Larve	Schnitte	Literatur
mAB 24B10	Maus, monoklonal, gegen Chaoptin, spezifisch für Photorezeptormembran	S. Benzer	1:100 IC+FL	1:500 IC+FL 1:1000 IC+FL	Zipursky et al., 1984
anti-HDC (U33)	Maus, monoklonal, gegen Headcase	R. White	1:4 IC 1:6 FL	1:10 IC in Larve; 1:50, 1:500 IC im Adulten	Weaver und White, 1995
anti-REPO	Kaninchen, polyklonal gegen Repo	DSHB	1:100 IC 1:200, 1:300 FL		Xiong et al., 1994

mAB dac2-3	Maus, monoklonal, gegen Dachshund	DSHB	1:50 IC		Mardon et al., 1994
mAB 7E8A10	Ratte, monoklonal gegen Elav	DSHB	1:50 IC 1:100 FL		Robinow und White, 1991
anti-β-Gal	Maus, monoklonal gegen β-Galaktosidase	DSHB	1:50 IC 1:100 IC+FL	1:50 IC in Adulten; 1:100 IC in Larve;	
anti-β-Gal	Kaninchen, monoklonal gegen β-Galaktosidase	Cappel	1:100, 1:200 FL	1:500, 1:1000 FL	
anti-BrdU	Maus, monoklonal gegen Bromodeoxyuridin	DSHB	1:50 IC		
anti-FasII	Maus, monoklonal gegen Fasclin II	DSHB	1:100 IC		Lin et al., 1994b
anti-FasIII	Maus, monoklonal gegen Fasclin III	DSHB	1:25 IC		Kose et al., 1997
anti-irreC	Maus, monoklonal gegen IrreC/Roughest	Fischbach	1:100 IC		Reiter et al., 1995
anti-mouse IgG	Ziege, polyklonal gegen Maus IgG, hrp-gekoppelt	BioRad	1:50, 1:100 IC	1:500, 1:1000 IC	
anti-rabbit IgG	Ziege, polyklonal gegen Kaninchen IgG, hrp-gekoppelt	Cappel	1:50, 1:100 IC		
anti-rat IgG	Ziege, polyklonal gegen Ratte IgG, hrp-gekoppelt	Jackson Laboratories	1:100 IC		
anti-mouse IgG	Ziege, polyklonal gegen Maus IgG, DTAF-gekoppelt (grün leucht.)	Jackson Laboratories	1:100, 1:150, 1:200 FL	1:500 FL	
anti-rabbit IgG	Ziege, polyklonal gegen Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt (rot leuchtend)	Jackson Laboratories	1:200, 1:300 1:400, 1:1000 FL	1:500, 1:1000 FL	
anti-rat IgG	Ziege, polyklonal gegen Maus IgG, Cy3-gekoppelt (rot leuchtend)	Cappel	1:100 FL		

Tab. 2: Antikörper. Die Tabelle enthält die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper, wobei Letztere entweder Peroxidase- oder Fluoreszenz-gekoppelt waren. IC: Immunhistochemie, FL: Fluoreszenzfärbung, DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, hrp: *horseradish peroxidase* =Meerrettich-Peroxidase.

3.3 Angewandte Methoden

3.3.1 Immunhistochemie und Fluoreszenz an larvalen Ganzhirnpräparaten

Die Augen-Hirn-Komplexe von Larven wurden in eiskaltem PBT (PBS: Phosphat gepufferte Saline mit 0,5 % Triton X-100 (Tx); für Headcase-Färbung 0,1 % Tx) freipräpariert und anschließend in 4 % Paraformaldehyd/PBT für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) fixiert (variiert je nach primärem Antikörper: Dachshund 20 min/RT, Repo 45 min/RT, Headcase 120 min/auf Eis, restliche Antikörper wie im Standardprotokoll angegeben). Nach dreimaligem Waschen mit PBT wurden unspezifische Bindestellen mindestens 30 Minuten

mit PBT/4 % Ziegenserum (PBTS) geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in PBTS. Am folgenden Tag wurden die Präparate erneut dreimal mit PBT gewaschen und 3-4 Stunden bei RT mit dem sekundären Antikörper in PBTS inkubiert.

Die Präparate mit Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpern wurden während der Inkubation im Dunkeln gehalten, anschließend dreimal mit PBT gewaschen und in 80 % Glycerin/PBS vorübergehend gelagert. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Augen-Hirn-Komplexe auf einen Objektträger in Vectashield H-1000 Medium (schützt vor Ausbleichen der Fluoreszenz; Vector Laboratories) überführt. Die Fluoreszenz der Präparate konnte mit dem Mikroskop Axiophot (Zeiss) und dem Kamerasytem Intas (Lindthaler&Co.Vision-Control) als Einzel- oder Doppelfärbung beobachtet werden. Bei Doppelfärbungen wurden die Ganzhirnpräparate parallel mit zwei primären bzw. sekundären Antikörpern behandelt. Die Absorption/Emission des fluoreszenten Farbstoffs DTAF beträgt 492/520 nm, während die von Cy3 550/570 nm aufweist.

Die Larvenhirne mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern wurden nach dem Inkubationsschritt dreimal mit PBT gewaschen, dann eine Minute mit 0,5 % Glutaraldehyd/PBT nachfixiert (minimiert unpezifische Peroxidaseaktivität) und wiederum dreimal in PBT gewaschen. Der Farbniederschlag erfolgte durch Inkubation der Präparate in einer Lösung aus 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) und Wasserstoffperoxid (Sigma DAB Tablettensystem). Anschließend wurden die Larvenhirne nochmals 5 Minuten in 0,5 % Glutaraldehyd/PBT inkubiert und damit die Färbung gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit PBT wurden die Präparate in 80 % Glycerin/PBS aufbewahrt. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte nach dem Transfer der Larvenhirne auf einen Objektträger und abschließendem Eindeckeln in Kaiser's Glycergel (Merck). (Protokolle verändert nach Sullivan et al., 2000).

3.3.2 Zellkern-Markierung (DAPI-Färbung)

Zur subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden Einzelfluoreszenzpräparate von larvalen Augen-Hirn-Komplexen wie oben beschrieben (Punkt 3.3.1) angefertigt. Vor dem Transfer in 80 % Glycerol/PBS wurden sie jedoch 5 Minuten mit 0,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidine-2-phenylindole), einem DNS-bindenden Fluoreszenzfarbstoff (Sigma) mit einer Absorption /Emission von 360/450 nm, bei RT gegengefärbt und erneut dreimal mit PBT gewaschen (nach Sullivan et al., 2000).

3.3.3 S-Phasenmarkierung (BrdU-Färbung)

Um mitotisch aktive Zellen darzustellen wurde deren S-Phase markiert. Dazu sind Larven des späten dritten Stadiums in Drosophila Schneider's Medium (Gibco BRL) präpariert worden und die Augen-Hirn-Komplexe für 90 Minuten in 7,5 mg/ml BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine; Boehringer) und Schneider's Medium bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBT wurden die Präparate 15 Minuten in 4 % Paraformaldehyd/PBT bei RT fixiert, worauf erneut ein PBT-Waschschnitt und eine 30 Minuten lange Inkubation in 4 N HCL/PBS bei 4°C folgte. Wiederum wurde zweimal mit PBT gewaschen und für 1 Stunde in PBTS bei 4°C geblockt, bevor über Nacht mit dem primären anti-BrdU-Antikörper in PBTS bei 4°C inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde viermal mit PBT gewaschen und anschließend 3 Stunden mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper in PBTS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen, zweimal mit PBT und einmal mit PBS, folgte eine Nachfixierung mit 1 % Glutaraldehyd/PBT, worauf nach zweimaligem Waschen mit PBT die DAB-Färbung entsprechend dem Protokoll unter 3.3.1 durchgeführt wurde. Eine 15 Minuten lange Inkubation in 1 % Glutaraldahyd/PBT stoppte die Farbreaktion und die Larvenhirne wurden noch zweimal gewaschen, einmal mit PBT und einmal mit PBS, und schließlich in 80 % Glycerin/PBS gelagert (Protokoll verändert nach Sullivan et al., 2000).

3.3.4 Immunhistochemie und Fluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten

Für die Antikörperfärbung an Gefrierschnitten wurden adulte, entrüsselte Köpfe zunächst in 4% Paraformaldahyd/PBS für 3-4 Stunden auf Eis fixiert, dann dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 25 % Saccharose/PBS über Nacht bei 4°C eingelegt.

Larvenhirne wurden entweder ebenso behandelt (bei anti-HDC-Färbung an *w¹¹¹⁸* Larven) oder die Fixierung erfolgte nach dem Schneiden 20 Minuten lang mit gleichem Fixans (bei anti-β-Galaktosidase-Färbung an *hdc^{B5}* Larven, wobei die Hirne nicht aus dem Gewebeverband präpariert, sondern von ganzen Larven Querschnitte im Kopfbereich angefertigt wurden).

Zum Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Präparate im Tissue-Tek-Medium (Sakura) angeordnet, im flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels eines Kryostaten (Leica) in 10 µm dicke Scheiben bei -20°C geschnitten. Die Gefrierschnitte wurden dabei auf SuperFrostPlus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Zur Färbung wurden die Schnitte ca. 5 Minuten bei 45°C (Wärmeplatte) aufgetaut, zweimal mit 0,1 % PBT gewaschen (diese PBT-Konzentration wurde in allen weiteren Waschungen verwendet) und für 2 Stunden mit 2 % Pferdeserum in PBT geblockt. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (bzw. zwei primären Antikörpern gleichzeitig bei Doppelfluoreszenz-Färbungen) in PBT über Nacht bei 4°C und am folgenden Tag eine zweimalige PBT-Waschung (dritter Tag der Färbung).

Für die Immunhistochemie wurde der Vectastain ABC Kit (Elite PK6100 Standard; Vector Laboratories) verwendet, ein Streptavidin-Biotin-Peroxidase System zur Verstärkung der Färbung, welche anschließend mit dem Sigma DAB-Tablettensystem durchgeführt wurde (siehe oben). Durch Waschen mit PBS (min. 10 Minuten) wurde die Farbreaktion gestoppt, dann die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und mit Kaiser's Glycergel für die Lichtmikroskopie eingedeckelt. (Protokoll verändert nach Buchner et al. (1986)).

Für die Fluoreszenz wurden die Schnitte am dritten Tag der Färbung lediglich mit den sekundären, fluoreszierenden Antikörpern in 2 % Pferdeserum/PBT für 4 Stunden bei RT (im Dunkeln) inkubiert, dann dreimal mit PBT gewaschen und die Objektträger mit Vectashield H-1000 Medium eingedeckelt. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie oben beschrieben.

3.3.5 Semidünnschnitte

Zur Durchführung tangentialer Semidünnschnitte von adulten Augen wurden die Fliegenköpfe entrüsselt und in 5 % Glutaraldehyd/PBT (PBS mit 0,5 % Triton X-100) über Nacht fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBT wurden die Köpfe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 99.5%) je 10 Minuten entwässert, dann zweimal 10 Minuten mit Propylenoxid inkubiert und in eine 1:1 Propylenoxid/Epon-Mischung überführt, welche sich über Nacht verdichtete. Die Präparate wurden in epongefüllte Förmchen eingebettet, über Nacht bei 60°C ausgehärtet und davon 2 µm dünne Serienschnitte angefertigt. Nach einer Färbung in 1 % Toluidinblau/1 % di-Natriumtetraborat wurden die Schnitte in DPX-Medium (Fluka) eingedeckelt.

3.3.6 β -Galaktosidasefärbung

Die Färbungen wurden nach Sullivan et al. (2000) durchgeführt.

3.3.7 Mosaikanalyse

Bei dieser Methode wurden in somatischen Zellen, die heterozygot für die *headcase*-Mutation *hdc⁵⁰* waren, mit Hilfe des FLP-Rekombinase/FRT Systems (Xu und Rubin, 1993) Chromosomenbrüche induziert, die in hoher Frequenz zur Rekombination zwischen den homologen Chromosomen führten. Dazu wurde *hdc⁵⁰* zunächst auf den rechten Arm des 3. Chromosoms rekombiniert, welcher nah am Centromer (in 82B) ein P-Element mit einer FRT-Sequenz aufwies. Die FLP(Flipase)-Rekombinase erkennt die FRT-Sequenz und bewirkt mitotische Rekombination zwischen den betreffenden Chromosomenarmen (Golic, 1994).

Die Flipase-vermittelte Rekombination wurde einerseits durch Hitzeschock-Applikation und andererseits durch die Anwendung der EGUF/hid-Methode (Stowers und Schwarz, 1999) ermöglicht. Die Hitzeschock-induzierbare Flipase (hs-FLP) wurde in den FRT-*hdc⁵⁰*-Stamm gekreuzt und mittels eines einstündigen Hitzeschocks (37°C, Wasserbad) im frühen dritten Larvenstadium (3 Tage nach Eiablage) zur Expression gebracht. Anhand des Augenfarbengens *white* konnten die induzierten homozygoten *hdc⁵⁰*-Augenklone (ohne *white*) von außen identifiziert werden.

Die EGUF/hid-Methode von Stowers und Schwarz (1999) ist eine Kombination des FLP/FRT-Systems mit dem GAL4/UAS System (Brand und Perrimon, 1993) über ein UAS-FLP-Konstrukt. Damit konnte das adulte Auge vollständig homozygot für *hdc⁵⁰* gestaltet werden, während der restliche Körper *hdc⁵⁰*-heterozygot blieb. Hierzu wurde die EGUF/hid-Transgene (*eyeless*-Gal4, UAS-Flipase/GMR-hid) in den FRT-*hdc⁵⁰*-Stamm gekreuzt und die Flipase somit *eyeless*-getrieben in allen Augenvorläuferzellen exprimiert. Das GMR-*hid* Konstrukt ist stromabwärts von der FRT-Sequenz positioniert und induziert die Apoptose aller *hdc⁵⁰*-heterozygoter Photorezeptorzellen im Auge während der Metamorphose.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung von Mutanten mit defekter retinaler Projektion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war eine Kollektion von Fliegenstämmen mit letalen P-Elementinsertionen auf dem 3. Chromosom. Diese von Deak et al. (1997) im Rahmen einer P-Element Mutagenese etablierte Sammlung wurde am Lehrstuhl verwendet, um nach Mutanten in der Gehirnentwicklung von *Drosophila* zu suchen, wobei Störungen im retinalen Projektionsmuster von besonderem Interesse waren.

Von den ursprünglich 2460 drittchromosomalen P-Elementstämmen erhielt der Lehrstuhl ca. 1200 Linien, welche erst nach der späten dritten Larve letal und damit für eine Untersuchung des visuellen Systems zugänglich waren. Die retinalen Projektionen des dritten Larvenstadiums sind bereits so weit entwickelt, dass sie immunhistochemisch gut nachgewiesen und auf Projektionsdefekte hin untersucht werden können. Für den immunhistochemischen Nachweis des visuellen Systems stand der monoklonale Antikörper 24B10 zur Verfügung, der spezifisch mit dem Protein CHAOPTIN der Photorezeptoren reagiert (Fujita et al., 1982; Zipursky et al., 1984).

Von 1015 untersuchten Stämmen wiesen 146 spezifische Defekte in der retinalen Projektion auf und wurden als potenzielle axonale Wegfindungsmutanten weiteren Analysen unterzogen (Fischer, 1998; Meier, 2000), wovon 32 Stämme in der vorliegenden Arbeit näher und daraus vier Linien im Detail erforscht wurden (siehe Punkt 4.2).

Bevor eine weitergehende Analyse der mutanten P-Elementstämme erfolgen konnte, war es zunächst notwendig bei den zu untersuchenden Linien den Kausalzusammenhang zwischen einer definierten P-Elementinsertion und der den Phänotyp verursachenden Mutation nachzuweisen, da bei transposonalen Mutagenesen häufig transiente und multiple Insertionen auftreten (Engels, 1996).

Für die meisten der 32 Stämme lagen bereits zytologische Kartierungen, als auch so genannte *plasmid rescues* vor (Koch, 1997; Meier, 2000), anhand derer der genaue Insertionsort der P-Elemente im Genom bestimmt werden konnte. Durch diese physikalische und molekularbiologische Lokalisation war es möglich weitere Fliegenstämme in den internationalen Stammsammlungen anzufordern, die an den betreffenden Stellen ebenfalls eine homozygot letale Mutation aufwiesen, und zwar verursacht entweder durch ein anderes P-Element (EP(3)-Linien), durch eine Punktmutation (l(3)-Linien) oder gar eine Deletion (Defizienz=Df(3)-Linien).

Die bestellten Fliegenstämme wurden anschließend mit den 32 Transposonstämmen gekreuzt und auf Komplementation bezüglich Phänotyp und Letalität hin überprüft.

Falls nun das Transposon die Ursache für den Phänotyp darstellt, dann sollte bei dem Komplementationstest (K-Test) die F1-Generation mit dem heterozygoten Genotyp P[w⁺;lacW] über EP(3), l(3) oder Df(3), den gleichen oder noch stärkeren Phänotyp zeigen als der homozygote P-Elementstamm.

Parallel dazu wurden die 32 P-Elementstämme über mehrere Generationen mit wildtypischen Fliegen (w¹¹¹⁸) gekreuzt, um sie mittels freier Rekombination von Sekundärmutationen zu befreien. Gemäss dem *hit and run* Modell von Engels (1996) kann es im Zuge einer Mutagenese, durch mehrfaches Inserieren und unpräzisem Wiederausschneiden von Transposons, zu einer Anhäufung solcher Mutationen kommen. Anschließend konnten die sauber gekreuzten Fliegenstämme erneut über Balancerchromosomen stabilisiert und ihr Phänotyp immunhistochemisch bestimmt werden.

Innerhalb der 32 untersuchten Linien konnten bei den 8 folgenden ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der P-Elementinsertion und dem mutanten Phänotyp ermittelt werden: 75/04, 88/31, 238/09, 324/17, 404/06, 890/04, 1075/15, 1397/05. Diese Stämme zeigten auch nach dem Sauberkreuzen deutliche retinale Projektionsstörungen mit einer Penetranz von etwa 30 % bis 95 %, wobei 6 Linien ihre pupale Letalität verloren haben. Das heißt, bei 2 Linien verursacht die Transposoninsertion sowohl den Phänotyp als auch die Letalität, während bei den 6 anderen nur die Projektionsdefekte hervorgerufen werden und somit deren Letalität in Sekundärmutationen begründet war.

Von den 8 Stämmen wiesen 3 (238/09, 324/17 und 890/04) nach einem K-Test mit l(3)-Linien keine Komplementation bezüglich mutantem Phänotyp, wohl aber in Hinblick auf die Letalität auf, was darauf schliessen lässt, dass die P-Elementinsertion tatsächlich die axonalen Defekte verursacht, nicht aber die Letalität. Von den Linien 404/06 und 1075/15 stehen noch K-Test aus, während die restlichen Linien sich als allelisch zu anderen Stämmen erwiesen (1397/05 zu 238/09; 75/04 zu 88/31).

Wie erwähnt war es mit Hilfe der *plasmid rescues* möglich DNS-Abschnitte zu isolieren und zu sequenzieren, welche das Transposon flankieren und damit den genomischen Insertionsort genau zu bestimmen. Die ermittelten Insertionsorte der 8 P-Elementlinien liefern dadurch einen Hinweis auf weitere potentielle Gene, welche an der axonalen Wegfindung beteiligt sind. Besonders auffällig zeigten sich in diesem Zusammenhang die Projektionsdefekte der Linien 75/04 und 88/04, deren P-Elemente innerhalb des Gens *headcase* (*hdc*) lagen.

Dieses wurde im Folgenden detailliert untersucht, um einen tieferen Einblick in die zellulären und molekularen Grundlagen der beobachteten Phänotypen zu erhalten.

4.2 Genetische und histologische Charakterisierung der *headcase* Mutante

Die oben vorgestellte Suche nach Mutanten mit defekter retinaler Projektion innerhalb einer Sammlung drittchromosomaler P-Elementstämme wurde auf die Linien 75/04 und 88/31 fokussiert, welche eine besonders prominente Ausprägung ihres mutanten Phänotyps aufwiesen.

Bereits vorliegende *in situ* Hybridisierungen und *plasmid rescues* zeigten, dass neben 75/04 und 88/31 auch die P-Element Linien 241/33 und 1003/03 bei 99E4-F1 bzw. 99F inserieren, dem zytogenetischen Bereich des *headcase* Gens (Abb. 8).

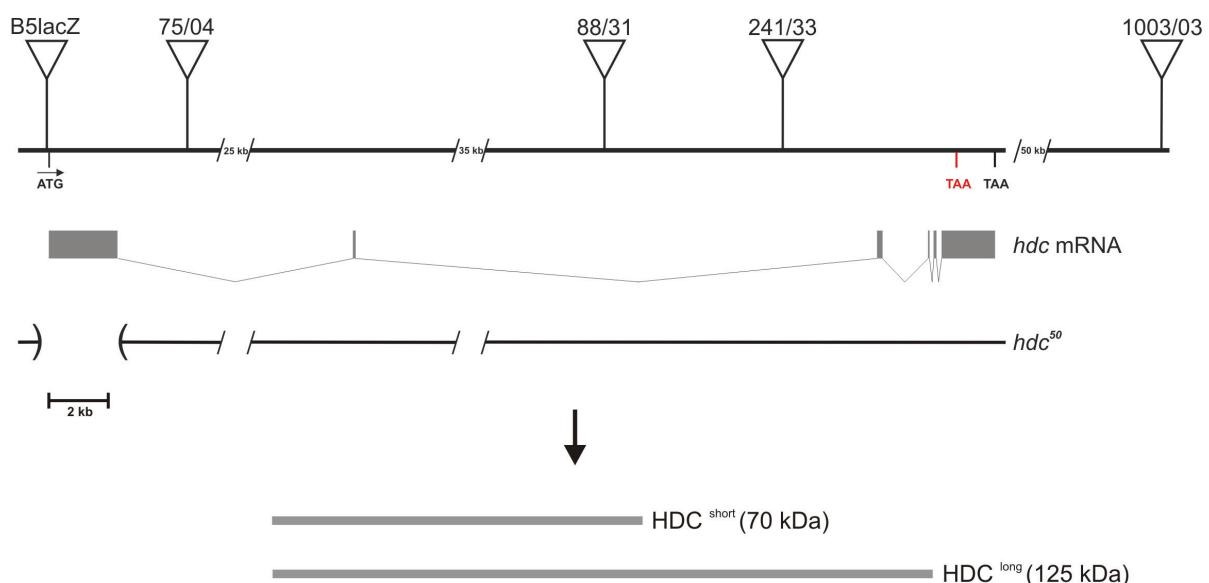


Abb. 8: Genomische Region des *headcase* Gens, inklusive der Insertionsloci relevanter P-Elemente, der *hdc* mRNA, der Defizienz *hdc*⁵⁰ sowie der zwei HDC Proteine. Die genomische Region des *headcase* Gens (Synonym CG15532) erstreckt sich über eine Länge von 84236 bp im zytogenetischen Bereich von 99E4-F1. Die P-Elemente der Linien 75/04, 88/31 und 241/33 inserieren in den ersten beiden Introns, wohingegen das Transposon der Linie 1003/03 *stromabwärts* außerhalb *hdc*-Gens lokalisiert ist. Das P-Element der *hdc*^{B5lacZ} Linie inseriert 51 bp *stromaufwärts* vor dem Translationsstart. Der längste offene Leserahmen des *headcase* Gens beträgt 3241 bp, welcher von einem internen Stoppkodon (TAA, rot markiert) an Position 2981 unterbrochen wird. Damit codiert *hdc* für zwei Polypeptide unterschiedlicher Größe: Eine kurze Form *HDC*^{short} (649 Aminosäuren (aa), 70 kDa) und eine lange Form *HDC*^{long} (1080 aa, 125 kDa). Die 2620 bp lange Deletion in der amorphen *hdc*⁵⁰-Mutante beginnt 254 bp vor ATG und betrifft somit den Transkriptionsstart, wodurch kein Protein mehr gebildet wird (nach Weaver und White, 1995; Steneberg et al., 1998).

Um auch hier einen ursächlichen Zusammenhang zwischen P-Elementinsertion und mutantem Phänotyp nachzuweisen, wurden Deletionsmutanten vom *headcase*-Gen angefordert und mit den P-Elementlinien gekreuzt. Insgesamt sind 4 *hdc*-Defizienzstämme bekannt, von denen die zwei Nullallele *hdc*⁴³ und *hdc*⁵⁰ freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Robert A.H. White (Cambridge) bereitgestellt wurden; larvale ZNS- und Imaginalscheibenextrakte dieser Linien zeigten im Westernblot keinen Proteinnachweis (Weaver und White, 1995; Steneberg et al., 1998).

Aufgrund ihres robusten Phänotyps, welcher später noch genauer analysiert wird, wurde im Folgenden nur die *hdc*⁵⁰-Fliegenlinie verwendet. Die *hdc*⁵⁰-Deletionsmutante ist ursprünglich aus der *hdc*^{B5}-Linie (Abb. 8) durch unpräzises Herausschneiden des inserierten P[*lacZ*; *ry*⁺]-Elements entstanden, nachdem es durch Einkreuzen einer Transposasequelle remobilisiert wurde (Weaver and White 1995).

Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der durchgeführten K-Tests zusammen, wobei jeweils die Penetranz des mutanten Phänotyps und die Letalität der F1-Generation dargestellt sind.

	hdc⁵⁰	75/04	88/31	241/33	1003/03
hdc⁵⁰	100 % †	17 %	wt	wt	wt
75/04		29 %	7 %	11 %	4 %
88/31			32 % †	14 %	4 %
241/33				wt †	wt
1003/03					11 %

Tab. 3: Komplementationskreuzungen mit *hdc* relevanten Linien. Die phänotypische Penetranz ist angegeben als prozentualer Anteil der mutanten Phänotypen an der Gesamtzahl der präparierten optischen Loben. Die pupale Letalität ist als Kreuz (†) gekennzeichnet. Nur die Linie 75/04 zeigt nach einem K-Test mit *hdc*⁵⁰ teils massive Defekte des visuellen Systems mit einer Penetranz von 17 %, jedoch keine pupale Letalität. Die Komplementationstests der P-Elementlinien untereinander wiesen ebenfalls keine Letalität auf und zeigten Phänotypen von milderem Ausmaß und geringerer Penetranz auf.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Linien 88/31, 241/33, 1003/03 nach Kreuzung mit *hdc*⁵⁰ sowohl den mutanten Phänotyp als auch die Letalität komplementieren. Nur der Stamm 75/04 zeigt bezüglich den axonalen Projektionsstörungen keine Komplementation, wohl aber im Bezug auf die Letalität. Damit ist der ursächliche Zusammenhang zwischen der P-Element Insertion der Linie 75/04 und dem mutanten *headcase* Phänotyp nachgewiesen.

Das bedeutet, dass die P-Elementinsertion tatsächlich die Funktion von *headcase* stört, was zu den beobachteten Defekten im visuellen System führt. Die Linie 75/04 stellt somit ein Allel vom *headcase* Gen dar und wird in der weiteren Analyse als *hdc*^{75/04} bezeichnet.

hdc^{75/04} ist homozygot lebensfähig und weist ausgeprägte Störungen im retinalen Projektionsmuster des Larvenhirns mit einer Penetranz von 62 % auf (die genaue phänotypische Charakterisierung folgt unten). Nach dem Sauberkreuzen sinkt sie auf 29 %, wobei der mutante Phänotyp erhalten bleibt (Tab. 3). Es handelt sich hier also um ein hypomorphes Allel von *headcase*.

Die Deletionsmutante *hdc*⁵⁰ ist homozygot rezessiv letal in der späten Puppe und zeigt einen noch stärkeren Phänotyp in der späten dritten Larve mit einer Penetranz von 100 %. Dagegen besitzen heterozygote *hdc*⁵⁰/+ Tiere mit der geringen Penetranz von ca. 10 % vernachlässigbar schwache Augenscheibedefekte (Daten nicht gezeigt).

Die transheterozygoten Tiere aus der Kreuzung zwischen *hdc*^{75/04} und *hdc*⁵⁰ sind pupal nicht letal. Die larvalen Projektionsdefekte im optischen Lobus sind jedoch in der Ausprägung vergleichbar mit der homozygoten *hdc*^{75/04}-Linie, wenn auch mit der geringeren Penetranz von 17 %. Damit wird die Letalität nicht von inserierten P-Element verursacht, sondern nur von der homozygoten *hdc*-Deletion.

Die folgende genauere Analyse des mutanten Phänotyps von *hdc*^{75/04} und *hdc*⁵⁰ beruht auf immunhistochemischen Färbungen retinaler Projektionen an larvalen Ganzhirnpräparaten mit dem photorezeptorspezifischen monoklonalen Antikörper 24B10.

Wie in der Einleitung erwähnt, ziehen in wildtypischen Larven (Abb. 9A) die Photorezeptoraxone (PRA) aus der Augenscheibe durch den optischen Stiel geordnet in das Gehirn ein. In der Lamina des optischen Lobus terminieren die Axone der äußeren Photorezeptoren (R1-R6), welche im Präparat als eine bogenförmige Linie starker Färbung sichtbar werden. Die Axone der inneren Photorezeptoraxone (R7+R8) wachsen weiter in die Medulla und bilden dort ein regelmäßiges Muster synaptischer Verschaltung aus. Der Bolwignerv enthält die Axone des larvalen Sinnesorgans und terminiert proximal in der Symmetriearchse der Medulla.

In den Larven der *headcase* Allele *hdc*⁵⁰ und *hdc*^{75/04} (Abb. 9B und C) sind die Photorezeptoren in der Augenscheibe weitgehend regelmäßig positioniert. Auch der optische Stiel zeigt eine wildtypische Ausprägung, bis auf einen etwas größeren Umfang. Die projizierenden PR-Axone jedoch weisen eine ganze Bandbreite an Defekten in der Lamina- und Medullaterminierung auf, welche das wildtypische Muster der optischen Loben auflösen:

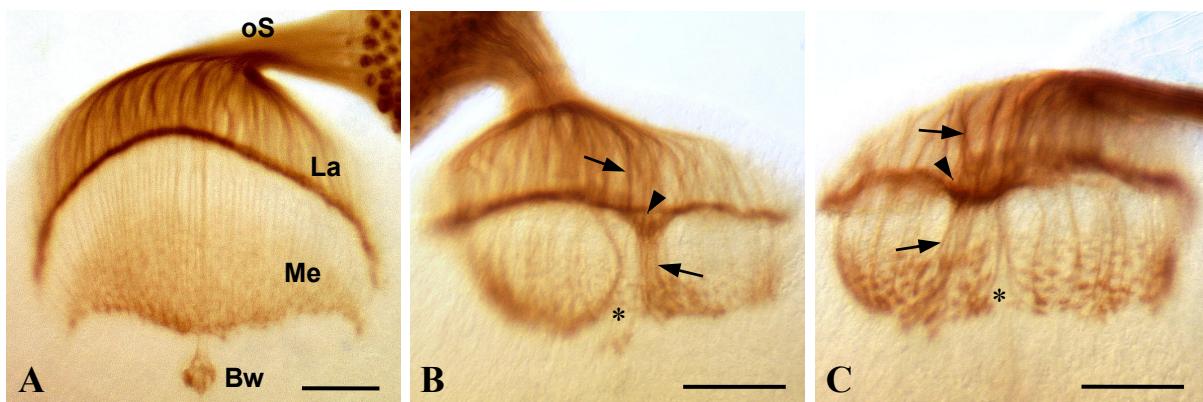


Abb. 9: Phänotypische Charakterisierung der *headcase* Mutante im larvalen Stadium. Ganzhirnpräparate von Fliegen des späten dritten Larvenstadiums wurden immunhistochemisch mit dem photorezeptorspezifischen Antikörper mAB 24B10 gefärbt. **(A)** Im Wildtyp ziehen die PRA durch den optischen Stiel (oS) in das Gehirn ein. Die Axone von R1-R6 terminieren geordnet in der Lamina (La), wohingegen R7+R8 in die Medulla (Me) projizieren und dort ein regelmäßiges Verschaltungsmuster aufbauen. Der Bolwignerv (Bw) terminiert proximal der Medulla. **(B)** In der Mutante *hdc*⁵⁰ und der P-Elementlinie *hdc*^{75/04} **(C)** laufen die PR-Axone häufig als dicke Bündel (Pfeile) in Lamina und Medulla ein und terminieren dort ungeordnet. Es kommt in beiden optischen Ganglien zur Auflösung der wildtypischen Struktur mit starker Faszikelbildung und Terminianhäufungen bzw. Lücken (Sterne) im Verschaltungsmuster. Die Laminalinie erscheint dadurch deformiert (Pfeilspitze) und die Medulla stellenweise stark hyperinnerviert. Der Bolwignerv projiziert noch weiter proximal der Medulla und breitet sich oft netzartig aus (außerhalb der Fokusebene). (anterior oben; dorsal rechts; Maßstab 50 µm)

Die Axone R1-R6 faszikulieren (meist zentral) zu dicken Bündeln und innervieren die Lamina nur ungenau. Dabei kann die im Wildtyp distinkte Laminalinie in der Mutante wellig, stufig oder zerrissen erscheinen. Des Weiteren lassen Laminalücken auf ein gemeinsames Einwachsen von R1-R6 mit den R7+R8 Axonen in die Medulla schließen, in welcher sich die Axonbündel wieder auffächern (typischer „Brokkoli“-Phänotyp von *hdc*⁵⁰). Da die Wachstumskegel von R1-R6 scheinbar ihre Zielregion nicht erkennen, wird die Medulla hyperinnerviert. Ferner lassen sich Lücken in den Medullaterminalien (oft direkt neben Faszikeln) beobachten. Das deutet darauf hin, daß Axone von R7 und R8 aus verschiedenen Ommatidien faszikulieren und nicht mehr retinotop, sondern ektopisch an verschiedenen Stellen im Medullaneuropil gehäuft terminieren. Auch die im Vergleich zum Wildtyp besonders ausgeprägte Boutonfärbung unterstützt diese Vermutung. Der Bolwignerv ist vorhanden, projiziert aber noch weiter proximal zur Medulla und fächert sich im Zielgebiet netzartig auf.

Die Gesamtheit der larvalen Defekte deutet zunächst auf eine Kombination aus gestörter Zielfindung der PR-Axone einerseits und fehlerhaftem Auswachsen der Wachstumskegel andererseits hin.

Im Vergleich zu den in der Entwicklung stehenden Larven, treten die defekten Projektionsmuster noch deutlicher in dem bereits manifestierten optischen System von Adulten hervor. Da die *hdc⁵⁰* Mutante erst in der Puppe stirbt, konnte das visuelle System fast adulter Tiere (*pharate adults*) untersucht werden. Hierzu wurden horizontale Gefrierschnitte von Köpfen dieser Tiere angefertigt und immunhistochemisch mit dem 24B10-Antikörper gefärbt.

Im Wildtyp sind die von den PR-Axonen retinotop innervierten Lamina- und Medullasäulen (engl. *cartridges*) fast parallel zueinander angeordnet. Zwischen Lamina und Medulla bilden die Axone ein zentral gelegenes optisches Chiasma (Abb. 10A). In den *hdc⁵⁰* Mutanten dagegen treten mit einer Penetranz von 100 % (12/12) massive Defekte in der Gehirnarchitektur auf. Wie in Abbildung 10B zu sehen, ist die regelmäßige Säulenstruktur der Lamina gestört, wodurch sie gedrungen erscheint. Das Chiasma erscheint lateral deplaziert, da sich die Medulla während der Pupalphase nicht vollständig gedreht hat und nun fast senkrecht zur Lamina steht.

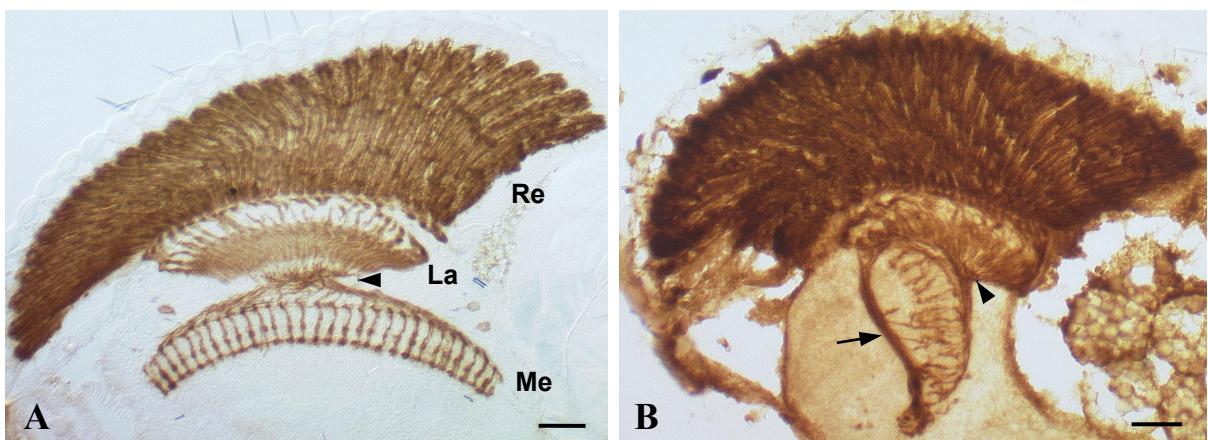


Abb. 10: Phänotypische Charakterisierung der *headcase* Mutante im adulten Stadium. Horizontale Gefrierschnitte von Köpfen fast adulter Tiere (*pharate adults*) wurden immunhistochemisch mit dem photorezeptorspezifischen Antikörper mAB 24B10 gefärbt. (A) Das wildtypische visuelle System weist eine geordnete Architektur von Retina (Re), Lamina (La), äusseres Chiasma (Pfeilspitze) und Medulla (Me) auf. Die äusseren Photorezeptoren R1-R6 projizieren in die Lamina, während die inneren Photorezeptoren R7+R8 in der Medulla terminieren. (B) Die *hdc⁵⁰*-Mutante zeigt Deformationen im säulenförmigen Aufbau der Retina und beiden optischen Ganglien und ektopisch projizierende Bündel von Photorezeptoraxonen (Pfeil). Das Laminaneuropil ist stark komprimiert, das Chiasma erscheint dezentral plaziert (Pfeilspitze) und die Medulla ist bezüglich ihrer Rotation und ihrem Verschaltungsmuster fehlerhaft. (anterior rechts; Maßstab 50 µm).

Die Medullasäulen der R7+R8 Axone sind zwar vorhanden, aber sehr unregelmäßig und weitgehend nicht linear angeordnet. Am deutlichsten aber fallen dicke retinale Axonbündel auf, welche nicht durch das Chiasma laufen, sondern ektopisch in die Medulla einwachsen (Bypass-Phänotyp).

Die säulenförmigen Photorezeptorzellen der Retina scheinen anterior noch wildtypisch parallel zueinander angeordnet, werden jedoch zum posterioren Ende hin zunehmend unstrukturierter. Tangentiale Semidünnsschnitte an adulten Komplexaugen von hdc^{50} (und von hdc^{50} -Augenmosaik-Fliegen, siehe Punkt 4.4.1.2) bestätigen die retinalen Defekte. Die Anordnung der Ommatidien zueinander ist unregelmäßig und die Anzahl der Rhabdomere pro Ommatidium ist variabel.

