

Biologie

Analyse synaptischer Spezifität im olfaktorischen System
von *Drosophila*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Ariane B. Zierau
aus Bonn

- 2007 -

Dekan:	Prof. Dr. N. Sachser
Erster Gutachter:	PD Dr. T. Hummel
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Tag der mündlichen Prüfung:	23.5.2007
Tag der Promotion:	25.5.2007

1	EINLEITUNG	1
1.1	Axonale Wegfindung und Synaptogenese	1
1.2	Das olfaktorische System als Modell zur Analyse synaptischer Spezifität	3
1.2.1	Das olfaktorische System in Vertebraten	4
1.2.2	Das olfaktorische System in <i>Drosophila</i>	6
1.2.2.1	Axonale Konvergenz und Glomerulus-Bildung in der pupalen Entwicklung	9
1.2.3	Zielfindung und synaptische Spezifität der ORNs	9
1.3	Ziel der Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien	12
2.1.2	Puffer, Medien und Lösungen	12
2.1.3	Primäre Antikörper und interkalierende Farbstoffe	13
2.1.4	Sekundäre Antikörper	13
2.1.5	Fliegenstämme	14
2.1.5.1	Stämme zur Markierung verschiedener Zelltypen des olfaktorischen Systems	14
2.1.5.2	Balancer und Stämme zur klonalen Analyse	15
2.1.5.3	Rekombinante <i>Dscam</i> -Chromosomen und Stämme zur Analyse der <i>Dscam</i> Funktion	17
2.1.5.4	Rekombinante <i>sema1a</i> -Chromosomen und Stämme zur Analyse der <i>sema1a</i> Funktion	18
2.2	Genetische und histologische Methoden	18
2.2.1	Fliegenzucht	18
2.2.2	Präparation von Gehirnen und Antennen	18

2.2.2.1	Adulte Gehirne	18
2.2.2.2	Pupale Gehirne und Antennen	19
2.2.3	Fixierung von Gewebe	19
2.2.4	Antikörperfärbung	19
2.2.5	EMS-Mutagenese zur Isolierung zweitchromosomaler Mutationen	19
2.2.6	Zytologische Kartierung letaler Mutationen	20
2.2.7	Generierung von Gal4-Aktivatorlinien durch P-Element-Konversion	20
3	ERGEBNISSE	22
3.1	Systematische Mutantanalyse	22
3.1.1.1	Generierung homozygot mutanter ORNs durch mitotische Rekombination	22
3.1.1.2	Visualisierung der synaptischen Spezifität	23
3.1.1.2.1	Generierung eines Markers zur Darstellung multipler ORN-Klassen	24
3.1.1.2.2	Darstellung der kontralateralen Projektion	25
3.1.1.3	EMS-Mutagenese und Etablierung letaler, zweitchromosomaler Mutationen	25
3.1.1.4	Durchführung der systematischen phänotypischen Analyse	26
3.1.1.5	Identifizierung mutanter Phänotypen	27
3.1.1.6	Phänotypische Klassifizierung	27
3.1.1.7	Reduktion des ORN-Projektionsmusters	30
3.1.1.7.1	Verlust der synaptischen Markierung einzelner ORN-Klassen	30
3.1.1.7.2	Reduzierte Innervation einzelner Glomeruli	31
3.1.1.8	Projektion von ORN-Axonon in ektopische AL Regionen	31
3.1.1.8.1	Mutationen, die zur Fehlprojektion von ORN Axonen führen	31
3.1.1.8.2	Mutationen, die zur Bildung ektopischer glomerulärer Strukturen führen	32
3.1.1.9	Defekte in der Glomerulus Bildung	33
3.1.1.9.1	Mutationen, die zu Defekten in Form und Struktur eines Glomerulus führen	33

3.1.1.9.2	Die Komplementationsgruppe <i>NCad</i>	33
3.1.1.10	Kartierung der letalen Mutationen	34
3.2	Die Mutation <i>sema1a</i>^{V2-13}	36
3.2.1	Phänotypische Charakterisierung von <i>sema1a</i> -Mutanten	36
3.2.1.1	Analyse einzelner antennaler ORN-Klassen	36
3.2.1.2	Analyse einzelner maxillarer ORN-Klassen	39
3.2.2	Klassen-spezifische Erkennung <i>sema1a</i> mutanter ORN Axone	40
3.2.2.1	Analyse ektopischer ORN47b Glomeruli im AL	40
3.2.2.2	Analyse ektopischer ORN21a Glomeruli im AL	40
3.2.3	Expression des SEMA1a Proteins im olfaktorischen System	41
3.2.3.1	Lokalisation des SEMA1A Proteins in <i>sema1a</i> ^{V2-13} und <i>sema</i> ^{P1} mutanten ORNs	41
3.2.3.2	Differentielle Expression von SEMA1A während der pupalen Entwicklung	41
3.2.4	Entwicklung des Konvergenzdefekts in <i>sema1a</i> Mutanten	43
3.2.5	Analyse von MARCM-Klonen mit <i>sema1a</i> ^{V2-13}	44
3.2.6	Analyse reverser MARCM-Klone und Einzel-Zell-Klone	45
3.2.7	Verschaltung homozygot <i>sema1a</i> mutanter ORNs mit den PN-Dendriten im antennalen Loben	46
3.2.7.1	Spezifität der ORN-PN-Erkennung in ektopischen Glomeruli in <i>sema1a</i> Mutanten	47
3.2.7.2	Innervation ektopischer Glomeruli durch LN-Dendriten in <i>sema1a</i> Mutanten	47
3.2.8	Überexpression von SEMA1A in ORNs	48
3.2.8.1	Analyse des <i>Sema1a</i> Überexpressions-Phänotyps in selektiv markierten ORN-Klassen	48
3.2.9	Interaktion von SEMA1A und seinem Rezeptor PLEXINA	49
3.3	Phänotypische Analyse der Mutation <i>Dscam</i>	51
3.3.1	Funktion von <i>Dscam</i> in verschiedenen ORN-Klassen	51

3.3.1.1	Vergleich des <i>Dscam</i> Verlust-Phänotyps in MARCM- und <i>Minute</i> -Klonen	52
3.3.1.2	Analyse des <i>Dscam</i> Verlust-Phänotyps in weiteren ORN-Klassen	53
3.3.1.2.1	Akkumulation ektoptischer glomerulärer Strukturen außerhalb des AL	54
3.3.1.2.2	Klassen-spezifische Sortierung <i>Dscam</i> mutanter ORN-Axone	55
3.3.1.3	Analyse reverser MARCM-Klone	56
3.3.1.4	ORN-Projektionsdefekte beim Verlust der <i>Dscam</i> Funktion im Zielgebiet	57
3.3.2	Innervation ektoptischer Glomeruli durch PN-Dendriten	58
3.3.2.1	Dendritische Innervation ektoptischer ORN47a Glomeruli in <i>Dscam</i> Mutanten	58
3.3.2.2	Dendritische Innervation ektoptischer ORN22a Glomeruli in <i>Dscam</i> Mutanten	60
3.3.2.3	Dendritische Innervation ektoptischer ORN47b Glomeruli in <i>Dscam</i> Mutanten	61
3.3.3	Spezifität der ORN-PN-Erkennung in <i>Dscam</i> Mutanten	62
3.3.4	Innervation ektoptischer Glomeruli durch LN-Dendriten	63
3.3.5	Die Rolle der DSCAM-Diversität in der Verschaltung der ORN Axone	64
3.3.5.1	Überexpression einzelner DSCAM-Isoformen	64
3.3.5.2	Entwicklungsanalyse des Überexpressionsphänotyps	66
3.3.5.2.1	Bildung des ORN88a Glomerulus in der pupalen Entwicklung	66
3.3.5.2.2	Der DSCAM Überexpressions-Phänotyp in der pupalen Entwicklung	67
3.3.5.3	Überexpression von DSCAM in einzelnen ORN Axonen	68
3.3.5.4	Differentielle Lokalisation verschiedener DSCAM-Isoformen innerhalb der ORN Axone	68
3.3.5.5	Einfluß einer reduzierten DSCAM-Diversität auf die Projektion der ORN Axone	69
4	DISKUSSION	72
4.1	Die phänotypische Mutantenanalyse	72

4.1.1	EMS-Mutagenese	72
4.1.2	Sensitivität des verwendeten ORN-Markers (MM1)	73
4.1.3	Die Analyse genetischer Mosaik	74
4.1.4	Phänotypische Klassen	75
4.1.4.1	Reduktion des ORN-Projektionsmusters	75
4.1.4.2	Projektion von ORN-Axon	76
4.1.4.2.1	Identifizierung von Genfunktionen, die zur Fehlprojektion von ORN-Axon	77
4.1.4.3	Konvergenzverlust in <i>NCad</i> mutanten ORN-Axon	80
4.1.4.4	Mutationen, die zu einer veränderten Glomerulus-Form	80
4.1.5	Beurteilung der phänotypischen Mutantenanalyse	81
4.2	Die Analyse der Mutation <i>sema1a</i>^{V2-013}	82
4.2.1	SEMA1A ist differentiell exprimiert und hat eine Klassen-spezifische Funktion in der Konvergenz von ORN-Axon	83
4.2.2	Der Verlust der <i>sema1a</i> Funktion führt zu Defekten in der ORN- und Glomerulus-Sortierung	84
4.2.3	<i>sema1a</i> wirkt überwiegend nicht zellautonom	84
4.2.4	SEMA1A vermittelt axonale Repulsion	85
4.3	Die Analyse der Mutation <i>Dscam</i>	87
4.3.1	Der Verlust der <i>Dscam</i> Funktion induziert die ektopische Konvergenz von ORN Axon	88
4.3.2	DSCAM verhindert eine vorzeitige Axon-Konvergenz indem es sowohl inter- als auch intra-axonale Repulsion vermittelt	89
4.3.3	Die Erkennung zwischen ORNs und ihren ZNS Zielzellen ist <i>Dscam</i> unabhängig	90
4.3.4	Mögliche Funktion von <i>Dscam</i> in der axonalen Wegfindung antennaler ORNs	91
4.3.5	Modell zur <i>Dscam</i> Funktion in der ORN Verschaltung	92

4.3.6	Die Konvergenz maxillarer ORN Axone ist von einer hohen DSCAM Diversität abhängig	93
4.4	Die Regulation synaptischer Spezifität im olfaktorischen System	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	98
6	LITERATUR	99
7	ANHANG	111

1 Einleitung

Für jeden Organismus ist es von enormer Wichtigkeit, Umweltreize aufzunehmen, diese zu verarbeiten und mit einer entsprechenden Verhaltensantwort zu reagieren. Die korrekte Verschaltung neuronaler Zellen ist die Grundlage für die Reizaufnahme und sinnvolle Verarbeitung im Nervensystem. Die sensorischen Neurone aus den peripheren Organen müssen hierzu über teilweise weite Distanzen ihre Axone projizieren, um sich mit ihren Zielzellen im zentralen Nervensystem zu verknüpfen.

Um eine korrekte Verschaltung mit dem synaptischen Partner zu gewährleisten, sind zwei Schritte notwendig: die axonale Wegfindung und die Zielzellerkennung.

Während der axonalen Wegfindung orientieren sich Wachstumskegel an der Spitze auswachsender Axone hierzu an repulsiven oder attraktiven Signalen aus der Umgebung, die entweder kontaktabhängig oder über weitere Distanzen wirken (Dickson, 2002; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Nach Erreichen des Zielgebiets müssen die Axone dann ihre korrekten postsynaptischen Zielzellen erkennen und die Synaptogenese initiieren.

1.1 Axonale Wegfindung und Synaptogenese

Die Bildung neuronaler Netzwerke wurde in *Drosophila* bereits an unterschiedlichen Modellsystemen, wie z.B. der Entwicklung der Ventralganglia (Strickleiter-Nervensystem), der Verschaltung von Motoneuronen mit ihren Muskeln oder auch der topographischen Verschaltung von Photorezeptoren untersucht. Dies führte zur Identifizierung verschiedener Ligand/Rezeptor-Mechanismen, die auch in Vertebraten konserviert sind.

Eines der bekanntesten Ligand/Rezeptor-Systeme ist der SLIT/ROBO-Signalweg. Seine Funktion in der axonalen Wegfindung konnte sowohl in Vertebraten (Brose et al., 1999; Li et al., 1999) als auch in *Drosophila* gezeigt werden. Die Interaktion des sekretierten SLIT-Signals mit den drei verschiedenen ROBO-Rezeptoren, ROBO-1, ROBO-2 UND ROBO-3, ist für das korrekte Überqueren der Mittellinie einiger Axone wichtig (Kidd et al., 1999; Simpson et al., 2000a). SLIT wird von der Mittellinien-Glia im embryonalen ZNS sezerniert und hindert die ROBO exprimierenden longitudinal projizierenden Axone am Kreuzen der Mittellinie. In kommissuralen Axonen, welche die Mittellinie bereits einmal überquert haben, verhindert die Expression von ROBO ein erneutes Überqueren. Der Verlust der *robo* Funktion führt dazu, daß zu viele Axone die Mittellinie kreuzen (Kidd et al., 1999; Simpson et al., 2000a). Die Expression einer bestimmten Kombination der unterschiedlichen Robo-Rezeptoren bestimmt zudem, in welchem der drei longitudinalen Faszikel die Axone projizieren (Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000b).

Ein weiterer Ligand/Rezeptor-Mechanismus ist der NETRIN/FRAZZLED-Signalweg. Für die Wegfindung von Axonen im embryonalen ZNS von *Drosophila* wurde gezeigt, daß das von der Mittellinien-Glia sekretierte NETRIN-Signal (Ligand) nach Interaktion mit dem Rezeptor FRAZZLED zur Attraktion (Kolodziej et al., 1996), bei der Interaktion mit UNC5 zur Repulsion (Keleman and Dickson, 2001) des neuronalen Wachstumskegels führt.

Die Identifizierung des Rezeptor-Ligand-Paars EPHRIN/ EPH zeigt, daß auch die relativen Expressionslevel von Rezeptor und Ligand von enormer Bedeutung sind. Sowohl für die Wegfindung kommissuraler Axone im Vorderhirn (Kullander et al., 2001), als auch für die retinotektale Verschaltung von Photorezeptoren (Brown et al., 2000; Flanagan and Vanderhaeghen, 1998) konnte gezeigt werden, daß komplementäre Expressionsgradienten von Ligand und Rezeptor die Positionierung der Retina Axone bestimmen. Für den Verlust von Ephrin-A2 und Ephrin-A5 wurde jedoch gezeigt, daß dies nicht etwa eine einfache Verschiebung der Axontermini im Superior colliculus (SC) verursacht. Die Axontermini der temporalen und nasalen Retina-Axone verteilen sich noch immer über den gesamten SC, ihre topographische Ordnung ist jedoch gestört (Feldheim et al., 2000). Brown et al. konnten durch ektoische Expression von EPHA3 in einem Teil der Axone zeigen, daß die überexprimierenden Axone in eine weiter anteriore Position des SC projizieren, während die Axone mit wildtypischem Level in weiter posteriore Bereiche projizieren. Auf diese Weise entstehen zwei retinotopie Karten in je einer Hälfte des SC (Brown et al., 2000). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, daß die relativen Expressionslevel von EphA in den Retina Axonen auf einen repulsiven Ephrin Gradienten reagieren und so die Position der Axontermini bestimmt wird. Im Gegensatz zu den zahlreichen EPHRINEN und EPH Rezeptoren in Vertebraten wurde in *Drosophila* nur ein EPHRIN /EPH Paar identifiziert (Bossing and Brand, 2002). Neuere Arbeiten in *Drosophila* konnten nun auch eine Funktion des EPHRIN-Signalwegs für die korrekte Projektion der Pilzkörperneurone zeigen (Boyle et al., 2006).

Die für die Orientierung des Wachstumskegels wichtigen Signalmoleküle müssen jedoch nicht unbedingt sekretiert sein und einen Gradienten bilden. Wachstumskegel orientieren sich auch über direkten Zell-Zell-Kontakt über die Interaktion von Oberflächenmolekülen. Ein Beispiel für Kontakt-abhängige Wegfindungssignale sind die Transmembran-Semaphorine. In der Familie der Semaphorine gibt es neben verschiedenen sekretierten auch Membran-assoziierte Proteine (Pasterkamp and Kolodkin, 2003). Für Vertebraten wurde die repulsive Funktion von SEMA6A, einem Transmembran-Semaphorin, auf auswachsende Axone *in vitro* gezeigt (Xu et al., 2000). *In vivo* Untersuchungen in *Danio rerio* konnten auch eine repulsive Wirkung von SEMA4E, das hier in den Pharyngealbögen exprimiert ist, für die auswachsenden Motoneurone zeigen (Xiao et al., 2003). Auch in *Drosophila* wurde für die

myotopische Verschaltung der Motoneurone die Funktion des transmembran-Proteins SEMA1A in diesen Neuronen beschrieben (Yu et al., 1998). Als Rezeptoren für die verschiedenen Semaphorine wurden Plexine und, als Co-Rezeptor für die sekretierte Klasse III Semaphorine, Neuropiline identifiziert (Comeau et al., 1998; Winberg et al., 1998).

Neben den bekannten Rezeptor-Ligand-Mechanismen ist auch eine große Zahl von Zelladhäsionsmolekülen bekannt, die über homo- oder heterophile Interaktion zur Orientierung und Faszikulation von Axonen beitragen. Ein klassisches Beispiel für Zelladhäsionsmoleküle sind die Cadherine. Die Cadherin-Superfamilie besteht aus Transmembran- oder Membran-verankerten Proteinen, die sich entsprechend ihrer Proteinstruktur in die klassischen und nicht-klassischen Cadherine einteilen lassen (Halbleib and Nelson, 2006). Für das *Drosophila* NCAD wurde beispielsweise gezeigt, daß es zur Projektion der R7 Photorezeptorzellen in die richtige Medulla-Ebene und zur Stabilisierung der Synapsen in dieser Position nötig ist (Lee et al., 2001; Yonekura et al., 2006). Auch das Protocadherin FLAMINGO ist an der korrekten Projektion der Photorezeptorzellen beteiligt (Lee et al., 2003; Senti et al., 2003).

Bisher wurden folglich einige Mechanismen identifiziert, die entweder über größere Distanz oder auch kontaktabhängig zur Attraktion oder Repulsion von auswachsenden Axonen führen. Die Untersuchungen der spezifischen Innervation bestimmter Muskeln durch Motoneurone im *Drosophila*-Embryo haben gezeigt, daß für die präzise synaptische Verschaltung ein genau reguliertes Zusammenspiel der verschiedenen Signal-Mechanismen wichtig ist (Yu et al., 2000). Die Überexpression des Adhäsionsmoleküls FASII in Motoneuronen führt zur Hyperfaszikulation der Axone, die Überexpression von SEMA1A hingegen zur Defaszikulation. Die ektopische Expression von CONNECTIN in Muskeln, die im Wildtyp keine CONNECTIN Expression zeigen, verhindert die Innervation durch die zugehörigen Motoneurone (Nose et al., 1992). Die Balance zwischen Attraktion und Repulsion unter Motoneuronen sowie deren Axonen und dem Zielgebiet führt hier zur Bildung des präzisen myotopischen Verschaltungsmusters.

1.2 Das olfaktorische System als Modell zur Analyse synaptischer Spezifität

Das olfaktorische System bietet sich, aufgrund des charakteristischen Verschaltungsmusters der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs) mit ihrem Zielgebiet im Gehirn, als geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der synaptischen Spezifität an.

Sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* zeigen die ORNs ein konvergentes Verschaltungsmuster im Gehirn (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Couto et al., 2005; Laissue et al., 1999). ORNs, die jeweils einen spezifischen olfaktorischen Rezeptor (OR)

exprimieren liegen im Riechepithelium der Vertebraten bzw. in der Antenne und den Maxillarpalpen in *Drosophila* verteilt, projizieren ihre Axone ins Gehirn und konvergieren dort entsprechend ihrer Rezeptorexpression in gemeinsame, kompakte Neuropil-Bereiche, die sogenannten Glomeruli. Hier bilden sie synaptische Verknüpfungen zu den ZNS-Zielzellen aus, die die olfaktorische Information in höhere Gehirnzentren weiterleiten. Die folgenden Abschnitte geben einen kurzen Überblick über den Aufbau des olfaktorischen Systems in Vertebraten und *Drosophila* wieder.

1.2.1 Das olfaktorische System in Vertebraten

Eine Vielzahl olfaktorischer Rezeptorneurone (ORNs) projiziert aus der Riechschleimhaut ins Gehirn, wo sie sich mit den Mitralzellen im olfaktorischen Bulbus verschalten (Lin and Ngai, 1999; Treloar et al., 1999; Zou et al., 2001). Jedes dieser ORNs exprimiert einen von etwa 1000 olfaktorischen Rezeptoren (ORs) (Ishii et al., 2001; Serizawa et al., 2004). ORs sind Siebentransmembran-Proteine (7TM-Proteine) (Buck and Axel, 1991; Clyne et al., 1999; Gao and Chess, 1999; Mombaerts, 2004; Zhang et al., 2004), die jeweils spezifische Geruchsmoleküle erkennen und das Signal über einen G-Protein/cAMP-Signalweg weiterleiten (Mombaerts, 2001). Im Folgenden werden die ORNs entsprechend ihrer OR Expression in Klassen unterteilt.

Die einzelnen ORNs einer gegebenen Klasse liegen im olfaktorischen Epithelium nicht direkt benachbart und projizieren ihre Axone in den olfaktorischen Bulbus, wo sie dann, entsprechend ihrer OR Expression, in einen gemeinsamen Glomerulus konvergieren (Miyamichi et al., 2005; Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993). Im adulten Tier projiziert ein einzelnes, unverzweigtes ORN in einen einzigen von 1600-1800 Glomeruli. Zu Beginn der Entwicklung werden häufig zunächst zwei oder mehr Glomeruli gebildet (Zou et al., 2004). Die synaptische Verschaltung von ORNs in Vertebraten ist also zunächst noch ungenau und wird postnatal modifiziert, bis das adulte glomeruläre Muster entsteht. Eine schematische Übersicht zum Aufbau des olfaktorischen Systems im adulten Vertebraten ist in Abbildung 1 dargestellt.

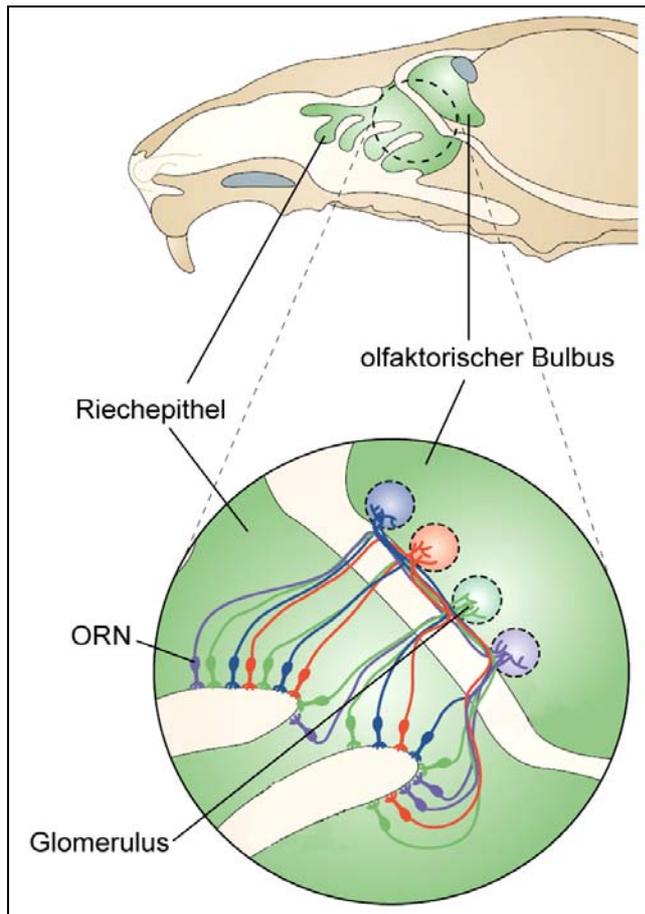


Abb. 1: Verschaltungsmuster des olfaktorischen Systems der Vertebraten.

Olfaktorische Rezeptorneurone (ORNs), die einen bestimmten olfaktorischen Rezeptor (OR) exprimieren liegen im Riechepithel Mosaik-ähnlich verteilt. Ihre Axone projizieren in den olfaktorischen Bulbus und konvergieren dort in Klassen-spezifische Glomeruli. Hierbei konvergieren stets Axone, in denen der gleiche OR exprimiert ist.

(aus Mombaerts, 2004)

Jedes Neuron exprimiert einen einzelnen funktionellen Rezeptor („Ein-Rezeptor-ein-Neuron“-Regel). Durch Deletions- und Austauschexperimente mit OR-Genen, konnte für die OR-Moleküle, die im gesamten Neuron exprimiert sind, eine Funktion in der Wegfindung der Axone nachgewiesen werden (Feinstein and Mombaerts, 2004; Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998). Untersuchungen von Feinstein und Mombaerts mit chimären OR-Proteinen geben zwar Hinweise darauf, daß ORs die Identität von ORNs bestimmen, die hierfür codierenden Aminosäuresequenzen liegen jedoch innerhalb der 7-TM-Domäne (Feinstein et al., 2004; Feinstein and Mombaerts, 2004), sodaß eine aktive Funktion als Wegfindungsmolekül unwahrscheinlich ist. Arbeiten von Serizawa et al. und Imai et al. haben gezeigt, daß die Expression Klassen-spezifischer Adhäsionsmoleküle in direktem Zusammenhang mit den exprimierten ORs steht (Imai et al., 2006; Serizawa et al., 2006). Cutforth et al. konnten in früheren Studien bereits demonstrieren, daß die Expression eines bestimmten EPHRIN-A Levels für die axonale Konvergenz in bestimmte Positionen des Bulbus notwendig ist. Nach Überexpression von EPHRIN-A in einem Teil der ORNs einer Rezeptorklasse, sortieren sich die ORNs gemäß der EPHRIN-A Expressionslevel aus und konvergieren in getrennte Glomeruli (Cutforth et al., 2003). Neuere Expressionsstudien von Serizawa et al. zeigen, daß eine Korrelation zwischen dem exprimierten OR und Wegfindungsmolekülen wie EPHRINA5/ EPHA5 und KIRREL2/ KIRREL3 besteht (Serizawa et al.,

2006). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Expressionsstärke dieser Moleküle mit der Aktivität des OR-Signalwegs zusammenhängt. Durch verschiedene Manipulationen des G-Protein/cAMP-Signalwegs konnten Imai et al. nachweisen, daß die Menge des cAMP für die Positionierung der Glomeruli entlang der anterior-posterior Achse des olfaktorischen Bulbus verantwortlich ist. Auch hier konnte eine Korrelation zur Expression des Wegfindungsrezeptors NEUROFILIN-1 gezeigt werden (Imai et al., 2006). Das von der Aktivität bestimmter ORs abhängige cAMP-Signal reguliert offensichtlich die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und führt so zur Positionierung der Glomeruli im Bulbus. In detaillierten Studien zur glomerulären Strukturierung des Bulbus in Vertebraten wurde festgestellt, daß die Anordnung der Glomeruli durchaus variabel ist (Schaefer et al., 2001; Strotmann et al., 2000). Die genaue Lokalisation eines bestimmten Glomerulus kann in verschiedenen Gehirnen variieren. Die synaptische Spezifität der ORNs, d.h. die Eigenschaft in, der Rezeptorexpression entsprechende, Neuropil-Bereiche zu konvergieren, ist in adulten Gehirnen jedoch stets wiederzufinden.

1.2.2 Das olfaktorische System in *Drosophila*

Auch das olfaktorische System von *Drosophila* zeigt ein, dem der Vertebraten vergleichbares, konvergentes Verschaltungsmuster. In *Drosophila* wird die olfaktorische Information von zwei peripheren Organen aufgenommen, dem 3. Antennensegment und dem Maxillarpalpus. Die Oberfläche dieser Organe ist bedeckt von Haar-ähnlichen Strukturen, den Sensillen, in denen die ORNs lokalisiert sind. Insgesamt können drei Sensillentypen unterschieden werden, basikonische, coelokonische und trichoide Sensillen, in denen jeweils eine bestimmte Zusammensetzung von ORN Klassen zu finden ist (Couto et al., 2005; de Bruyne et al., 2001; Hallem et al., 2004). Auch die etwa 60 OR Gene, die in *Drosophila* identifiziert wurden haben eine 7TM-Domäne (Clyne et al., 1999; Gao and Chess, 1999; Vosshall et al., 1999; Vosshall et al., 2000). In den *Drosophila* ORNs wird in den meisten Fällen je ein spezifischer OR, sowie OR83b exprimiert. Der atypische Rezeptor OR83b bildet Heterodimere mit den anderen ORs und ist für deren Lokalisation in den ORN Dendriten verantwortlich (Larsson et al., 2004). Zudem konnten Neuhaus et al. zeigen, daß die Co-Expression von OR83b mit anderen ORs die Sensitivität für deren Geruchsmoleküle erhöht (Neuhaus et al., 2005). Welcher OR in einem ORN exprimiert wird unterliegt vermutlich einem kombinatorischen Code verschiedener Transkriptionsfaktoren (Ray et al., 2007). Es gibt jedoch auch Ausnahmen von der „ein-Neuron-ein-Rezeptor“-Regel, in denen es zur Co-Expression von ORs mit hoher Sequenzähnlichkeit kommt (Couto et al., 2005; Goldman et al., 2005). Im Folgenden werden die ORNs entsprechend dieser Rezeptorexpression in ORN-Klassen unterteilt.

Die ORNs aus der Antenne projizieren über die antennalen Nerven (AN) ins Gehirn. Dort treffen sie auf das erste Verarbeitungszentrum für die olfaktorische Information, die antennalen Loben (AL). Die maxillaren ORNs projizieren über die maxillaren Nerven (MN), die im Gehirn zunächst das Suboesophagial-Ganglion (SOG) durchqueren, bevor sie auf die AL treffen. Die AL sind bilateral-symmetrisch angeordnet und liegen anterior-zentral im Gehirn. Ein AL besteht aus etwa 50 identifizierbaren Glomeruli, die alle eine charakteristische Position, Größe und Form haben (Couto et al., 2005; Fishilevich and Vosshall, 2005; Laissue et al., 1999). Im Vergleich zu den Vertebraten ist die glomeruläre Organisation im AL sehr stereotyp. Die ORNs der verschiedenen Klassen konvergieren stets in den gleichen identifizierbaren Glomerulus. Einige ORN-Klassen bilden zudem axonale Verzweigungen aus, die anterior-dorsal über den ipsilateralen AL projizieren, um über die Kommissur in den kontralateralen AL einzuwachsen und dort ebenfalls in den Klassenspezifischen Glomerulus zu konvergieren. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht über den Aufbau des olfaktorischen Systems von *Drosophila* und die Projektionwege der ORN-Axone.

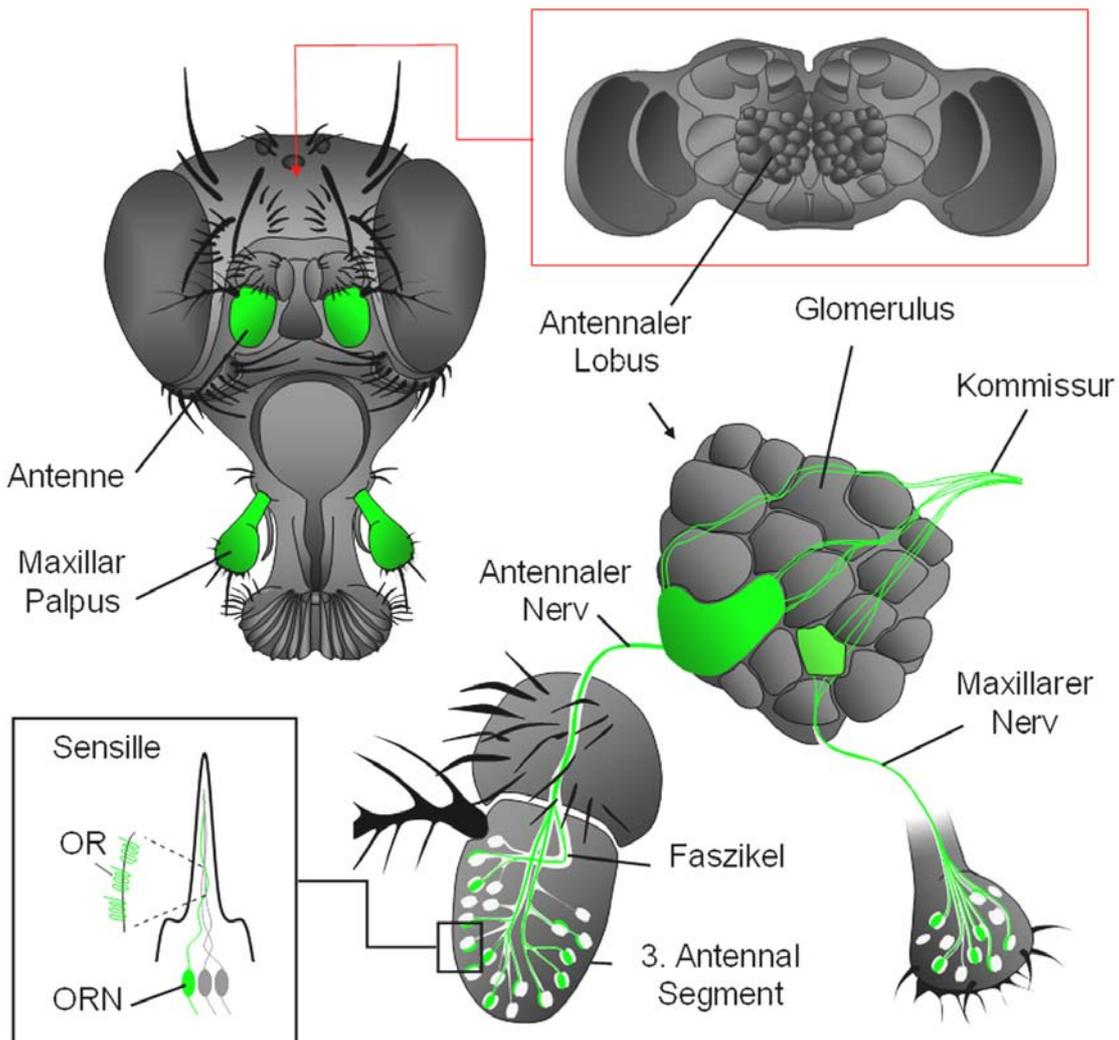


Abb. 2: Schematische Übersicht über den Aufbau des olfaktorischen Systems von *Drosophila*. Die Oberflächen der peripheren olfaktorischen Organe, Antennen und Maxillarpalpen sind mit verschiedenen Typen von Sensillen bedeckt. Diese Sensillen können 1-4 olfaktorische Rezeptorneurone (ORNs) beinhalten, die jeweils einen bestimmten olfaktorischen Rezeptor (OR) exprimieren. Die Axone der ORNs faszikulieren und projizieren im antennalen bzw. maxillaren Nerv ins Gehirn (roter Kasten). Hier treffen sie auf den antennalen Lobus (AL), wo sie ihr Zielgebiet suchen und dort in Glomeruli konvergieren. Zudem projizieren ORN Axone auch über die Kommissur in den kontralateralen AL, wo sie ebenfalls in ihre Zielglomeruli konvergieren.

Die einzelnen Glomeruli bestehen aus den synaptischen Verknüpfungen zwischen den Axonen der ORNs und den Dendriten der Projektionsneurone (PNs) und lokalen Interneuronen (LNs) (Stocker, 1994). Während LNs Verknüpfungen zwischen mehreren oder allen Glomeruli ausbilden (Ng et al., 2002b; Shang et al., 2007; Wilson and Laurent, 2005), innervieren PNs spezifische Glomeruli und vermitteln die olfaktorische Information weiter ins laterale Horn und die Pilzkörper (Jefferis et al., 2001; Marin et al., 2005; Wong et al., 2002).

Im Vergleich zu den ORs der Vertebraten scheinen die *Drosophila* ORs keine Funktion in der Verschaltung der ORN Axone im AL zu haben. Dobritsa et al. konnten in OR22a/OR22b Deletionsmutanten zeigen, daß die Wegfindung der ORNs von der Expression der ORs unabhängig ist (Dobritsa et al., 2003). Zudem setzt die OR Expression erst ein, wenn die Wegfindung der ORN Axone bereits abgeschlossen ist (Jefferis et al., 2004).

1.2.2.1 Axonale Konvergenz und Glomerulus-Bildung in der pupalen Entwicklung

Vor dem Einwachsen der ersten ORNs bei etwa 18h nach Bildung der Puppe (APF; after puparium formation (engl)= nach Bildung des Pupariums) haben die Dendriten der PNs bereits distinkte Bereiche im AL besetzt (Jefferis et al., 2002; Jefferis et al., 2004). Die einwachsenden ORN Axone projizieren zunächst über den AL nach dorsal und über die Kommissur in den kontralateralen AL. Hierbei bleiben sie zunächst an der Oberfläche des AL und umgeben das AL Neuropil als eine Schicht von Axonfasern (NFL = nerve fiber layer). Im Verlauf der Entwicklung sortieren sich die Axone verschiedener Klassen voneinander aus, bis bei etwa 35% der pupalen Entwicklung Axone der gleichen ORN-Klasse erste Proto-Glomeruli bilden. Hummel et al. konnten zeigen, daß dieser Schritt abhängig vom Ca^{2+} -abhängigen Adhäsionsmolekül NCADHERIN ist (Hummel and Zipursky, 2004). Der Verlust von NCAD beeinflusst nicht die Projektion der Axone in die richtige Zielregion, vielmehr ist der finale Schritt in der Glomerulus-Bildung, die axonale Konvergenz und synaptische Verknüpfung mit den PN-Dendriten, betroffen. In den PN-Dendriten führt der Verlust von *NCad* zu einem vergleichbaren Phänotyp. Die Dendriten sind zwar noch in ihrer Zielregion lokalisiert, projizieren jedoch nicht in kompakte Neuropil-Bereiche, sondern überlappen teilweise mit den Dendriten der Nachbarglomeruli (Zhu and Luo, 2004). Der *NCad*-Verlust in PNs beeinflusst jedoch nicht die Konvergenz der korrespondierenden ORN-Axone.

Die synaptische Spezifität einiger ORN-Klassen wird vom Transkriptionsfaktor ACJ6 reguliert (Komiyama et al., 2004). Komiyama et al. konnten zudem zeigen, daß die verschiedenen ORN-Klassen in einer bestimmten Hierarchie miteinander interagieren. Zusammen führen diese Ergebnisse zu einem Modell für die Entwicklung des olfaktorischen Systems, in dem ORNs und PNs sich zunächst unabhängig voneinander sortieren und grobe Glomeruli-Karten bilden, die dann mit der nachfolgenden Synaptogenese verfeinert werden (Jefferis and Hummel, 2006).

1.2.3 Zielfindung und synaptische Spezifität der ORNs

Bisher ist weitgehend ungeklärt, welche Faktoren die Spezifität der ORN Verschaltung bestimmen. Einige, der aus anderen Verschaltungsmustern bekannten Mechanismen, wurden im olfaktorischen System bereits untersucht.

In Vertebraten wurde für die Projektion der Neurone aus dem vomeronasalen Organ, das der Aufnahme von Pheromon-Signalen gilt, in den akzessorischen olfaktorischen Bulbus ebenfalls eine Funktion des SLIT-ROBO-Mechanismus beschrieben (Knoll et al., 2003). Auch im olfaktorischen System in *Drosophila* wurde die Funktion des SLIT/ROBO-Systems untersucht (Jhaveri et al., 2004). ROBO1 und ROBO2 sind in unterschiedlichen ORN-Klassen exprimiert, deren Axone in unterschiedlichen Bahnen über den AL projizieren. Der Verlust oder die Überexpression von *robo* führen zu einer Störung des Projektions- und Innervationsmuster einiger ORN-Klassen.

Als neuronales Wegfindungsmolekül für ORN Axone wurde außerdem der Rezeptor DSCAM, ein Mitglied der Ig-Superfamilie, identifiziert (Hummel et al., 2003). Durch alternatives Spleißen können über 38000 mögliche *Dscam* Isoformen generiert werden (Schmucker et al., 2000). Ob diese auch in der ORN Wegfindung und Konvergenz eine Funktion haben, ist bisher nicht geklärt. Der Verlust von *Dscam* in ORNs führt zur Bildung neuer, ektopisch lokalisierter Glomeruli entlang der ORN Projektionsbahnen im AL. Der eigentliche Ziel-Glomerulus im AL wird dennoch von einigen mutanten ORNs innerviert (Hummel et al., 2003). Schmucker et al. identifizierten DSCAM zuvor als Interaktionspartner des SH2/SH3-Adapterproteins DOCK (Schmucker et al., 2000). DOCK interagiert mit der Serin/Threonin-Kinase PAK, die an die GTPasen der Rho-Familie bindet und so eine Verknüpfung zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts darstellt. Auch der Verlust von *dock* und *Pak* wurde im olfaktorischen System untersucht (Ang et al., 2003). Hier kommt es zu deutlichen Fehlprojektionen und der Bildung ektopischer Glomeruli, die sich über den gesamten AL verteilen.

Insgesamt sind die Mechanismen, die die spezifische Verschaltung der ORNs regulieren noch weitgehend ungeklärt. Die, im Vergleich zu Vertebraten, geringere Zellzahl und die vielen Möglichkeiten zur genetischen Manipulation machen das olfaktorische System von *Drosophila* zu einem guten Modell, um die synaptische Spezifität von Neuronen und die Entwicklung komplexer neuronaler Schaltkreise zu analysieren.

1.3 Ziel der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Analyse von Genfunktionen, welche die Spezifität der synaptischen Verschaltung neuronaler Zellen im sich entwickelnden olfaktorischen System von *Drosophila* kontrollieren.

Eine groß angelegte phänotypische Mutantanalyse sollte zunächst zur Identifizierung neuer Genfunktionen führen. Eine der isolierten Mutanten (*sema-1a*) erwies sich aufgrund ihres Verlustphänotyps als vielversprechender Kandidat für einen Kontrollfaktor synaptischer Spezifität und sollte daher umfangreich charakterisiert werden.

Aufgrund seiner molekularen Diversität und seines charakteristischen axonalen Verlustphänotyps handelt es sich bei dem Transmembranmolekül DSCAM ebenfalls um einen möglichen Regulator der ORN Verschaltungsspezifität. Daher sollte die *Dscam* Funktion, vor allem mit Blick auf eine potentielle Funktion der DSCAM Diversität für die Projektion der ORN Axone, genauer analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den folgenden Firmen in der Qualität *pro-analysis* bezogen:

Aldrich (Steinheim)	Amersham (Freiberg)	Baker (Groß-Gerau)
Biomol (Hamburg)	Bioline (Luckenwalde)	Biozym (Hameln)
Fluka (Neu Ulm)	Eppendorf (Hamburg)	GIBCO/BRL (Eggenstein)
Invitrogen (Karlsruhe)	Merck (Darmstadt)	Pharmacia/LKB (Feiburg)
Roche (Mannheim)	Roth (Karlsruhe)	Sigma (Deisenhofen)

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Drosophila-Standardmedium:

- pro Liter Leitungswasser 8,5g Agar und 77g Maismehl aufkochen
- 18g Trockenhefe, 10g Sojamehl, 82g Malzextrakt und 41g Rübensirup hinzugeben
- auf 60 °C abkühlen lassen
- 4,5ml Propionsäure sowie 1/5 Eßlöffel Nipagin hinzugeben
- in Plastikgefäße abfüllen und erkalten lassen

PBS (pH 7,6)

- 130 mM NaCl
- 7 mM Na₂HPO₄
- 3 mM KH₂PO₄
- 2,7 mM KCl

PBT

- 0,1% Triton X-100 in PBS

Paraformaldehyd-Stammlösung (8%):

- 0,8 g Paraformaldehyd in 10 ml Reinstwasser geben
- Zugabe von 70 µl 1M NaOH

- ca. 30 min bei 37°C lösen
- Sterilfiltration mittels 0,2 µm Filter
- zum Fixieren von Gewebe, die Stammlösung durch Zugabe von PBS auf 2% verdünnen

2.1.3 Primäre Antikörper und interkalierende Farbstoffe

Bezeichnung/ Herkunft	Verdünnung	Quelle
α-GFP/ Kaninchen	1:1000	Molecular Probes
α-Ncad/ Ratte (DN-EX#8)	1:20	(Iwai et al., 1997); Hybridoma Bank
α-NC82/ Maus	1:20	(Stortkuhl et al., 1994)
α-β-Galaktosidase/ Maus	1:300	Molecular Probes
Toto3	1:5000	Molecular Probes
α-CD2/ Maus	1:1000	Molecular Probes
α-Connectin/ Maus	1:50	(Meadows et al., 1994)
α-Sema1a/ Kaninchen	1:1000	A. Kolodkin
α-Dscam ^{cyto} / Kaninchen	1:1000	(Hummel et al., 2003)
α-Elav/ Ratte	1:10	Hybridoma Bank

2.1.4 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Konjugation	Verdünnung	Quelle
Ziege anti-Kaninchen	Alexa 488	1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Ratte	Alexa 568	1:300	Molecular Probes
Ziege anti-Ratte	Alexa 647	1:300	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa 488	1:300	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa 568	1:300	Molecular Probes
Ziege anti-GFP	Alexa 488	1:1000	Molecular Probes
Ziege anti-HRP	Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-HRP	FITC	1:200	Dianova GmbH

2.1.5 Fliegenstämme

2.1.5.1 Stämme zur Markierung verschiedener Zelltypen des olfaktorischen Systems

Genotyp	Chromosom	Quelle
<i>C753-Gal4</i>	3.	(Yang et al., 1995)
<i>72OK-Gal4</i>	2.	(Acebes and Ferrus, 2001)
<i>con-Gal4</i>	3.	diese Arbeit
<i>con-Gal4 UAS-sytGFP</i>	3.	diese Arbeit
<i>con-Gal4 UAS-CD8GFP</i>	3.	diese Arbeit
<i>elav-Gal4</i>	3.	(Lin and Goodman, 1994)
<i>GH146-Gal4</i>	2.	(Stocker et al., 1997)
<i>GH298-Gal4</i>	3.	(Stocker et al., 1997)
<i>MT14-Gal4</i>	3.	(Tissot et al., 1997)
<i>MZ19-Gal4</i>	2.	(Ito et al., 1998; Jefferis et al., 2004)
<i>OR19a-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR21a-Gal4</i>	3.	(Scott et al., 2001)
<i>OR22a-Gal4</i>	3.	(Vosshall et al., 2000)
<i>OR23a-Gal4</i>	3.	(Vosshall et al., 2000)
<i>OR42a-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR42b-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR43a-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR43b-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR46a-Gal4</i>	3.	(Vosshall et al., 2000)
<i>OR47a-Gal4</i>	3.	(Vosshall et al., 2000)
<i>OR47b-Gal4</i>	3.	(Vosshall et al., 2000)
<i>OR49a-Gal4</i>	3.	(Fishilevich and Vosshall, 2005)
<i>OR49b-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR59c-Gal4</i>	3.	(Hummel et al., 2003)
<i>OR65a-Gal4</i>	3.	(Fishilevich and Vosshall, 2005)
<i>OR67b-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR67c-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR71c-Gal4</i>	3.	(Hummel et al., 2003)
<i>OR82a-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR83c-Gal4</i>	3.	(Couto et al., 2005)
<i>OR85e-Gal4</i>	3.	(Komiyama et al., 2004)

<i>OR88a-Gal4</i>	3.	(Komiyama et al., 2004)
<i>OR92a-Gal4</i>	3.	(Komiyama et al., 2004)
<i>Sg18.1-Gal4</i>	3.	(Jhaveri et al., 2004)
UASCD2	3.	N. Brown, Bloomington Stock Collection
UAS-mCD8GFP	3.	(Lee and Luo, 1999)
<i>UAS-sybGFP</i>	3.	(Estes et al., 2000)
<i>UAS-sytGFP</i>	3.	K. Broadie, Bloomington Stock Collection
OR22a:sybGFP	3.	(Vosshall et al., 2000)
OR47a:sytGFP	3.	(Vosshall et al., 2000)
OR46a:CD8GFP	3.	(Vosshall et al., 2000)
OR88a:CD8GFP	3.	B. Dickson
OR83c:CD8GFP	3.	B. Dickson
OR47b:sytGFP	2.	(Vosshall et al., 2000)
OR47b:sytGFP	3.	(Vosshall et al., 2000)
OR21a:sytGFP	3.	(Vosshall et al., 2000)
OR82a:CD8GFP	2.	B. Dickson
OR92a:CD8GFP	2.	B. Dickson
OR43a:CD8GFP	2.	B. Dickson
OR56a:CD8GFP	3.	B. Dickson
<i>Sp/ CyO; OR71a-Gal4 UAS-CD2</i> <i>OR46a:sytGFP/ TM6</i>	2., 3.	(Engelen, 2005)
<i>Sp/ CyO; OR22a-Gal4 UAS-CD2</i> <i>OR47a:sytGFP/ TM6</i>	2., 3.	(Engelen, 2005)
<i>Sp/ CyO; Or47b:sytGFP Or47b-</i> <i>Gal4 UAS-CD2/ TM2</i>	2., 3.	(Engelen, 2005)
<i>E132-Gal4</i>	1.	(Halder et al., 1995)
<i>E132-Gal4 UAS-sytGFP; UAS-</i> <i>CD8GFP</i>	1., 2.	Steffes, 2007

2.1.5.2 Balancer und Stämme zur klonalen Analyse

Genotyp	Quelle
<i>eyFLP</i>	(Newsome et al., 2000)
<i>eyFLP; Gla Bc hs-hid/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>eyFLP; Cyo/ Tft</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>eyFLP; FRT40A</i>	Hummel, unveröffentlicht

<i>hsFLP</i>	(Golic and Lindquist, 1989)
<i>hsFLP; Cyo/ Tft</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>N/ FM7; Cyo/ Tft</i>	(Edenfeld, 2004)
<i>eyFLP UAS-CD2; CyO/Tft</i>	Steffes, 2007
<i>eyFLP UAS-sytGFP; CyO/Tft</i>	Steffes, 2007
<i>hsFLP UAS-CD2; CyO/Tft</i>	Steffes, 2007
<i>OR22a:sybGFP FRT40A GMR-GFP</i>	diese Arbeit
<i>eyFlp; OR22a:sybGFP FRT40A GMR-GFP / CyO</i>	diese Arbeit
<i>OR21a-Gal4 OR23a-Gal4 OR46a-Gal4 OR47a-Gal4 OR47b-Gal4 UAS-sytGFP/ TM2</i>	diese Arbeit
<i>FRT40A CycE/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>FRT40A CycE/ CyO; TM2/ TM6</i>	diese Arbeit
<i>FRT40A CycE/ CyO; OR21a-Gal4 OR23a-Gal4 OR46a-Gal4 OR47a-Gal4 OR47b-Gal4 UAS-sytGFP/ TM2</i>	diese Arbeit
<i>FRT40A tubP-GAL80/CyO</i>	L. Luo, Bloomington Stock Collection
<i>FRT40A tubP-GAL80/ CyO; TM2/ TM6</i>	diese Arbeit
<i>FRT40A tubP-GAL80/ CyO; OR21a-Gal4 OR23a-Gal4 OR46a-Gal4 OR47a-Gal4 OR47b-Gal4 UAS-sytGFP/ TM2</i>	diese Arbeit
<i>PCNA FRT42D/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>PCNA FRT42D / CyO; TM2/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>tubP-GAL80 FRT42D/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>tubP-GAL80 FRT42D/ CyO; TM2/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht
Zur Analyse einzelner ORN-Klassen im <i>Minute</i> Hintergrund wurden folgende Stämme etabliert:	
<i>FRT40A CycE/ CyO; OR-Gal4 UAS-sytGFP/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht; diese Arbeit
<i>PCNA FRT42D/ CyO; OR-Gal4 UAS-sytGFP/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht; diese Arbeit
<i>FRT40A CycE/ CyO; OR71a-Gal4 UAS-CD2 OR46a:sytGFP/ TM6</i>	diese Arbeit
<i>PCNA FRT42D / CyO; OR71a-Gal4 UAS-CD2 OR46a:sytGFP/ TM6</i>	diese Arbeit
<i>FRT40A CycE/ CyO; OR88a-Gal4 UAS-CD2 OR47b:sytGFP/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>PCNA FRT42D / CyO; OR88a-Gal4 UAS-CD2 OR47b:sytGFP/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht

Zur Analyse einzelner ORN-Klassen in MARCM-Klonen wurden folgende Stämme etabliert:	
<i>FRT40A CycE/ CyO; OR-Gal4 UAS-sytGFP/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht; diese Arbeit
<i>PCNA FRT42D/ CyO; OR-Gal4 UAS-sytGFP/ TM6</i>	Hummel, unveröffentlicht; diese Arbeit

2.1.5.3 Rekombinante *Dscam*-Chromosomen und Stämme zur Analyse der *Dscam* Funktion

<i>FRT42 Dscam²¹</i>	(Hummel et al., 2003)
<i>FRT42 Dscam²³</i>	(Hummel et al., 2003)
<i>FRT42 Dscam³³</i>	(Hummel et al., 2003)
<i>FRT42 Dscam⁴⁷</i>	(Zhan et al., 2004)
<i>FRT42 Dscam²⁴</i>	(Zhan et al., 2004)
<i>eyFLP; FRT42 Dscam²¹ Gal80</i>	B. Göllner
<i>eyFLP; FRT42 Dscam²³ Gal80</i>	B. Göllner
<i>eyFLP; FRT42 Dscam³³ Gal80</i>	B. Göllner
<i>eyFlp; FRT42 Dscam²¹ Or22a:sytGFP/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>eyFlp; FRT42 Dscam²¹ Or46a:sytGFP/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>eyFlp; FRT42 Dscam²¹ Or47a:sytGFP/ CyO</i>	(Engelen, 2005)
<i>eyFlp; FRT42 Dscam²¹ Or21a:sytGFP/ CyO</i>	(Engelen, 2005)
<i>eyFLP; FRT42 Dscam²¹ MZ19-Gal4/ CyO</i>	(Engelen, 2005)
<i>eyFLP; FRT42 Dscam²³ MZ19-Gal4/ CyO</i>	(Engelen, 2005)
<i>eyFLP; FRT42 Dscam³³ MZ19-Gal4/ CyO</i>	(Engelen, 2005)
<i>eyFLP; FRT42 Dscam²¹ GH146-Gal4/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>eyFLP; FRT42 Dscam²³ GH146-Gal4/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>eyFLP; FRT42 Dscam³³ GH146-Gal4/ CyO</i>	Hummel, unveröffentlicht
<i>UAS-Dscam[exon 17.1]-GFP</i>	(Wang et al., 2004)
<i>UAS-Dscam[exon 17.2]-GFP</i>	(Wang et al., 2004)
<i>DscamΔP4.1-4.3</i>	(Wang et al., 2004)
<i>Dscam ΔP4.3-4.7</i>	(Wang et al., 2004)
<i>Dscam ΔP4.1-4.12</i>	(Wang et al., 2004)

2.1.5.4 Rekombinante *sema1a*-Chromosomen und Stämme zur Analyse der *sema1a* Funktion

<i>sema1a</i> ^{P1}	(Kolodkin et al., 1993; Yu et al., 1998)
<i>sema1a</i> ^{P2}	(Kolodkin et al., 1993; Yu et al., 1998)
<i>sema1a</i> ^{P1} <i>FRT40</i>	(Lattemann et al., 2007)
<i>sema1a</i> ^{P1} <i>FRT40</i>	(Lattemann et al., 2007)
<i>sema</i> ^{V2-013} <i>FRT40 Gal80</i>	(Lattemann et al., 2007)
<i>sema</i> ^{V2-013} <i>FRT40 MZ19-Gal4</i>	(Lattemann et al., 2007)
<i>sema</i> ^{V2-013} <i>FRT40 OR21a:sytGFP</i>	(Lattemann et al., 2007)
<i>sema</i> ^{V2-013} <i>FRT40 OR47b:sytGFP</i>	(Lattemann et al., 2007)
<i>UAS-sema1a</i>	(Godenschwege et al., 2002)
<i>UAS-sema1a</i> ^{EC}	(Godenschwege et al., 2002)
<i>UAS-sema1a</i> ^C	(Godenschwege et al., 2002)
<i>UAS-plexinA</i>	(Godenschwege et al., 2002)

2.2 Genetische und histologische Methoden

2.2.1 Fliegenzucht

Alle Fliegenstämme wurden auf *Drosophila*-Standardmedium (siehe Abschnitt 2.1.2.) in Plastikgefäßen bei 25°C oder 18°C gehalten. Für Kreuzungen wurden jeweils frisch geschlüpfte, jungfräuliche Weibchen (0-4h nach Verlassen des Pupariums) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.2.2 Präparation von Gehirnen und Antennen

2.2.2.1 Adulte Gehirne

Fliegen mit dem zu analysierenden Genotyp werden zunächst mit CO₂ betäubt und anschließend in Ethanol getötet. Das Ethanol wird nach einer Minute durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Zum Präparieren werden einzelne Fliegen mit einer Pinzette auf eine Präparierplatte aus Silikon überführt und mit PBS überschichtet.