Die beschriebenen Defekte im adulten visuellen System treten mit einer Penetranz von 93 % (27/29) auch bei den lebensfähigen, transheterozygoten Mutanten $hdc^{50}/hdc^{75/04}$ auf, nicht jedoch bei der homozygoten P-Element Linie $hdc^{75/04}$, welche ebenfalls lebensfähig ist. Wahrscheinlich werden die in der Larve noch mutanten Effekte des schwachen $hdc^{75/04}$ Allels während der gravierenden pupalen Umstrukturierung des Auges und der optischen Ganglien kompensiert, so dass im adulten Tier kein mutanter Phänotyp mehr erkennbar ist (siehe schwache Penetranz in Larve!).

hdc^{50} -defiziente Larven zeigen also mutante Phänotypen in den retinalen Projektionen bei nahezu intakter Augenscheibe (Daten nicht gezeigt), während adulte hdc^{50} -Tiere sowohl in Retina, als auch im Hirn Störungen aufweisen. Aus der phänotypischen Mutantenanalyse lässt sich daher postulieren, daß *headcase* für das visuelle System mindestens in zweifacher Hinsicht wichtig ist: Zum einen für die axonale Wegfindung der PR-Axone und zum anderen für die strukturelle Entwicklung der Photorezeptoren während der pupalen Metamorphose.

Diese Aussagen werden gestützt nicht nur durch die Beobachtung einer starken Hochregulierung der HDC-Expression während der Pupalphase (Weaver und White, 1995), sondern auch durch die folgende Funktionsanalyse des *headcase*-Gens. Diese deutet darüber hinaus auf weitere Aufgaben von *hdc*, sowohl innerhalb der speziellen Entwicklung des visuellen Systems von *Drosophila*, als auch ihrer allgemeinen Organentwicklung.

FUNKTIONSANALYSE

Die Frage nach der Funktion von *headcase* innerhalb der postulierten Prozesse lässt sich auf verschiedenen Wegen klären. Einerseits geben Expressionsstudien Hinweise auf den Ort der Funktion. Andererseits lassen Experimente mit klonalen Mosaiken und ektopisch exprimierter *headcase*-cDNA Rückschlüsse darauf zu, ob die *hdc*-Funktion in bestimmten Geweben notwendig oder gar hinreichend ist, um ein wildtypisches optisches System aufzubauen.

4.3 Untersuchungen zur Expression von *headcase*

Für die Expressionsstudien waren sowohl monoklonale Antikörper gegen das HDC-Protein verfügbar, als auch die Enhancer-Trap-Linie *hdc*^{B5}, welche ein P[*lacZ*; *ry*⁺]-Element im *hdc* Lokus aufweist. Bei diesem Transposon steht das bakterielle β-Galaktosidase-Gen unter Kontrolle eines schwachen Promotors und benötigt daher für seine Expression endogene Enhancer (O’Kane und Gehring, 1987). Das Expressionsmuster des Reporters β-Galaktosidase entspricht somit dem endogenen Expressionsmuster des *headcase*-Gens. Mittels einer histochemischen Übersichtsfärbung mit X-Gal an Embryos, Larven und Puppen von *hdc*^{B5} konnten Weaver und White (1995) bereits zeigen, dass *headcase* in allen proliferierenden imaginalen Zelllinien exprimiert wird, inklusive aller Imaginalscheiben und in sich entwickelnden optischen Zentren. Anknüpfend an diese Ergebnisse wurde die HDC-Expression untersucht, mit besonderem Augenmerk auf das visuelle System.

4.3.1 Die Enhancer-Trap-Linie *hdc*^{B5}

Auch hier kommt es nach einer X-Gal Färbung an *hdc*^{B5}-Tieren des dritten Larvenstadiums zu einer nachweisbaren β-Galaktosidase-Expression in der gesamten Augenscheibe und in weiten Teilen des optischen Lobus, wobei der blaue Farbniederschlag recht diffus bleibt (Daten nicht gezeigt). Dagegen erlauben immunhistochemische Färbungen mit β-Galaktosidase-spezifischen Antikörpern genauere Aussagen zur Expression in bestimmten Strukturen und Zellen.

Abbildung 11A zeigt eine deutliche β-Galaktosidase-Expression im gesamten Bereich der Augenscheibe, wobei Zellen sowohl posterior als auch anterior der Morphogenetischen Furche (MF) gefärbt sind; lediglich auf der Höhe der MF ist ein schmaler Streifen geringerer Färbung erkennbar, welcher auf eine reduzierte bzw. ausbleibende *hdc*-Expression in Bereich der nicht teilungsaktiven Zellen innerhalb der MF hinweist. Aus der Struktur und dem Verteilungsmuster der gefärbten Zellen lässt sich erkennen, dass neben Photorezeptoren auch andere Zelltypen betroffen sind.

Im optischen Stiel und im optischen Lobus (Abb. 11A und B) sind distinkte Zellen bzw. Strukturen gefärbt. Das Färbemuster weist dabei große Ähnlichkeit zu Gliazellmarkern wie *reversed polarity* (*repo*) oder *optomotor blind* (*omb*) auf (Punkt 4.7.3, Abb. 34A und C).

Da *repo* in subretinalen Glia exprimiert wird (Campbell et al., 1994), welche vom optischen

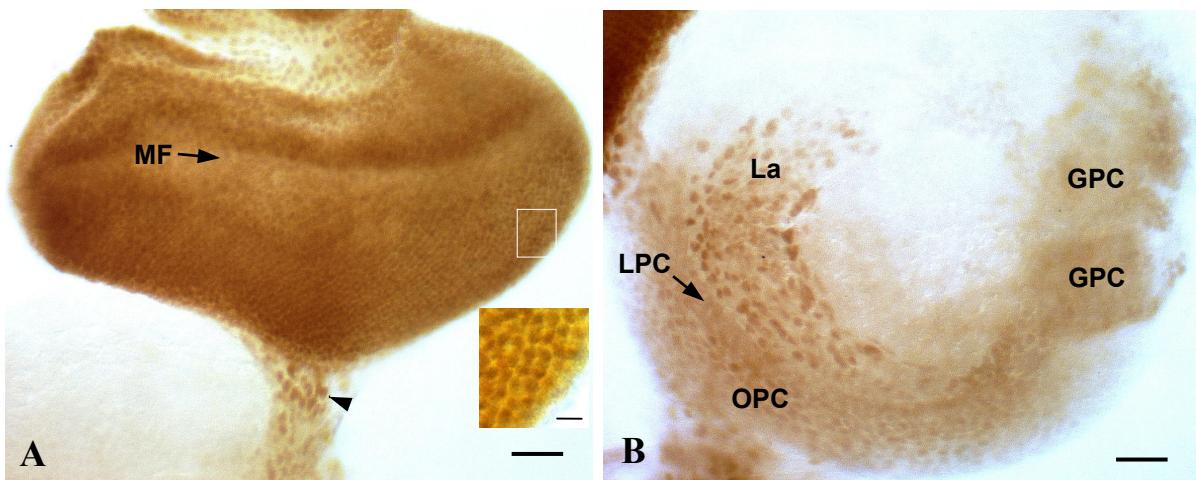


Abb. 11: Expressionsmuster der Enhancer-Trap-Linie *hdc^{B5}* im larvalen Gewebe. Die lacZ-Expression in Augenscheiben und optischen Loben von *hdc^{B5}*-Larven des späten dritten Stadiums wurden immunhistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen die β-Galaktosidase nachgewiesen. **(A)** In der Augenscheibe ist eine ubiquitäre Färbung aller Zellkerne zu erkennen, sowohl von Photorezeptoren (Vergrößerung) als auch von anderen Zelltypen (Gliazellen, Peritonealmembranzellen u.a.). Nur auf der Höhe der Morphogenetischen Furche (MF) zeigt sich ein schwächer gefärbter Zellstreifen (Pfeil). Innerhalb des optischen Stiels kommt es auch in subretinalen Gliazellen (Pfeilspitze) zur lacZ-Expression. **(B)** Im optischen Lobus sind gefärbte Zellkerne im Bereich der Lamina (La), des äußeren Proliferationszentrums (OPC) und der Laminavorläuferzellen (LPC, Pfeil) sowie den dorsalen und lateralen Gliaanlagen (GPC) zu sehen. Aus der großen Ähnlichkeit mit *repo-* bzw. *omb*-Färbemustern kann geschlossen werden, dass im Laminabereich vorwiegend Gliazellen die stärkste lacZ-Expression aufweisen. (in A anterior oben, in B anterior links, dorsal oben; Maßstab 50 µm, in der Vergrößerung 5 µm)

Stiel aus basal in die Augenscheibe einwandern (Choi und Benzer, 1994) lässt sich schließen, dass im optischen Stiel von *hdc^{B5}* ebenfalls subretinale Gliazellen gefärbt sind. Auch im Larvenhirn kann durch Vergleich mit dem *repo-* und *omb*-Färbemuster gefolgert werden, dass die stärkste Färbung überwiegend in Gliazellen und deren Proliferationszentren (GPC) auftritt (REPO wird von Gliazellen erst dann exprimiert, wenn sie in die Lamina eingewandert sind; Xiong et al. 1994; Huang and Kunes, 1998). Mit geringerer Intensität sind aber auch Neurone gefärbt, wobei insbesondere Laminazellen, die Laminavorläuferzellen (LPC) und die Zellen des äußeren Proliferationszentrums (OPC) markiert sind.

Diese Aussagen werden durch Doppelfärbungen an larvalen Ganzhirnpräparaten (Abb. 12) mit Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern gegen die β-Galaktosidase (grün leuchtend) und REPO (rot leuchtend) bestätigt.

Die überlappenden Färbemuster in Abb. 12A bis C bzw. 12D bis F lassen dabei auf eine Koexpression von REPO und somit auf eine *headcase* Expression in Gliazellen schließen, einschließlich der subretinalen Glia des optischen Stiels bzw. der Augenscheibe (Abb. 12G bis I).

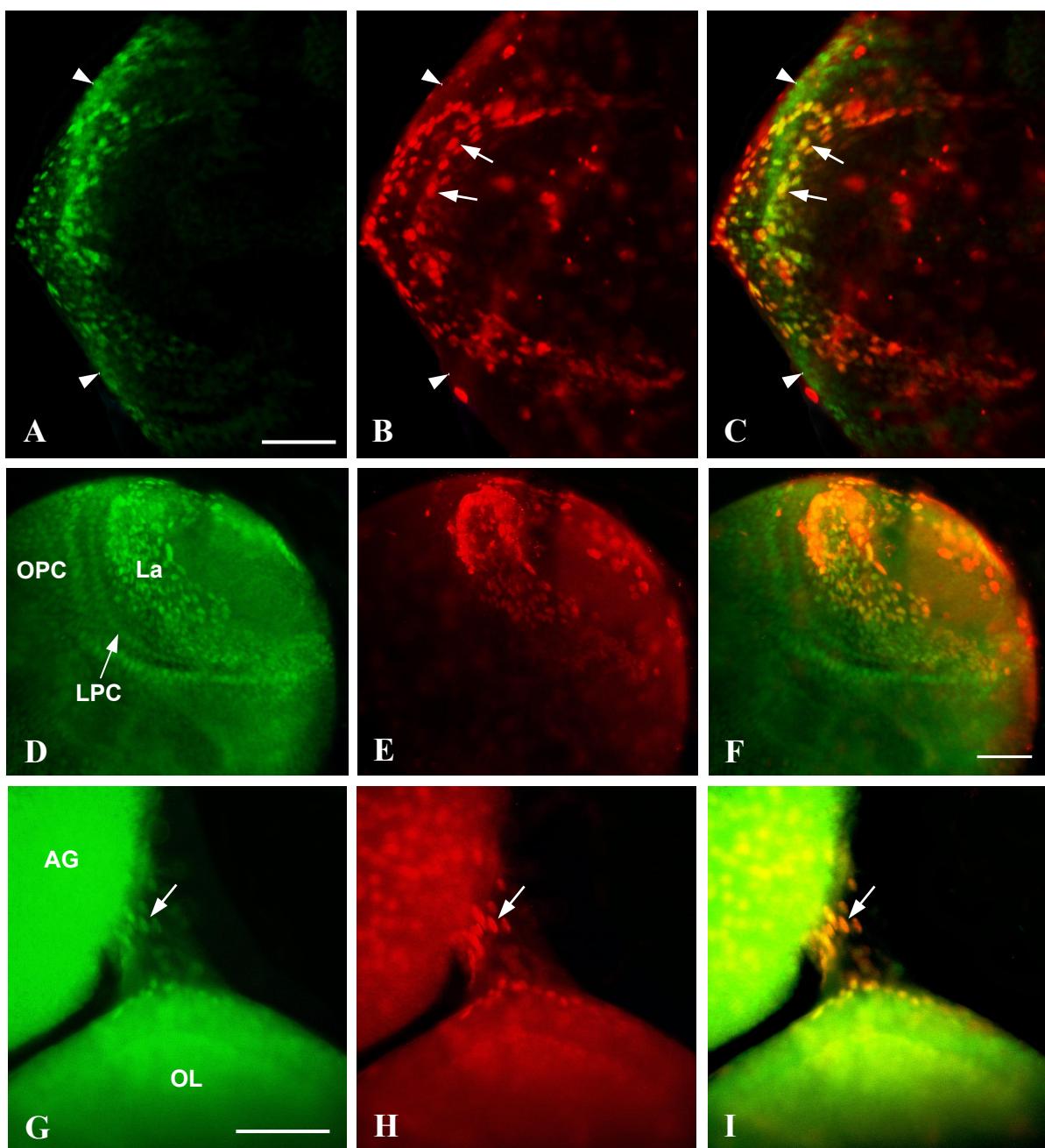


Abb. 12: Expression von *headcase* in Gliazellen und Neuronen des larvalen visuellen Systems. Im Zuge einer Doppelfärbung sind Ganzhirnpräparate von *hdc^{B5}*-Larven des späten dritten Stadiums gleichzeitig mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die β-Galaktosidase (grün) und gegen REPO (rot) inkubiert worden. (A), (B), (D), (E), (G) und (H) zeigen die jeweiligen Einzelfärbungen, (C), (F) und (I) stellen die Doppelfärbungen als Überlagerung der Einzelfärbungen dar. **(A) bis (C)** Im optischen Lobus der lacZ-Linie *hdc^{B5}* sind in der Laminaregion deutlich REPO-positive Gliazellen zu erkennen, welche ebenfalls die β-Galaktosidase exprimieren (Pfeile). Ferner können in der selben Geweberegion auch Zellen nachgewiesen werden, die nicht mit REPO überlappen und damit nur die β-Galaktosidase bilden (Pfeilköpfe). Diese nicht-gliären Zellen sind demnach Neurone des entstehenden Laminacortex bzw. deren Vorläufer. **(D) bis (F)** Eine mehr laterale Perspektive verdeutlicht die Bereiche nicht-überlappender β-Galaktosidase-Färbung in der Lamina (La) und deren Vorläuferzellen (LPC und OPC). **(G) bis (I)** Der vergrößerte Ausschnitt ist fokussiert auf Zellen innerhalb des optischen Stiels (Pfeil), wobei auch Teile der Augenscheibe (AG) und des optischen Lobus (OL) zu sehen sind. Die REPO-positiven subretinalen Gliazellen (Pfeil) im optischen Stiel koexprimieren die β-Galaktosidase. (In A-C anterior links, dorsal oben. In D-F Sicht auf die laterale Hirnoberfläche, ventral links. In G-I anterior oben, dorsal rechts; Maßstab 50 µm)

Daneben zeigen Regionen nicht überlappender β -Galaktosidase-Färbung, dass *headcase* nicht nur in Gliazellen, sondern auch in den Laminaneuronen und deren Vorläuferzellen (LPC, OPC) exprimiert wird.

Immunhistochemische Färbungen mit dem β -Galaktosidase-Antikörper an horizontalen Gefrierschnitten von adulten Köpfen der *hdc^{B5}*-Linie belegen darüber hinaus, dass *hdc* fast ubiquitär im visuellen System zur Expression kommt, sowohl in der Retina, als auch in den Zellen der optischen Ganglien. Abbildung 13A zeigt einen intensiven Farbniederschlag in Pigment-, Kegel- und allen PR-Zellen (R1-R8) der Retina. Proximal davon sind vermutlich alle Gliazelltypen, u.a. subretinale Glia, Epithelial- und Marginalgia gefärbt, als auch Zellkörper monopolarer Neurone des Laminakortex. Wahrscheinlich sind auch distale und proximale Satellitenglia und Pseudocartridgeglia betroffen, welche jedoch angesichts der räumlichen Nähe zu den Zellen des Laminakortex nicht genau lokalisiert werden können. Im Bereich der Medulla und des Lobula-Komplexes sind ebenfalls die meisten Gliazellen gefärbt, u.a. Medullaglia und sog. „giant glia“ des inneren Chiasma, sowie die Zellkörper von Kortexneuronen. (Eule et al., 2000; Kretschmar und Pflugfelder, 2002).

Die dargestellte Färbung in Abb. 13A kann jedoch nicht als eine Momentaufnahme der *hdc*-Expression im adulten Tier bezeichnet werden, sondern geschieht aufgrund der Stabilität der β -Galaktosidase, welche bereits in der frühen Puppe exprimiert wurde (Weaver und White, 1995; das Ende der *hdc*-Expression korreliert mit dem Abschalten der Zellproliferation und ist im adulten Tier nicht mehr nachweisbar). Falls diese Färbung nur von der β -Galaktosidase-Stabilität abhängt, dann müsste sie aufgrund endogener Abbauprozesse mit zunehmenden Alter der Tiere schwächer werden. Genau dieses Phänomen ließ sich bei β -Galaktosidase-Färbungen mit 0 (d.h. gerade aus der Puppe geschlüpften), 7 und 14 Tage alten *hdc^{B5}* Tieren beobachten (Abb. 13B und C).

Das Neuropil des visuellen Systems adulter *hdc^{B5}* Fliegen bleibt stets ungefärbt, da die β -Galaktosidase des Transposons P[*lacZ*; *ry*⁺] eine Signalsequenz enthält, welche sie im Zellkern hält. Das lässt zunächst keine Aussagen dahingehend zu, ob das HDC-Protein selbst tatsächlich nicht im Neuropil vorkommt. Klarheit hierüber und über die generelle Verteilung des HEADCASE-Proteins geben immunhistochemische Nachweise mit einem monoklonalen Antikörper gegen HEADCASE.

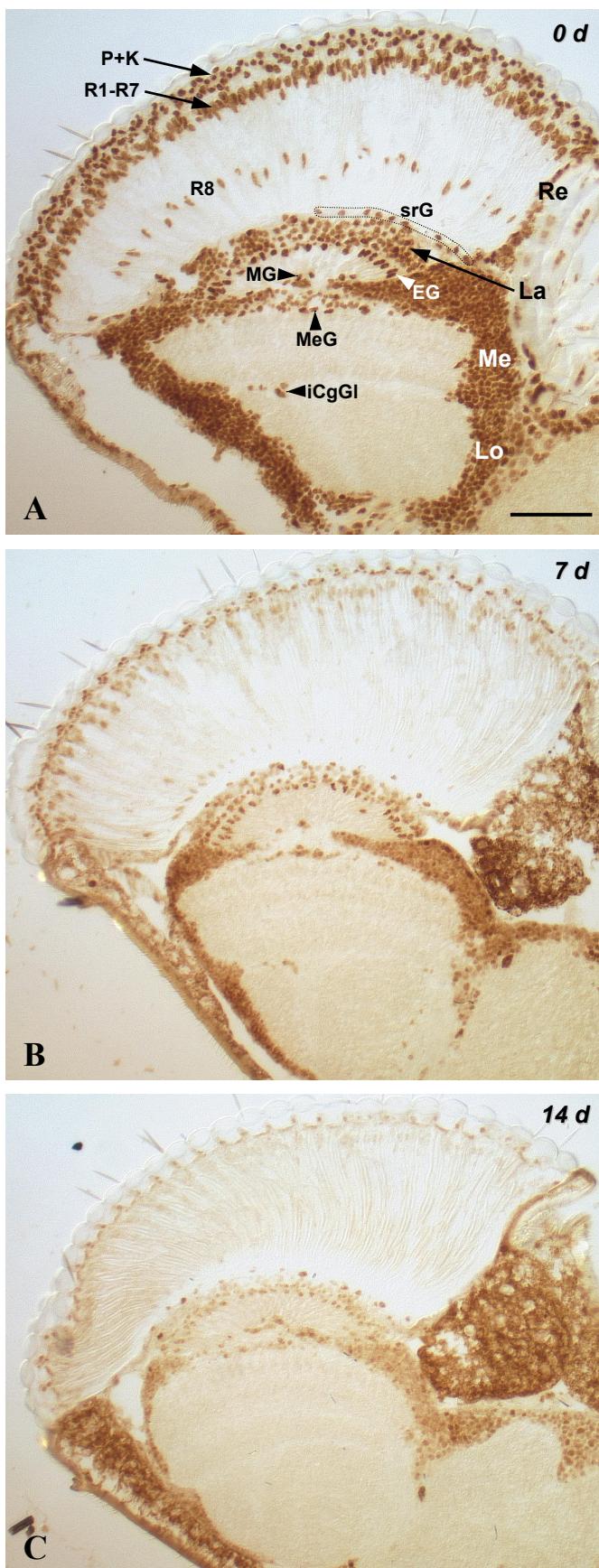


Abb. 13: Expressionsmuster der hdc^{B5} -Linie im adulten optischen System. Zum Nachweis der lacZ-Expression wurden horizontale Gefrierschnitte adulter Köpfe von 0, 7 und 14 Tage alten Fliegen des hdc^{B5} -Stammes immunhistochemisch mit α - β -Galaktosidase-Antikörpern gefärbt.

(A) 0 Tage alte (d.h. gerade aus der Puppe geschlüpfte) Fliegen zeigen die stärkste β -Galaktosidase-Expression. Dabei zeigt sich eine ubiquitäre Färbung aller Zellen (bzw. deren Zellkerne) des adulten visuellen Systems. In der Retina (Re) sind distal Pigment- und Kegelzellen (P+K) und die Photorezeptoren R1-R7 gefärbt, während weiter proximal die R8-Zellkerne zu sehen sind. Aufgrund ihrer spezifischen Lage können auch zahlreiche Gliazelltypen, wie subretinale (srG, Auswahl in gepunkteter Linie), epitheliale (EG), marginale (MG) und medulläre (MeG) Gliazellen, sowie sog. „giant glia“ des inneren Chiasma (iCgGl) identifiziert werden. Ferner sind Kortexneurone der Lamina- (La), Medulla- (Me) und Lobularegion (Lo) als gefärbt zu erkennen.

Der beobachtete Farbniederschlag stellt jedoch keine Momentaufnahme einer β -Galaktosidase-Expression im adulten Tier dar, sondern beruht auf der Stabilität der bereits im pupalen Stadium exprimierten β -Galaktosidase.

Das bestätigen die Aufnahmen von 7 und 14 Tage alten hdc^{B5} Tieren (**B** und **C**) zusammen mit den Antikörperfärbungen gegen HDC (Punkt 4.3.2.1, Abb. 16). Aufgrund dem fortschreitenden Abbau der β -Galaktosidase weist das visuelle System von hdc^{B5} eine zunehmend schwächere Färbung auf.

(anterior rechts, distal oben; Maßstab 50 μ m)

4.3.2 Expressionsanalyse mit dem monoklonalen anti-HEADCASE-Antikörper

4.3.2.1 Lokalisation von HEADCASE im Gewebe

Immunhistochemische anti-HEADCASE-Färbungen an wildtypischen, larvalen Ganzhirnpräparaten entsprechen dem β -Galaktosidase-Expressionsmuster in der hdc^{B5} -Linie. Wie in Abbildung 14A zu sehen, ist das HEADCASE-Protein ebenfalls einheitlich in fast allen Zellen (u.a. Photorezeptoren, Glia) der Augenscheibe lokalisiert, bis auf ein schmales Band geringerer Expression auf Höhe der MF.

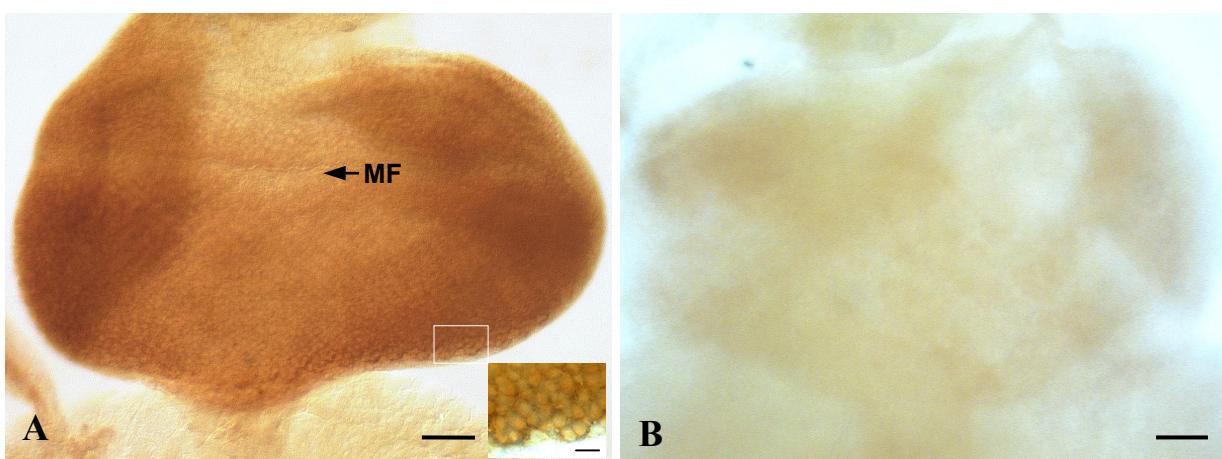


Abb. 14: Expression von HEADCASE in der Augenscheibe von Wildtyp und hdc^{50} -Mutante. Immunhistochemischer Nachweis der Expression vom HEADCASE-Protein mittels monoklonalen α -HDC Antikörpern in der larvalen Augenscheibe des Wildtyps (w^{1118}) und der Deletionsmutante hdc^{50} . (A) Die wildtypische HDC-Expression betrifft alle Zellen in der gesamten Augenscheibe (AS), bis auf einen schmalen Streifen geringerer Färbung im Bereich der Morphogenetischen Furche (MF, Pfeil). Aufgrund der gleich verteilten Färbung kann nicht auf bestimmte Zelltypen geschlossen werden, d.h. dass sowohl Photorezeptoren und deren Vorläuferzellen, als auch Gliazellen das HDC-Protein exprimieren. Dabei scheint die Färbung hauptsächlich zytoplasmatisch vorzuliegen (Ausschnittsvergrößerung). (B) In der hdc^{50} -Mutante kann kein HEADCASE-Protein nachgewiesen werden; es zeigt sich lediglich eine geringe Hintergrundfärbung. Damit ist die Funktionalität des α -HDC Antikörpers, als auch die Echtheit der HEADCASE-Färbung in (A) nachgewiesen. (anterior oben; Maßstab 50 µm, in Vergrößerung 5 µm)

Ein Signalvergleich mit der Augenscheibe der hdc^{50} Nullmutante (Abb. 14B), welche kein HDC-Protein mehr exprimiert und damit keine Färbung zeigt, bestätigt die Funktionalität und Spezifität des monoklonalen α -HDC Antikörpers und somit die Echtheit der HDC-Färbung im Wildtyp.

Leider konnte sowohl im optischen Stiel als auch im optischen Lobus nur ein recht schwaches HDC-positives Signal detektiert werden, gleichwohl es gegenüber der hdc^{50} Mutante deutlich intensiver war (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der α -HDC

Antikörper die kompakten Geweberegionen des Ganzhirnpräparates nur ungenügend zu penetrieren vermag, jedoch leichter in das vergleichsweise lockere, wenigschichtige Gewebe der Augenscheibe eindringt.

Um dennoch einen *in vivo* Nachweis von HEADCASE im optischen Lobus zu führen, wurde die Analyse auf larvale Gefrierschnitte verlegt, wodurch die inneren Gewebeformationen für die Antikörperbindung offenlagen. Abbildung 15A zeigt einen Querschnitt durch den Augen-Hirn-Komplex eines wildtypischen Tieres im dritten Larvenstadium und dokumentiert einen distinkten Farbniederschlag nicht nur in den Augenscheiben, sondern zweifelsfrei auch im optischen Lobus.

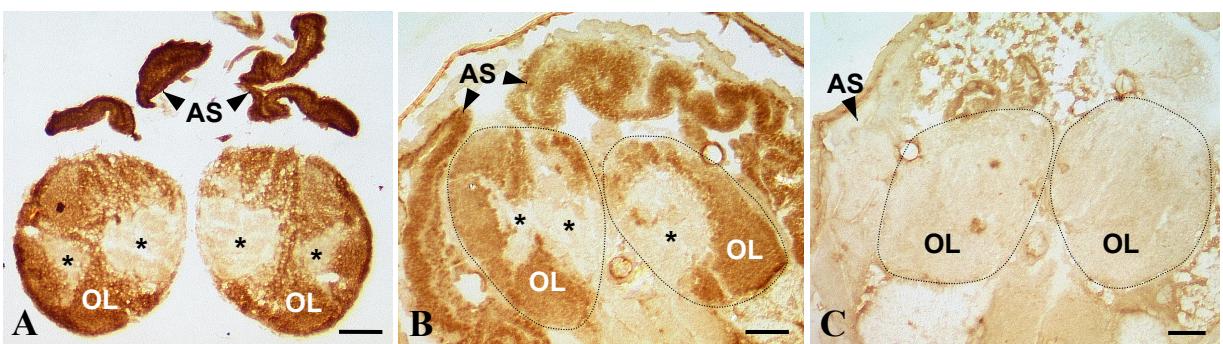


Abb. 15: Expression von *headcase* im larvalen Augen-Hirn-Komplex von Wildtyp, *hdc^{B5}*-Linie und *hdc⁵⁰*-Mutante. Gefrierschnitte larvaler Augen-Hirn-Komplexe (AHK) des *w¹¹¹⁸*-Wildtyps, der *hdc^{B5}*-Linie und der *hdc⁵⁰*-Deletionsmutante wurden immunhistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen HEADCASE (Abb. A und C) bzw. gegen die β -Galaktosidase (Abb. B) gefärbt. In Abb. A ist der AHK von restlichen Gewebe gereinigt worden, während er in Abb. B und C im Gewebeverband der Larve belassen wurde. **(A)** In wildtypischen Larven kann HEADCASE in allen Zellen des paarigen Augen-Hirn-Komplexes nachgewiesen werden, sowohl in der Augenscheibe (AS; Pfeilkopf) als auch im optischen Lobus (OL). Die Neuropilregionen (Sterne) blieben jedoch ausgespart. **(B)** Die AHK von *hdc^{B5}* Larven zeigen ein analoges Expressionsmuster, mit Färbungen in der Augenscheibe und im Hirn (gepunktete Linie), wobei auch hier das Neuropil ungefärbt bleibt. **(C)** In der *hdc⁵⁰*-Mutante konnte wie erwartet kein HEADCASE-Protein im gesamten AHK detektiert werden. (Maßstab 50 μ m)

Dabei scheint HEADCASE in fast allen Zellen vorzuliegen, nicht jedoch im entstehenden Neuropil, welches keine Färbung aufweist. Ein entsprechendes Expressionsmuster lässt sich an Gefrierschnitten von *hdc^{B5}*-Larven beobachten (Abb. 15B), d.h. die β -Galaktosidase-Expression des *hdc^{B5}* Stammes spiegelt die wildtypische HEADCASE-Verteilung wieder. Im Gegensatz dazu zeigen larvale Gefrierschnitte von *hdc⁵⁰* keine Färbung nach immunhistochemischer Behandlung mit dem α -HEADCASE Antikörper (Abb. 15C).



Abb. 16: Keine HEADCASE-Expression im optischen System des adulten Wildtyps. Gefrierschnitte vom visuellen System von 0, 7 und 14 Tage alten w^{1118} -Fliegen wurden immunhistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen HEADCASE behandelt. **(A) bis (C)** Zu keiner Zeit konnte ein spezifischer Farbniederschlag beobachtet werden und damit auch keine Expression von HEADCASE. In (C) ist lediglich eine starke Hintergrundfärbung zu sehen, welche auf einer zu langen Einwirkung des Färbemittels DAB beruht. (anterior links; Maßstab 50 µm)

In Kryoschnitten des adulten visuellen Systems von w^{1118} Fliegen konnte nach α -HEADCASE Behandlung ebenfalls keine Färbung detektiert werden. Dabei wurden die adulten Wildtypfliegen parallel zum hdc^{B5} Stamm gealtert (siehe Punkt 4.3.1) und zu den Zeitpunkten 0, 7 und 14 Tage geschnitten und gefärbt (Abb. 16A bis C). Das fehlende HDC-Signal bestätigt die Arbeiten von Weaver und White (1995), in denen eine Korrelation zwischen dem Ende der HEADCASE-Expression und dem Ende der Proliferation beschrieben ist; HDC kann somit zuletzt in der Puppe, aber nicht mehr im adulten Tier nachgewiesen werden (Die starke HDC-Expression während des Proliferationsstadiums der Imaginalscheibenmorphogenese endet innerhalb der ersten 24 Stunden der pupalen Entwicklung, d.h. wenn die Zellteilung aufhört). Gleichzeitig bestätigt das Fehlen des HDC-Signals im adulten Wildtyp, dass die Färbung in den adulten hdc^{B5} Fliegen (Abb. 13A) tatsächlich in der Stabilität der larvalen β -Galaktosidase begründet ist und nicht in der HDC-Expression des Imago. Die Daten lassen darauf schließen, daß *headcase* seine Funktion innerhalb der kritischen Entwicklungsphase vom späten Embryo bis zur frühen Puppe ausübt, in welcher durch massive strukturelle Umwälzungen imaginale Gewebe in Richtung adultes Tier modelliert wird.

Dabei sind selbstverständlich Entwicklungsprozesse mit eingeschlossen, die zum Aufbau eines optischen Systems führen, wie u.a. die Photorezeptorentwicklung und deren axonale Wegfindung, sowie die Differenzierung der optischen Ganglien.

4.3.2.2 Subzelluläre Lokalisierung von HEADCASE

Bei näherer Betrachtung der immunhistochemischen Färbung der Augenscheibe mit α -HDC am Wildtyp bzw. α - β -Galaktosidase am hdc^{B5} Stamm stellt man einen Unterschied in der subzellulären Verteilung fest (Vergrößerung in Abb. 14A und 11A). Während die β -Galaktosidase-Färbung im Zellkern lokalisiert ist, zeigt die HEADCASE-Färbung ein inverses Bild und scheint auf das Zytoplasma oder die Zellmembran beschränkt zu sein.

Daher wurde die subzelluläre Verteilung von HEADCASE mit Hilfe von Fluoreszenz-Doppelfärbungen mit Cy3-gekoppeltem α -HDC Antikörper und dem autofluoreszenten Farbstoff DAPI genauer bestimmt. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindole) bindet an die DNS und kann daher zur Markierung von Zellkernen verwendet werden.

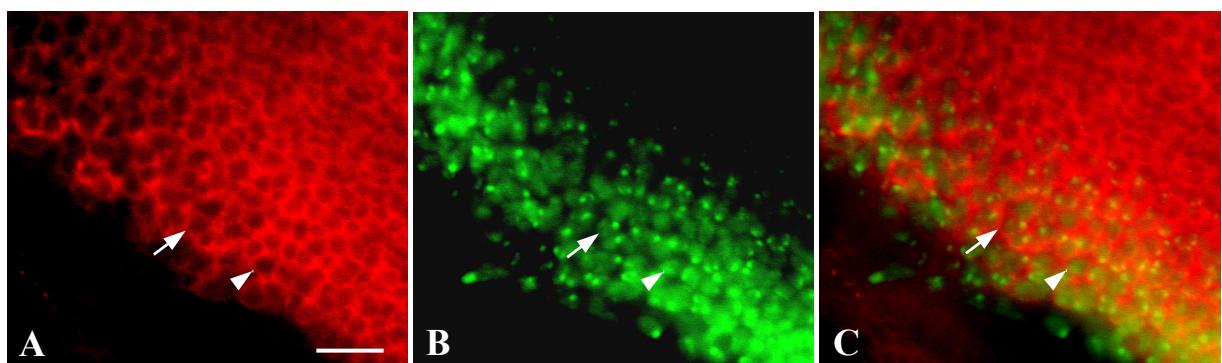


Abb. 17: Subzelluläre Verteilung des HEADCASE-Proteins in larvalen Augenscheiben. Doppelfärbungen mit Fluoreszenz-gekoppelten (Cy3, rot leuchtend) monoklonalen α -HEADCASE Antikörpern und dem autofluoreszierenden Farbstoff DAPI (grün) an wildtypischen Augenscheiben des späten dritten Larvenstadiums. **(A)** Die Einzeldarstellung der HEADCASE-Verteilung zeichnet das Muster ommatidialer Cluster von Photorezeptorzellen (Pfeil) nach, wobei das HDC-Protein im Zytoplasma bzw. in Zellmembrannähe lokalisiert ist (Pfeilkopf). **(B)** Die DAPI-Fluoreszenz (zur übersichtlichen Darstellung in grün) zeigt ein quasi inverses Bild der HDC/Cy3-Färbung (Pfeil) und markiert die Zellkerne der Photorezeptoren (Pfeilkopf), innerhalb derer die Nukleoli als hell leuchtende Punkte besonders hervortreten. **(C)** Die Überlagerung beider Einzelfärbungen belegt, dass die HEADCASE- und die DAPI-Fluoreszenz sich kaum überlappen. Somit ist HDC allein auf das Zytoplasma bzw. den Zellmembranbereich von Photozeptorzellen beschränkt und kommt als Protein nicht im Zellkern vor. (anterior oben, Maßstab 10 μm)

Die Fluoreszenzfärbungen wurden an Augenscheiben durchgeführt, da der α -HDC Antikörper diese optimal penetrieren kann. Abbildung 17 zeigt die Doppelfärbung einer wildtypischen Augenscheibe des dritten Larvenstadiums in Aufsicht. Die Einzeldarstellung in Abb. 17A des Cy3-gekoppelten α -HEADCASE Antikörpers (rot) markiert zum posterioren Rand hin u.a. das typische Muster „unreifer, ommatidialer 8-Zell Cluster“ (engl. *immature eight-cell cluster*, Wolff und Ready, 1993), dessen apikale Photorezeptorkerne von der Färbung

ausgespart sind; nur das umgebene Zytoplasma ist rot leuchtend sichtbar. Die DAPI-Färbung in Abb. 17B zeigt ein quasi inverses Bild der ommatidialen Cluster, d.h. nur die apikalen Photorezeptorkerne leuchten grün, wobei die Nukleoli als helle Punkte innerhalb der Zellkerne besonders hervortreten. Eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzen in Abb. 17C bestätigt, dass die Einzelfärbungen sich kaum überlappen und das HEADCASE-Protein somit nur im Zytoplasma bzw. im Bereich der Zellmembran lokalisiert sein kann. Identisch durchgeführte Doppelfluoreszenzfärbungen an mutanten *hdc⁵⁰*-Augenscheiben wiesen kein HDC-positives Signal auf, womit die Echtheit der HEADCASE-Färbung beim Wildtyp bewiesen ist (Daten nicht gezeigt).