Um das Gehirn freizulegen wird erst die Proboscis entfernt und dann, ausgehend von der entstandenen Öffnung, die Kutikula entfernt. Das nun freiliegende Gehirn wird von Tracheen befreit und vom Rest des Körpers abgetrennt.

2.2.2.2 Pupale Gehirne und Antennen

Um das jeweilige pupale Entwicklungsstadium zu bestimmen wird die Position sich verpuppende Larven an der Gefäßwand markiert. Die so markierten Puppen werden dann im zu untersuchenden Entwicklungsstadium aus dem Gefäß entfernt und auf einem Streifen dopellseitigem Klebeband auf der Präparierplatte fixiert. Mit Hilfe von Pinzetten wird dann zunächst das Operculum entfernt und das Puparium längsseitig aufgeschlitzt. Die so freigelegte Puppe wird auf einen neuen Streifen dopellseitigen Klebeband überführt und mit 2% PFA überschichtet und 10 Minuten vorfixiert. Die sich entwickelnde Kopf-Kutikula wird mit Pinzetten geöffnet und das darunter liegende pupale Gehirn freipräpariert.

Zur Präparation von pupalen Antennen werden Puppen bei 30-50h APF verwendet. Hier wird der gesamte anteriore Teil der sich entwickelnden Kopfkapsel, in dem die Antennen liegen, abgetrennt. Die Antennen werden erst nach Fixierung und Antikörperfärbung freipräpariert.

2.2.3 Fixierung von Gewebe

- Überführen des freipräparierten Gewebes in ein Mikroreaktionsgefäß mit 2% PFA
- Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumler
- Abnehmen der Fixierlösung
- 3 x 15 Minuten mit PBT waschen

2.2.4 Antikörperfärbung

- Inkubation mit 10% Ziegen Serum in PBT für eine Stunde
- Inkubation mit primären Antikörpern in 10% Ziegen Serum (in PBT) bei 4°C über Nacht
- Abnehmen der Antikörperlösung
- 3 x 15 Minuten waschen in PBT
- Inkubation mit sekundärem Antikörper in 10% Ziegen Serum (in PBT) für drei Stunden bei Raumtemperatur
- 3 x 15 Minuten waschen in PBT
- Aufbewahrung bei 4 °C

2.2.5 EMS-Mutagenese zur Isolierung zweitchromosomaler Mutationen

Für die Mutagenese werden 3-4 Tage alte, isogenisierte Männchen mit dem Genotyp *GMR-GFP FRT40 OR22a:sybGFP* (homozygot) gesammelt. Diese werden über Nacht in leeren Aufzucht-Röhrchen gehalten und anschließend einer 25mM EMS-Lösung (Ethylmethansulfonat) ausgesetzt. Je 50 der so mutagenisierten Männchen werden mit ca. 200 Jungfrauen des Genotyps *eyFLP; Gla Bc hs-hid/CyO*; „en masse“ verkreuzt und diese Kreuzung zweimal im Abstand von je einem Tag auf neues Futtermedium umgesetzt. Aus

der F1-Generation werden dann *eyFLP; GMR-GFP FRT40* OR22a:sybGFP/CyO*-Männchen (Träger des mutagenisierten Chromosoms) gesammelt und einzeln gegen *eyFLP; Gla Bc hs-hid/CyO*-Jungfrauen gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen werden dann auf das Vorhandensein des Balancers *CyO* hin selektioniert und zur Etablierung des einzelnen mutagenisierten Chromosoms miteinander verkreuzt (siehe auch Kapitel 3.1.1.3 und Abb. 6).

2.2.6 Zytologische Kartierung letaler Mutationen

Eine erste grobe Bestimmung der Lokalisation letaler Loci erfolgte durch Komplementationsanalysen mit verschiedenen chromosomalen Defizienzen. Hierzu wurde eine Kollektion von Defizienzen aus dem Bloomington Stock Center verwendet, die insgesamt ein Minimum von 94,8% des Chromosomenarms 2L abdecken.

Zur Komplementationsanalyse wurden ca. zehn Jungfrauen mit der zu kartierenden Mutation mit jeweils 2-3 Männchen verkreuzt, die eine Defizienz tragen. Die nachkommende F1-Generation wurde auf Tiere hin untersucht, die Mutation und Defizienz in *trans* tragen. Kommt dieser Genotyp nicht vor, so kann die letale Mutation dem von der Defizienz betroffenen zytologischen Bereich zugeordnet werden.

Im Anschluß wird durch Komplementationsanalysen mit immer kleineren chromosomalen Defizienzen die zytologische Region weiter eingegrenzt.

2.2.7 Generierung von Gal4-Aktivatorlinien durch P-Element-Konversion

Um aus einer spezifischen Enhancer-Trap Linie wie z.B. *rF400*, die eine *P[lacZ, ry⁺]* Insertion trägt, eine Gal4-Linie zu generieren muß die *P[lacZ, ry⁺]* Insertion durch eine *P[Gal4, w⁺]* Insertion ausgetauscht werden. Der gerichtete Austausch der beiden P-Element Insertionen erfolgt nach dem Protokoll von Sepp und Auld (1999).

Zunächst werden Fliegenstämme etabliert, die eine x-chromosomale *P[Gal4, w⁺]* Insertion, sowie den *lacZ*-Enhancer-Trap tragen. Jungfrauen dieses Stamms werden „en masse“ mit Männchen verkreuzt, die auf dem 3. Chromosom die $\Delta 2-3$ Transposase tragen (Genotyp: *Sp/CyO; Sb $\Delta 2-3$ TM3/Df(3R)*). Einzelne Jungfrauen aus der F1-Generation, die den Genotyp *P[GAL4, w⁺]/+; rF400/CyO; Sb $\Delta 2-3$ TM3/+* haben, werden dann gegen Doppelbalancer-Männchen mit dem Genotyp *Bl/ CyO; TM2/ TM6* gekreuzt. Aus den Nachkommen dieser Kreuzung werden dann Jungfrauen ohne die drittchromosomale Transposase gesammelt und erneut mit Doppelbalancer-Männchen verkreuzt.

Die hieraus resultierenden *w⁺* Männchen werden verwendet um neue Fliegenstämme zu etablieren, die dann auf das richtige P-Element Konversionsereignis hin untersucht werden. Im Fall der hier durchgeführten Konversion der *rF400-[lacZ, ry⁺]* Insertion in eine *connectin*-Gal4 Linie wurde die Expression in einer Kreuzung gegen Tiere, die eine *UAS-mCD8GFP*

Insertion tragen, und einer Antikörperfärbung mit α -Connectin bestätigt. Die Daten zur *con-Gal4* Expression im AL sind im Anhang aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Systematische Mutantenanalyse

Da bisher wenige Gene beschrieben wurden, die an der Kontrolle der Entwicklung axonaler Konvergenz der ORNs im olfaktorischen System beteiligt sind, bieten sich zwei Möglichkeiten, um weitere Erkenntnisse über diesen Entwicklungsprozeß zu gewinnen. Zum einen können sogenannte „Kandidaten“-Gene, d.h. Gene, deren Funktion für Wegfindungs- und Verschaltungs- Prozesse anderer Neurone bereits beschrieben wurde oder bekannte Genfunktionen aus Vertebraten, auf eine ähnliche Funktion im olfaktorischen System untersucht werden (Lattemann, 2004).

Eine andere Möglichkeit ist die zufällige Generierung neuer Mutationen und eine anschließende Analyse eines möglichen Einflusses auf das neuronale Verschaltungsmuster. Der Vorteil einer systematischen Mutantenanalyse ist, daß auch Gene identifiziert werden können, für die bisher keine Funktion im Aufbau neuronaler Verschaltung beschrieben wurde. Bei einer groß angelegten phänotypischen Mutantenanalyse können so theoretisch alle für den untersuchten Prozeß wichtigen Gene identifiziert werden. Die Markierung des zu analysierenden Verschaltungsmusters ist hierbei besonders wichtig.

Die im Folgenden beschriebene, systematische Mutantenanalyse in genetischen Mosaiken diente der histologischen Identifizierung von Verschaltungsdefekten sensorischer Neurone im AL.

3.1.1.1 Generierung homozygot mutanter ORNs durch mitotische Rekombination

Um phänotypisch Genfunktionen zu identifizieren, die direkt in den ORN-Axonon ihre korrekte Wegfindung und Verschaltung kontrollieren, ist es notwendig, einen indirekten Einfluß auf die sensorische Verschaltung durch morphologische Veränderungen im Zielgebiet auszuschließen.

Um die zu untersuchenden Genfunktionen selektiv in den einwachsenden ORN-Axonon auszuschalten, wurde das FRT-FLP-System genutzt (Xu and Rubin, 1993). Durch die Wahl einer Flipase-Quelle unter der Kontrolle des *eye/less*-Promotors ist es möglich, genetische Mosaik in der Augen-Antennen-Imaginalscheibe (AAS) zu induzieren. Auf diese Weise werden die ORN-Vorläufer homozygot mutant für die zu untersuchende Mutation. Das ZNS-Zielgebiet der ORNs bleibt hingegen heterozygot. Alle beobachteten Verschaltungsdefekte von ORN-Axonon sind daher auf einen Verlust der Genfunktion innerhalb der ORNs

zurückzuführen. Auf diese Weise können folglich homozygot mutante Bereiche in adultem Gewebe untersucht werden. Zudem kann eine mögliche frühe Letalität der Mutation umgangen werden.

Um einen deutlich ausgeprägten mutanten Phänotyp zu bekommen, wurden die Anzahl der homozygot mutanten ORNs durch Gegenselektion mit einer Zell-letalen Mutation erhöht. Eine *Minute* Mutation (*CycE*) wird hierzu auf das wildtypische Gegenchromosom gebracht, um den homozygot mutanten Zellen einen Wachstumsvorteil vor den wildtypischen und heterozygoten Zellen zu ermöglichen. In Abb. 3 ist die Generierung von Mosaik-Klonen schematisch zusammengefaßt.

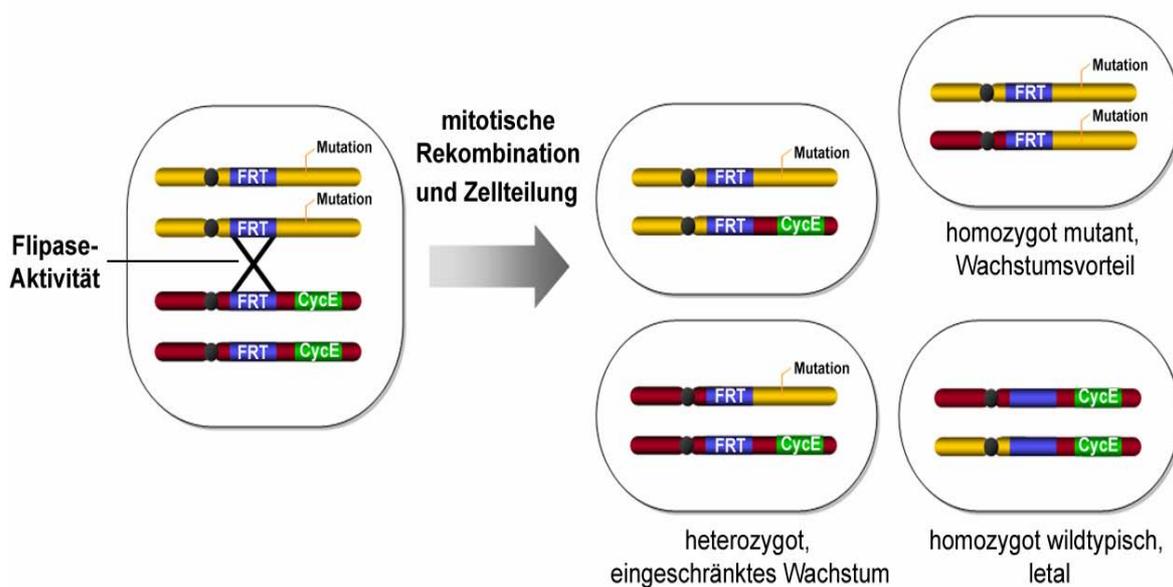


Abb. 3: Erzeugung homozygot mutanter Bereiche im Mosaik-Gewebe.

3.1.1.2 Visualisierung der synaptischen Spezifität

Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, daß sich der Verlust einer Genfunktion auf das Projektionsverhalten verschiedener ORN-Klassen durchaus unterschiedlich auswirken kann (Komiyama et al., 2004). Verschiedene ORN-Klassen besitzen bestimmte Eigenschaften, die sie von anderen unterscheiden. Neben der charakteristischen Expression bestimmter ORs in einzelnen ORNs projizieren die ORNs aus einem von drei möglichen Sensillentypen, stammen entweder aus Antenne oder Maxillarpalpus und die Zielglomeruli innerhalb des AL sind in bestimmten Bereichen lokalisiert. Zudem gibt es auch ORN-Klassen, die eine rein ipsilaterale Projektion im Gehirn zeigen.

Für die phänotypische Mutantanalyse sollte daher ein Marker generiert werden, der möglichst viele dieser unterschiedlichen ORN-Eigenschaften darstellen kann, um so auch Gene mit einer ORN Klassen-spezifischen Funktion zu identifizieren.

3.1.1.2.1 Generierung eines Markers zur Darstellung multipler ORN-Klassen

Zunächst wurden einige besonders charakteristische ORN-Klassen ausgewählt, die in einfach identifizierbare Glomeruli, sogenannte ‚Landmark-Glomeruli‘, projizieren (Tabelle 1).

Tabelle 1: In der Mutantanalyse untersuchte ORN-Klassen und ihre Zielglomeruli.

ORN-Klasse	Glomerulus	Sensillentyp	olfaktorisches Organ
ORN21a	V	ab1	Antenne
ORN22a	DM2	ab3	Antenne
ORN23a	DA3	at2	Antenne
ORN46a	VA7m, VA7l	pb2	Maxillarpalpus
ORN47a	DM3	ab5	Antenne
ORN47b	VA1v	at4	Antenne

Die ausgewählten ORN-Klassen stammen aus unterschiedlichen Sensillen und projizieren in fünf Glomeruli, die im gesamten AL verteilt liegen. Die Abstände der Glomeruli zueinander sind so groß, daß Fehlprojektionen und ektopische Strukturen deutlich zu erkennen sein sollten.

Die ORN-Klassen 22a und 47a liegen beide im dorso-medialen AL. Während der ORN22a Glomerulus die mediale Abgrenzung zur Mittellinie des Gehirns im posterioren AL bildet, liegt der ORN47a Glomerulus weiter anterior auf Höhe der Kommissur. Mit der Klasse ORN23a wurde ein Glomerulus ausgewählt, der im dorso-anterioren Lobus liegt. Während die meisten Glomeruli im AL eine eher kugelige Form haben ist der ORN47b Glomerulus mit seiner Halbmond-ähnlichen Form besonders auffällig. ORN46a repräsentiert einen Vertreter der maxillaren ORN-Klassen. Im Vergleich zum direkten Projektionsweg antennaler ORNs in den AL, durchqueren die maxillaren ORNs durch den maxillaren Nerv zunächst das primäre Verarbeitungszentrum für gustatorische Informationen, das SOG. Erst dann treffen sie auf Höhe des V-Glomerulus auf den AL. Die antennale Klasse ORN21a innerviert den V-Glomerulus, der die posterior-ventrale Grenze des AL bildet. Zudem zeigen ORN21a Axone keine kontralaterale Projektion. Im Gegensatz dazu senden ORNs der anderen Klassen Axone über die Kommissur in den kontralateralen AL, wo sie ebenfalls ihren Zielglomerulus innervieren.

Die verschiedene OR-Gal4 Linien der ausgewählten ORN-Klassen wurden zusammen mit dem Konstrukt *UAS-synaptotagminGFP* auf ein Chromosom rekombiniert. Auf diese Weise ist es möglich, die synaptischen Bereiche multipler ORN-Klassen im AL gleichzeitig darzustellen. Im Folgenden wird dieses Marker-Chromosom als MM1-Marker (multi-Marker 1) bezeichnet. Zur Markierung der Klasse ORN22a wurde eine direkte Fusion von *synaptobrevinGFP* an den Promotor des Rezeptorgens *OR22a* verwendet. Diese ORN22a-

Fusion wurde auf das zu mutagenisierende FRT-Chromosom gebracht. Abbildung 4 zeigt das Projektionsmuster der markierten ORN-Klassen im Wildtyp.

3.1.1.2.2 Darstellung der kontralateralen Projektion

Um die kontralaterale Projektion der ORNs sichtbar zu machen, wurde den zu analysierenden Tieren unilateral das 3. Antennensegment mit einer Pinzette abgetrennt. Nachdem der antennale Nerv auf dieser Seite degeneriert ist, bleibt nur noch die Projektion der ORNs aus dem anderen Nerv übrig. Sollten Mutationen zu einer Beeinträchtigung der kontralateralen Projektion führen, so sollte dies nun im deantennisierten AL sichtbar werden. Abbildung 5 zeigt das Innervationsmuster der analysierten ORNs im Wildtyp, nachdem der rechte antennale Nerv entfernt wurde. Es zeigt sich deutlich, daß die Innervation des V-Glomerulus im rechten AL fehlt.

3.1.1.3 EMS-Mutagenese und Etablierung letaler, zweitchromosomaler Mutationen

Mutagenisierte Männchen mit dem Genotyp *GMR-GFP * FRT40 OR22a:sybGFP* wurden mit Jungfrauen des Genotyps *eyFLP; Gla Bc hs-hid/CyO*; „en masse“ verkreuzt. Aus der F1-Generation wurden dann *eyFLP; GMR-GFP * FRT40 OR22a:sybGFP/CyO*-Männchen gesammelt und einzeln gegen *eyFLP; Gla Bc hs-hid/CyO*-Jungfrauen gekreuzt. Aus diesen Einzelkreuzungen wurden, entweder über einen Hitzeschock oder durch Selektion auf Tiere mit dem Balancer *CyO*, einzelne mutagenisierte Chromosomen etabliert.

Da die Mutation *Gla* mit der Inversion *In(2LR)Gla* assoziiert ist, kann sie auch als Balancer für den linken Arm des zweiten Chromosoms verwendet werden (Lindsley and Zimm, 1992). So wurden einige Mutationen auch über das *Gla*-Chromosom etabliert.

Letale Mutationen bieten die Möglichkeit, das betroffene Gen durch einfache Komplementationsanalysen zu kartieren.

Die einzelnen Etablierungsschritte zur Generierung der in der Mutantenanalyse phänotypisch untersuchten Fliegenstämme sind in Abb. 6 nochmals zusammengefaßt.

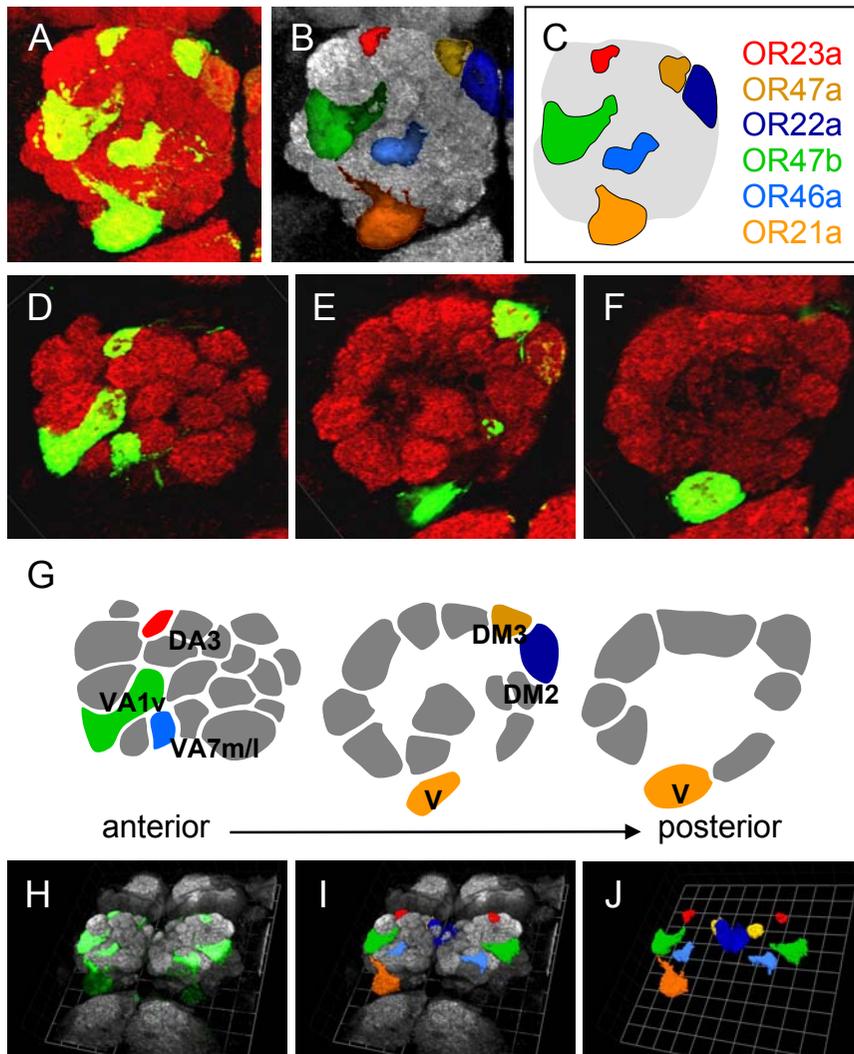


Abb. 4: Innervationsmuster des ORN-Markers MM1 im Wildtyp. In (A) ist eine Projektion des GFP-Signal der im MM1 markierten ORN-Klassen in *Minute*-Klonen dargestellt. Die markierten ORN-Klassen sind in (B) und (C) in einem Farbcode aufgeschlüsselt. (D-F) sind einzelne Schnittebenen durch die anterior-posteriore Achse. Das Modell in (G) zeigt diese Schnittebenen nochmals mit dem bereits verwendeten Farbcode. Hier sind die von den jeweiligen ORN-Klassen innervierten Glomeruli beschriftet. (H) zeigt eine 3D-Rekonstruktion der GFP-Expression im MM1-Marker. In (I) und (J) sind die verschiedenen Glomeruli im Farbcode aufgeschlüsselt. Die 3D-Rekonstruktionen zeigen die räumliche Orientierung der markierten ORN Klassen zueinander. Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40* GMR-GFP/ CycE FRT40; MM1/+*. Die hier gezeigten AL wurden mit α -GFP (grün) und α -Ncad (rot) gefärbt.

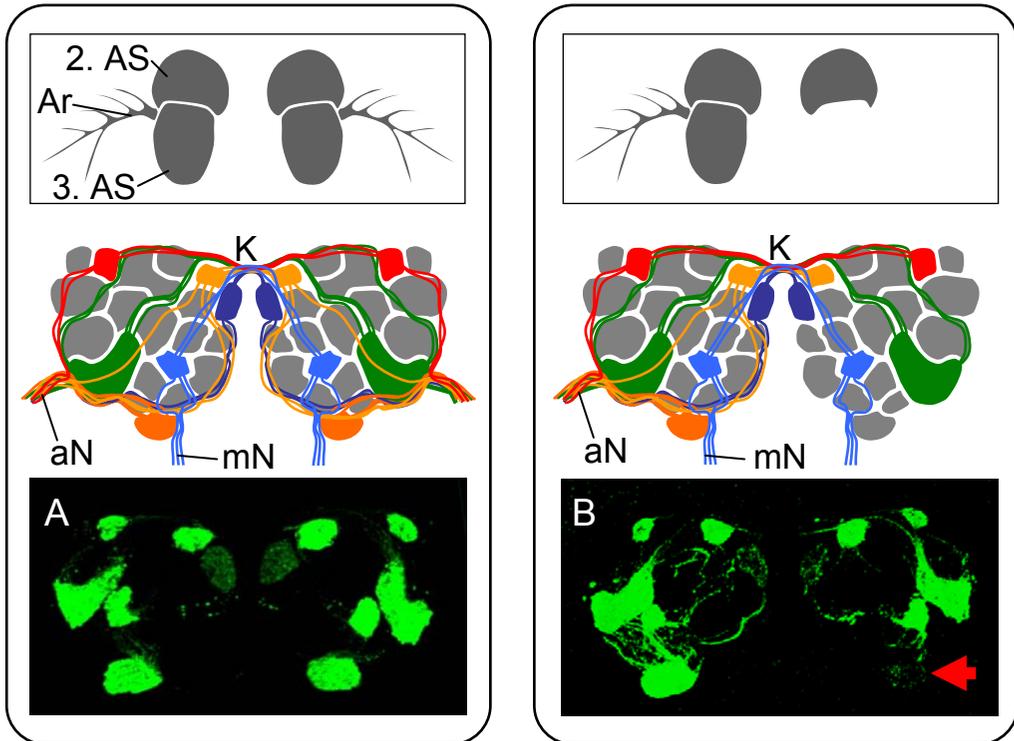


Abb. 5: Darstellung der kontralateralen Projektion. Um die kontralaterale Projektion einzelner ORN-Klassen sichtbar zu machen wurde das 3. Antennensegment der rechten Antenne entfernt. Nach ca. 5 Tagen ist der antennale Nerv (aN) degeneriert. Die Glomeruli im rechten AL werden nun nur noch durch die kontralateral projizierenden Axone der ORN-Klassen innerviert. Da die Klasse ORN21a keine kontralaterale Projektion hat, fehlt die Innervation des V-Glomerulus im rechten AL (roter Pfeil in B). (A) und (B) zeigen jeweils eine Projektion von konfokalen Schnitten. Genotyp: *eyFLP; FRT40/ CycE FRT40; MM1/+*; Antikörperfärbung: α -GFP (grün). Abkürzungen: AS (Antennensegment), Ar (Arista), K (Kommissur), aN (antennaler Nerv), mN (maxillarer Nerv).

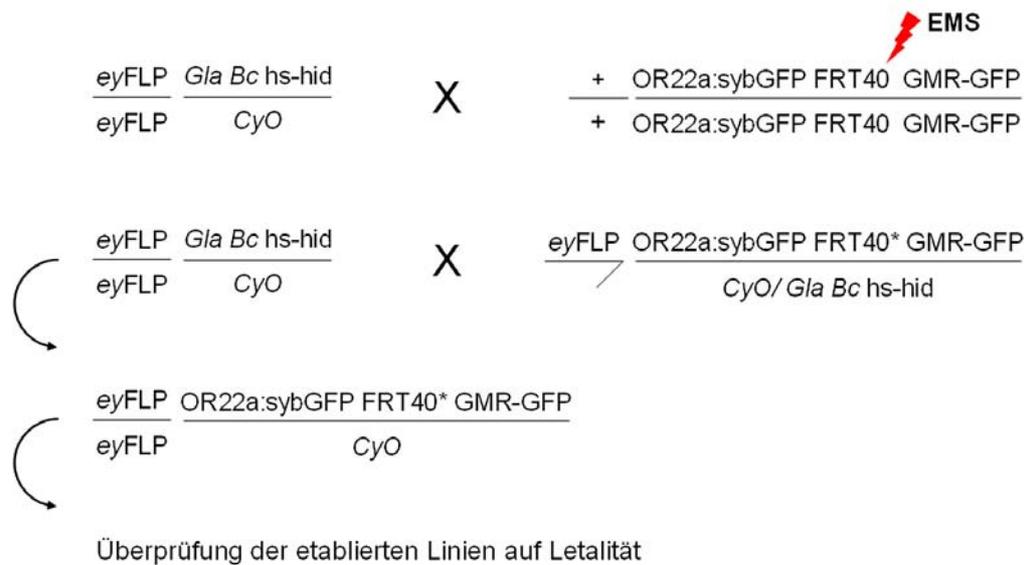


Abb. 6: Etablierung homozygot letaler Mutationen.

Insgesamt wurden 51 Ansätze mit EMS behandelt. Aus 5564 Einzelkreuzungen von Männchen der F1-Generation mit dem Balancer *eyFLP; Gla Bc hs-hid/CyO* konnten insgesamt 4135 homozygot letale Mutationen etabliert werden. Dies entspricht einer Letalitätsrate von 75%. Vitale Mutationen wurden verworfen.

3.1.1.4 Durchführung der systematischen phänotypischen Analyse

Je drei bis vier Männchen aus den etablierten Linien wurden mit Jungfrauen der MM1-Marker-Linie verkreuzt. Aus der F1-Generation wurden dann Weibchen gesammelt, die auf dem 2. Chromosom sowohl das mutagenisierte FRT-Chromosom, als auch das *Minute-FRT*-Chromosom und zudem den MM1-Marker auf dem 3. Chromosom trugen (siehe auch Kreuzungsschema in Abbildung 7).

Den gesammelten Weibchen wurde das 3. Antennensegment auf der rechten Seite entfernt und nach ca. 5 Tagen wurden die Gehirne präpariert und auf einen mutanten Phänotyp hin untersucht.

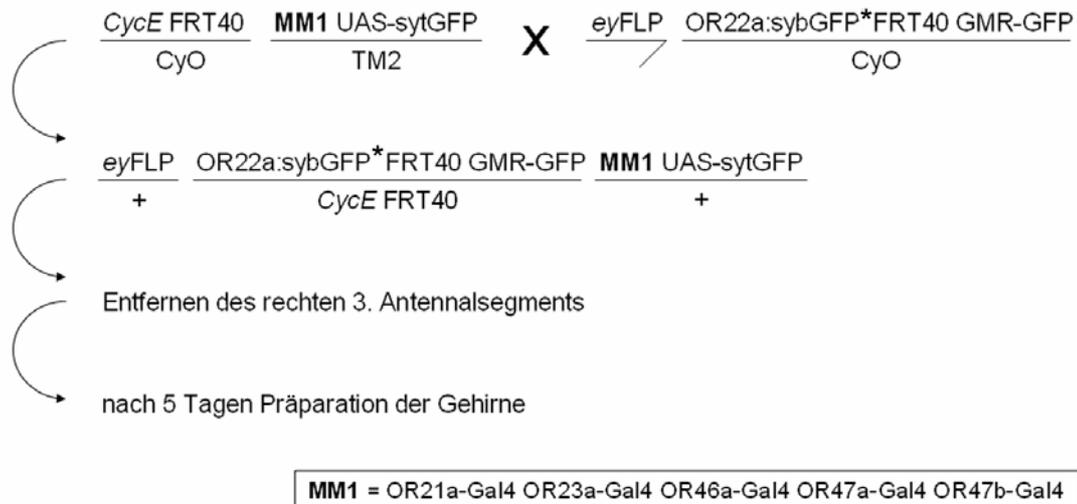


Abb. 7: Kreuzungsschema zur Durchführung der phänotypischen Mutantanalyse.

In Zusammenarbeit mit Britta Kuhlmann und Claus Schulte wurden so 1828 letale Mutationen untersucht.

3.1.1.5 Identifizierung mutanter Phänotypen

Der mutante Phänotyp einer Mutation wurde zunächst durch eine unabhängige zweite Analyse bestätigt. Hierzu erfolgte nach der Präparation eine Fixierung der Gehirne sowie einer Antikörperfärbung. Die Mutationen, die in *Minute*-Klonen zu offensichtlichen, morphologischen Defekten in den peripheren Organen führen, wurden verworfen. Mutationen, die z.B. in Homozygose zu einer Reduktion des 3. Antennalsegments führen, zeigen meist auch eine Reduktion des GFP-Signals im antennalen Lobus (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen von Axonen der verschiedenen markierten ORN-Klassen ist hier wahrscheinlich eher auf den Verlust der ORN-Zellkörper im reduzierten Organ zurückzuführen und nicht auf eine Fehlprojektion und den Verlust der synaptischen Spezifität.

Unter den 1828 analysierten Mutationen konnten 110 Mutationen gefunden werden, die einen mutanten Phänotyp im olfaktorischen System zeigten, der nicht auf eine offensichtliche morphologische Veränderung der peripheren Organe zurückzuführen ist.

3.1.1.6 Phänotypische Klassifizierung

Insgesamt lassen sich die beobachteten Phänotypen in der ORN Projektion in drei phänotypische Gruppen aufteilen. Zum einen die Mutationen, in denen eine Reduktion des ORN-Projektionsmuster beobachtet werden kann. Desweiteren solche Mutationen, die zu

einer Fehlprojektion von ORNs in ektopische Regionen des AL führen. In die dritte phänotypische Gruppe zählen Mutationen, in denen eine Veränderung der synaptischen Bereiche zu beobachten ist. Diese Gruppen werden im Folgenden weiter klassifiziert. In den Abbildungen 8 und 9 ist hierzu eine Übersicht mit Beispielen gezeigt (siehe auch Tabelle 2).

In die Gruppe „*Reduktion der ORN-Projektion*“ zählen zwei phänotypischen Klassen. Die Klassifizierung „*Verlust synaptischer Markierungen*“ faßt Mutationen zusammen, die eine drastische Reduktion des sytGFP-Signals im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Hierbei kommt es zum kompletten Verlust der Markierung eines oder mehrerer Glomeruli. Im Vergleich dazu stehen die Mutationen, die zu einer *unvollständigen Innervation* eines oder mehrere Glomeruli führen. Die Glomeruli der markierten ORN-Klassen lassen sich hier zwar eindeutig identifizieren, werden jedoch nicht im gleichen Maß innerviert, wie im Wildtyp.

Zur Gruppe „*Defekte in der Glomerulus Bildung*“ werden zum einen Mutationen gezählt, die in der klonalen Analyse eine auffällige Veränderung in der *Form und Struktur eines Glomerulus* zeigen. Die mutanten ORN-Axone projizieren zwar noch in die korrekte Zielregion im AL, konvergieren jedoch nicht mehr in einen Glomerulus mit der für die ORN-Klasse charakteristischen Form. Der bereits beschriebene charakteristische *NCad-Phänotyp* entsteht durch den Verlust der Konvergenz von ORN-Axone (Hummel and Zipursky, 2004). Die einwachsenden ORN-Axone finden zwar ihr Zielgebiet, bilden jedoch keinen kompakten Glomerulus mehr aus. Insgesamt sehen die Glomeruli zur Kommissur hin „verschmiert“ aus.

Die zweitgrößte phänotypische Gruppe umfaßt verschiedene Arten von Projektionen in ektopische AL-Regionen. Hierzu zählen zum einen *Fehlprojektion von ORN-Axonen*, bei denen vereinzelt Axone in ektopischen Regionen des AL zu sehen sind. Hier ist häufig das SytGFP-Signal in den ektopisch projizierenden Axonen zu finden. Zum anderen gehört in diese Gruppe eine weitere Form der Fehlprojektion von ORN-Axonen. In einigen Mutanten kommt es zur Bildung von *ektopischen glomerulären Strukturen*. Hierbei sind nicht nur einzelne Axone in ektopischen Bereichen verteilt, es kommt vielmehr zur Konvergenz in kompakte glomeruläre Strukturen.

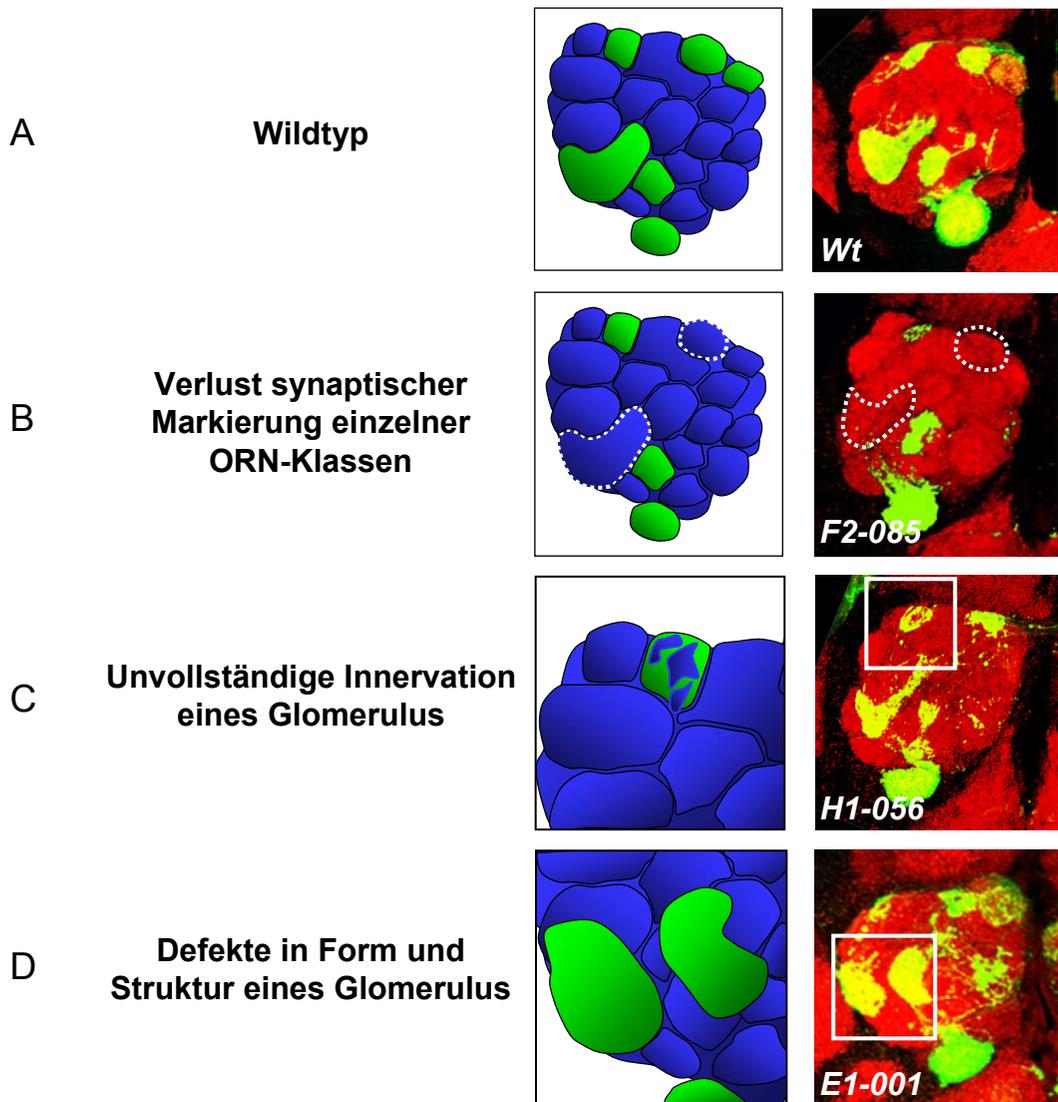


Abb. 8: Übersicht zur phänotypischen Klassifizierung I. Reihe (A) zeigt das wildtypische Projektionsmuster der ORN-Klassen des MM1-Markers. In Reihe (B) ist ein Beispiel für eine Mutante gezeigt, die zum Verlust der synaptischen Markierung der ORN-Klassen ORN47b und ORN47a (gestrichelte Linien in Abbildung und Modell) führt. Ein Beispiel für einen unvollständig innervierten Glomerulus ist in Reihe (C) gezeigt. Der von ORN23a innervierte Glomerulus zeigt deutlich Bereiche, in denen keine sytGFP Markierung zu sehen ist. Das Modell zeigt den in der Abbildung eingerahmten Ausschnitt. In Reihe (D) ist ein Beispiel für eine Mutation gezeigt, die zu einer abgerundeten Form des ORN47b Glomerulus und einem stark vergrößerten ORN46a Glomerulus führt. Alle Abbildungen zeigen Antikörperfärbungen mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün).

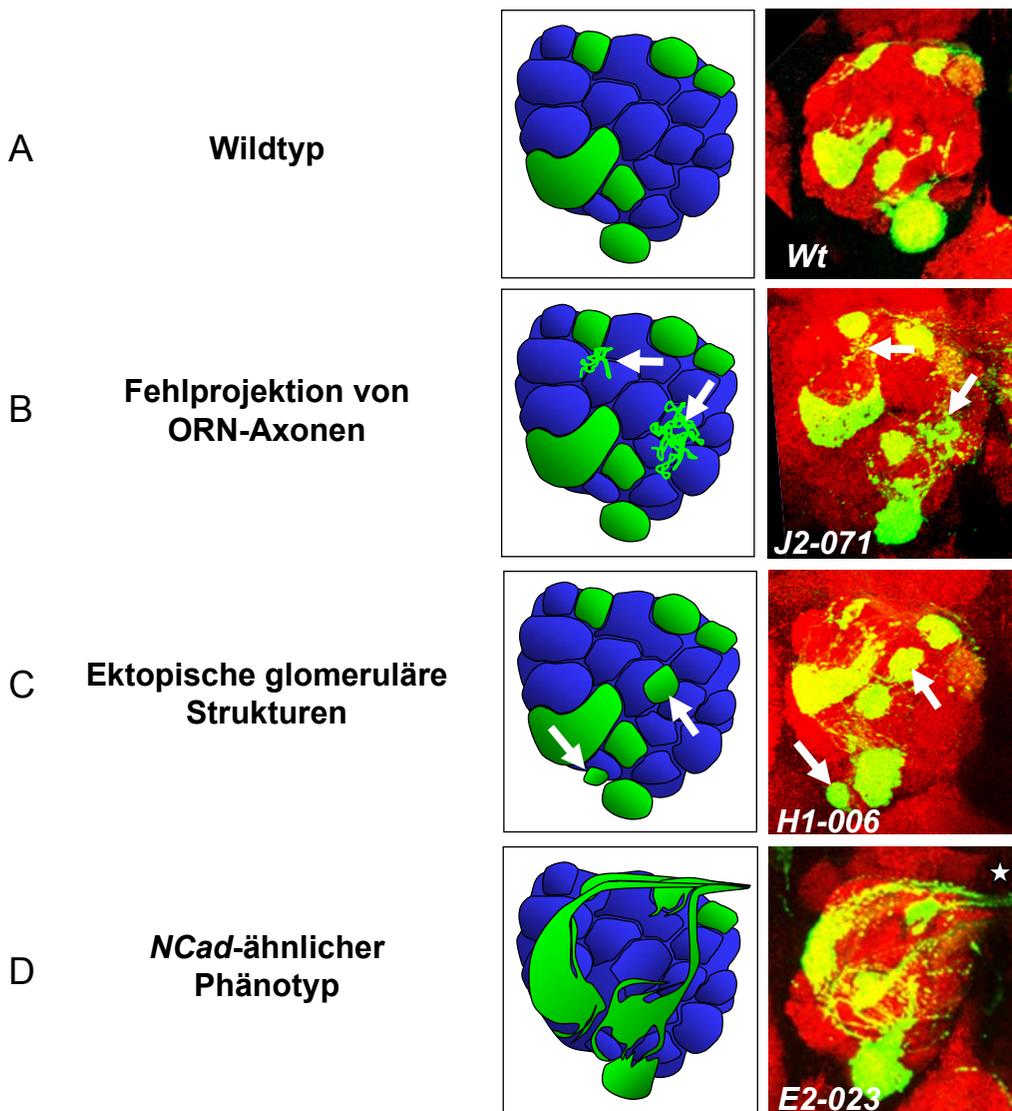


Abb. 9: Übersicht zur phänotypischen Klassifizierung II. Reihe (A) zeigt den Wildtyp. In Reihe (B) ist ein Beispiel für eine Fehlprojektion dargestellt. Die Pfeile deuten hier auf innervierte Bereiche im AL die im Wildtyp keine synaptische Markierung zeigen. In Reihe (C) weisen die Pfeile auf kompakte, ektopische Strukturen hin. Reihe (D) zeigt ein Beispiel für den charakteristischen Phänotyp, der durch den Verlust von *NCad* bedingt wird. Die markierten Glomeruli wirken zur Kommissur hin (Sternchen) „verschmiert“ und haben eine langgezogene Form. Alle Abbildungen zeigen Antikörperfärbungen mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün).

Tab. 2: Phänotypische Klassifizierung der Mutanten.

Gruppe	phänotypische Klasse
Reduktion des ORN-Projektionsmusters	<i>Verlust synaptischer Markierung einzelner ORN-Klassen</i>
	<i>unvollständige Innervation von Glomeruli</i>
Projektion in ektopische AL-Regionen	<i>ektopische glomeruläre Strukturen</i>
	<i>Fehlprojektion von ORN-Axonon</i>
Defekte in der Glomerulus Bildung	<i>Defekte in Form und Struktur eines Glomerulus</i>
	<i>NCad-ähnlicher Phänotyp</i>

Abbildung 10 zeigt die prozentuale Verteilung der Mutationen (n=110) auf die einzelnen phänotypischen Klassen.

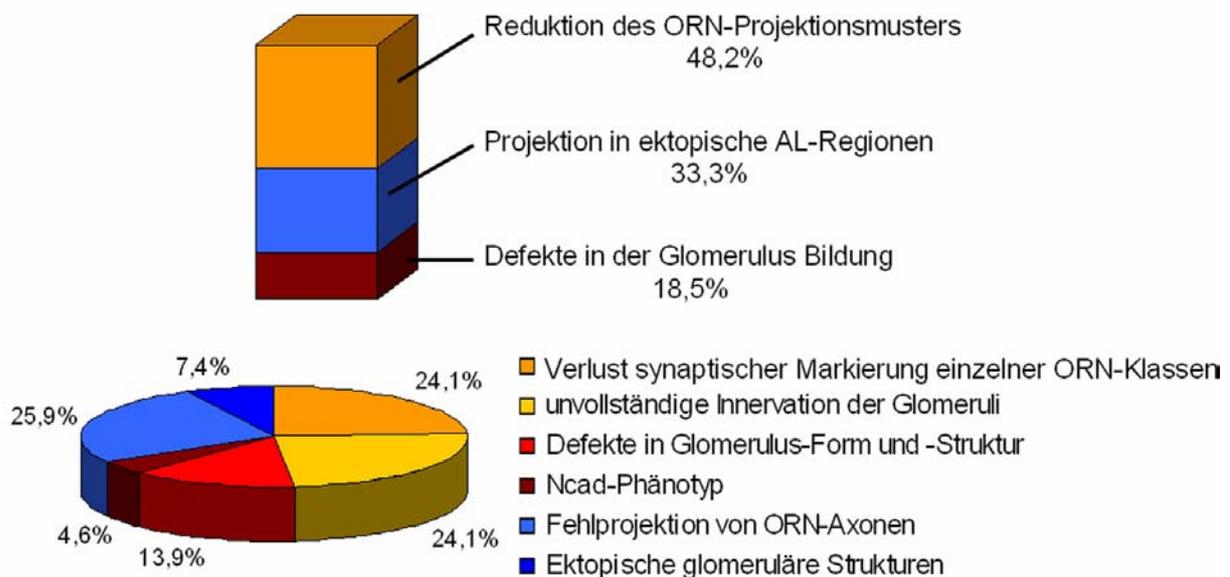


Abb. 10: Prozentuale Verteilung der analysierten Mutationen auf die phänotypischen Klassen.