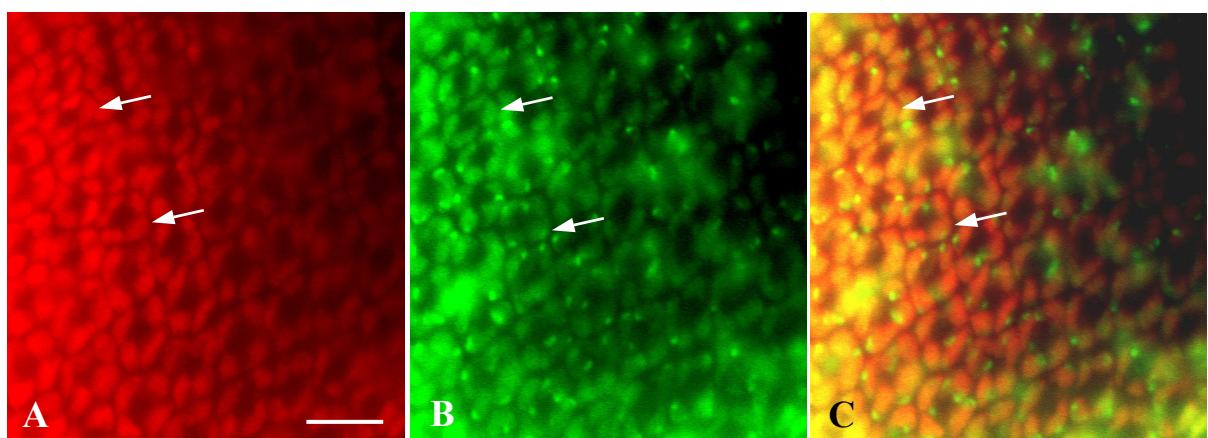


Abb. 18: Subzelluläre Expression des *headcase*-Gens in der Augenscheibe der *hdc^{B5}*-Linie. Doppelfärbungen mit Fluoreszenz-gekoppelten (Cy3) monoklonalen α - β -Galaktosidase Antikörpern und dem autofluoreszenten Farbstoff DAPI an Augenscheiben von *hdc^{B5}*-Larven des späten dritten Stadiums. **(A)** Die rote Einzelfluoreszenz zeigt die Verteilung des Reporterproteins β -Galaktosidase in den apikalen Zellkernen ommatidialer Photorezeptorcluster (Pfeile). **(B)** Die grüne DAPI-Fluoreszenz lokализiert die Zellkerne der Photorezeptoren im selben Muster wie in Bild A, wobei die Nukleoli wiederum als helle Punkte hervortreten. **(C)** Die Überlagerung der Abb. A und B weist eine vollständige Deckungsgleichheit der Einzelfluoreszenzen auf und beweist die nukleäre Lokalisierung der β -Galaktosidase. (anterior oben, Maßstab 10 μm)

Entsprechende DAPI-Untersuchungen an Augenscheiben des *hdc^{B5}* Allels mit Cy3-gekoppelten Antikörpern gegen die α - β -Galaktosidase, demonstrieren die Kongruenz beider Fluoreszenzen und damit die Lokalisation der β -Galaktosidase in den apikalen Photorezeptorkernen (Abb. 18A bis C). Dabei stellt die rote Einzelfärbung in Abb. 18A das markante sog. „symmetrische 8-Zell Cluster“ (engl. *symmetrical eight-cell cluster*) der sich entwickelnden Ommatidien dar, die zu diesem Zeitpunkt eine charakteristische bilaterale Symmetrie besitzen (Wolff und Ready, 1993).

Die Beobachtung prominenter und vollständiger Ommatidiencluster bei der Analyse der subzellulären HDC-Lokalisation und der *hdc*-Expression in der *hdc^{B5}*-Linie (Abb. 18A und

Abb. 13A) bestätigen, daß HEADCASE nicht auf bestimmte Zelltypen in der Augenscheibe beschränkt ist, sondern in der Tat ubiquitär in allen am Ommatidienaufbau beteiligten Zellen (einschließlich Photorezeptoren und nicht-neuronalen accessorischen Zellen) vorliegt.

Zusammenfassend erlauben die Versuche zur HEADCASE-Expression folgende Aussagen:

- 1) Das HEADCASE-Protein wird ubiquitär im Auge und Hirn der Larve bzw. Puppe, aber nicht im adulten Tier exprimiert
- 2) Es ist dort sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen lokalisiert. Im sich entwickelnden Auge kann HDC nicht nur in allen Photorezeptorzellen (R1-R8), sondern auch in den accessorischen Pigment- und Kegelzellen und in subretinalen Glia nachgewiesen werden.
- 3) Subzellulär ist HEADCASE auf den Zellkörper beschränkt und kommt nicht im Neuropil vor. Es ist im Zytoplasma lokalisiert, aber nicht im Zellkern.

4.4 Mosaikanalyse zur Lokalisation der *hdc*-Funktion

Die Expressionsdaten geben zwar Hinweise auf den möglichen Ort der *headcase* Funktion, aber noch keine konkreten Indizien oder gar Beweise für dessen Notwendigkeit am korrekten Aufbau des visuellen Systems. Ob *headcase* in einem bestimmten Gewebe (Auge, optischer Lobus etc.) funktional notwendig ist, kann unter anderem durch die Induktion von *somatischen Mosaiken* festgestellt werden. Diese Mosaike enthalten mitotische Klone, welche homozygot für die gewünschte Mutation in einem ansonsten heterozygoten Gewebe sind. Sie entstehen dadurch, dass in einem heterozygoten Hintergrund mittels geeigneter Methoden Chromosomenbrüche in somatischen Zellen induziert werden. Durch eine anschließende Rekombination können Zellklone entstehen, die für bestimmte Chromosomenarme homozygot sind, inklusive den darauf lokalisierten Mutationen. Anhand passender Marker lassen sich die Klone visualisieren und deren Zellen histologisch untersuchen.

Im Fall von *headcase* wurden somatische Klone im Auge von *Drosophila* durch zwei verwandte Methoden erzeugt, welche beide auf dem FLP-Rekombinase System beruhen (Xu und Rubin, 1993). Zum einen konnten unter Verwendung einer Hitzeschock-induzierten Flipase partielle Klone im Auge induziert werden; zum anderen war es mittels der EGUF/hid Methode von Stowers und Schwarz (1999) möglich, das adulte Auge vollständig homozygot mutant für *headcase* zu gestalten, wobei der restliche Körper heterozygot blieb. Dabei kommt es mit dem Beginn der pupalen Phase bzw. mit der abklingenden Zellteilung in der larvalen

Augenscheibe, zu einer Apoptose der heterozygoten Zellen, wodurch das Auge letztlich nur noch aus homozygot mutanten Zellen besteht.

4.4.1 EGUF/hid-induzierte hdc^{50} -Mosaik

4.4.1.1 Larvale hdc^{50} -Mosaik

Wie schon bei der Charakterisierung des hdc^{50} -Phänotyps (Punkt 4.2) wurden auch hier larvale Ganzhirnpräparate der EGUF/hid- hdc^{50} -Tiere immunhistochemisch mit dem 24B10-Antikörper gefärbt und das visuelle System untersucht. Da die Augenscheiben der untersuchten Genotypen stets ein weitgehend wildtypisches Muster ihrer ommatidialen Anlagen aufwiesen (Daten nicht gezeigt), beschränkte sich die Detailuntersuchung des visuellen Systems auf Projektionsstörungen in den optischen Loben. Dabei zeigte eine semiquantitative Analyse der beobachteten Phänotypen, dass hdc^{50} -homozygote Photorezeptoren axonale Projektionsdefekte in einem wildtypischen (d.h. für hdc^{50} heterozygotem) Gehirn aufweisen, wenn auch mit deutlich milderem Schweregrad und verminderter Penetranz als bei vollständig hdc^{50} mutanten Tieren. Der Beweis, daß hdc^{50} -homozygot mutante PR-Axone tatsächlich ein wildtypisches Zielgebiet im Hirn vorfinden, wird später unter Punkt 4.7.2 dieser Arbeit geführt, mit immunhistochemischen Untersuchungen spezifischer Markerproteine der betreffenden Gewebe.

Die Abbildung 19 fasst die Ergebnisse der semiquantitativen Mosaik-Analyse zusammen, wobei der Lamina- und der Medullaphänotyp der axonalen PR-Projektionen gesondert bewertet, d.h. gemäß dem Schweregrad seiner Defekte klassifiziert wurde.

Addiert man die prozentualen Anteile der Phänotypklassen „mittel, schwer und laminalos“ bzw. „leicht und ~wt“ zusammen, so zeigen die Lamina-Defekte (Abb. 19B) der EGUF/hid- hdc^{50} Tiere ein nahezu paritätisches Verhältnis von 53 % zu 47 % zwischen den beiden Kategorien, während bei den vollständig hdc^{50} -mutanten Tieren mit 96 % zu 4% (mit Sp/CyO-Marker) bzw. 79 % zu 21% (ohne Marker) der Schwerpunkt eindeutig bei den schweren Projektionsfehlern liegt. Dennoch zeigen die hdc^{50} -Mosaik im Vergleich zur Mosaik-Kontrolle (EGUF/hid-wt mit 13 % zu 87 %) ein Übergewicht an „mittleren bis schweren“ Projektionsdefekten.

Die vereinzelt in der Mosaik-Kontrolle auftretenden nicht-wildtypischen Phänotypen hängen vermutlich mit dem benutzten EGUF/hid-System zusammen; da die Apoptose der heterozygoten Zellen wie erwähnt erst mit der Pupalphase bzw. mit der abklingenden Zellteilung beginnt, werden möglicherweise nicht alle Zellen rechtzeitig ersetzt, so dass einige

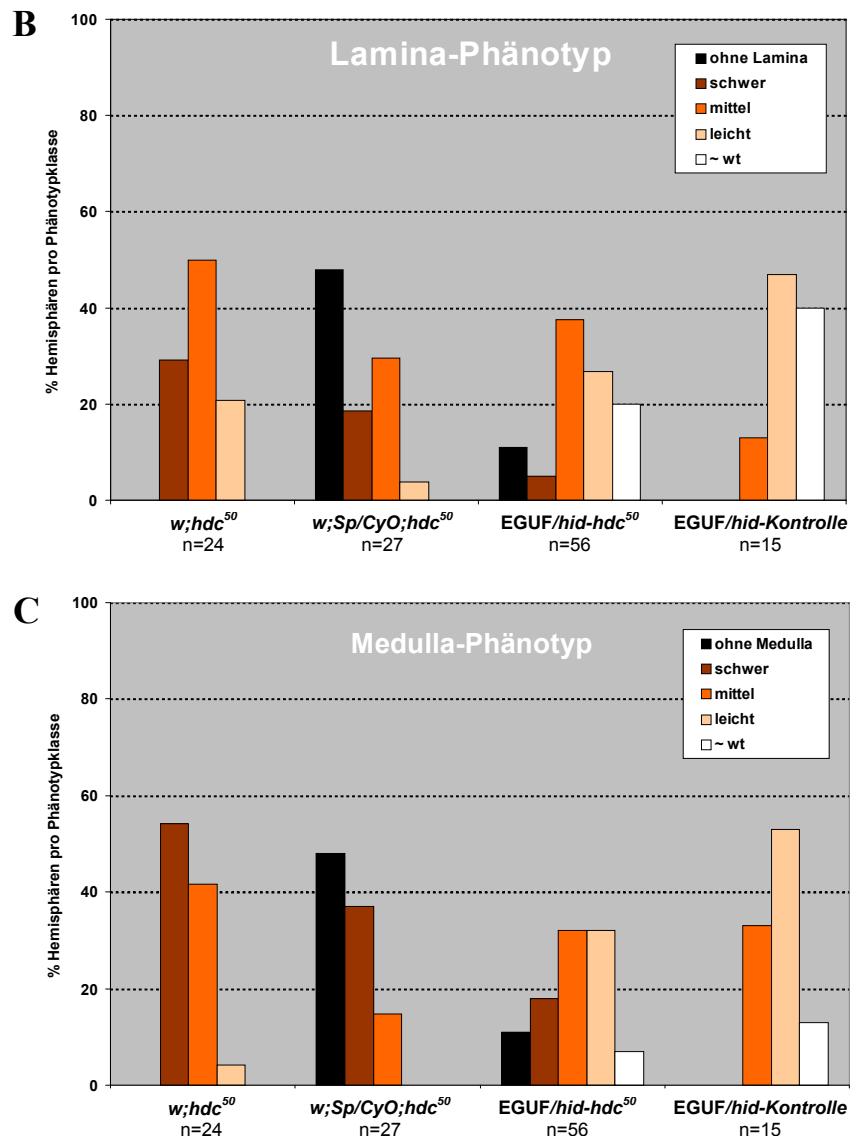
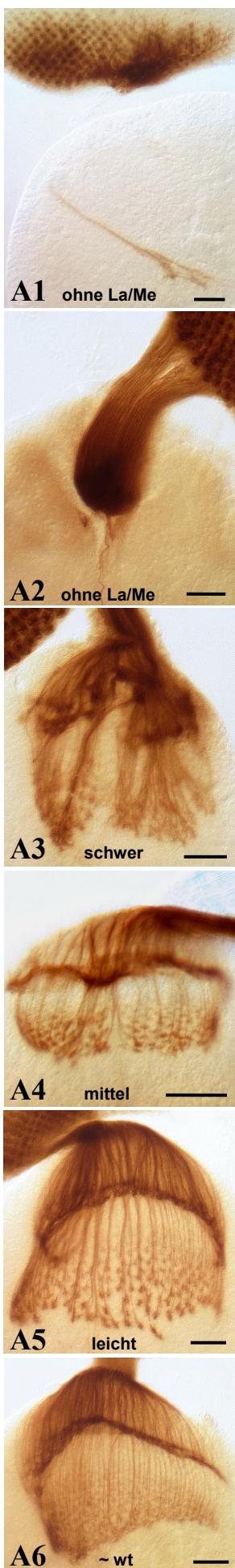


Abb. 19: Semiquantitative Analyse EGUF/hid-induzierter *hdc⁵⁰*-Mosaik im optischen System von Larven. Die Hirnhemisphären larvaler *hdc⁵⁰*-Mosaik-Präparate wurden in einem Blindtest gemäß den beobachteten Defekten im visuellen System 5 verschiedenen Phänotypklassen zugeordnet (Newsome et al., 2000), wobei Lamina und Medulla gesondert bewertet wurde. Die Abb. A1 bis A6 zeigen repräsentative Beispiele für typische Defekte der jeweiligen Phänotypklasse; dabei sind die Präparate ohne Hirnprojektionen (Abb. A1) oder ohne Auffächерung der Projektionen in Lamina und Medulla (Abb. A2) zu der Phänotypklasse „ohne Lamina“ bzw. „ohne Medulla“ gerechnet worden. Die Balkendiagramme in Abb. B und Abb. C stellen gesondert für Lamina und Medulla den prozentualen Anteil der bewerteten Hirnhemisphären pro Phänotypklasse dar. In den EGUF/hid-*hdc⁵⁰* Tieren projizieren Axone *hdc⁵⁰*-homozygot mutanter Photo-rezeptoren in ein wildtypisches Hirn, während in der EGUF/hid-Kontrolle sowohl PR-Axone als auch die optischen Loben wildtypisch sind. Zur Abschätzung der Stärke der Projektionsstörungen in den Mosaiktieren wurden auch vollständig *hdc⁵⁰*-mutante Larven (mit und ohne „Sp/CyO“-Marker) analysiert. Die Mosaiktiere weisen gegenüber zwar überwiegend milder, aber im Vergleich zur Kontrolle dennoch gehäuft vorhandene mittlere bis schwere Projektionsdefekte auf. (Maßstab in Abb. A1 bis A6 50 µm)

fehlerhafte, heterozygote Photorezeptorzellen im Auge überbleiben (wie unter Punkt 4.2 berichtet, zeigen in der Tat heterozygote $hdc^{50}/+$ Larven zwar vernachlässigbar leichte, aber dennoch vorhandene Augenscheibedefekte). Ferner kann homozygot exprimiertes Gal4 im larvalen Auge ebenfalls Entwicklungsstörungen und Apoptose verursachen (Kramer und Staveley, 2003). Jedoch zeichnet eine GMR-Gal4 getriebene β -Galaktosidase-Expression in der Larve ein nahezu wildtypisches Muster des optischen Systems nach, sowohl in der Augenscheibe als auch in beiden optischen Ganglien (Daten nicht gezeigt).

Betrachtet man die Medulla-Defekte (Abb. 19C), so sind sie bei allen untersuchten Genotypen insgesamt ausgeprägter als die der Lamina. Die EGUF/hid- hdc^{50} Phänotypen zeigen mit einem Verhältnis von 61 % zu 39 % die klare Dominanz der mittleren bis extremen (ohne Medulla) Projektionsdefekte, welche aber dennoch in geringerer Häufigkeit auftreten als bei den vollständig hdc^{50} -mutanten Larven (mit 100 % „mittlere bis extreme“ Phänotypen).

Die Kontrolle EGUF/hid-wt zeigt auch hier mit 33 % zu 66 % überwiegend leichte bis nahezu wildtypische Phänotypen; das Auftreten der mittleren Medulladefekte kann ebenfalls mit den Eigenarten des zur Mosaikgenerierung verwendeten EGUF/hid-Systems erklärt werden. Zu keiner Zeit jedoch konnten bei der EGUF/hid-wt Kontrolle in Lamina und Medulla schwere oder gar extreme Defekte beobachtet werden, welche gerade bei den hdc^{50} -Mosaiken bzw. den vollständig hdc^{50} homozygoten Tieren prominent sind.

Besonders auffallend in diesem Zusammenhang ist die Phänotypklasse der „extremen“ Projektionsstörungen, bei denen zwar der Bolwigernerv stets sichtbar ins Hirn projiziert, aber keine oder keine typischen retinalen Projektionen im optischen Lobus auftreten. In 48 % der Larven vom Genotyp $w;Sp/CyO;hdc^{50}$ bleiben alle PR-Axone in der Augenscheibe und wachsen nicht durch den optischen Stiel in Richtung Hirn, sondern wandern anterior (quasi rückwärts) in die Augenscheibe hinein (Abb. 19A1). Bei den EGUF/hid- hdc^{50} Mosaik-Larven weisen 11 % untypische Lamina- und Medullaprojektionen auf, wobei die Axone sich zwar im optischen Stiel bündeln und in den Lobus einwachsen, dort aber gebündelt bleiben und nicht zu einer typischen Lamina- oder Medullastruktur auffächern (Abb. 19A2).

Diese extreme Defekte besitzen große Ähnlichkeit mit Phänotypen von Mutanten wie *eddy* (Martin et al., 1995), *omb:Ras^{N17}* (Rangajaran et al., 1999), *gilgamesh* oder *sine oculis* (Hummel et al., 2002), welche Störungen in der Verteilung ihrer subretinalen Glia besitzen, entlang derer die PR-Axone fehlerhaft auswachsen.

Da die extremen Störungen nur bei Genotypen vorkommen, die eine homozygote hdc^{50} -Mutation zusammen mit dem Sp/CyO Marker/Balancer bzw. den EGUF/hid-Konstrukten tragen, liegt zunächst die Vermutung nahe, dass eine genetische Interaktion zwischen dem

mutierten *headcase* Gen und den Mutationen des Markers *Sternopleural* oder des Balancerchromosoms *Curly of Oster* stattfindet. Dadurch könnte die korrekte Verteilung von Gliazellen in der Augenscheibe, im optischen Stiel und/oder im Hirn gestört sein, welche für den intakten Aufbau eines visuellen Systems notwendig sind (Hummel et al., 2002; Poeck et al., 2001; Suh et al., 2002).

Eine alternative Erklärung für das selektive Auftreten der „extremen“ Phänotypen ist die Akkumulation von sekundären Mutationen (engl. *modifiers*), welche den genetischen Hintergrund verändern. De Belle und Heisenberg (1996) weisen darauf hin, dass Expressivität und Penetranz von Mutationen auch von ihrem genetischen Hintergrund abhängen. Daher könnte ein Hinzufügen oder Austausch von Chromosomen ebenfalls zu einer Interaktionen von *hdc*⁵⁰ mit sekundären Mutationen führen, welche den mutanten Phänotyp drastisch verstärken.

Zusammenfassend dokumentieren die Mosaik-Experimenter an Larven, dass homozygot *hdc*⁵⁰-mutierte Photorezeptoraxone zwar weniger starke Projektionsfehler im visuellen System verursachen als vollständig homozygote Tiere, aber dennoch vorhanden sind. Daraus lässt sich schließen, dass *headcase* funktional nicht auf ein Teilsystem beschränkt ist, sondern sowohl in den Photorezeptoren als auch im optischen Lobus für einen fehlerlosen Aufbau der optischen Systems in der Larve notwendig ist.

4.4.1.2 Adulte *hdc*⁵⁰-Mosaiken

Es stellt sich nun die Frage, ob der schwache larvale Mosaik-*hdc*⁵⁰ Phänotyp auch im adulten Tier zur Geltung kommt oder während der Metamorphose kompensiert wird. Da die EGUF/*hid-hdc*⁵⁰ Mosaiken nur das Auge betreffen und damit pupal nicht letal sind, konnte das visuelle System adulter Mosaik-Tiere analysiert werden. Dazu wurden einerseits 24B10-Färbungen an horizontalen Gefrierschnitten adulter Fliegenköpfe (auch aus der Puppe gezogen, zwecks besserer Vergleichbarkeit mit der pupal letalen *hdc*⁵⁰-Linie) zur Untersuchung der axonalen PR-Projektionen angefertigt. Andererseits dienten tangentiale Semidünnschnitte durch adulte Augen der Detailanalyse ommatidialer Strukturen in der Retina.

Im Vergleich zur vollständig *hdc*⁵⁰-mutanten Linie (Abb. 10B) weisen die adulten *hdc*⁵⁰-Mosaikfliegen weniger drastische, aber immer noch vorhandene Defekte in der axonalen Projektion ihrer Photorezeptoren auf (Abb. 20B).



Abb. 20: Phänotyp des visuellen Systems adulter EGUF/*hid-hdc⁵⁰* Mosaikfliegen. Horizontale Gefrierschnitte von Köpfen fast adulter Tiere (pharate adults) von EGUF/*hid-hdc⁵⁰* und EGUF/*hid*-Kontrolle wurden immunhistochemisch mit dem photorezeptorspezifischen Antikörper mAB 24B10 gefärbt. **(A)** Die EGUF-/*hid*-Kontrolle mit wildtypischen PR-Axonen weist ein normales optisches System auf. **(B)** Das visuelle System der EGUF/*hid-hdc⁵⁰* Mosaiktiere weist fehlerhafte Projektionen *hdc⁵⁰*-mutanter PR-Axone auf, welche als dicke Bündel (Pfeil) außerhalb des Chiasma (Pfeilkopf) in die Medulla ziehen (sog. Bypass-Phänotyp). Diese zeigt zwar Störungen in der regelmäßigen Anordnung der R7 und R8 Axontermini, ist aber stets komplett gedreht, wodurch das Chiasma fast zentral positioniert erscheint. (anterior links; Maßstab 50 µm)

Die Lamina- und Medullasäulen erscheinen leicht in ihrer Parallelität gestört zu sein, wobei die Schichtung der Axontermini in der Medulla lückenhafter und unregelmäßiger ist als in der Lamina. Die Medulla ist stets komplett wildtypisch gedreht, wodurch sich das Chiasma nur gering deplaziert aufbaut. Sehr auffällig sind wiederum dicke Bündel retinaler Projektionen, die ähnlich der vollständig *hdc⁵⁰*-mutanten Linie nicht durch das Chiasma laufen, sondern ektopisch aus der posterioren Lamina direkt in die Medulla ziehen, entlang ihrer proximalen Grenze wachsen und schließlich doch noch im anterioren Teil der distalen Medulla terminieren (sog. Bypass-Phänotyp).

Im Detail betrachtet betrug die Penetranz des Phänotyps 46 %, wovon 31 % eindeutig als fehlgeleitete Retinafasern klassifiziert wurden. Die restlichen 15 % wiesen einen Phänotyp geringerer Expressivität auf, der neben Retinafasern vermutlich auch Projektionen des Hofbauer-Buchner Äugleins (Yasuyama und Meinertzhagen, 1999; Hofbauer und Buchner, 1989) als fehlerhaft darstellte.

Dabei korrelierte das Ausmaß der Projektionsdefekte im visuellen System mit der Rauhheit des Auges, die in einer Störung des regelmäßigen Ommatidienmusters begründet ist. D.h. je größer die Rauhheit des Auges, desto stärker trat der mutante Bypass-Phänotyp zu Tage. Hierzu wurde zunächst der rauhe Augenphänotyp photographisch festgehalten und anschließend horizontale Kryostatschnitte von denselben Augen bzw. Köpfen via 24B10-

Färbung auf Projektionsdefekte untersucht (Daten nicht gezeigt). 43 % (6 von 14) der stark rauhen Augen zeigten auch einen starken Bypassphänotyp, wohingegen 21 % (3 von 14) der wildtypischen Fliegenaugen auch eine wildtypische Gehirnarchitektur aufwiesen. Bei den Augen mit nur leichter Rauheit zeigten 29 % (4 von 14) keine sichtbaren Fehler im visuellen System, während lediglich bei 7 % (1 von 14) wildtypischer Augen schwache Projektionsfehler registriert werden konnten.

Der beobachtete adulte *hdc⁵⁰*-Mosaik-Phänotyp besitzt eine große Ähnlichkeit zur Mutante *irregular chiasm C (irreC)* des *roughest*-Gens (Poster Fischbach und Dietrich, 2000), welches für einen Transmembranrezeptor codiert und sowohl an der Augenentwicklung als auch der axonalen Wegfindung beteiligt ist (Reiter et al., 1996; Schneider et al., 1995; Ramos et al., 1993; Boschert et al., 1990). Daher könnte *headcase* in ähnliche Prozesse involviert sein.

Zumindest aber zeigen die Ergebnisse, daß die Funktion von *headcase* innerhalb der Photorezeptoren für eine korrekte Hirnarchitektur des adulten visuellen Systems benötigt wird. Ferner deutet der Zusammenhang zwischen rauhem Auge und den Projektionsdefekten eher auf eine *headcase*-Funktion innerhalb der Retinaentwicklung hin, als auf eine isolierte Funktion in der axonalen Wegfindung.

Genauer betrachtet ist *headcase* auch für die normale Entwicklung der Photorezeptoren selbst notwendig, wie an tangentialen Semidünnschnitten durch adulte Augen der *hdc⁵⁰*-EGUF/hid-Mosaike erkennbar ist (Abb. 21).

Homozygot *hdc⁵⁰* mutantes Retinagewebe (Abb. 21B) weist zum Teil schwere Defekte der ommatidialen Struktur auf. Dabei kommt es häufig zu einem Verlust oder Verschmelzen ganzer Ommatidienvverbände, inklusive derer Pigment- und Photorezeptorzellen. Die Anordnung der anderen Ommatidien zueinander ist sehr unregelmäßig und die Anzahl der Rhabdomere pro Ommatidium variiert stark. Die vorhandenen Rhabdomere zeigen oft eine abnorme Morphologie mit länglich ausgezogenen bis gebogenen Formen.

In der Kontrolle (Abb. 21A) mit homozygot wildtypischem Gewebe treten ebenfalls vereinzelt Störungen der Struktur und Rhabdomerzahl von Ommatidien auf. Wie schon bei der Analyse der larvalen Mosaike erwähnt (siehe Punkt 4.4.1.1), könnten diese Defekte mit einer unvollständigen Apoptose heterozygoter Zellen zusammenhängen, so daß einige Ommatidien mit unvollständigem Rhabdomersatz überbleiben.

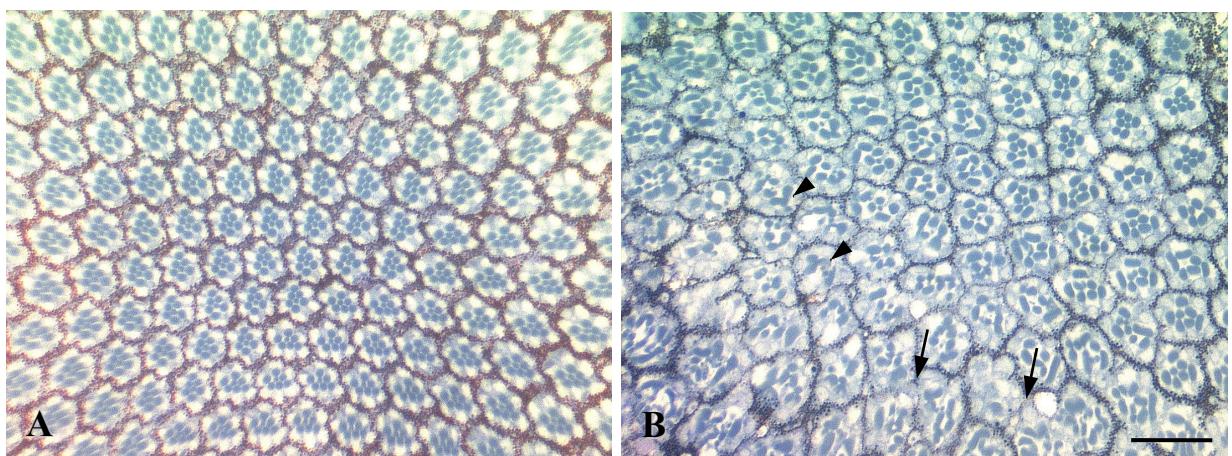


Abb. 21: Analyse der Retinamorphologie adulter EGUF/hid-*hdc*⁵⁰ Mosaikfliegen. Toluidinblau-Färbung tangentialer Semidünnsschnitte vom Retinagewebe adulter EGUF/hid-*hdc*⁵⁰ Mosaiktiere und EGUF/hid-wt Kontrollen. **(A)** Die EGUF/hid-wt Kontrolltiere zeigen in der Mehrzahl wildtypische Augen mit einer streng regelmäßigen Anordnung der Ommatidien und Photorezeptoren, wobei die Rhabdomere stets in der prominenten 6+1 Formation zu sehen sind. **(B)** Das homozygot *headcase*-mutante Auge der EGUF/hid-*hdc*⁵⁰ Fliegen weist massive Störungen in der regelmäßigen Orientierung, Anordnung und Morphologie der Ommatidien auf, welche teils nicht mehr klar voneinander abgegrenzt sind (Pfeile). Die Rhabdomere der Photorezeptorzellen sind stellenweise stark missgebildet (Pfeilköpfe), nicht vorhanden, überzählig oder miteinander verschmolzen, wodurch die typische Struktur von 6 äußeren und einem inneren Rhabomer aufgelöst ist. (Maßstab 20 µm)

Die Defekte in den *hdc*⁵⁰-Mosaikaugen erwiesen sich jedoch als signifikant verschieden von denen in der Kontrolle. Das zeigte eine statistische Analyse der Rhabdomeranzahl pro Ommatidium (Abb. 22).

Dabei zeigten die *hdc*⁵⁰-Mosaikretinas hochsignifikant ($p < 0.01$) größere Mengen an Ommatidien mit einer nicht-wildtypischen Anzahl an Rhabdomeren (größer oder kleiner als 7). Während auf die Kontrollretinas durchschnittlich nahezu 90 % an wildtypischen Rhabdomeren entfielen, waren es bei den Mosaiken nur 19 %. Unter den Ommatidien mit dem vollständigem Photorezeptorsatz zeigten die *hdc*⁵⁰-Mosaike 24 % missgebildete Rhabdomere, wohingegen die Kontrolle nur rund 5 % derartiger Fehler aufwies.

Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass *headcase* auch wesentlich zum Aufbau einer korrekten Retina beiträgt und für die Entwicklung der Photorezeptoren selbst notwendig ist. Da larvale Augenscheiben nur geringe Defekte zeigen (siehe Punkt 4.4.1.1), übt *headcase* diesbezüglich seine Funktion vermutlich während der pupalen Metamorphose aus, bei welcher der strukturelle Aufbau der Rhabdomere und des gesamten Ommatidiums vollzogen wird.

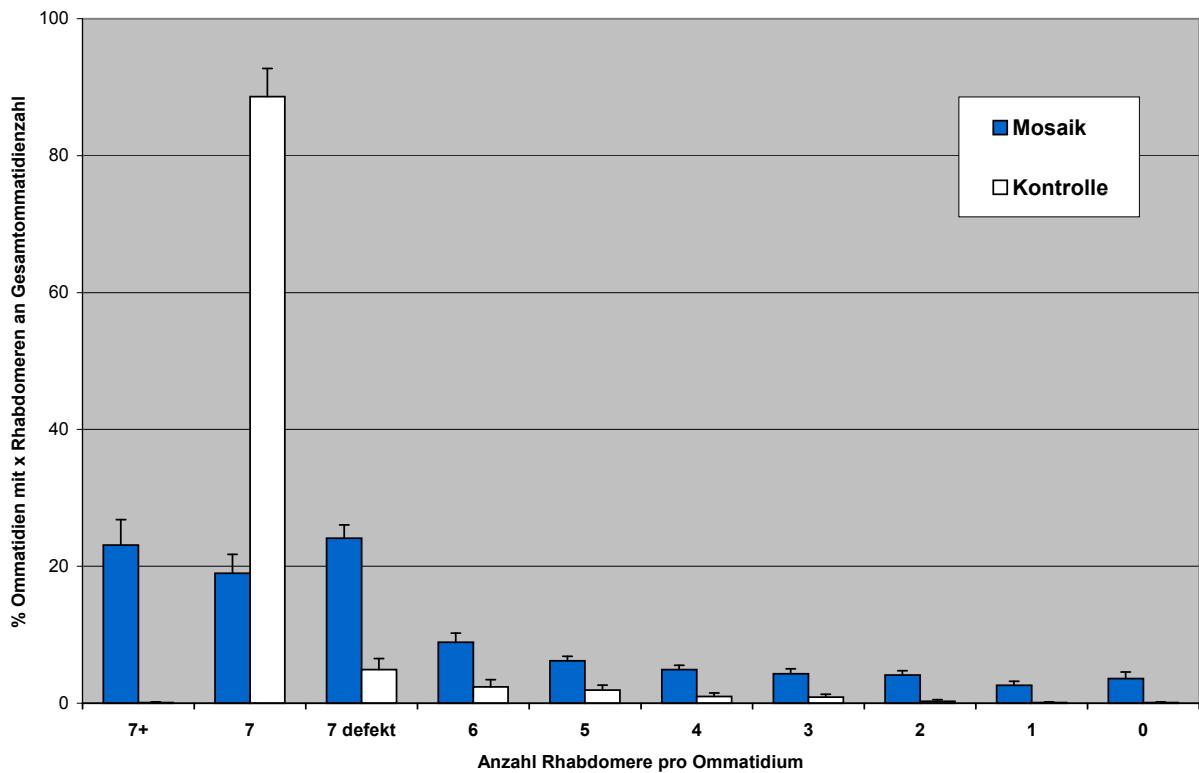


Abb. 22: Statistische Auswertung der Rhabdomeranzahl pro Ommatidium in der Retina von EGUF/*hid-hdc⁵⁰* Mosaiktieren. Anhand der tangentialen Semidünnschnitte von Augen der EGUF/*hid-hdc⁵⁰* Mosaikfliegen und der EGUF/*hid-wt* Kontrollen wurde die Anzahl der Photorezeptor-Rhabdomere pro Ommatidium bestimmt und anschließend der prozentuale Anteil der Ommatidien mit x Rhabdomeren an der Gesamtzahl gezählter Ommatidien in einer Retina errechnet. Im Diagramm kennzeichnen die Ziffern auf der x-Achse die Anzahl der Rhabdomere pro Ommatidium, wobei „7+“ bzw. „7 defekt“ auf Ommatidien mit mehr als 7 bzw. mit 7 morphologisch missgebildeten Rhabdomeren hindeuten. Nach der Analyse von jeweils 10 Tieren zeigte sich die Retina der *hdc⁵⁰*-Mosaiken hochsignifikant verschieden von den Kontrollen ($p<0.01$). Die Mosaiken wiesen gegenüber den Kontrollen weitaus mehr Ommatidien mit einer nicht-wildtypischen Anzahl an Rhabdomeren auf bzw. mehr Ommatidien der Rubrik „7 defekt“ auf. Bei den Kontrolltieren konnten zum Großteil (fast 90 %) nur Ommatidien mit wildtypischer Rhabdomeranzahl- und morphologie gezählt werden.

4.4.2 Hitzeschock-induzierte *hdc⁵⁰*-Mosaiken

Die gelegentlichen Störungen in den Kontrollpräparaten der EGUF-Mosaiken gaben Anlass zur Verifizierung der Ergebnisse mit einem zweiten System. Wie erwähnt wurden dazu somatische *hdc⁵⁰*-Klone nicht mit dem EGUF/hid System, sondern mittels einer Hitzeschock-induzierbaren Lipase hergestellt, wodurch u.a. auch im Auge partielle Klone entstehen konnten.

Solche Augen mit partiellen homozygoten *hdc⁵⁰*-Klonen konnten durch die Anwesenheit rot/weißer Flecken identifiziert werden und wiesen fast immer eine Rauhheit auf (Abb. 23A).

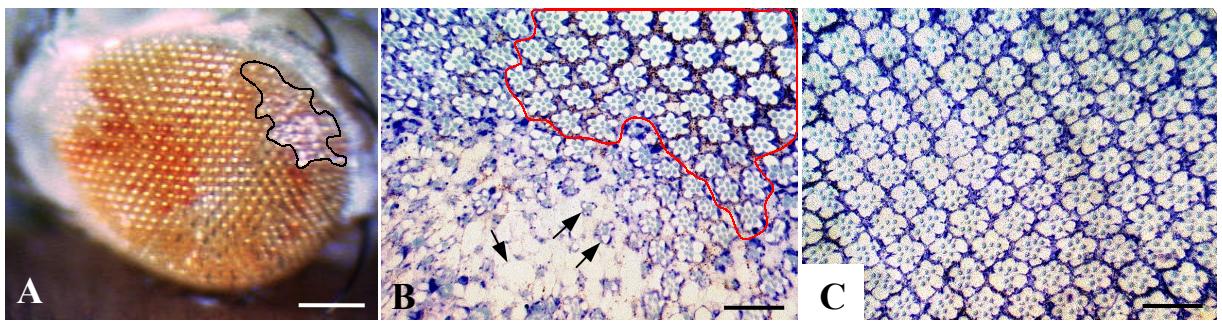


Abb. 23: Analyse der adulten Retina Hitzeschock-induzierter *hdc⁵⁰*-Augenmosaiken. Die Induktion von klonalem Gewebe mittels Hitzeschock (1 h bei 37°C; 3 Tage nach Eiablage) führte zu Augen mit gemischt heterozygoten (rot pigmentiert) und homozygoten Zellregionen. **(A)** Das in Aufsicht dargestellte Mosaikauge zeigt in nicht pigmentierten Regionen *hdc⁵⁰*-homozygote, rauhe Ommatidien (schwarze Umrandung); die pigmentierten Bereiche sind *hdc⁵⁰*-heterozygot bzw. homozygot wildtypisch und kristallin angeordnet. **(B)** Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitte durch *hdc⁵⁰*-Mosaikaugen weisen im pigmentierten Gewebe das wildtypische 6+1 Rhabdomermuster in den regelmäßig angeordneten Ommatidien (rote Umrandung) auf, während die unpigmentierten, *hdc⁵⁰*-homozygoten Zellregionen massive Missbildungen bzw. Ausfälle von Ommatidien samt ihren Rhabdomeren aufzeigen (Pfeile). **(C)** Die Hitzeschock-Kontrollfliegen zeigen in der gesamten Retina die wildtypische 6+1 Formation der Rhabdomere in fast regelmäßig angeordneten Ommatidien (bis auf eine leichte Musterstörungen, welche vermutlich durch die Anwendung des Hitzeschocks hervorgerufen wird; Brand und Perrimon, 1993). (in A anterior oben, Maßstab 100 µm; in B und C Maßstab 20 µm)

Tangentielle Semidünnschnitte durch diese Mosaik-Augen zeigen, dass auch hier die Anordnung und Struktur der Ommatidien gestört ist (Abb. 23B) und zwar im selben Ausmaß wie bei den *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaiken. So sind bei den *hdc⁵⁰*-homozygoten (unpigmentierten) Augenflecken ebenfalls grobe Ausfallerscheinungen an Ommatidien zu beobachten. Die vorhandenen unpigmentierten Ommatidien variieren wiederum in der Anordnung zueinander, in ihrem Photorezeptorsatz und in der Form der Rhabdomere. Demgegenüber bleiben die Ommatidien in heterozygoten (pigmentierten) Bereichen diesbezüglich wildtypisch.