Es wird deutlich, daß etwa die Hälfte der analysierten Mutationen eine Reduktion des MM1-Projektionsmusters aufweist. Etwa ein Drittel der Mutanten zeigt eine Art von Fehlprojektion der ORNs in Bereiche des AL, die im Wildtyp nicht innerviert sind.

Die Grenzen zwischen den hier eingeteilten phänotypischen Klassen sind manchmal fließend. Einzelne Mutationen zeigen durchaus mehrere Charakteristika der verschiedenen phänotypischen Klassen. Abbildung 11 zeigt Beispiele von Mutationen, die in *Minute*-Klonen zu besonders divergenten Phänotypen führen. So können verschiedene Mosaik-Gehirne derselben Mutante zum Teil sehr unterschiedliche Charakteristika zeigen. Während ein Teil der analysierten Gehirne eine Reduktion der ORN-Innervation zeigt, fehlt in anderen die

Markierung einer einzelnen ORN-Klasse. In einem weiteren Teil der Gehirne ist hingegen eine deutliche Fehlprojektion von ORN-Axonon in ektopische AL-Regionen zu beobachten (siehe Mutation *F2-129* in Abb. 11).

Bei solchen Mutationen erfolgte die Einteilung in eine der phänotypischen Gruppen dann entsprechend der Expressivität oder Penetranz einzelner Defekte.

3.1.1.7 Reduktion des ORN-Projektionsmusters

3.1.1.7.1 Verlust der synaptischen Markierung einzelner ORN-Klassen

Insgesamt wurden 26 der aufgedeckten Mutanten dieser phänotypischen Klasse zugeordnet (siehe Auflistung in Tabelle 3).

Tab. 3: Mutationen, die zum Verlust synaptischer Markierungen einzelner ORN-Klassen führen.

<i>A1-004</i>	<i>F2-085</i>	<i>G2-037</i>	<i>J1-076</i>
<i>D1-011</i>	<i>F2-113</i>	<i>G2-072</i>	<i>J2-038</i>
<i>D1-013</i>	<i>F2-116</i>	<i>H1-004</i>	<i>J3-003</i>
<i>D1-040</i>	<i>F2-125</i>	<i>H1-037</i>	<i>J3-044</i>
<i>E1-013</i>	<i>G1-040</i>	<i>H2-195</i>	<i>J3-066</i>
<i>E1-034</i>	<i>G1-060</i>	<i>I1-031</i>	
<i>E2-028</i>	<i>G2-036</i>	<i>I2-065</i>	

Abbildung 12 zeigt einige Beispiele aus dieser phänotypischen Klasse. Beim Vergleich der hier eingeordneten Mutationen fällt auf, daß es in einigen Mutanten zwar zum Verlust des GFP-Signals verschiedener ORN-Klassen kommt, die Glomeruli dieser Klassen jedoch mit Hilfe der α -NCAD-Färbung nachgewiesen werden können. Anscheinend beruht die fehlende Markierung hier auf einem Defekt im Transport oder der Expression des SYTGFP-Proteins (z.B. *G2-072* und *H1-037* in E-F). In einigen Mutanten ist der Verlust von Glomeruli auch mit der α -NCAD-Färbung nachweisbar, was Hinweise auf das Fehlen der jeweiligen ORN-Klassen gibt (z.B. *H2-195* und *A1-004* in G-H).

Interessanterweise konnte unter den analysierten Mutationen keine gefunden werden, in der es nur auf der kontralateralen Seite des Gehirns zum kompletten Verlust einzelner ORN-Markierungen kommt. Lediglich eine stärkere Reduktion der ORN-Innervation verschiedener Klassen wurde beobachtet.

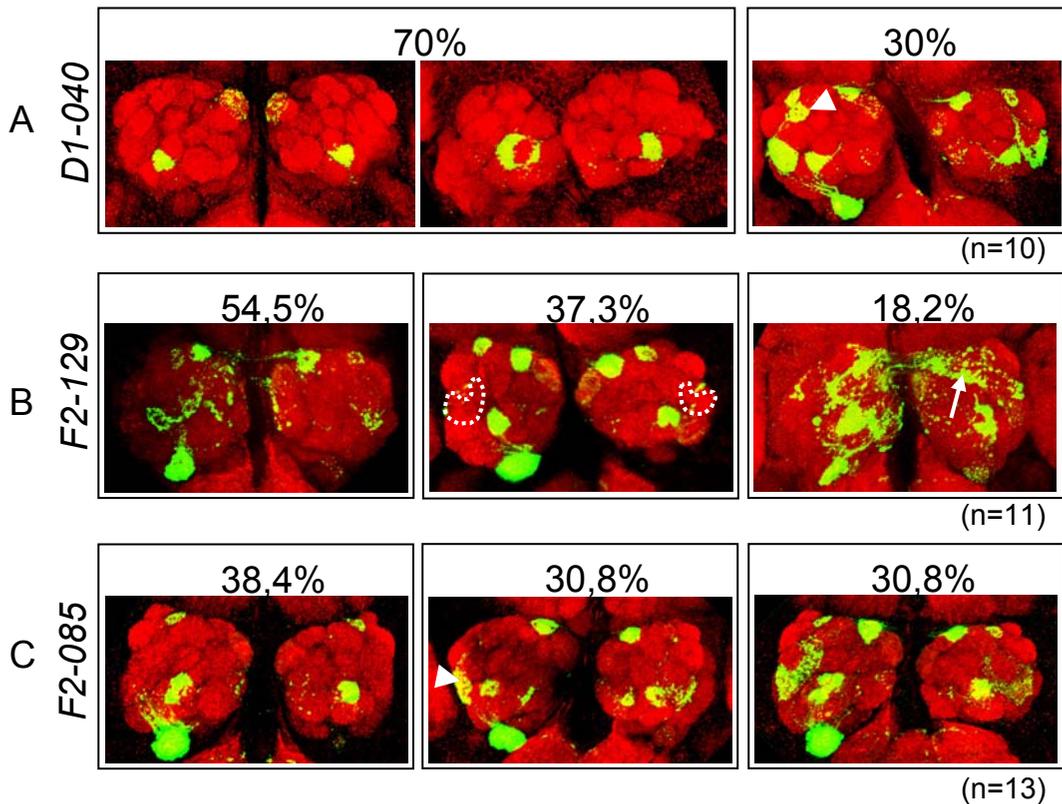


Abb. 11: Heterogenität und Expressivität mutanter Phänotypen. Reihe (A) zeigt die unterschiedlichen Phänotypen der Mutante *D1-040*. In einem Großteil der AL fehlen synaptische Markierungen von Glomeruli. Lediglich der von den ORN46a Axonen innervierte Glomerulus ist stets markiert. Ein Drittel der AL zeigen jedoch eine deutliche Innervation der anderen Glomeruli sowie ektopische glomeruläre Strukturen (Pfeilspitze). Reihe (B) zeigt AL der Mutante *F2-129*. Neben der Reduktion mehrerer ORN Klassen (54,5%) ist auch der selektive Verlust der ORN47b Markierung (gestrichelte Markierung) zu beobachten (37,3%). Andere AL dieser Mutante zeigen jedoch starke Fehlprojektionen (Pfeil) und den Verlust klar abgegrenzter, glomerulärer Strukturen (18,2%). In Reihe (C) ist die Mutante *F2-085* dargestellt. Alle der untersuchten Gehirne zeigten eine Reduktion des synaptischen Musters. Hier sind entweder ganze Glomeruli nicht markiert (linkes Bild) oder die Innervation einzelner Glomeruli ist reduziert (Pfeilspitze). Etwa ein Drittel der Mosaik-Gehirne zeigt ein wildtypisches Projektionsmuster. Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40* GMR-GFP/ FRT40 CycE; MM1/+*. Die hier gezeigten Präparate wurden mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün) markiert.

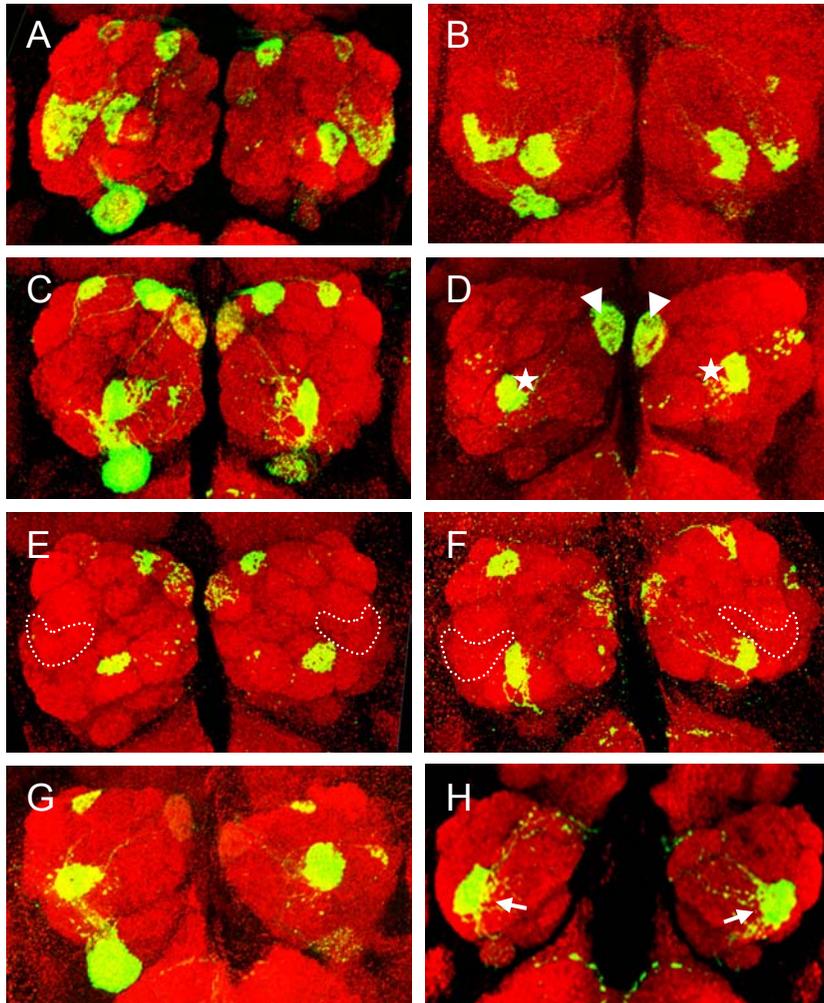


Abb. 12: Verlust der synaptischen Markierung einzelner ORN-Klassen. In (A) ist der ORN-Marker MM1 im Wildtyp dargestellt. In den hier gezeigten Mutanten fehlt oft die synaptische Markierung ganzer ORN-Klassen. Die Ausprägung des Phänotyps ist unterschiedlich. Während der Mutante *F2-113* (C) ausschließlich die Innervation der ORN47b-Axone fehlt, so kommt es in der Mutante *F2-116* (D) zum Verlust aller ORN-Marker mit Ausnahme der Klassen ORN46a (Sternchen) und ORN22a (Pfeilspitzen). Ein häufig beobachteter Phänotyp ist am Beispiel der Mutante *A1-004* (H) gezeigt. Hier ist nur eine synaptische Markierung im Bereich des ORN46a-Glomerulus zu erkennen (Pfeile). Während in *G2-072* (E) und *H1-037* (F) lediglich die GFP-Markierung des ORN47b Glomerulus fehlt, ist die Struktur des Glomerulus in der Antikörperfärbung mit α -Ncad deutlich zu erkennen (gestrichelte Linien). Die Antikörperfärbung der Gehirne in *J1-076* (B) und *H2-195* (G) zeigt hingegen einen deutlichen Defekt der AL-Struktur. Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40* GMR-GFP/FRT40 CycE; MM1/+*. Die hier dargestellten adulten Gehirne wurden mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün) markiert.

3.1.1.7.2 Reduzierte Innervation einzelner Glomeruli

In Abbildung 13 sind einige Beispiele für Mutanten gezeigt, die eine unvollständige Innervation eines oder mehrerer Glomeruli zeigen. Insgesamt wurden 25 Linien dieser phänotypischen Klasse zugeordnet (siehe Auflistung in Tabelle 4).

Tab. 4: Mutanten, die eine unvollständige Innervation verschiedener Glomeruli zeigen.

A1-002	F2-096	H1-046	L2-033
B1-031	G2-034	H1-056	L2-039
C1-012	G2-073	I1-051	L2-081
C1-014	G2-101	I2-107	T1-036
D1-044	H1-038	J3-023	
F2-012	H1-039	K1-021	
F2-084	H1-045	L1-020	

Die hier eingeordneten Mutationen zeigen alle eine reduzierte Innervation mehrerer ORN-Klassen. Unter allen analysierten Mutationen konnte keine gefunden werden, die spezifisch zur Reduktion einer einzelnen ORN-Klasse führt.

3.1.1.8 Projektion von ORN-Axonon in ektopische AL Regionen

3.1.1.8.1 Mutationen, die zur Fehlprojektion von ORN Axonen führen

Insgesamt konnten in der phänotypischen Mutantenanalyse 30 Mutationen isoliert werden, die eine Fehlprojektion markierter ORN-Axone zeigen. Abbildung 14 zeigt einige phänotypische Beispiele der in Tabelle 5 aufgelisteten Mutationen.

Tab. 5: Mutanten mit Fehlprojektionen der markierten ORN Axonen.

C1-010	F2-123	I2-063	L2-004	U2-017
C1-020	H1-002	J1-024	L2-026	W1-040
C1-024	H1-013	J1-049	L2-105	
C1-055	H1-040	J1-059	T1-049	
D1-031	H1-044	J2-071	T3-022	
F1-025	H2-134	J2-072	U1-016	
F2-042	I1-070	K1-070	U1-032	

Im Vergleich zum Wildtyp fällt auf, daß in fast allen der hier eingeordneten Mutanten eine Anhäufung des SytGFP-Signals in den Axonen zu beobachten ist. Zum einen ist das Signal vesikulär in bestimmten Bereichen des AL zu finden (F'), zum anderen scheint es in manchen Axonen gleichmäßig verteilt (G').

Neben eher vereinzelt Axonen (F', gestrichelte Markierung in B), die beispielsweise in den ventro-medialen AL projizieren, kommt es auch zu Akkumulationen in kleinere gemeinsame Bereiche (Pfeile in C und E). Eine Konvergenz der Axone in eine gemeinsame kompakte Struktur konnte jedoch nicht beobachtet werden. Vielmehr bleiben sie an der Oberfläche dieser Bereiche liegen oder sie innervieren Glomeruli anderer Klassen (G').

3.1.1.8.2 Mutationen, die zur Bildung ektopischer glomerulärer Strukturen führen

Insgesamt wurden nur in zehn Mutationen ektopische glomeruläre Strukturen identifiziert. Abbildung 15 zeigt einige der in der Tabelle 6 aufgelisteten Mutationen.

Tab. 6: Mutanten, in denen ektopische glomeruläre Strukturen zu finden sind.

<i>A1-005</i>	<i>H1-006</i>	<i>I2-066</i>	<i>U2-017</i>
<i>F2-021</i>	<i>H2-126</i>	<i>K2-073</i>	
<i>F2-130</i>	<i>H2-180</i>	<i>V2-013</i>	

Im Gegensatz zu Mutationen, in denen eine Fehlprojektion von ORN Axonen in andere Glomeruli beobachtet werden kann (siehe 3.1.1.8.1), kommt es in den hier eingeordneten Mutationen zur Bildung neuer glomerulärer Strukturen. Diese lassen sich auch durch eine α -NCAD-Färbung nachweisen.

Auffallend ist zudem, daß die Mutanten in dieser phänotypischen Klasse kaum weitere Defekte, wie z.B. unvollständige Innervation einzelner Glomeruli oder ähnliches, zeigen.

Die ektopischen Glomeruli können zum einen stets an der gleichen Position im AL lokalisiert sein (wie z.B. bei *F2-130*, Abb. 15 B), zum anderen kann die Lokalisation in den verschiedenen Mosaik-Gehirnen auch variieren (wie z.B. bei *A1-005* in Abb. 15 D).

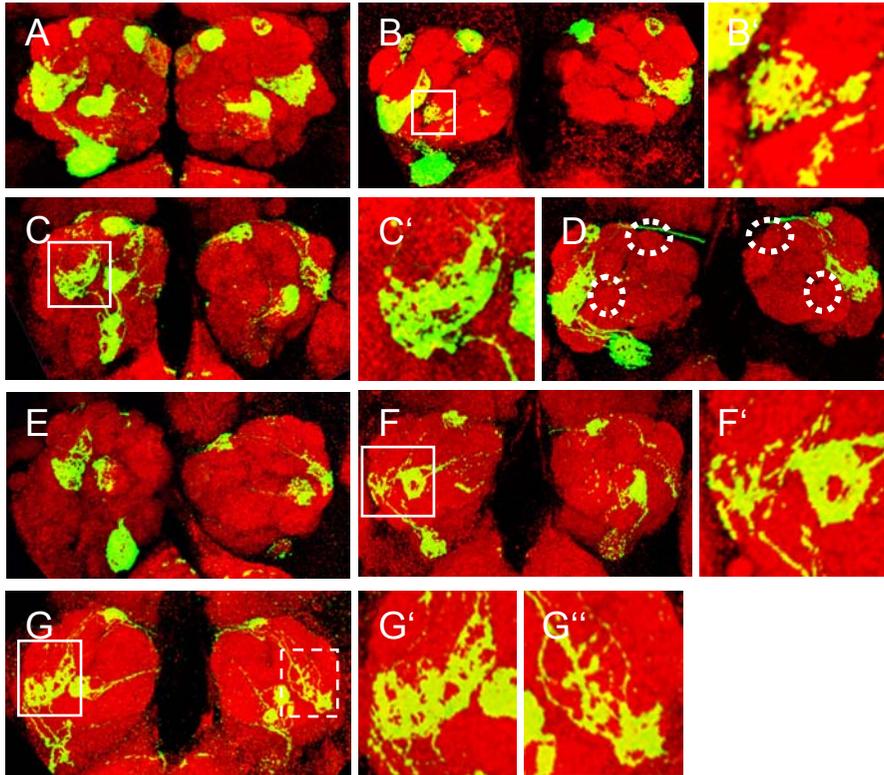


Abb. 13: Unvollständige Innervation eines Glomerulus. (A) zeigt das Projektionsmuster des MM1-Markers im Wildtyp. Die hier exemplarisch dargestellten Mutanten zeigen alle eine unvollständige Innervation der Glomeruli einer oder mehrerer ORN-Klassen. In der Mutante *C1-012* (B) ist nur die Innervation des ORN46a Glomerulus deutlich reduziert. Die Mutanten *J3-023* (C-C'), *F2-096* (E) und *G2-034* (F-F') zeigen eine Reduktion in mehreren ORN Klassen. In einigen Mutanten kommt es auch zum kompletten Verlust der Markierung von ORN Klassen. In der Mutante *A1-002* (D) fehlt die Markierung der ORN46a und ORN47a Axone (gestrichelte Markierung). Die übrigen markierten Glomeruli zeigen zudem kleinere Bereiche, in denen kein GFP-Signal zu detektieren ist. Im Fall von *I1-051* (G) wird die reduzierte Innervation des ORN47b Glomerulus besonders deutlich, wenn man die kontralaterale Projektion betrachtet (G''). Während im ipsilateralen Bereich (G') die Halbmond-ähnliche Form des Glomerulus mehr oder weniger ausgefüllt ist, so ist das Innervationsmuster der kontralateral projizierenden Axone deutlich reduziert. Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40* GMR-GFP/ CycE FRT40; MM1/+*. Die hier dargestellten adulten Gehirne wurden mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün) gefärbt. (B'-F') sind Ausschnittsvergrößerungen aus den Projektionen in (B-F).

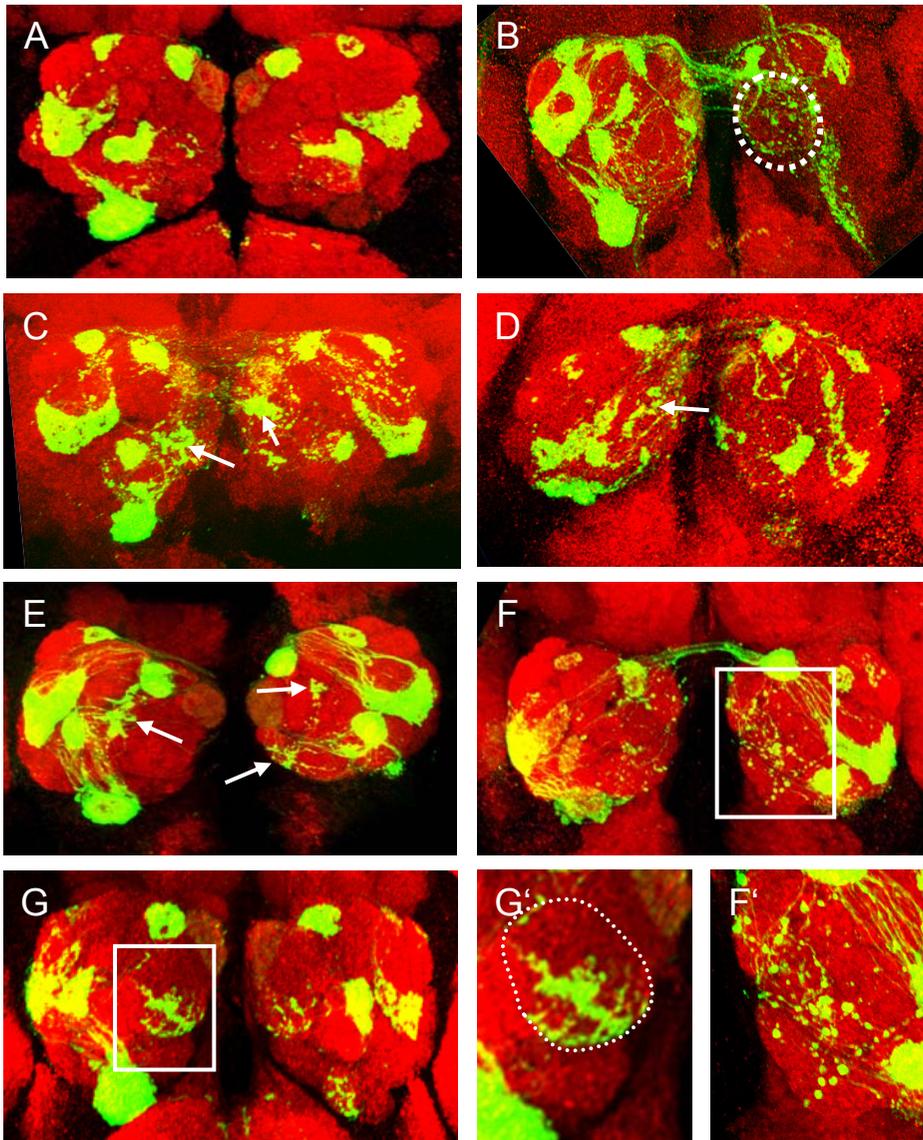


Abb. 14: Fehlprojektion von ORN-Axonen. In (A) ist das wildtypische Projektionsmuster des MM1-Markers dargestellt. In den meisten Mutanten dieser phänotypischen Klasse wird der ventro-mediale AL innerviert. In den Mutanten *L2-026* (B) und *C1-055* (F) sind vor allem im kontralateralen, ventro-medialen AL ektopische Axontermini lokalisiert (gestrichelte Markierung in B und F'). Die Mutanten *J2-071* (C) und *J1-059* (D) zeigen sowohl ipsi- als auch kontralateral Fehlprojektionen in dieser Region (Pfeile). In *C1-024* (E) kommt es zur Fehlprojektion der Axone in anterior-mediale Bereiche des AL (Pfeile). Die Mutation *B1-031* (G) führt zur partiellen Innervation des VA1-Glomerulus (gestrichelte Markierung in G'). Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40* GMR-GFP/ CycE FRT40; MM1/+*. Die hier dargestellten adulten Gehirne wurden mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün) gefärbt. (F'-G') sind Ausschnittsvergrößerungen aus den Projektionen in (F-G).

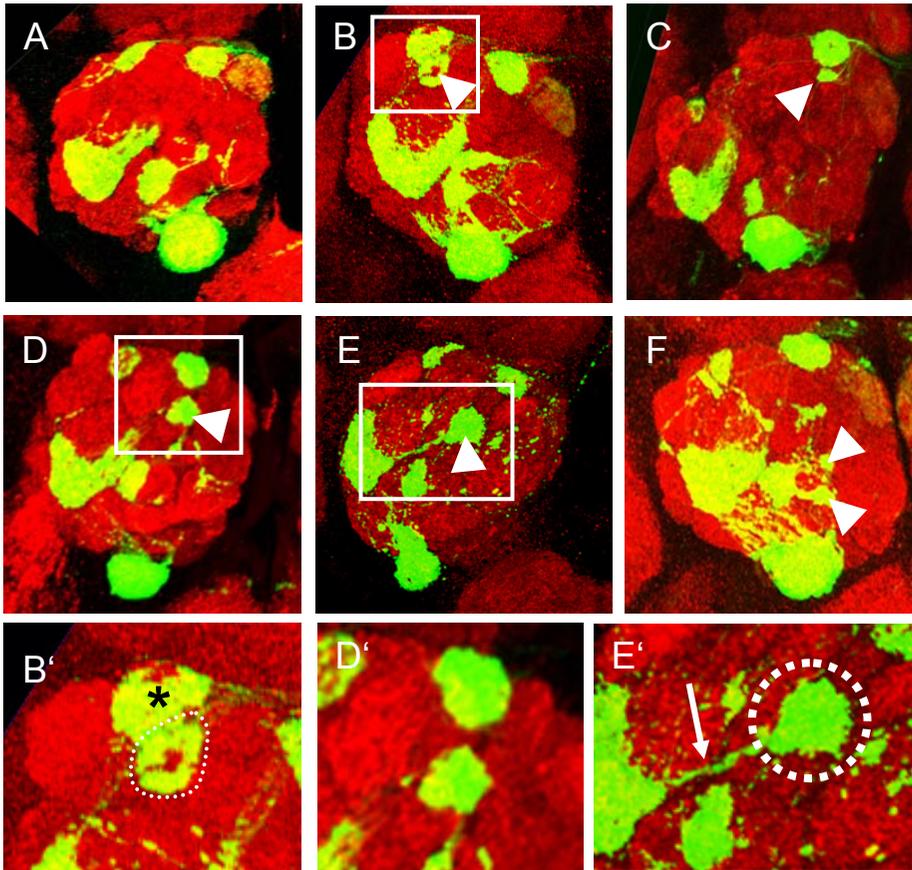


Abb. 15: Ektopische glomeruläre Strukturen. (A) zeigt das wildtypische Muster des ORN-Markers. Die hier gezeigten Mutanten sind Beispiele für die unterschiedlichen Ausprägungsformen ektopischer glomerulärer Strukturen. So findet man neben kleineren Glomeruli (Pfeilspitzen in C und E) auch große kompakte glomeruläre Strukturen (Pfeilspitzen in B und D). Die Mutation *F2-130* führt zur Bildung eines ektopischen Glomerulus (Markierung in B'), der stets unterhalb des ORN23a-Glomerulus liegt (Sternchen). Weitere Analysen haben gezeigt, daß dieser jedoch von ORN47b Axonen innerviert wird. In der Mutante *K2-073* ist häufig eine Verbindung (Pfeil in E') der ektopischen Strukturen (gestrichelte Markierung) zum ORN47b Glomerulus zu beobachten. Dargestellte Mutanten: (B) *F2-130*, (C) *F2-021*, (D) *A1-005*, (E) *K2-073* und (F) *H1-006*. Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40 * GMR-GFP/ CycE FRT40; MM1/+*. Die hier dargestellten adulten Gehirne wurden mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün) gefärbt. (B', E' und G') sind Ausschnittsvergrößerungen aus den Projektionen in (B, E und F).

3.1.1.9 Defekte in der Glomerulus Bildung

3.1.1.9.1 Mutationen, die zu Defekten in Form und Struktur eines Glomerulus führen

Insgesamt wurden 15 Linien anhand ihres Phänotyps dieser Klasse zugeordnet (siehe Tabelle 7). Abbildung 16 zeigt eine Auswahl der Phänotypen.

Tab. 7: Mutanten, mit Defekten in Form und Struktur der Glomeruli.

<i>D1-007</i>	<i>F2-074</i>	<i>L1-063</i>
<i>D1-016</i>	<i>F2-129</i>	<i>L2-080</i>
<i>D1-030</i>	<i>G1-002</i>	<i>V1-019</i>
<i>E1-001</i>	<i>J2-064</i>	
<i>F1-020</i>	<i>J2-075</i>	
<i>F2-022</i>	<i>J3-047</i>	

Die Entscheidung, ob ein Glomerulus eine andere Form oder Struktur hat fällt oft schwer. Da die meisten der markierten Glomeruli klein sind und eine kugelige, runde Form aufweisen, lassen sich solche Defekte meist nur am besonders markanten ORN47b Glomerulus erkennen. In einigen Fällen kommt es zur Veränderung der charakteristischen Halbmond-Form, so daß ein eher rundlicher Glomerulus entsteht (D und D'). Auffällig ist der Phänotyp der Mutation *F2-022*. Hier läßt sich die synaptische Markierung häufig keiner bestimmten ORN-Klasse zuordnen (E).

Einige Mutationen führen nicht direkt zu einer Veränderung der Glomerulus Form, vielmehr ist das Innervationsmuster innerhalb eines Glomerulus betroffen. So zeigt z.B. die Mutation *D1-016* in den ORN47b (Kasten in C und C') und ORN23a Glomeruli (Pfeil in C) runde Bereiche, in denen keine ORN Axone zu sehen sind. Hier scheint eher die Anordnung von ORN-Axonon und den PN- und LN-Dendriten gestört zu sein.

3.1.1.9.2 Die Komplementationsgruppe *NCad*

Zunächst wurden in der phänotypischen Mutantanalyse fünf Mutationen isoliert, die den charakteristischen für *NCad* beschriebenen Konvergenzverlust zeigen (Hummel and Zipursky, 2004). Darauf folgende Komplementationsanalysen mit einer beschriebenen *NCad*-Mutation ergaben, daß es sich bei allen fünf Mutationen um *NCad*-Allele handelt. Abbildung 17 zeigt die Phänotypen der Komplementationsgruppe.

Tab. 8: Im Screen identifizierte NCad-Allele.

<i>E2-023</i>	<i>H2-237</i>
<i>H2-096</i>	<i>U1-018</i>
<i>H2-115</i>	

Drei der isolierten *NCad*-Allele stammen aus dem Mutagenese-Ansatz H2, könnten also klonalen Ursprungs sein. Ihre phänotypische Ausprägung ist jedoch unterschiedlich. Das Allel *NCad*^{H2-096} zeigt, ähnlich wie *NCad*^{E2-023}, einen milden Effekt, *NCad*^{H2-237} hingegen führt zum kompletten Verlust der AL-Struktur.

Alle Mutationen, die den für *NCad* beschriebenen Phänotyp zeigen, konnten als Allele von *NCad* bestätigt werden. Somit konnten auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms keine weiteren Gene identifiziert werden, die ebenfalls zu diesem charakteristischen Phänotyp führen.

3.1.1.10 Kartierung der letalen Mutationen

In Zusammenarbeit mit Claus Schulte (Schulte, 2005) und Bernd Göllner (Göllner, 2007) wurde die zytologische Kartierung einer Auswahl von Mutationen begonnen. Hierzu wurden die letalen Mutationen mit einer Kollektion von homozygot letalen Defizienzen (Bloomington, *Drosophila* Stock Center) auf ihr Komplementationsverhalten hin untersucht. Falls die Defizienzen eine oder mehrere Letalitäten des mutanten Chromosoms aufdecken konnten, wurden weitere kleinere Defizienzen, sowie letale P-Element Insertionen oder Mutationen in dieser Region in die Komplementationsanalyse mit einbezogen. Tabelle 9 faßt die Ergebnisse der Kartierung zusammen.

Tab. 9: Kartierungsdaten ausgewählter Mutationen.

Mutation	chromosomaler Bereich	ORN Phänotyp
<i>E1-001</i>	21B4 ; 21B7	Veränderte Form der Glomeruli; Fehlprojektionen einzelner Axone; teilweise reduzierte Innervation
<i>F2-022</i>	26B01-02 ; 26D01-02 31B ; 32D1	Fehlprojektionen in den ventro-medialen AL
<i>F2-042</i>	34D4 ; 34E2	Fehlprojektionen einzelner Axone im gesamten AL
<i>F2-130</i>	26D10 ; 27C1	Fehlprojektion der ORN47b Axone in ektopischen Glomerulus im dorso-lateralen AL
<i>H1-002</i>	22E1 ; 22F3	Starke Fehlprojektionen von ORN-Axonon im gesamten AL

<i>H1-056</i>	33B3 ; 33B8	Reduzierte Innervation und Verlust einzelner Glomeruli; Defekte in anderen Bereichen des Kopfes
<i>I1-070</i>	36C11 ; 36D1	starke Fehlprojektion von Axonen im gesamten AL
<i>I2-063</i>	31F4 (CG6094) (Class 1 peptide chain release factor)	Fehlprojektionen einzelner Axone im gesamten AL; ektopischer Glomerulus im posterioren AL
<i>J1-059</i>	CG9140 (NADH-Ubichinon Oxidoreduktase)	Fehlprojektionen in den ventro-medialen AL, ORN47b Glomerulus ist elongiert
<i>K1-070</i>	31B ; 32A	Fehlprojektion von einzelnen Axonen im gesamten AL
<i>K2-073</i>	36B3 ; 36C 32D1 ; 32F1-3	Fehlprojektionen in den dorsalen AL
<i>L2-105</i>	24C2-8 ; 25C8-9 26D3-E1 ; 26F4-7 28A4-B1 ; 28D3-9 * 28E4-7 ; 29B2-C1 * 35F-36A ; 36D 36C2-4 ; 37B9-C1	Fehlprojektionen im gesamten AL * Aus Komplementationskreuzungen schlüpfen einzelne Escaper-Tiere mit deutlichen Flügel-Phänotypen
<i>T1-036</i>	29C1-2 ; 30C8-9	Reduzierte Innervation des ORN47b Glomerulus, Fehlprojektionen im lateralen AL
<i>T1-049</i>	35B4-6 ; 35F1-7	Fehlprojektionen in den dorso-medialen AL
<i>T3-022</i>	21E2	Innervation der Glomeruli durch ORN-Axone mit starken Bouton-artigen Verdickungen; Fehlprojektionen und elongierter ORN47b Glomerulus
<i>U1-016</i>	21A1 ; 21B7-8	Fehlprojektion in den ventro-medialen AL
<i>U1-032</i>	35B4-6 ; 35F1-7	Abgrenzung der Glomeruli wirkt undeutlich, Fehlprojektionen im ventralen AL
<i>U2-017</i>	<i>lace</i>	Ektopische Glomeruli im gesamten AL verteilt
<i>V1-019</i>	21B7-C1 ; 21B6-8	Reduzierte Innervation von Glomeruli
<i>V2-013</i>	<i>sema1a</i>	Ektopische Glomeruli, elongierter ORN47b Glomerulus
<i>W1-040</i>	30C3-5 ; 30F1	Fehlprojektionen oberhalb des ORN47b Glomerulus

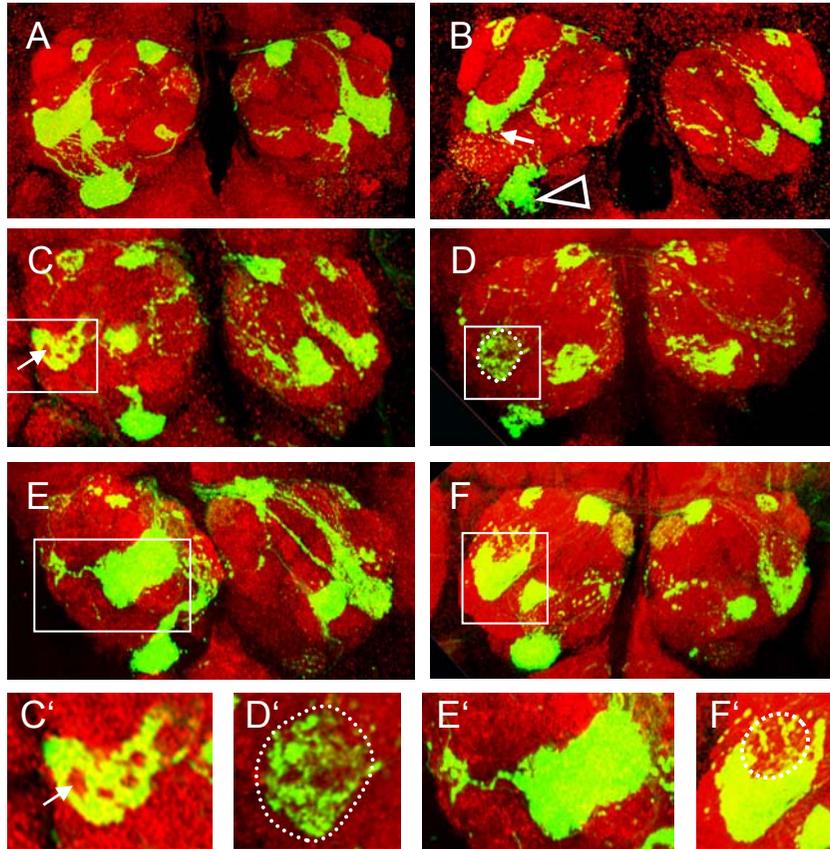


Abb. 16: Defekte in Form und Struktur eines Glomerulus. (A) zeigt den MM1-Marker im Wildtyp. In den hier dargestellten Mutanten zeigen unterschiedliche Glomeruli Defekte in Form oder Struktur der synaptischen Markierung. In der Mutante *D1-030* (B) zeigen sowohl der ORN21a (Pfeilspitze), als auch der ORN47b Glomerulus (Pfeil) eine unregelmäßige Abgrenzung. Die Glomerulus-Grenze weist hier deutliche Einkerbungen auf. In *D1-016* Mutanten sind im ORN47b und ORN23a Glomerulus Bereiche zu beobachten, die von einer ORN-Innervation ausgespart werden (Pfeil in C und C'). Der ORN47b Glomerulus in *F2-129* Mutanten wirkt eher rund (Markierung in D und D'). Der eigentlich Halbmond-förmige Glomerulus ist auch mit der α -Ncad-Färbung nicht nachweisbar. In *F2-022* (E-E') läßt sich die GFP-Markierung oft nicht eindeutig einer bestimmten ORN-Klasse zuordnen. ORN47b und ORN46a Axone konvergieren hier scheinbar in gemeinsame Bereiche. In *J2-075* Mutanten (F) projizieren die ORN47b Axone, über ihren Zielglomerulus hinaus weiter dorsal in benachbarte Glomeruli (Markierung in F'). Der ORN47b Glomerulus wirkt auch hier nicht mehr scharf abgegrenzt. Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40* GMR-GFP/ CycE FRT40; MM1/+*. Die hier dargestellten adulten Gehirne wurden mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün) gefärbt. (C'-F') sind Ausschnittsvergrößerungen aus den Projektionen in (C-F).

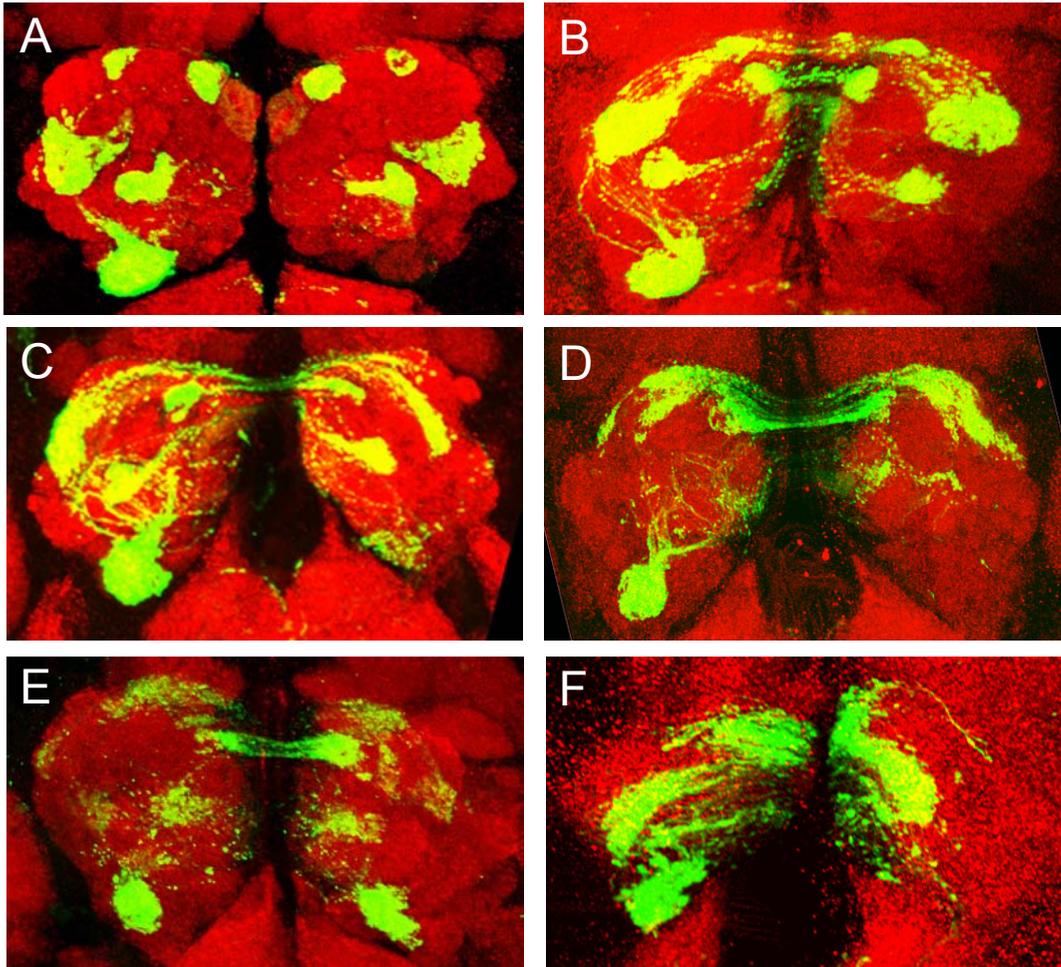


Abb. 17: Die Komplementationsgruppe *NCad*. (A) zeigt den MM1-Marker im Wildtyp. In den hier dargestellten *Ncad*-Allelen konvergieren die markierten Axone nicht mehr in kompakte Glomeruli. Die phänotypische Ausprägung ist in den verschiedenen Allelen unterschiedlich. Den schwächsten Phänotyp zeigt das Allel *E1-023* (C). Das SytGFP-Signal im AL lässt sich noch den einzelnen ORN-Klassen zuordnen, zudem zeigt die α -Ncad-Färbung noch Reste glomerulärer Strukturen. Das Allel *H2-096* (B) zeigt keine glomeruläre Strukturierung mehr. In *H2-115* (D) und *U1-018* (E) kann das GFP-Signal den einzelnen ORN-Klassen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden. Das Allel *H2-237* (F) zeigt den stärksten Phänotyp. Da die in der rechten Spalte abgebildeten Allele (B, D, F) alle aus dem gleichen Mutageneseansatz (H2) stammen, könnten sie auch klonal sein. Der besonders starke Phänotyp von *H2-237* unterscheidet sich jedoch deutlich von dem der anderen Allelen. Genotyp: *eyFLP; OR22a:sybGFP FRT40* GMR-GFP/ CycE FRT40; MM1/+*. Die hier dargestellten adulten Gehirne wurden mit α -Ncad (rot) und α -GFP (grün) gefärbt.

3.2 Die Mutation *sema1a*^{V2-13}

Die Mutante *V2-13* fiel im phänotypischen Screen aufgrund der Fehlprojektion von ORN-Axonon und der Bildung ektopischer glomerulärer Strukturen auf (Schulte, 2005). Mittels Komplementationsanalysen konnte die letale Mutation der Linie *V2-13* zunächst auf den Bereich 29E kartiert und dann als ein neues Allel von *semaphorin1a* identifiziert werden.

Die Mutation *V2-13* konnte die beiden beschriebenen *semaphorin1a* Allele *sema1a*^{P1} und *sema1a*^{P2} (Kolodkin et al., 1993; Yu et al., 1998) nicht komplementieren. Zudem konnten für die beschriebenen Allele vergleichbare Phänotypen beobachtet werden. In Abbildung 18 ist das MM1-Projektionsmuster in *Minute*-Klonen mit den verschiedenen *sema1a*-Allelen dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, daß der ORN47b Glomerulus in einigen der Mosaik-Gehirne stark elongiert ist (Pfeilspitzen in B und D-F). Oberhalb des ORN47b Glomerulus ist in einigen Gehirnen zudem ein ektopischer Glomerulus zu erkennen (Pfeilspitzen in C und G). Auch neben dem ORN21a Glomerulus ist in 2/3 der Mosaik-Gehirne ein ektopischer Glomerulus lokalisiert. Die Axone der maxillaren Klasse ORN46a scheinen ihren Zielglomerulus im AL nicht mehr vollständig zu innervieren (Sternchen in C-G). In einigen Fällen terminieren ORN-Axone in Bereichen außerhalb des AL (Umrisslinie in C).

In Zusammenarbeit mit Marc Lattemann wurde die folgende Charakterisierung der *sema1a*-Funktion im olfaktorischen System durchgeführt (Lattemann et al., 2007).

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von *sema1a*-Mutanten

Bisher wurde der Phänotyp von *sema1a*^{V2-13} nur im Hintergrund des MM1-Markers analysiert. Es gibt zwar einige Hinweise darauf, welche der markierten ORN-Klassen für welchen Phänotyp verantwortlich ist, jedoch kann erst nach Analyse einzelner markierter ORN-Klassen eine eindeutige Aussage über die Funktion von *sema1a* in den verschiedenen Klassen gemacht werden.

3.2.1.1 Analyse einzelner antennaler ORN-Klassen

Durch die Verwendung spezifischer OR-Gal4 Linien zusammen mit dem Reporterkonstrukt UAS-*syGFP* werden die einzelnen ORN-Klassen im wildtypischen und mutanten Hintergrund dargestellt. In *Minute*-Klonen mit *sema1a*^{V2-13} wurden nun die verschiedenen ORN-Klassen auf mögliche Projektionsdefekte hin untersucht. Einige Beispiele der untersuchten ORN-Klassen sind in Abbildung 19 zusammengestellt.

Die Analyse der einzelnen ORN-Klassen ergab, daß der Verlust von *sema1a* in den untersuchten ORN-Klassen zu zwei Arten von Projektionsdefekten führt.

Zum einen kommt es bei einigen ORN-Klassen in *sema1a*-Mosaiken zur Fehlprojektion von Axonen in benachbarte Regionen. ORN19a und ORN83c Axone projizieren z.B. über ihr eigentliches Ziel hinaus in ihre Nachbar-Glomeruli. Die Abgrenzung des Glomerulus wirkt daher unregelmäßig. Die Axone scheinen zwar ihre ungefähre Zielregion im AL zu finden, konvergieren jedoch nicht vollständig zu einem kompakten, klar abgegrenzten Glomerulus. Diese Art des Konvergenzverlustes wird im Folgenden als Konvergenzdefekt „Typ 1“ beschrieben.

Ein weiterer Phänotyp ist das Auftreten kompakter ektopischer Glomeruli. Neben den ORN47b (H und H') und ORN21a Axonen, die bereits im MM1-Muster markiert waren, zeigen auch Axone der Klasse ORN67b eine Fehlprojektion in ektopische glomeruläre Strukturen (Pfeil in F). Hier projizieren die *sema1a* mutanten Axone in ektopische Regionen des AL und konvergieren dort zu einem zusätzlichen Glomerulus. Diese Art von Phänotyp wird im Folgenden als Konvergenzdefekt vom „Typ 2“ beschrieben

Der Verlust der *sema1a* Funktion in den ORNs führt jedoch nicht in allen Klassen zu einem der beschriebenen Konvergenzdefekte. Einige Klassen, wie z.B. ORN92a (I-J) und ORN42b (K-L), zeigen in *Minute*-Klonen mit *sema1a*^{V2-13} keine Veränderung zum wildtypischen Innervationsmuster. Insgesamt wurden 17 antennale ORN-Klassen auf Projektionsdefekte hin untersucht. Die phänotypische Analyse von Mosaik-Klonen der verschiedenen ORN-Klassen ist in Tabelle 10 zusammengefaßt.

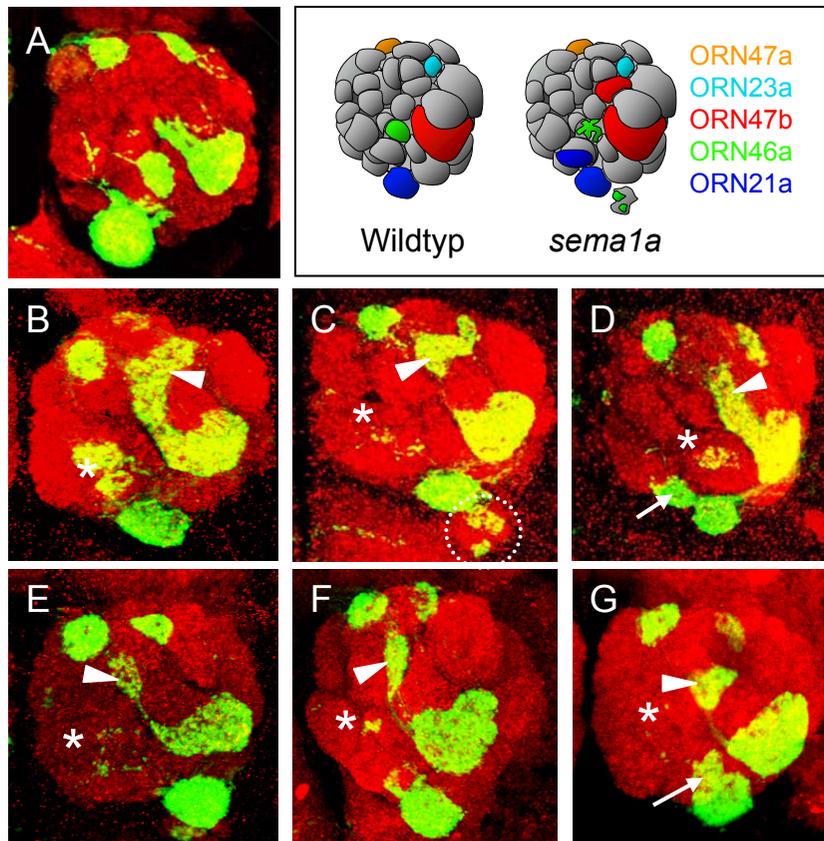


Abb. 18: Projektionsdefekte von ORN Axonen in *sema1a* Klonen. Das *sema1a*-Allel V2-13 zeigt nach Markierung mit dem Markerchromosom MM1 eine Vielzahl von phänotypischen Veränderungen. Im Vergleich zum Wildtyp (A) ist der sonst sichelförmige ORN47b Glomerulus elongiert (Pfeilspitze in B und D). Oberhalb des ORN47b Glomerulus (Pfeilspitzen in C) oder auch neben dem ORN21a Glomerulus (Pfeil in D) sind ektopische glomeruläre Strukturen zu beobachten. ORN46a sind im AL teilweise stark reduziert (Sternchen in C) oder auch weniger stark konvergiert (Sternchen in D). In einem Teil der Mosaik-Gehirne innervieren ORN46a Axone Bereiche außerhalb des AL (gestrichelte Markierung in C). Die Allele *sema1a*^{P1} (E-F) oder *sema1a*^{P2} (G) zeigen die gleichen Phänotypen. ORN47b-Axone konvergieren in einen elongierten Glomerulus (Pfeilspitzen in E-F), dessen dorsaler Teil entweder über einen schmalen Bereich mit dem Rest des Glomerulus verbunden ist, oder einen eigenen ektopisch lokalisierten Glomerulus (Pfeilspitze in G). ORN46a Axone konvergieren im AL nicht zu einem klar abgegrenzten Glomerulus (Sternchen in E-F) und ORN21a Axone bilden ebenfalls einen zweiten ektopischen Glomerulus aus (Pfeil in G). Das Schema faßt die unterschiedlichen Projektionsdefekte nochmals zusammen. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT40/ FRT40 CycE; MM1-Gal4 UAS-SytGFP/+*; (B-G) *eyFLP; sema1a FRT40/ FRT40 CycE; MM-Gal4 UAS-SytGFP/+*. Verwendete *sema1a*-Allele: (B-D) *sema1a*^{V2-13}, (E-F) *sema1a*^{P1}, (G) *sema1a*^{P2}. Alle abgebildeten AL wurden mit α -GFP (grün), α -Nc82 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

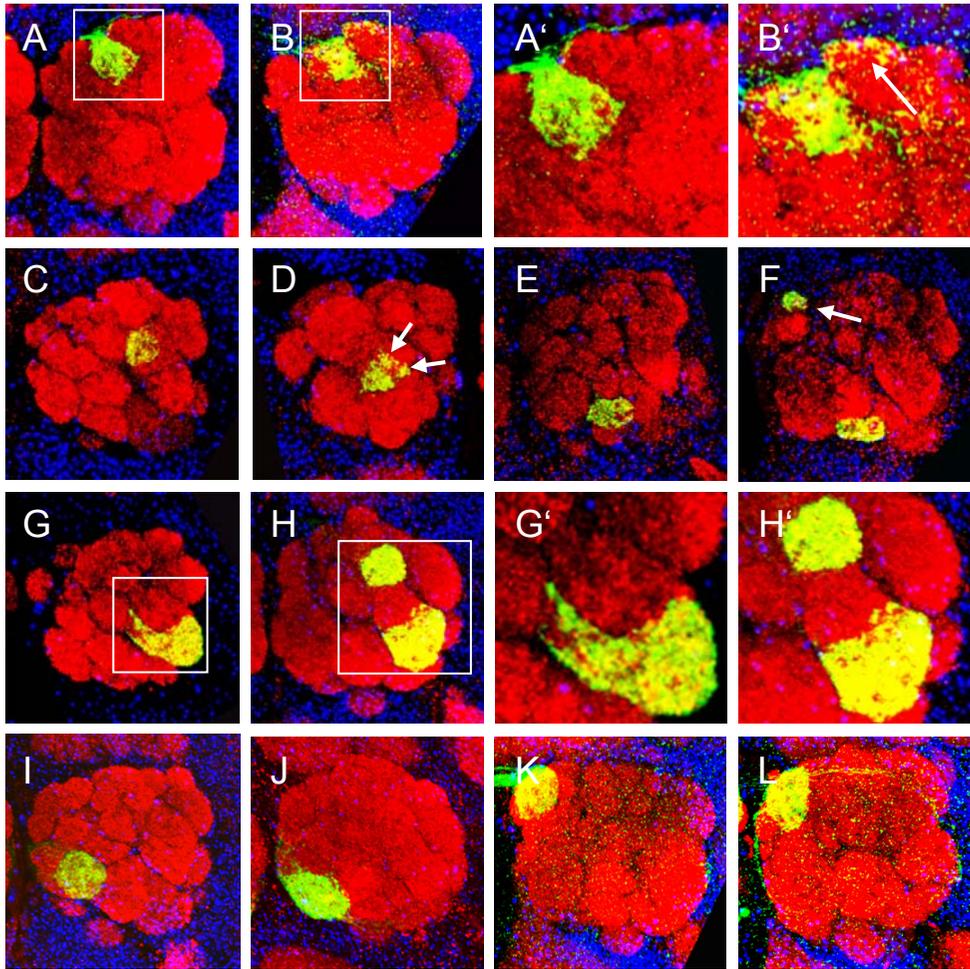


Abb. 19: Der Verlust der *sema1a* Funktion führt in antennalen ORN-Klassen zu unterschiedlichen Projektionsdefekten. In den ORN-Klassen 19a (B) und 83c (D) führt der Verlust von *sema1a* zu einer Fehlprojektion der mutanten ORN Axone. Zwar finden diese noch zu ihrem eigentlichen Zielgebiet, projizieren jedoch auch in benachbarte Bereiche (Pfeile in B' und D). Der Glomerulus grenzt sich nicht mehr deutlich ab. Im Folgenden wird dieser Phänotyp „Typ1-Konvergenzdefekt“ genannt. In anderen ORN-Klassen, wie z.B. ORN67b (F) und ORN47b (H), kommt es zur axonalen Konvergenz in einen ectopischen Glomerulus („Typ2-Konvergenzdefekt“). Der ectopische ORN67b Glomerulus liegt auch weit vom ursprünglichen Terminationsort entfernt (Pfeil in F). Andere ORN-Klassen, wie 92a (J) und 42b (L), sind hingegen nicht vom *sema1a* Verlust betroffen. Genotypen: (A, C, E, G, I und K) *eyFLP; FRT40/ CycE FRT40; OR-Gal4 UAS-sytGFP/ +* (B, D, F, H, J und L) *eyFLP;sema1a^{V2-13} FRT40/ CycE FRT40; OR-Gal4 UAS-sytGFP/ +*. Verwendete ORN-Klassen: (A-B) ORN19a, (C-D) ORN83c, (E-F) ORN67b, (G-H) ORN47b, (I-J) ORN92a und (K-L) ORN42b. Für die Antikörperfärbung wurden α -GFP (grün), α -NC82 (rot) und toto3 (blau) verwendet.

Tabelle 10: Übersicht über die phänotypische Analyse der verschiedenen antennalen ORN-Klassen in *sema1a*^{V2-13} Minute-Klonen.

Klasse	Sensille	Glomerulus	Phänotyp	Penetranz
ORN19a	at3	DC1	Typ 1	30%
ORN 21a	ab1	V	Typ 2	75%
ORN 22a	ab3	DM2	Wildtyp	-
ORN 23a	at2	DA3	Wildtyp	-
ORN 42b	ab1	DM1	Wildtyp	-
ORN 43a	at3	DA4I	Typ 1	60%
ORN 43b	ab8	VM2	Typ1	81%
ORN 47a	ab5	DM3	Wildtyp	-
ORN 47b	at4	VA1v	Typ 2	85%
ORN 49a	ab10	DL4	Wildtyp	-
ORN 49b	ab6	VA5	Typ 1	83%
ORN 65a	at4	DL3	Wildtyp	-
ORN 67b	ab9	VA3	Typ 2	60%
ORN 67c	ab7	VC4	Wildtyp	-
ORN 83c	at2	DC3	Typ 1	70%
ORN 88a	at4	VA1d	Typ 1	50%
ORN 92a	ab1	VA2	Wildtyp	-

Alle untersuchten Klassen projizieren entweder aus basikonischen oder trichoiden Sensillen in den AL. Es ist jedoch keine Korrelation zwischen Ausprägung des Phänotyps und dem Sensillen-Typ festzustellen. So zeigen ORN-Klassen aus basikonischen Sensillen sowohl Konvergenzdefekte vom Typ1 oder Typ2, als auch ein wildtypisches Innervationsmuster der jeweiligen Glomeruli.

Ebenso scheint die Lokalisation des eigentlichen Zielglomeruli innerhalb des AL in keinem Zusammenhang mit einem Konvergenzdefekt oder der wildtypischen Innervation zu stehen. Sowohl dorsal lokalisierte Glomeruli als auch die ventral liegenden zeigen das gesamte phänotypische Spektrum.

3.2.1.2 Analyse einzelner maxillarer ORN-Klassen

Die Besonderheit maxillarer ORN-Klassen besteht darin, daß diese ihre Axone innerhalb des maxillaren Nervs zunächst durch das SOG projizieren. Aus diesem treten sie etwas unterhalb des AL aus und wachsen schließlich medial des V-Glomerulus in den AL ein. Zunächst wurde die Innervation der eigentlichen Zielglomeruli im AL untersucht. Abbildung 20 zeigt die fünf analysierten maxillaren ORN-Klassen im Überblick.

Für alle hier untersuchten maxillaren ORN-Klassen konnte ein Konvergenzdefekt vom „Typ1“ beobachtet werden. Teilweise erstreckt sich die Innervation durch die Axone einer ORN-Klasse über größere Bereiche. *sema1a*^{V2-13} mutante Axone der Klassen ORN59c (D) und ORN85e (F) terminieren z.B. in einiger Entfernung zum eigentlichen Zielglomerulus (Pfeilspitzen). Im Vergleich zu antennalen ORN-Klassen, wie ORN47b oder ORN67b, kommt es hier jedoch nicht zur axonalen Konvergenz in kompakte ektopische Strukturen. Die Glomeruli der Klassen ORN71a und ORN46a liegen im AL direkt benachbart und grenzen sich im Wildtyp deutlich voneinander ab. Durch eine differentielle Markierung beider Klassen läßt sich ihre gemeinsame Grenze im Wildtyp darstellen (K). In *sema1a*^{V2-13} Mutanten verschwindet diese Abgrenzung. Die ORN-Axone der beiden Klassen „greifen ineinander“ und ihre Innervation begrenzt sich nicht auf einen kompakten Glomerulus (L). Jedoch konnte in keinem der analysierten Gehirne eine Co-Konvergenz von ORN71a und ORN46a Axonen in gemeinsame Bereiche beobachtet werden. Die Ergebnisse zur Analyse der Innervation *sema1a*^{V2-13} mutanter maxillarer ORNs sind in Tabelle 11 nochmals zusammengefaßt.

Tabelle 11: Übersicht über die phänotypische Analyse der verschiedenen maxillaren ORN-Klassen in *sema1a*^{V2-13} Mosaik-Klonen.

Klasse	Sensille	Glomerulus	Phänotyp	Penetranz
ORN 42a	pb1	VA7	Typ 1	60%
ORN 46a	pb2	VM7m/l	Typ 1	80%
ORN 59c	pb3	1, VM7	Typ 1	99%
ORN 71a	pb1	VC2	Typ 1	83%
ORN 85e	pb2	VC1	Typ 1	98%

Für den mutanten Phänotyp im MM1-Marker wurde bereits eine ektopische Innervation unterhalb des AL beschrieben (siehe 3.3). In Abbildung 21 sind Beispiele der analysierten maxillaren ORN-Klassen gezeigt, die neben ihrer Zielregion im AL (Pfeile in A-C) auch Bereiche unterhalb des AL innervieren. Diese ektopischen Bereiche können mit dem

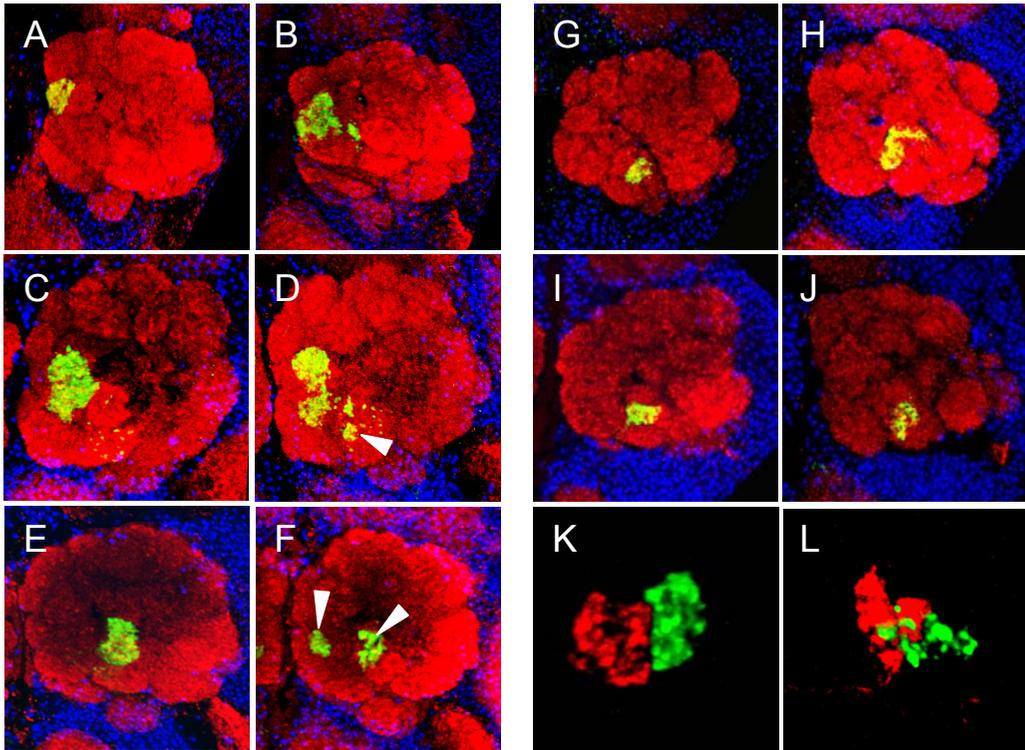


Abb. 20: Der Verlust der *sema1a* Funktion in maxillaren ORN-Klassen (1). Im Wildtyp konvergieren ORN42a (A) Axone in einen kompakten Glomerulus ventromedial im AL. In *sema1a* Mutanten projizieren die Axone zwar in die richtige Region, der Glomerulus wirkt jedoch unförmig und grenzt sich nicht deutlich von den benachbarten Klassen ab (B). Auch *sema1a* mutante ORN59c Axone (D) zeigen einen deutlichen Konvergenzverlust im Vergleich zum Wildtyp (C). Während im Wildtyp ORN85e Axone in einen einzelnen, kompakten Glomerulus konvergieren, akkumulieren in *sema1a* Mutanten die Axontermini (F) in deutlich voneinander getrennten Bereichen (Pfeilspitzen). Auch die ORN46a (J) und ORN71a (H) Glomeruli grenzen sich in *sema1a* Mutanten nicht klar von benachbarten Glomeruli ab. Doppelmarkierungen beider Klassen zeigen, daß sich ihre Axone durchmischen. In der 3D-Rekonstruktion (L) ist keine scharfe Grenze zwischen dem von ORN46a (grün) und dem von ORN71a (rot) innervierten Glomerulus zu erkennen. Genotypen: (A, C, E, G, I) *eyFLP, FRT40/ FRT40 CycE; OR-Gal4 UAS-sytGFP/+* (B, D, F, H, J) *eyFLP, sema^{V2-13} FRT40/ FRT40 CycE; OR-Gal4 UAS-sytGFP/+* (K) *eyFLP, FRT40/ FRT40 CycE; OR71a-Gal4 UAS-CD2 OR46a::sytGFP/+* (L) *eyFLP, sema^{V2-13} FRT40/ FRT40 CycE; OR71a-Gal4 UAS-CD2 OR46a::sytGFP/+*, verwendete OR-Gal4 Linien: (A-B) OR42a-Gal4 (C-D) OR59c-Gal4 (E-F) OR85e-Gal4 (G-H) OR71a-Gal4 (I-J) OR46a-Gal4. Antikörperfärbungen: (A-J) α -GFP (grün), α -Nc82 (rot) und toto3 (blau) (K-L) α -GFP (grün) und α -CD2 (rot).

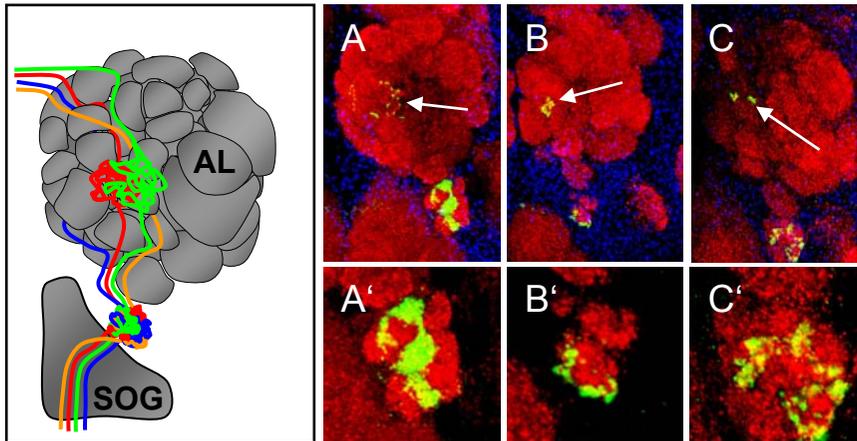


Abb. 21: Der Verlust der *sema1a* Funktion in maxillaren ORN-Klassen (2). Maxillare ORN Axone müssen auf dem Weg zu ihrem Zielgebiet im AL zunächst das SOG durchqueren (siehe Schema). In *sema1a* Mutanten kommt es in einigen Fällen zur Bildung ectopischer glomerulärer Strukturen unterhalb des AL. Die Axone der verschiedenen ORN-Klassen stoppen nach Austritt aus dem SOG und es kommt zur Akkumulation von Axontermini der verschiedenen ORN-Klasse. Einige Axone projizieren dennoch in ihre Zielregion im AL (Pfeile in A-C). Genotypen: (A) *eyFLP, sema^{V2-13} FRT40/ FRT40 CycE; OR85e-Gal4 UAS-sytGFP/+* (B) *eyFLP, sema^{V2-13} FRT40/ FRT40 CycE; OR71a-Gal4 UAS-sytGFP/+* (C) *eyFLP, sema^{V2-13} FRT40/ FRT40 CycE; OR46a-Gal4 UAS-sytGFP/+* (A'-C') sind Vergrößerungen der ectopischen Strukturen in (A-C). Die hier gezeigten Präparate wurden alle mit α -GFP (grün), α -Nc82 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

α -NCad-Antikörper nachgewiesen werden. Auffallend ist, daß auch hier die ORN-Axone nicht zu kompakten, ektopischen Strukturen konvergieren. Vielmehr scheint es sich um Ansammlungen ektopischer Axontermini der verschiedenen ORN-Klassen zu handeln.

3.2.2 Klassen-spezifische Erkennung *sema1a* mutanter ORN Axone

Eine wesentliche Eigenschaft der axonalen Konvergenz im AL ist, daß jeder Glomerulus nur von einer ORN-Klasse innerviert wird. Für die Klassen ORN21a, ORN47b und ORN67b wurde die Konvergenz von Axonen in ektopische, glomeruläre Strukturen beobachtet. Es stellt sich die Frage, ob die fehlprojizierenden Axone dieser Klassen in einen neuen Glomerulus konvergieren oder, ob sie den Zielglomerulus einer anderen ORN-Klasse innervieren, d.h. ihre synaptische Spezifität aufgehoben ist. Hierzu wurde zunächst der Projektionsdefekt der Klasse ORN47b untersucht.

3.2.2.1 Analyse ektopischer ORN47b Glomeruli im AL

Kommt es in den *sema1a* Mosaik-Gehirnen zur Konvergenz von ORN47b Axonen in einen ektopischen Glomerulus, so ist dieser stets dorsal zum eigentlichen Ziel-Glomerulus lokalisiert. Die differentielle Markierung der Klassen ORN47b und ORN43a (Abbildung 22 A-C) zeigt, daß der ektopische Glomerulus direkt unterhalb des ORN43a Glomerulus liegt. Die beiden Glomeruli grenzen sich jedoch deutlich voneinander ab. Es konnte in keinem der analysierten Mosaik-Gehirne eine Co-Konvergenz der beiden ORN-Klassen beobachtet werden. Auch die Analyse der Doppelmarkierung von ORN47b und ORN88a Axonen ergab keine Konvergenz der beiden Klassen in gemeinsame Bereiche (Abb. 22 D-F). Zudem wird deutlich, daß im Fall eines elongierten oder auch ektopischen ORN47b Glomerulus der ORN88a Glomerulus ebenfalls eine veränderte Form aufweist. Kommt es zu einem Typ1-Konvergenzdefekt der ORN88a Axone (F), ist auch hier stets die deutliche Sortierung von Axonen der beiden Klassen in getrennte Bereiche zu beobachten.

3.2.2.2 Analyse ektopischer ORN21a Glomeruli im AL

In *sema1a* Mutanten konvergieren ORN21a Axone häufig in einen kompakten, ektopischen Glomerulus, der neben dem eigentlichen V-Glomerulus lokalisiert ist. Die Linien *con-Gal4* und *MT14-Gal4* sind in einem Großteil der ORN-Klassen exprimiert, die dem V-Glomerulus benachbart sind. Die Analyse der differentiellen Markierung von ORN21a Axonen und den benachbarter ORN-Klassen zeigt deutlich, daß *sema1a*^{V2-13} mutante ORN21a Axone nicht mit *con*- oder *MT14*-positiven ORN-Klassen in gemeinsame Bereiche konvergieren (Abbildung 23). Im Wildtyp ragt der von ORN21a Axonen innervierte

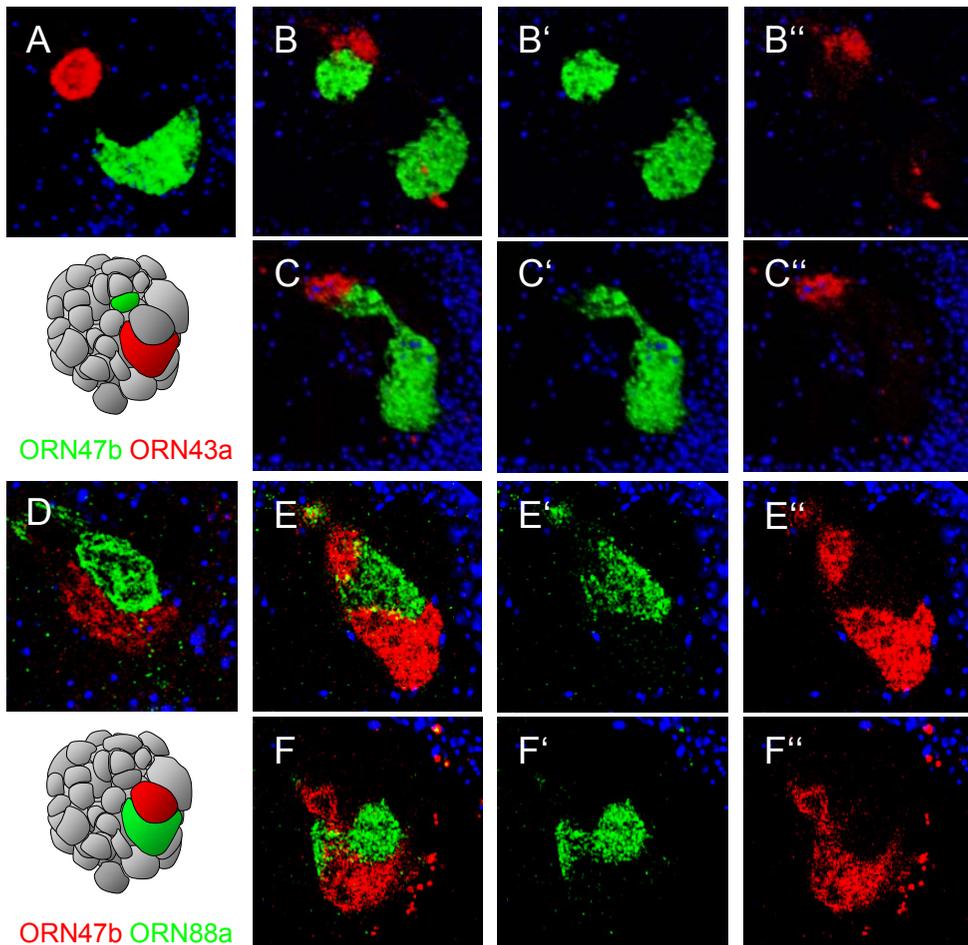


Abb. 22: Konvergenzdefekte *sema1a* mutanter ORN47b Axone. *sema1a* mutante ORN47b Axone konvergieren häufig in eine ektopische glomeruläre Struktur die dorsal über dem eigentlich von ORN47b innervierten VA1v-Glomerulus liegt. In dieser Region liegt im Wildtyp (A) auch der ORN43a Glomerulus. Der ektopische ORN47b Glomerulus liegt direkt angrenzend zu diesem Glomerulus (B und C). Die Axone beider Klassen sortieren sich jedoch deutlich voneinander aus und konvergieren nicht in gemeinsame Bereiche. Dorsal zum ORN47b Glomerulus liegt der ORN88a Glomerulus (Wildtyp in D). In *sema1a* Mutanten liegen ORN88a Axone zwischen dem dorsalen, ektopischen ORN47b Glomerulus dem eigentlichen ORN47b Zielglomerulus. Auch in den Fällen, in denen ORN88a Axone einen „Typ1-Konvergenzdefekt“ zeigen (F), ist keine Co-Konvergenz von Axonen beider Klassen zu beobachten. Genotypen: (A) *eyFlp; OR47b::syGFP FRT40/ CycE FRT40; OR43a-Gal4 UAS-CD2*. (B-C) *eyFlp; OR47b::syGFP sema-1a^{V2-13} FRT40/ CycE FRT40; OR43a-Gal4 UAS-CD2* (D) *eyFlp; FRT40/ CycE FRT40; OR88a::CD8GFP OR47b-Gal4 UAS-CD2* (E-F) *eyFlp; sema-1a^{V2-13} FRT40/ CycE FRT40; OR88a::syGFP OR47b-Gal4 UAS-CD2*. (B'-F') und (B'' und F'') zeigen jeweils den grünen bzw. roten Kanal aus den Projektionen (B-F). Alle AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

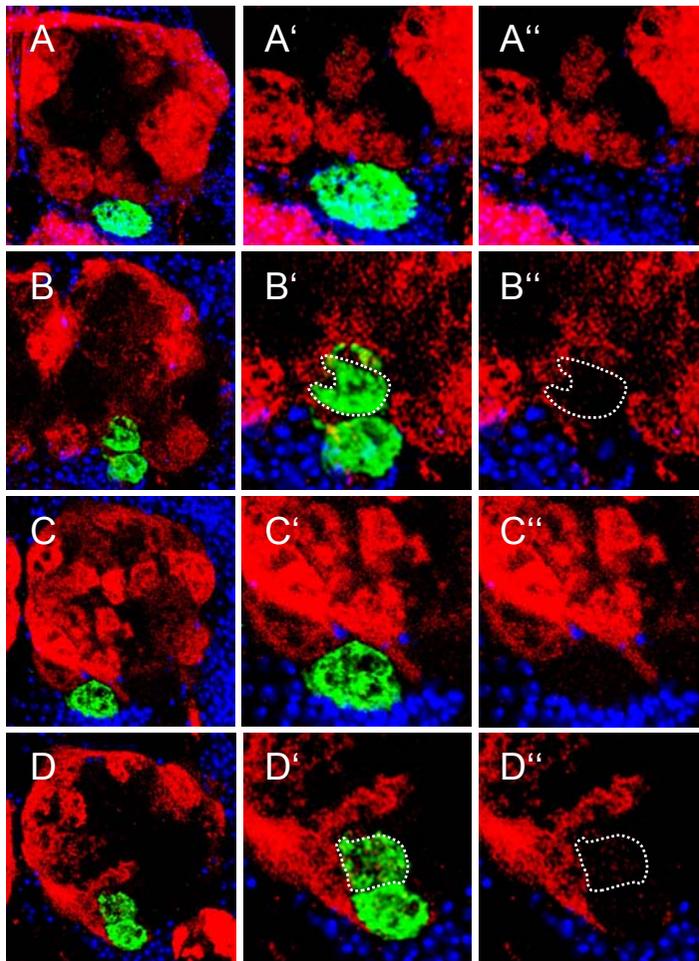


Abb. 23: *sema1a* mutante ORN21a Axone konvergieren in einen neuen ektopischen Glomerulus. Die Linie *con-Gal4* innerviert nicht den von ORN21a-Axonen innervierten V-Glomerulus (Wildtyp in A). In *sema1a* Mutanten (B) konvergieren die ORN21a Axone in einen zweiten ektopischen Glomerulus (weiße Markierung in B'-B''). Dieser ektopische Glomerulus wird nicht von *con* positiven ORNs co-innerviert. Markiert man mit Hilfe von *MT14-Gal4* einen anderen Teil von ORN-Klassen, die dem ORN21a Glomerulus benachbart sind (Wildtyp in C), so zeigt sich auch hier im *sema1a* mutanten Hintergrund, daß sich der ektopische ORN21 Glomerulus (Markierung in D'-D'') zwischen die benachbarten Glomeruli schiebt und kein schon vorhandener Glomerulus innerviert wird. (A'-D') sind Ausschnittsvergrößerungen aus (A-D). (A''-D'') zeigen den roten Kanal aus (A'-D'). Genotypen: (A) *eyFLP; OR21a::syGFP FRT40/ CycE FRT40; con-Gal4 UAS-CD2* (B) *eyFLP; sema1a OR21a::syGFP FRT40/ CycE FRT40; con-Gal4 UAS-CD2* (C) *eyFLP; OR21a::syGFP FRT40/ CycE FRT40; MT14-Gal4 UAS-CD2* (D) *eyFLP; sema1a OR21a::syGFP FRT40/ CycE FRT40; MT14-Gal4 UAS-CD2*. Alle abgebildeten AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und *toto3* (blau) gefärbt.

V-Glomerulus am ventralen Rand aus dem AL (A). Seine nächsten benachbarten Glomeruli sind *con* positiv. Der ektopische ORN21a Glomerulus in den *sema1a^{V2-13}* Mutanten ist oberhalb des V-Glomerulus, inmitten der *con*-positiven Glomeruli lokalisiert. Die *con*-positiven ORNs scheinen ihre Position im AL verändert zu haben (B).

3.2.3 Expression des SEMA1a Proteins im olfaktorischen System

Die Analyse von *Minute*-Klonen verschiedener ORN-Klassen zeigte, daß der Verlust der *sema1a*-Funktion nicht in allen analysierten Klassen einen mutanten Phänotyp verursacht. Um zu klären, ob das SEMA1A Protein möglicherweise in einigen ORN-Klassen nicht exprimiert ist, wurde mit Hilfe eines α -SEMA1A-Antikörpers zunächst die Expression im olfaktorischen System analysiert. Der α -SEMA1A-Antikörper markiert in den peripheren olfaktorischen Sinnesorganen die Faszikel der sensorischen Neurone, die aus den Sensillen in Richtung Gehirn projizieren (Pfeile in Abbildung 24 A und C). Im Bereich der Dendriten und Zellkörper der ORNs ist hingegen nur eine punktuelle Markierung zu sehen (B und D). Das SEMA1A Protein scheint somit hauptsächlich in den Axonen der einwachsenden ORNs lokalisiert zu sein.

3.2.3.1 Lokalisation des SEMA1A Proteins in *sema1a^{V2-13}* und *sema^{P1}* mutanten ORNs

Um zu klären, ob es in für *sema1a^{V2-13}* homozygot mutante ORNs zu einer Reduktion oder dem Verlust des Proteins kommt, wurde das Mosaik-Gewebe von MARCM-Klonen analysiert. Die α -SEMA1A-Färbung von pupalen Antennen mit MARCM-Klonen zeigt eine deutliche Reduktion der Markierung in den Faszikeln. Auffällig ist die starke Markierung der ORN-Zellkörper in der Antenne (Pfeil in Abbildung 25 C''). Anscheinend kommt es in *sema^{V2-13}* mutanten ORNs zu einer Fehllokalisierung des Proteins. Im Vergleich dazu wurde die Verteilung des SEMA1A Proteins in *sema^{P1}* mutanten ORNs analysiert. Hier ist lediglich eine schwache Markierung der Faszikel zu erkennen (Pfeilspitze in B und Pfeil in D). Die Zellkörper der *sema^{P1}* mutanten ORNs zeigen keine Markierung.

3.2.3.2 Differentielle Expression von SEMA1A während der pupalen Entwicklung

Die Untersuchung von α -SEMA1A-Färbungen an Antennen und Maxillarpalpen ergab, daß das SEMA1A Protein in den Axonen der sensorischen Neurone exprimiert wird. Die Axone der verschiedenen ORN-Klassen projizieren aus der Antenne in den AL, wo sie in ihre spezifischen Zielglomeruli konvergieren. Um zu überprüfen, ob auch im AL das SEMA1A

Protein in den Axonen detektierbar ist, wurden α -SEMA1A-Färbungen an Gehirnen untersucht.

In adulten Gehirnen konnte mit dem Antikörper keine SEMA1A Expression nachgewiesen werden. Das Protein scheint also temporär in der Entwicklung exprimiert zu werden. Die Analyse pupaler AL unterschiedlichen Alters ergab eine differentielle Expression von SEMA1A in den verschiedenen Glomeruli. Abbildung 26 zeigt die Antikörperfärbung mit α -SEMA1A von pupalen Gehirnen. Bereits 35h APF ist eine deutliche Expression von SEMA1A im dorso-lateralen AL zu sehen. Bei etwa 45-50h APF lassen sich einige der Landmark-Glomeruli bereits anhand ihrer Position und Morphologie unterscheiden (Beschriftungen in D''). Die Glomeruli DL3, DA1, VA1d und VA1v zeigen eine starke Expression des SEMA1A Proteins. Im Vergleich dazu ist das SEMA1A-Signal in DA4m und DA4l etwas schwächer. Die Expression im DA3 Glomerulus ist noch schwächer (Pfeilspitze in D'). Besonders auffällig ist, daß der von ORN21a Axonen innervierte V-lomerulus fast keine Expression von SEMA1A zeigt (Markierung in E₁ und F₁). Die dorsal über dem V-Glomerulus liegenden Glomeruli zeigen hingegen eine starke Expression.

Um zu klären, ob die unterschiedlichen Expressions-Niveaus in den Glomeruli mit dem Auftreten eines *sema1a* Verlust-Phänotyps korrelieren, wurden Phänotypen und Stärke des SEMA1A-Signals der verschiedenen ORN-Klassen miteinander verglichen. Tabelle 12 zeigt die Zusammenstellung der Ergebnisse.

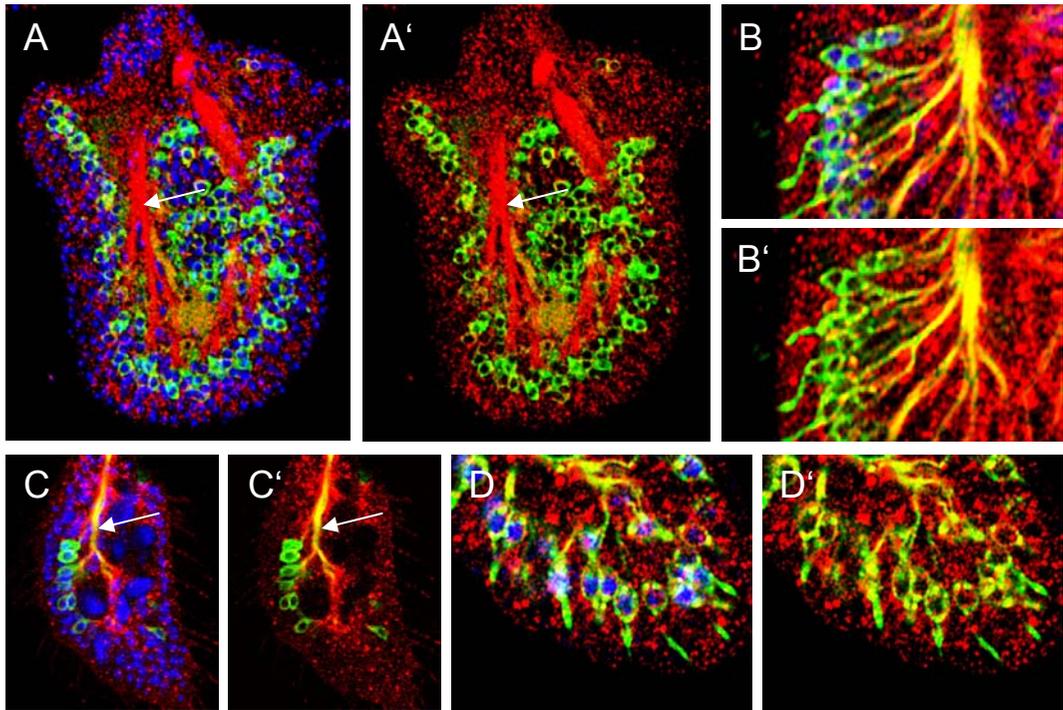


Abb. 24: Sema1a Expression in den peripheren olfaktorischen Sinnesorganen. Die hier gezeigten pupalen, olfaktorischen Sinnesorgane, Antenne (A-B) und Maxillarpalpus (C-D), wurden mit einem Antikörper gegen Sema1a (rot) gefärbt. Um einen Teil der antennalen und maxillaren ORNs zu Markieren wurde die Linie *Sg18.1-Gal4 UAS-CD8GFP* verwendet. Die Sema1a Expression ist am deutlichsten in den Faszikeln zu sehen (Pfeil in A-A' und C-C'). Innerhalb der Zellkörper der antennalen (B) und maxillaren ORNs (D) ist lediglich eine punktuelle Markierung zu erkennen. Das Sema1a Protein ist hauptsächlich in den Axonen der ORNs lokalisiert. Antikörperfärbung: α -GFP (grün), α -Sema1a (rot) und toto3 (blau). In (A'-D') ist der blaue Kanal aus (A-D) ausgeblendet.

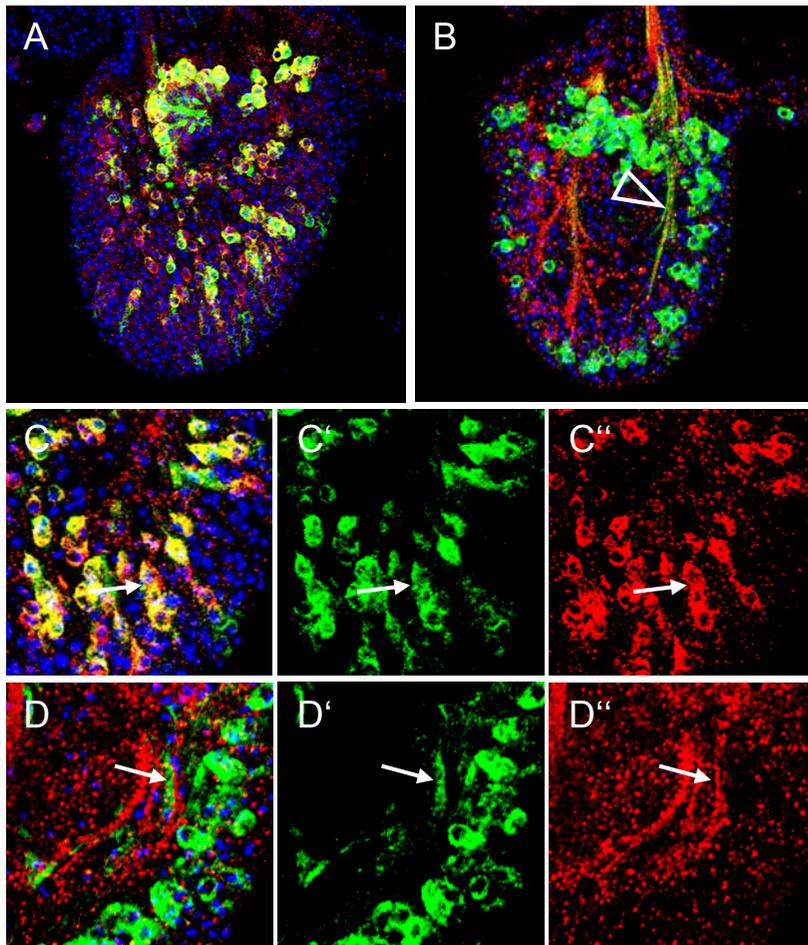


Abb. 25: Die Lokalisation des Sema1a Proteins im *sema1a* mutanten Hintergrund. Die Abbildungen zeigen MARCM-Klone der Allele *sema1a^{V2-13}* (A, C) und *sema1a^{P1}* (B, D) in pupalen Antennen. Die homozygot mutanten ORNs sind mit GFP (grün) markiert. Nach Antikörperfärbung mit α -Sema1a (rot) zeigt *sema1a^{V2-13}* eine deutliche Markierung der ORN-Zellkörper (Pfeil in C-C''). Vergleicht man damit die Antikörperfärbung des *sema1a^{P1}*-Alleles, so ist hier eine deutliche Färbung der Faszikel zu sehen (Pfeilspitze in B und Pfeil in D-D''). Die Zellkörper zeigen hingegen keine α -Sema1a-Färbung. Genotypen: (A) *eyFLP; sema1a^{V2-13}/FRT40; elav-Gal4 UAS-CD8GFP/+* (B) *eyFLP; sema1a^{P1}/FRT40; elav-Gal4 UAS-CD8GFP/+* Antikörperfärbung: α -GFP (grün), α -Sema1a (rot) und toto3.

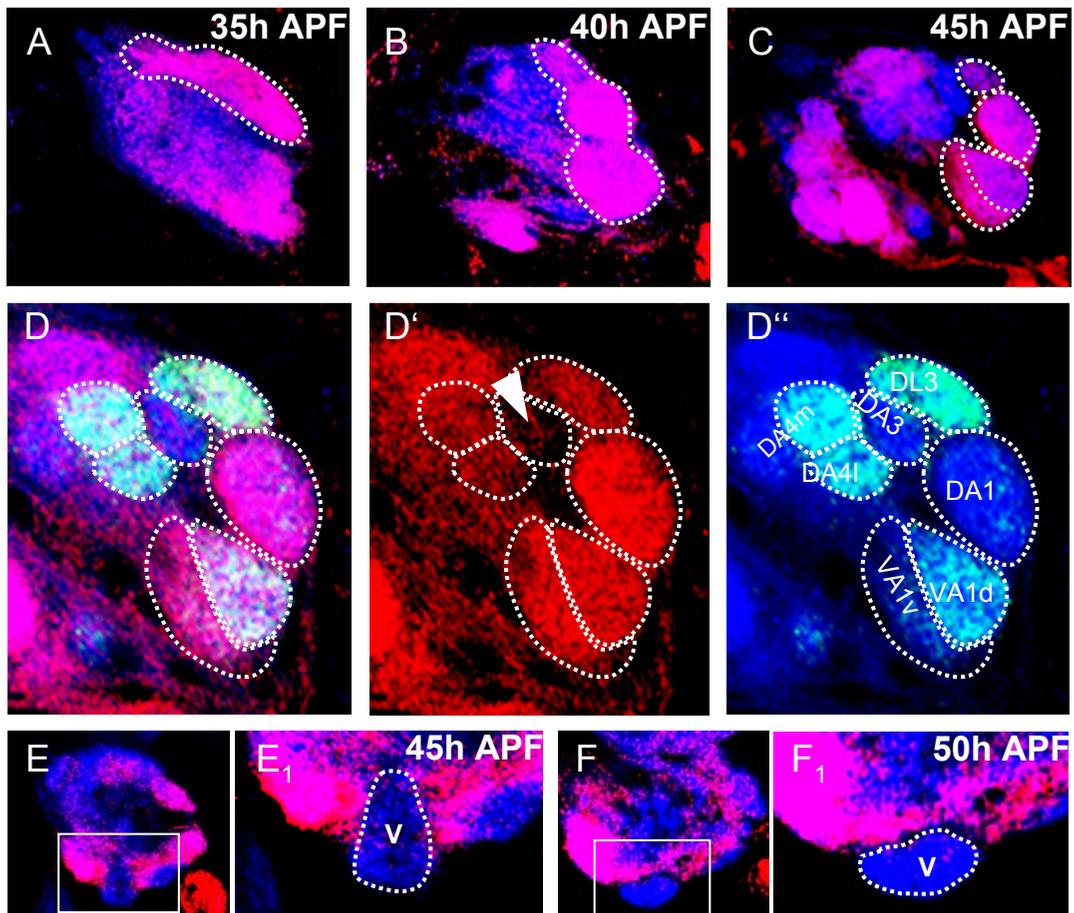


Abb. 26: Differentielle Expression von Sema1a im antennalen Lobus. Die Expression des Sema1a Proteins lässt sich mittels eines Antikörpers im sich entwickelnden AL nachweisen. Während der pupalen Entwicklung unterliegt der AL großen morphologischen Veränderungen: bei 35h APF wird zunächst nur eine breite anterior-lateral liegende Domäne sichtbar (Markierung in A), aus der sich nach weiteren 5h einzelne glomeruläre Strukturen „abschnüren“ (Markierung in B). Bei etwa 50h APF lassen sich erste Glomeruli anhand ihrer Morphologie bestimmen (Markierungen in C-D und Beschriftungen in D''). Das GFP-Signal (grün) markiert *con*-positive Glomeruli, was zur Identifizierung einzelner Glomeruli beiträgt. In den Glomeruli DL3, DA1, VA1d und VA1v ist eine deutliche Expression des Sema1a Proteins zu sehen. Im Vergleich dazu ist die Expression in DA4m und DA4l etwas schwächer. Im DA3 Glomerulus ist nur eine geringe Expression zu sehen (Pfeilspitze in D'). Der V-Glomerulus (Markierungen in E₁ und F₁) zeigt fast keine Expression von Sema1a. Der Glomerulus liegt bei etwa 45h APF zunächst zwischen Glomeruli mit hoher Sema1a Expression (E-E₁), bei 50h APF jedoch unterhalb dieser Glomeruli (F-F₁). (E₁-F₁) sind Ausschnittsvergrößerungen aus (E-F). Die hier gezeigten pupalen AL wurden mit α -Ncad (blau), α -Sema1a (rot) und α -GFP (grün) gefärbt.

Tab. 12: Vergleich der glomerulären SEMA1A Expression und den Verlust-Phänotypen verschiedener ORN-Klassen.

	Glomerulus	Klasse	Phänotyp
Starke SEMA1A Expression	VA1v	ORN 47b	Typ 2
	DL3	ORN 49a	Wildtyp
	VA5	ORN 49b	Typ 1
	VA3	ORN 67b	Typ 2
	VA1d	ORN 88a	Typ 1
	VA2	ORN92a	Wildtyp
Mittlere SEMA1A Expression	DC1	ORN19a	Typ 1
	DL3	ORN65a	Wildtyp
	DC3	ORN83c	Typ 1
Schwache SEMA1A Expression	V	ORN21a	Typ 2
	DA3	ORN23a	Wildtyp
	DM2	ORN22a	Wildtyp
	DM1	ORN42b	Wildtyp
	DA4l	ORN43a	Typ 1
	VA7m/l	ORN46a	Typ 1
	DM3	ORN47a	Wildtyp

Der Vergleich zwischen Expressions-Stärke und Art des Phänotyps ergibt jedoch keinen offensichtlichen Zusammenhang. So zeigen z.B. einige der ORN-Klassen mit einer starken SEMA1A Expression keinen Phänotyp in den *Minute*-Klonen. Ebenso gibt es auch ORN-Klassen, in denen nur eine schwache Expression beobachtet wurde, die jedoch einen Konvergenzdefekt in *Minute*-Klonen zeigen.

3.2.4 Entwicklung des Konvergenzdefekts in *sema1a* Mutanten

Das SEMA1A Protein ist im Wildtyp in den Axonen der unterschiedlichen ORN-Klassen exprimiert. In *Minute*-Klonen mit *sema1a*^{V2-13} scheint das Protein in den mutanten Axonen zu fehlen (Vergleiche 3.2.3.1). Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle SEMA1A für die korrekte Projektion und Konvergenz der Axone spielt und wann die SEMA1A Funktion hier wichtig wird. Hierzu wurde im Folgenden der Typ 2-Konvergenzdefekt der Klasse ORN47b im Verlauf der pupalen Entwicklung analysiert. Die Linie *con*-Gal4 markiert bereits in der frühen pupalen Entwicklung die dorso-lateralen Landmark-Glomeruli der Klassen ORN47b, ORN88a und ORN43a. Abbildung 27 zeigt die Entwicklung des dorso-lateralen AL im Wildtyp und in MARCM-Klonen mit *sema1a*^{V2-13}.

Bei 35-40h APF sind im Wildtyp längliche *con*-positive Domänen zu sehen (A). Die Grenzen des ORN47b Glomerulus sind zunächst nicht zu erkennen. Die α -NCAD-Färbung zeigt in der länglichen Domäne jedoch erste Einschnürungen, aus denen später die Glomeruli DA4m und DA4l entstehen (Pfeile in A'). Nach etwa 5h werden die glomerulären Grenzen der verschiedenen ORN-Klassen sichtbar. Der ORN47b Glomerulus wirkt zunächst stark elongiert und umfaßt größtenteils den dorsal liegenden ORN88a Glomerulus (gestrichelte Markierungen in B'). Im weiteren Verlauf der Entwicklung zieht sich die dorso-mediale Spitze des ORN47b Glomerulus nach ventral zurück (Pfeil in C), sodaß der ORN47b und ORN88a Glomerulus untereinander liegen.

Die Analyse der MARCM-Klone für *sema1a*^{V2-13} ergab in der frühen pupalen Entwicklung zunächst keine Unterschiede zum Wildtyp. Auch hier formieren sich aus einer breiteren Domäne nach und nach kompakte glomeruläre Strukturen, bis schließlich auch die glomerulären Grenzen des ORN47b und ORN88a Glomerulus sichtbar werden. Im Gegensatz zum Wildtyp setzt hier nach 50h APF jedoch nicht die Retraktion des ORN47b Glomerulus ein. Die dorso-mediale Spitze des Glomerulus bleibt stets auf gleicher Höhe mit der dorsalen Grenze des ORN88a Glomerulus (Pfeilspitzen in F'-H'). SEMA1A scheint also bei der Sortierung von ORN-Axonon in ihre Protoglomeruli und der anschließenden Konvergenz in kompakte Glomeruli zu wirken.

3.2.5 Analyse von MARCM-Klonen mit *sema1a*^{V2-13}

In den bisher analysierten *Minute*-Klonen war der Großteil der ORN-Axone, die in den AL projizieren, homozygot mutant für *sema1a*^{V2-13}. In Klonen ohne eine Gegenselektion mit der Zell-letalen *Minute* Mutation ist der Anteil homozygot mutanter Axone jedoch geringer. Es stellt sich die Frage, ob ein verändertes Verhältnis von mutanten zu wildtypischen Axonen einen Einfluß auf die Ausprägung des Phänotyps hat.