Horizontale Gefrierschnitte durch diese Hitzeschock-induzierten *hdc⁵⁰*-Mosaikaugen mit anschließender 24B10-Färbung, weisen den *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaiken entsprechende Projektionsdefekte im optischen Lobus auf, wie Bypass- oder Äugleinphänotyp (Abb. 24B). Mit einer Penetranz von etwa 75 % (bzw. 63 % ohne Äugleinphän) treten diese Defekte sogar noch häufiger als beim EGUF-System auf (siehe Punkt 4.4.1.2).

Leider erwies sich das verwendete Hitzeschock-Konstrukt als „leaky“, d.h. es war nicht nur bei 37° Celsius, sondern auch bei 25°C und in geringem Maße sogar bei 18°C aktivierbar. Dennoch war es unter Verwendung geeigneter Kontrollen möglich, den deutlichen Unterschied zwischen dem Phänotyp wildtypischer und *hdc⁵⁰*-Klone darzustellen.

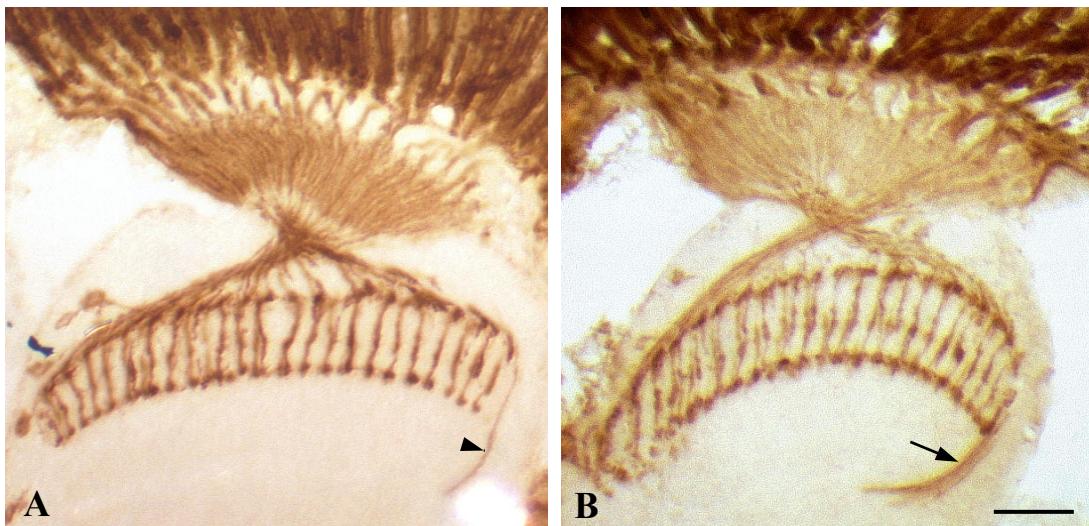


Abb. 24: Phänotyp des adulten visuellen Systems Hitzeschock-induzierter *hdc⁵⁰*-Mosaiktiere. Gefrierschnitte von adulten Köpfen von Hitzeschock-*hdc⁵⁰*-Mosaikfliegen und von Kontrolltieren wurden immunhistochemisch mit dem photorezeptorspezifischen Antikörper 24B10 gefärbt. **(A)** Die Kontrollfliegen zeigen vereinzelt schwache Projektionsfehler des Äuglein (Pfeilkopf), weisen aber ansonsten ein normales visuelles System auf. **(B)** Das optische System Hitzeschock-induzierter *hdc⁵⁰*-Mosaiktiere besitzt einen ähnlichen Phänotyp wie die EGUF/*hid-hdc⁵⁰* Mosaik, d.h. während die Regelmäßigkeit der Lamina, des Chiasma und der Medulla nur gering gestört sind, treten am posterioren Medullaende dennoch dicke Bündel von Photorezeptoraxonen (Pfeil) ektopisch aus und laufen in die anteriore Richtung (Bypass-Phänotyp). (anterior links, Maßstab 50 µm)

Die Hitzeschock-Mosaik-Kontrollaugen ohne *hdc⁵⁰*, d.h. mit homozygot wildtypischen Klonen zeigen stets eine regelmäßige Ommatidienstruktur und ein wildtypisches visuelles System, bis auf vereinzelte Störungen wie das Fehlen einiger Rhabdomere (Abb. 23C) oder schwache Äuglein-Projektionsfehler (Abb. 24A) (Hitzeschock selbst kann Phänokopien induzieren; Brand und Perrimon, 1993, u.a.).

Aus den Daten kann gefolgert werden, dass die Hitzeschock-Experimente die Aussagen zu den EGUF-Versuchen bestätigen, d.h. *headcase* ist sowohl in der Retina als auch im optischen Lobus notwendig, um ein wildtypisches visuelles System aufzubauen.

4.5 Spezifische Rettung des *hdc*-Phänotyps

Nach dem Beweis der Notwendigkeit von *headcase* in den Photorezeptoren der Retina, stellt sich die Frage, ob die *hdc*-Expression dort auch hinreichend ist, d.h. ob sie in den Photorezeptoren ausreichend ist, um in einem ansonsten homozygot mutanten Tier eine wildtypische Projektion der Photorezeptoraxone zu erlauben. Diese spezifische Rettung (engl. *rescue*) des Phänotyps durch die ektopische Expression einer *headcase*-cDNA würde ferner

beweisen, dass sämtliche in der *hdc⁵⁰*-Nullmutante gestörten Funktionen in der Tat durch diese cDNA repräsentiert werden.

Die definierte ektopische Expression der *hdc*-cDNA war möglich durch die Anwendung des GAL4/UAS-Systems von Brand und Perrimon (1993). Diese Methode erlaubt es in *Drosophila* ein beliebiges Gen unter der Kontrolle eines Enhancer-Elements (UAS) der Hefe *S. cerevisiae* zu exprimieren, wenn gleichzeitig der entsprechende Transkriptionsaktivator (GAL4) vorhanden ist (Abb. 25).

Damit kann z.B. das Expressionsmuster studiert oder wie im Falle von *headcase*, das Gen spezifisch in bestimmten Geweben exprimiert werden. Hierzu wurde die *hdc*-cDNA zunächst gentechnisch unter die Kontrolle der *upstream activated sequence* (UAS) gebracht und dieses Konstrukt mittels P-Element induzierter Keimbahntransformation in Fliegen eingebracht (Steneberg et al., 1998). Zur ektopischen Expression gelangt *headcase* nur dann, wenn eine GAL4-Fliegenlinie (sog. Treiberlinie) mit dem UAS-*hdc* Stamm gekreuzt wird, so dass in den

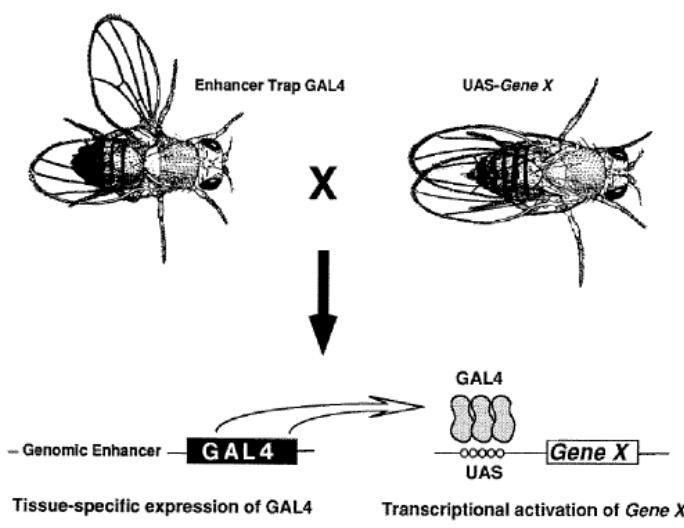


Abb. 25: Schema der gerichteten Genexpression in *Drosophila* mit Hilfe des GAL4/UAS Systems. Hierbei steht ein beliebiges Gen X (z.B. *headcase*) unter Kontrolle einer *upstream activating sequence* (UAS). Dessen Transkription kann gezielt aktiviert (*getrieben*) werden, falls der Transkriptionsfaktor GAL4 an die UAS-Sequenz bindet. Die Expression von GAL4 wird seinerseits kontrolliert von gewebe- oder zellspezifischen Enhancern. Durch Kreuzung einer GAL4-Treiberlinie mit einem UAS-Stamm kann das Gen X (z.B. *hdc*) somit in beliebigen Geweben- oder Zellen zur Expression gebracht werden. (Abbildung aus Brand und Perrimon, 1993)

Nachkommen GAL4 und UAS-*hdc* gemeinsam in einer Zelle vorliegen. In *Drosophila* sind eine Vielzahl dieser transgenen Treiberlinien erhältlich, welche GAL4 jeweils in definierten Zelltypen exprimieren und zwar entsprechend des vorgeschalteten Promotors eines bekannten Gens.

Für die ektopische *headcase*-Expression standen 4 verschiedene Treiberlinien zur Verfügung: Die augenspezifische Linie GMR-GAL4 besitzt ein Konstrukt aus dem GAL4-Gen und der Promotorregion vom *ninaE*-Gen, welches aus 5 GLASS-Bindestellen besteht (Hay et al., 1997). So kann GAL4 und somit auch *headcase* in allen Photorezeptorzellen posterior der

Morphogenetischen Furche exprimiert werden (Freeman, 1996). Die ebenfalls augenspezifische *eyeless*-GAL4 Linie treibt die Expression in allen Zellen der Augenanlage (d.h. anterior der MF) bereits ab dem ersten Larvenstadium (Bonini et al., 1997). Des weiteren wurde mit *loco*-Gal4 eine gliaspezifische Treiberlinie eingesetzt, welche in lateralnen Gliazellen des CNS und des optischen Lobus exprimiert (Granderath et al., 1999; Fischer, 2001). Für eine ubiquitäre Expression wurde schließlich die Linie *actin*-GAL4 gewählt, bei der GAL4 unter Kontrolle des *actin*-Promotors steht (Ito et al., 1997).

Wie unter Punkt 4.2 erwähnt, besitzt das *headcase*-Gen ein internes Stopp-Codon, welches zur Expression von zwei verschiedenen HDC-Proteinen unterschiedlicher Größe führt. Daher wurden die Rescue-Experimente mit zwei verschiedenen UAS-*hdc* Fliegenstämmen durchgeführt, bei denen jeweils die kurze und die lange Form der *headcase*-cDNA unter UAS-Kontrolle steht. Um das lange Stück der *hdc*-mRNA zu erhalten wurde bei der langen *hdc*-cDNA das interne Stoppkodon TAA durch GCA ersetzt (Steneberg et al., 1998). Diese Fliegenlinien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Samakovlis (Umea Universität, Schweden) zu Verfügung gestellt.

Die Auswertung der Rescue-Experimente erfolgte entsprechend der Mosaikanalyse larvaler Ganzhirnpräparate (siehe Punkt 4.4.1.1), d.h. das larvale, visuelle System der Rescuetiere wurde mit dem photorezeptorspezifischen Antikörper gefärbt und mittels einer semiquantitativen Analyse auf axonale Projektionsdefekte hin untersucht.

Dabei zeigte sich, dass nur die photorezeptorspezifische *headcase*-Expression durch die GMR-GAL4-Linie die axonale Projektion in Lamina und Medulla partiell retten kann. Die Expression von *headcase* durch die anderen Treiberlinien *eyeless*-GAL4 und *actin*-GAL4 führte zwar zu einer Abschwächung, aber nicht zur deutlichen Rettung des mutanten Phänotyps bezüglich Penetranz und Expressivität (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz der gliaspezifischen Treiberlinie *loco*-Gal4 hatte eine erhöhte Letalität zufolge, so dass nur äußerst wenige Tiere des gewünschten Genotyps das 3. Larvenstadium erreichten, wodurch keine weitergehende Auswertung möglich war.

Abbildung 26 stellt den erfolgreichen Rescue-Versuch mit dem GMR-GAL4-Treiber im Detail dar. Dabei wurden die Auswirkungen der exprimierten UAS-*headcase*-cDNA in ihrer langen (*hdc*^{long}) bzw. kurzen (*hdc*^{short}) Form und in der Kombination aus beiden (*hdc*^{long+short}) gesondert analysiert, und der Lamina- und Medullaphänotyp wiederum getrennt betrachtet. Bezuglich der Lamina (Abb. 26A) zeigen alle Larvenhirne nach GMR-GAL4 getriebener Expression der Konstrukte UAS-*hdc*^{long}, UAS-*hdc*^{short} und UAS-*hdc*^{long+short} einander gleichwertige Ergebnisse.

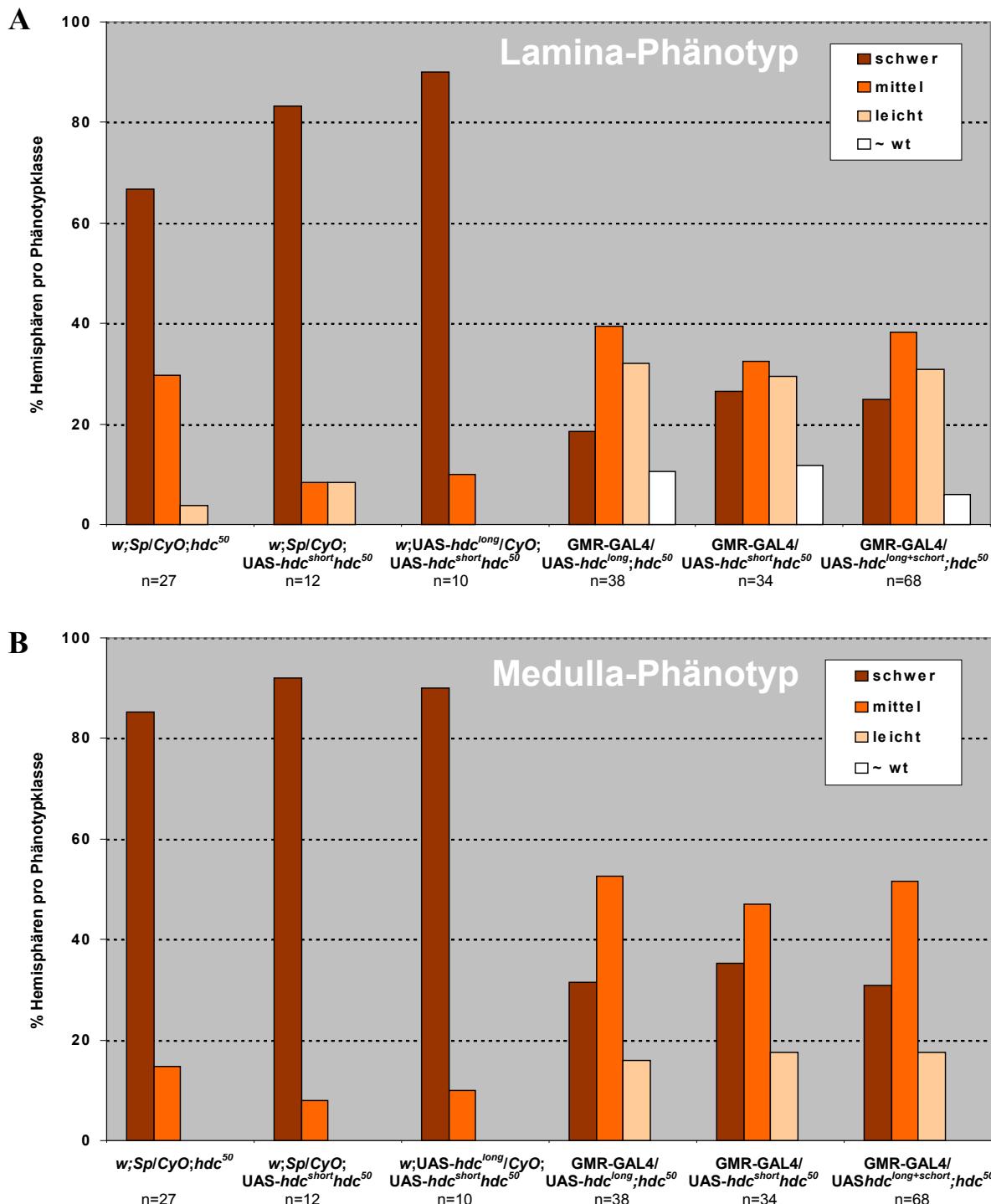


Abb. 26: Partielle Rettung des *hdc⁵⁰*-Phänotyps durch eine photorezeptorspezifische Expression der *hdc*-cDNA.

Dargestellt ist eine semiquantitative Analyse (analog zur Mosaikanalyse unter Punkt 4.4.1.1, Abb. 12) der Experimente zur Rettung des mutanten *hdc⁵⁰*-Phänotyps durch die spezifische Expression einer *headcase*-cDNA in den Photorezeptoren unter Zuhilfenahme des GAL4/UAS Systems. Dazu wurde der photorezeptorspezifische GMR-GAL4 Treiberstamm mit verschiedenen UAS-*hdc* Linien gekreuzt, bei welchen jeweils die lange oder die kurze Form der *hdc*-cDNA oder beide zusammen unter UAS-Kontrolle stehen. Das larvale, visuelle System der F1-Generation wurde immunhistochemisch mit dem 24B10-Antikörper gefärbt und der beobachtete Lamina- bzw. Medulla-Phänotyp anhand von Blindtests unterschiedlichen Defektklassen zugeordnet (siehe Abb.12A1-A6). Zur besseren Veranschaulichung ist die Phänotypklasse „ohne Lamina bzw. Medulla“ unter die „schweren“ Defekte gezählt worden. Dabei zeigen Lamina (**A**) als auch Medulla (**B**) der *hdc⁵⁰*-Mutanten mit GMR-getriebener *hdc*-cDNA-Expression im Vergleich den Kontrollen (ohne GMR-Treiber) deutlich geringere Anteile an „schweren“ Projektionsdefekten, jedoch mehr an „mittleren“ bis „leichten“ bzw. „~ wildtypischen“ Phänotypen.

In allen drei Fällen können ca. 40 % an „leichten bis ~wt“ Phänotypen registriert werden, während die Kontrollen nur ca. 8 % optische Loben mit „leichten“ Defekten und keine „~wt“ Hirne aufwiesen. Bei den „mittleren bis schweren“ Projektionsdefekten zeigen alle UAS-*hdc*-Konstrukte einen Anteil von etwa 60 %, gegenüber 90-100 % bei den Kontrollen. Auffallend ist hierbei die starke Reduzierung des „schweren“ Phänotyps von über 80 % auf unter 30 %, sowie das Erscheinen von Larven mit nahezu wildtypischer Lamina.

Ähnlich drastische Veränderungen zeigen sich beim Medullaphänotyp (Abb. 26B), wobei auch hier alle drei *hdc*-Konstrukte einander gleichwertige Zahlen aufweisen. Bemerkenswert ist vor allem die anteilmäßige Verschiebung innerhalb der Phänotypklassen „mittel bis schwer“, sowie das Auftreten von „leichten“ Phänotypen. Während bei den Kontrollen etwa 90 % „schwere“ und ca. 10 % „mittlere“ Defekte, jedoch keine „leichten“ gezählt wurden, zeigten alle drei *hdc*-Konstrukte nur ca. 30-35 % an „schweren“, um die 50 % an „mittleren“ Phänotypen und bei 17 % treten nur „leichte“ Medullafehler auf.

Somit kann von der klaren, partiellen Rettung eines Großteils der mutanten *hdc*⁵⁰-Phänotypen bei allen Larven gesprochen werden, welche entweder die lange oder kurze Form der *headcase*-cDNA oder auch beide zusammen GMR-GAL4-getrieben exprimieren.

Eine **Überexpression** von *hdc*^{long} mit dem GMR- bzw. *eyeless*-GAL4-Treiber im wildtypischen Hintergrund führt in 18 % bzw. 21 % der Fälle zu mittleren bis schweren Defekten in der Augenscheibe, dem optischen Stiel als auch dem optischen Lobus der Larve (Tab. 4). Dabei ist sowohl die generelle Morphologie, die Musterbildung, als auch die Topographie der betreffenden Strukturen fehlerhaft. Mit dem *actin*-GAL4-Treiber konnten nur sehr vereinzelte und schwache Störungen detektiert werden.

Genotyp	Mutanter larvaler Phänotyp in %
w;GMR-GAL4/UAS- <i>hdc</i> ^{long} ;D ³ /TM6B	8(45)=18 %
w; <i>eyeless</i> -GAL4/UAS- <i>hdc</i> ^{long} ;D ³ /TM6B	10(48)=21%
w; <i>actin</i> -GAL4/UAS- <i>hdc</i> ^{long} ;D ³ /TM6B	2(12)=6 %

Tab. 4: Eine augenspezifische Überexpression von *headcase* verursacht Defekte im visuellen System von Larven. Aufgelistet ist der prozentualer Anteil an Larven mit gestörtem, visuellen System nach Überexpression der *hdc*^{long}-cDNA in Photorezeptoren (GMR-GAL4), im Auge (*eyeless*-GAL4) oder ubiquitär in allen Zellen (*actin*-GAL4). Hierzu wurden larvale Ganzhirnpräparate mit dem Antikörper 24B10 immunhistochemisch gefärbt und das optische System bewertet.

Eine GMR-getriebene *hdc*^{long}-Überexpression adulter Tiere ruft gelegentlich rauhe Augen hervor. Tangentiale Semidünnschnitte durch rauhe und auch nicht rauhe GMR/*hdc*^{long}-Augen

zeigen ein gestörtes Ommatidienmuster, während derartige Effekte mit dem *eyeless*- und dem *actin*-Treiber nicht bzw. in geringem Maße auftreten (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten deuten ebenfalls auf eine Beteiligung von *hdc* in der frühen und späten Augenentwicklung.

Damit stimmen die Ergebnisse der Rescue-Experimente mit den Mosaikanalysen und den Expressionsdaten insofern überein, als dass *headcase* für den Aufbau eines wildtypischen, visuellen Systems nicht auf ein Gewebe allein beschränkt ist, sondern seine Funktion sowohl im Auge (Ausgangsgewebe) als auch im Hirn (Zielgewebe) ausüben muss. Diese Aussagen manifestieren sich in der weiteren Untersuchung des Zielgebiets retinaler Projektionen unter Punkt 4.7. Es zeichnet sich also vermehrt eine ubiquitäre Notwendigkeit von *headcase* in der Entwicklung des optischen Systems von *Drosophila* ab.

4.6 Detaillierte Analyse des mutanten *headcase*-Phänotyps

4.6.1 Axonale Marker

Bei genauer Betrachtung des mutanten *hdc*-Phänotyps und aufgrund der ubiquitären Expression von *headcase* stellt sich die Frage nach der Spezifität der axonalen Projektionsdefekte im optischen Lobus; d.h. sind alle 8 Photorezeptoren in gleicher Weise am Aufbau des typischen „Brokkoli“-Phänotyps bzw. des adulten „Bypass“ –Phänotyps beteiligt oder eher nur bestimmte Subtypen. Wie unter Punkt 4.2 erwähnt, lassen die Laminalücken im visuellen System der Larve zunächst vermuten, daß die R1-R6 Axone nicht in der Lamina stoppen, sondern gemeinsam mit den R7+R8 Axone in die Medulla einwachsen (wie beim *nonstop*-Phänotyp in Poeck et al., 2001). Jedoch zeichnen genauere Analysen mit spezifischen axonalen Markern ein unterschiedliches Bild vom larvalen und adulten visuellen System der *hdc⁵⁰*-Mutante.

Zur Verfügung standen 3 Fliegenlinien mit den entsprechenden Markerkonstrukten: *Ro- τ lacZ* codiert für ein Tau-β-Galaktosidase Fusionsprotein (Callahan und Thomas, 1994), welches unter Kontrolle des *Rough*-Enhancer steht und larval in den Photorezeptoren R2-R5 exprimiert wird (Kimmel et al., 1990). Der Marker *Rh1- τ lacZ* besitzt einen *Rhodopsin1*-Promotor und kommt in den Photorezeptoren R1-R6 von Adulten zur Expression, während die Linie *Rh6- τ lacZ* unter *Rhodopsin6*-Promotorkontrolle spezifisch die R8-Photorezeptoren markiert (Chou et al., 1999).

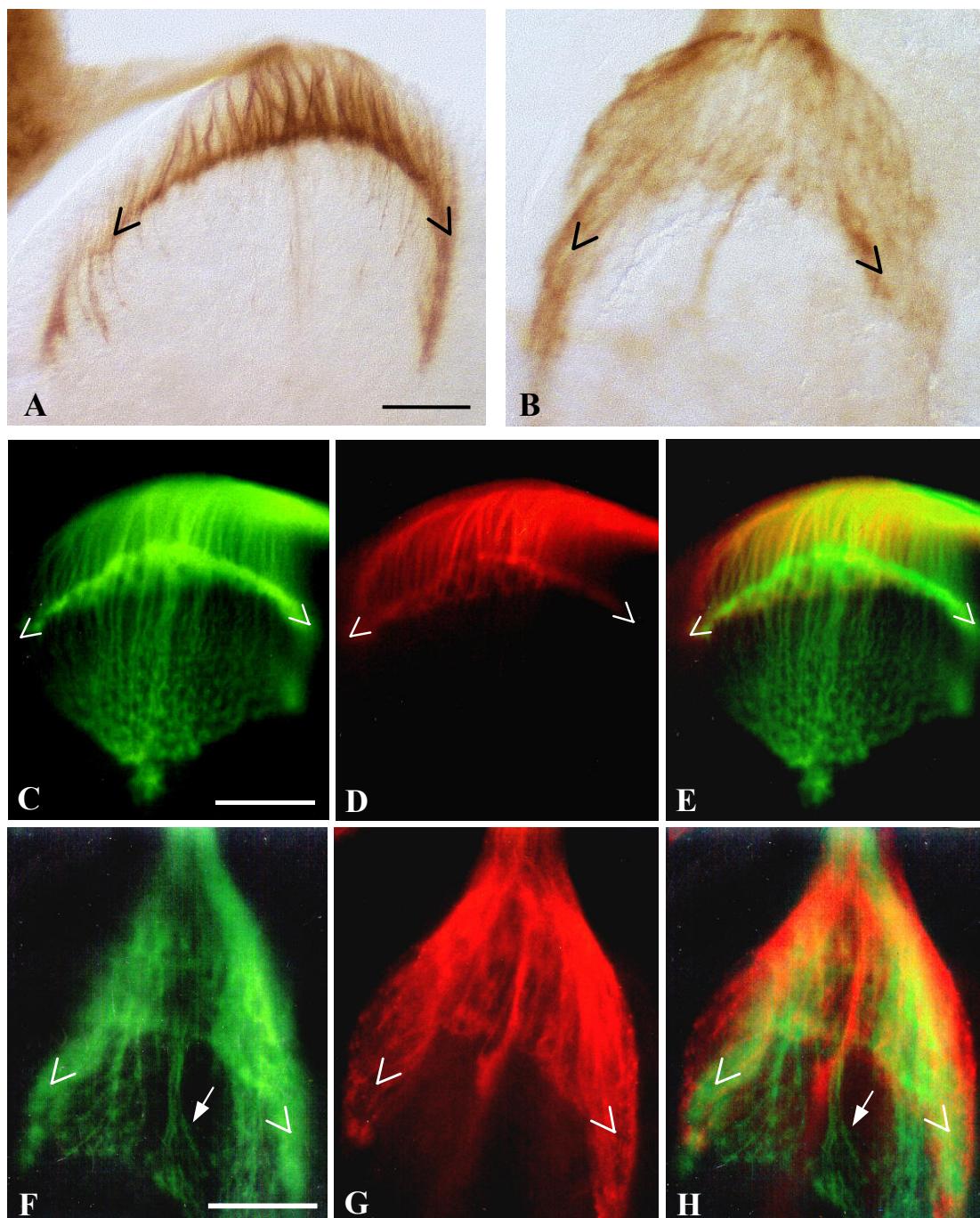


Abb. 27: Spezifische Färbung der Photorezeptoraxone R2-R5 im larvalen optischen Lobus von *hdc⁵⁰*-Mutanten. Die PR-Axone R2-R5 in Ganzhirnpräparaten von *hdc⁵⁰*-mutanten und wildtypischen Larven des späten dritten Stadiums wurden mit Hilfe des *Ro-tlacZ*-Markers visualisiert. **(A) und (B)** Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die β -Galaktosidase zeigen, dass die R2-R5 Axone in *Ro-tlacZ; hdc⁵⁰*-Larven (B) in der Lamina (eckige Klammer) terminieren und analog zur Wildtyp-Kontrolle (A) keinen *nonstop*-Phän aufweisen. Die vereinzelten Medullaprojektionen entsprechen der Hintergrundfärbung der *Ro-tlacZ*-Kontrolle. **(C) bis (H)** Doppelfärbungen mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern 24B10/DTAF (grün; markieren alle PR-Axone R1-R8) und α - β -Galaktosidase/Cy3 (rot, markieren nur die R2-R5 Axone). Die Färbungen in **Abb. C bis E** stellen die axonalen Projektionen in der *Ro-tlacZ*-Kontrolle dar. Die **Abb. F bis H** bestätigen die korrekte Terminierung der R2-R5 Axone in der Lamina von *hdc⁵⁰*-Mutanten. Dabei zeigt sich, dass der typische „Medulla-Brokkoli-Phänotyp“ der larvalen *hdc⁵⁰*-Mutante nur aus fehlerhaften R7+R8 Axonen besteht (Pfeil) und keine in die Medulla ziehenden R2-R5 Fasern enthält. Abb. G zeigt lediglich eine geringe medulläre Hintergrundfärbung (anterior oben, dorsal rechts; Maßstab 50 μ m).

Immunhistochemische Färbungen an mutanten, larvalen Ganzhirnpräparaten von *Ro-tlacZ;hdc⁵⁰* mit Antikörpern gegen die β-Galaktosidase zeigen bezüglich der R2-R5 Projektionen kaum Unterschiede zum *Ro-tlacZ*-Wildtyp (Abb. 27A und B). In beiden Fällen werden fast ausschließlich Axone gefärbt, welche in der Lamina terminieren, wobei die Färbung in der Mutante sich schwächer äußert und damit schlechter auszuwerten ist. Vereinzelt können zwar Medulla-terminierende Fasern beobachtet werden, die jedoch in ihrer Häufigkeit der Medulla-Hintergrundfärbung des *Ro-tlacZ*-Wildtyps (Garrity et al., 1999) entsprechen.

Doppelfärbungen an solchen Präparaten mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern 24B10/DTAF (grün leuchtend) und anti-β-Galaktosidase/Cy3 (rot leuchtend) belegen, dass bei *hdc⁵⁰* fast sämtliche in die Medulla ziehenden Axone β-Galaktosidase-negativ sind (bis auf wenige positive Fasern) (Abb. 27C bis H).

Damit liegt kein offensichtlicher *nonstop*-Phänotyp der Photorezeptoraxone R2-R5 vor. Es scheint beim mutanten *headcase*-Phänotyp der Larve eher ein Defaszikulierungsproblem aller Axone (einerseits R1-R6 und andererseits R7+R8) zu bestehen, da dicke Faszikel sowohl in der Lamina als auch in der Medulla (hier „Brokkoli-Phän“) gebildet werden. Das bedeutet, dass ein Ausfall der *headcase*-Funktion in den Photorezeptoren möglicherweise zu einem partiellen „Verkleben“ ihrer Axone führt. Deren Wachstumshügel terminieren somit nicht wildtypisch in definierten Abständen voneinander, sondern ektopisch als Bündel in der Lamina bzw. der Medulla. Jedoch können damit nicht die teils gravierenden Defekte (zerrissene Laminalinie, aufgelöste Topographie in Medulla) in den optischen Ganglien erklärt werden.

Ein *headcase*-Ausfall hat vermutlich eher ein komplexes Störungsmuster zur Folge, welches die grundlegenden Mechanismen zum Aufbau einer korrekten Lamina bzw. Medulla mit betreffen. Hier sei nur das komplizierte Zusammenspiel aus wechselseitigen Induktionsprozessen zwischen den Photorezeptoraxonen und Neuronen bzw. Gliazellen erwähnt, welches ein korrektes Verschaltungsmuster im visuellen System von *Drosophila* sichert (Übersicht u.a. in Pielage und Klämbt, 2001; Tayler und Garrity, 2003). Daher wurden nähere Untersuchungen zum Zielgebiet der retinalen Projektionen durchgeführt, deren Ergebnisse weiter unten dargestellt werden (siehe Punkt 4.7 und 4.8).

Das adulte visuelle System mutanter *Rh1-tlacZ;hdc⁵⁰* Tiere zeigt nach immunhistochemischer Behandlung mit dem 24B10-Antikörper den typischen „Bypass“-Phänotyp retinaler Projektionen, neben den bereits beschriebenen Störungen der Ommatidiensäulen, sowie der Lamina- und Medullastrukturen (Abb. 28A).

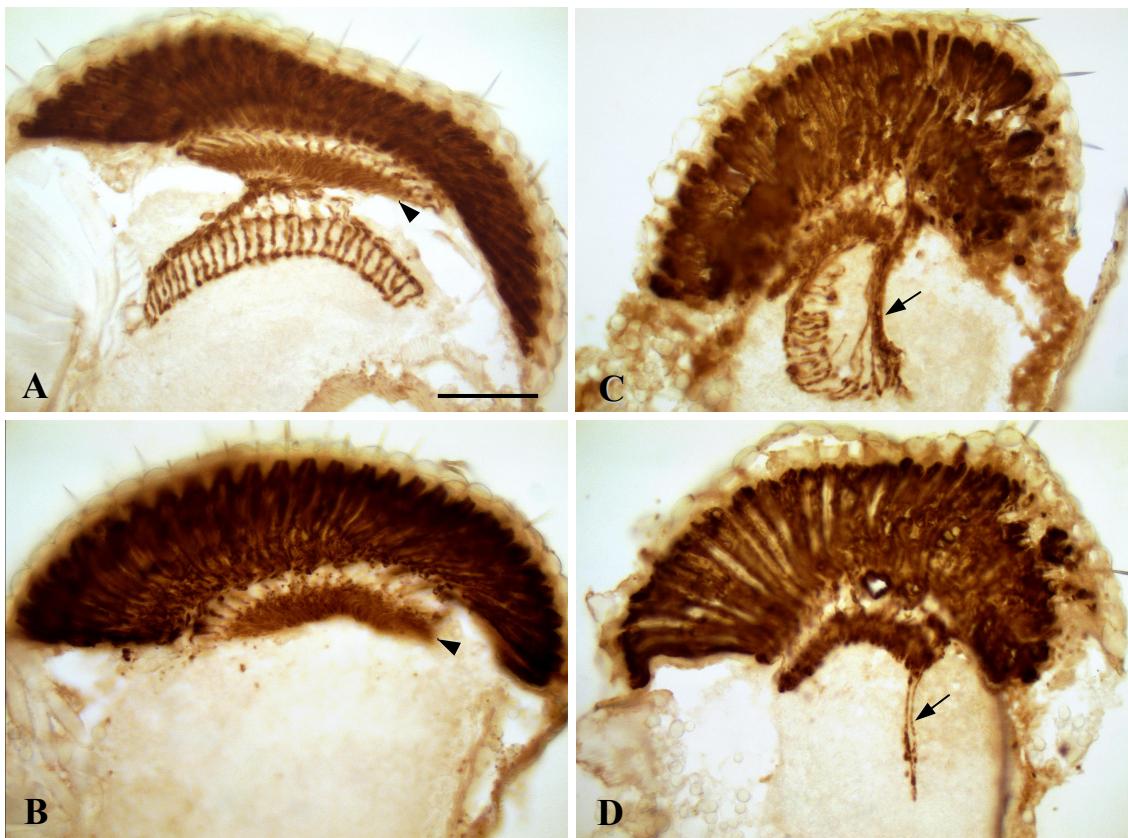


Abb. 28: Spezifische Färbung der Photorezeptoren R1-R6 und deren Axone im adulten visuellen System von *hdc*⁵⁰-Mutanten. Die spezifische Darstellung der PR-Axone R1-R6 erfolgte mit Hilfe des Markers *Rh1lacZ*. Horizontale Gefrierschnitte von adulten Köpfen der Linie *Rh1lacZ* (Kontrolle) und *Rh1lacZ;hdc*⁵⁰ wurden immunhistochemisch mit den Antikörpern 24B10 (A und C) bzw. α - β -Galaktosidase (B und D) behandelt. **(A) und (B)** Die Kontrollfliegen *Rh1lacZ* zeigen ein wildtypisches visuelles System, bei welchen die R1-R6 Axone in der Lamina terminieren (Pfeilköpfe). **(C) und (D)** In der Mutante *Rh1lacZ;hdc*⁵⁰ lässt sich neben den Strukturdefekten in der Retina und den beiden optischen Ganglien vor allem der typische Medulla-Bypass Phänotyp (Pfeil) der PR-Axone beobachten (C). Hierzu tragen auch R1-R6 Projektionen (Pfeil) bei, wie die spezifische Färbung dieser Axone zeigt (D). (anterior links, Maßstab 50 μ m)

Bei der spezifischen anti- β -Galaktosidase Färbung gegen die R1-R6 Axone eines anderen mutanten Tieres werden neben Retina und Lamina auch einige Fasern innerhalb des Bypass-Faszikels sichtbar, während die Medulla gänzlich ungefärbt bleibt (Abb. 28D). Die Kontrollen in Abb. 28A und B belegen die Spezifität der Farbreaktion, d.h. *Rh1- τ lacZ* markiert spezifisch nur R1-R6 Axone, welche im Wildtyp nicht in die Medulla laufen. Identische immunhistochemische Färbungen (Abb. 29) am visuellen System der R8-spezifischen Linie *Rh6- τ lacZ;hdc*⁵⁰ zeigen, dass die dicken Bypass-Bündel der *headcase*-Mutante nicht nur aus R1-R6 Axonen bestehen, sondern sich ebenfalls aus fehlgeleiteten R8-Axonen zusammensetzen. Dabei ist die R8-spezifische β -Galaktosidase-Expression recht gering, so dass die R8-Axone in der defekten, nicht gedrehten Medulla und im Bypass-Faszikel der *hdc*⁵⁰-Mutante nur schwach nachgezeichnet werden (Abb. 29D).