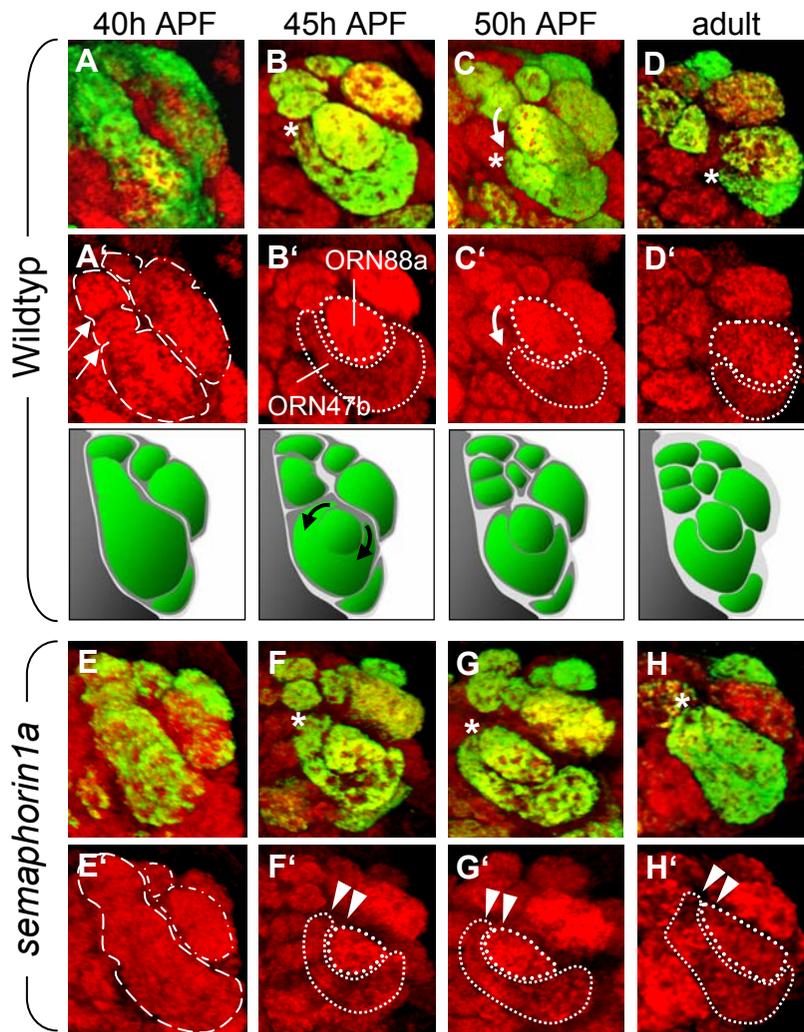


Abb. 27: Entwicklung des antero-lateralen Glomerulus-Komplexes in *sema1a* mutanten Fliegen. Bei etwa 35-40h APF werden zunächst längliche Domänen sichtbar, in denen sich einzelne glomeruläre Strukturen nur schwer erkennen lassen. Zunächst sind nur „Einschnürungen“ zu erkennen (Pfeile in A') aus denen später die Glomeruli DA4m und DA4l entstehen. In (B-D) ist dargestellt, wie sich die dorsomediale Spitze des ORN47b Glomerulus (Sternchen) im Lauf der Entwicklung nach ventral zurückzieht (Pfeil in C und C'). In (B'-D') sind die Umrisse der Glomeruli ORN47b und ORN88a gekennzeichnet. Die Schemazeichnungen fassen die Wildtyp-Entwicklung nochmals zusammen. In *sema1a* Mutanten sind zunächst auch die breiten Neuropil-Domänen sichtbar (Markierungen in E'). Im Verlauf der weiteren Entwicklung zieht sich der ORN47b Glomerulus jedoch nicht zurück. Die dorsomediale Spitze des ORN47b und des darin eingefaßt liegenden ORN88a Glomerulus liegen dicht nebeneinander (Pfeilspitzen in F'-H' und Sternchen in F-H). Genotypen: (A-D) *eyFLP; FRT40/ FRT40 Gal80; con-Gal4 UAS-sytGFP/ TM2* (E-H) *eyFLP;sema1a^{V2-13} FRT40/ FRT40 Gal80; con-Gal4 UAS-sytGFP/TM2*. Die hier dargestellten pupalen AL sind 3D-Rekonstruktionen. Alle gezeigten Gehirne wurden mit α -GFP (grün) und α -Ncad (rot) gefärbt.

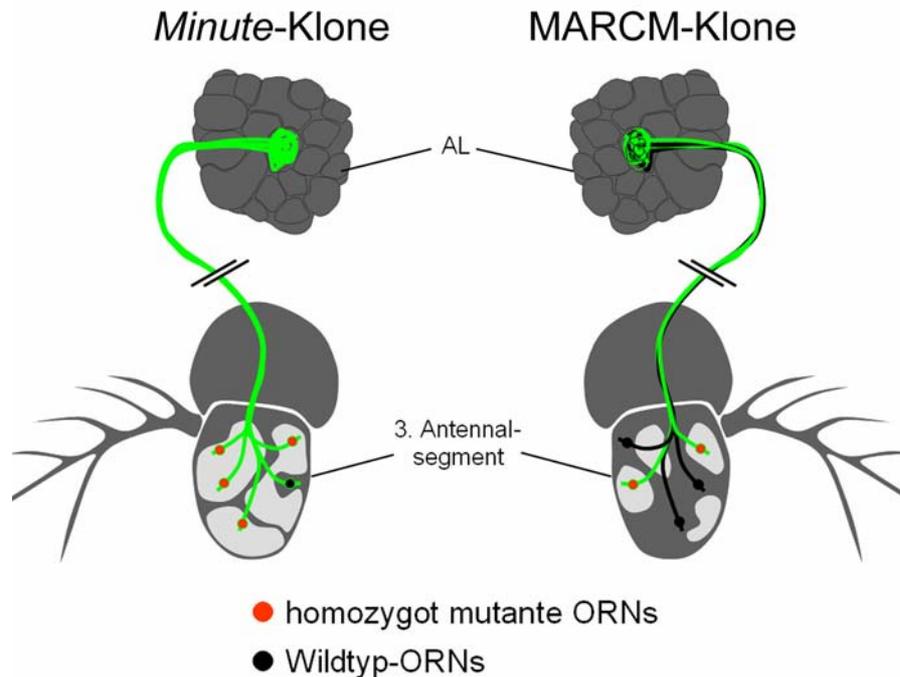


Abb. 28: Vergleich von *Minute*- und MARCM-Klonen.

Das Schema in Abbildung 28 zeigt den Vergleich von Mosaik-Gewebe in *Minute*- und MARCM-Klonen (mosaic analysis with a repressible cell marker). MARCM-Klone sind im Vergleich zu *Minute*-Klonen deutlich kleiner. Während in *Minute*-Klonen alle ORNs markiert sind, ist es in MARCM-Klonen möglich selektiv die homozygot mutanten ORNs zu markieren (Lee and Luo, 2001). Hierzu wird, anstelle der *Minute* Mutation, ein ubiquitär exprimiertes Gal80 Transgen ($P\{tub-Gal80\}$) auf dem FRT-Chromosom verwendet. Nach der Flipase-induzierten mitotischen Rekombination entstehen neben homozygot mutanten ORNs auch Zellen, die homo- oder heterozygot für das Gal80 Transgen sind. Das exprimierte Gal80 Protein unterdrückt die Gal4 abhängige Expression des UAS-*GFP* Reporters.

Abbildung 29 zeigt die Analyse von MARCM-Klonen in *sema1a* Mutanten. Für mutante ORN21a Axone konnte, wie auch in *Minute*-Klonen, die Konvergenz in ektopische Glomeruli beobachtet werden (B). Auch die Klassen ORN88a (L), ORN46a (Q) und ORN59c (V) zeigen in MARCM-Klonen Phänotypen, die denen der *Minute*-Klone ähnlich sind. Mutante ORN47b Axone konvergieren hier jedoch nur in einen elongierten Glomerulus (G). In keinem der analysierten Mosaik-Gehirne wurde ein dorsal liegender, ektopischer ORN47b Glomerulus gefunden.

3.2.6 Analyse reverser MARCM-Klone und Einzel-Zell-Klone

Durch Rekombination des Gal80 Transgens auf das Chromosom mit der *sema*^{V2-13} Mutation, wird die Aktivierung des UAS-*GFP* Konstrukts in den homozygot *sema1a* mutanten ORNs unterdrückt. Auf diese Weise werden selektiv die Wildtyp-Axone im klonalen Gewebe

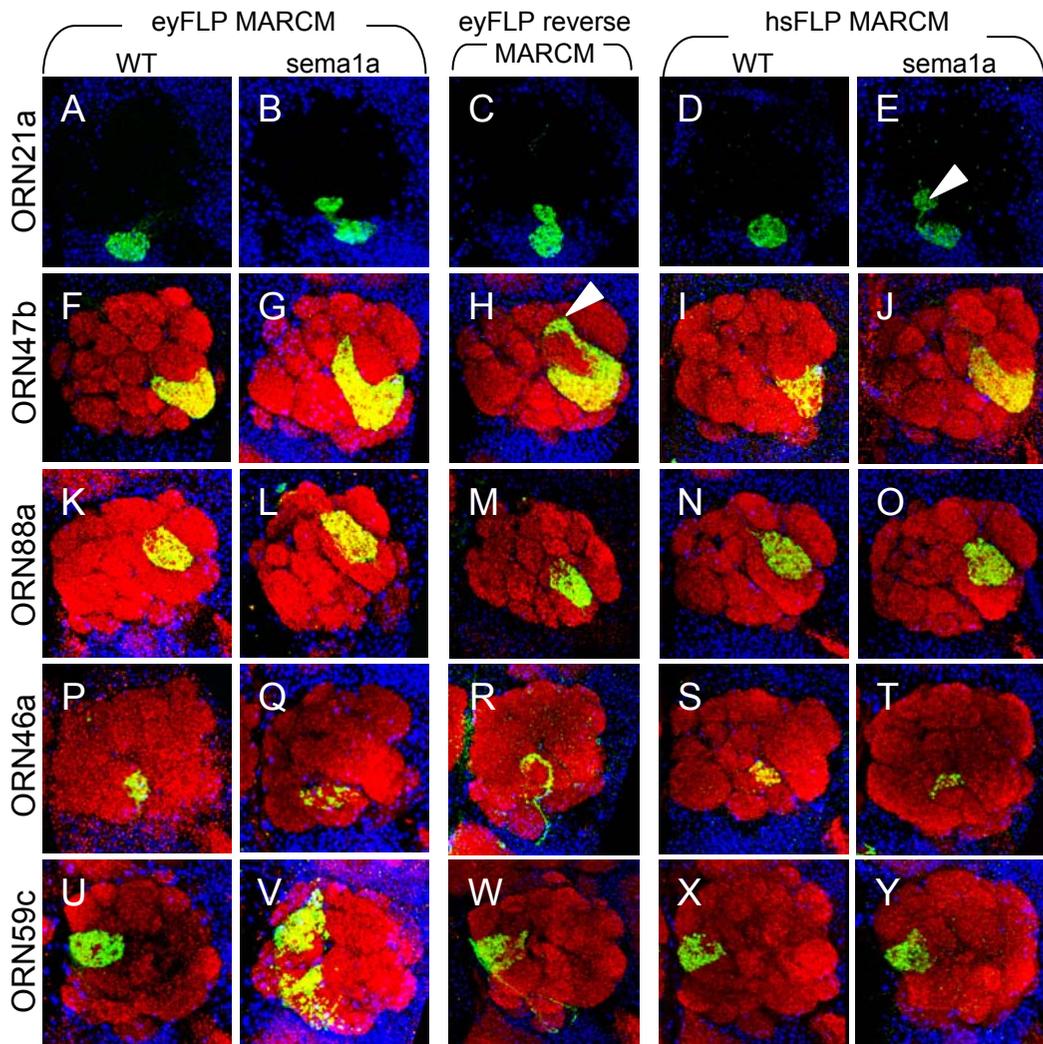


Abb. 29: Selektive Markierung wildtypischer und mutanter Axone im *sema1a* Klonen. In MARCM-Klonen (zweite Spalte) werden ausschließlich homozygot *sema1a*-mutante Axone markiert. Hier zeigen sich deutliche Konvergenzdefekte (B-V). Für mutante ORN47b Axone konnte lediglich die Konvergenz in einen elongierten Glomerulus beobachtet werden (G). Die Markierung der wildtypische Axone (dritte Spalte) zeigt, daß diese an den Konvergenzdefekten beteiligt sind. Der Phänotyp von ORN47b Axonen ist in reversen MARCM-Klonen sogar stärker (Pfeilspitze in H), als in MARCM-Klonen. Bei Verlust der *sema1a* Funktion in einzelnen, wenigen Zellen (*hsFLP*-Klone) zeigt nur die Klasse ORN21a die Konvergenz in einen ektopischen Glomerulus (Pfeilspitze in E). Die anderen untersuchten Klassen zeigen hier keinen mutanten Phänotyp. Genotypen: (A, F, K, P, U) *eyFLP; FRT40/ FRT40 Gal80; OR-Gal4 UAS-sytGFP* (B, G, L, Q, V) *eyFLP; sema1a^{V2-13} FRT40/ FRT40 Gal80; OR-Gal4 UAS-sytGFP* (C, H, M, R, W) *eyFLP; sema1a^{V2-13} FRT40 Gal80/ FRT40; OR-Gal4 UAS-sytGFP* (D, I, N, S, X) *hsFLP; FRT40/ FRT40 Gal80; OR-Gal4 UAS-sytGFP* (E, J, O, T, Y) *hsFLP; sema1a^{V2-13} FRT40/ FRT40 Gal80; OR-Gal4 UAS-sytGFP*. Verwendete OR-Gal4 Linien: (A-E) OR21a-Gal4 mit UAS-CD2; (F-J) OR47b-Gal4; (K-O) OR88a-Gal4; (P-T) OR46a-Gal4; (U-Y) OR59c-Gal4. Antikörperfärbungen: (A-E) α -CD2 (grün) und toto3 (blau); (F-Y) α -GFP (grün), α -NC82 (rot) und toto3 (blau).

markiert. Die Analyse dieser ‚reversen MARCM-Klone‘ zeigt, daß auch wildtypische Axone nicht mehr richtig in die verschiedenen Glomeruli konvergieren (Abbildung 29). Für alle der hier untersuchten Klassen konnte ein mutanter Phänotyp beobachtet werden, der meist dem Phänotyp im MARCM-Klon vergleichbar ist. Der Verlust der *sema1a* Funktion in einigen ORN-Axonon beeinflusst somit auch die Projektion der wildtypischen Axone im Klon.

Für die wildtypischen ORN47b Axone in *sema*^{V2-13}-Klonen konnte sogar ein stärkerer Konvergenzdefekt als in den herkömmlichen MARCM-Klonen beobachtet werden. In den hier analysierten reversen MARCM-Klonen lassen sich immer wieder separate ektopische Glomeruli dorsal zum eigentlichen Zielglomerulus finden (Pfeilspitze in H). Der in *sema1a* Mutanten beobachtet ektopische Glomerulus scheint weniger von mutanten Axonen innerviert zu werden, vielmehr wird dieser von einem erheblichen Anteil wildtypischer Axone innerviert. Dies weist auf eine nicht zellautonome Funktion von *sema1a* in der Sortierung der Axone hin.

Die Analyse vereinzelter, homozygot mutanter ORNs, die durch *hsFLP* induzierte Rekombination generiert wurden, zeigt für die meisten der analysierten ORN-Klassen keine mutanten Phänotypen. Der Verlust von SEMA1A in einem Axon führt also nicht automatisch zu einer Fehlprojektion desselben. Lediglich für ORN21a konnten einzelne Axone beobachtet werden, die in eine ektopische Struktur projizieren (Pfeilspitze in Abb. 29 E). Möglicherweise besitzt *sema1a* in dieser Klasse auch zellautonome Eigenschaften.

3.2.7 Verschaltung homozygot *sema1a* mutanter ORNs mit den PN-Dendriten im antennalen Loben

Ähnlich wie die ORNs zeigen auch PNs ein spezifisches Innervationsmuster. Jedes PN projiziert seine Dendriten in einen bestimmten Glomerulus (Jefferis et al., 2001; Jefferis et al., 2004; Marin et al., 2005; Wong et al., 2002). Somit gehört zu jeder einzelnen ORN-Klasse mindestens ein spezifisches korrespondierendes PN. Die Klassen ORN21a und ORN47b zeigen in *Minute*-Klonen eine Konvergenz in ektopische, Klassen-spezifische Glomeruli, die in der Nähe des eigentlichen Zielglomerulus lokalisiert sind. Es stellt sich nun die Frage, ob diese ektopischen Glomeruli auch von den Dendriten der PNs innerviert werden?

Die Linie *GH146-Gal4* markiert einen Großteil der PNs im AL (Jefferis et al., 2001; Stocker et al., 1997). Der ORN47b Glomerulus wird im Wildtyp ebenfalls von *GH146*-positiven PNs innerviert. Abbildung 30 zeigt die Doppelmarkierung der Klasse ORN47b und den innervierenden PNs. In *Minute*-Klonen resultiert der Verlust der *sema1a* Funktion entweder in einem deutlich elongierten Glomerulus (B) oder aber in einem weiteren, ektopischen Glomerulus (C). Sowohl elongierte Glomeruli als auch ektopische Glomeruli werden deutlich von den fein verzweigten PN-Dendriten innerviert.

3.2.7.1 Spezifität der ORN-PN-Erkennung in ektopischen Glomeruli in *sema1a* Mutanten

Für die meisten ORN-Klassen ist beschrieben, daß ihr jeweiliger Glomerulus von mindestens einem spezifischen PN innerviert wird. Für den ORN47b positiven VA1v Glomerulus wurden bereits drei unterschiedliche PNs identifiziert, deren Dendriten in diesen Glomerulus projizieren (Marin et al., 2005). Die Untersuchungen zur Innervation ektopischer Glomeruli mit einem breiten Marker, wie der zuvor verwendeten *GH146*-Linie, läßt keine Aussage über die synaptische Spezifität zu, d.h. welches der PNs sich mit den ektopischen ORN-Axonon verschaltet. Die Linie *MZ19-Gal4* markiert eine kleinere Anzahl von PNs. Hier werden insgesamt sechs PNs aus dem dorsalen Zellcluster markiert, die in die Glomeruli VA1d und DC3 projizieren, sowie sieben weitere aus dem lateralen Zellcluster, die DA1 innervieren (Berdnik et al., 2006).

Die Analyse der Doppelmarkierung von ORN88a Axonen und den *MZ19*-positiven PNs in *Minute*-Klonen ergab keine auffälligen Unterschiede zur Innervation im Wildtyp. In einigen der untersuchten Mosaik-Gehirne ist jedoch eine Positionsverschiebung der Glomeruli im AL zu beobachten. Zwischen ORN88a- und DA1-Glomerulus bildet sich in einigen Fällen eine Lücke (Abbildung 31 Pfeil in B). Vergleicht man hierzu jedoch die Doppelmarkierung von *MZ19*-positiven PNs und den ORN47b Axonen, so wird deutlich, daß die beobachtete Positionsverschiebung mit dem Auftreten ektopischer ORN47b Axone im dorsalen Bereich korreliert (Pfeilspitze in F). In keinem der untersuchten Mosaik-Gehirne wurde eine Innervation ektopischer ORN47b Strukturen durch die markierten PNs entdeckt. Zumindest für die hier analysierten ORN- und PN-Klassen scheint die spezifische Erkennung im *sema1a* mutanten Hintergrund noch gegeben.

3.2.7.2 Innervation ektopischer Glomeruli durch LN-Dendriten in *sema1a* Mutanten

Glomeruli bestehen nicht nur aus den synaptischen Verschaltungen der ORN-Axone mit ihren korrespondierenden PNs, sie werden gleichermaßen von feinen dendritischen Verzweigungen der LN-Dendriten innerviert. Die Linie *C753-Gal4* markiert eine Gruppe von LNs, deren Zellkörper in drei großen Zellclustern neben dem AL angeordnet sind. Ihre Dendriten innervieren alle Glomeruli des AL und die feinen Verzweigungen der markierten Dendriten füllen die innervierten Glomeruli komplett aus.

Abbildung 32 zeigt die Doppelmarkierung *C753*-positiver LNs zusammen mit den ORN21a bzw. ORN47b Axonen in *Minute*-Klonen. Die Analyse der Mosaik-Gehirne ergab stets eine deutliche dendritische Innervation der ektopischen Strukturen (Pfeilspitzen in B₁ und D₁). Im Vergleich zur Innervation des eigentlichen Zielglomerulus ist kein Unterschied zu erkennen.

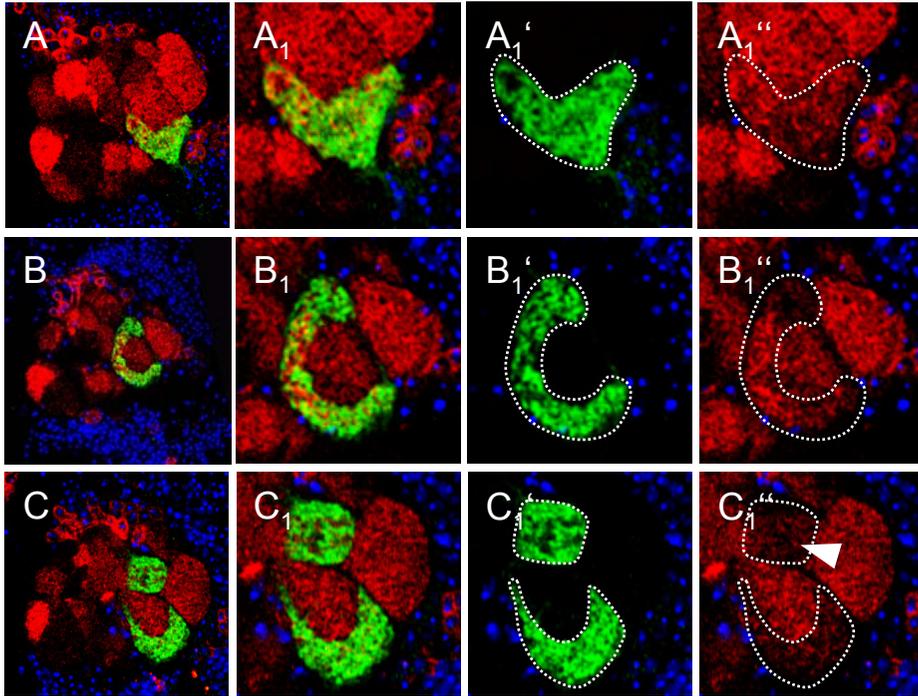


Abb. 30: Innervation verschiedener Glomeruli durch heterozygote PN-Dendriten und *sema1a* mutante ORNs (1). *GH146* positive PNs innervieren etwa 2/3 der Glomeruli im AL. Im Wildtyp (A) wird auch der V-förmige ORN47b-Glomerulus von *GH146* positiven PN-Dendriten innerviert. *sema1a*-mutante ORN47b Axone konvergieren in einen stark elongierten (B) oder einen separaten, ektopischen Glomerulus (C). Sowohl der stark elongierte Glomerulus als auch der ektopische Glomerulus (Pfeilspitze in C₁'') werden von PN-Dendriten innerviert. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT40 GH146-Gal4/ CycE FRT40; 47b::CD8GFP UAS-CD2/+* (B-C) *eyFLP; V2-013 FRT40 GH146-Gal4/ CycE FRT40; 47b::CD8GFP UAS-CD2/+*. Die Bilder (A₁-C₁) sind Ausschnittsvergrößerungen der Glomeruli aus (A-C). (A₁'-C₁') und (A₁''-C₁'') zeigen den grünen bzw. roten Kanal aus (A₁-C₁). Die gezeigten AL wurden mit α-GFP (grün), α-CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

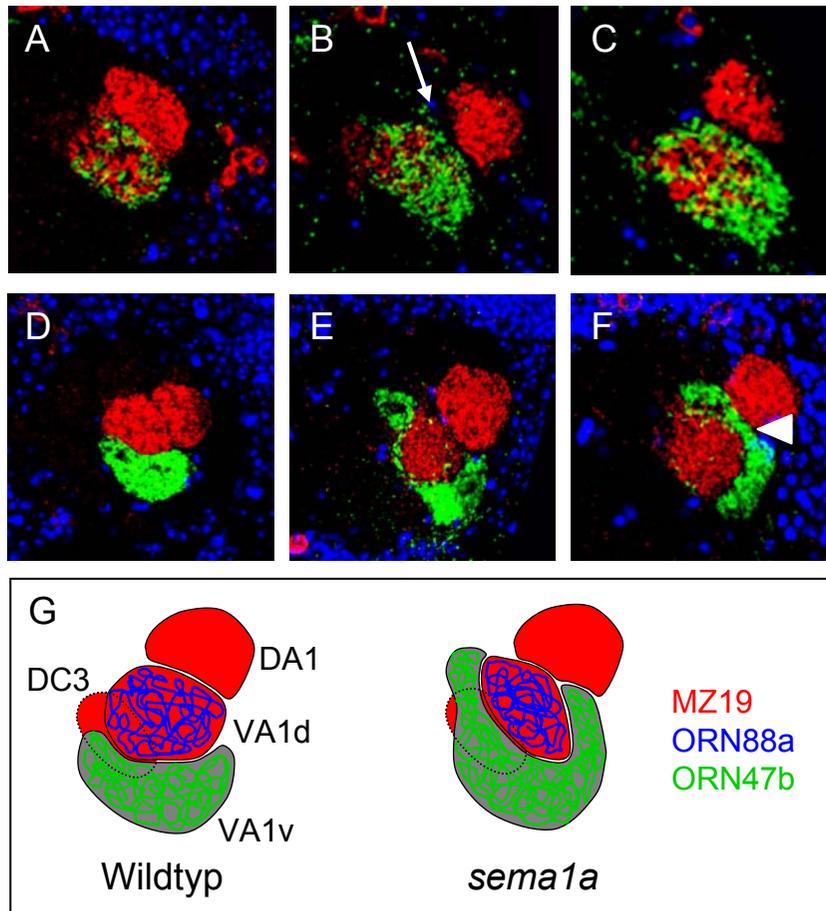


Abb. 31: Innervation verschiedener Glomeruli durch heterozygote PN-Dendriten und *sema1a* mutante ORNs (2). Die Gal4-Linie MZ19 markiert PNs, deren Dendriten die anterioren Glomeruli VA1d, DA1 und den darunter liegenden DC3 innervieren. Die ORN88a Axone (A-C) innervieren den VA1d-Glomerulus. Im Wildtyp hat dieser Glomerulus eine runde Form und liegt dicht neben dem darüber liegenden DA1-Glomerulus (A). In *sema1a* Mutanten ist zum einen eine ovalere Form des Glomerulus zu beobachten (C), zum anderen verschiebt sich in einigen Fällen das räumliche Verhältnis zum benachbarten DA1 Glomerulus (Pfeil in B). ORN47b Axone innervieren im Wildtyp den VA1v Glomerulus, der ventral zum VA1d Glomerulus liegt. In *sema1a* Mutanten ist der ORN47b Glomerulus elongiert (E). In einigen Fällen sind ORN47b Axone zwischen den Glomeruli VA1d und DA1 lokalisiert (Pfeilspitze in F). Das Schema (G) fasst die dargestellten Phänotypen zusammen. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT40 MZ19-Gal4/ CycE FRT40; 88a::CD8GFP UAS-CD2/+* (B-C) *eyFLP; V2-013 FRT40 MZ19-Gal4/ CycE FRT40; 88a::CD8GFP UAS-CD2/+* (D) *eyFLP; FRT40 MZ19-Gal4/ CycE FRT40; 47b::CD8GFP UAS-CD2/+* (E-F) *eyFLP; V2-013 FRT40 MZ19-Gal4/ CycE FRT40; 47b::CD8GFP UAS-CD2/+*. Die gezeigten AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 gefärbt.

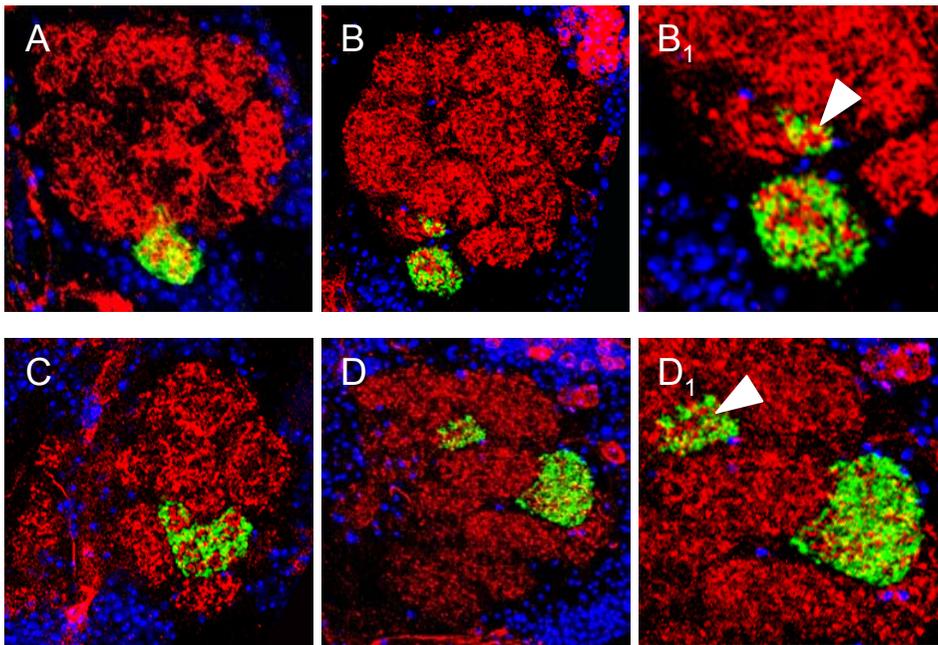


Abb. 32: Innervation ectopischer ORN21a und ORN47b Glomeruli durch LN-Dendriten. Die Linie C753-Gal4 markiert die Dendriten verschiedener LNs. ORN21a (A) und ORN47b (C) Glomeruli werden im Wildtyp gleichmäßig von diesen Dendriten innerviert. *sema1a* mutante ORN21a Axone projizieren in einen dorsal des V-Glomerulus liegenden, ectopischen Glomerulus (B und B₁). Dieser ectopische Glomerulus wird von C753 positiven LNs innerviert (Pfeilspitze in B₁). Mutante ORN47b Axone konvergieren in einen ectopischen Glomerulus dorsal zum sonst innervierten VA1v-Glomerulus (Pfeilspitze in D₁), der ebenfalls von C753 positiven LN-Dendriten innerviert wird. Genotypen: (A) *eyFLP; OR21a::sytGFP FRT40/ CycE FT40; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (B und B₁) *eyFLP; V2-13 OR21a::sytGFP FRT40/ CycE FT40; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (C) *eyFLP; OR47b::sytGFP FRT40/ CycE FT40; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (D und D₁) *eyFLP; V2-13 OR47b::sytGFP FRT40/ CycE FT40; C753-Gal4 UAS-CD2/+*. Alle gezeigten AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt. Alle Bilder zeigen konfokale Aufnahmen einer Schnittebene. (B₁-D₁) sind Ausschnittsvergrößerungen aus (B-D).

3.2.8 Überexpression von SEMA1A in ORNs

Der Verlust von *sema1a* führt zu Konvergenzdefekten in einzelnen ORN-Klassen. Zudem zeigt der Wildtyp ein differentielles Expressionsmuster des Proteins in den verschiedenen ORN-Klassen. Zusammen spricht dies für eine Funktion der unterschiedlichen Expressionsniveaus in den Glomeruli für die korrekte ORN-Sortierung und Konvergenz. Wenn Axone benachbarter ORN-Klassen ein unterschiedliches Expressions-Niveau des SEMA1A Proteins brauchen, um in kompakte, klar abgegrenzte Glomeruli zu konvergieren, so sollte die gleichmäßige Überexpression des Proteins in benachbarten Klassen einen Einfluß auf die axonale Sortierung und Konvergenz haben.

Zur Überexpression wurden verschiedenen Konstrukte verwendet, mit denen zum einen das komplette SEMA1A Protein, zum anderen aber auch nur der intra- (UAS-*sema1a-trunc^{myc}*) oder extrazelluläre Teil des Proteins (UAS-*sema1a-EC*) exprimiert werden kann. Die Linie *en-Gal4* ist in einer Gruppe von ORNs exprimiert, die eine schmale Domäne in der Mitte des anterioren AL innervieren (Wildtyp in Abb. 33 A). Wird mit Hilfe dieser Linie nun das UAS-*sema1a* Konstrukt exprimiert, so führt dies zu einem drastischen Effekt. Die *en*-Domäne wirkt zum einen sehr schmal, zum anderen lassen sich keine glomerulären Strukturen innerhalb der Domäne ausmachen (B). Die Linie *72OK-Gal4* markiert unter anderem einen charakteristischen Glomerulus im posterioren AL. Auch hier resultiert die Expression des UAS-*sema1a* Konstruktes in der Innervation eines schmalen, länglichen Bereichs (F). Die Expression der Konstrukte UAS-*sema1a-trunc^{myc}* und UAS-*sema1a-EC* zeigten weder mit der Treiberlinie *en-Gal4*, noch mit *72OK-Gal4* einen Unterschied zum Innervationsmuster des Wildtyps.

Für die Expression des Konstruktes UAS-*sema1a-trunc^{myc}* konnte durch eine Antikörperfärbung mit α -myc eine Lokalisation innerhalb der Überexpressionsdomäne nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.8.1 Analyse des *Sema1a* Überexpressions-Phänotyps in selektiv markierten ORN-Klassen

Die Überexpression in *en-Gal4* führt scheinbar zu einem Verlust glomerulärer Grenzen innerhalb der Überexpressionsdomäne. Es stellt sich die Frage, ob sich die Axone der einzelnen Klassen innerhalb der Domäne noch korrekt sortieren? Die Doppelmarkierung der *en*-Domäne und einzelner Glomeruli sollte klären, ob die Axone einzelner ORN-Klassen in einen bestimmten Bereich innerhalb der Domäne innervieren und wie weit sie noch in der Lage sind, in einen gemeinsamen Glomerulus zu konvergieren. Die Analyse der Doppelmarkierungen ist in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt.

Die Glomeruli der Klassen ORN46a und ORN82a liegen beide innerhalb der *en*-Domäne (Wildtypen in Abb. 34 A und C). Nach Überexpression von UAS-*sema1a* wirkt die *en*-

Domäne sehr schmal. Die Markierung der einzelnen ORN-Klassen zeigt, daß die Axone zwar in eine gemeinsame Zielregion projizieren, diese im Vergleich zum Wildtyp jedoch deutlich elongiert ist (B und D). Die Axone der hier analysierten Klassen konvergieren in einen elongierten und weniger kompakten Glomerulus. Rechts und links der überexprimierenden *en*-Domäne ist die glomeruläre Organisation des AL wildtypisch. Die Doppelmarkierung der *en*-Domäne und benachbarten ORN-Klassen, wie ORN92a oder ORN43a, zeigt zudem, daß sich die überexprimierenden Axone deutlich von den Klassen mit wildtypischer SEMA1A Expression abgrenzen (Abb. 35 A und B). In keinem der analysierten Gehirne konnte eine Fehlprojektion einzelner Axone in Bereiche außerhalb der *en*-Domäne beobachtet werden.

3.2.9 Interaktion von SEMA1A und seinem Rezeptor PLEXINA

Als Rezeptoren für die verschiedenen Semaphorine wurden Mitglieder der Plexin- und Neuropilin-Familie identifiziert (He and Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). Für das *Drosophila* SEMA1A-Signal wurde in früheren Analysen zur Wegfindung von Motoneuronen im *Drosophila* Embryo PLEXINA bereits als Rezeptor beschrieben (Terman et al., 2002; Winberg et al., 1998). Um zu prüfen, ob auch die Sortierung und Konvergenz von ORN-Axonon über den SEMA1A-PLEXINA-Signalweg vermittelt wird, wurde die genetische Interaktion der beiden analysiert (siehe Abbildung 36).

Zunächst wurde der Phänotyp in den heterozygoten Situationen analysiert. Die Analyse der *sema1a*^{V2-13} heterozygoten Gehirne ergab, daß schon beim Verlust einer Kopie des *sema1a* Gens die ORN47b Axone in einen elongierten Glomerulus konvergieren (A). ORN47b Axone, die heterozygot für die Defizienz *Df(4)plexA* sind, zeigen keinen auffälligen Phänotyp (Abb. 36 B). Zwar kommt es in etwa 11% der untersuchten Gehirne zu einem leicht elongierten Glomerulus, dessen Ausprägung ist jedoch wesentlich schwächer als in der *sema1a* heterozygoten Situation. In der doppel-heterozygoten Situation, d.h. nach Verlust je einer Kopie *sema1a* und *plexinA*, ist eine deutliche Verstärkung des Phänotyps zu beobachten. Neben stark elongierten ORN47b Glomeruli (ca. 55%) ist in etwa 14% der untersuchten Gehirne auch die Konvergenz in ektopische ORN47b Glomeruli zu finden (Pfeilspitze in C). Auch für die Analyse von Doppelmarkierungen der maxillaren Klassen ORN46a und ORN71a ist ein deutlicher Phänotyp in *sema1a/plexA* doppel-heterozygoten Gehirnen zu finden. Die Axone einer Klasse innervieren in mehrere Bereiche, die teilweise in einigem Abstand zueinander liegen (Sternchen in F). Zudem liegen die innervierten Bereiche benachbarter Klassen häufig ineinander verschachtelt. Eine Co-Innervation in gemeinsame Bereiche kann jedoch nicht festgestellt werden. Die Grafik in Abbildung 37 faßt die Quantifizierung der Projektionsdefekte nochmals zusammen.

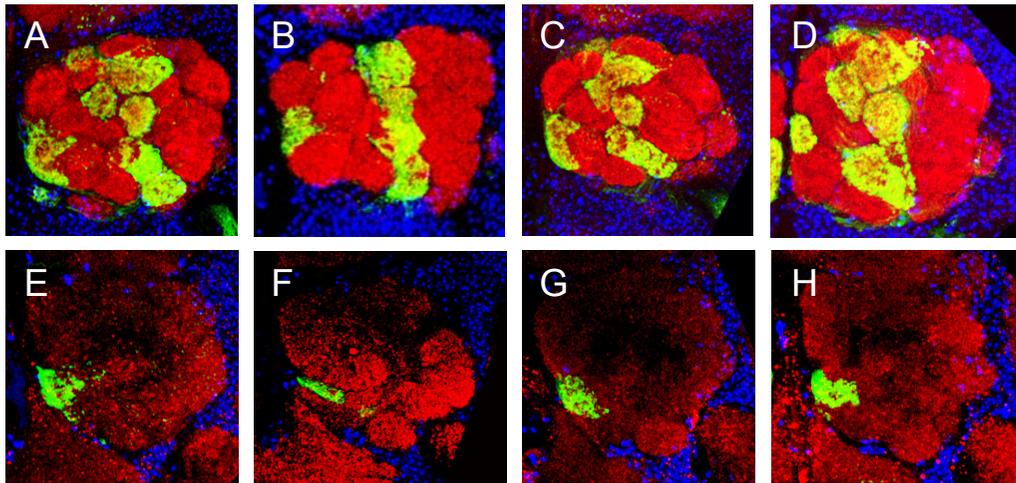


Abb. 33: Überexpression verschiedener UAS-*sema1a* Konstrukte mit *en-Gal4* und *72OK-Gal4*. Die Linie *en-Gal4* markiert im AL ein Drittel der Glomeruli. *en-Gal4* positive ORNs innervieren eine schmale Domäne medial und hauptsächlich anterior im AL (Wildtyp in A). Wird das *UAS-sema1a* Konstrukt in dieser Domäne exprimiert lassen sich morphologisch keine einzelnen Glomeruli mehr unterscheiden (B). Die überexprimierenden Axone respektieren zwar die Grenze zu den benachbarten, *en* negativen Regionen, konvergieren jedoch nicht in unterscheidbare Glomeruli. Die gesamte *en*-Domäne ist schmaler. *72OK-Gal4* markiert unter anderem einen charakteristischen, posterior im AL liegenden Glomerulus (Wildtyp in E). Nach Überexpression von *UAS-sema1a* ist nur noch ein schmaler länglicher Bereich sichtbar (F). Die Expression der Konstrukte *UAS-sema1a trunc^{myc}* (C und G) und *UAS-semaEC* (D und H) zeigen mit den verwendeten Treiber-Linien keinen Effekt. Genotypen: (A) *en-Gal4 UAS-sytGFP/ CyO; +/+* (B) *en-Gal4 UAS-sytGFP/ CyO; UAS-sema1a/+* (C) *en-Gal4 UAS-sytGFP/ CyO; UAS-sema1a trunc^{myc} /+* (D) *en-Gal4 UAS-sytGFP/ CyO; UAS-sema EC/+* (E) *72OK-Gal4 UAS-CD8GFP;; +/+* (F) *72OK-Gal4 UAS-CD8GFP;; UAS-sema1a/+* (G) *72OK-Gal4 UAS-CD8GFP;; UAS-sema1a trunc^{myc} /+* (H) *72OK-Gal4 UAS-CD8GFP;; UAS-sema EC/+*. Antikörperfärbungen: α -GFP (grün) und α - Ncad (rot) und toto3 (blau).

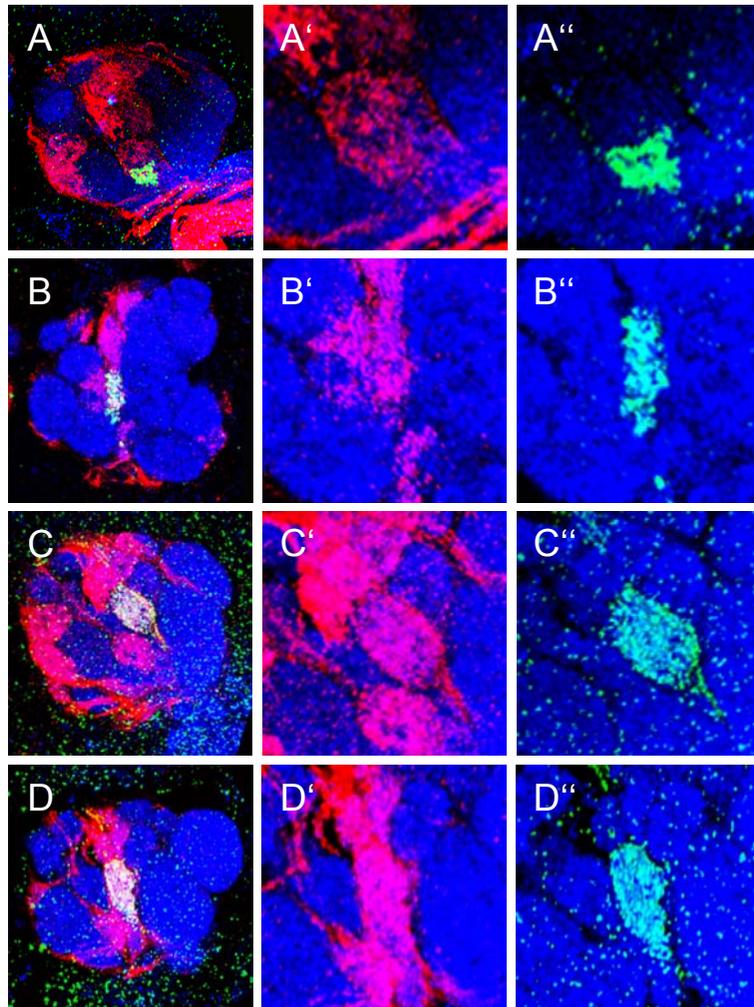


Abb. 34: Darstellung einzelner ORN-Klassen nach Überexpression von Sema1a (1). Die Promotorfusionen OR82a::CD8GFP (A-B) und OR46a::CD8GFP (C-D) markieren Glomeruli, die innerhalb der *en*-Domäne liegen. In (A) bzw. (C) ist die Innervation im Wildtyp dargestellt. Nach Überexpression von Sema1a wirkt die gesamte *en*-Domäne schmaler (B' und D'). Einzelne Glomeruli können nicht mehr anhand ihrer Morphologie identifiziert werden. Die Markierung der ORN-Klassen 82a (B'') und 46a (D'') zeigt jedoch, daß die Axone der einzelnen ORN-Klassen noch zu einem gemeinsamen Glomerulus konvergieren, und nicht etwa über die gesamte Domäne verteilt sind. Die Form der einzelnen Glomeruli ist jedoch entlang der dorso-ventral Achse stark elongiert. Genotypen: (A) *en-Gal4 UAS-RFP/ OR82a::CD8GFP; +/+* (B) *en-Gal4 UAS-RFP/ OR82a::CD8GFP; UAS-sema1a/+* (C) *en-Gal4 UAS-RFP/ OR46a::CD8GFP; +/+* (D) *en-Gal4 UAS-RFP/ OR46a::CD8GFP; UAS-sema1a/+*. Die hier dargestellten antennalen Loben wurden mit α -GFP (grün) und α -Ncad (blau) gefärbt. Das native RFP-Signal ist rot dargestellt. (A'-D') und (A''-D'') sind Ausschnittsvergrößerungen aus (A-D) und zeigen den grünen bzw. roten Kanal zusammen mit der α -Ncad-Markierung.

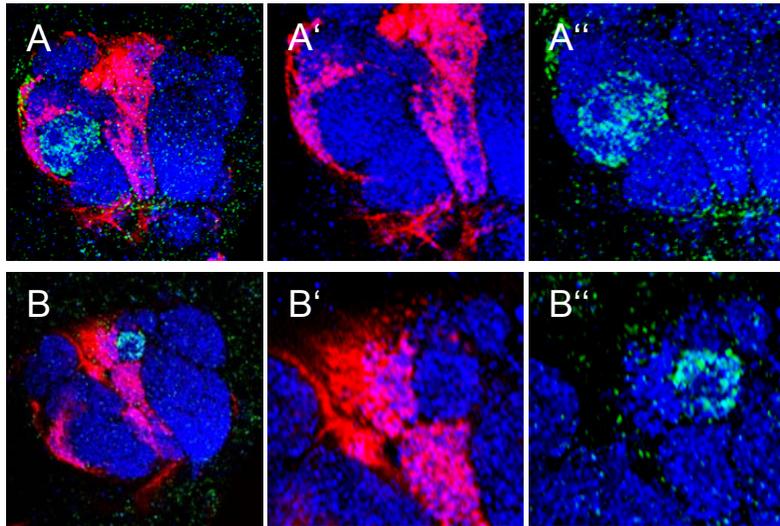


Abb. 35: Darstellung benachbarter ORN-Klassen nach Überexpression von Sema1a (2). Die Promotorfusion OR92a::CD8GFP (A) markiert einen ventro-lateral gelegenen Glomerulus, die Promotorfusion OR43a::CD8GFP (B) markiert einen dorso-zentralen Glomerulus. Beide Glomeruli sind der *en*-Domäne (A' und B'), in der *UAS-sema1a* exprimiert wird, direkt benachbart. Die Nachbarschaft beeinträchtigt jedoch nicht die Morphologie der von ORN92a und ORN43a innervierten Glomeruli. Im Gegensatz zu den elongierten Glomeruli innerhalb der Überexpressions-Domäne (Vergleiche Abb. 34) behalten die benachbart liegenden Glomeruli ihre charakteristische Form. Genotypen: (A) *en-Gal4 UAS-RFP/ OR92a::CD8GFP; UAS-sema1a/+* (B) *en-Gal4 UAS-RFP/ OR43a::CD8GFP; UAS-sema1a/+*. (A'-B') und (A''-B'') zeigen das RFP-Signal bzw. GFP-Signal in Ausschnittsvergrößerungen aus (A-B). Die hier dargestellten antennalen Loben wurden mit α -GFP (grün) und α -Ncad (blau) gefärbt. Das native RFP-Signal ist rot dargestellt.

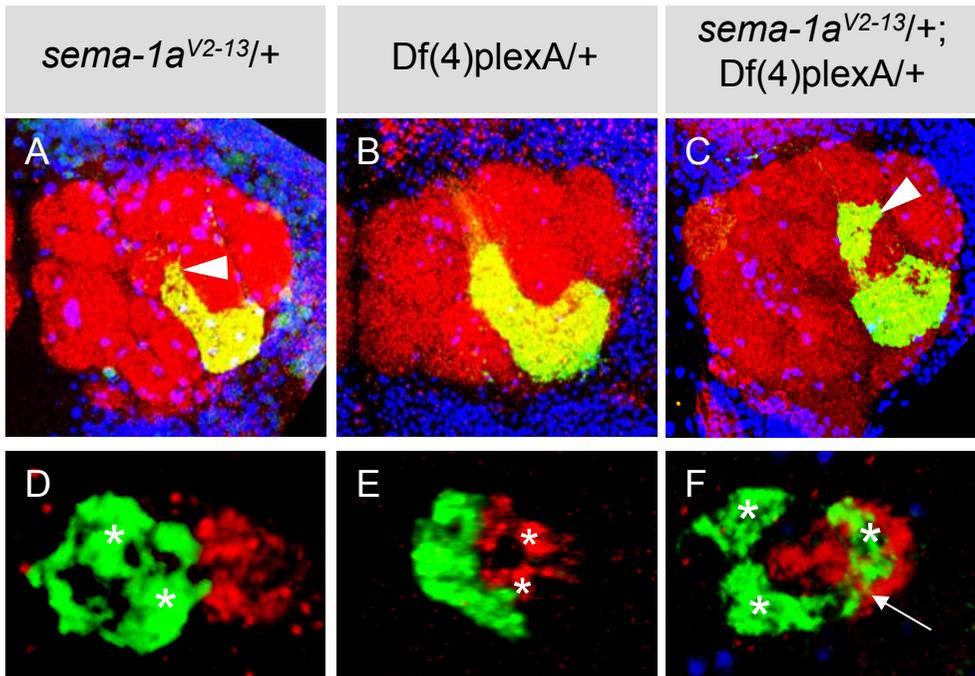


Abb. 36: Genetische Interaktion von *plexinA* und *sema1a*. *sema1a*^{V2-13} heterozygote ORN47b Axone konvergieren in einen deutlich elongierten Glomerulus (Pfeilspitze in A). Im Vergleich dazu führt der Verlust einer Kopie von *plexinA* in *Df(4)plexA* heterozygoten Tieren zu keinen auffälligen Veränderungen des ORN47b Glomerulus (B). In *Df(4)plexA/sema*^{V2-13} doppel-heterozygote Tieren projizieren die Axone in einen ektopischen Glomerulus (Pfeilspitze in C). Auch die Doppelmarkierung der maxillaren Klassen ORN46a und ORN71a zeigt in den doppel-heterozygoten AL einen deutlichen Konvergenzdefekt (F). Hier akkumulieren die Termini der ORN46a Axone in mehreren Bereichen (Sternchen). Zudem greifen ORN71a und ORN46a Axone ineinander (Pfeil). Insgesamt wirken die Glomeruli stark aufgelöst. Zwar kommt es auch in einigen Tieren, die entweder heterozygot für *sema*^{V2-13} (D) oder *plexinA* (E) sind, zur Innervation breiterer Bereiche und zur Konvergenz in weniger kompakter Glomeruli (Sternchen) durch ORN71a und ORN46a Axone, der Phänotyp ist hier jedoch nicht so stark ausgeprägt. Genotypen: (A) *sema1a*^{V2-13} 47b:*sytGFP/+* (B) *;;Df(4)plexA/+* (C) *sema1a*^{V2-13} 47b:*sytGFP/+;;Df(4)plexA/+* (D) *sema1a*^{V2-13/+}; *OR46a:sytGFP OR71a-Gal4 UAS-CD2* (E) *;;OR46a:sytGFP OR71a-Gal4 UAS-CD2; Df(4)plexA/+* (F) *sema1a*^{V2-13/+}; *OR46a:sytGFP OR71a-Gal4 UAS-CD2; Df(4)plexA/+*. Die hier dargestellten AL, bzw. Glomeruli, wurden mit α -GFP (grün), α -Nc82 bzw. α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

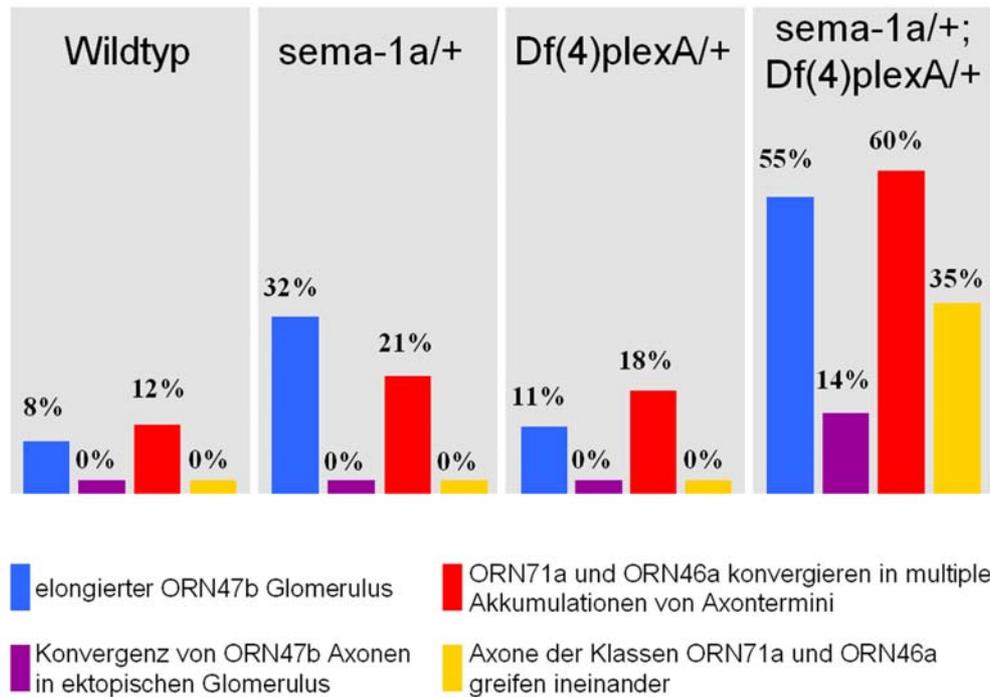


Abb. 37: Quantifizierung der Projektionsdefekte in *sema1a* und *plexA* heterozygoten Gehirnen.