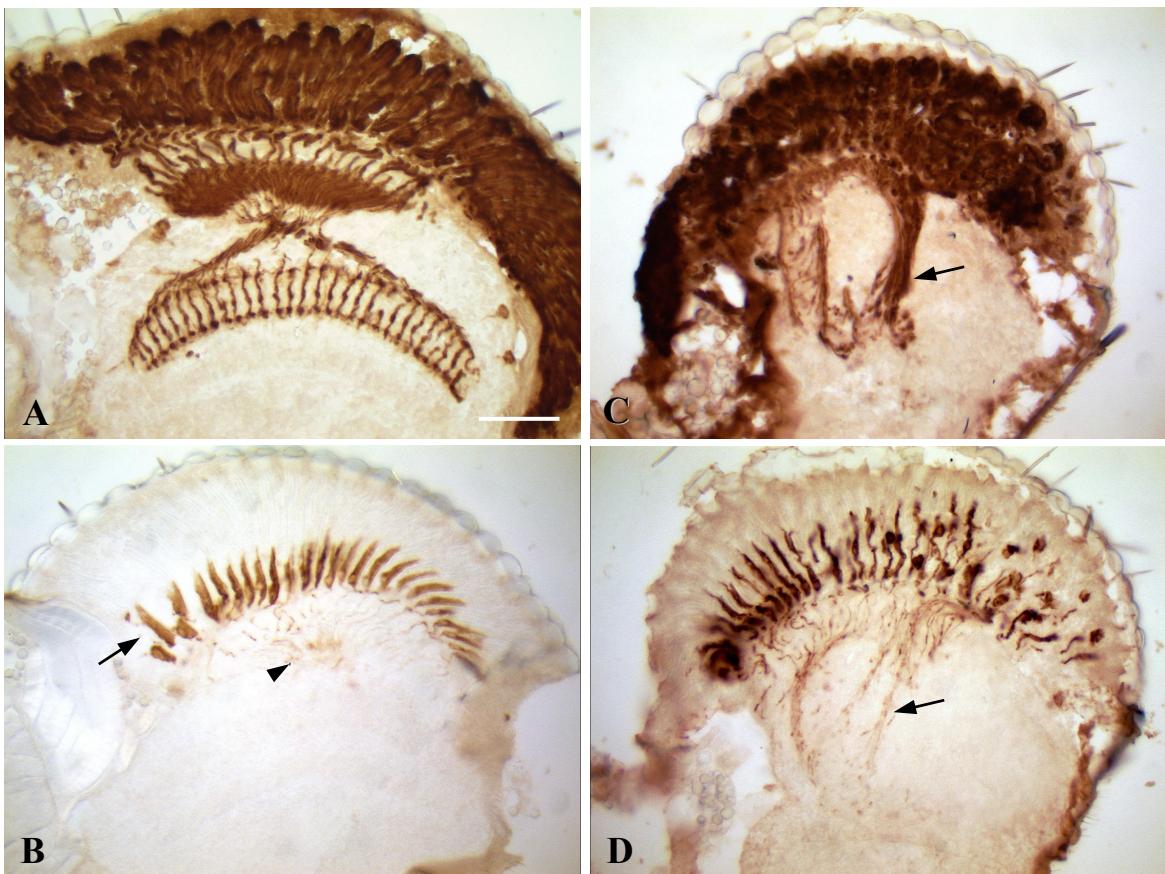


Abb. 29: Spezifische Färbung der R8-Photorezeptoren und deren Axone im adulten visuellen System von *hdc⁵⁰*-Mutanten. Die R8-Photorezeptoren konnten anhand des Markers *Rh6lacZ* spezifisch dargestellt werden. Horizontale Gefrierschnitte adulter Köpfe der Stämme *Rh6lacZ* (Kontrolle) und *Rh6lacZ;hdc⁵⁰* wurden immunhistochemisch mit den Antikörpern 24B10 und anti-β-Galaktosidase gefärbt. **(A) und (B)** In den *Rh6lacZ*-Kontrollen war die β-Galaktosidase-Expression schwach, so dass nur die basal gelegenen R8-Zellkörper in der Retina deutlich spezifisch markiert sind (B; Pfeil), wohingegen deren axonale Projektionen nur bis zum Chiasma verfolgt (B; Pfeilkopf), aber nicht mehr als hochgeordnete Medullatermini wahrgenommen werden können. Abb. A zeigt die regelmäßige Anordnung der retinalen Projektionen in Lamina und Medulla des Wildtyps. **(C) und (D)** Die dargestellten *Rh6lacZ;hdc⁵⁰* Mutanten zeigen äußerst ausgeprägte Bypass-Fasikeln (Pfeil), an welchen ebenfalls fehlgeleitete R8-Axone ihren Anteil haben, was durch ihre spezifische Markierung in Abb. D sichtbar wird (Pfeil). (anterior links, Maßstab 50 µm)

Eine β-Galaktosidase-spezifische Färbung an den Kontrollfliegen markiert deutlich die basale Lage der R8-Photorezeptoren in der Retina (Abb. 29B) und deren durch die Lamina laufenden Axone. Die in den *hdc⁵⁰*-Mutanten dennoch vorhandene anti-β-Galaktosidase-Färbung der R8-Axone in der defekten Medulla- und den Bypass-Fasikeln (Abb. 29D) könnte in einer erhöhten β-Galaktosidase-Expression und/oder der besseren Detektion aufgrund von R8-Fasikelbildung begründet sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in *hdc⁵⁰*-Mutanten alle 8 Photorezeptoraxone von Störungen in der Defasikulierung und der Zielfindung betroffen sind, wobei die Fehlprojektionen der R1-R6 Axone sich erst im adulten Tier, d.h. nach der pupalen

Umstrukturierung des visuellen Systems, sichtbar manifestieren. Das *headcase*-Gen übt demnach seine Funktion in allen Photorezeptoren aus und nicht spezifisch in bestimmten Subtypen, worauf schon die *hdc*-Expressionsdaten unter Punkt 4.3.2 hindeuteten.

4.6.2 Faszikulation

Die Beobachtung dicker, ektopischer Axonfaszikel im visuellen System von *hdc*⁵⁰-Tieren und insbesondere die große Ähnlichkeit des adulten *hdc*⁵⁰-Mosaik-Phänotyps (siehe Punkt 4.4.1.2) zur *irreC-roughest*-Mutante, legte eine Expressionsanalyse nicht nur des ROUGHEST-Proteins, sondern auch anderer an Zelladhäsion und axonaler Wegfindung beteiligten Membranproteine wie FAS II und FAS III in der *headcase*-Muntante nahe (Lin et al., 1994a und b; Kose et al., 1997; Rose und Chiba, 1999).

Hierzu wurden larvale Ganzhirnpräparate von Wildtyp und *hdc*⁵⁰ immunohistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen die Proteine ROUGHEST, FAS II und FAS III gefärbt.

Wie in den Abbildungen 30A und B dargestellt, kann FAS II in der Augenscheibe, dem optischen Stiel und im optischen Lobus des Wildtyps nachgewiesen werden. Dabei kommt es zu einer Expression in allen Photorezeptorzellen posterior der MF und deren Axonen, wobei die Laminafasern deutlich stärker gefärbt sind als die der Medulla. Das optische System insgesamt ist klar strukturiert. Im Vergleich dazu erscheint die FAS II-Färbung in der *hdc*⁵⁰-Mutante inhomogener. Während die Augenscheibe eine nahezu wildtypische Expression zeigt, weisen optischer Stiel und optischer Lobus eine partielle Verdichtung der axonalen Färbung auf. Die Strukturen von Lamina und Medulla können nicht klar voneinander abgegrenzt werden. Ein Ausfall von *headcase* könnte somit zu einer veränderten Expression von FAS II führen. Lin et al. (1994) beschrieben bereits, dass eine Fehlexpression von FAS II eine Defaskulierung von CNS-Axonen unterbinden kann.

Die Verteilung von FAS III (Abb. 30C) im Wildtyp scheint in der Augenscheibe auf die Zellzwischenräume beschränkt zu sein (siehe auch Woods et al., 1997: Nachweis von FAS III in den apico-lateralen Zellverbindungen von Imaginalscheiben) und zwar wiederum posterior der MF. Die axonale Färbung im optischen Stiel ist schwach bzw. in der Lamina fast nicht zu detektieren. Die Medulla hingegen weist eine distinkte FAS III-Expression auf, mit strukturierten punktförmigen Färbungen am Laminasum, welche von dort faserartig tiefer in die Medulla ziehen.

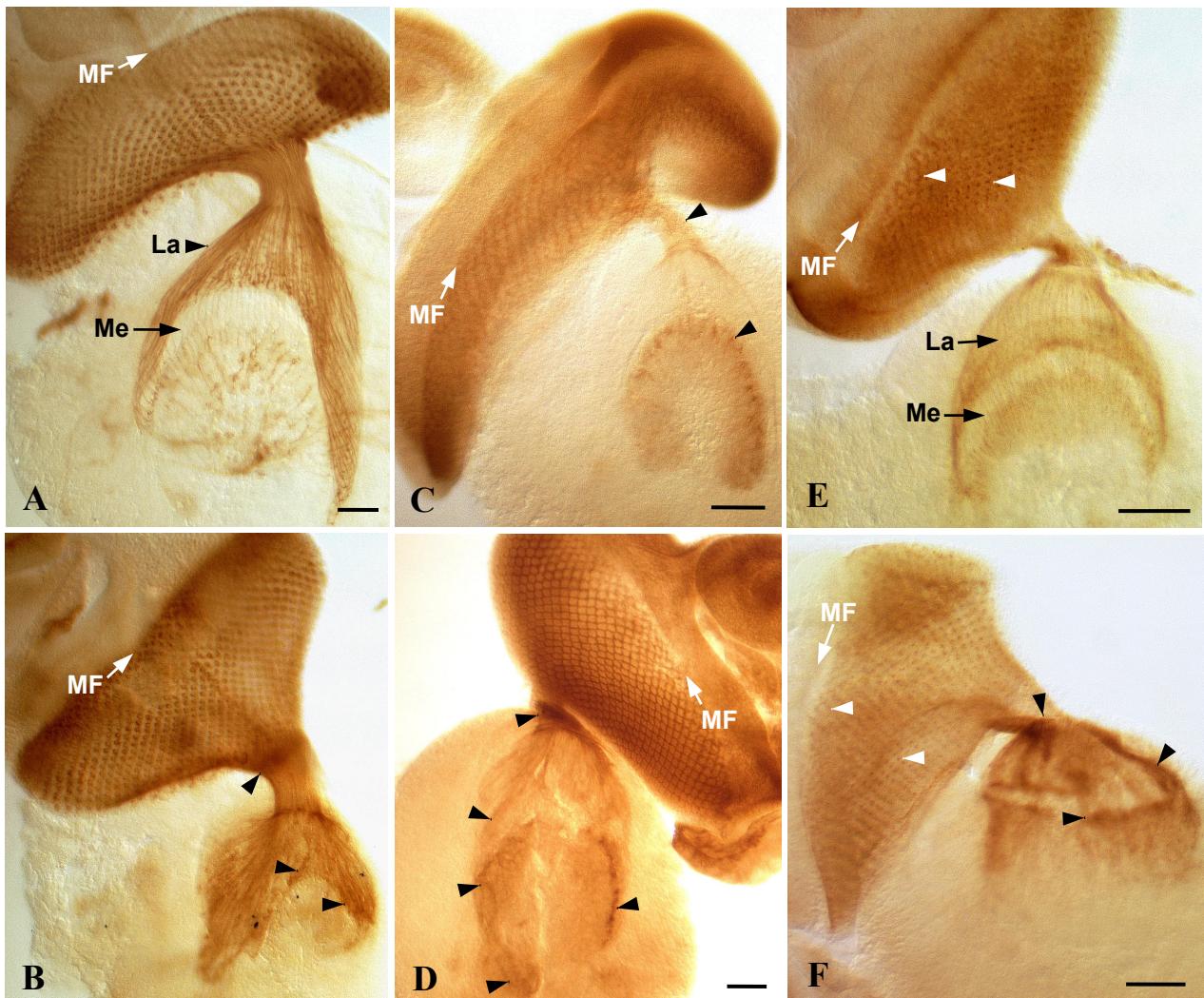


Abb. 30: Expression der Zelladhäsionsmoleküle FASCICLIN II, FASCICLIN III und ROUGHEST im larvalen visuellen System von *hdc⁵⁰*-Mutanten. Immunhistochemische Färbung des optischen Systems von wildtypischen und *hdc⁵⁰*-mutanten Larven des dritten Stadiums mit den monoklonalen Antikörpern α -FAS II (A und B), α -FAS III (C und D) und α -ROUGHEST (E und F). (A) Im Wildtyp wird FASCICLIN II in den Photorezeptoren der Augenscheibe (posterior der MF; weißer Pfeil) und in deren Axonen homogen exprimiert. Deutlich sind die geordneten Laminaprojektionen (La; Pfeilkopf) von den schwächer gefärbten Medullafasern (Me; Pfeil) abgegrenzt. (B) In der Mutante *w;Sp/CyO;hdc⁵⁰* ist die FAS II-Expression in der Augenscheibe wildtypisch, während die axonalen Projektionen im optischen Stiel und in den optischen Ganglien lokale Verdichtungen (Pfeilköpfe) der FAS II-Färbung aufweisen. Die Lamina/Medulla-Grenze ist verschwommen. (C) Im Wildtyp scheint FAS III in den Zellzwischenräume der Augenscheibe posterior der MF (weißer Pfeil) lokalisiert zu sein. Weitere schwache Färbungen zeigen im optischen Stiel und posterioren Rand der Lamina (Pfeilköpfe). (D) Die Mutante *w;Sp/CyO;hdc⁵⁰* weist eine deutlich stärkere FAS III-Färbung auf, wobei das Verteilungsmuster in der Augenscheibe wildtypisch erscheint. Der optische Stiel sowie Strukturen im Bereich der Lamina jedoch weisen eine ungleichmäßige FAS III-Verteilung vermutlich in den axonalen Projektionen auf, mit lokaler Anhäufung von Farbpunkten (Pfeilköpfe). (E) Die wildtypische Augenscheibe zeigt eine dynamische ROUGHEST-Expression, welche bereits in der MF (weißer Pfeil) beginnt und im 5-Zell-Precluster sowie in bestimmten Photorezeptorzellen verbleibt (weiße Pfeilköpfe). Deren axonale Projektionen sind ebenfalls ROUGHEST-positiv und als feinstrukturierte Färbung (Pfeile) im optischen Stiel, der Lamina (La) und der Medulla (Me) zu erkennen. (F) In der Mutante *w;Sp/CyO;hdc⁵⁰* zeigt sich das Expressionsmuster von ROUGHEST in der Augenscheibe weitgehend wildtypisch, wenn auch etwas schwächer und daher strukturell weniger ausgeprägt. Die Lamina- und Medullaprojektionen der Photorezeptoren sind lokal stark gefärbt (Pfeilköpfe) und in der Anordnung fehlerhaft. (anterior oben, Maßstab 50 μm)

In der *hdc*⁵⁰-Mutante ist die FAS III-Expression in der Augenscheibe wildtypisch lokalisiert (Abb. 30D), während optischer Stiel und die Lamina bzw. Medulla eine deutlich stärkere und unstrukturierte Färbung aufweisen. FAS III akkumuliert vermutlich ektopisch beim Funktionsausfall von *headcase* und könnte damit als homophiles Zelladhäsionsmolekül zum „verkleben“ mutanter PR-Axone schon im optischen Stiel beitragen bzw. die Axone an falsche Zielregionen binden (Kose et al., 1997).

Die wildtypische Expression von ROUGHEST (Abb. 30E) ist während der Entwicklung des optischen Systems dynamisch reguliert (Reiter et al., 1996). In der Augenscheibe beginnt die Expression bereits in den Zellen der MF; weiter posterior ist das 5-Zell-Precluster betroffen und schließlich verbleibt die Expression in bestimmten Photorezeptorzellen (R2, R5, R8) und deren Axonen. In der Augenscheibe ergibt sich daraus eine überwiegend punktförmige Färbung, während der optische Stiel und die Lamina- bzw. die Medullastrukturen des optischen Lobus in feinen Linien nachgezeichnet werden.

Die *headcase*-Mutante hingegen (Abb. 30F) weist zwar in der Augenscheibe eine nahezu wildtypische ROUGHEST-Expression auf, jedoch sind in Lamina und Medulla teils massive Verdichtungen der Färbung zu erkennen. Diese lassen auf dicke Axonfaszikel in den optischen Ganglien schließen, welche von einem groben Strukturverlust betroffen sind.

Auch ROUGHEST scheint demnach bei Ausfall von *headcase* entweder in stärkerem Maße exprimiert oder ektopisch in den PR-Axonen akkumuliert, wo es als membranständiges Adhäsionsmolekül mit zur fehlerhaften Faszikulation der in den optischen Lobus einziehenden Retinafasern beitragen könnte.

Im Falle der untersuchten membrangebundenen Zelladhäsionsmoleküle FAS II, FAS III und ROUGHEST könnte HEADCASE demnach als direkt oder indirekt kontaktierender Mediator dienen, welcher die Expression, Lokalisation und/oder die Signalübermittlung dieser Proteine regelt und somit die Feinabstimmung axonaler Projektionen im visuellen System sicherstellt.

4.7 Untersuchung der Zielregion retinaler Projektion

Die bisherigen Daten aus der Expressionsanalyse, den Mosaik- und Rescue-Experimenten, sowie der Detailuntersuchung des mutanten *hdc*-Phänotyps, deuten stark auf eine funktionelle Notwendigkeit von *headcase* auch im Zielgebiet retinaler Projektionen innerhalb des Drosophilagehirns, d.h. den optischen Ganglien hin. Folglich ist eine eingehende Analyse zur Entwicklung dieser Strukturen in den *headcase*-Mutanten geboten. Da der Aufbau von

Lamina und Medulla ein Zusammenspiel von einwachsenden Axonen mit Neuronen und Gliazellen darstellt, sind beide Zelltypen Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

4.7.1 Proliferation neuronaler Vorläuferzellen

Ontogenetisch gesehen entstammen Lamina und distale Medulla dem äußeren Proliferationszentrum (OPC), einer Population postembryonaler Neuroblasten (Hofbauer und Campos-Ortega, 1990; Selleck und Steller, 1992). Das OPC liefert Laminavorläuferzellen (LPC), welche von einwachsenden Photorezeptoraxonen ein induktives Signal erhalten, aus ihrem G1-Arrest in die S-Phase überzutreten und damit ihre letzte Zellteilung zu vollenden, was schließlich zu ausdifferenzierten Laminaneuronen führt (Huang und Kunes, 1996; Salecker et al., 1998). Aus dem inneren Proliferationszentrum (IOC) entstehen die proximale Medulla und die Lobula, welche keine direkten PR-Projektionen erhalten (Hofbauer und Campos-Ortega, 1990; Martin et al., 1995).

Die Struktur der Proliferationszonen kann durch Markierung ihrer teilungsaktiven Zellen mittels Inkorporation von Bromodeoxyuridin (BrdU) während ihrer S-Phase sichtbar gemacht werden. Gleichzeitig können auf diese Weise Axone auf ihr normales Verhalten hin überprüft werden.

Abbildung 31A zeigt eine immunhistochemische Färbung mit einem anti-BrdU-Antikörper an wildtypischen Ganzhirnpräparaten von Tieren des dritten Larvenstadiums. Dabei sind sowohl das ausgeprägte äußere und innere Proliferationszentrum, als auch das schmale, dazwischen liegende Band an Laminavorläuferzellen deutlich markiert.

Demgegenüber zeigen entsprechend behandelte *hdc⁵⁰*-Präparate ein breites Spektrum an abnormen BrdU-Mustern (Abb. 31B), angefangen von massiven Defekten bezüglich der Organisation der OPC, LPC und IPC, bis hin zu leichten Störungen in OPC bzw. LPC. Im Detail gesehen erscheint das OPC weit weniger ausgeprägt als im Wildtyp, weist lokale Ausfälle und/oder Zellinseln auf. Die LPC sind oftmals nicht zu einem gebogenen, durchgängigen Band formiert, sondern zeigen sich lückenhaft, zerrissen oder gänzlich abwesend bzw. als nicht vom OPC getrennt. Die Zellen des IPC bilden oftmals kein rundes Band, sondern eine oval ausgezogene, teils durchbrochene Struktur. Insgesamt sind in der *hdc⁵⁰*-Mutante weniger mitotisch aktive Zellen gefärbt als im Wildtyp.

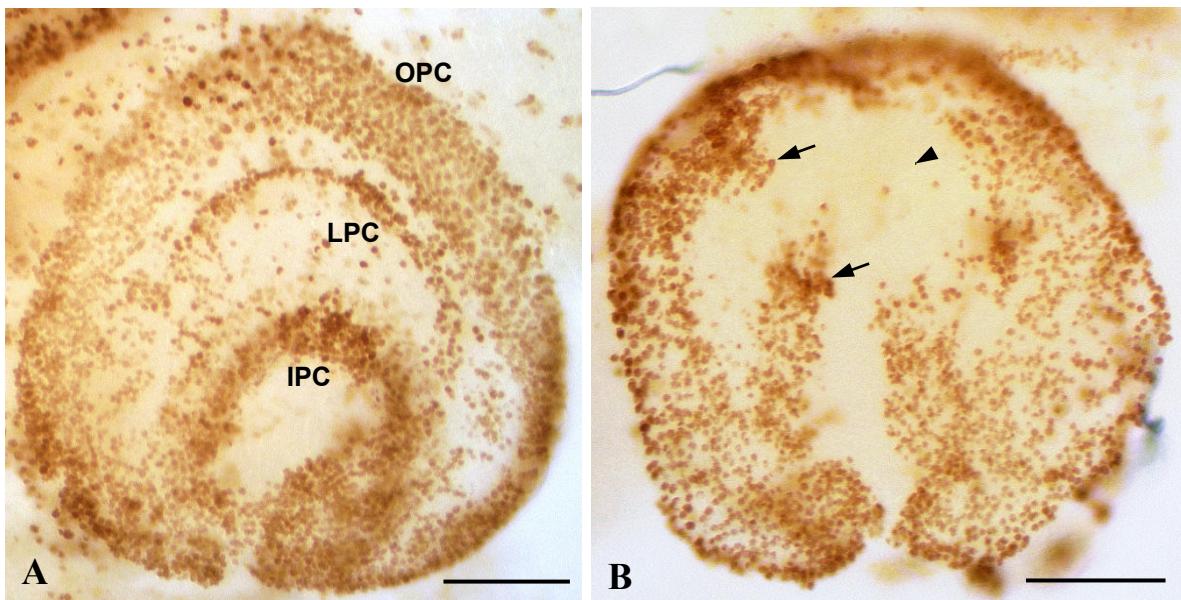


Abb. 31: Proliferation im larvalen optischen Lobus der *hdc*⁵⁰-Mutante. Immunhistochemische Markierung von Zellen in S-Phase bei wildtypischen und *hdc*⁵⁰-mutanten Larvenhirnen des dritten Stadiums mit monoklonalen α -BrdU-Antikörpern. (A) Im Wildtyp sind die Neuroblasten des äusseren (OPC) und inneren (IPC) Proliferationszentrum, sowie das dazwischen liegende Band an Laminavorläuferzellen (LPC) klar voneinander zu unterscheiden. (B) Dagegen weist die *hdc*⁵⁰-Mutante grobe Störungen des wildtypischen Proliferationsmusters von OPC, IPC und LPC auf. Insgesamt sind weniger Zellen gefärbt, welche sich lokal ektopisch anhäufen (Pfeile) bzw. an anderen Stellen großflächig fehlen (Pfeilkopf). (anterior oben, Maßstab 50 μ m)

Aus diesen Daten kann gefolgt werden, dass *headcase* notwendig ist für die frühe Entwicklung der optischen Ganglien. Die lückenhafte bzw. fehlende LPC-Muster in der *hdc*⁵⁰-Mutante kann entweder durch fehlerhaft einwachsende PR-Axone oder durch eine nicht synchrone Bereitstellung teilungsbereiter LPC aus dem OPC erklärt werden.

In Diskussionsteil (Punkt 5.3) wird jedoch dargelegt, dass die LPC-Störung vermutlich nicht in einem *hdc*-Funktionsausfall innerhalb der Axone begründet ist, sondern innerhalb der Neuroblastenzellen. Es kann daraus postuliert werden, dass *headcase* mitunter eine wichtige Rolle im Zellzyklus postembryonaler Neuroblasten der optischen Loben spielt, wobei es wahrscheinlich mit an der Synchronisierung der Zellteilungen beteiligt ist und damit zum korrekten Aufbau imaginaler Hirnstrukturen beiträgt.

In der Tat beschrieben bereits Weaver and White (1995), dass *headcase* in imaginalen Neuroblasten (IN) und ihren Nachkommen während ihrer intensiven Teilungsphase im zweiten und frühen dritten Larvenstadium exprimiert wird. Mit der finalen Neuroblastenteilung im späten dritten Larvenstadium, in welchem sich das larvale CNS für die Verpuppung bereit macht, hört auch die *hdc*-Expression in den IN auf. Somit markiert *hdc*

sowohl den Zeitpunkt für den Wiedereintritt imaginaler Zellen in den mitotischen Zyklus als auch das Zeitfenster ihrer Proliferation.

Die Autoren postulieren daher eine funktionelle Bedeutung von *headcase* für das Timing der imaginalen Proliferation, wobei *hdc* weniger die Zellzahl oder ihr Überleben reguliert, als vielmehr die korrekte Differenzierung adulter Strukturen (da Imaginalscheiben von *hdc*-Mutanten bezüglich ihrer Größe wildtypisch sind).

Daher kann aus den BrdU-Daten auf eine Beteiligung von *headcase* an der Differenzierung eines intakten Zielgebiets axonaler Projektionen geschlossen werden. Das bestätigen auch weitere Untersuchungen der auf die Proliferation folgenden ersten Differenzierungsstufen der Laminaneurone.

4.7.2 Differenzierung der Laminaneurone

Die Laminaneurogenese kann anhand verschiedener zellspezifischer Marker verfolgt werden, welche nicht in den undifferenzierten LPC exprimiert werden, wie z.B. die Proteine Dachshund (DAC; Mardon et al., 1994) und ELAV (Robinow und White, 1991). Das Dachshund-Protein wird in solchen LPC gebildet, welche durch den Übergang in die S-Phase bereits mit ihrer Differenzierung begonnen haben und posterior der Laminafurche liegen; DAC kennzeichnet somit die frühe Differenzierungsphase der Laminaneurone. ELAV hingegen markiert die späte Phase und wird erst dann exprimiert, wenn die postmitotischen neuronalen Vorläuferzellen jenseits der Laminafurche zu sog. *Cartridges* (Laminasäulen) assembliert werden. Beide Marker bleiben nach ihrer Induktion kontinuierlich in den Laminaneuronen exprimiert (Huang und Kunes, 1996, 1998; Huang et al., 1998).

Immunhistochemische Färbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen DAC zeigen beim Wildtyp eine Expression in allen Neuronen der sichelförmigen Lamina und der inneren optischen Anlage (IOA, Abb. 32A). Dagegen weisen *hdc*⁵⁰-Tiere ein breites Spektrum an Störungen im Muster DAC-positiver Neuronen der Lamina als auch der inneren optischen Anlage auf (Abb. 32B). In beiden Strukturen treten gehäuft Inseln fehlender oder DAC-negativer Neurone auf. Die Lamina erscheint dadurch breiter, ausgefranst und asymmetrisch-zerklüftet und die IOA länglich ausgezogen.

Die Daten belegen, dass beim ubiquitären Funktionsausfall von *headcase* auch die frühe Laminadifferenzierung und damit das Zielgebiet der Photorezeptoraxone R1-R6 gestört ist.

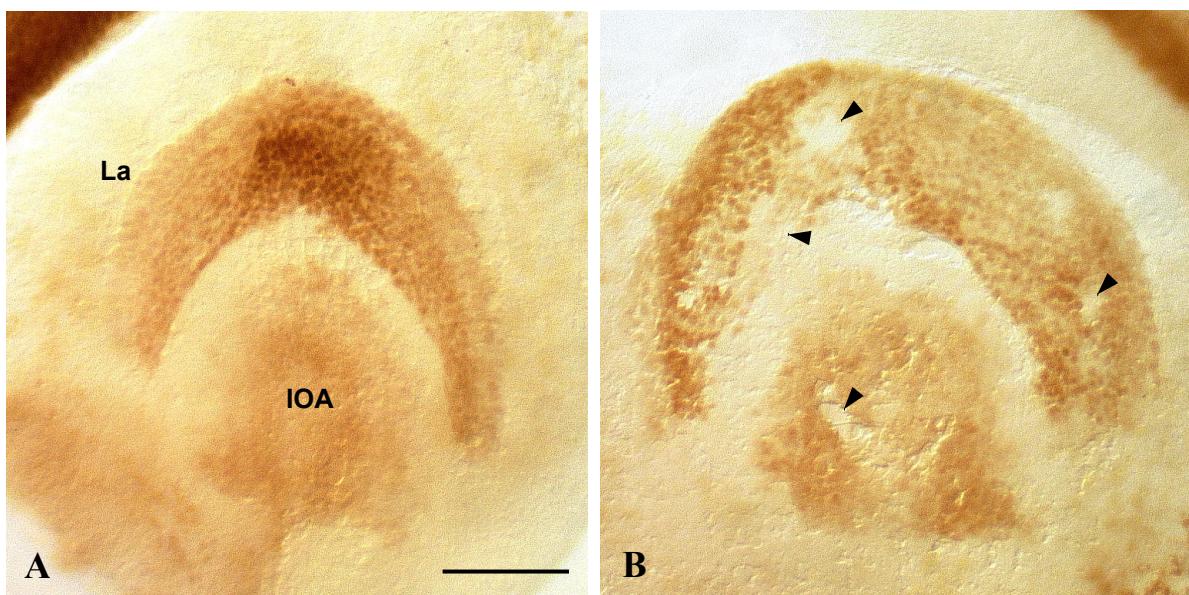


Abb. 32: Frühe Differenzierung der Laminaneurone in *hdc⁵⁰*-mutanten Larven. Ganzhirnpräparate von wildtypischen und *hdc⁵⁰*-mutanten Larven des dritten Stadiums wurden immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper α -DACHSHUND gefärbt. **(A)** Das wildtypische Hirn zeigt eine Färbung in Neuronen der halbmondförmigen Lamina (La) und der inneren optischen Anlage (IOA). **(B)** Im mutanten Hirn ist die Struktur der Lamina und der inneren optischen Anlage fehlerhaft, wobei Stellen mit fehlenden Neuronen (Pfeilköpfe) zu beobachten sind. Die Lamina erscheint insgesamt breiter als im Wildtyp (anterior oben, Maßstab 50 μm).

Diese Störung kann darin begründet sein, dass entweder *nicht alle* (aufgrund fehlender/gestörter Induktion durch retinaler Axone) oder aber *nicht genügend* (aufgrund fehlerhafter Proliferation des OPC) Laminavorläuferzellen in die Differenzierungsphase übertreten.

Aufschluß hierüber geben DAC-Färbungen an *hdc⁵⁰*-Mosaik-Tieren, welche mit dem EGUF-System hergestellt wurden (siehe Punkt 4.4). Wie oben erwähnt besitzen solche Larven selektiv *hdc⁵⁰*-homozygot mutante Photorezeptorzellen, deren Axone in ein ansonsten wildtypisches bzw. *hdc⁵⁰*-heterozygotes Hirn projizieren.

Die Abbildungen 33A und B beweisen, dass *hdc⁵⁰*-EGUF-Tiere tatsächlich ein wildtypisches Zielgebiet *hdc⁵⁰*-mutanter retinaler Axone zeigen. Das Dachshund-Expressionsmuster sowohl der Lamina als auch der inneren optische Anlage der *headcase*-Mosaike ist von der Kontrolle nicht zu unterscheiden. Zwar können vereinzelt fehlerhafte Strukturen beobachtet werden, welche jedoch in Mosaik und Kontrolle gleichermaßen vorkommen und damit wohl in dem verwendeten EGUF/hid-System selbst und nicht in *hdc⁵⁰* begründet sind. Kramer und Staveley (2003) weisen darauf hin, dass im Auge stark exprimiertes GAL4 nachteilige Effekte auf die Entwicklung von *Drosophila* haben kann.

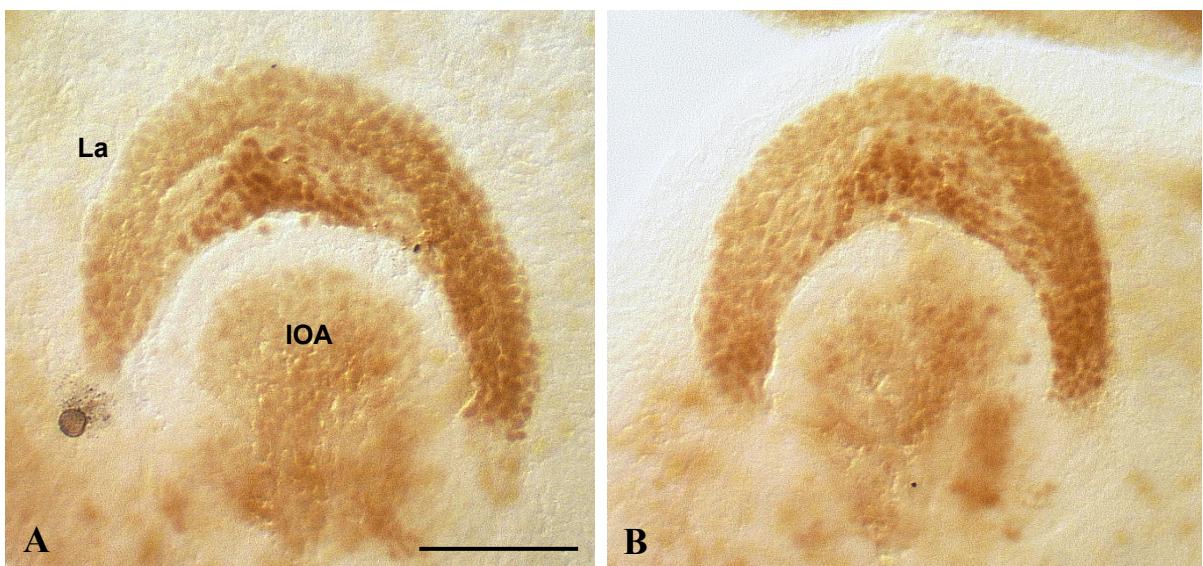


Abb. 33: Frühe Differenzierung der Laminaneurone in *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaik-Larven. Ganzhirnpräparate von wildtypischen und *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaik-Larven des dritten Stadiums wurden immunhistochemisch mit dem monoklonalen α -DACHSHUND Antikörper behandelt. **(A)** Die wildtypischen Mosaik-Kontrolltiere besitzen eine normal ausgeprägte Lamina (La) und innere optische Anlage (IOA). **(B)** Die *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaik-Tiere, bei welchen nur die Augenscheibe (samt Photorezeptoren und deren Axone) homozygot für *hdc⁵⁰* ist, zeigen ebenso eine wildtypische Ausprägung der DACHSHUND-positiven Lamina und inneren optischen Anlage. (anterior oben, Maßstab 50 μm).

Dennoch zeigen die DAC-Färbungen an den Mosaiken, dass ungeachtet des Funktionsverlustes von *headcase* in den Photorezeptoraxonen und des daraus resultierenden mutanten axonalen Phänotyps, der Aufbau der optischen Ganglien nahezu ungestört ist. Demzufolge ist *headcase* kein Faktor der in den Photorezeptoraxonen an der Induktion der Lamina beteiligt ist, sondern seine Funktion in den Neuroblasten ausübt, um dort die Weichen für eine korrekte Laminadifferenzierung zu stellen.

Die Fehler in der frühen Laminadifferenzierung pflanzen sich auch in der späten Phase fort, wie ELAV-Färbungen an Ganzhirnpräparaten *hdc⁵⁰*-mutante Larven belegen. Dabei sind ELAV-positive Lamina- und Lobulaneurone im Vergleich zum Wildtyp stark dezimiert, bzw. weisen isolierte, ektopische Zellinseln auf (Daten nicht gezeigt).

4.7.3 Beteiligung von Gliazellen am *hdc*-Phänotyp

Die Formation des retinalen Projektionsmusters im optischen Lobus ist ein induktives Zusammenspiel von Photorezeptorzellaxonen nicht nur mit neuronalen Zielzellen, sondern auch mit Gliazellen, welche eine wesentliche Aufgabe bei der Wahl des korrekten Zielgebietes retinaler Axone wahrnehmen. Dabei induzieren PR-Axone sowohl die Proliferation und Differenzierung von Laminaneuronen, als auch die Differenzierung und Migration von bestimmten Gliazelltypen (Perez und Steller, 1996; Poeck et al., 2001; Pielage und Klämbt, 2001). Die Gliazellen der Lamina entstehen in zwei Zentren (*glial precursor cells*, GPC) an den posterioren Enden der Lamina, von welchen aus sie in die Lamina-Vorläuferregion einwandern. Die Proliferation und frühe Morphogenese der Laminaglia ist unabhängig von retinalen Eingängen, nicht jedoch ihre spätere Migration und Differenzierung (Perez und Steller, 1996; Huang und Kunes, 1998; Suh et al., 2002). Andererseits liefern die Laminaglia das Stoppsignal für einwachsende R1-R6 Axonkegel zur Bildung eines korrekten Laminaneuropils (Poeck et al., 2001)

Aufgrund des Nachweises einer HEADCASE-Expression auch in Gliazellen (siehe Punkt 4.3.1) und deren wichtige Rolle in der Entstehung des visuellen Systems, wurde die Verteilung und Differenzierung von Gliazellen in der *headcase*-Mutante analysiert. Dabei dienten die Gene *optomotor blind* (*omb*) und *reversed polarity* (*repo*) als zwei verschiedene Gliazellmarker. Für *omb* stand die *Enhancer-Trap-Linie* X35 zur Verfügung, die in den *hdc*⁵⁰-Stamm eingekreuzt wurde. X35 weist eine β-Galaktosidase-Expression u.a. in Gliavorläuferzellen der zwei glialen Anlagen, in reifen epithelialen und marginalen Glia der Lamina, sowie in subretinalen Gliazellen auf (Poeck et al., 1993; Huang and Kunes, 1998). Für den REPO-Nachweis wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, welcher alle reifen Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems markiert, darunter auch die Lamina-, Medulla- und subretinale Gliazellen des optischen Systems (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995).

Abbildung 34A zeigt eine immunhistochemische Färbung gegen die β-Galaktosidase an Ganzhirnpräparaten von wildtypischen X35-Larven. Dabei ist ein klar strukturiertes Muster *omb*-positiver Zellen in den dorsalen und ventralen glialen Anlagen und in Gliazellen, die von dort aus in die entstehende Lamina einwandern und sich als epithiale und marginale Gliazellen halbmondförmig im Projektionsgebiet der PR-Axone R1-R6 verteilen. Aufgrund ihrer charakteristischen Lage anterior zu den Laminaglia (Perez und Steller, 1996) sind ferner

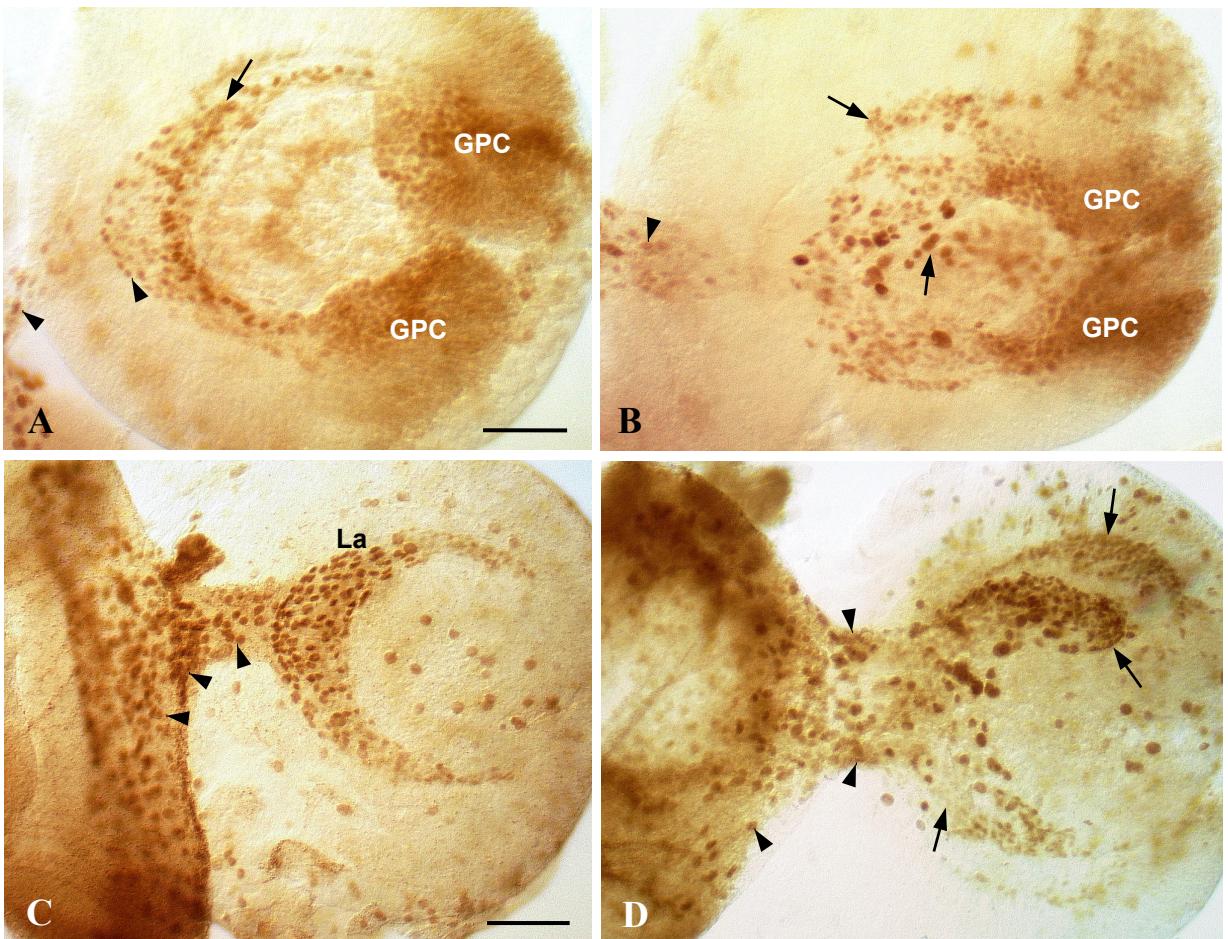


Abb. 34: Struktur und Differenzierung von Gliazellen im larvalen optischen System der *hdc⁵⁰*-Mutante. Immunhistochemischer Nachweis von Gliazellen im visuellen System von wildtypischen und *hdc⁵⁰*-mutanten Larven des dritten Stadiums mit Hilfe des gliaspezifischen *omb-lacZ* (X35) Markers (A und B) bzw. unter Verwendung des polyklonalen α -REPO Antikörpers (C und D). (A) In der wildtypischen Kontrolle X35;Sp/Cyo;D3/TM6B färben die Zellen der dorsalen und lateralen Gliaanlagen (GPC), der im Projektionsgebiet von R1-R6-Axonen liegenden epithelialen und marginalen Glia (Pfeile), sowie der im Bereich des antrioren Laminacortex bzw. des optischen Stiels positionierten Satelliten- bzw. Subretinalglia (Pfeilköpfe). (B) Die Mutante X35;Sp/Cyo;*hdc⁵⁰* zeigt ein schwer gestörtes Muster der gliaspezifischen Färbung. Die glialen Anlagen sind länglich ausgezogen und sind nicht mehr klar von den Laminaglia getrennt, welche ihrerseits an ektopischen Positionen zu finden sind (Pfeile) und damit kein geordnetes, sichelförmiges Muster ausbilden. Die subretinalen Gliazellen scheinen vermehrt im optischen Stiel aufzutreten (Pfeilkopf). (C) Die Wildtyp-Kontrolle *w¹¹¹⁸* weist nach REPO-Färbung ein halbmondförmiges, stereotypes Muster aller reifen Gliazellen im Laminabereich (La) und der Augenscheibe bzw. des optischen Stiels (Subretinale Glia; Pfeilköpfe) auf. (D) Die REPO-gefärbte *hdc⁵⁰*-Mutante bestätigt die in B gezeigte fehlerhafte Verteilung der betreffenden Gliazellen. Die Laminaglia bilden Inseln ektopisch lokalisierter Zellenansammlungen bzw. fehlender Zellen auf (Pfeile). In der Augenscheibe sind insgesamt weniger subretinale Glia (Pfeilkopf) gefärbt, während sie im optischen Stiel gehäuft aufzutreten scheinen. (anterior links; dorsal oben; Maßstab 50 µm)

Satellitenglia und subretinale Gliazellen (SR-Glia) als *omb*-positiv zu erkennen, wobei letztere auch im optischen Stiel und der Augenscheibe markiert sind.

Im Gegensatz zur Kontrolle weisen die X35;*hdc⁵⁰*-Larven teils gravierende Störungen im Verteilungsmuster aller gefärbten Gliazellen auf (Abb. 34B). Die runde Struktur der glialen

Anlagen und die halbmondförmige Anordnung der Lamina- und Satellitenglia ist aufgelöst und die subretinalen Glia treten gehäuft im optischen Stiel auf, aber in der Augenscheibe nur in geringerer Zahl und unstrukturierter. Es scheint, als ob die unreifen Gliazellen an den Orten ihrer Entstehung stecken bleiben bzw. die Gliazellen zu falschen Zeitpunkten aus ihren Anlagen heraustreten und sich differenzieren. Die dennoch wandernden Glia verfehlten ihren wildtypischen Migrationspfad und stoppen an ektopischen Stellen des visuellen Systems, wodurch sie im retinalen Projektionsbereich stochastisch verstreut liegen.

Immunhistochemische Färbungen gegen REPO (Abb. 34D) an mutanten *hdc⁵⁰*-Larven bestätigen das fehlerhafte Verteilungsmuster reifer Gliazellen. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 34C) ist auch hier die Anordnung der Lamina-, Medulla- und Satellitenglia in der Mutante nicht mehr halbmondförmig, sondern zeigt eine unstrukturierte Verteilung mit ektopisch verstreuten Zellansammlungen, wobei diese gehäuft an den dorsalen und ventralen Enden der Lamina auftreten.

Das bedeutet, dass tatsächlich ein Teil der aus den GPC wandernden Gliazellen stehen bleiben und nicht im korrekten retinalen Projektionsgebiet, sondern ektopisch an dessen Flanken stoppen und dort ausdifferenzieren. Das gleiche Schicksal erfahren die subretinalen Glia, welche im optischen Stiel bzw. der Augenscheibe eher stochastisch positioniert sind. Sie migrieren nicht geordnet aus dem optischen Stiel, ihrem Entstehungsort (Choi und Benzer, 1994; Rangajaran et al., 1999), in die Augenscheibe hinein, sondern verteilen sich unregelmäßig an ektopischen Orten dieser Strukturen. Insgesamt erscheinen deutlich weniger REPO-positive Zellen gefärbt, was auf weniger reife Gliazellen schließen lässt.

Doppel-Fluoreszenzfärbungen mit den Antikörpern 24B10 und α -REPO an larvalen Ganzhirnpräparaten von Wildtyp und *headcase*-Mutante demonstrieren die genaue Lage der retinalen Projektionszonen im Verhältnis zu den Gliazellen. Im Wildtyp (Abb. 35A bis C) stoppen die Wachstumskegel der R1-R6 Axone im Grenzgebiet zwischen den epithelialen Gliareihen auf der einen Seite und den marginalen und medullären Gliazellen auf der anderen Seite.

Die *hdc⁵⁰*-Mutante hingegen (Abb. 35D bis F) besitzt kein geordnetes Muster der drei Gliazellreihen, sondern sie sind stark gegeneinander verschoben bzw. liegen als einzelne Zellinseln verstreut und unzusammenhängend im Laminaplexus. Dieser weist eine grob fehlerhafte Terminierung der R1-R6 Axone auf, wobei sich eine Korrelation zwischen der deformierten Laminalinie und der ektopischen Lage der Gliazellen abzeichnet.

Betrachtet man die Verteilung der subretinalen REPO-positiven Glia der *hdc⁵⁰*-Mutante näher (Abb. 36), so zeigt sich gegenüber dem Wildtyp eine Anhäufung von Zellen im optischen

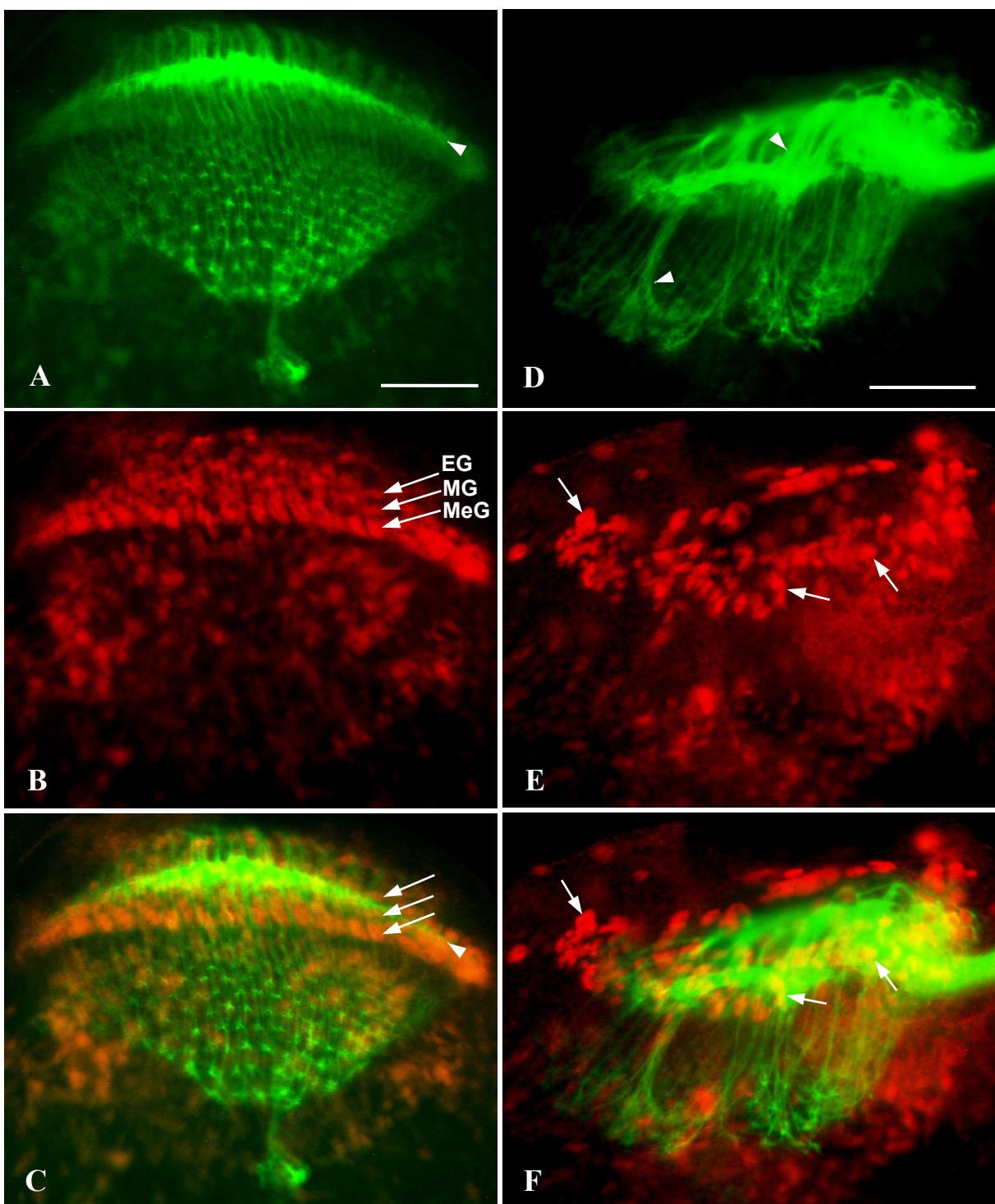


Abb. 35: Doppelfärbungen von Gliazellen und Photorezeptoraxonen im optischen Lobus von *hdc⁵⁰*-Larven. Doppelfärbungen mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern 24B10/DTAF (grün) und α -REPO/Cy3 (rot) an Ganzhirnpräparaten von wildtypischen und *hdc⁵⁰*-mutanten Larven. (A) bis (C) Beim Wildtyp terminieren die Photorezeptoraxone R1-R6 in einer Linie (A und C; Pfeilkopf) zwischen den Zellreihen der epithelialen Glia (EG) auf der einen und den marginalen (MG) und medullären Glia (MeG) auf der anderen Seite (B und C; Pfeile), während die R7 und R8 Axone retinotopes Projektionsmuster in der Medulla aufbauen. (D) bis (F) In der *hdc⁵⁰*-Mutante bilden die Zellen der drei Gliareihen kein definiertes Muster, sondern liegen verstreut im Laminabereich (E und F; Pfeile). Die defekten Projektionen der PR-Axone R7+R8 bilden in der Medulla den typischen „*hdc⁵⁰*-Brokkoli-Phän“ und die R1-R6 Axone terminieren ebenfalls in dicken Faszikeln unstrukturiert in die Laminaregion (D; Pfeilkopf). Die defekten Laminalinie scheint dabei mit der fehlerhaften Lage der Gliazellen zu korrelieren. (anterior oben, Maßstab 50 μm)

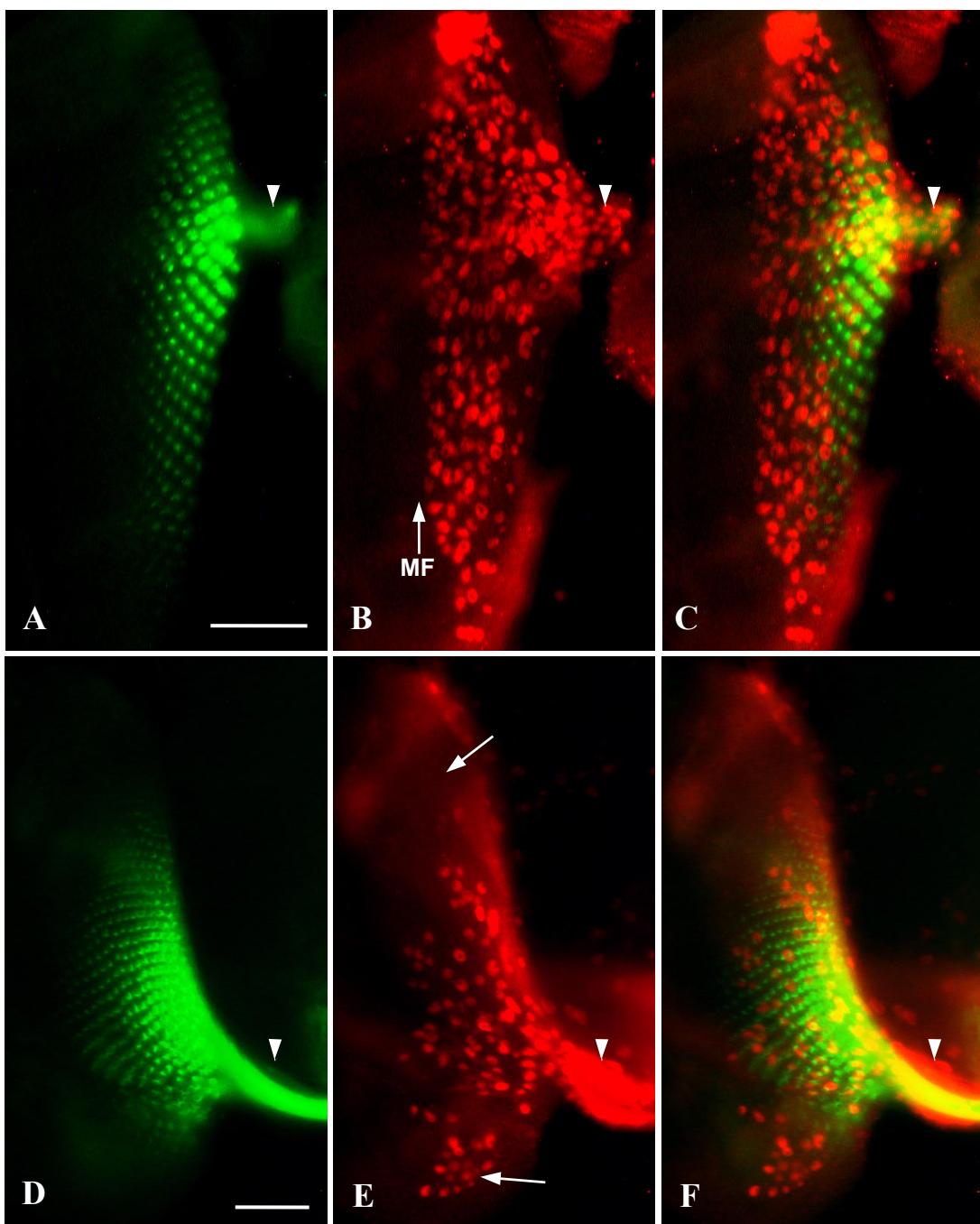


Abb. 36: Doppelfärbungen der subretinalen Gliazellen und der Photorezeptoren mit ihren Axonen in Augenscheibe und im optischen Stiel von *hdc⁵⁰*-Larven. Fluoreszenz-Doppelfärbungen mit 24B10/DTAF (grün) und α -REPO/Cy3 (rot) an Augenscheibenpräparaten von wildtypischen (A bis C) und *hdc⁵⁰*-mutanten (D bis E) Larven. **(A) bis (C)** Im Wildtyp zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der SR-Glia im optischen Stiel (Pfeilkopf) und über die gesamte Breite der Augenscheibe, in welcher die Glia bis zur Morphogenetischen Furche (MF in B; Pfeil) wandern und dort eine scharfe Grenze markieren. Die grüne Färbung kennzeichnet dazu die Lage der Photorezeptoren und ihrer durch den optischen Stiel ins Hirn ziehenden Axone. **(D) bis (F)** Die *hdc⁵⁰*-Mutante weist trotz weitgehender wildtypischer Anordnung der Photorezeptoren ein gestörtes Gliazellmuster auf. Dabei akkumulieren die SR-Glia im optischen Stiel (Pfeilkopf) und wandern in deutlich geringerer Zahl in die Augenscheibe ein. Das Gewebe ist nicht in der gesamten Breite von Gliazellen belegt, sondern es zeigen sich Lücken im Verteilungsmuster bzw. Zellinseln (Pfeile in E), die keine scharfe Grenze bilden. (anterior links, Maßstab 50 μ m)

Stiel, während in der mutanten Augenscheibe die SR-Glia in geringerer Zahl und ungeordneter bzw. in lückenhaftem Verteilungsmuster auftreten.

Auffällig in diesem Zusammenhang ist die Verteilung der Gliazellen beim extremen *headcase*-Phänotyp, welcher bereits unter Punkt 4.4.1.1 erwähnt wurde. Bei diesem bleiben die PR-Axone entweder im optischen Stiel stecken oder laufen quasi rückwärts (anterior) in die Augenscheibe hinein. Die Abbildung 37 bestätigt nun die weiter oben geäußerte Vermutung, dass bei diesem Phänotyp die Verteilung der Gliazellen gestört ist. Während die Augenscheibe keine oder kaum REPO-positive SR-Glia aufweist und im Hirn ebenfalls nur sehr vereinzelt Gliazellen gefärbt sind, zeigt der optische Stiel eine starke Akkumulation von SR-Glia im optischen Stiel, welche nicht in die Augenscheibe gewandert sind. Gleichzeitig beweist die 24B10-Markierung, dass keine PR-Axone in diesen optischen Lobus projizieren, sondern in der Augenscheibe verbleiben; nur der Bolwignerv wandert sichtbar in das Hirn.

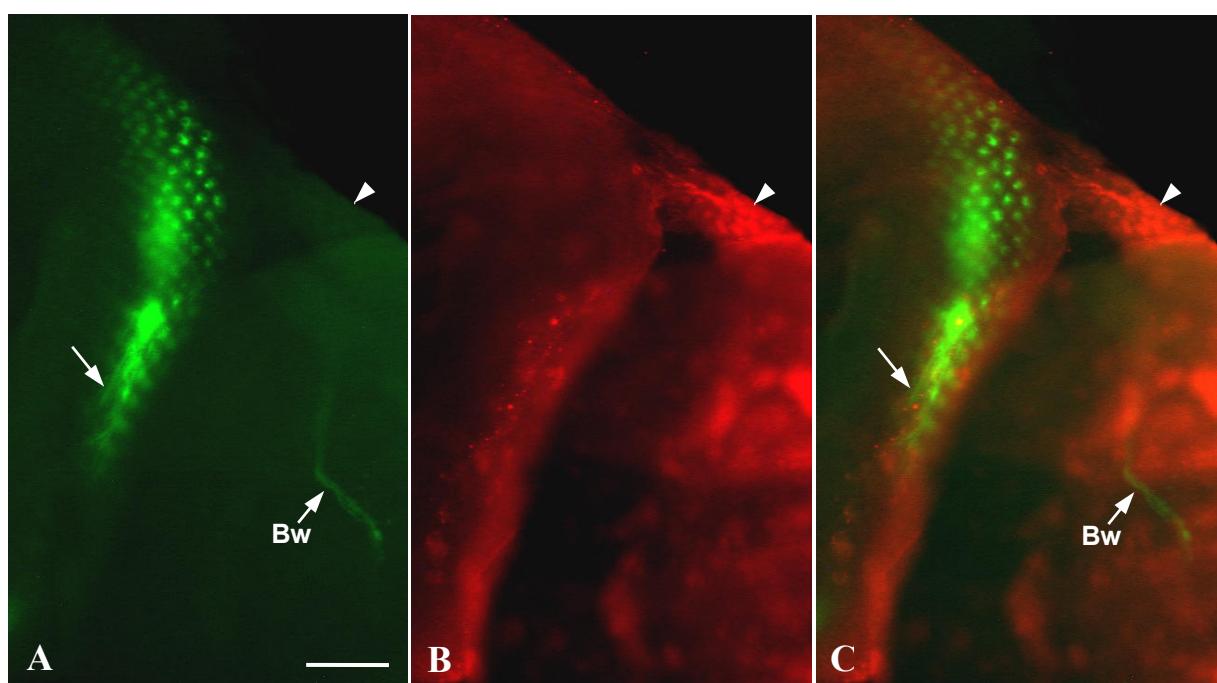


Abb. 37: Doppelfärbungen der subretinalen Glia und der Photorezeptoren mit ihren Axonen in Augenscheibe und im optischen Stiel von *hdc⁵⁰*-Larven mit extremem Phänotyp. Fluoreszenz-Doppelfärbung mit 24B10/DTAF (grün) und α -REPO/Cy3 (rot) am larvalen Ganzhirnpräparat einer *hdc⁵⁰*-Mutante mit extremen Projektionsdefekten der Photorezeptoraxone. (A) bis (C) Beim extremen *hdc⁵⁰*-Phänotyp projizieren keine PR-Axone ins Hirn, sondern laufen anterior („rückwärts“) in die Augenscheibe hinein (A; Pfeil). Allein der Bolwignerv (Bw in A; Pfeil) des larvalen Lichtsinnesorgans zieht sichtbar in den optischen Lobus. Die subretinalen Glia bleiben fast gänzlich im optischen Stiel stecken (B; Pfeilkopf), so dass in die Augenscheibe kaum REPO-positive Gliazellen aufweist. (anterior links, Maßstab 50 μm)

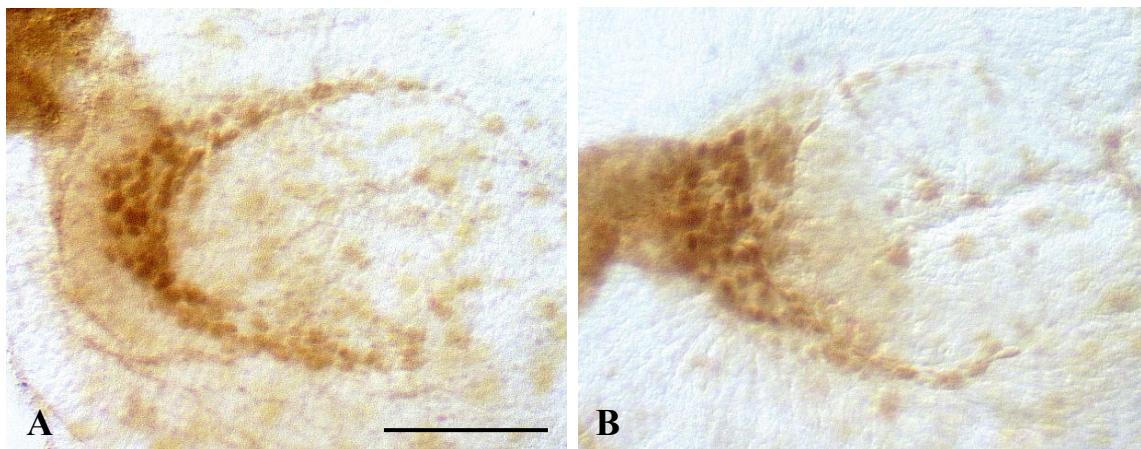


Abb. 38: Struktur und Differenzierung REPO-positiver Glia im larvalen optischen Lobus von *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaiktieren. Immunhistochemische α -REPO Färbungen am larvalen Ganzhirnpräparaten von wildtypischen EGUF-Mosaik Kontrollen und mutanten *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaiktieren. **(A) und (B)** Der optische Lobus von *hdc⁵⁰*-Mosaiken (B) zeigt eine ungestörte Organisation der differenzierten Gliazellen der Laminaregion und unterscheidet sich damit nicht von der wildtypischen Kontrolle (A). (anterior links, Maßstab 50 μm)

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass ein Funktionsausfall von *headcase* auch eine Störung der Proliferation, Differenzierung und/oder Migration von Gliazellen zur Folge hat. Falsch positionierte Laminagliazellen könnten somit die groben Defekte in der Projektion von R1-R6 Axonen der *hdc⁵⁰*-Mutante bedingen und ebenso könnte die fehlerhafte bzw. fehlende Migration der subretinalen Glia zu den beobachteten extremen *headcase*-Phänotypen führen.

Zur Unterstützung dieser Hypothese wurden α -REPO Färbungen an larvalen *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaiktieren durchgeführt, bei welchen wie oben erwähnt homozygot *hdc⁵⁰*-mutante Photorezeptoraxone in ein wildtypisches Gehirn projizieren. Falls die Hypothese stimmt, dann dürften in den Mosaiktieren die mutanten PR-Axone keinen Einfluß auf die Organisation der differenzierten Gliazellen im Laminabereich besitzen. Genau dieser Befund ließ sich bei der REPO-Färbung der *hdc⁵⁰*-Mosaike beobachten, wie Abb. 38 demonstriert. Dabei zeigte sich im optischen Lobus der Mosaiklarven (Abb. 38B) eine kaum gestörte Verteilung REPO-positiver Glia und war damit nicht von der Kontrolle zu unterscheiden (Abb. 38A). Auch in der Augenscheibe und im optischen Stiel waren die Gliazellen weitgehend wildtypisch angeordnet (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern neue Erkenntnisse zur Entwicklung des visuellen Systems von *Drosophila melanogaster*. An der Entstehung einer funktionellen Einheit aus den perzeptiven Photorezeptoren und den signalverarbeitenden optischen Ganglien sind eine ganze Reihe von Genen beteiligt, deren Wirkungsweise im Prinzip bereits gut verstanden ist (siehe Einleitung; Tayler und Garrity, 2003; Voas und Rebay, 2004). Dennoch bestehen viele offene Fragen hinsichtlich des präzisen Aufbaus dieser hochgeordneten axonalen Netzwerke, welche zwischen der Retina und dem optischen Lobus während der Ontogenese etabliert werden müssen. Während der letzten Dekade wurden große Anstrengungen unternommen, um in ungerichteten Mutagenesen neue genetische Elemente aufzuspüren, die ihre Rolle in der komplexen Symphonie der neuronalen Vernetzung des optischen Systems wahrnehmen. Aus der umfassenden Charakterisierung dieser Mutanten auf zellulärer und molekularer Ebene erwächst ein tieferes Verständnis der funktionellen Beziehungen und Signalwege der an diesen Prozessen beteiligten Gene bzw. ihrer Produkte.

Die vorliegende Arbeit präsentiert eine detaillierte histologische, genetische und funktionelle Untersuchung der Mutante des Gens *headcase*, welche Fehler im Aufbau des visuellen Systems aufweist. Die Ergebnisse dieser Analyse werden nun im Hinblick auf die Bedeutung von *headcase* innerhalb der ontogenetischen Entwicklung der Retina bzw. des Zielgebietes ihrer axonalen Projektionen diskutiert.

5.1 Die Mutante *headcase* zeigt fehlerhafte retinale Projektionen

Das *headcase*-Gen ist aufgrund seiner Beteiligung an der Tracheenentwicklung und der Differenzierung von Imaginalscheiben bereits bekannt gewesen (Steneberg et al., 1998; Weaver und White, 1995). Bisher nicht beschrieben ist jedoch der Zusammenhang zwischen dem *headcase*-Gen und seiner putativen Funktion im Aufbau des visuellen Systems. Dieser eröffnete sich erst im Zuge der Isolierung von Mutanten mit defekter retinaler Projektion aus einer Sammlung letaler P-Elementstämme (siehe Ergebnisse Punkt 4.1; Deak et al., 1997). Dabei wurde zunächst die Linie 75/04 identifiziert, welche gravierende Defekte in der retinalen Projektion der späten dritten Larve aufwies. Deren P-Element inseriert in der Region 99E4-F1, dem zytogenetischen Bereich von *headcase*, zu welchem sich 75/04 allelisch zeigte, da es die *headcase* Deletionsmutante *hdc⁵⁰* bezüglich ihres mutanten Phänotyps nicht komplementierte, wohl aber bezüglich ihrer pupalen Letalität. Demnach könnte das *headcase* Allel *hdc^{75/04}* in seiner Ausprägung nur schwach hypomorph sein, so dass die infolge der P-

Element-Insertion veränderte Expression des HEADCASE-Proteins keine lebenswichtigen Funktionen der Tiere stört, sondern lediglich das visuelle System in seinem Aufbau.

Hierbei zeigen *hdc*⁵⁰ und *hdc*^{75/04} einander gleichartige phänotypische Ausprägungen (Abb. 9B und C), wenn auch bei *hdc*^{75/04} mit einer geringeren Penetranz. Beide *hdc* Allele weisen im dritten Larvenstadium, d.h. nach weitgehendem Abschluss der retinalen Projektionen, eine starke Faszikelbildung der Photorezeptoraxone sowohl in der Lamina als auch der Medulla auf, bei gleichzeitig kaum gestörter Augenscheibe. Es kommt in Lamina und Medulla zu lokalen Terminianhäufungen und damit zur fehlerhaften Topographie. Die Lamina erscheint stellenweise stark deformiert und zerklüftet. Die Medulla zeigt den typischen „Brokkoli“-Phänotyp, bei welchem sich die Axone partiell bündeln und zu ektopischen Positionen hin wieder auffächern. Die Störungen in der Lamina- und Medullaterminierung deuten zunächst auf eine gestörte Zielfindung der PR-Axone hin. Die hyperinnervierte Medulla verleitet zu der Annahme, dass einige R1-R6 Axone nicht im ersten Ganglion stoppen, sondern gemeinsam mit R7+R8 in Faszikeln in die Medulla ziehen, wie es bereits für die *nonstop*-Mutante beschrieben wurde (Poeck et al., 2001). Jedoch zeigte eine spezifische Markierung der R1-R6 Axone in larvalen *hdc*⁵⁰-Mutanten (Abb. 27), dass diese PRA fast alle korrekt in der Lamina halten und nicht in die Medulla weiterziehen. Damit ist *headcase* im Larvenstadium nicht direkt an der Wahl des korrekten Ganglions durch die R1-R6 Axone beteiligt, sondern eher an deren geordnetem Auswachsen aus den Photorezeptoren. Es scheint in *headcase* zu diesem Zeitpunkt entweder ein Defaszikulierungsproblem der PRA oder eine falsche axonale Komposition der PR-Faszikel zu bestehen, was die Axone daran hindert ihre wildtypische Position innerhalb der Lamina bzw. Medulla einzunehmen. Wie schon im Ergebnisteil erwähnt (Punkt 4.2), deuten die Lücken im Medullaneuropil (Abb. 9C) darauf hin, dass R7 und R8 PR-Axone aus verschiedenen Ommatidien gemeinsam faszikulieren und nicht mehr retinotop, sondern an ektopischen Positionen in der Medulla terminieren. Diese Defekte wurden u.a. in der Protocadherin-Mutante *flamingo* (Lee et al., 2003) beobachtet, in der sich die PR-Axone dick bündeln und falsche synaptische Ziele in beiden optischen Ganglien ansteuern, aber R1-R6 ebenfalls keinen *nonstop* Phän aufweisen. Ferner konnten Clandinin und Zipursky (2000) zeigen, dass Interaktionen zwischen afferenten Axonen bestimmter Photorezeptoren für die Selektion des korrekten Zielgebiets im optischen System notwendig sind, wobei die präzise Zusammensetzung von PR-Axonen innerhalb der retinalen Faszikel eine kritische Rolle spielt. Dieser Sachverhalt wird weiter unten noch eingehender erläutert.

Die larvalen Projektionsdefekte der *headcase*-Mutanten setzen sich im adulten Tier fort (Abb. 10B). Neben Deformationen im säulenförmigen Aufbau der Retina und den beiden optischen Ganglien fällt insbesondere die unvollständige Medulla-Drehung und der sog. „Bypass“-Phänotyp auf. Dieser besteht aus einem Bündel ektopisch projizierender PR-Axone, welche nicht durch das Chiasma, sondern um die Medulla herum laufen, um letztlich doch in ihr zu terminieren. Wie spezifische Markierungen von bestimmten PR-Subtypen (Punkt 4.6.1) belegten, sind am Aufbau des Bypass-Faszikels alle 8 Photorezeptoraxone beteiligt, wobei der Großteil vermutlich aus fehlerhaften R7-Axonen besteht. Das lässt sich aus einem Vergleich der durchgeführten Färbungen schließen. Während der Bypass-Faszikel in der 24B10-Färbung (markiert alle PR-Axone) recht dick erscheint (Abb. 28C und 29C), sind bei den spezifischen Färbungen gegen *Rh1lacZ* (R1-R6) und *Rh6lacZ* (R8) unverhältnismäßig wenig axonale Fasern sichtbar, welche zusammengenommen nicht den Umfang des 24B10-gefärbbten Faszikels ergeben. Demnach müsste der fehlende, nicht spezifisch-gefärbte Anteil an Bypass-Projektionen aus R7 PR-Axonen bestehen.

Tangentiale Semidünnschnitte durch adulte *hdc⁵⁰*-homozygote Augen demonstrierten grobe retinale Störungen bezüglich der Anordnung, Anzahl und Morphologie von Ommatidien und ihren Rhabdomeren (Abb. 21). Eine statistische Auswertung belegte eine gegenüber dem Wildtyp signifikant unterzählige als auch überzählige Anzahl an Rhabdomeren pro Ommatidium (Abb. 22). Dabei scheint es, dass in der Mehrzahl R7-Photorezeptoren von einer Verdopplung betroffen sind, deren Rhabdomere aufgrund ihrer kleineren Größe und ihrer zentralen Lage im Rhabdomerverband eindeutig identifiziert werden können. Deutlich zu erkennen ist ebenfalls eine verminderte Zahl an Pigmentzellen, was darauf hindeuten könnte, dass bei *headcase*-Ausfall eine Transformation von PR-, Pigment- und/oder Kegelzellen zu überzähligen R7- oder auch anderen PR-Zellen stattfindet oder es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose der am Ommatidienebau beteiligten Zellen. Fehler in der ommatidialen Entwicklung verursachen auch eine fehlerhafte Zusammensetzung der ins Hirn ziehenden Axonfaszikel und damit auch eine gestörte axonale Terminierung, wie z.B. eine von überschüssigen R7-Axonen hyperinnervierte Medulla.

5.2 *headcase* beeinflusst die PR-Differenzierung und die Faszikulation ihrer axonalen Projektionen

Die beschriebenen larvalen und adulten Projektionsfehler können nur richtig gedeutet werden, wenn man sich die wildtypische Entwicklung des visuellen Systems vor Augen hält, insbesondere die während der Pupalphase, da dort eine Reorganisation der retinalen Terminalien im optischen Lobus stattfindet (siehe Einleitung Punkt 2.2.4; Clandinin und Zipursky, 2000).

Um aus dem mutanten *hdc*⁵⁰-Phänotyp auf die Bedeutung von *headcase* innerhalb dieses komplexen Geschehens zu schließen, war es zunächst wichtig den Ort der *hdc*-Funktion zu bestimmen. Diesbezüglich lieferten eingehende Expressionsanalysen mit Hilfe der *lacZ*-Linie *hdc*^{B5} und einem monoklonalen Antikörper gegen das HEADCASE-Protein erste Hinweise (Punkt 4.3). Dabei zeigte sich, dass *headcase* nicht auf ein Teilsystem beschränkt ist, sondern ubiquitär im Zytosol aller Zellkörper des optischen Systems exprimiert wird, d.h. sowohl in neuronalen (u.a. Photorezeptoren, Lamina- und Medullaneurone) als auch nicht-neuronalen Zellen (u.a. Pigment- und Kegelzellen, Glia). Hier zeichnet sich bereits eine ubiquitäre Funktion von *headcase* im Aufbau des visuellen Systems ab.

Da Expressionsdaten keine Aussagen zu der funktionellen Notwendigkeit von *headcase* liefern können, wurden Mosaik- und Rescue-Experimente durchgeführt, wobei entweder das Auge oder das Gehirn der Fliege homozygot mutant für *headcase* gestaltet wurden. Aus den Ergebnissen ließ sich zunächst ableiten, ob und in welchem Teil des visuellen Systems die *headcase*-Funktion notwendig oder gar hinreichend ist.