Die Verstärkung des Phänotyps nach Verlust der *sema1a*- und *plexinA*-Funktion spricht für eine Rolle des SEMA1A-PLEXA-Signalwegs in der ORN-Sortierung und Konvergenz.

Die Überexpression von UAS-*plexinA* in *en-Gal4* zeigte hingegen keinen Effekt auf die Konvergenz der Glomeruli (Abb. 38 B).

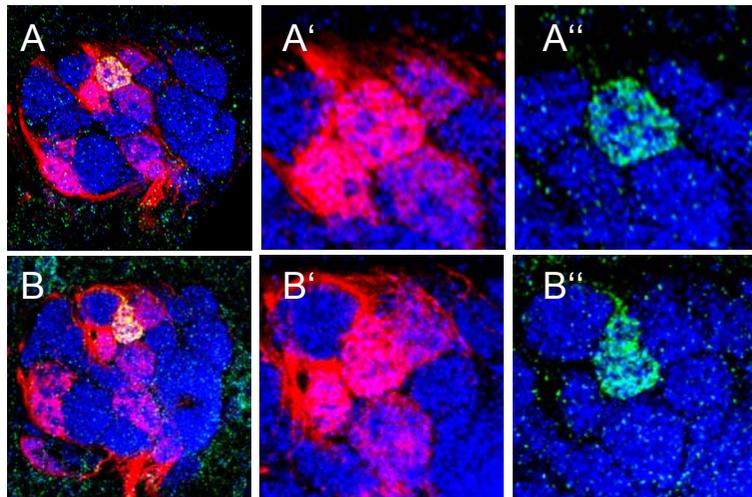


Abb. 38: Überexpression von PlexinA in der *en*-Domäne. Im Vergleich zur Überexpression von Sema1a mit *en-Gal4* (vergleiche Abb. 34) führt die Expression des Konstrukts *UAS-PlexA* zu keiner Veränderung der glomerulären Strukturierung (B). Der ORN56a Glomerulus wirkt kompakt und genau wie im Wildtyp (A) sind deutliche interglomerulären Grenzen innerhalb der *en*-Domäne zu erkennen. Genotypen: (A) *en-Gal4 UAS-RFP/+; OR56a::CD8GFP/+* (B) *en-Gal4 UAS-RFP/UAS-plexA; OR56a::CD8GFP/+* Die hier dargestellten antennalen Loben wurden mit α -GFP (grün) und α -Ncad (blau) gefärbt. Das native RFP-Signal ist rot dargestellt.

3.3 Phänotypische Analyse der Mutation *Dscam*

Das *Drosophila* Homolog des ‚Down Syndrom Cell Adhesion‘ Moleküls DSCAM war das erste neuronale Zelloberflächenmolekül, für das eine Rolle in der synaptischen Verschaltung verschiedener ORN Klassen beschrieben werden konnte (Hummel et al., 2003). Hier wurden drei phänotypische Klassen von Projektionsdefekten unterschieden. Neben *Dscam* mutanten ORN-Klassen mit Fehlprojektionen im ipsilateralen AL gibt es auch Klassen, die zudem im kontralateralen AL fehlprojizieren. Für maxillare ORNs wurde die Bildung ektopischer Glomeruli im SOG beschrieben.

Der folgende Teil dieser Arbeit umfaßt eine genauere Charakterisierung der ektopischen Konvergenz von *Dscam* mutanten ORN-Axonon und dient zur Klärung einiger noch offener Fragen. So sollte geklärt werden, inwieweit ektopische Glomeruli von Axonen einer ORN-Klasse innerviert werden oder eine Co-Konvergenz verschiedener ORN-Klassen stattfindet. Zudem sollte untersucht werden, ob ektopische Glomeruli von Dendriten der ZNS-Zielzellen innerviert werden. Desweiteren ist bisher nicht bekannt, wie der charakteristische *Dscam*-Verlust-Phänotyp in der Entwicklung entsteht.

Durch alternatives Spleißen können über 38000 Isoformen generiert werden. Bisher ist unklar, inwiefern diese hohe Diversität möglicher DSCAM-Proteine eine Rolle in der synaptischen Verschaltung der ORNs spielt. Es stellt sich also die Frage, welche Auswirkung eine Reduktion der Diversität oder auch die Expression einer einzigen Isoform auf die Konvergenz von ORN Axonen hat.

3.3.1 Funktion von *Dscam* in verschiedenen ORN-Klassen

Von den in MARCM-Klonen bisher untersuchten acht ORN-Klassen wurde für sechs Klassen eine Projektion in ektopische AL-Regionen und für zwei Klassen eine reduzierte Innervation des kontralateralen Zielglomerulus beschrieben (Hummel et al., 2003). Um die Frage zu untersuchen, ob *Dscam* nur in der Verschaltung bestimmter ORN-Klassen eine Funktion hat, wurden weitere ORN-Klassen auf eine Abhängigkeit der *Dscam* Funktion hin untersucht. Die bisherige phänotypische Charakterisierung basierte ausschließlich auf der Analyse von MARCM-Klonen. Um zu klären, welchen Einfluß eine größere Anzahl mutanter ORNs auf den bisher beschriebenen Projektionsdefekt hat, wurden durch *Minute*-Klone größere homozygot mutante Bereiche induziert.

3.3.1.1 Vergleich des *Dscam* Verlust-Phänotyps in MARCM- und *Minute*-Klonen

Von Hummel et al. wurde der *Dscam* Verlust-Phänotyp in MARCM-Klonen für einige ORN Klassen beschrieben (Hummel et al., 2003). Die ORN Klassen 47a und 21a zeigten hier Fehlprojektionen der Axone zu ektopischen glomerulären Strukturen innerhalb des ipsilateralen AL. Die ORN Klasse 47b zeigte neben ipsilateralen Fehlprojektionen auch ein verstärktes Auftreten ektopischer Glomeruli im kontralateralen AL. Für die ORN-Klassen 22a und 23a wurden bisher keine ipsilateralen Projektionsdefekte in MARCM-Klonen beschrieben. Diese Klassen zeigten lediglich eine reduzierte Innervation ihrer kontralateralen Glomeruli. Eine weitere phänotypische Kategorie bilden die ORN Klassen aus den Maxillarpalpen. Hier wurden bisher die ORN Klassen 46a, 71a und 59c untersucht. Alle maxillaren ORN-Klassen zeigten ektopische, glomeruläre Strukturen außerhalb des AL sowie in einigen Fällen auch ektopische Glomeruli im ventralen Bereich des AL.

Die Abbildung 39 zeigt den *Dscam* Verlust-Phänotyp der bereits beschriebenen ORN-Klassen in *Minute*-Klonen. Die bereits in MARCM-Klonen beobachteten Phänotypen der Klassen ORN47a (Abb. 39, Pfeile in B), ORN21a (Pfeile in D) und ORN47b sind in *Minute*-Klonen ebenfalls zu finden. Anzahl und Lokalisation der ektopischen Strukturen sind in beiden Klonen ähnlich. Im Vergleich zu MARCM-Klonen ist die Penetranz der Phänotypen für einige ORN-Klassen im *Minute*-Hintergrund jedoch erhöht. In 79% der analysierten Mosaik-Gehirne (n=64 AL) zeigen ORN47a Axone eine Konvergenz in ektopische Glomeruli, die zum Teil weit vom eigentlichen Zielglomerulus entfernt liegen. Das bedeutet eine Steigerung der phänotypischen Penetranz um 12% in *Minute*-Klonen. Die Fehlprojektion von ORN47b Axonen in eine dorsal zum Zielglomerulus liegende Region ist in 36% der Mosaik-Gehirne zu sehen. Neben der um 10% höheren Penetranz führt die erhöhte Anzahl *Dscam* mutanter Axone in *Minute*-Klonen zudem zu einer etwas stärkeren Expressivität dieses Defekts. Im Vergleich dazu tritt der Projektionsdefekt von ORN21a Axonen in MARCM- und *Minute*-Klonen etwa gleich häufig auf. Auch der bereits beschriebene Projektionsdefekt der maxillaren ORN-Klassen ist in *Minute*-Klonen ähnlich dem für MARCM-Klone beschriebenen Phänotyp. Neben einigen *Dscam* mutanten ORN46a Axonen, die weiter in den AL projizieren konvergiert ein Großteil der Axone (J) noch vor dem Eintritt ins SOG in ektopischen Glomeruli. Auch hier bleibt die phänotypische Penetranz ungefähr gleich.

Für die Klassen ORN22a und ORN23a konnte in MARCM-Klonen bisher keine Projektionsdefekte gezeigt werden. Durch eine erhöhte Anzahl *Dscam* mutanter Axone in *Minute*-Klonen kann jedoch für beide Klassen eine Fehlprojektion induziert werden. So zeigt hier auch die Klasse ORN22a (Abb. 40 B) kleinere ektopische glomeruläre Strukturen (ca. 43%, n=14). Diese sind meist im ventralen AL lokalisiert, treten jedoch auch vereinzelt in dorso-lateralen AL-Bereichen auf. Auch ORN23a Axone projizieren in *Minute*-Klonen in 1-2

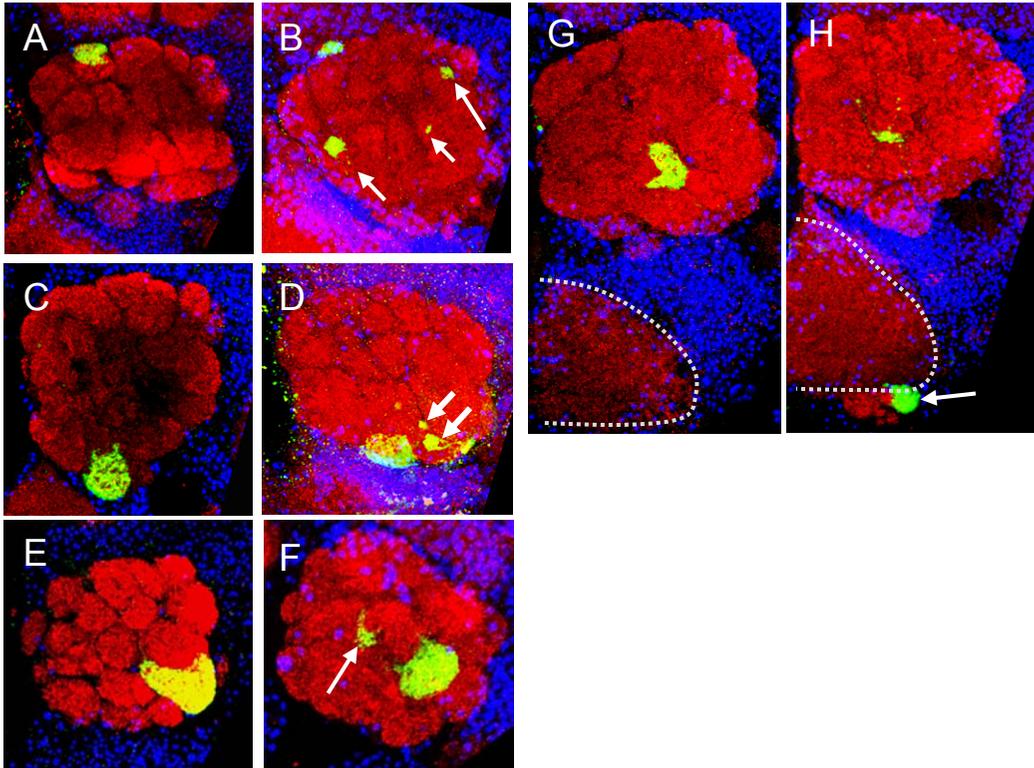


Abb. 39: Projektionsdefekte *Dscam* mutanter ORN Axone (1). Für die hier gezeigten ORN-Klassen wurde in MARCM-Klonen eine Projektion in ektopische Glomeruli beschrieben (Hummel et al., 2003). In den hier dargestellten antennalen Loben wurde der Anteil der homozygot mutanten ORNs durch eine Gegenselektion mit der Zellletalen Mutation *PCNA* erhöht. Ähnlich wie in MARCM-Klonen projizieren auch hier die mutanten Axone der antennalen ORN-Klassen 47a (B) und 21a (D) in kleinere ektopische Glomeruli (Pfeile) im AL, die teilweise auch weit von der eigentlichen Zielregion entfernt liegen. Wie auch für MARCM-Klone beschrieben zeigen *Dscam* mutante ORN47b Axone einen Projektionsdefekt in weiter dorsal gelegene Regionen (Pfeil in F). Die ORN47b Axone teilen sich hier gleichmäßig in zwei größere glomeruläre Strukturen auf. Maxillare ORN-Klassen wie z.B. ORN46a (H) bilden ektopische Glomeruli im SOG (durch gestrichelte Linie gekennzeichnet). Dennoch erreichen einige ORN46a Axone ihr Zielgebiet im AL. Genotypen: (A) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR47a-Gal4 UAS-sytGFP* (B) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR47a-Gal4 UAS-sytGFP* (C) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR21a-Gal4 UAS-sytGFP* (D) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR21a-Gal4 UAS-sytGFP* (E) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR47b-Gal4 UAS-sytGFP* (F) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR47b-Gal4 UAS-sytGFP* (G) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR46a-Gal4 UAS-sytGFP* (H) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR46a-Gal4 UAS-sytGFP*. Die hier abgebildeten AL wurden alle mit α -GFP (grün), α -Ncad (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

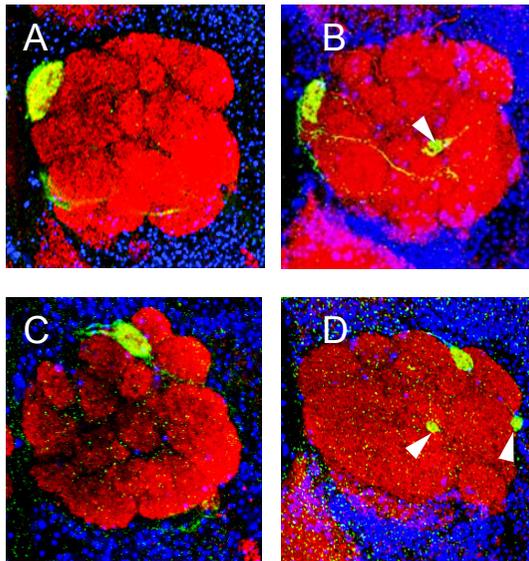


Abb. 40: Projektionsdefekte *Dscam* mutanter ORN-Axone (2). In MARCM-Analysen konnten für die Klassen ORN22a und ORN23a keine Projektionsdefekte gezeigt werden. Die Analyse von *Minute*-Klonen mit dem *Dscam*²¹-Allel zeigen jedoch, daß auch Axone dieser Klassen in ektopische AL-Regionen projizieren und dort ektopische glomeruläre Strukturen ausbilden. Ektopische ORN22a Glomeruli liegen hierbei häufig im ventralen und medialen AL (Pfeilspitze in B), ektopische ORN23a Glomeruli verteilen sich über den gesamten AL. Im hier dargestellten Beispiel liegen sie in der dorso-lateralen Hälfte des AL (Pfeilspitzen in D). Genotypen: (A) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR22a-Gal4 UAS-CD8GFP* (B) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR22a-Gal4 UAS-CD8GFP* (C) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR23a-Gal4 UAS-sytGFP* (D) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR23a-Gal4 UAS-sytGFP*. Die hier abgebildeten AL wurden alle mit α -GFP (grün), α -Ncad (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

ektopische Glomeruli, die im AL verteilt liegen (Abb. 40 D). Die Penetranz dieses Phänotyps liegt hier bei 9 %.

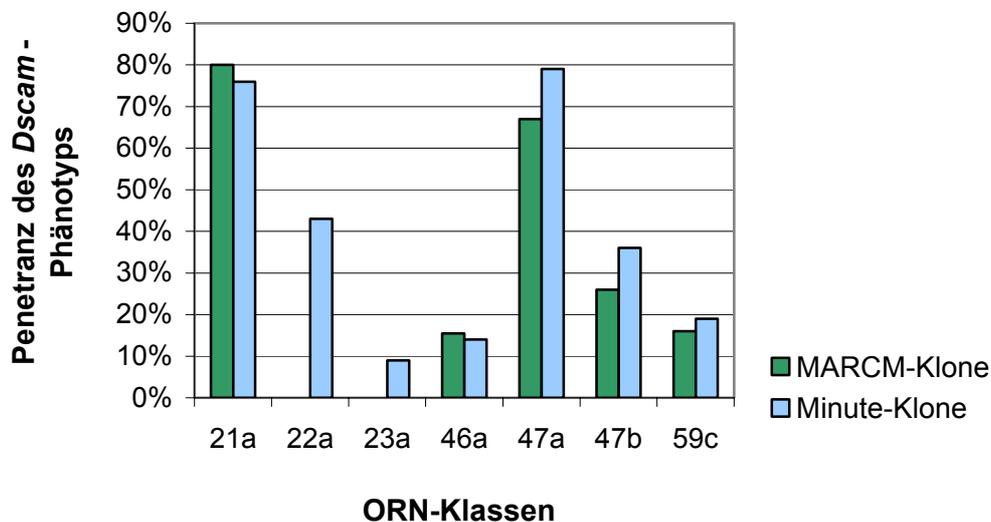


Abb. 41: Vergleich der Penetranz von *Dscam*²¹ Verlust-Phänotypen in MARCM- und Minute-Klonen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Projektionsdefekt, d.h. die Anzahl und Lokalisation ektopischer Glomeruli, den die einzelnen ORN-Klassen in MARCM-Klonen zeigen, dem Phänotyp der *Minute*-Klone sehr ähnlich ist. Die Penetranz des *Dscam*-Phänotyps in *Minute*-Klonen ist in einigen Klassen etwas höher als in den MARCM-Klonen. Besonders auffallend ist der Projektionsdefekt der Klassen ORN22a und ORN23a in *Minute*-Klonen. So scheint zumindest für diese Klassen die Menge der *Dscam* mutanten ORNs, die in den AL projizieren, auf die korrekte Projektion der Axone einen Einfluß zu haben.

3.3.1.2 Analyse des *Dscam* Verlust-Phänotyps in weiteren ORN-Klassen

Bis auf die maxillaren ORN-Klassen projizieren alle der bisher analysierten ORN-Klassen in peripher im AL lokalisierte Glomeruli, d.h. in Glomeruli, die nicht von allen Seiten von ORNs anderer Klassen umgeben sind. Die ORN-Klasse 83c projiziert in einen Glomerulus, der zentral im AL liegt (Abb. 42 A). *Dscam* mutante ORN83c Axone projizieren in 70% (n=10) der Fälle auch hier in kleinere ektopische Glomeruli (Pfeile in B). Hier sind 1-2 ektopische Glomeruli pro AL zu finden. Diese können sowohl im dorso-medialen als auch im dorso-lateralen AL lokalisiert sein.

Für die Klasse ORN47b wurde bereits ein Projektionsdefekt beschrieben. Dies macht eine Analyse des von ORN88a innervierten, benachbarten VA1d-Glomerulus besonders interessant. In *Dscam* Klonen ist der eigentliche VA1d-Glomerulus stets innerviert. Die im Wildtyp auffallend runde Form des Glomerulus scheint hingegen in einigen Fällen verändert.

Zur Fehlprojektion in kleinere ektopische Glomeruli kommt es hingegen nur in etwa 8% (n=26) der Mosaik-Gehirne. Diese ektopischen ORN88a Glomeruli sind meist posterior und etwas weiter ventral zum eigentlichen VA1d-Glomerulus lokalisiert (Pfeilspitze in H).

Es wurden außerdem weitere ORN-Klassen analysiert, die in besonders leicht zu bestimmende, sogenannte ‚Landmark-Glomeruli‘ projizieren. Der von ORN65a innervierte DL3 Glomerulus bildet die dorso-laterale Grenze des AL (C). In etwa 1/5 der Mosaik-Gehirne projizieren auch hier *Dscam* mutante Axone (21%, n=14) meist in einen ektopischen Glomerulus. In allen analysierten AL lagen die ektopischen Glomeruli stets im dorso-medialen oder dorso-lateralen Bereich. ORN92a-Axone projizieren in den prominenten ventro-medial liegenden VA2-Glomerulus (Wildtyp in E). In 50% der untersuchten AL konnten 1-2 ektopische Glomeruli gezählt werden (Pfeil in F), die im gesamten AL lokalisiert sein können.

Neben den hier beschriebenen antennalen ORN-Klassen wurde außerdem noch eine weitere maxillare Klasse untersucht. Die Klasse ORN42a projiziert in den Glomerulus VM7, der unter anderem auch von den Axonen der Klasse ORN59c innerviert wird (Couto et al., 2005). Wie auch in den anderen bereits untersuchten maxillaren ORN-Klassen kommt es hier zur Bildung ektopischer glomerulärer Strukturen in der Nähe des SOG (durch gestrichelte weiße Linie in I und J markiert). Ein Teil der ORN42a Axone erreicht jedoch noch den Zielglomerulus im AL.

3.3.1.2.1 Akkumulation ektopischer glomerulärer Strukturen außerhalb des AL

Neben kleineren, ektopischen Glomeruli innerhalb des AL kommt es in *Dscam* mutanten maxillaren ORNs immer wieder zur Bildung ektopischer Glomeruli am Eintritts- oder Austrittspunkt des maxillaren Nervs in bzw. aus dem SOG. Auffallend ist, daß der α -NCad-Antikörper stets weitere glomeruläre Strukturen in direkter Nachbarschaft nachweist. Durch die Markierung mehrerer maxillarer Klassen mit Hilfe der breit exprimierten Linie *MT14-Gal4*, lassen sich in *Dscam Minute*-Klonen sowohl am Eintritts- als auch am Austrittspunkt des maxillaren Nervs ins bzw. aus dem SOG Anhäufungen ektopischer Glomeruli darstellen (Abb. 43, roter Kanal in B' und C'). Eine Doppelmarkierung mit ORN46a Axonen zeigt deutlich, daß es sich hierbei um ektopische Glomeruli einzelner ORN-Klassen handelt (grüner Kanal in B und C). In den meisten der hier analysierten *Minute*-Klonen wurden stets mehrere ektopische SOG-Glomeruli in direkter Nachbarschaft gefunden. Zudem fällt auf, daß meist nur an einer Stelle, entweder am Eintrittspunkt ins SOG oder aber zwischen SOG und AL, diese ektopischen Strukturen akkumulieren.

Bisher wurde nur für maxillare ORN-Klassen eine Bildung ektopischer Glomeruli außerhalb des AL beschrieben (Hummel et al., 2003). Die Analyse der *Minute*-Klone zeigt jedoch, daß auch antennale ORN-Klassen auf ihrem Projektionsweg zu früh in ektopische glomeruläre

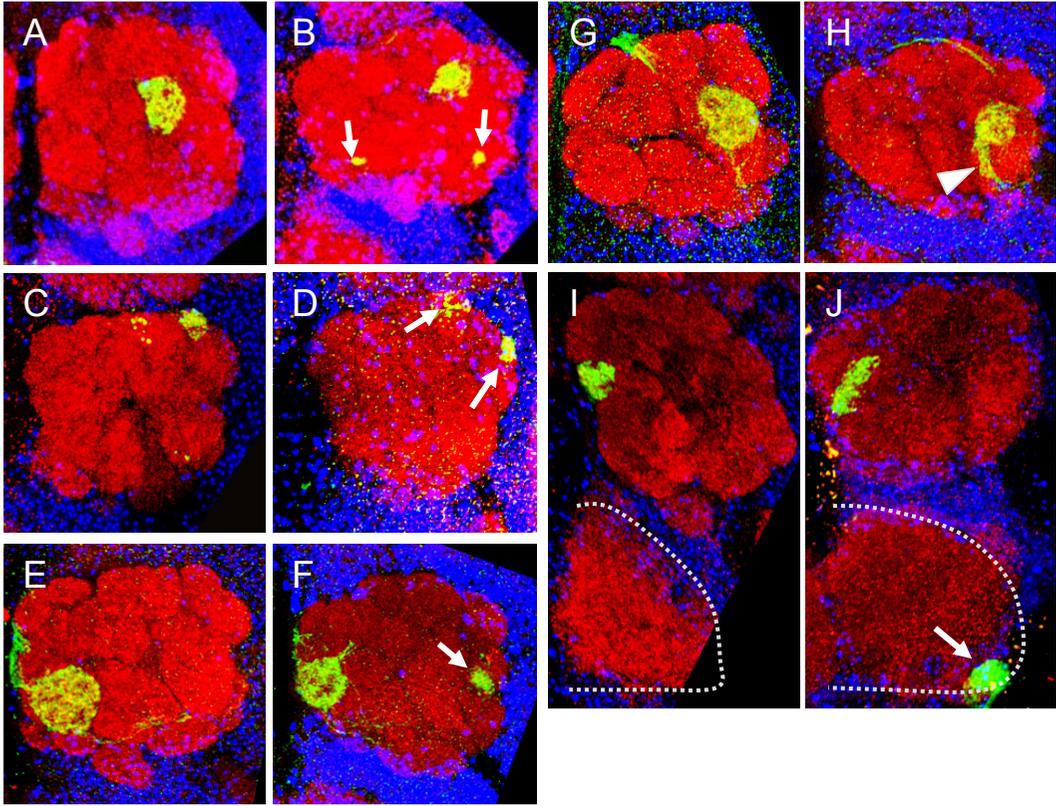


Abb. 42: Projektionsdefekte *Dscam* mutanter ORN Axone (3). *Dscam* mutante ORN Axone verschiedener Klassen projizieren in falsche Regionen und konvergieren dort in ektopische glomeruläre Strukturen (Pfeile in B, D und F). Auch Axone der Klasse ORN88a (Wildtyp in G) zeigen beim Verlust von *Dscam* einen Projektionsdefekt. Im hier dargestellten Beispiel liegt posterior zum eigentlichen ORN88a Glomerulus eine größere langgestreckte ektopische Struktur (Pfeilspitze in H). Ähnlich der bisher untersuchten maxillaren ORN-Klassen zeigt auch die Klasse ORN42a ektopische Glomeruli im SOG (gestrichelte Linie und Pfeil in J). Genotypen: (A) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR83c-Gal4 UAS-sytGFP* (B) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR83c-Gal4 UAS-sytGFP* (C) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR65a-Gal4 UAS-sytGFP* (D) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR65a-Gal4 UAS-sytGFP* (E) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR92a-Gal4 UAS-CD8GFP* (F) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR92a-Gal4 UAS-CD8GFP* (G) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR88a-Gal4 UAS-CD8GFP* (H) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR88a-Gal4 UAS-CD8GFP* (I) *eyFLP, FRT42/ FRT42 PCNA; OR43a-Gal4 UAS-sytGFP* (J) *eyFLP, FRT42 Dscam21/ FRT42 PCNA; OR43a-Gal4 UAS-sytGFP*. Die hier abgebildeten AL wurden alle mit α -GFP (grün), α -Ncad (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

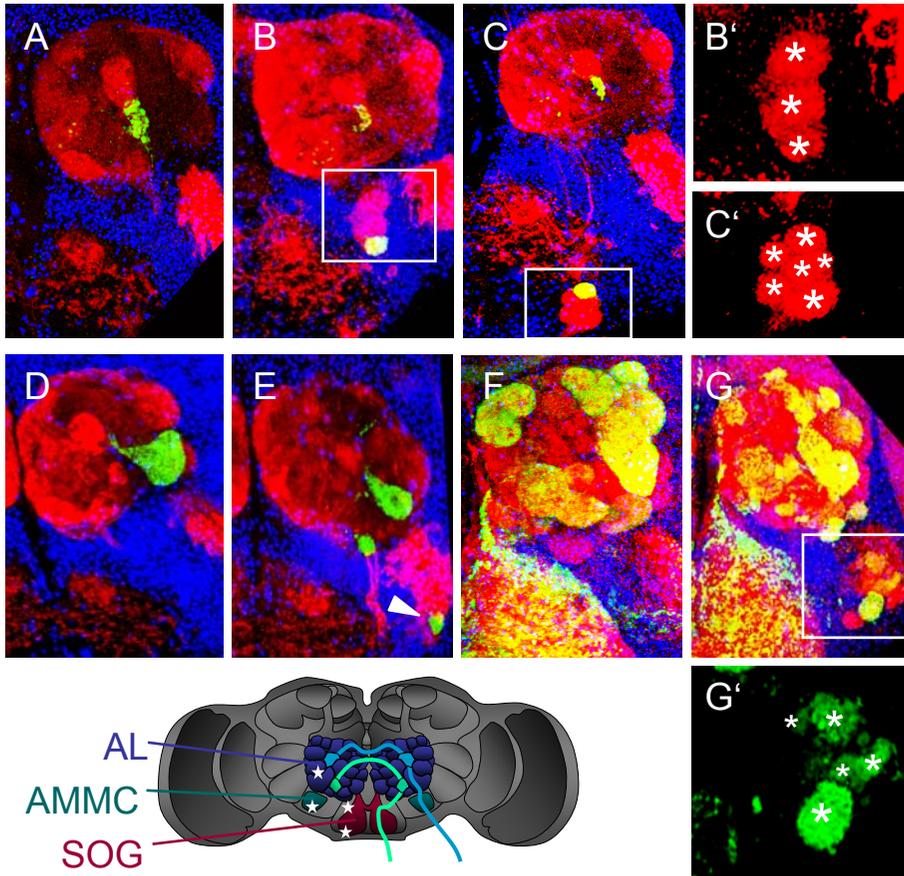


Abb. 43: Übersicht über die Lokalisation ectopischer Glomeruli in *Dscam* Mutanten. Die Gal4-Linie *MT14* markiert neben einigen antennalen auch einen Teil der maxillaren ORN-Klassen (roter Kanal im Wildtyp A). Die maxillaren ORNs (wie z.B. ORN46a, grüne Markierung in A-C) projizieren durch das SOG. In *Dscam* Mutanten konvergieren maxillare ORNs unter anderem in ectopische Glomeruli am Eintritts- oder Austrittspunkt des maxillaren Nervs im SOG (Sternchen in B' und C'). Auch antennale ORN Axone wie z.B. von ORN47b bilden ectopische glomeruläre Strukturen außerhalb des AL (Pfeilspitze in E). Die Linie *con-Gal4* markiert einen Großteil antennaler ORNs (Wildtyp in F). Im *Dscam* mutanten Hintergrund kommt es zu einer Anhäufung ectopischer antennaler Glomeruli im AMMC (umrahmter Bereich in G und Sternchen in G'). Das Vorkommen ectopischer Glomeruli ist mit Sternchen in der Schemadarstellung des Gehirns gekennzeichnet. (A-G) sind Projektionen mehrerer konfokaler Schnitte. (B'-C' und G') sind Ausschnittsvergrößerungen des roten bzw. grünen Kanals der eingerahmten Bereiche in (B-C und G). Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 46a::sytGFP/FRT42 PCNA; MT14-Gal4 UAS-CD2/+*, (B-C) *eyFLP; FRT42 Dscam21 46a::sytGFP/FRT42 PCNA; MT14-Gal4 UAS-CD2/+*, (D) *eyFLP; FRT42 47b::sytGFP/FRT42 PCNA; MT14-Gal4 UAS-CD2/+*, (E) *eyFLP; FRT42 Dscam21 47b::sytGFP/FRT42 PCNA; MT14-Gal4 UAS-CD2/+*, (F) *eyFLP; FRT42/FRT42 PCNA; con-Gal4 UAS-sytGFP/+*, (G) *eyFLP; FRT42 Dscam21/FRT42 PCNA; con-Gal4 UAS-sytGFP/+*. Alle hier dargestellten ALs wurden mit α -GFP (grün) und α -Ncad bzw. α -CD2 (rot) markiert.

Strukturen konvergieren. So zeigt beispielsweise die Klasse ORN47b (E) neben dem Projektionsdefekt innerhalb des AL auch ektopische Glomeruli in anderen Bereichen des Gehirns. Auch bei der Analyse von *Dscam Minute*-Klonen, bei denen selektiv einzelne ORN-Klassen (ORN83c, ORN92a und ORN47a) markiert wurden, konnten kleinere ektopische Glomeruli in dieser Region beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Analysen verschiedener Antikörperfärbungen geben Hinweise darauf, daß es sich bei dieser Gehirnregion um den antennomechanosensorischen Komplex (AMMC) handelt. Die Axone der ORNs projizieren aus der Antenne in einem Faszikel zusammen mit anderen Axonen mechanosensorischer Neurone. So projizieren z.B. die Axone der auditorischen Mechanorezeptoren aus dem ‚Johnston's Organ‘ in den AMMC (Kamikouchi et al., 2006; Sivan-Loukianova and Eberl, 2005). Ähnlich wie bei den maxillaren ORN-Klassen akkumulieren auch die ektopischen Glomeruli antennaler ORN-Klassen in einen engen Bereich. Dies wird durch die Markierung eines Großteils der antennalen ORNs durch *con-Gal4* besonders deutlich (G, Sternchen in G').

3.3.1.2.2 Klassen-spezifische Sortierung *Dscam* mutanter ORN-Axone

Um zu klären, ob *Dscam* mutante Axone bestimmter ORN-Klassen mit Axonen anderer Klassen co-konvergieren, wurden benachbarte ORN-Klassen differentiell markiert. Dies ermöglicht eine genaue Analyse der inter-glomerulären Grenzen.

Abbildung 44 zeigt eine Analyse der Klassen ORN47b und ORN88a, die benachbarte Bereiche im dorso-lateralen AL innervieren (Wildtyp in A). In *eyFLP* induzierten Klonen kommt es in 36% der Mosaik-Gehirne zu einem Projektionsdefekt der Klasse ORN47b. Bei genauerer Analyse lassen sich zwei Arten von Projektionsdefekten für ORN47b beschreiben. Meist projizieren die *Dscam* mutanten Axone hier in zwei große glomeruläre Strukturen, die um den ORN88a Glomerulus herum angeordnet sind (B und D). Diesen eher lokalen Projektionsdefekt zeigen 2/3 der betroffenen Mosaikgehirne. In einigen Fällen kommt es jedoch auch zur Fehlprojektion von ORN47b Axonen in vom Zielglomerulus entfernt liegende, ektopische Glomeruli (C und E). Bisherige Analysen, bei denen lediglich die Klasse ORN88a markiert wurde, zeigten in etwa 8% der untersuchten AL eine Projektion *Dscam* mutanter Axone in kleinere ektopische Glomeruli. Die gleichzeitige Markierung des benachbarten ORN47b-Glomerulus macht jedoch deutlich, daß die im Wildtyp auffällig runde Form des Glomerulus in *Dscam* Mutanten häufig gestört ist. In allen analysierten AL, in denen eine Aufspaltung der ORN47b Axone in zwei Glomeruli zu beobachten ist, kommt es stets zu einer Veränderung der Form des ORN88a-Glomerulus (B und D). Bei einer Fehlprojektion der markierten ORN-Klassen in weiter von der eigentlichen Zielregion entfernte Bereiche projizieren ORN47b und ORN88a Axone häufig in benachbarte, ektopische Glomeruli (Projektionen in C und E). Eine Analyse der inter-glomerulären

Grenzen in einzelnen Schnittebenen zeigt, daß auch hier Axone der benachbarten Klassen nicht in gemeinsame Regionen co-konvergieren. Auffällig ist, daß in allen untersuchten AL, in denen auch ORN88a Axone ektopische Glomeruli bilden, diese stets ektopischen ORN47b Glomeruli benachbart sind.

Die von den ORN-Klassen 47a und 22a innervierten Glomeruli DM3 und DM2 liegen beide im dorso-medialen AL, sind jedoch nicht direkt benachbart. In *Dscam* Mutanten projizieren beide Klassen in kleinere ektopische Strukturen (B). Mutante ORN47a Axone projizieren bevorzugt in ektopische Glomeruli in dorso-lateralen und ventralen AL-Regionen (siehe auch 3.3.2.1), ektopische ORN22a Glomeruli projizieren hingegen bevorzugt in die ventrale Hälfte des AL (siehe auch 3.3.2.2). Kommt es zu einer eher lokalen Fehlprojektion von ORN47a Axonen in den dorso-medialen Bereich (Abb. 45, Pfeil in C), in dem auch der ORN22a Glomerulus lokalisiert ist, läßt sich eine Veränderung der Glomerulus Positionierung beobachten. Die Position des ORN22a Glomerulus scheint weiter nach ventral verschoben. Auch hier konnte in keinem Fall die Co-Konvergenz von Axonen beider ORN-Klassen in gemeinsame Bereiche beobachtet werden.

Dscam mutante maxillare ORN Axone konvergieren häufig bereits vor dem AL in ektopische Glomeruli (Abb. 46 B-C und E-F). In keiner der analysierten Fehlprojektionen in SOG-Glomeruli konnte eine Co-Konvergenz von zwei ORN-Klassen in einen gemeinsamen ektopischen Glomerulus gezeigt werden. Auch *Dscam* mutante Axone verschiedener Klassen, die in die Zielregion projizieren sortieren sich in getrennte Bereiche aus (Daten nicht gezeigt). Die Klasse ORN59c innerviert im Wildtyp zwei posteriore Glomeruli, 1 und VM7 (roter Kanal in D). Die beiden Klassen sind im AL nicht direkt benachbart. In *Minute*-Klonen projizieren Axone beider Klassen in ektopische Glomeruli außerhalb des AL. Dort können diese auch direkt benachbart liegen (Kästchen in E) oder im Verhältnis zur eigentlichen Position innerhalb des AL zumindest näher aneinander (F).

Die Analyse der Doppelmarkierungen zeigt, daß der Verlust von *Dscam* zwar zur Fehlprojektion von ORNs verschiedener Klassen in ektopische Glomeruli führt, die Aussortierung verschiedener ORN-Klassen untereinander jedoch nicht beeinträchtigt ist. Zudem wird deutlich, daß die zuvor erwähnten Akkumulationen ektopischer Glomeruli in der Nähe des SOG aus Axonen verschiedener ORN-Klassen bestehen, die sich deutlich voneinander abgrenzen.

3.3.1.3 Analyse reverser MARCM-Klone

Um zu klären, ob auch wildtypische ORN-Axone in *Dscam* mutanten ektopischen Glomeruli projizieren, wurden „reverse MARCM-Klone“ analysiert, die eine selektive Markierung der wildtypischen Axone ermöglichen.

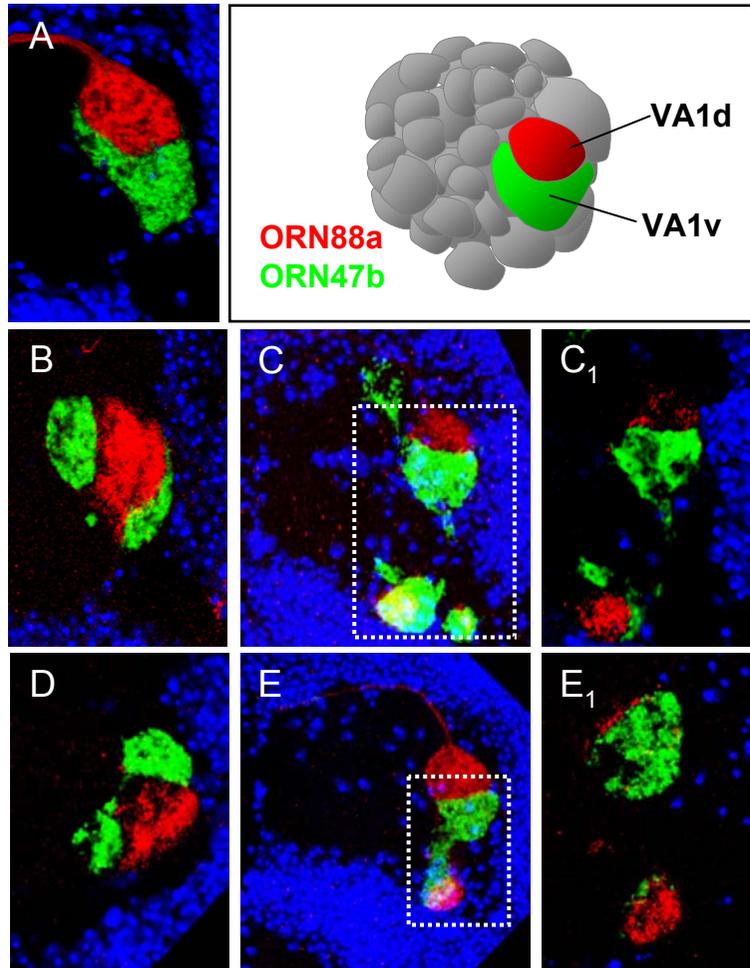


Abb. 44: Innervation *Dscam* mutanter ORN47b und ORN88a Axone. ORN88a Axone innervieren im Wildtyp den Glomerulus VA1d. Direkt darunter konvergieren ORN47b Axone in den V-förmigen VA1v Glomerulus (A und Schema). In *Dscam* Mutanten projizieren ORN47b Axone häufig in zwei etwa gleich große glomeruläre Strukturen, die sich um den ORN88a-Glomerulus herum anordnen (B und D). Die im Wildtyp runde Form des ORN88a-Glomerulus wirkt hier zusammengedrückt (B-D). In einigen Fällen kommt es zur Projektion beider Klassen in mehrere kleinere ektopische Glomeruli, die weiter vom eigentlichen Zielglomerulus entfernt liegen (C und E). Axone beider Klassen sortieren sich hier voneinander aus und konvergieren in abgegrenzte Bereiche. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 PCNA/ FRT42 OR47b:sytGFP; OR88a-Gal4 UAS-CD2/ +* (B-C) *eyFLP; FRT42 PCNA/ FRT42 Dscam21 OR47b:sytGFP; OR88a-Gal4 UAS-CD2/ +* (D-E) *eyFLP; FRT42 PCNA/ FRT42 Dscam33 OR47b:sytGFP; OR88a-Gal4 UAS-CD2/ +*. (C₁) und (E₁) sind vergrößerte, einzelne Schnitte aus den Projektionen in (C) und (E). Die hier abgebildeten antennalen Loben wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) markiert.

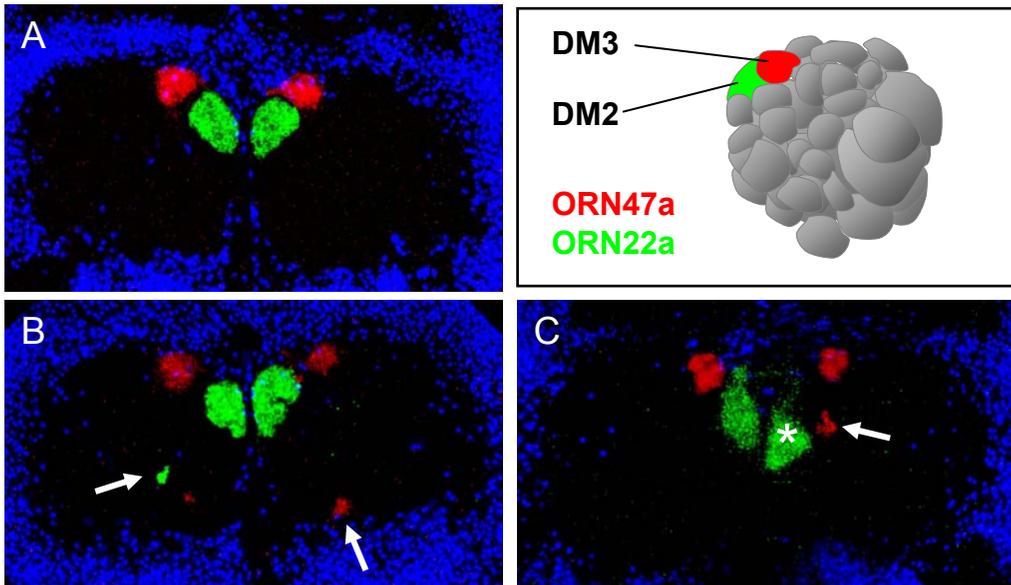


Abb. 45: Innervation *Dscam* mutanter ORN47a und ORN22a Axone. Im Wildtyp liegt der von ORN47a Axonen innervierte DM3 Glomerulus etwas anterior über dem von ORN22a Axonen innervierten DM2 Glomerulus (A und Schema). *Dscam* mutante ORN22a (grün) und ORN47a Axone (rot) projizieren in von der Zielregion weiter entfernte AL Bereiche (Pfeile in B). Bei der in (C) dargestellten, eher lokalen Fehlprojektion von ORN47a Axonen (Pfeil) kommt es zudem zu einer Verschiebung des ORN22a Glomerulus (Sternchen). Im Vergleich zum linken AL liegt der DM2 Glomerulus im rechten AL deutlich weiter ventral. Die beiden dorsalen ORN47a positiven Glomeruli hingegen liegen auf etwa gleicher Höhe. Genotypen: (A) *eyFLP*; *FRT42 PCNA/ FRT42 OR22a:sybGFP*; *OR47a-Gal4 UAS-CD2/ +* (B-C) *eyFLP*; *FRT42 PCNA/ FRT42 Dscam33 OR22a:sybGFP*; *OR47a-Gal4 UAS-CD2/+*. Die hier abgebildeten antennalen Loben wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) markiert.

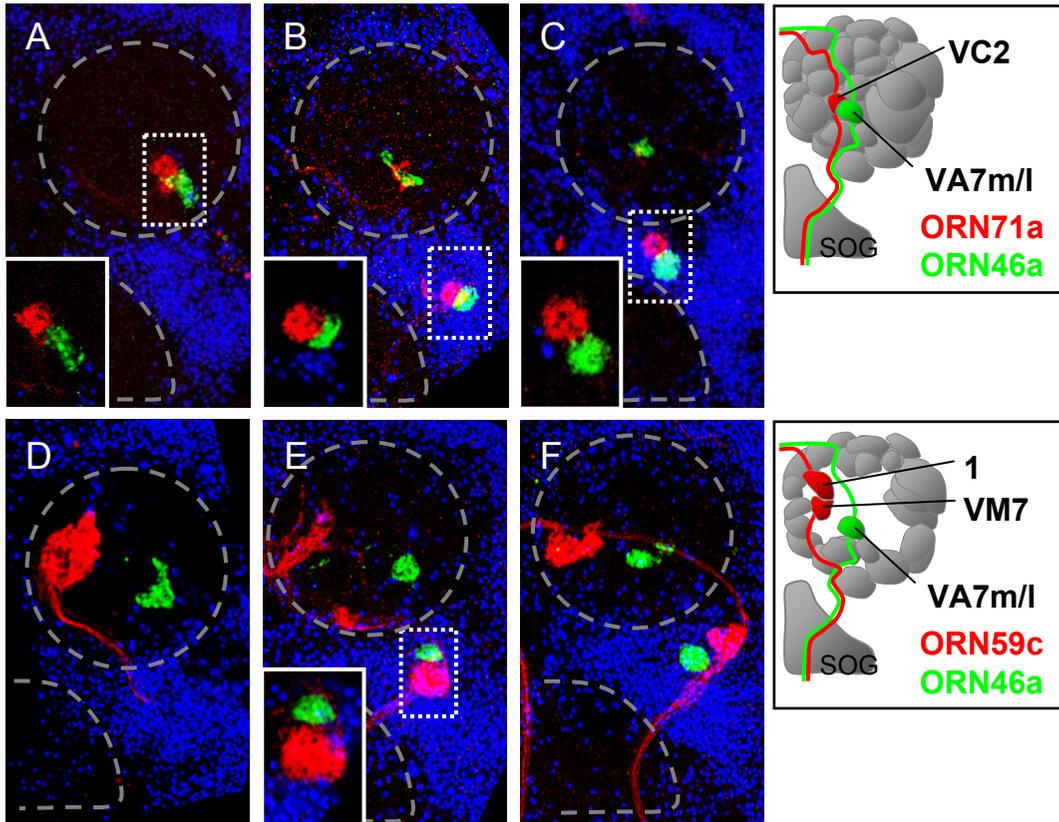


Abb. 46: Innervation *Dscam* mutanter ORN Axone der maxillaren ORN-Klassen 71a, 46a und 59c. Die Klassen ORN46a und ORN71a innervieren direkt benachbarte Glomeruli im AL (Wildtyp in A und Schema). Die Klassen ORN59c und ORN46a liegen etwas weiter auseinander (Wildtyp in D und unteres Schema). *Dscam* mutante Axone bilden auf ihrem Projektionsweg in den AL bereits ektopische Glomeruli (B-C und D-E). Die Ausschnittsvergrößerung einzelner konfokaler Schnitte aus den dargestellten Projektionen zeigen, daß sich die mutanten Axone der verschiedenen Klassen deutlich voneinander abgrenzen und nicht in gemeinsame Bereiche co-konvergieren. Die gestrichelten Linien zeigen die Umrisse des AL und des SOG an. Genotypen: (A) *eyFLP*; *FRT42 OR46a:sytGFP/ FRT42 PCNA*; *OR71a-Gal4 UAS-CD2/+* (B-C) *eyFLP*; *FRT42 Dscam21 OR46a:sytGFP/ FRT42 PCNA*; *OR71a-Gal4 UAS-CD2/+* (D) *eyFLP*; *FRT42 OR46a:sytGFP/ FRT42 PCNA*; *OR59c-Gal4 UAS-CD2/+* (E-F) *eyFLP*; *FRT42 Dscam21 OR46a:sytGFP / FRT42 PCNA*; *OR59c-Gal4 UAS-CD2/+*. Die hier gezeigten antennalen Loben wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

Abb. 47 zeigt die phänotypische Analyse der verschiedenen klonalen Situationen im Vergleich. Während homozygot mutante ORNs in den ‚forward‘ MARCM-Klonen die für die einzelnen ORN-Klassen beschriebenen Projektionsdefekte zeigen, konnte für die in reversen MARCM-Klonen markierten wildtypischen Axone keine Fehlprojektion beobachtet werden. Alle untersuchten AL zeigten ein dem Wildtyp ähnliches Projektionsmuster der markierten ORN-Axone. Dies bedeutet, daß der für *Dscam* beschriebene Phänotyp ausschließlich durch die Fehlprojektion der homozygot mutanten ORNs gebildet wird. DSCAM wirkt in den hier analysierten ORN-Klassen folglich zellautonom.

3.3.1.4 ORN-Projektionsdefekte beim Verlust der *Dscam* Funktion im Zielgebiet

Frühere Expressionsdaten haben gezeigt, daß DSCAM sowohl in den ORNs als auch den PNs exprimiert ist (Hummel et al., 2003). Es stellt sich die Frage, ob die beobachteten Projektionsdefekte der verschiedenen ORN-Klassen auf der Störung einer DSCAM vermittelten Axon-Axon-Interaktion oder aber einer Axon-Dendrit-Interaktion zurückzuführen sind. Um zu klären, ob *Dscam* eine Rolle bei der Erkennung von PNs und ORNs spielt, wurde der Phänotyp der oben beschriebenen *Minute*-Klone mit dem ORN-Projektionsmuster in *Dscam* transheterozygoten Tieren verglichen, in denen neben den ORNs nun auch PNs und LNs mutant sind.

Die Kombination der beiden hypomorphen Allele *Dscam*²⁴ und *Dscam*⁴⁷ führt zu transheterozygoten adulten ‚Escapers‘ (5%), die auf ORN Projektionsdefekte analysiert wurden. Diese *Dscam*²⁴/*Dscam*⁴⁷-Tiere zeigen starke motorische Defekte, entfalten ihre Flügel nicht und überleben meist nur 2 Tage. Ähnlich wie für die Analyse der *Minute*-Klone der ORN-Klassen 47b und 88a, zeigen auch die für *Dscam* transheterozygoten Gehirne die typische Projektion von ORN47b Axonen in zwei größere Glomeruli, die sich um den ORN88a Glomerulus anordnen (Abb. 48 B). Auch kleinere, weiter entfernte ektopische Glomeruli können beobachtet werden (C). Wie auch in den *Minute*-Klonen ist hier die klassen-spezifische Sortierung der ORNs in voneinander getrennte Bereiche noch intakt.

In transheterozygoten AL zeigt auch die Klasse ORN47a den aus den klonalen Analysen bekannten Phänotyp. Die ORN Axone projizieren in ektopische Glomeruli, die sich im gesamten AL verteilen. Auch hier zeigt die Doppelmarkierung, daß die räumliche Orientierung der ORN22a und ORN47a Glomeruli zueinander verändert ist. Diese „Glomeruli-Verschiebungen“ konnten in 19% der für ORN47a und ORN22a markierten AL festgestellt werden (n=16).

Als Beispiel für das Projektionsverhalten maxillarer ORN-Klassen wurden Markierungen der Klassen ORN59c und ORN46a analysiert (Abb. 48 G-J). Auch hier lassen sich keine Unterschiede zum Projektionsdefekt der ORNs in *Minute*-Klonen feststellen (Vergleiche mit

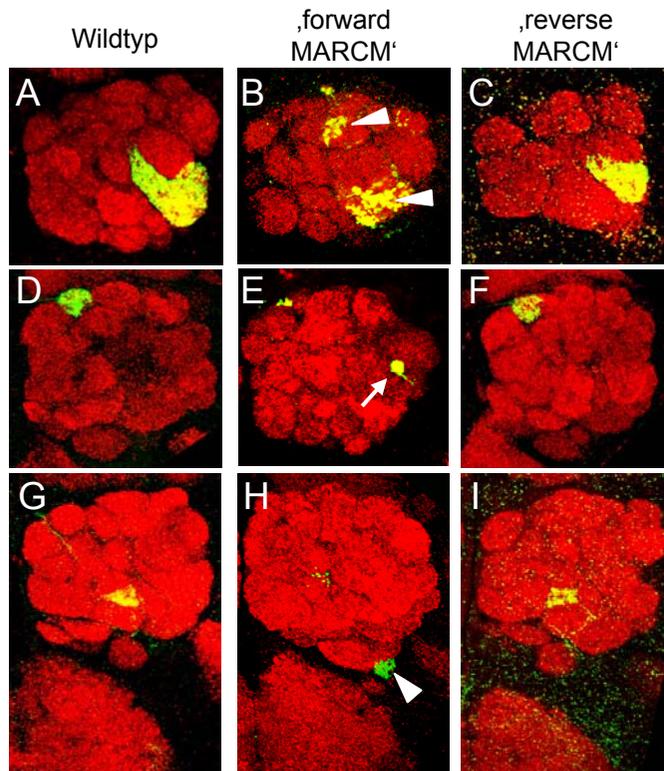


Abb. 47: Selektive Markierung homozygot *Dscam* mutanter und wildtypischer ORN Axone. In der ersten Spalte ist jeweils das wildtypische Innervationsmuster der Klassen ORN47b (A), ORN47a (D) und ORN46a (G) dargestellt. Die mittlere Spalte zeigt die Markierung der *Dscam* mutanter Axone der verschiedenen ORN-Klassen. *Dscam* mutante ORN47b Axone projizieren in zwei Glomeruli, die um den Nachbarglomerulus angeordnet sind (Pfeilspitzen in B). Homozygot mutante ORN47a Axone konvergieren in kleinere Glomeruli (E) und mutante ORN46a Axone stoppen noch bevor sie den AL erreichen und bilden dort ektopische Glomeruli (Pfeilspitze in H). Die Markierung der wildtypischen Axone im *Dscam* Klon (rechte Spalte) zeigt, daß diese nicht in die ektopischen Glomeruli terminieren. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42/ FRT42 Gal80; OR47b-Gal4 UAS-sytGFP/+* (B) *eyFLP; FRT42 Dscam21/ FRT42 Gal80; OR47b-Gal4 UAS-sytGFP/+* (C) *eyFLP; FRT42/ FRT42 Dscam21 Gal80; OR47b-Gal4 UAS-sytGFP/+* (D) *eyFLP; FRT42/ FRT42 Gal80; OR47a-Gal4 UAS-sytGFP/+* (E) *eyFLP; FRT42 Dscam21/ FRT42 Gal80; OR47a-Gal4 UAS-sytGFP/+* (F) *eyFLP; FRT42/ FRT42 Dscam21 Gal80; OR47a-Gal4 UAS-sytGFP/+* (G) *eyFLP; FRT42/ FRT42 Gal80; OR46a-Gal4 UAS-CD8GFP/+* (H) *eyFLP; FRT42 Dscam21/ FRT42 Gal80; OR46a-Gal4 UAS-CD8GFP /+* (I) *eyFLP; FRT42/ FRT42 Dscam21 Gal80; OR46a-Gal4 UAS-CD8GFP /+* Die dargestellten AL wurden mit α -GFP (grün) und α -Ncad (rot) markiert.

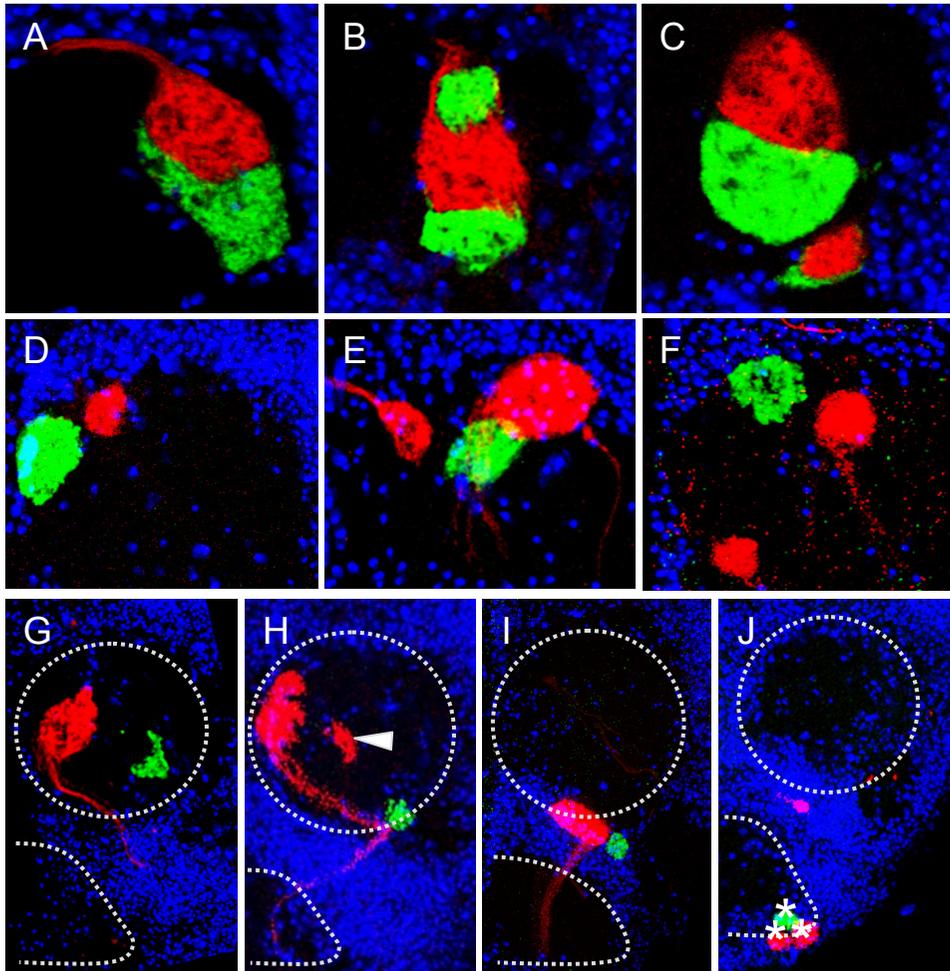


Abb. 48: Projektionsdefekte verschiedener ORN Klassen in *Dscam* transheterozygoten Fliegen. Im Wildtyp umfaßt der sichelförmige ORN47b Glomerulus den dorsal darüber liegenden ORN88a Glomerulus (A). In *Dscam* transheterozygoten Tieren kommt es häufig zu einer Spaltung des ORN47b Glomerulus (B), in einigen Fällen sogar zu einer Spaltung beider Glomeruli (C). Axone beider ORN Klassen konvergieren stets in deutlich voneinander abgegrenzte Bereiche. Auch *Dscam* transheterozygote ORN47a Axone projizieren in ektopische Glomeruli (E-F, hier zusammen mit ORN22a (grün) dargestellt). Maxillare ORNs konvergieren in *Dscam* transheterozygoten Tieren in ektopische Glomeruli innerhalb (Pfeilspitze in H) und außerhalb des AL (I und Sternchen in J). Genotypen: (A) *OR47b::sybGFP/ OR88a-Gal4 UAS-CD2* (B-C) *Dscam47/Dscam24; OR47b::sybGFP/ OR88a-Gal4 UAS-CD2* (D) *OR22a::sybGFP/ OR47a-Gal4 UAS-CD2* (E-F) *Dscam47/Dscam24; OR22a::sybGFP/ OR47a-Gal4 UAS-CD2* (G) *OR59c-Gal4 UAS-CD2/ OR46a::sybGFP* (H-J) *Dscam47/Dscam24; OR59c-Gal4 UAS-CD2/ OR46a::sybGFP*. Alle hier dargestellten AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt. Die Markierungen in (G-J) zeigen die Umrisse des AL und SOG.

Abb. 46 E-F). Neben ektopisch positionierten Glomeruli innerhalb des AL (Pfeilspitze in H) treten auch hier wieder ektopische glomeruläre Strukturen am Ein- und Austrittspunkt des maxillaren Nervs in bzw. aus dem SOG auf.

Der zusätzliche *Dscam* Verlust im Zielgebiet führt nicht zu einer verstärkten Fehlprojektion von ORN Axonen. Die phänotypische Ausprägung in transheterozygoten Tieren gleicht der Situation in *Minute*-Klonen. Auch hier findet ein Teil der ORNs seinen eigentlichen Zielglomerulus. Zudem sind Anzahl und Größe der ektopischen Glomeruli vergleichbar. Falls DSCAM in PNs und LNs eine Funktion als Wegfindungssignal hätte, so wäre eine verstärkte Fehlprojektion zu erwarten gewesen. Die Wegfindung der ORN-Axone, d.h. die Erkennung des Zielgebiets, scheint daher *Dscam* unabhängig zu sein. DSCAM stellt somit kein Erkennungsmolekül für ORNs und ihre korrespondierenden PNs dar. Obwohl die Art der Fehlprojektionen sich in Transheterozygoten nicht verstärkt, ist die phänotypische Penetranz deutlich höher als in *Minute*-Klonen. Für alle der analysierten Doppelmarkierungen lag die phänotypische Penetranz in transheterozygoten Tieren bei 100%.

3.3.2 Innervation ektopischer Glomeruli durch PN-Dendriten

Einige der *Dscam* mutanten Axone konvergieren in weit vom eigentlichen Zielgebiet entfernten Regionen. Es stellt sich die Frage, ob diese entfernt liegenden, ektopischen Glomeruli von PN Dendriten innerviert werden. Mit Hilfe der Linie *GH146-Gal4* wurde nun untersucht, ob ektopische Glomeruli, die von *Dscam* mutanten ORN-Klassen gebildet werden von Dendriten der markierten PNs innerviert sind.

3.3.2.1 Dendritische Innervation ektopischer ORN47a Glomeruli in *Dscam* Mutanten

Die Linie *GH146* markiert unter anderem auch die PNs, die in den von ORN47a innervierten DM3 Glomerulus projizieren. Neben der Projektion in den eigentlichen Zielglomerulus terminieren *Dscam* mutante ORN47a Axone in mehrer ektopische Glomeruli, die oft weit von der eigentlichen Zielregion entfernt lokalisiert sind. Dies macht eine genauere Analyse der dendritischen Innervation ektopischer Glomeruli besonders interessant.

Die Innervation des wildtypischen ORN47a Glomerulus zeigt in einer einzelnen konfokalen Schnittebene durch die Mitte des Glomerulus deutlich die Bereiche in denen PN-Dendriten und ORN-Axone ineinander greifen (Wildtyp in Abb. 49 A). Auch in den Mosaik-Gehirnen wird der von ORN47a Axonen innervierte DM3 Glomerulus von feinen dendritischen Verzweigungen der PNs durchzogen (Ausschnittsvergrößerungen in C₁ und D₁). Die Analyse der ektopischen Glomeruli zeigt, daß nicht alle von PNs innerviert werden (B₁ und C₂). Um eine Korrelation zwischen Innervations-Verhalten der PNs und Lokalisation der *Dscam* mutanten ektopischen Glomeruli zu finden, wurden die Größe der ektopischen Glomeruli,

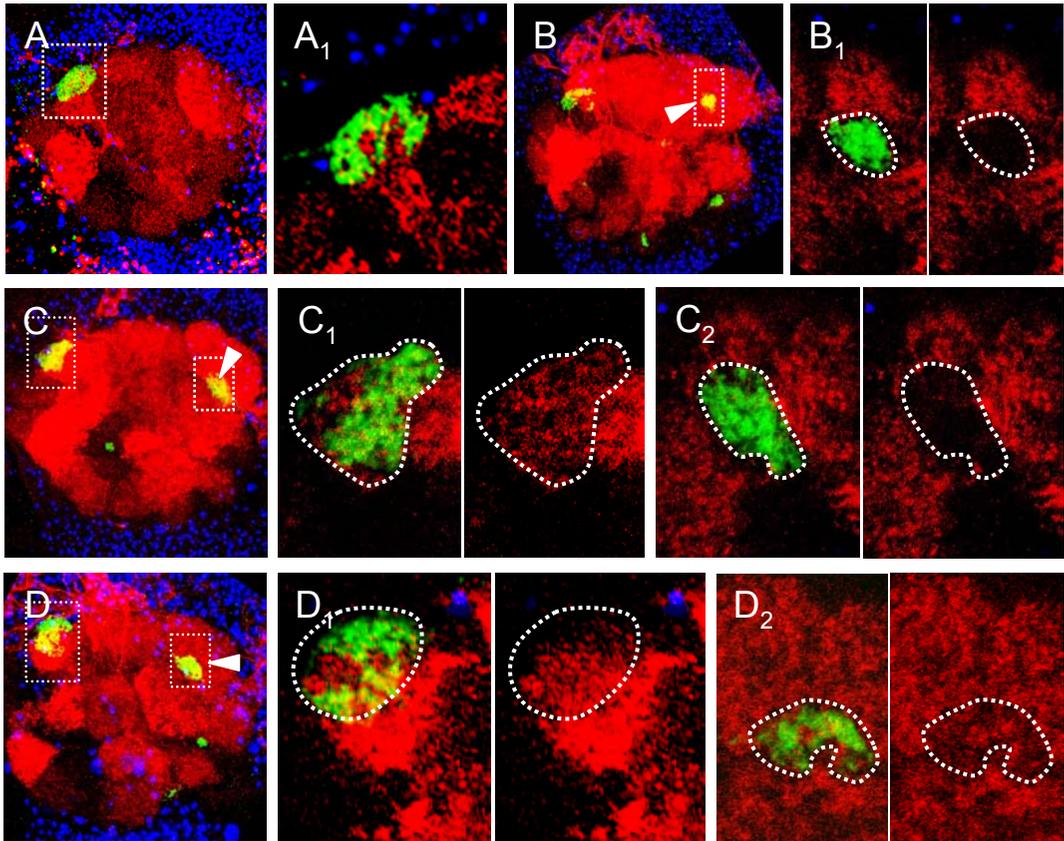


Abb. 49: Dendritische Innervation ectopischer ORN47a Glomeruli durch PNs. Der ORN47a Glomerulus wird im Wildtyp (A) von *GH146* positiven PN-Dendriten innerviert. *Dscam* mutante ORN47a Axone konvergieren unter anderem häufiger im dorso-lateralen AL zu ectopischen Glomeruli (Pfeilspitzen in B,C und D). Während der eigentliche Zielglomerulus von ORN47a stets von PN-Dendriten innerviert ist (*C*₁ und *D*₁), werden ectopische Glomeruli im dorso-lateralen Bereich hingegen nicht immer innerviert. In (*B*₁ und *C*₂) scheinen die umliegenden PNs eine Innervation des von ORN47a Axonen besetzten Bereichs zu meiden. Im unter (*D*₂) gezeigten, weiter anterior liegenden dorso-lateralen Glomerulus ist jedoch eine deutliche Innervation durch die fein verzweigten PN-Dendriten zu erkennen. Die Bilder (A-D) zeigen Projektionen mehrerer konfokaler Einzelschnitte. Die anderen Abbildungen sind Vergrößerungen einzelner Schnitte aus diesen Projektionen. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 GH146/ FRT42PCNA; OR47b::syGFP UAS-CD2/+* (B-D) *eyFLP; FRT42 Dscam21 GH146/ FRT42PCNA; OR47b::syGFP UAS-CD2/+*. Die gezeigten AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

ihre Lokalisation im AL sowie ihre Distanz zur eigentlichen Zielregion vermessen und dann miteinander verglichen (Abb. 50).

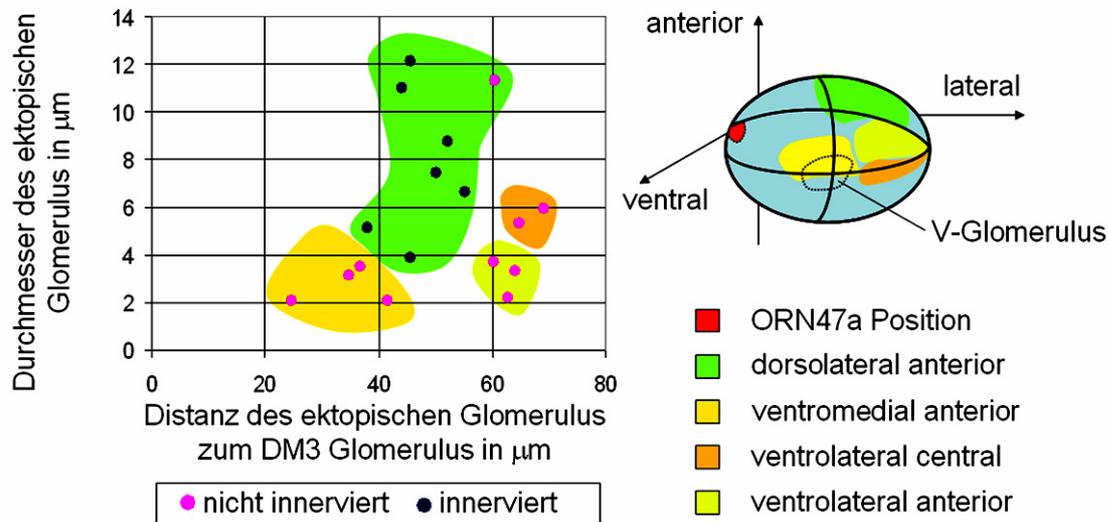


Abb. 50: Analyse zur dendritischen Innervation ectopischer ORN47a Glomeruli.

Die Grafik faßt einzelne ectopische Glomeruli aus unterschiedlichen AL (n=8) zusammen. Auf der X-Achse ist die Distanz des ectopischen Glomerulus zum DM3-Zielglomerulus aufgetragen. Die Y-Achse gibt den Durchmesser des ectopischen Glomerulus an. Die in der Grafik dargestellten Farbfelder korrespondieren mit den farblich gekennzeichneten Bereichen im AL-Schema. Der rote Bereich im AL gibt die Position des DM3 Glomerulus an. Die Position des V-Glomerulus ist durch eine Umrisslinie gekennzeichnet. Es werden nur die ectopischen ORN47a Glomeruli von PNs innerviert, die anterior im dorso-lateralen AL liegen (grüner Bereich in Grafik und AL-Schema). Alle anderen Glomeruli, auch solche mit geringerer Distanz zur Zielregion, zeigen keine Innervation.

Für die Innervation ectopischer ORN47a Glomeruli läßt sich sagen, daß nur anterior im dorso-lateralen AL lokalisierte, ectopische Glomeruli von PN-Dendriten innerviert werden. Selbst ectopische Glomeruli, die anterior im ventro-medialen AL, d.h. näher am eigentlichen Zielglomerulus liegen, werden nicht von PNs innerviert. Die Lokalisation der ectopischen Glomeruli scheint für die Innervation von PNs also von Bedeutung zu sein. Zudem läßt sich eine Korrelation zwischen Glomerulus-Durchmesser und PN-Innervation feststellen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob hier die Innervation durch PNs für die Größe der Glomeruli verantwortlich ist oder, ob besonders kleine Glomeruli einfach nicht von PNs innerviert werden.

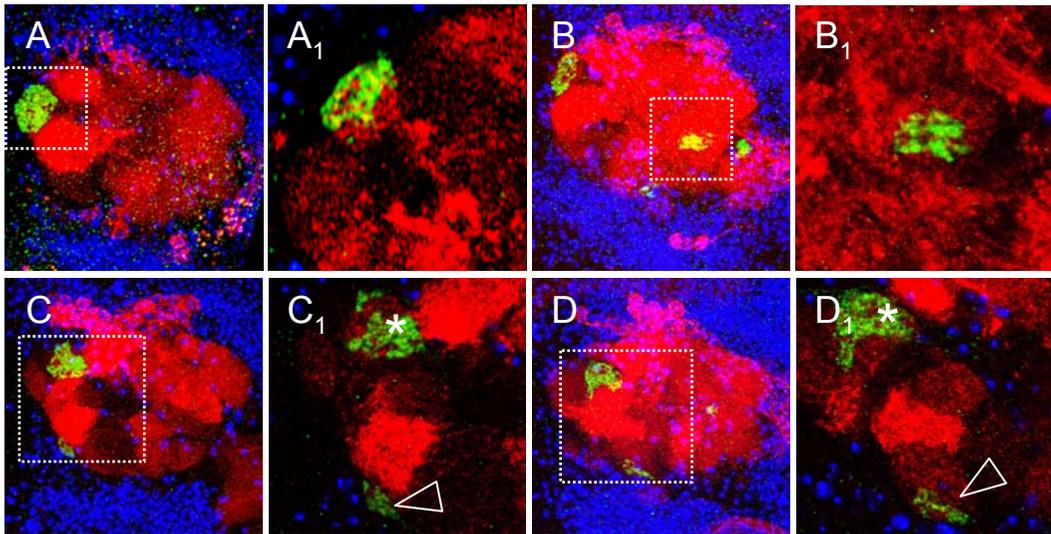


Abb. 51: Dendritische Innervation ectopischer ORN22a Glomeruli durch PNs. ORN22a Axone innervieren im Wildtyp (A) den posterior im AL liegenden DM2-Glomerulus. Dieser wird ebenfalls von *GH146* positiven PN-Dendriten innerviert (A₁). In allen untersuchten *Dscam* Mosaik-Gehirnen ist die PN-Innervation des eigentlichen Zielglomerulus (Sternchen in C₁ und D₁) ähnlich dem Wildtyp. *Dscam* mutante ORN22a Axone projizieren unter anderem auch in ventromediale (Pfeilspitzen in C₁ und D₁) oder ventrolaterale Bereiche (B₁) des AL. Diese ectopischen Glomeruli werden in den hier dargestellten Beispielen (B-D) unterschiedlich stark von *GH146* positiven PN-Dendriten innerviert. Während in (B₁) der ectopische Glomerulus deutlich mit verzweigten PN-Dendriten durchzogen ist, scheint die Innervation im unter (C₁) gezeigten Fall etwas schwächer (Pfeilspitze). Die Bilder (A-D) zeigen Projektionen mehrerer konfokaler Einzelschnitte. Die anderen Abbildungen sind Vergrößerungen einzelner Schnitte aus diesen Projektionen. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 GH146/ FRT42PCNA; OR22a::syGFP UAS-CD2/+* (B-D) *eyFLP; FRT42 Dscam21 GH146/ FRT42PCNA; OR22a::syGFP UAS-CD2/+* Die gezeigten AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

3.3.2.2 Dendritische Innervation ektopischer ORN22a Glomeruli in *Dscam* Mutanten

Die Analyse der ektopischen ORN22a Glomeruli ist besonders interessant im direkten Vergleich zu ektopischen ORN47a Glomeruli. Da die eigentlichen Zielglomeruli, DM2 und DM3, im AL relativ nah zueinander liegen, projizieren die Axone beider Klassen entlang ähnlicher Routen. Zum einen stellt sich die Frage, ob mutante Axone der beiden Klassen so auch in ähnliche Regionen konvergieren und, ob die dendritische Innervation vergleichbar ist. Die PN-Innervation ektopischer ORN22a Glomeruli ist in Abbildung 51 dargestellt. Abbildung 52 zeigt die für ORN22a Glomeruli gemessenen Daten im Überblick.

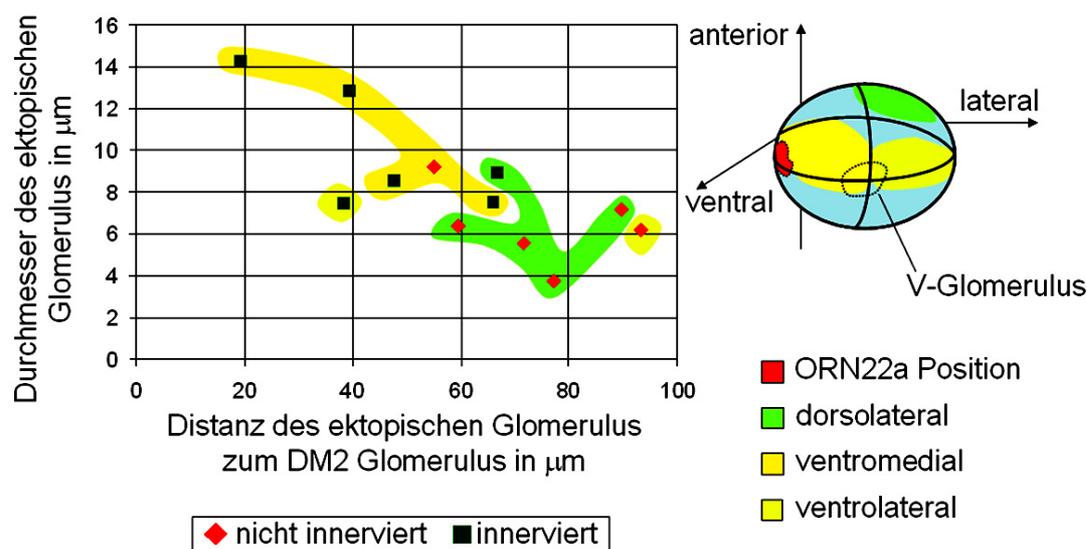


Abb. 52: Analyse zur dendritischen Innervation ektopischer ORN22a Glomeruli. Die Grafik faßt ektopische ORN22a Glomeruli aus insgesamt sieben AL zusammen. Die X-Achse gibt die Distanz des ektopischen Glomerulus zum DM2-Zielglomerulus an, die Y-Achse den Durchmesser des ektopischen Glomerulus. Die Farbfelder in der Grafik korrespondieren mit den farblich gekennzeichneten Bereichen im schematisch dargestellten AL. Der rote Bereich im AL gibt die Position des DM2 Glomerulus an. Ektopische ORN22a Glomeruli sind sowohl dorso-lateral als auch ventral im AL lokalisiert. PN-Innervation ist jedoch hauptsächlich in ventralen Glomeruli zu beobachten. Nur einer der dorso-lateral lokalisierten Glomeruli zeigt eine PN-Innervation.

Ektopische ORN22a und ORN47a Glomeruli sind also in ähnlichen AL Regionen lokalisiert. Jedoch werden ektopische ORN22a Glomeruli meist dann von PNs innerviert, wenn sie in der ventralen Hälfte des AL liegen und so eine geringere Distanz zum Zielglomerulus haben. Obwohl die eigentlichen Zielglomeruli und somit die korrespondierenden PNs in einer ähnlichen Region liegen ist die Innervation der ektopischen Glomeruli sehr verschieden.

3.3.2.3 Dendritische Innervation ektopischer ORN47b Glomeruli in *Dscam* Mutanten

Im Gegensatz zu den Fehlprojektionen *Dscam* mutanter ORN47a und ORN22a Axone in weit entfernte Regionen, zeigt die Klasse ORN47b eher einen lokalen Projektionsdefekt. Der in *Minute*-Klonen meist beobachtete Phänotyp *Dscam* mutanter ORN47b Axone ist die Aufteilung in zwei größere glomeruläre Strukturen, die in der eigentlichen Zielregion lokalisiert sind (Abb. 53 B). Kommt es jedoch zur Projektion *Dscam* mutanter Axone in mehrere ektopische Strukturen, so sind auch diese vergleichsweise nah zur dorso-lateralen Zielregion lokalisiert, verteilen sich jedoch meist entlang der anterior-posterior Achse. In allen untersuchten AL, in denen es zu einer Spaltung des VA1d Glomerulus kam (B und B₁), konnte eine deutliche Innervation beider Kompartimente durch PNs festgestellt werden (n=8). Innerhalb der beiden Glomeruli sind stets *GH146* positive Dendriten zu sehen.

Kommt es zur Fehlprojektion mutanter ORN47b Axone in etwas weiter entfernte Regionen des AL, so kann meist auch hier die dendritische Innervation ektopischer Glomeruli beobachtet werden. Einige der ektopischen Glomeruli, die sich in derselben anterior-posterior Ebene befinden zeigen jedoch eine unterschiedlich starke Innervation durch PN-Dendriten (D₃). Die genaue Lokalisation der Glomeruli scheint hier zumindest für die Dichte der PN-Innervation von Bedeutung zu sein. Auch hier wurden die Daten zu Größe, Distanz und Lokalisation der ektopischen ORN47b Glomeruli in einer Grafik zusammengefaßt (Abb. 54). Es wurden jedoch nur solche Glomeruli in die Analyse mit einbezogen, die deutlich von einem als solchen identifizierbaren Zielglomerulus entfernt lagen. Alle AL, in denen der VA1d Glomerulus in zwei größere glomeruläre Strukturen geteilt ist, wurden nicht berücksichtigt, da hier keine Distanz zum Zielglomerulus ermittelt werden kann.

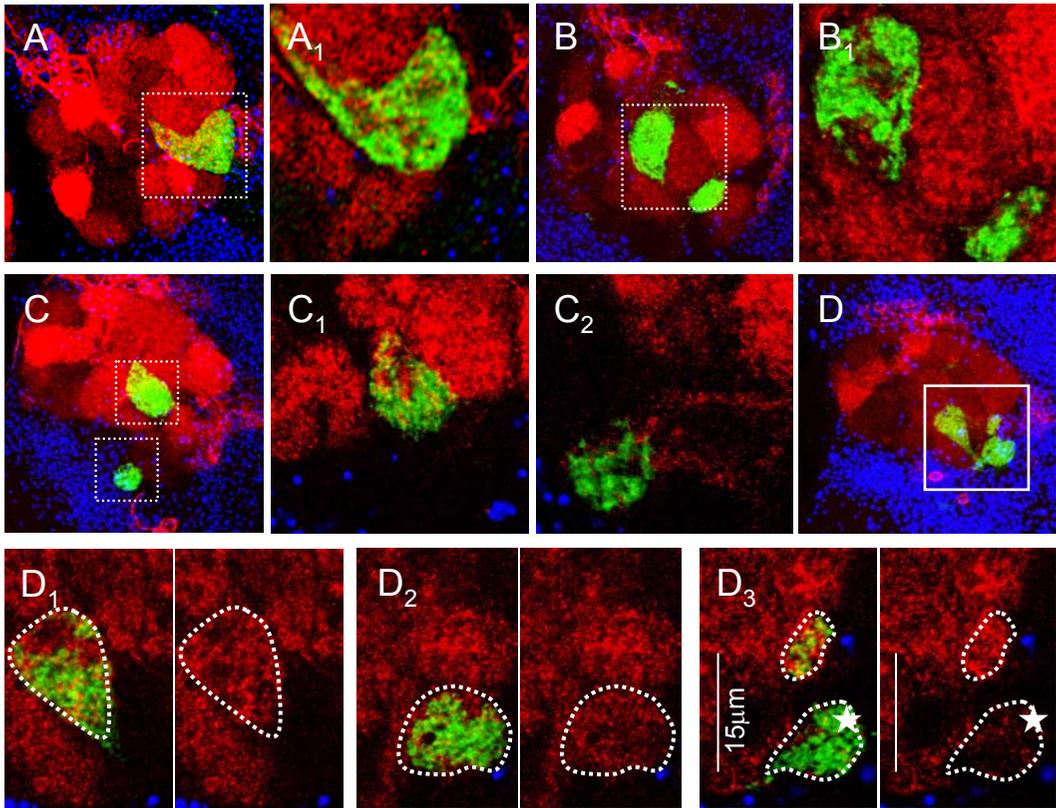


Abb. 53: Dendritische Innervation ektopischer ORN47b Glomeruli durch PNs.
 Im Wildtyp (A) wird der sichelförmige ORN47b Glomerulus durch *GH146* positive PN-Dendriten innerviert (A₁). In *Dscam* Mutanten teilen sich ORN47b Axone auf zwei anteriore (B) oder auch mehrere kleinere ektopische Glomeruli auf (C und D), die auch weiter posterior im AL liegen können. Neben den größeren von ORN47b innervierten Bereichen (C₁ und D₁) werden auch kleinere weiter posterior liegende ektopische Glomeruli von PN-Dendriten innerviert (C₂, D₂ und D₃). Die Dichte der innervierenden PN-Dendriten variiert jedoch. (D₁-D₃) zeigen jeweils einzelne Schnitte aus der konfokalen Projektion in (D), die von anterior nach posterior angeordnet sind. Auffällig ist, daß auch ektopische Glomeruli, die in der gleichen anterior-posterior Ebene liegen unterschiedlich stark von PNs innerviert sind. So ist der weiter ventral gelegene Glomerulus (Sternchen in D₃) im Vergleich zum dorsalen deutlich schwächer innerviert. (A-D) zeigen Projektionen mehrerer konfokaler Einzelschnitte. Die anderen Abbildungen sind einzelne Schnittebenen aus diesen Projektionen. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 GH146-Gal4/ FRT42PCNA; OR47b::sytGFP UAS-CD2/+* (B-D) *eyFLP; FRT42 Dscam21 GH146-Gal4/ FRT42PCNA; OR47b::sytGFP UAS-CD2/+*. Die gezeigten AL wurden mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

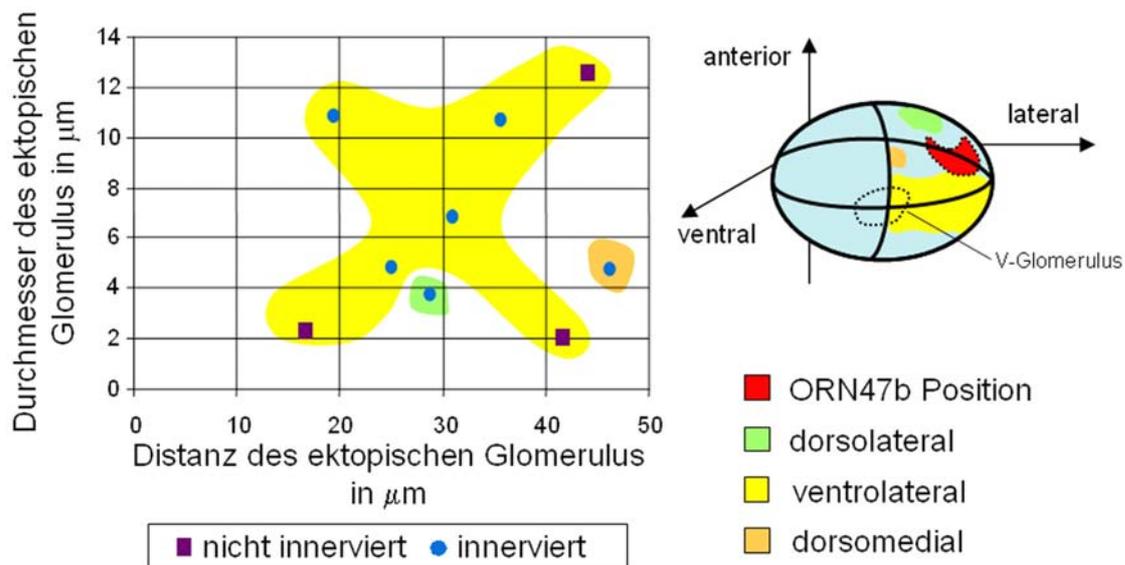


Abb. 54: Analyse zur dendritischen Innervation ectopischer ORN47b Glomeruli. Da eine Fehlprojektion von ORN47b Axonen in weiter entfernte Bereiche des AL nicht so häufig vorkommt, konnten hier nur wenige AL in die Analyse mit einbezogen werden ($n=4$). Die X-Achse gibt die Distanz des ectopischen Glomerulus zum VA1v-Zielglomerulus an, die Y-Achse den Durchmesser des ectopischen Glomerulus. Die in der Grafik dargestellten Farbfelder korrespondieren mit den farblich gekennzeichneten Bereichen im AL-Schema. Der rote Bereich im AL gibt die wildtypische Position des VA1v Glomerulus an. Die ectopischen ORN47b Glomeruli verteilen sich nur in der lateralen Hälfte des AL. Der Großteil der Glomeruli liegt hierbei posterior unterhalb der eigentlichen Zielregion (gelbes Farbfeld). Fast alle hier analysierten ORN47b Glomeruli werden von PNs innerviert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die *Dscam* mutanten ORNs der verschiedenen Klassen in bestimmte Bereiche des AL projizieren. Während sich ORN47b Axone entweder in zwei große ectopische Strukturen aufteilen oder weiter posterior im ventro-lateralen AL in kleinere ectopische Glomeruli konvergieren, projizieren mutante ORN47a und ORN22a Axone hauptsächlich in dorso-laterale bzw. ventro-laterale Regionen. Hierbei ist es von Klasse zu Klasse verschieden, wann ectopische Glomeruli von PN-Dendriten innerviert werden. Allen drei hier untersuchten ORN-Klassen ist gemeinsam, daß erst in ectopischen Glomeruli mit einer Größe von mindestens $4\mu\text{m}$ Durchmesser eine Innervation durch PN-Dendriten sichtbar ist.

3.3.3 Spezifität der ORN-PN-Erkennung in *Dscam* Mutanten

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, daß sich in *Dscam* Mutanten ectopische projizierende ORNs durchaus mit Dendriten der PNs verschalten können. Die

Analyse der Doppelmarkierung von *MZ19*-Gal4 und den Klassen ORN47b und ORN88a sollte die Frage nach der Spezifität der ORN-PN-Erkennung klären.

In *Minute*-Klonen zeigen ORN47b Axone häufig eine Aufteilung in zwei glomeruläre Strukturen, die um den ORN88a Glomerulus herum positioniert sind (Abb. 55 B und C). Betrachtet man nun die Anordnung der *MZ19* positiven Glomeruli, so fällt auf, daß auch diese eine veränderte Position im AL zeigen. In einigen der untersuchten AL zeigt der ORN88a Glomerulus (VA1d) eine eher längliche Form, die von zwei ORN47b innervierten Strukturen eingerahmt ist. Die ektopischen ORN47b Glomeruli zeigten in keinem der analysierten Mosaik-Gehirne eine Fehlinnervation durch *MZ19* positive PN-Dendriten. Vielmehr ist eine deutliche Abgrenzung zwischen den beteiligten Zelltypen zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigt eine selektive Markierung der ORN88a Axone in *Minute*-Klonen, daß solch ein langgestreckter ORN88a Glomerulus auch von seinen *MZ19* positiven PN-Dendriten innerviert wird (Abb. 56 B). Im Fall der hier analysierten ORN-Klassen 47b und 88a scheint die spezifische Erkennung der korrespondierenden PN-Klassen in *Minute*-Klonen mit *Dscam*²¹ nicht gestört zu sein. Der für die ORNs beobachtete Projektionsdefekt bzw. Veränderung der glomerulären Form und Position wurde in allen analysierten AL vom Innervationsmuster der PNs widergespiegelt.

3.3.4 Innervation ektopischer Glomeruli durch LN-Dendriten

Für die ektopischen Glomeruli der Klassen ORN47a und ORN47b konnte bereits eine Innervation durch PN-Dendriten gezeigt werden. Auch die Analyse des LN-Innervationsmusters in *Minute*-Klonen ergab für beide Klassen stets eine gleichmäßige Verteilung der LN-Dendriten innerhalb der ektopischen Glomeruli (Abb. 57 B und D), sofern die ektopischen Glomeruli innerhalb des AL lokalisiert waren. Kleinere ektopische Strukturen, wie sie für einige antennale ORN-Klassen auch im AMMC und am Eintrittspunkt des antennalen Nervs am AL gezeigt werden konnten, werden nicht von LNs innerviert. Auch die Analyse ektopischer Glomeruli der Klasse ORN21a zeigte in allen der untersuchten Mosaik-Gehirne eine deutliche Innervation durch LN-Dendriten. Interessanterweise scheinen auch kleinere, ektopische Strukturen, mit einem Durchmesser unter 4µm, noch einzelne LN-Dendriten zu beinhalten. Im Vergleich zur PN-Innervation fanden sich in allen analysierten ektopischen Glomeruli innerhalb des AL stets LN-Dendriten. Hier scheinen Größe und Lokalisation der Glomeruli nicht von Bedeutung zu sein.

Besonders interessant ist die Analyse der ektopischen ORN46a Glomeruli. Maxillare ORN-Axone terminieren in *Minute*-Klonen häufig in Regionen außerhalb des AL. Teilweise kommt es zu Akkumulationen ektopischer Glomeruli direkt unterhalb des AL. Hier ist auch in ektopischen ORN46a Glomeruli, die direkt unterhalb des AL lokalisiert sind, d.h. beispielsweise dem V-Glomerulus direkt benachbart sind, eine deutliche Innervation durch

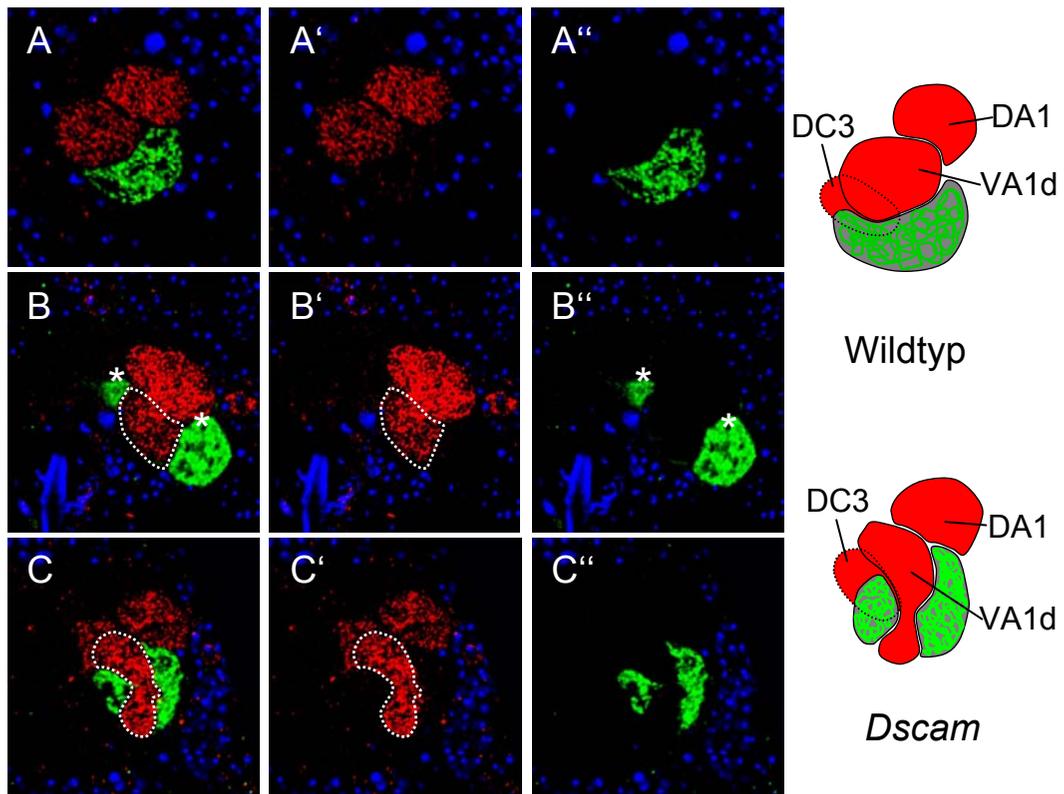


Abb. 55: Spezifität der ORN-PN-Erkennung in *Dscam* Mutanten (1). Die Linie *MZ19-Gal4* markiert die dendritische PN-Innervation der Glomeruli DA1, VA1d und DC3. Im Wildtyp (A) liegen die beiden Glomeruli DA1 und VA1d anterior im AL. Unterhalb des VA1d Glomerulus ist der DC3 Glomerulus (siehe Schemazeichnung). *Dscam* mutante ORN47b Axone projizieren oft in zwei größere ektopische Glomeruli, die dem VA1d Glomerulus benachbart liegen (Sternchen in B). In einigen Fällen sind diese Glomeruli so lokalisiert, daß eine morphologische Veränderung des VA1d Glomerulus sichtbar wird (gestrichelte Umrisslinie in C). In keinem der gezeigten Beispiele kommt es jedoch zur Verschaltung *MZ19* positiver Dendriten mit ektopisch projizierenden ORN47b-Axonen. Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 MZ19-Gal4/ FRT42 PCNA; OR47b:sytGFP UAS-CD2/+* (B-C) *eyFLP; FRT42 Dscam21 MZ19-Gal4/ FRT42 PCNA; OR47b:sytGFP UAS-CD2/+*. Die hier abgebildeten AL wurden alle mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt. (A'-C') und (A''-C'') zeigen jeweils den roten bzw. grünen Kanal aus (A-C).

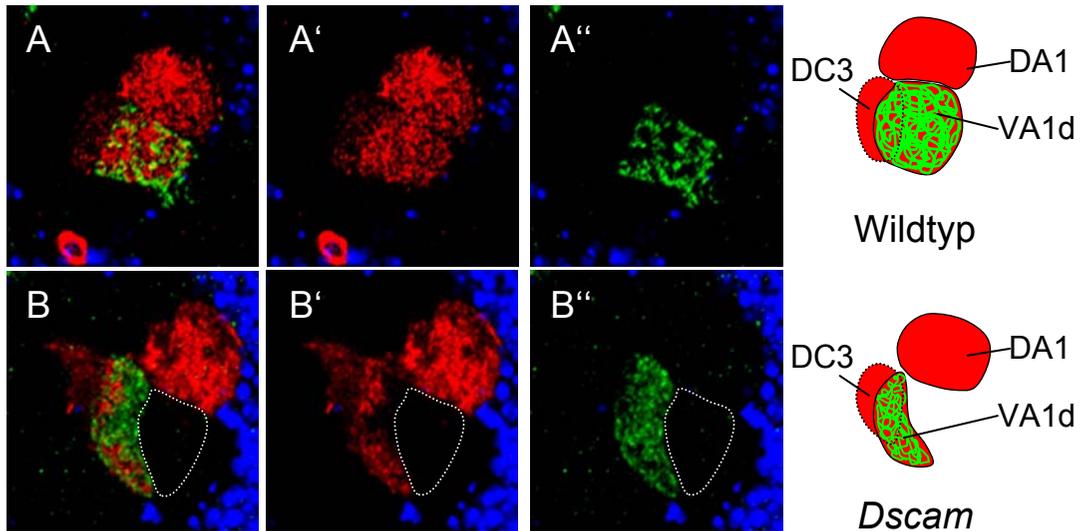


Abb. 56: Spezifität der ORN-PN-Erkennung in *Dscam* Mutanten (2). ORN88a Axone innervieren den *MZ19* positiven VA1d Glomerulus (Wildtyp in A). In *Dscam Minute*-Klonen kommt es häufig zur Verschiebung der glomerulären Strukturen. Der ORN88a Glomerulus ist elongiert und liegt nicht mehr direkt unterhalb des DA1 Glomerulus. Die Umrisslinie in (B) gibt die Form eines mutmaßlichen, veränderten ORN47b Glomerulus an (vergleiche ORN47b Phänotyp in Abb. 55 C), der sich keilförmig zwischen die *MZ19* positiven Glomeruli schiebt. Trotz der veränderten Form und Position wird der VA1d Glomerulus neben den ORN Axonen auch noch von *MZ19* positiven PN-Dendriten innerviert. Genotypen: (A) *eyFLP UAS-CD2; FRT42 MZ19-Gal4/ FRT42 PCNA; OR88a:sytGFP UAS-CD2/+* (B) *eyFLP UAS-CD2; FRT42 Dscam21 MZ19-Gal4/ FRT42 PCNA; OR88a:sytGFP UAS-CD2/+*. Die hier abgebildeten AL wurden alle mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt. (A'-B') und (A''-B'') zeigen jeweils den roten bzw. grünen Kanal aus (A-B).