Eine semiquantitative Analyse EGUF/*hid*-induzierter *hdc*⁵⁰-Mosaiken (Abb. 19) zeigte deutlich milder Phänotypen (im Vergleich zu den vollständig *hdc*⁵⁰-Homozygoten), aber dennoch vorhandene mutante Phänotypen. Das bestätigen die dazu komplementären Rescueexperimente, bei denen eine partielle Rettung des *hdc*⁵⁰-Phänotyps mittels einer PR-spezifischen Expression der *hdc*-cDNA gelungen ist. Obwohl die Expressionsstärken der augenspezifischen Treiberlinien GMR-Gal4 bzw. *eyeless*-GAL4 und der ubiquitären *actin*-GAL4 Linie in etwa gleich waren (bestimmt anhand der Expression einer UAS-β-Galaktosidase-Linie; Meier, 2000 und eigene Daten, nicht gezeigt), führte nur der Einsatz der GMR-GAL4-Linie zu einer deutlichen Rettung der Projektionsdefekte. Im Falle von *eyeless*-GAL4 könnte der Zeitrahmen der *eyeless*-Aktivität verschieden von der endogenen *hdc*-Expression im Wildtyp sein, so dass ektopisches HEADCASE zu einem Zeitpunkt exprimiert wird, bei dem es nicht gebraucht

wird. In der Tat weisen *eyeless* und *headcase* unterschiedliche Expressionsprofile auf (für *eyeless*: http://genome.med.yale.edu/Lifecycle/query_gen.php?input1=FBgn0010113; für *headcase*: http://genome.med.yale.edu/Lifecycle/query_gen.php?input1=FBgn0005558). Bei der *actin*-GAL4-Linie blieb die *hdc*-Expression vermutlich unter einer kritischen Grenze, unterhalb derer HEADCASE seine wildtypische Funktion nicht genügend ausüben konnte. Das zeigt sich auch daran, dass die pupale Letalität in keinem Falle revertiert wurde.

Die Daten belegen jedoch, dass *headcase* in der Tat nicht nur im Auge, sondern auch im optischen Lobus für die Etablierung korrekter retinaler Projektionen notwendig ist und damit eher ubiquitär im visuellen System wirksam sein könnte. Die Bedeutung von *headcase* für die Entwicklung des optischen Lobus wird unter Punkt 5.3 noch ausführlicher erläutert.

Aber nicht nur der larvale, sondern auch der adulte *headcase*-Phänotyp hat seine Ursache in der Kombination von Augen- und Hirndefekten. Das zeigte die Analyse von *hdc⁵⁰*-Mosaiktieren, die in Bezug auf Penetranz und Ausprägung ebenfalls einen schwächeren Phänotyp aufwiesen (Abb. 20B). Dabei sank die Penetranz des Bypass-Phäns von 100 % (vollständig *hdc⁵⁰*-homozygote Tiere) auf 46 % bzw. 31 % und die Medulla erschien stets vollständig gedreht. Da in *hdc⁵⁰*-Mosaiken nur das Auge *hdc⁵⁰*-homozygot war, das Hirn jedoch wildtypisch blieb, kann der schwächere Bypass-Phänotyp auf Defekte in der Photorezeptorentwicklung zurückgeführt werden. Das bestätigten auch die Untersuchungen zur Beziehung zwischen adultem Augen- und Hirnphänotyp (Punkt 4.4.1.2), bei welchen eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Augenrauhheit (d.h. der Ommatidiendefekte) und dem Ausmaß der Projektionsdefekte im optischen Lobus ermittelt wurde.

Wie im Ergebnisteil erwähnt, besitzt der Bypass-Phänotyp der *hdc⁵⁰*-Mosaike große Ähnlichkeit mit der *irreC*-Mutante des *roughest*-Gens, welches für ein transmembranes Zelladhäsionsmolekül codiert und an der Augenentwicklung und der axonalen Wegfindung beteiligt ist (Reiter et al., 1996; Schneider et al., 1995; Ramos et al., 1993; Boschert et al., 1990). Der Bypass-Phänotyp der *irreC*-Mutante ist verbunden mit einer Fehlpositionierung von einer sich früh differenzierenden Neuronengruppe, welche im larvalen optischen Lobus nahe der Insertionsstelle des optischen Stiels plaziert ist und von Tix et al. (1989) als sog. Pionierneurone im larvalen optischen System ausgewiesen wurden. Diese sind wegweisend für die ersten ins Gehirn einwachsenden PR-Axone und etablieren offensichtlich das äußere optische Chiasma (Boschert et al., 1990). In *hdc⁵⁰*-Mosaiken sind die optischen Loben jedoch wildtypisch, so dass hier der Bypass-Phänotyp nicht in falsch positionierten Pionierneuronen begründet sein kann, sondern seine Ursache in der nicht korrekten Zielfindung *hdc⁵⁰*-mutanter Photorezeptoraxone haben muss.

Anders sieht der Sachverhalt bei vollständig *hdc⁵⁰*-homozygoten Tieren aus, mit deutlich stärkerem Bypass-Phänotyp, wobei der Hauptfaszikel stets dicker erscheint und von ihm abzweigende Nebenfaszikel in größerer Anzahl auftreten (Abb. 10B, 28C, 29C). Vermutlich verstärken hier fehlerhafte Gehirnstrukturen die Ausprägung des Bypass-Phäns. Wie in *irreC*-Mutanten könnten auch bei *hdc⁵⁰* falsch platzierte Pionierneurone ektopische PR-Fasikeln und ein fehlerhaftes Chiasma bedingen. Eine alternative bzw. weitere Erklärung ergibt sich aus Untersuchungen von *argos*-Mutanten (Meier, 2000), welche ebenfalls *hdc⁵⁰*-Phänotypen gleichen (Bypass, nicht gedrehte Medulla, verschobenes Chiasma). Es stellte sich heraus, dass bei *argos*-Ausfall der Ecdyson-induzierte Transkriptionsfaktor *Broad Complex* (BrC) nicht mehr inhibiert wird, was zu einer gestörten Differenzierung der Laminaneurone führt. Diese projizieren ihre Axone verfrüht und ektopisch in die Medulla, so dass bei der pupalen Bildung der Laminacartridges die Photorezeptoraxone den falschen Wegen folgen und ebenfalls ektopisch in die Medulla einwachsen. Analog dazu könnte also der Bypass-Phänotyp von *hdc⁵⁰* nicht nur ein Resultat einer fehlerhaften Photorezeptor-, sondern sekundär auch einer gestörten Laminaentwicklung sein, zumal *headcase* auch für die frühe Entwicklung der Lamina notwendig ist, wie später noch ausführlicher erläutert wird.

Interessant in diesen Zusammenhang ist die Tatsache, dass auch *irreC/roughest* in Laminaneuronen exprimiert wird und dessen Ausfall oder Überexpression zu veränderter Faszikulierung bzw. Hyperfaszikulierung führt (Van Vactor, 1998; Schneider et al., 1995).

Van Vactor vermutet daher, dass normale Axonfaszikulierung vom Gleichgewicht adhäsiver Interaktionen abhängt. Somit wäre es möglich, dass die starken Faszikulierungdefekte von *hdc⁵⁰*-mutanten Larven (Brokkoli-Phän) bzw. Adulten (Bypass-Phän) die Prozesse zur Bildung ausgewogener adhäsiver Interaktionen zwischen einlaufenden PR-Axonen beeinflussen.

Es lag also nahe, im visuellen System von *hdc⁵⁰*-Larven nicht nur die Expression des *irreC/roughest*-Proteins, sondern auch die anderer transmembraner Zelladhäsionsmoleküle, wie FASII und FASIII, immunhistochemisch zu untersuchen (Punkt 4.6.2). Die Daten zeigen, dass in *hdc⁵⁰*-Mutanten die Verteilung der drei untersuchten Proteine zwar in der Augenscheibe wildtypisch ist, aber im optischen Stiel und im Gehirn stets fehlerhaft erscheint, wobei häufig eine stärkere Färbung beobachtet werden konnte. Offen ist dabei noch, ob die stärkere Färbung durch die Faszikulierung der Axone zustande kommt, oder durch eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen. Vermutlich nimmt *headcase* Einfluss auf die Verteilung dieser transmembranen Proteine entlang der ins Hirn ziehenden Projektionen, wobei mit der Feinabstimmung adhäsiver Wechselwirkungen eine korrekte

Bündelung und damit eine korrekte Zielwahl der retinalen Axone sichergestellt wird. Bei der Analyse der langen Form des HEADCASE-Proteins auf bekannte Peptidmotive (gegen die Datenbank von Prosite, <http://ca.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>) wurden u.a. zahlreiche N-Myristinylierungsstellen und mehrere putative Zielsequenzen für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen vorhergesagt. Eine attraktive Vorstellung ist, dass HEADCASE über diese Motive temporär in Richtung Plasmamembran befördert wird und direkt oder indirekt mit den untersuchten (oder auch anderen) transmembranen Proteinen in Kontakt tritt. Demnach könnte HDC einen wichtigen Mediator innerhalb einer Signaltransduktionskette darstellen, welche die Expression, Lokalisation und/oder Zielerkennung von Zelladhäsionsmolekülen und damit die fehlerlose Adhäsion auch von PR-Axonen gewährleistet. Clandinin und Zipursky (2002) weisen darauf hin, dass der Großteil der Information für die korrekten Verknüpfungsmuster zwischen PR-Axonen und dem ersten optischen Ganglion in den afferenten Axonen selbst enthalten ist und zwar dekodiert als Interaktionen zwischen ihnen. Ein weiterer Zusammenhang zwischen *irreC/roughest* und *headcase* ergibt sich aus einem analogen retinalen Phänotyp ihrer Mutanten. Entsprechend adulter *hdc⁵⁰*-Augen zeigen auch *irreC*-Mutanten Störungen im regelmäßigen Aufbau der Ommatidien. Dabei ist das RHOUGHEST-Protein mitverantwortlich für den genauen Zeitpunkt der Apoptose von zunächst im Überschuss produzierten Interommatidialzellen, um die korrekte Differenzierung und Morphologie von sekundären/tertiären Pigmentzellen sicherzustellen und dadurch dem entstehenden Komplexauge den nötigen „Feinschliff“ zu geben (Araujo et al., 2003; Machado et al., 2002; Reiter et al., 1996). Interessanterweise wurde für das HDC-Protein eine signifikante Interaktion (mittels Two-Hybrid-System) mit dem zytoplasmatischen Zink-Finger-Protein UNKEMPT beschrieben (Giot et al., 2004), welches neben seiner allgemeinen Bedeutung für die postembryonale Entwicklung, auch an der Flügelentwicklung und der Augenmorphogenese bzw. dem Ommatidieneaufbau beteiligt ist (Mohler et al., 1992).

Ferner ruft eine GMR-getriebene Überexpression der langen *headcase*-cDNA im adulten Auge ein gestörtes Ommatidienmuster und Pigmentstörungen hervor (Tab. 4), was die Bedeutung von *hdc* für die Augenentwicklung demonstriert.

Somit könnte *headcase* eine wichtige Rolle als Transducer-Molekül innerhalb verschiedener Signaltransduktionsprozesse zukommen, welche u.a. im Rahmen der Differenzierung von ommatidialen Zellen ablaufen. Für diese These sprechen auch die folgenden Indizien: Zunächst deutet die zytoplasmatische Lokalisation von HEADCASE auch in Photorezeptoren und anderen ommatidialen Zellen (Abb. 17 und 18) auf seine Vermittlerrolle bezüglich Signale hin, welche über Zelloberflächen-Proteine an andere Zellen weitergeleitet werden,

wie es bereits von Steneberg et al. (1998) für die HDC-Funktion innerhalb der Tracheenentwicklung vermutet wurde. Des Weiteren weist die extreme Basizität des HEADCASE-Proteins auf eine mögliche Affinität für Protein/Protein- oder Protein/RNA-Interaktionen hin (Weaver und White, 1995). Ferner zeigte eine Motiv-Suche im HDC-Protein gegen die Datenbank von ELM (Puntravoll et al., 2003) mehrere putative SH2/S3-Bindemotive und zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen durch verschiedene Proteinkinasen, wobei die Motive der Casein Kinase II (CK2) auch durch ScanProsite (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>) vorhergesagt wurden. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass CK2 mittels Phosphorylierung eines Notch-Effektors die laterale Inhibition während der Selektion der R8-Vorläuferzellen beeinflusst (Karandikar et al., 2004). Demnach könnte auch HEADCASE im Zusammenspiel mit CK2 bzw. anderen Kinasen oder Phosphatasen eine Rolle in der retinalen Musterbildung zukommen, zumal die Suche nach konservierten Motiven innerhalb des HDC-Proteins gegen die CDD-Datenbank (**Conserved Domain Database**) von BLAST (Marchler-Bauer et al., 2003) eine Consensus-Sequenz offenlegte, welche bei Mensch und *C. elegans* gleichermaßen vorkommt, und die Definierung von Headcase als einer neuen Gruppe von Regulatoren der Zelldifferenzierung rechtfertigte (COG= **Clusters of Orthologous Groups** Klassifizierung von HDC unter COG3816).

Da diese Daten statistischer Natur sind, bedürfen sie der empirischen Verifizierung durch biochemische und genetische Interaktionsstudien (Two-Hybrid, Epistasis-Experimente etc.) zwischen *headcase* und den genannten potentiellen Interaktionspartnern.

Was sich aber aus den Experimenten dieser Arbeit und aus der Literatur gesichert ableiten lässt, ist die Beteiligung von *headcase* am strukturellen Aufbau der Rhabdomere und des gesamten Ommatidiums während der pupalen Metamorphose, da nur die adulte *hdc⁵⁰*-Retina grobe Defekte aufweist (Abb. 21-23), während die larvale Augenscheibe von *headcase*-Mutanten nur gering gestört ist. Wie schon im Ergebnisteil beschrieben endet die HDC-Expression innerhalb der ersten 24 Stunden der Pupalphase; die Rhabdomere jedoch formieren sich erst ca. 45 Stunden APF (*after puparium formation*) (Cagan und Ready, 1989), d.h. nach dem HDC-Expressionspeak. Somit könnte ein ausbleibendes *headcase*-Signal in *hdc⁵⁰*-Mutanten, die nachfolgende Morphogenese der Rhabdomere bzw. des Ommatidiums stören. Ob *headcase* auch an der Differenzierung und Determinierung von Photorezeptoren beteiligt ist, müsste durch weitere Versuche geklärt werden. Hierzu bietet sich u.a. eine Beobachtung der kritischen PR-Diffenzierungsphase anhand spezifischer immunhisto-chemischer Färbung von Photorezeptor-Subtypen (z.B. von R8 mit anti-BOSS, von R7 mit anti-SEVENLESS) an, um sich einer eventuellen Überproduktion, Defizienz und/oder

Transformation von bestimmten Photorezeptoren in *hdc⁵⁰*-Augen zu versichern. Die spezifische Färbung würde auch mögliche Störungen in der Orientierung der larvalen Ommatidien von *hdc⁵⁰*-Augenscheiben offenlegen, wie sie mit einer 24B10-Färbung nicht festgestellt werden konnten, aber an tangentialen Schnitten von adulten Augen *hdc⁵⁰*-mutanter Tiere beobachtet wurden (Abb. 21B).

Das Auftreten ommatidialer Musterstörungen in *hdc⁵⁰*-Mutanten und der kürzlich veröffentlichte Nachweis einer Verbindung zwischen *headcase* und dem Jak/Stat-Signalsystem (Bach et al., 2003) sind weitere Hinweise für eine putative Aufgabe von HEADCASE als Signalmolekül. Das Jak/Stat (**J**anus **k**inase/**s**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription) Signalsystem besitzt pleiotrope biologische Effekte und beeinflusst in *Drosophila* u.a. die Zellproliferation und die ommatidiale Rotation (Chen et al., 2002; Zeidler et al., 2000 und 1999). Bach et al. (2003) wiesen nach, dass ein mutiertes *headcase*-Gen den GMR-*upd* (*upd=unpaired* ist ein Ligand des Jak/stat-Systems) induzierten *enlarged*-Augenphänotyp spezifisch reprimieren kann. Dieser Phänotyp ist das Ergebnis zusätzlicher Mitosen von Vorläuferzellen in der Augenscheibe posterior der Morphogenetischen Furche (Bach et al., 2003). Die Augenscheiben von *hdc⁵⁰*-Larven jedoch unterscheiden sich weder in ihrer Größe noch in der grundsätzlichen Anordnung der Photorezeptoren vom Wildtyp-Phänotyp (Punkt 4.2). Daher ist es unwahrscheinlich, dass *headcase* in der Augenscheibe die Anzahl der Zellteilungen beeinflusst (Weaver und White, 1995), sondern in der Tat eher die Differenzierung und Morphogenese der Photorezeptoren bzw. des gesamten Ommatidiums, wie die gravierenden Defekte in der adulten Retina *headcase*-defizienter Tiere demonstrieren.

Als zytoplasmatisches Protein beeinflusst HEADCASE wahrscheinlich die Zytoplasma-Komponenten des Jak/Stat-Systems (die Januskinase HOPSCOTCH und/oder den Transkriptionsfaktor STAT92E) oder ist selbst Teil dieses Signaltransduktionsweges. Interessant ist, dass der Ausfall des STAT92-Inhibitors D-PIAS (Betz et al., 2001) ähnlich drastische Ommatidiendefekte zeigt wie *hdc⁵⁰*-Mutanten. Somit könnte HEADCASE entweder inhibitorisch auf STAT92E einwirken oder STAT92E reguliert die Expression von *headcase*, um eine korrekte Entwicklung und Rotation der Ommatidien zu gewährleisten. Und wie Clandinin und Zipursky (2000) bereits zeigten bestimmt die Polarität der Ommatidien innerhalb der Retina auch die Projektionsrichtung der PR-Axone innerhalb der Lamina, so dass die axonalen Fehlbündelungen in der Lamina von *hdc⁵⁰*-Larven (Abb. 9B und C) durch eine inkorrekte retinale Projektion zu falschen Laminacartridges aufgrund fehlerhafter Ommatidien bedingt sein könnte, neben den bereits erwähnten potentiellen Fehlern in der

Verteilung von Zelladhäsionsmolekülen in den PR-Axonen, welche zu inkorrektener Defaszikulierung von R1-R6 Axonen führen könnte.

Die Faszikulationsdefekte in der larvalen Medulla von *hdc⁵⁰*-Mutanten und *hdc⁵⁰*-EGUF-Mosaiken sind vermutlich ebenso das Ergebnis einer Kombination aus Defekten in der Adhäsion von R7 bzw. R8 Axone und im Aufbau von Ommatidien. Wie oben berichtet zeigen die PR-Axone R1-R6 in *hdc⁵⁰*-Larven keinen *nonstop* Phänotyp und die adulte *hdc⁵⁰*-Retina weist überzählige Rhabdomere auf, so dass die Medulla wahrscheinlich mit überschüssigen R7 oder R8 Axonen hyperinnerviert wurde. Der Überschuss an R7 Axonen könnte aus einer Transformation von R1-R6 Photorezeptoren oder deren accessorischen Zellen (Pigment-, Kegelzellen) zu R7 Photorezeptoren resultieren, wie sie auch bei anderen, das retinale Muster betreffenden Mutanten, z.B. *lozenge^{sprite}*, *seven up* oder *tramtrack* (Voas und Rebay, 2004; Clandinin und Zipursky, 2000), vorkommen. So hat ein Ausfall von *tramtrack* (*ttk*) eine Transformation von Kegelzellen zu ektopischen R7-Zellen zur Folge, selbst in einem *sina*-mutanten genetischem Hintergrund (Lai et al., 1996). *ttk* verhindert demnach eine unwildtypische R7 Determinierung.

Eine Suche nach Bindemotiven von Transkriptionsfaktoren innerhalb des *headcase*-Gens mit SignalScan gegen die Datenbank von TRANSFAC (Wingender et al., 2000) ergab mehrere Signalsequenzen für beide Spliceformen von *tramtrack*, sowohl für TTK69 als auch TTK88. Es wäre denkbar, dass der Transkriptionsfaktor TTK über die Regulierung der *hdc*-Expression oder aber durch eine direkte Interaktion mit HDC seine R7-Repressorfunktion in ommatidialen Zellen ausübt, woraufhin eine *ttk*- oder *hdc*-Mutation zu ektopischen R7 Zellen und damit zusätzlichen R7 Axonen in der Medulla von *hdc⁵⁰*-Tieren führen würde.

5.3 *headcase* ist an der Proliferation und Differenzierung von Laminaneuronen und Laminaglia beteiligt

Die unter Punkt 5.2 postulierten Prozesse zur Interpretation der *headcase*-typischen Faszikulationsdefekte (larvaler „Brokkoli“- bzw. adulter „Bypass“-Phänotyp) können jedoch nicht die teils drastischen Topographiedefekte in Lamina und Medulla von *hdc⁵⁰*-Larven erklären, wie sie in Abb. 19A3 zu sehen sind. In über 30 % der Fälle (Abb. 19B) erscheint die Laminalinie stark zerrissen und extrem stufig, d.h. die retinalen Axone der ersten optischen Ganglien halten an ektopischen Positionen.

Wie in der Einleitung erwähnt, terminieren die PR-Axone R1-R6 auch in Abwesenheit von Laminaneuronen korrekt in ihrem Zielgebiet, nicht aber bei fehlerhaft positionierten Gliazellen, welche sie als *intermediate target* ansteuern (Poeck et al., 2001). Für deren wildtypische Entwicklung und Migration aus den Gliaanlagen (GPC) in die Lamina ist u.a. die Ubiquitin-spezifische Protease NONSTOP (Fischer, 2001; Poeck et al. 2001) und das Signalprotein Jab1/CSN5 (Suh et al., 2002) beteiligt. Dabei wird *nonstop* in Gliazellen und Laminavorläuferzellen und *Jab1/CSN5* nur in den Photorezeptoren und in allen optischen Neuropilen exprimiert. Das *headcase*-Gen jedoch kommt sowohl in gesamten Auge (einschließlich Photorezeptoren), als auch in den Zellen des optischen Lobus (einschließlich Laminaneurone und Laminaglia) zur Expression (siehe Punkt 4.3). Allerdings konnte eine Neuropilexpression für HDC bisher nicht nachgewiesen werden.

Wie oben dargestellt, weist diese bezüglich des visuellen Systems ubiquitäre HDC-Expression auf eine funktionelle Bedeutung von *headcase* nicht nur im den Photorezeptoren, sondern auch im optischen Lobus hin. Die durchgeführten Mosaik- und Rescueversuche zeigten daraufhin die Notwendigkeit einer *headcase*-Funktion in Auge und Hirn für eine wildtypische Entwicklung des visuellen Systems.

Bei einer Detailbetrachtung der *hdc⁵⁰*-Mosaiken stellte sich heraus, dass der schwächere Laminaphänotyp zwar Lücken und Faszikel aufweisen konnte, aber sich nie so stark ausprägte wie es bei vollständig *hdc⁵⁰*-homzygoten Tieren in Abb. 19A1 bzw. 19A3 zu sehen ist, d.h. ganz ohne Lamina bzw. mit zerrissener, stark verschobener Laminalinie. Alle extremen Phänotypen (ca. 10 % der Fälle; Abb. 19B) der *hdc⁵⁰*-Mosaiken besaßen zumindest stets retinale Hirnprojektionen, wenn auch ohne deren typische Auffächerung zu einer Lamina- und Medullastruktur im optischen Lobus. Das bedeutet, dass in *hdc⁵⁰*-Mosaiktieren die Laminaglia und Laminaneurone korrekt positioniert sein müssten, um den einwandernden PR-Axonen wenigstens eine normale Terminierung innerhalb ihrer intermediären Ziele zu ermöglichen, was in der 24B10-Färbung eine wenig gestörte Laminalinie zur Folge hätte; die Nichtauffächerung der PR-Axone im optischen Lobus hätte damit ihre Ursache allein in massiven Störungen ihrer Defasikulierung. Die drastischen Laminadefekte in den *hdc⁵⁰*-Tieren wären demnach durch einen Ausfall der *hdc*-Funktion in den Gliazellen und Neuronen des optischen Lobus begründet.

In der Tat belegten immunhistochemische Färbungen mit dem DACHSHUND- und dem REPO-Antikörper, dass die PR-Axone von *hdc⁵⁰*-Mosaiklarven in ein wildtypisches Zielgebiet im optischen Lobus terminieren, wobei sowohl die Neurone der Lamina und der IOA (Abb. 33) als auch die Gliazellen der Laminaregion (Abb. 38) nicht von der Kontrolle zu

unterscheiden waren. In vollständig *hdc*⁵⁰-homozygoten Mutanten (d.h. mit einem *headcase*-Ausfall auch im optischen Lobus) traten gravierende Störungen nicht nur in der korrekten Positionierung von Gliazellen (Abb. 34 und Abb. 35), sondern in der Differenzierung der Laminaneurone (Abb. 32).

Ein *headcase*-Ausfall in den Zellen des optischen Lobus verursacht also eine Fehlpositionierung von Laminaglia und aufgrund dessen eine Fehlterminierung der R1-R6 Axone, die sich der 24B10-Färbung als dramatische Verzerrung der Laminalinie äußert. Man kann daraus schließen, dass *headcase* ebenso wie *nonstop* und *Jab1/CSN5* an der korrekten Positionierung von Gliazellen im Laminabereich beteiligt ist. HDC wirkt aber nicht aus PR-Axonen heraus auf die Laminaentwicklung (wie z.B. *hedgehog*) oder die Gliazellmigration (wie *Jab1/CSN5*), sondern besitzt mindestens zwei autonome Funktionen, einmal in der Augenentwicklung und ein anderes mal in der Entwicklung des optischen Lobus.

Gerade die extremen Phänotypen der vollständig homozygoten *hdc*⁵⁰-Larven dokumentieren eine Beteiligung von *headcase* an der Migration von Gliazellen. Abbildung 37 belegt eindeutig, dass hierbei die subretinalen Gliazellen im optischen Stiel stecken blieben und nicht in die Augenscheibe einwandern, woraufhin die PR-Axone nicht in den optischen Stiel eintreten. Auch in mittelschweren Defekten von *hdc*⁵⁰-Tieren (Abb. 34D und Abb. 36E) weist der optische Stiel eine Akkumulation von SR-Glia auf, während die Augenscheibe eine geringere Anzahl an diesen Gliazellen aufweist. Es ist bereits bekannt, dass der Eintritt der PR-Axone in den optischen Stiel abhängig ist von der korrekten Wanderung der subretinalen Gliazellen in die Augenscheibe (Taylor und Garrity, 2003; Hummel et al., 2002).

Dabei sind einige Gene identifiziert worden, deren Funktionsstörung Defekte in der Verteilung der SR-Glia verursachen und daher einen zu *hdc*⁵⁰ analogen axonalen Phänotyp aufweisen. Hier zu zählen u.a. *eddy* (Martin et al., 1995), *omb:Ras^{N17}* (Rangajaran et al., 1999), *sine oculis*, *gilgamesh* und *tramtrak69* (Hummel et al., 2002), wobei die zwei zuletzt genannten Gene für die Funktion von *headcase* von Bedeutung sein könnten. *gilgamesh* (*gish*) kontrolliert zusammen mit anderen Genen den Zeitpunkt der Auswanderung von SR-Gliazen in den optischen Stiel und codiert für eine Caseinkinase1 (CK1), deren Substrat innerhalb dieser Prozesse noch nicht bekannt ist. Interessanterweise ergab die oben erwähnte Motiv-Suche im HDC-Protein gegen die Datenbank von ELM (Puntervoll et al., 2003) auch zahlreiche putative Phosphorylierungsstellen für die CK1. Aufgrund dessen könnte GISH die Kontrolle der SR-Gliazellwanderung über eine direkte Modulierung der HDC-Funktion ausüben.

Desweiteren ist es möglich, dass *headcase* in Zusammenarbeit mit *ttk69* die Gliazellwanderung beeinflusst. Dafür sprechen folgende vier Argumente: Erstens, eine spezifische Überexpression des transkriptionalen Repressors TTK69 in SR-Glia inhibiert deren Migration in den optischen Stiel (Hummel et al., 2002). Zweitens, die oben erwähnte Suche nach Bindemotiven von Transkriptionsfaktoren innerhalb des *headcase*-Gens mit SignalScan gegen die Datenbank von TRANSFAC (Wingender et al., 2000) zeigte mehrere potentielle Bindemotive für TTK69, das die Expression von *headcase* nicht nur in den Kegelzellen des reifenden Auges, sondern auch in den SR-Glia regulieren und damit auf deren Wanderung einwirken könnte. Drittens, TTK69 und REPO kooperieren miteinander in der Differenzierung der Gliazellen des Zentralnervensystems, wobei REPO als Transkriptionsaktivator über das CAATTA-Motiv die Expression bestimmter Zielgene in Gliazellen regulieren kann (Yuasa et al., 2003). Das CAATTA-Motif ist ebenfalls in der *headcase*-Sequenz auffällig zahlreich vertreten (an 58 Positionen !), so dass TTK69 vermutlich auch in Kooperation mit REPO die Expression von *headcase* zu justieren vermag. Viertens, die Färbungen in Abb.11 und Abb. 12 bewiesen die Koexpression von REPO und HEADCASE in allen reifen Gliazellen des larvalen visuellen Systems, einschließlich der SR-Glia, womit die Funktionalität von *headcase* und TTK69/REPO in den selben Zellen bestätigt ist.

Die Verbindung zwischen REPO und *headcase* über das CAATTA-Motif und die gemeinsame gliäre Expression legt die Vermutung nahe, dass REPO seine Funktion in der Gliadifferenzierung auch über die Induktion der *headcase*-Expression ausübt; eine fehlerhafte *headcase* Expression würde eine gestörte Differenzierung und ungenaue Positionierung auch der Laminaglia bedingen, wie sie in *hdc*⁵⁰-Larven beobachtet werden kann (Abb. 34). Fehlpositionierte Laminaglia führen daher zu den starken Projektionsstörungen der PR-Axone R1-R6, welche in der Abb. 19A3 dargestellt sind.

Wie unter Punkt 4.7.3 einleitend angemerkt, ist nur die Proliferation und frühe Morphogenese der Laminaglia von retinalen Eingängen unabhängig, nicht aber ihre spätere Migration und Differenzierung. Im Hinblick auf diese Tatsache ist es erwähnenswert, dass REPO auch an der korrekten Faszikulierung von Nervensträngen im ZNS beteiligt ist (Halter et al., 1995). Man könnte daher vermuten, dass die Gliazellen über REPO und HDC auch im visuellen System auf die normale Faszikulierung von PR-Axonen Einfluss nehmen und damit deren gezielte Terminierung sichern. Das wäre eine weitere, interessante Erklärung für die starken Faszikulierungfehler („Brokkoli“-Phän) in *hdc*⁵⁰-Larven, zumal in *hdc*⁵⁰-Mosaiken (mit *hdc*-defizienten Photorezeptoren, aber wildtypischem Hirn) der „Brokkoli“-Phän weit milder

ausfällt, als in GMR-Rescue-Tieren (mit wildtypischen Photorezeptoren aufgrund GMR-getriebener *hdc*-Expression, aber *hdc*-defizientem Hirn).

In *hdc*⁵⁰-Larven ist jedoch nicht nur die Differenzierung der Gliazellen gestört, sondern wie oben erwähnt auch die der Laminaneurone. Das zeigten spezifische Markierungen der frühen und späten Phase der Laminaneurogenese mit DACHSHUND bzw. ELAV (Punkt 4.7.2). Allerdings konnten die beobachteten Fehler in der Laminastruktur (Abb. 32) nicht in erster Linie durch fehlerhafte retinale Eingänge entstanden sein, da die optischen Loben von *hdc*⁵⁰-Mosaiken bezüglich ihrer Lamina- und Gliaentwicklung wildtypisch waren (Abb. 33 und Abb. 38). Einwachsende PR-Axone veranlassen die Laminavorläuferzellen (LPC) eine finale Zellteilung zu vollziehen, was zur Reifung von Laminaneuronen führt. Aufgrund dessen müsste ein *headcase*-Funktionsverlust einen Einfluss auf solche Proliferationsvorgänge haben, die unabhängig von retinalen Projektionen stattfinden, wie die Bereitstellung von LPC aus dem äußeren Proliferationszentrum (OPC).

Anhand einer S-Phasenmarkierung mit BrdU an *hdc*⁵⁰-Mutanten konnte gezeigt werden, dass ein Ausfall von *headcase* grobe Proliferationsdefekte im OPC und LPC zur Folge hat (Abb. 31). Die Daten verleiten zwar zunächst zu der Annahme, dass *headcase* innerhalb von Photorezeptoraxonen an der Signalkette zur Induktion der Laminadifferenzierung beteiligt sein könnte, aber es sprechen folgende Einwände dagegen: Zunächst betrifft die ermittelte ubiquitäre HDC-Expression (siehe Punkt 4.3) ausschließlich die Zellkörper und nicht die ihrer axonalen Fortsätze, so dass HEADCASE zumindest nicht direkt in das Induktionsgeschehen im Wachstumskegel der retinalen Axone eingreifen kann. Ferner bilden *glass* (*gl*)-Mutanten an den Zielorten abnormer PR-Projektionen zwar ektopische LPC aus und *eyes absent* (*eya*)-bzw. *hedgehog* (*hh*)-mutante Larven besitzen keine LPC infolge fehlender PR-Axone bzw. fehlendem *hh*-Induktionssignal (Selleck und Steller, 1991; Huang und Kunes, 1998). Jedoch sind bei diesen Mutanten nur die LPC betroffen, nicht aber die anderen Proliferationszentren OPC und IPC. Bei *hdc*⁵⁰ jedoch geht das defekte LPC-Band stets einher mit einem defekten OPC-Muster, so dass aus einer fehlerhaften Proliferation *hdc*⁵⁰-mutanter postembryonalen Neuroblasten auch nur eine fehlerhafte Anzahl an teilungsbereiten LPC entstehen können, die sich in Laminaneurone differenzieren. Dabei ist die Bereitstellung der Laminavorläuferzellen aus dem äusseren Proferationszentrum nicht von retinaler Innervation abhängig (Selleck und Steller, 1991). Weiterhin weisen *hdc*⁵⁰-mutierte Larven klare Defekte auch im inneren Proliferationszentrum auf, obwohl es ebenfalls keine direkten retinalen Eingänge erhält.

Daher spielt *headcase* wohl keine Rolle in der Induktion der Laminadifferenzierung, sondern übt seine Funktion auf das Proliferationstiming von Neuroblasten im äusseren Prolifertionszentrum aus und ist vermutlich an der synchronen Bereitstellung von LPCs beteiligt. Fehler in diesen Prozessen würden sich damit auf die spätere Differenzierung der Laminaneurone übertragen und eine fehlerhafte Laminastruktur zeigen, wie sie sich in Abb. 32B äußert.

Anders als bei den Proliferationsvorgängen in der Augenscheibe (Punkt 5.2), scheint *headcase* im optischen Lobus sehr wohl das Timing und die Anzahl der Zellteilungen mitzubestimmen. Schon Weaver und White (1995) postulierten für *headcase* eine Funktion im Timing der Proliferation imaginaler Zellen. Es ist zwar bekannt, dass Proliferation ein Resultat der Aktivierung des Jak/Stat-Systems darstellt, aber nicht *wie* dieser Signalweg die Erhöhung der Zellzahl oder der Zellzyklen bewirkt. Bach et al. (2003) vermuten aufgrund ihrer Daten, dass die Jak/Stat-Aktivierung entweder die G1-Phase verkürzt oder den G2/M-Übergang reguliert, in dem solche Gene beeinflusst werden, die an der Zellproliferation beteiligt sind. Die nachgewiesene Verbindung von *headcase* mit dem Jak/Stat-System wurde bereits unter Punkt 5.2 besprochen. Diese Daten unterstützen daher die Hypothese, dass HDC in Zusammenarbeit mit dem Jak/Stat-Signalweg oder aber anderen Wegen (wie unter Punkt 5.4 beschrieben) eine wichtige Aufgabe im Zellzyklus postembryonaler Neuroblasten im entstehenden optischen Lobus übernimmt und an der Synchronisierung von Zellteilungen beteiligt ist, die zur Bildung einer korrekten Zielregion retinaler Projektionen führt.

Weitere Hinweise auf eine Bedeutung von *headcase* für die Zellproliferation ergeben sich aus Homologieanalysen. So besitzt das HDC-Protein eine 42 % Homologie zum humanen HEADCASE (Pontius et al., 2003; Steneberg et al., 1998), welches im Zusammenhang mit der Bildung von Pankreaskrebs steht (Makino et al., 2001). In 80 % der Tumorzellen ist *headcase*-Expression runterreguliert, so dass *hdc* auch hier als mögliches Tumorsuppressor-Gen die Proliferation der Zellen beeinflusst. Ferner weist HDC eine 36 % Homologie zum PTIP (Pax transactivation domain-interacting protein) der Maus auf, das eine essentielle Bedeutung für deren Zellproliferationsmaschinerie besitzt (Cho et al., 2003; Lechner et al., 2000).

Eine große Fülle an Literatur berichtet über die enge Verbindung zwischen Proliferation und Differenzierung (u.a. Myster und Duronio, 2000; Jasper et al., 2002; Coffman, 2003), bzw. über die zeitliche Kopplung von Zellzyklus-Arrest und terminaler Zellreifung. Insofern ist eine Synchronisation der proliferierenden Vorläuferzellen wichtig, da mit dem Ausstieg aus der Mitose die Zellen für die Differenzierung freigegeben werden. In diesem Zusammenhang

bedingt ein falsch gesetztes Proliferationsfenster auch falsche Signale in dem wechselseitigen Induktionsgeschehen der Differenzierung funktionaler Zellverbände, wie zum Beispiel der Entstehung eines visuellen Systems. Die Folge wären gravierende Störungen in der Differenzierung, Musterbildung und der Vitalität des gesamten Organismus, welche ja gerade in den *headcase*-Mutanten beobachtet werden können.

5.4 Die Bedeutung von *headcase* für die Reorganisation des visuellen Systems während der Metamorphose

Die Notwendigkeit der *headcase*-Funktion im Auge und im optischen Lobus, als auch die ubiquitäre Expression des HDC-Proteins im visuellen System vermittelt den Eindruck, dass *headcase* als multifunktionales Gen eine grundlegende Bedeutung für die Signalintegration innerhalb von Musterbildungsprozessen während der Organentwicklung der adulten *Drosophila*-Fliege besitzt. Damit könnte es in einer Reihe mit anderen multifunktionalen Genen wie *CSN5* (Suh et. al., 2002), *hedgehog* (u.a. Hummel et al., 2002; Huang und Kunes, 1998) und *Jak/Stat* (Luo und Dearolf, 2001) stehen, deren Beteiligung an der Entwicklung des visuellen Systems von *Drosophila* in dieser Arbeit bereits Erwähnung fand.

Schon Weaver und White (1995) beobachteten bei *headcase*-Mutanten eine große Variabilität sowohl im Phänotyp, als auch im Zeitpunkt der pupalen Lethalität. Diese Pleiotropie steht im Einklang mit der großen Bandbreite an spezifischen imaginalen Zellen, in denen *hdc* zur Expression kommt. Der Grund für diese variable Expressivität von *headcase* blieb aber bisher unklar.

Die Mechanismen, welche die Proliferation imaginaler Zellen mit ihrer Differenzierung koordinieren, werden von hormonalen Signalen kontrolliert (Weaver und White, 1995). Eine zentrale Bedeutung innerhalb dieser Prozesse kommt dem Steroidhormon 20-Hydroxyecdysone (Ecdysone) zu, welches den Übergang von der Larve zum adulten Tier triggert. Mehrere Ecdysone-Pulse während der Entwicklung von *Drosophila* steuern wichtige postembryonale Differenzierungsschritte wie larvale Häutung und Metamorphose (Thummel et al., 1996). Die dramatischsten Veränderungen geschehen am Ende des dritten Larvenstadiums, wenn ein Ecdysone-Puls die Bildung der Puppe und damit die präpupale Entwicklung einleitet, in welcher die meisten larvalen Organe durch Histolyse zerstört werden

und sich gleichzeitig adulte Gewebe aus imaginalen Vorläuferzellen formieren. Etwa 10 Stunden (10 h APF) später triggert ein weiterer Ecdyson-Puls die Kopfausstülpung und den Übergang von der präpupalen in die pupale Phase, die mit einer kompletten Transformation der Larve zur adulten Fliege endet. Während dieser Metamorphose findet Ecdyson-getriggert auch die neuronale Remodellierung des ZNS statt, einschließlich der Reorganisation des visuellen Systems (Refisto und Hauglum, 1998; Liu und Refisto, 1998; Riddiford, 1993).

Ecdyson übt seine Wirkung über die Aktivierung einer Transkriptionskaskade aus, die zunächst nur wenige sog. „*early response*“ Gene betrifft, von denen die meisten für Transkriptionsfaktoren (TF) codieren. Diese früh (*early*) aktivierten TF regeln die Expression zahlreicher Effektor-Gene, sog. „*late/secondary response genes*“, welche die Metamorphose spezifisch für jedes transformierende Gewebe umsetzen. Dabei ist das Wissen über die vollständige Anzahl und die Identität der Ecdyson-induzierten Zielgene oder das Ausmaß der Interaktion der Ecdyson-Kaskade mit anderen gewebespezifischen Signalwegen bis dato nur beschränkt (Li und White, 2003).

Bekannt ist jedoch, dass der bereits erwähnte Zink-Finger TF *Broad Complex* eine herausragende Rolle unter den Ecdyson-induzierten Faktoren besitzt. Das „*early response*“ Gen *BrC* ist essentiell für die Transduktion von Ecdyson-Signalen in morphogenetische Bewegungen und zelluläre Assemblierung, die während der Reorganisation des ZNS stattfinden (Refisto und Hauglum, 1998).

Interessant ist nun, dass die Expression von *headcase* in allen proliferierenden imaginalen Zellen während des präpupalen Ecdyson-Pulses (ca. 10 h APF) um etwa das dreifache erhöht wird, aber sich während des larvalen Ecdyson-Pulses nicht substantiell ändert (White et al., 1999). Mit dem Ende der imaginalen Proliferation läuft auch die *hdc*-Expression aus (ca. 24 h APF). Das deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Ecdyson-Kaskade und *headcase* am Beginn der pupalen Entwicklung und damit der Formation adulter Gewebe und Organe hin.

Dieser Zusammenhang wird durch mehrere Literaturhinweise erhärtet. Zum einen zeigen sowohl das Ecdyson-induzierte *BrC* als auch dessen Zielgen *H217* bei Ausfall einen sehr ähnlichen Bypass-Phänotyp wie adulte *hdc⁵⁰*-Mutanten (Liu und Refisto, 1998). Ferner bindet *BrC* u.a. auch bei 99F (Gonzy et al., 2002), d.h. in der zytogenetischen Region von *headcase* (99E4–F1). Darüber hinaus zeigten genetische Interaktionsstudien, dass die Defizienzlinie *Df(3R)L127*, mit einer Deletion bei 99B5-6;99E4-F1, den Beinphänotyp der *BrC*-Mutante *br¹* in 36 % der Fälle verstärkt (Ward et al., 2003).

Zum anderen verursachen Mutationen in einem anderen Ecdyson-induzierten Gen, *E74*, ebenso schwerwiegende Defekte in der Kopfausstülpung wie in *hdc⁵⁰* (Fletcher et al., 1995; Weaver und White, 1995). *E74* besitzt zwei Splicevarianten, den *E74A* und *E74B*, und ist ein ebenso wichtiges „*early response gene*“ wie *BrC*. Es wird u.a. für die Morphogenese imaginaler Gewebe gebraucht und spielt eine zentrale Rolle im Timing der Expressionsinduktion von „*secondary response*“ Genen (Fletcher et al., 1997). Für dieses Timing ist die Umschaltung vom Repressor *E74B* auf den Induktor *E74A* während des letzten larvalen Ecdyson-Pulses notwendig. Die *E74A*-Expression findet auch während des letzten präpupalen Ecdyson-Pulses statt (Thummel, 1996), wo es mit dem Anstieg des Ecdyson-induzierten präpupalen Expressionslevels von *headcase* korreliert (White et al., 1999).

headcase könnte daher ein Kandidat für ein Ecdyson-induziertes „*late response*“ Gen sein, dessen Expression von *BrC* bzw. *E74* direkt oder indirekt beeinflusst wird. Gonzy et al. (2002) vermuten für *BrC* eine generelle modulatorische Funktion in der Dynamik der Chromatinstruktur und der Zugänglichkeit von Ecdyson-induzierbaren Gene von spezifischen Regulatoren. Interessanterweise ergab der oben erwähnte SignalScan gegen die TRANSFEC-Datenbank zahlreiche potentielle Bindestellen auch für *E74A* (Wingender et al., 2000).

Aufgrund der dargelegten Argumente könnte *BrC* Ecdyson-induziert die Chromatinstruktur auch im zytogenetischen Bereich von *headcase* (d.h. bei 99E4-F1) auflockern, um den Zugang des putativen spezifischen Regulators *E74* zum *headcase*-Gen zu ermöglichen und dessen Expression und damit die Remodellierung auch des visuellen Systems zu steuern.

Da die *hdc⁵⁰*-Mutante zwar grob in der Anordnung der optischen Ganglien gestört ist, aber ansonsten keine wesentlichen Teile des Systems fehlen, reflektieren die beobachteten Defekte im wesentlichen ein Koordinierungsproblem in der Assemblierung des optischen Lobus.

In der zweiten Hälfte des dritten Larvenstadiums beginnen sich die Photorezeptoren zu differenzieren und senden ihre Axone in Richtung der optischen Ganglien. Gleichzeitig proliferieren die Laminavorläuferzellen, um für die einwachsenden retinalen Axone ein korrektes Zielgebiet vorzubereiten, das durch induktive Prozesse der PR-Axone weitere Differenzierungs- und Positionssignale erhält (Salecker et al., 1998; Hofbauer und Campos-Ortega, 1990). Wie einleitend erläutert, müssen also molekulare Mechanismen vorhanden sein, welche die zeitliche und räumliche Koordinierung dieser komplexen Musterbildungsprozesse im visuellen System übernehmen (Liu und Refisto, 1998).

Mindestens zwei Mechanismen werden bereits diskutiert, bei denen auch *headcase* wichtige Funktionen übernimmt: Erstens, die Verwendung intermediärer Ziele von PR-Axonen und zweitens, die gewebeübergreifende Signalgebung durch Ecdyson-getriggerte Kaskaden.

Bezüglich des ersten Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine intakte *headcase*-Funktion notwendig ist für die Differenzierung der Lamina und die Entwicklung von Gliazellen, einschließlich der Laminaglia, welche den PR-Axonen als intermediäre Ziele dienen. Dadurch können die Axone in ihr Zielgebiet einwandern, bevor ihre postsynaptischen Partner ausreifen und stimmen via Induktion der LPCs die Anzahl der postsynaptischen Einheiten und der retinalen Afferenzen aufeinander ab. Somit kann der Zeitpunkt der Histogenese von verschiedenen Regionen des optischen Systems mit der Formierung neuronaler Projektionen zwischen ihnen koordiniert werden (Clandinin und Zipursky, 2002; Poeck et al., 2001; Liu und Refisto, 1998).

Im Hinblick auf den zweiten Mechanismus zeigte diese Arbeit eine Verbindung zwischen dem Ecdyson-induzierten Transformation des ZNS (inklusive des visuellen Systems) und *headcase*. Truman et al. (1994) stellten bereits fest, dass die Konzentration einer Spliceform des Ecdysonrezeptors (EcR-B1) mit Beginn des dritten Larvenstadiums in dem OPC erhöht wird, dann allmählich abfällt, bevor es in der Pupalphase in den postmitotischen Neuronen des optischen Lobus wieder ansteigt. Die EcR-B1-Expression stimmt also genau mit den zwei zeitlichen Phasen überein, in denen die PR-Axone in einem zweistufigen Prozess ihr Zielgebiet wählen: die erste Stufe ist das Erreichen der Laminaglia als *intermediäres Ziel* gegen Ende des dritten Larvenstadiums und die zweite Stufe stellt die Projektion der PR-Axone zu ihren synaptischen Partnern als *finales Ziel* während der Umgestaltung der rein anatomischen Topographie zu einer funktionalen (siehe Punkt 2.2.4).

Wie schon Truman et al. (1994) vermuteten, hält die anhaltende EcR-B1-Expression die imaginalen Neurone in einem unreifen, formbaren Zustand. Diese ausgedehnte Phase der Plastizität könnte die Beteiligung der Neuronen an den induktiven Wechselwirkungen sicherstellen, welche notwendig sind zum Aufbau intakter retinaler Projektionen ins Gehirn. Diese Wirkung könnte Ecdyson über *BrC* bzw. *E74* und letztlich *headcase* ausüben, da *BrC* und seine Zielgene (u.a. *H217*) ebenfalls in Verbindung gebracht werden mit der Koordination von Zellteilung und Differenzierung im visuellen System zur korrekten Assemblierung der optischen Ganglien, bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der retinotopischen Verschaltung (Liu und Refisto, 1998). Letztgenannte Autoren postulieren, dass ein funktionsreduziertes *BrC* eine Missexpression von *H217* in den LPC bewirkt, was deren Fähigkeit zur Koordinierung ihrer Proliferation unterbindet und/oder die normale Differenzierung zu Laminaneuronen. Ein analoges Szenario könnte daher auch für *headcase*, als einem potentiellen Ecdyson-induzierten „late response“ Gen, gültig sein. Die vorliegende

Arbeit hat diesbezüglich gezeigt, dass *hdc* für die Proliferation der LPC und der anschließenden Reifung der Laminaneurone notwendig ist.

Daraus lässt sich ableiten, dass *headcase* an der Integration von Signalen beteiligt ist, welche das Proliferationstiming der neuronalen Vorläuferzellen im visuellen System bestimmen, wobei diese Signale Ecdyson-getriggert sind und/oder vom Jak/Stat-Signalweg (siehe Punkt 5.3) ausgehen.

Diese Dissertation arbeitete aus dem breiten Wirkungsspektrum von *headcase* seine Bedeutung für das optische System von *Drosophila melanogaster* fokussiert heraus. Es gelang in dieser Arbeit zum erstenmal eine funktionale Rolle des *headcase*-Gens in der Entstehung des visuellen Systems nachzuweisen. Im speziellen konnten mindestens zwei unabhängige Aufgaben von *hdc* in der korrekten Etablierung retinaler Projektionsmuster identifiziert werden: Zum einen in der Entwicklung der Photorezeptoren und ihrer axonalen Projektionen und zum anderen im Aufbau eines korrekten optischen Lobus. Dabei wird *headcase* in den optischen Ganglien sowohl für die wildtypische Verteilung der Gliazellen zur korrekten R1-R6 Terminierung, als auch für die Bereitstellung teilungsaktiver Neuroblasten hinsichtlich einer normalen Laminaentwicklung benötigt.

6 Literaturangaben

- Araujo H., Machado L.C., Octacilio-Silva S., Mizutani C.M., Silva M.J. und Ramos R.G.** (2003). Requirement of the roughest gene for differentiation and time of death of interommatidial cells during pupal stages of Drosophila compound eye development. *Mech. Dev.* **120**, 537-547
- Bach E.A., Vincent S., Zeidler M.P. und Perrimon N.** (2003). A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the Drosophila janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Genetics* **165**, 1149-1166
- Bashaw G.J. und Goodman C.S.** (1999). Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* **97**, 917-926
- Betz A., Lampen N., Martinek S., Young M.W. und Darnell J.E. Jr.** (2001). A Drosophila PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9563-9568
- Bonini N.M., Bui Q.T., Gray-Board G.L. und Warrick J.M.** (1997). The Drosophila eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* **124**, 4819-4826
- Boschert U., Ramos R.G., Tix S., Technau G.M. und Fischbach K.F.** (1990). Genetic and developmental analysis of irreC, a genetic function required for optic chiasm formation in Drosophila. *J. Neurogenet.* **6**, 153-171
- Brand A.H. und Perrimon N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415
- Buchner E., Buchner S., Crawford G., Mason W.T., Salavaterra P.M. und Satelle D.B.** (1986). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of the Drosophila melanogaster. *Cell Tissue Res.* **246**, 57-62
- Cagan R.L. und Ready D.F.** (1989). The emergence of order in the Drosophila pupal retina. *Dev. Biol.* **136**, 346-362
- Callahan C.A. und Thomas J.B.** (1994). Tau-beta-galactosidase, an axon-targeted fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**, 5972-5976
- Campbell G., Goring H., Lin T., Spana E., Andersson S., Doe C.Q. und Tomlinson A.** (1994). RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in Drosophila. *Development* **120**, 2957-2966
- Chen H.W., Chen X., Oh S.W., Marinissen M.J., Gutkind J.S. und Hou S.X.** (2002). mom identifies a receptor for the Drosophila JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev.* **16**, 388-398
- Chisholm A. und Tessier-Lavigne M.** (1999). Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 603-615

- Cho E.A., Prindle M.J. und Dressler G.R.** (2003). BRCT domain-containing protein PTIP is essential for progression through mitosis. *Mol Cell Biol.* **23**, 1666-1673
- Choi K.W. und Benzer S.** (1994). Migration of glia along photoreceptor axons in the developing Drosophila eye. *Neuron* **12**, 423-431
- Chou W.H., Huber A., Bentrop J., Schulz S., Schwab K., Chadwell L.V., Paulsen R., und Britt S.G.** (1999). Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of Drosophila: evidence for induced and default cell-fate specification. *Development* **126**, 607-616
- Clandinin T.R. und Zipursky S.L.** (2002). Making connections in the fly visual system. *Neuron* **35**, 827-841
- Clandinin T.R., Lee C.H., Herman T., Lee R.C., Yang A.Y., Ovasapyan S. und Zipursky S.L.** (2001). Drosophila LAR regulates R1-R6 and R7 target specificity in the visual system. *Neuron* **32**, 237-248
- Clandinin T.R. und Zipursky S.L.** (2000). Afferent growth cone interactions control synaptic specificity in the Drosophila visual system. *Neuron* **28**, 427-436
- Coffman J.A.** (2003). Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell. Biol. Int.* **27**, 315-324
- Cook T.** (2003). Cell diversity in the retina: more than meets the eye. *Bioessays* **25**, 921-925
- Cooper H.M.** (2002). Axon guidance receptors direct growth cone pathfinding: rivalry at the leading edge. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 621-631
- Deak P., Omar M.M., Saunders R.D., Pal M., Komonyi O., Szidonya J., Maroy P., Zhang Y., Ashburner M., Benos P., Savakis C., Siden-Kiamos I., Louis C., Bolshakov V.N., Kafatos F.C., Madueno E., Modolell J. und Glover D.M.** (1997). P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of Drosophila melanogaster: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* **147**, 1697-1722
- Desai C.J., Gindhart J.G. Jr, Goldstein L.S. und Zinn K.** (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the Drosophila embryo. *Cell* **84**, 599-609
- Dickson B.J.** (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-1964
- Dominguez M., Wasserman J.D. und Freeman M.** (1998). Multiple functions of the EGF receptor in Drosophila eye development. *Curr. Biol.* **8**, 1039-1048
- Engels, W.R.** (1996). P-Elements in Drosophila. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **204**, 103-123
- Eule E., Tix S. und Fischbach K.F.** (1999). Glial Cells in the Optic Lobe of Drosophila melanogaster. <http://flybrain.unifreiburg.de/Flybrain/html/poster/GliaPaper/Eckharts.html>

Fambrough D., Goodman C.S. (1996). The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell* **87**, 1049-1058

Fischbach K.P. und Dittrich A.P. (2000). Lamina-medulla Connections in Structural Brain Mutants. <http://flybrain.neurobio.arizona.edu/Flybrain/html/poster/poster3menu.html>

Fischbach K.P. und Heisenberg M. (1984). Neurogenetics and behavior in insects. *J. Exp. Biol.* **112**, 65-93

Fischer, S. (2001). Untersuchungen zur Funktion der Ubiquitin spezifischen Protease *nonstop* im visuellen System von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Regensburg

Fischer, S. (1998). Molekulare und genetische Analyse axonaler Pathfindingmutanten im visuellen System bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Regensburg

Fletcher J.C., D'Avino P.P. und Thummel C.S. (1997). A steroid-triggered switch in E74 transcription factor isoforms regulates the timing of secondary-response gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 4582-4586

Fletcher J.C., Burtis K.C., Hogness D.S. und Thummel C.S. (1995). The *Drosophila* E74 gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development* **121**, 1455-1465

Fujita S.C., Zipursky S.L., Benzer S., Ferrus A. und Shotwell S.L. (1982). Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **79**, 7929-7933.

Garrity P.A., Rao Y., Salecker I., McGlade J., Pawson T. und Zipursky S.L. (1996). *Drosophila* photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein. *Cell* **85**, 639-650

Garrity P.A., Lee C.H., Salecker I., Robertson H.C., Desai C.J., Zinn K. und Zipursky S.L. (1999). Retinal axon target selection in *Drosophila* is regulated by a receptor protein tyrosine phosphatase. *Neuron* **22**, 707-717

Gehring W.J. (1992). The homeobox in perspective. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 277-280

Giniger E. (2002). How do Rho family GTPases direct axon growth and guidance? A proposal relating signaling pathways to growth cone mechanics. *Differentiation* **70**, 385-396

Giot L., Bader J.S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao Y.L., Ooi C.E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamodar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y., Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., McDaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J., Neurath K., Ioime N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carrolla S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., DaSilva A., Zhong J., Stanyon C.A., Finley R.L. Jr., White K.P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R.A., McKenna M.P., Chant J. und Rothberg J.M. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736

Gitt, W. (1986). Energie - optimal durch Information. *Hänssler-Verlag*

- Golic K.G.** (1994). Local transposition of P elements in *Drosophila melanogaster* and recombination between duplicated elements using a site-specific recombinase. *Genetics* **137**, 551-563
- Gonzy G., Pokholkova G.V., Peronnet F., Mugat B., Demakova O.V., Kotlikova I.V., Lepesant J.A. und Zhimulev I.F.** (2002). Isolation and characterization of novel mutations of the Broad-Complex, a key regulatory gene of ecdysone induction in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 121-132
- Granderath S., Stollewerk A., Greig S., Goodman C.S., O'Kane C.J. und Klambt C.** (1999). *loco* encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation. *Development* **126**, 1781-1791
- Guarnieri D.J. und Heberlein U.** (2003). *Drosophila melanogaster*, a genetic model system for alcohol research. *Int. Rev. Neurobiol.* **54**, 199-228
- 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 and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317-332
- Hay B.A., Maile R. und Rubin G.M.** (1997). P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 5195-5200
- Hidalgo A.** (2003). Neuron-glia interactions during axon guidance in *Drosophila*. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 50-55
- Hing H., Xiao J., Harden N., Lim L. und Zipursky S.L.** (1999). Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* **97**, 853-863
- Hirth F. und Reichert H.** (1999). Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. *Bioessays* **21**, 677-684
- Holley S.A. und Ferguson E.L.** (1997). Fish are like flies are like frogs: conservation of dorsal-ventral patterning mechanisms. *Bioessays* **19**, 281-284
- Hsiung F. und Moses K.** (2002). Retinal development in *Drosophila*: specifying the first neuron. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1207-1214
- Hofbauer A.und Buchner E.** (1989). Does *Drosophila* have seven eyes? *Naturwissenschaften* **76**, 335-336
- Hofbauer A. und Campos-Ortega J.A.** (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**, 264-274
- Huang Z. und Kunes S.** (1998). Signals transmitted along retinal axons in *Drosophila*: Hedgehog signal reception and the cell circuitry of lamina cartridge assembly. *Development* **125**, 3753-3764
- Huang Z., Shilo B.Z. und Kunes S.** (1998). A retinal axon fascicle uses *spitz*, an EGF receptor ligand, to construct a synaptic cartridge in the brain of *Drosophila*. *Cell* **95**, 693-703

- Huang Z. und Kunes S.** (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the Drosophila brain. *Cell* **86**, 411-422
- Hummel T., Attix S., Gunning D. und Zipursky S.L.** (2002). Temporal control of glial cell migration in the Drosophila eye requires gilgamesh, hedgehog, and eye specification genes. *Neuron* **33**, 193-203
- International Human Genome Sequencing Consortium** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Ito K., Awano W., Suzuki K., Hiromi Y. und Yamamoto D.** (1997). The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-771
- Jasper H., Benes V., Atzberger A., Sauer S., Ansorge W. und Bohmann D.** (2002). A genomic switch at the transition from cell proliferation to terminal differentiation in the Drosophila eye. *Dev. Cell* **3**, 511-521
- Karandikar U.C., Trott R.L., Yin J., Bishop C.P. und Bidwai A.P.** (2004). *Drosophila* CK2 regulates eye morphogenesis via phosphorylation of E(spl)M8. *Mech. Dev.* **121**, 273-286
- Kimmel B.E., Heberlein U. und Rubin G.M.** (1990). The homeo domain protein rough is expressed in a subset of cells in the developing Drosophila eye where it can specify photoreceptor cell subtype. *Genes Dev.* **4**, 712-727
- Koch, I.** (1997). Charakterisierung von Pathfinding-Mutanten bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Regensburg
- Kose H., Rose D., Zhu X. und Chiba A.** (1997). Homophilic synaptic target recognition mediated by immunoglobulin-like cell adhesion molecule Fasciclin III. *Development* **124**, 4143-4152
- Kretzschmar D. und Plugfelder G.O.** (2002). Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. *Brain Res. Bull.* **57**, 121-131
- Kramer J.M. und Staveley B.E.** (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Res.* **2**, 43-47
- Kumar J.P.** (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 846-857
- Kypta R.M., Su H. und Reichardt L.F.** (1996). Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J. Cell Biol.* **134**, 1519-1529
- Lai Z.C., Harrison S.D., Karim F., Li Y. und Rubin G.M.** (1996). Loss of tramtrack gene activity results in ectopic R7 cell formation, even in a *sina* mutant background. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5025-5030
- Lechner M.S., Levitan I. und Dressler G.R.** (2000). PTIP, a novel BRCT domain-containing protein interacts with Pax2 and is associated with active chromatin. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2741-2751

Lee R.C., Clandinin T.R., Lee C.H., Chen P.L., Meinertzhagen I.A. und Zipursky S.L. (2003). The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the Drosophila visual system. *Nat. Neurosci.* **6**, 557-563

Lee C.H., Herman T., Clandinin T.R., Lee R. und Zipursky S.L. (2001). N-cadherin regulates target specificity in the Drosophila visual system. *Neuron* **30**, 437-450

Lexikon der Biologie (2003). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Li T.R. und White K.P. (2003). Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in Drosophila. *Dev. Cell* **5**, 59-72

Lin D.M. und Goodman C.S. (1994a). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**, 507-523

Lin D.M., Fetter R.D., Kopczynski C., Grenningloh G. und Goodman C.S. (1994b). Genetic analysis of Fasciclin II in Drosophila: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron* **13**, 1055-1069

Lindsley D.L. und Zimm G.G. (1992). The Genome of Drosophila melanogaster. *Academic Press*, San Diego.

Liu E. und Restifo L.L. (1998). Identification of a broad complex-regulated enhancer in the developing visual system of Drosophila. *J. Neurobiol.* **34**, 253-270

Luo H. und Dearolf C.R. (2001). The JAK/STAT pathway and Drosophila development. *Bioessays*. **23**, 1138-1147

Machado R.C., Pereira R.N., Costa M.S. und Ramos R.G. (2002). "In vivo" toxicity of a truncated version of the Drosophila Rst-IrreC protein is dependent on the presence of a glutamine-rich region in its intracellular domain. *An Acad. Bras. Cienc.* **74**, 285-295

Makino N, Yamato T., Inoue H., Furukawa T., Abe T., Yokoyama T., Yatsuoka T., Fukushige S., Orikasa S., Takahashi T. und Horii A. (2001). Isolation and characterization of the human gene homologous to the Drosophila headcase (hdc) gene in chromosome bands 6q23-q24, a region of common deletion in human pancreatic cancer. *DNA Seq.* **11**, 547-553

Maurel-Zaffran C., Suzuki T., Gahmon G., Treisman J.E. und Dickson B.J. (2001). Cell-autonomous and -nonautonomous functions of LAR in R7 photoreceptor axon targeting. *Neuron* **32**, 225-235

Marchler-Bauer A., Anderson J.B., DeWeese-Scott C., Fedorova N.D., Geer L.Y., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Jacobs A.R., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Madej T., Marchler G.H., Mazumder R., Nikolskaya A.N., Panchenko A.R., Rao B.S., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thiessen P.A., Vasudevan S., Wang Y., Yamashita R.A., Yin J.J. und Bryant S.H. (2003). CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* **31**, 383-387

Mardon G., Solomon N.M. und Rubin G.M. (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in Drosophila. *Development* **120**, 3473-3486

- Martin K.A., Poeck B., Roth H., Ebens A.J., Ballard L.C. und Zipursky S.L.** (1995). Mutations disrupting neuronal connectivity in the Drosophila visual system. *Neuron* **14**, 229-240
- Meier, D.** (2000). Untersuchungen zu Genetik und Molekularbiologie der Entwicklung des visuellen Systems in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Regensburg
- Meinertzhagen L.A und Hanson T.E.** (1993). The Development of the Optic Lobe. In: Bate und Martinez Arias (Eds.). The Development of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 1363-1491
- Mohler J., Weiss N., Murli S., Mohammadi S., Vani K., Vasilakis G., Song C.H., Epstein A., Kuang T., English J. und Cherdak D.** (1992) The embryonically active gene, unkempt, of *Drosophila* encodes a Cys3His finger protein. *Genetics* **131**, 377-388
- Myster D.L. und Duronio R.J.** (2000). To differentiate or not to differentiate? *Curr. Biol.* **10**, R302-304
- Nassif C., Noveen A. und Hartenstein V.** (2003). Early development of the *Drosophila* brain: III. The pattern of neuropile founder tracts during the larval period. *J. Comp. Neurol.* **455**, 417-434
- Neves G., Zucker J., Daly M. und Chess A.** (2004). Stochastic yet biased expression of multiple Dscam splice variants by individual cells. *Nat. Genet.* **36**, 240-246
- Newsome T.P., Schmidt S., Dietzl G., Keleman K., Asling B., Debant A. und Dickson B.J.** (2000). Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell* **101**, 283-294
- O'Kane C.J. und Gehring W.J.** (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**, 9123-9127
- Oliver C.P.** (1976). Historical Introduction. In: Ashburner und Novitski (Eds.). The Genetics and Biology of *Drosophila*. 1-30
- Perez S.E. und Steller H.** (1996). Migration of glial cells into retinal axon target field in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* **30**, 359-373
- Pielage J. und Klammt C.** (2001). Glial cells aid axonal target selection. *Trends Neurosci.* **24**, 432-433
- Poeck B., Fischer S., Gunning D., Zipursky S.L. und Salecker I.** (2001). Glial cells mediate target layer selection of retinal axons in the developing visual system of *Drosophila*. *Neuron* **29**, 99-113
- Poeck B., Hofbauer A. und Pflugfelder G.O.** (1993). Expression of the *Drosophila* optomotor-blind gene transcript in neuronal and glial cells of the developing nervous system. *Development* **117**, 1017-1029
- Pontius J.U., Wagner L. und Schuler G.D.** (2003). UniGene: a unified view of the transcriptome. In: The NCBI Handbook. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information

- Puntervoll P., Linding R., Gemund C., Chabanis-Davidson S., Mattingdal M., Cameron S., Martin D.M., Ausiello G., Brannetti B., Costantini A., Ferre F., Maselli V., Via A., Cesareni G., Diella F., Superti-Furga G., Wyrwicz L., Ramu C., McGuigan C., Gudavalli R., Letunic I., Bork P., Rychlewski L., Kuster B., Helmer-Citterich M., Hunter W.N., Aasland R. und Gibson T.J.** (2003). ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3625-3630
- Ramos R.G., Igloi G.L., Lichte B., Baumann U., Maier D., Schneider T., Brandstatter J.H., Frohlich A., Fischbach K.F.** (1993). The irregular chiasm C-roughest locus of Drosophila, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Genes Dev.* **7**, 2533-2547
- Rangarajan R., Gong Q. und Gaul U.** (1999). Migration and function of glia in the developing Drosophila eye. *Development* **126**, 3285-3292
- Rao Y., Pang P., Ruan W., Gunning D. und Zipursky S.L.** (2000). brakeless is required for photoreceptor growth-cone targeting in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5966-5971
- Reichert H. und Boyan G.** (1997). Building a brain: developmental insights in insects. *Trends Neurosci.* **20**, 258-264.
- Reiter C., Schimansky T., Nie Z. und Fischbach K.** (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the Drosophila retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development* **122**, 1931-1940
- Restifo L.L. und Hauglum W.** (1998). Parallel molecular genetic pathways operate during CNS metamorphosis in Drosophila. *Mol Cell Neurosci.* **11**, 134-148
- Riddiford L.M.** (1993). Hormones and Drosophila Development. In: Bate und Martinez Arias (Eds.) The Development of Drosophila melanogaster. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 899-939
- Robinow S. und White K.** (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during Drosophila melanogaster development. *J. Neurobiol.* **22**, 443-461
- Rose D. und Chiba A.** (1999). A single growth cone is capable of integrating simultaneously presented and functionally distinct molecular cues during target recognition. *J. Neurosci.* **19**, 4899-4906
- Rubin G.M.** (1991). Signal transduction and the fate of the R7 photoreceptor in Drosophila. *Trends Genet.* **7**, 372-377
- Rubin G.M., Yandell M.D., Wortman J.R., Gabor Miklos G.L., Nelson C.R., Hariharan I.K., Fortini M.E. et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-2215
- Salecker I., Clandinin T.R. und Zipursky S.L.** (1998). Hedgehog and Spitz: making a match between photoreceptor axons and their targets. *Cell* **95**, 587-590

- Schmucker D., Clemens J.C., Shu H., Worby C.A., Xiao J., Muda M., Dixon J.E. und Zipursky S.L.** (2000). Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**, 671-684
- Schneider T., Reiter C., Eule E., Bader B., Lichte B., Nie Z., Schimansky T., Ramos R.G. und Fischbach K.F.** (1995). Restricted expression of the irrec-rst protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons. *Neuron* **15**, 259-271
- Selleck S.B. und Steller H.** (1991). The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of Drosophila. *Neuron* **6**, 83-99
- Senti K., Keleman K., Eisenhaber F. und Dickson B.J.** (2000). brakeless is required for lamina targeting of R1-R6 axons in the Drosophila visual system. *Development* **127**, 2291-2301
- Shulman J.M., Shulman L.M., Weiner W.J. und Feany M.B.** (2003). From fruit fly to bedside: translating lessons from Drosophila models of neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 443-449
- Song J., Wu L., Chen Z., Kohanski R.A. und Pick L.** (2003). Axons guided by insulin receptor in Drosophila visual system. *Science* **300**, 502-505
- Stein E. und Tessier-Lavigne M.** (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-1938
- Steneberg P. und Samakovlis C.** (2001). A novel stop codon readthrough mechanism produces functional Headcase protein in Drosophila trachea. *EMBO Rep.* **2**, 593-597
- Steneberg P., Englund C., Kronhamn J., Weaver T.A. und Samakovlis C.** (1998). Translational readthrough in the hdc mRNA generates a novel branching inhibitor in the drosophila trachea. *Genes Dev.* **12**, 956-967
- Stowers R.S. und Schwarz T.L.** (1999). A genetic method for generating Drosophila eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype. *Genetics* **152**, 1631-1639
- Suh G.S., Poeck B., Chouard T., Oron E., Segal D., Chamovitz D.A. und Zipursky S.L.** (2002). Drosophila JAB1/CSN5 acts in photoreceptor cells to induce glial cells. *Neuron* **33**, 35-46
- Sullivan W., Ashburner M. und Hawley R.C.** (2000). *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Taylor T.D. und Garrity P.A.** (2003). Axon targeting in the Drosophila visual system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 90-95
- Tessier-Lavigne M. und Goodman C.S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133
- Thaker H.M. und Kankel D.R.** (1992). Mosaic analysis gives an estimate of the extent of genomic involvement in the development of the visual system in Drosophila melanogaster. *Genetics* **131**, 883-894

- Thummel C.S.** (1996). Files on steroids--Drosophila metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet.* **12**, 306-310
- Tix S., Minden J.S. und Technau G.M.** (1989). Pre-existing neuronal pathways in the developing optic lobes of Drosophila. *Development* **105**, 739-746
- Truman J.W., Talbot W.S., Fahrbach S.E. und Hogness D.S.** (1994). Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during Drosophila and Manduca development. *Development* **120**, 219-234
- Van Vactor, D.** (1998). Adhesion and signaling in axonal fasciculation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 80-86
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A. et al.** (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351
- Voas M.G. und Rebay, I.** (2004). Signal integration during development: insights from the Drosophila Eye. *Dev. Dyn.* **229**, 162-175
- Wang J., Zugates C.T., Liang I.H., Lee C.H. und Lee T.** (2002). Drosophila Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron* **33**, 559-571
- Ward R.E., Evans J. und Thummel C.S.** (2003). Genetic modifier screens in Drosophila demonstrate a role for Rho1 signaling in ecdysone-triggered imaginal disc morphogenesis. *Genetics* **165**, 1397-1415
- Weaver T.A. und White R.A.** (1995). headcase, an imaginal specific gene required for adult morphogenesis in Drosophila melanogaster. *Development* **121**, 4149-4160
- Weigmann K., Klapper R., Strasser T., Rickert C., Technau G. M., Jäckle H., Janning W. and Klämbt C.** (2003). FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends in Genetics* **19**, 310-311
- White K.P., Rifkin S.A., Hurban P. und Hogness D.S.** (1999). Microarray analysis of Drosophila development during metamorphosis. *Science* **286**, 2179-2184
- Wilkin M.B., Becker M.N., Mulvey D., Phan I., Chao A., Cooper K, Chung H.J., Campbell I.D., Baron M. und MacIntyre R.** (2000). Drosophila dumpy is a gigantic extracellular protein required to maintain tension at epidermal-cuticle attachment sites. *Curr. Biol.* **10**, 559-567
- Winberg M.L., Perez S.E. und Steller H.** (1992). Generation and early differentiation of glial cells in the first optic ganglion of Drosophila melanogaster. *Development* **115**, 903-911
- Wingender E., Chen X., Hehl R., Karas H., Liebich I., Matys V., Meinhardt T., Pruss M., Reuter I. und Schacherer F.** (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* **28**, 316-319

- Wolff T. und Ready D.** (1993). Pattern Formation the Drosophila Retina. In: Bate und Martinez Arias (Eds.) The Development of Drosophila melanogaster. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1277-1325
- Woods D.F., Wu J.W. und Bryant P.J.** (1997). Localization of proteins to the apico-lateral junctions of Drosophila epithelia. *Dev. Genet.* **20**, 111-118
- Xiong W.C., Okano H., Patel N.H., Blendy J.A. und Montell C.** (1994). *repo* encodes a glial-specific homeo domain protein required in the Drosophila nervous system. *Genes Dev.* **8**, 981-994
- Xu T. und Rubin G.M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-1237
- Yamamoto D.** (1996). Architecture Of The Adult Compound Eye And The Developing Eye Disc. In: Molecular Dynamics In The Developing Drosophila Eye. *Springer-Verlag*, 5-23
- Yasuyama K. und Meinertzhagen I.A.** (1999). Extraretinal photoreceptors at the compound eye's posterior margin in Drosophila melanogaster. *J. Comp. Neurol.* **412**, 193-202
- Yuasa Y., Okabe M., Yoshikawa S., Tabuchi K., Xiong W.C., Hiromi Y. und Okano H.** (2003). Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* **130**, 2419-2428
- Zeidler M.P., Bach E.A. und Perrimon N.** (2000). The roles of the Drosophila JAK/STAT pathway. *Oncogene* **19**, 2598-2606
- Zeidler M.P., Perrimon N. und Strutt D.I.** (1999). Polarity determination in the Drosophila eye: a novel role for unpaired and JAK/STAT signaling. *Genes Dev.* **13**, 1342-1353
- Zinsmaier K.E., Hofbauer A., Heimbeck G., Pflugfelder G.O., Buchner S. und Buchner E.** (1990). A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of Drosophila. *J. Neurogenet.* **7**, 15-29
- Zipursky S.L. und Rubin G.M.** (1994). Determination of neuronal cell fate: lessons from the R7 neuron of Drosophila. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 373-397
- Zipursky S.L., Venkatesh T.R., Teplow D.B. und Benzer S.** (1984). Neuronal development in the Drosophila retina: monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* **36**, 15-26

Danke...

Stephan Schneuwly für die Betreuung meiner Arbeit, die konstruktiven Ratschläge und geduldige Begleitung inner- und außerhalb des Projekts.

Alois Hofbauer für die zahlreichen Erste-Hilfe-Leistungen (...die Zugriffszeit auf deine geclusterte Papersammlung ist beachtlich!) und virtuosen Gedankenspiele in wohlwollender Atmosphäre.

Renate Reng und Ursula Roth für die Anfertigung und Färbung diverser Hirnschnitte und Ganzhirnpräparate, sowie ihre schweißtreibende Fliegenarbeit während meiner Knock-Out-Phasen und die angenehme Stimmung nicht nur an der Bench.

Susanne Fischer für eine Laborfreundschaft wie sie im Buche steht, als auch für die rastlose Hilfe beim Dezimieren meiner Drosophila-Lücken und Schokovorräte (...der Sarotti-Engel hat's gedankt).

Señor José Botella-Muñoz für die Einführung in die deutsch-spanische Konversation mit englischen Untertiteln und die fruchtbaren sachlichen, geistlichen und sonstigen Diskussionen.

Christoph, Moni, SusiII und allen Freunden der mittäglichen Kaffeeklatsch-Runde für dieses genussvolle Highlight an jedem laaaangen Arbeitstag.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für das gesunde Klima im Drosophila-Freigehege.

Stefan Birngruber für seinen nimmermüden Adlerblick beim ermüdenden Korrekturlesen.

Kerstin, meiner Familie und allen Brüdern und Schwestern im Geiste – ihr wisst wofür!

Vor allem meinem Herrn Jesus Christus, you've done so much for me.

„Denn ich schäme mich des Evangeliums nicht; denn es ist die Kraft Gottes, die alle rettet, die daran glauben...“ (Bibel, Römerbrief 1,16)