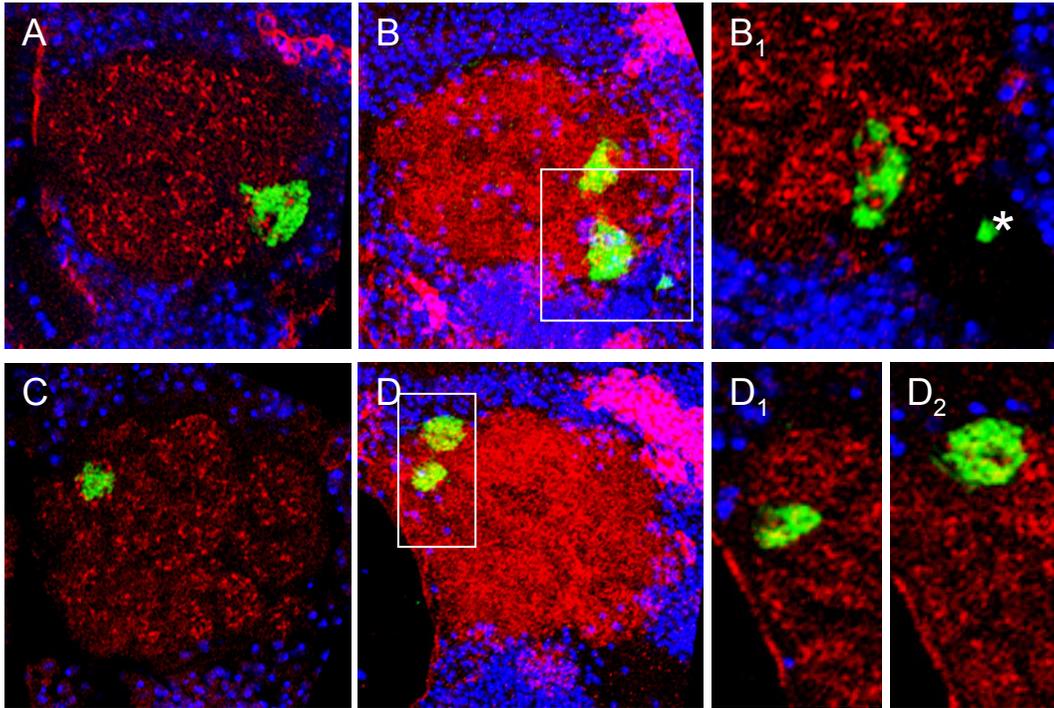


Abb. 57: Innervation ectopischer Glomeruli durch LN-Dendriten (1). Die Linie C753-Gal4 markiert eine Vielzahl von LNs, die ihre Dendriten aus zwei dorsalen Zell-Clustern in den AL projizieren und alle Glomeruli des AL innervieren (Wildtypen in A und C). *Dscam* mutante ORN47b-Axone projizieren meist in zwei etwa gleich große Strukturen (B). In einigen Fällen sind jedoch auch kleinere ectopische Glomeruli am Eintrittspunkt des antennalen Nervs zu beobachten (Sternchen in B₁). Die beiden großen Glomeruli werden gleichmäßig von C753 positiven LN-Dendriten innerviert, die ectopische Struktur außerhalb des AL jedoch nicht. *Dscam* mutante ORN47a-Axone (D) konvergieren wie im Wildtyp in den DM3-Glomerulus und außerdem in einen weiter ventral-anterior liegenden ectopischen Glomerulus. Beide Glomeruli werden gleichermaßen von LN-Dendriten innerviert (D₁-D₂). Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 OR47b:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (B) *eyFLP; FRT42 Dscam21 OR47b:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (C) *eyFLP; FRT42 OR47a:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (D) *eyFLP; FRT42 Dscam33 OR47a:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+*. (A-D) sind Projektionen mehrerer Schnittebenen. (B₁, D₁ und D₂) sind Vergrößerungen einer einzelnen Schnittebene aus den Projektionen (B und D). Die hier abgebildeten AL wurden alle mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

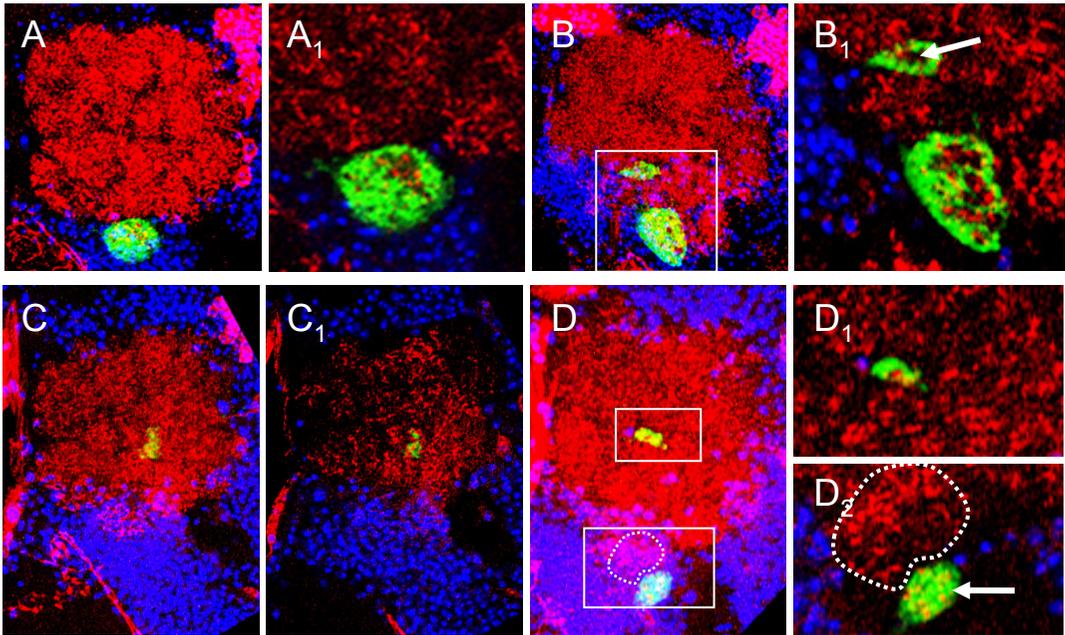


Abb. 58: Innervation ectopischer Glomeruli durch LN-Dendriten (2). Ähnlich dem wildtypischen Innervationsmuster (A) werden auch ectopische ORN21a Glomeruli von LN-Dendriten innerviert (B und Pfeil in B₁). Maxillaren Klassen, wie ORN46a zeigen in *Dscam* Mutanten neben einer partiellen Innervation der eigentlichen Zielregion außerdem häufig ectopische Glomeruli in der SOG Region. Die in die wildtypische Region (vergleiche Wildtyp in C) projizierenden Axone scheinen sich noch mit LNs zu verschalten. Die markierten ORN Axone umfassen hier *C753* positive Dendriten (D₁). Auch ectopische Glomeruli (D und Pfeil in D₂), die unterhalb des AL liegen, scheinen noch von PN-Dendriten innerviert zu werden (Markierungen in D und D₂ zeigen die Umrisse des V-Glomerulus). Genotypen: (A) *eyFLP; FRT42 OR21a:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (B) *eyFLP; FRT42 Dscam33/ OR21a:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (C) *eyFLP; FRT42 OR46a:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+* (D) *eyFLP; FRT42 Dscam21 OR46a:sytGFP/ FRT42 PCNA; C753-Gal4 UAS-CD2/+*. (A-D) sind Projektionen mehrerer konfokaler Schnittebenen. Alle anderen Bilder sind einzelne Schnitte aus diesen Projektionen. Die hier abgebildeten AL wurden alle mit α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

LN-Dendriten zu erkennen (Abb. 58, D und D₂). Lagen die ektopischen Glomeruli hingegen weiter vom AL entfernt, so konnten keine LN-Dendriten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die C753 positiven LNs scheinen also eine gewisse Reichweite zu haben, in der sie selbst ektopische Glomeruli, die am Rand des AL liegen, noch erkennen und innervieren.

3.3.5 Die Rolle der DSCAM-Diversität in der Verschaltung der ORN Axone

In den vorangegangenen Mosaik-Analysen wurde stets der Effekt eines kompletten *Dscam*-Verlusts in ORN-Axonon analysiert. Axone, die also keine DSCAM Moleküle exprimieren, konvergieren in ektopische Glomeruli. Es stellt sich die Frage, ob ORN-Axone für eine korrekte Projektion und Konvergenz ein bestimmtes Repertoire an unterschiedlichen DSCAM Molekülen brauchen? Mit Hilfe verschiedener UAS-*Dscam* Konstrukte wurde in den folgenden Analysen der Effekt einer einzelnen Isoform auf die Projektion verschiedener ORN-Klassen untersucht. Zudem ermöglichen verschiedene Deletionskonstrukte die Diversität in unterschiedlichen Maßen zu reduzieren.

3.3.5.1 Überexpression einzelner Dscam-Isoformen

Mit den im Folgenden hier analysierten Konstrukten wird jeweils eine DSCAM-Isoform exprimiert, deren variable IG-Domänen von den Exons 4.1, 6.30, 9.30 codiert werden sowie einer der beiden möglichen Transmembrandomänen (Zhan et al., 2004). Abbildung 59 zeigt hierzu ein Schema.

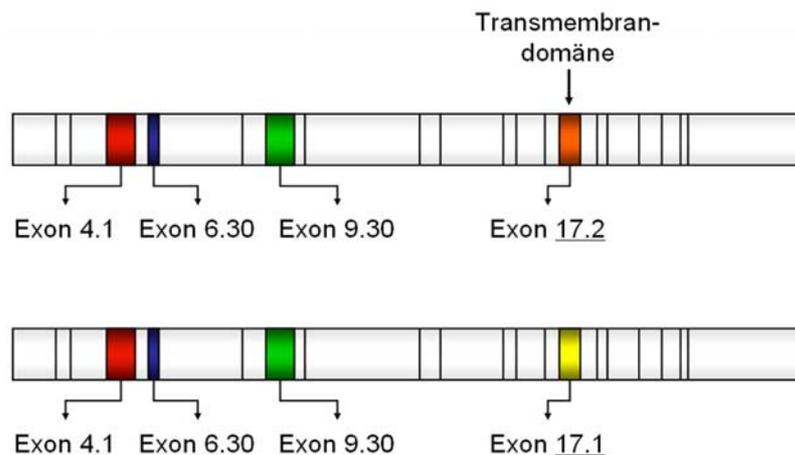


Abb. 59: Aufbau der durch die UAS-Konstrukte exprimierten Dscam Isoformen.

Zur Expression der Konstrukte werden unterschiedliche Gal4-Linien verwendet, die bereits während der axonalen Projektion in den AL exprimiert sind. Durch die Verwendung verschiedener OR-Promotorfusionen mit sytGFP ist es möglich, im adulten Gehirn den Effekt der Überexpression in einzelnen ORN-Klassen darzustellen.

Abbildungen 60 und 61 zeigen die Analyse der Überexpression von UAS-*Dscam* Konstrukten mit Hilfe der Linie *con*-Gal4. Diese Gal4-Linie markiert bereits während der frühen pupalen Entwicklung ein Drittel der ORN-Klassen. Diese konvergieren größtenteils in dorso-laterale Glomeruli. Innerhalb dieser *con*-positiven Domäne liegt auch der von ORN88a innervierte VA1d Glomerulus (Sternchen in A). Wird nun mit *con*-Gal4 als Treiberlinie das Konstrukt UAS-*Dscam*^{17.1-10} exprimiert, zeigt sich, daß ORN88a Axone nicht mehr gemeinsam in einen Glomerulus konvergieren. Der Konvergenzverlust überexprimierender ORN Axone ist auch in der restlichen *con*-Domäne zu beobachten. Die im Wildtyp so deutlichen Grenzen zwischen den einzelnen Glomeruli verschwinden. Die ORN-Axone scheinen über ihr Zielgebiet hinaus, weiter in die Kommissur zu wachsen. Insgesamt sieht die dorso-laterale *con*-Domäne zur Kommissur hin „verschmiert“ aus.

Da ORN-Klassen, die eine einzelne DSCAM-Isoform überexprimieren, nicht mehr in der Lage sind, deutliche Abgrenzungen voneinander in kompakte glomeruläre Strukturen auszubilden, stellt sich die Frage der Sortierung angrenzender, wildtypischer ORN-Klassen. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe der Linie E132-Gal4, die im adulten Wildtyp in den ORN88a Axonen exprimiert ist, das UAS-*Dscam*^{17.1-10} Konstrukt exprimiert. Wie bei der Überexpression in *con*-Gal4, nimmt der ORN88a Glomerulus hier eine breite und zur Kommissur hin gezogene Form an (Umrisslinie in D). Der benachbarte ORN47b-Glomerulus (grüner Kanal) scheint sich dieser morphologischen Veränderung anzupassen. Auch dieser Glomerulus verliert seine kompakte sichelförmige Struktur und wirkt statt dessen langgezogen. Die gemeinsame Grenze mit dem überexprimierenden ORN-Nachbar wirkt zwar unregelmäßig (siehe auch Schema in E), eine Co-Innervation in der Grenzregion ist jedoch nicht zu erkennen. Die interglomerulären Grenzen zu den übrigen, wildtypischen Glomeruli sind hingegen normal.

Inmitten der *con*-Domäne liegt der rundliche ORN83c Glomerulus (Abb. 61 A-B), der selbst jedoch nicht *con*-positiv ist. Diese Klasse eignet sich daher besonders gut, um den Effekt überexprimierender ORNs auf eine wildtypische ORN-Klasse zu untersuchen. Nach Überexpression des UAS-*Dscam*^{17.2-1} Konstrukts unter *con*-Gal4 wirkt der ORN83c Glomerulus eher langgezogen. Zudem ist die im Wildtyp so deutliche Abgrenzung zu den benachbarten Klassen nicht zu erkennen. Der ORN56a Glomerulus grenzt zum einen direkt an die *con*-positiven Glomeruli (Abb. 61 C-D), zum anderen liegt er innerhalb der von *en*-Gal4 markierten Domäne (Abb. 61 E-F). Dies ermöglicht es, die Gestalt des Glomerulus sowohl in einer „Nachbar-Situation“ als auch in einer Überexpressions-Situation zu vergleichen.

Auch die Expression des Konstrukts UAS-*Dscam*^{17.1-8} im *con*-Gal4 Muster führt zu einem Konvergenzverlust innerhalb der *con*-Domäne. Jedoch ist der Phänotyp deutlich schwächer als in den Überexpressions-Experimenten mit den Konstrukten UAS-*Dscam*^{17.2-1} und UAS-*Dscam*^{17.1-10}. Die *con*-Domäne wirkt hier wesentlich strukturierter und nicht so stark

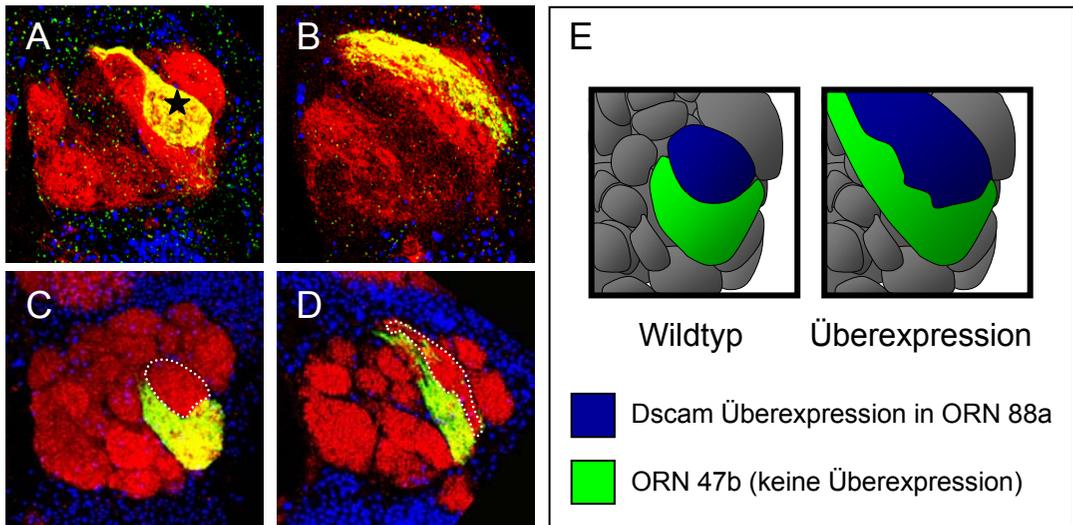


Abb. 60: Überexpression von Dscam (1). Die *con*-Gal4 Linie markiert etwa ein Drittel der Glomeruli im AL (Wildtyp in A). Inmitten der *con* positiven Domäne des AL liegt der von ORN88a Axonen innervierten VA1d-Glomerulus (Sternchen in A). Nach Expression des Konstrukts *UAS-Dscam*^{17.1-10} in *con*-Gal4, wird aus dem im Wildtyp runden und klar abgegrenzten VA1d-Glomerulus ein breiter zur Kommissur hin verlängerter Streifen. Auch sind die Grenzen zu den benachbarten, ebenfalls *con* positiven Glomeruli nicht mehr so deutlich (B). In Abbildung (D) wurde dieses *UAS*-Konstrukt nun nicht in einer breiten Domäne, sondern mit Hilfe von *E132*-Gal4 ausschließlich in ORN88a Axonen exprimiert (die Umrißlinie in C und die blau markierten Glomeruli in E zeigen den von ORN88a innervierten Glomerulus). Mittels einer Promotorfusion wird der benachbarte ORN47b Glomerulus markiert. Es ist deutlich zu erkennen daß der überexprimierende ORN88a Glomerulus ähnlich wie unter (B) zur Kommissur hin verlängert ist. Der GFP-markierte, benachbarte ORN47b liegt eng am ORN88a Glomerulus und ist ebenfalls deutlich zur Kommissur hin gestreckt. Die Grenzen zum überexprimierenden ORN88a Glomerulus sind jedoch deutlicher abgegrenzt als in Abbildung (B). Das Schema (E) stellt nochmals die unter (C-D) gezeigte Situation dar. Genotypen: (A) *Sp/CyO; con-Gal4 UAS-CD2/OR88a::CD8GFP* (B) *UAS-Dscam*^{17.1-10}/*CyO; con-Gal4 UAS-CD2/OR88a::CD8GFP* (C) *E132-Gal4 OR47b::sytGFP* (D) *E132-Gal4 OR47b::sytGFP; UAS-Dscam*^{17.1-10}/*CyO*. Antikörperfärbung: (A-B) α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau); (C-D) α -GFP (grün), α -Ncad (rot) und toto3 (blau).

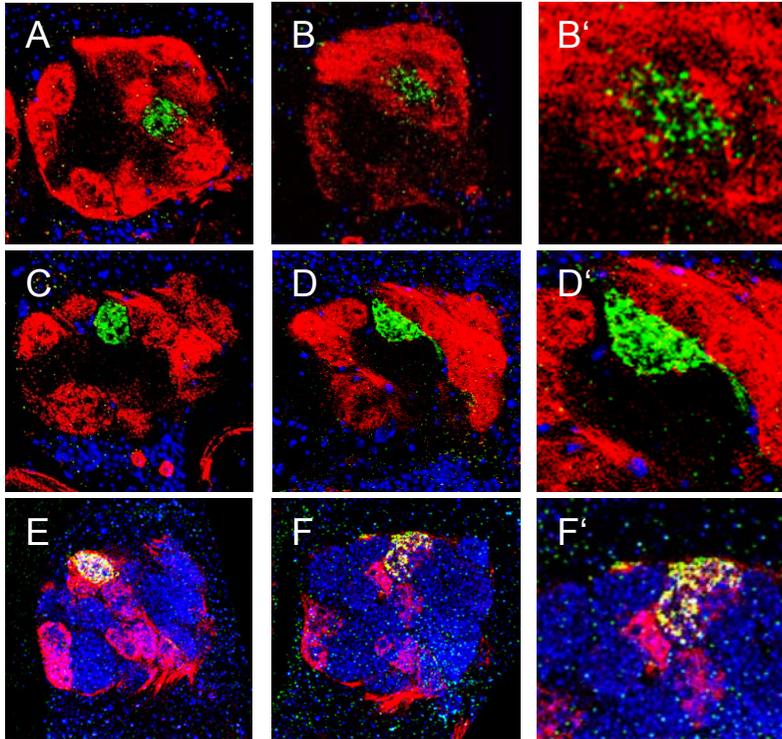


Abb. 61: Überexpression von Dscam (2). Die Klasse ORN83c liegt inmitten der *con*-Domäne, ist selbst jedoch nicht *con*-positiv (Wildtyp in A). Nach Überexpression des UAS-*Dscam*^{17.2-1} Konstrukts in *con*-Gal4 kommt es zum Verlust der klar abgegrenzten glomerulären Strukturen. Die Glomeruli wirken zur Kommissur hin „verschmiert“. Dies hat auch Einfluß auf den ORN83c Glomerulus, der von den überexprimierenden ORN-Klassen umgeben ist. Der Glomerulus wirkt aufgelöst und grenzt sich nicht mehr so deutlich von seinen Nachbarn ab (B und B'). Zudem erscheint er langezogen. Die ORN-Klasse 65a ist ebenfalls *con*-negativ. Der ORN65a Glomerulus ist der *con*-Domäne jedoch an einer Seite direkt benachbart (Wildtyp in C). Das Konstrukt UAS-*Dscam*^{17.1-8} (D) zeigt im Vergleich zu dem unter (B) verwendeten Konstrukt einen deutlich schwächeren Effekt. Dennoch ist auch hier die runde kompakte Form des ORN65a Glomerulus nach Überexpression elongiert. Die ORN65a Axone scheinen sich den überexprimierenden Nachbarn anzulagern. Wird hingegen das Konstrukt UAS-*Dscam*^{17.1-8} mittels *en*-Gal4 unter anderem auch in dieser Klasse direkt überexprimiert, so zeigt sich, daß der Glomerulus nun deutlich stärker betroffen ist. Er wirkt größer und weniger kompakt als im Wildtyp (Wildtyp in E). Die überexprimierenden ORN65a Axone projizieren zwar in ihr Zielgebiet, scheinen dieses aber weniger dicht zu innervieren (B). Genotypen: (A) *Sp/CyO*; *con-Gal4 UAS-CD2/OR83c::CD8GFP* (B) *UAS-Dscam*^{17.2-1}/*CyO*; *con-Gal4 UAS-CD2/OR83c::CD8GFP* (C) *OR65a::CD8GFP/CyO;con-Gal4 UAS-CD2/TM2* (D) *OR56a::CD8GFP/CyO; con-Gal4 UAS-CD2/ UAS-Dscam*^{17.1-8} (E) *OR56a::CD8GFP/en-Gal4 UAS-RFP; TM2/+* (F) *OR65a::CD8GFP/en-Gal4 UAS-RFP; UAS-Dscam*^{17.1-8} /+ Antikörperfärbung: (A-D) α -GFP (grün), α -CD2 (rot) und toto3 (blau); (E-F) α -GFP (grün), natives RFP-Signal (rot) und toto3 (blau).

„verschmiert“. Dennoch zeigt sich auch hier ein erkennbarer Effekt auf den ORN56a Glomerulus. Dieser ist leicht elongiert und bleibt in engem Kontakt zu den überexprimierenden, *con*-positiven Glomeruli. Zur anderen Seite hin, an der der ORN56a Glomerulus sich von wildtypischen ORNs abgrenzt, zeigt er eine, dem Wildtyp ähnliche, runde Form (D). Nach Überexpression von UAS-*Dscam*^{17.1-8} im *en*-Gal4 Muster ist innerhalb der *en*-Domäne fast keine glomeruläre Strukturierung mehr sichtbar. Insgesamt scheinen weniger ORN-Axone in die *en*-Domäne zu projizieren. Die Innervation des ORN56a Glomerulus wirkt reduziert und scheint eher diffus, da die Axone sich über einen breiten Bereich verteilen und nicht in eine kompaktere Struktur konvergieren.

Alle der hier analysierten UAS-*Dscam* Konstrukte zeigen in der Überexpression einen stark repulsiven Effekt. Die Stärke der verwendeten Konstrukte ist jedoch unterschiedlich. Die Konstrukte UAS-*Dscam*^{17.1-10} und UAS-*Dscam*^{17.2-1} zeigen einen besonders starken Effekt. Die Überexpression dieser beiden Konstrukte in *en*-Gal4 ist letal. Das Konstrukt UAS-*Dscam*^{17.1-8} zeigt zwar einen ähnlichen Phänotyp, dieser ist in seiner Expressivität jedoch wesentlich schwächer.

3.3.5.2 Entwicklungsanalyse des Überexpressionsphänotyps

Im adulten Gehirn scheinen ORN-Axone, die eine DSCAM-Isoform überexprimieren, nicht mehr richtig in die einzelnen Glomeruli zu konvergieren. Um zu klären, ob die Repulsion erst bei der Konvergenz der Axone in einen Glomerulus oder bereits vorher, während der Projektion der Axone über den AL wirkt, wurde die Entwicklung des Überexpressions-Phänotyps im pupalen AL analysiert.

E132-Gal4 ist bereits sehr früh im sich entwickelnden ORN88a Glomerulus exprimiert. In der frühen pupalen Entwicklung werden zwar zwei weitere posteriore Glomeruli von *E132*-Gal4 markiert, die anteriore Position und die charakteristische große, runde Form des ORN88a Glomerulus ermöglichen jedoch eine leichte Identifizierung. Die Projektion der ersten ORN88a Axone anterior über den pupalen AL lassen sich in 3D-Rekonstruktionen, die mit Hilfe des Programms Volocity-3D[®] erstellt wurden, leicht darstellen. Da die Entstehung eines einzelnen, ansprechbaren Glomerulus bisher nicht beschrieben wurde, war zunächst eine genaue Analyse der frühen wildtypischen Entwicklung notwendig. Abb. 62 zeigt die, im folgenden beschriebenen, pupale Entwicklung des Wildtyps im Vergleich zur Entwicklung des Überexpressions-Phänotyps.

3.3.5.2.1 Bildung des ORN88a Glomerulus in der pupalen Entwicklung

Im wildtypischen AL sind die ersten einwachsenden Axone nach etwa 18h APF sichtbar (Pfeilspitze in A). Insgesamt hat der pupale AL zunächst einen Durchmesser von ca. 25µm. Erste einzelne *E132* positive Axone projizieren durch den antennalen Nerv (Pfeil in A). Nur

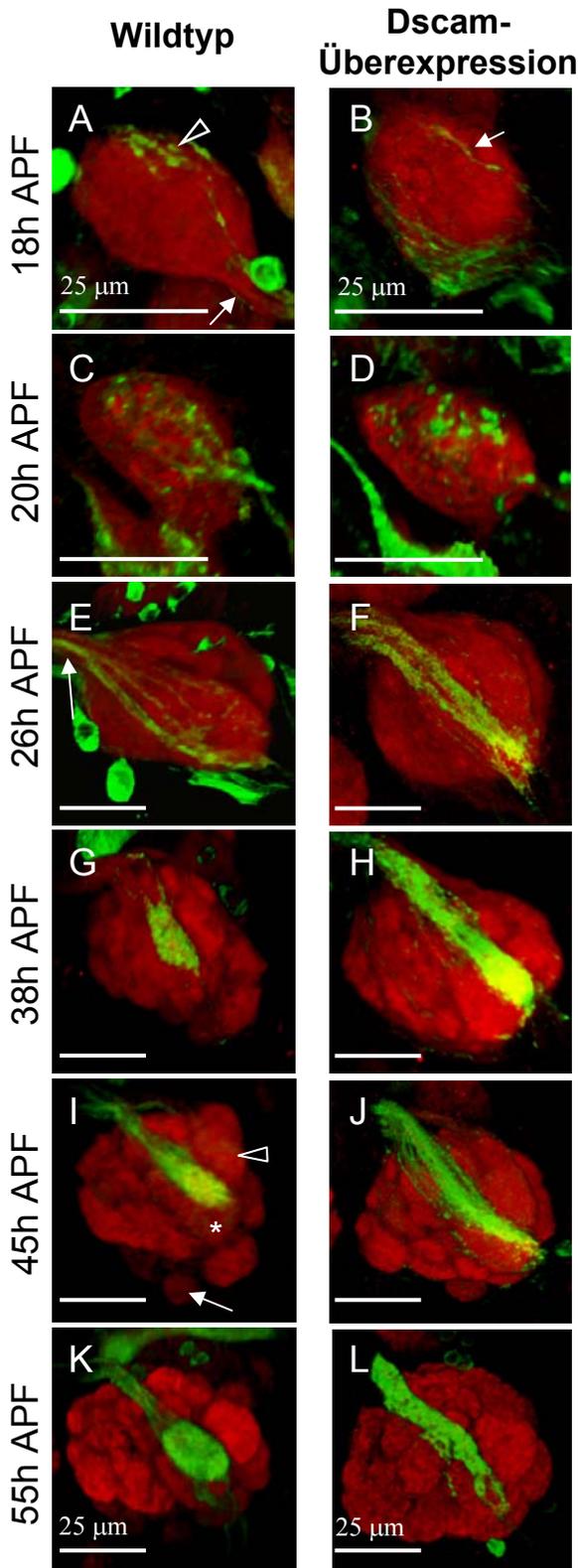


Abb. 62: Pupale Entwicklung des *Dscam* Überexpressionsphänotyps. Bereits bei ca. 18h APF sind die ersten ORN88a Axone zu sehen, die aus dem antennalen Nerv (Pfeil in A) anterior über den pupalen AL projizieren (Pfeilspitze in A und Pfeil in B). Bei 26h APF ist im Wildtyp die Projektion der eng faszikulierten Axone innerhalb der Kommissur deutlich zu erkennen (Pfeil in E). Die Projektion der überexprimierenden ORNs über den AL und in die Kommissur wirkt wesentlich breiter (F). Während sich nach 38h APF im Wildtyp kompakte Glomeruli bilden (G), innervieren überexprimierende Axone weiterhin eine breite Domäne. Nach 45h sind erste Landmark-Glomeruli identifizierbar (Pfeilspitze und Sternchen in I). Auch 55h APF innervieren die überexprimierenden Axone noch einen wesentlich breiteren Bereich (L). Genotypen: (Wildtyp) *E132-Gal4 UAS-sytGFP; UAS-mCD8GFP/ UAS-mCD8GFP* (Überexpression) *E132-Gal4 UAS-sytGFP; UAS-Dscam^{17:1}/ UAS-mCD8GFP*. Anterior ist oben, ventral ist unten. Der in den 3D-Rekonstruktionen angegebenen Maßstab zeigt jeweils 25 μ m an.

wenige Stunden später kommen zu den wenigen Pionieren der ORN88a Axone weitere hinzu, die nun einen breiten dorso-lateralen Bereich im anterioren AL innervieren (20 APF). Nach etwa 26h APF sieht man bereits markierte Axone, die in die Kommissur projizieren (Pfeil in E). Der pupale AL besteht nun aus insgesamt drei größeren Neuropil Strängen, die jeweils an Kommissur und Eintrittspunkt des antennalen Nervs zusammenhängen (vergleiche auch schematische Darstellung in Abb. 63). Insgesamt scheinen die markierten ORN Axone über einen breiteren Bereich des anterior liegenden Neuropil Strangs zu projizieren, konzentrieren sich aber hauptsächlich auf eine schmale Projektionsbahn. Bei etwa 38h APF werden erste glomeruläre Strukturen sichtbar. Ihre Konturen sind jedoch eher diffus und die ORN-Glomeruli zeigen noch nicht ihre charakteristische Morphologie. Die markierten ORN88a Axone konvergieren bereits in einen distinkten, länglichen Bereich. Bei etwa 45h APF lassen sich erste ‚Landmark-Glomeruli‘ erkennen, wie z.B. ORN47b (Sternchen in I), ORN67d (Pfeilspitze) und ORN21a (Pfeil). Die Abgrenzung des ORN88a Glomerulus zu den umgebenden Glomeruli ist nun viel deutlicher. Im adulten AL ist der ORN88a Glomerulus dann kompakt und hat die charakteristische runde Form. Insgesamt hat der AL im Lauf der pupalen Entwicklung seine Größe ungefähr verdoppelt. Die morphologischen Veränderungen der pupalen AL-Struktur hin zur adulten sind in der Schemazeichnung in Abb. 63 nochmals zusammengefaßt.

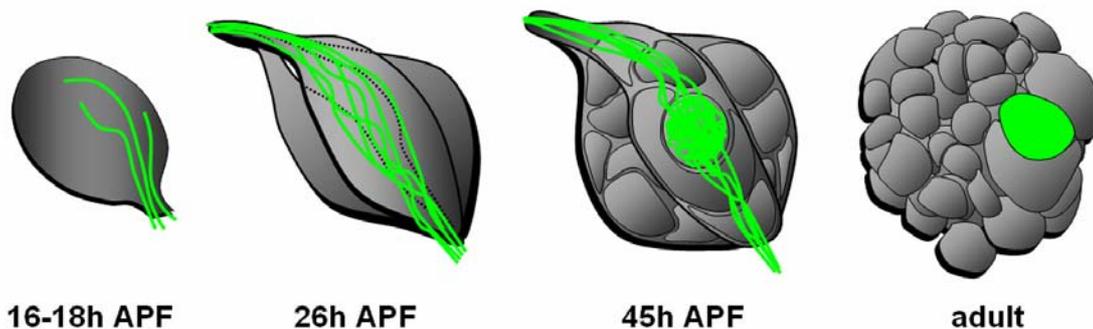


Abb. 63: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen des pupalen AL im Wildtyp.

3.3.5.2.2 Der DSCAM Überexpressions-Phänotyp in der pupalen Entwicklung

Wird unter *E132-Gal4* nun das Konstrukt *UAS-Dscam*^{17.2-1} exprimiert, so läßt sich bis etwa 20h APF keine Veränderung zur wildtypischen Entwicklung feststellen (Abb. 62 B und D). Auch hier sind nach 18h APF die ersten Pionieraxone, nach 20h APF weitere ORN88a Axone zu erkennen. Nach ca. 26h APF projizieren auch hier die Axone über den anterioren Neuropil-Strang. Im Vergleich zum Wildtyp verteilen sich die ORN88a Axone jedoch über eine größere Fläche und scheinen weniger stark faszikuliert in die Kommissur zu wachsen (F). Dieser breite von ORN88a Axonen besetzte Bereich ist auch bei 38h APF deutlich zu

erkennen (H). Die umliegenden ORNs konvergieren in ihre Glomeruli, die ORN88a Axone bleiben hingegen an der Oberfläche des AL und bilden eine breite zur Kommissur hin ziehende Struktur aus (J). Bei 45h APF wird deutlich, daß die überexprimierenden Axone einen sehr viel breiteren Bereich einnehmen (L). Es ist praktisch keine kompakte Glomerulus-Struktur zu erkennen. Im adulten AL grenzt sich zwar auch der überexprimierende Bereich noch etwas deutlicher von den wildtypischen Nachbar-ORNs ab, eine kompakte Glomerulus-Form wird jedoch nicht mehr gebildet. Die starke Repulsion durch Überexpression einer DSCAM-Isoform verhindert also bereits bei etwa 26h APF eine engere Faszikulation der über den AL projizierenden Axone. Daher kann keine korrekte Konvergenz in einen gemeinsamen Glomerulus stattfinden. Die Expression des Konstrukts UAS-*Dscam*^{17.2-2} mit *E132-Gal4* zeigte vergleichbare Phänotypen (Daten nicht gezeigt).

3.3.5.3 Überexpression von DscAM in einzelnen ORN Axonen

Durch *hsFLP* induzierte mitotische Rekombination wurden mit Hilfe des MARCM Systems vereinzelte *E132-Gal4* positive ORN Axone im adulten AL markiert. Im Wildtyp ist deutlich zu erkennen, daß sich bereits wenige, markierte Axone innerhalb des Glomerulus stark verzweigen und sich diese Verzweigungen durch den gesamten Glomerulus ziehen (Abb. 64 A). Im Vergleich dazu scheinen einzelne Axone, in denen das Konstrukt UAS-*Dscam*^{17.2-1} überexprimiert wird, nur an der Oberfläche des Glomerulus entlang zu projizieren. Deutliche Verzweigungen der Axone innerhalb des Glomerulus sind hier nicht zu erkennen (Abb. 64 B-C). Interessanterweise kann selbst ein einzelnes überexprimierendes Axon nicht in sein Zielgebiet konvergieren und sich zusammen mit den wildtypischen Axonen seiner ORN-Klasse in den Glomerulus integrieren (D). Der *Dscam* Überexpressions-Phänotyp scheint daher zellautonom zu sein.

3.3.5.4 Differentielle Lokalisation verschiedener DscAM-Isoformen innerhalb der ORN Axone

Die Konstrukte UAS-*Dscam*^{17.1}*GFP* und UAS-*Dscam*^{17.2}*GFP* (Wang et al., 2004) ermöglichen es, durch ihre direkte GFP-Markierung die Lokalisation der Isoformen innerhalb der überexprimierenden ORN-Axone zu verfolgen. Abbildung 65 zeigt die Expression beider Konstrukte in Expressionsmuster von *Sg18.1-Gal4*. Die Expression des Konstrukts UAS-*Dscam*^{17.2}*GFP* in *Sg18.1-Gal4* zeigt deutlich die Lokalisation des GFP-Signals innerhalb der Axone (siehe Projektion in Abb.65 B und Schnitt durch die anteriore Ebene in B₁). Der Überexpressionsphänotyp gleicht hier dem zuvor gezeigten stark repulsiven Effekt nach Expression von UAS-*Dscam*^{17.2} (siehe oben). Die innere Strukturierung des AL weist starke Defekte auf. Es sind deutliche Löcher im Inneren des AL zu erkennen (Pfeilspitze in B₂), einzelne glomeruläre Strukturen sind nicht zu identifizieren. Die hier über die Isoform

markierten Axone scheinen den AL nicht zu innervieren, sondern oberflächlich weiter zu projizieren.

Nach Expression des Konstrukts *UAS-Dscam^{17.1}GFP* ist keine offensichtliche Veränderung der glomerulären Organisation zu erkennen. Einzelne Glomeruli innerhalb des AL können deutlich unterschieden werden (roter Kanal in den Schnitten C₁ und C₂). Auffällig ist, daß diese DSCAM-Isoform hauptsächlich in feinen Verzweigungen innerhalb der Glomeruli lokalisiert ist. Im Gegensatz zum Konstrukt *UAS-Dscam^{17.2}GFP* sind hier der einwachsende Nerv und die Kommissur nicht markiert, so daß hier möglicherweise *Sg18.1*-positive LN- und PN-Dendriten markiert werden. Die Expression der Transmembrandomäne 1 führt somit zur Lokalisation des DSCAM Proteins in dendritische Strukturen. Dies wurde ebenfalls von Wang et al. für die Expression in Neuronen der Pilzkörper beschrieben.

Tabelle 13 faßt die Ergebnisse der Überexpression-Analysen der unterschiedlichen Konstrukte zusammen.

Tab. 13: Vergleich der Expressivität des Überexpressionsphänotyps der verschiedenen UAS-Dscam Konstrukte mit exprimierten Transmembrandomäne.

	verwendetes Konstrukt	Insertionsort	Konvergenzdefekt
A	<i>UAS-Dscam^{17.1-8}</i>	2. Chromosom	schwach
B	<i>UAS-Dscam^{17.2-1}</i>	3. Chromosom	stark
C	<i>UAS-Dscam^{17.1-10}</i>	3. Chromosom	stark (etwas schwächer als B)
D	<i>UAS-Dscam^{17.2}GFP</i>	3. Chromosom	stark
E	<i>UAS-Dscam^{17.1}GFP</i>	3. Chromosom	kein Effekt

Die hier untersuchten Überexpressionsexperimente zeigen alle, daß die Expression einer einzelnen Isoform in Axonen zu einem dominanten, repulsiven Effekt führt. Die Überexpression in einzelnen Axonen zeigt zudem, daß dieser Effekt zellautonom ist. Lediglich die Expression des Konstruktes *UAS-Dscam^{17.1}GFP*, in denen die markierten DSCAM Moleküle offenbar nicht ins Axon transportiert werden, zeigte keinen Effekt.

3.3.5.5 Einfluß einer reduzierten Dscam-Diversität auf die Projektion der ORN Axone

Durch Exzision eines in Exon 4 lokalisierten P-Elements wurden Deletionen generiert, in denen ein Teil der 12 möglichen alternativen Exons für die N-terminale Hälfte der Ig-Domäne 2 fehlen (Wang et al., 2004). Da diese Deletionen zudem eine FRT-Sequenz auf dem Chromosom tragen, ist es möglich durch *eyFLP*-Klone ORNs zu generieren, die homozygot

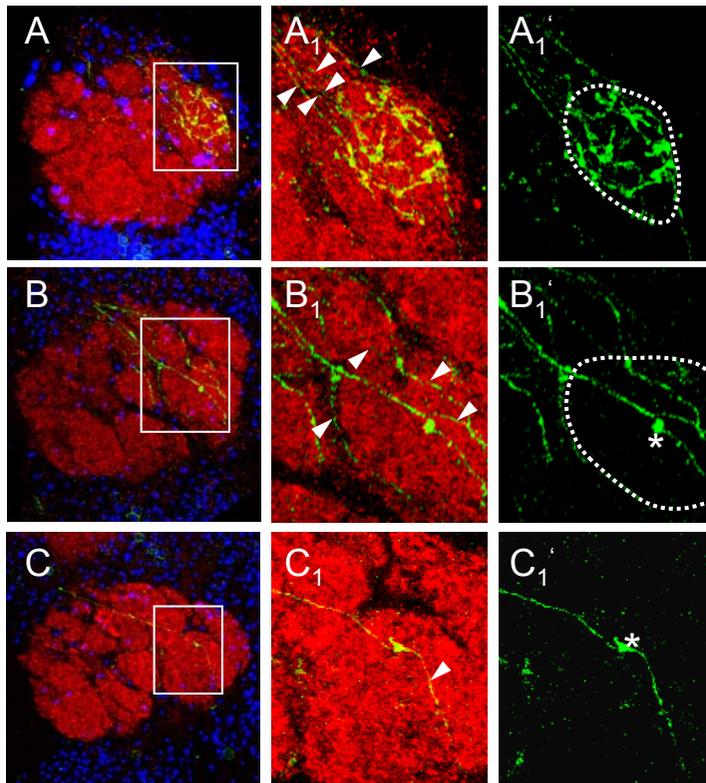


Abb. 64: Überexpression von Dscam in einzelnen ORN Axonen. In (A) sind etwa fünf wildtypische ORN88a Axone markiert (Pfeilspitzen in A₁). Es ist deutlich zu erkennen, daß diese sich innerhalb des Glomerulus (gestrichelte Markierung in A₁') stark verzweigen. Abbildung (B) zeigt vier bis fünf markierte Axone (Pfeilspitzen in B₁) in denen das Konstrukt *UAS-Dscam*^{17.2-1} exprimiert wird. Hier sind im Vergleich zum Wildtyp keine axonalen Verzweigungen innerhalb des Glomerulus zu erkennen (gestrichelte Markierung in B₁'). Einige Axonen weisen auffällige Verdickungen auf (Sternchen in B₁' und C₁'). Auch ein einzelnes Axon, in dem *Dscam* überexprimiert wird (Pfeilspitze in C₁), bildet keine deutlichen Verzweigungen aus sondern projiziert direkt über sein Zielgebiet hinweg weiter in die Kommissur. Genotypen: (A) *hsFLP UAS-CD2/ E132-Gal4 UAS-CD2; FRT42/ FRT42 Gal80* (B-D) *hsFLP UAS-CD2/ E132-Gal4 UAS-CD2; FRT42 UAS-Dscam*^{17.2-1}/*FRT42 Gal80*. (A₁-C₁) sind Ausschnittsvergrößerungen aus (A-C). (A₁'-C₁') zeigen den grünen Kanal aus (A₁-C₁). Antikörperfärbung: Die hier gezeigten AL wurden zunächst mit α -CD2 (grün) gefärbt, nochmals fixiert und anschließend mit α -Ncad gefärbt.

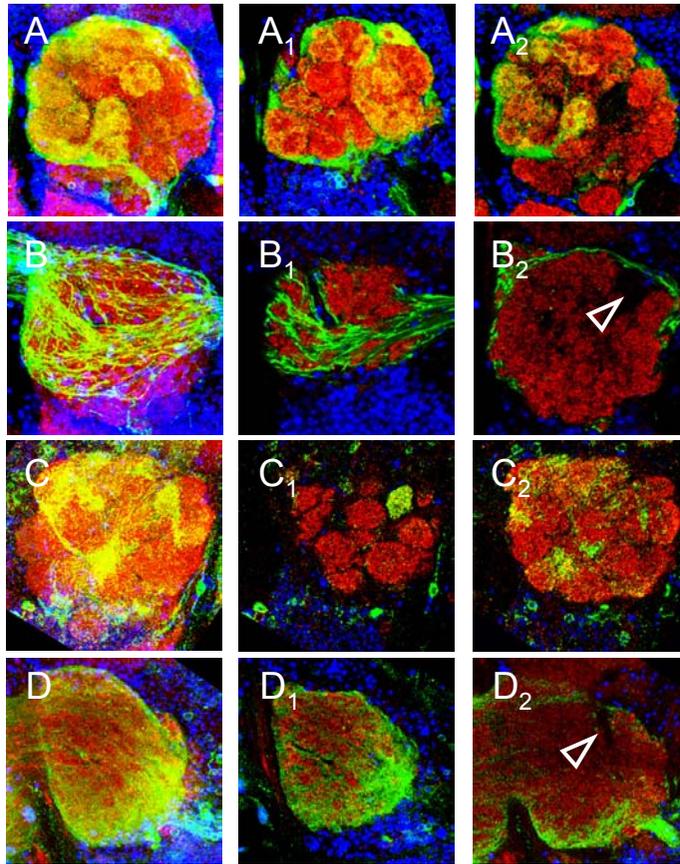


Abb. 65: Expression unterschiedlicher Dscam Isoformen in *Sg18.1-Gal4*. Die Linie *Sg18.1-Gal4* ist in einem Teil der verschiedenen ORN-Klassen exprimiert. Durch die Expression von *UAS-CD8GFP* mit *Sg18.1-Gal4* können 2/3 der Glomeruli im Wildtyp markiert werden (A). In (B) ist die Überexpression des Konstrukts *UAS-Dscam^{17.2}GFP* gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die GFP-markierte Isoform in den ORN Axonen lokalisiert ist (grüner Kanal in B) und, daß diese nicht in den AL hineinprojizieren, sondern an der Oberfläche des AL bleiben (Vergleiche anteriore Schnittenebene in B₁ und mediale Schnittenebene in B₂). Die Überexpression des Konstrukts *UAS-Dscam^{17.1}GFP* zeigt hingegen eine Lokalisation des Proteins in fein verzweigten Strukturen innerhalb des AL (C-C₂). Hier projizieren die Axone in den AL und verzweigen sich innerhalb einzelner Glomeruli. Die Expression von *UAS-Dscam^{17.1}* zusammen mit *UAS-mCD8* (D) zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie das in (A) dargestellte *UAS-Dscam^{17.1}GFP* Konstrukt. Der AL wirkt in beiden Fällen unstrukturiert und löchrig (Pfeilspitzen in B₂ und D₂). (A, B, C) sind Projektion mehrerer Schnittebenen. (A₁, B₁, C₁) zeigen Schnitte durch den anterioren AL, (A₂, B₂, C₂) durch den medialen AL. Genotypen: (A) *Sg18.1-Gal4 UAS-CD8GFP* (B) *Sg18.1-Gal4/ UAS-Dscam^{17.2}GFP* (C) *Sg18.1-Gal4/ UAS-Dscam^{17.1}GFP* (D) *Sg18.1-Gal4 UAS-CD8GFP/ UAS-Dscam^{17.1}*. Antikörper-färbungen: α -GFP (grün), α -Ncad (rot) und toto3 (blau).

für diese Deletionen sind. Eine Übersicht über die verwendeten Deletions-Konstrukte ist in Abb. 66 dargestellt.

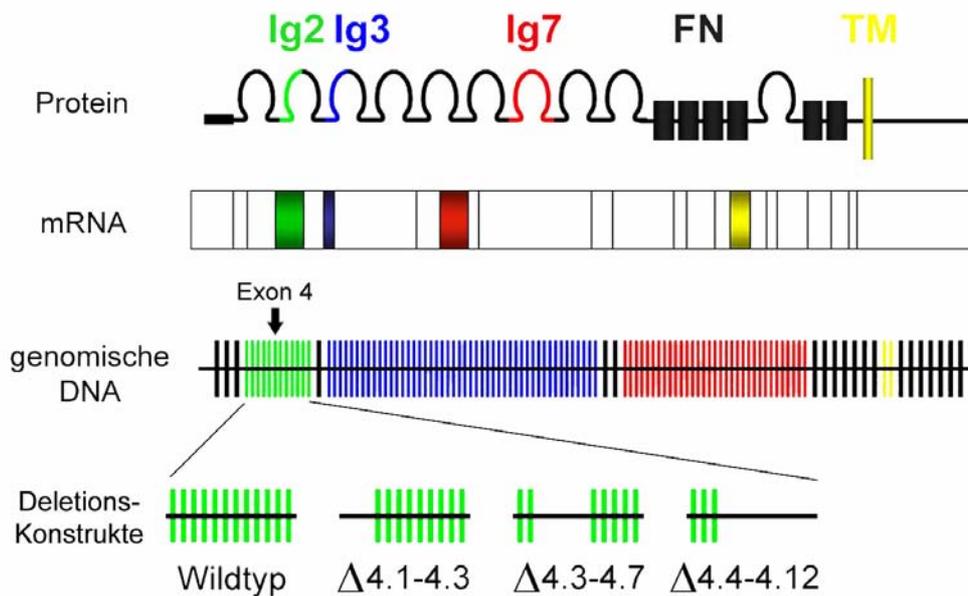


Abb. 66: Reduktion der Dscam-Diversität durch Deletionen alternativer Exons.

Die Abbildungen 67 und 68 zeigen die Analyse verschiedener ORN-Klassen in Mosaik-Gehirnen mit den verschiedenen Deletions-Konstrukten. Das Projektionsmuster des MM1-Markers zeigt für alle drei Konstrukte ektopische, glomeruläre Strukturen im dorsalen AL (Pfeile in Abb. 67 B-D). Die bisherige Analyse der einzelnen ORN-Klassen ergab, daß diese nicht durch Fehlprojektion von Axonen der Klassen 88a, 47b oder 21a entstehen. Ihr Projektionsmuster ist wildtypisch. Möglicherweise werden diese ektopischen Glomeruli von ORN47a Axonen gebildet. Der Phänotyp wurde bisher nicht in selektiv markierten ORN47a Axonen analysiert.

Einen mutanten Phänotyp zeigen jedoch die maxillaren ORN-Axone (Abb. 68). In den hier untersuchten Klassen ORN46a und ORN71a kommt es zur Bildung von nicht klar abgegrenzten Glomeruli. Die ORN-Axone projizieren zwar in die Zielregion, konvergieren jedoch nicht in einem klar strukturierten Glomerulus. In der Projektion einzelner Schnittebenen des AL wirkt der Glomerulus fragmentiert (C, E und G). Die Doppelmarkierung der benachbarten ORN-Klassen zeigt, daß die Axone beider Klassen ineinander greifen und die Glomeruli „ineinander verschachtelt“ sind (F₁ und H₁).

Im Vergleich der verschiedenen Konstrukte untereinander wird deutlich, daß die Deletion $\Delta P^{4.1-4.3}$, die 3 der 12 Alternativen des Exons 4 deletiert, den schwächsten Phänotyp zeigt. Zum einen ist die Struktur der Glomeruli etwas kompakter, zum anderen liegt die Penetranz des Phänotyps bei etwa 13%.

Das Konstrukt *Dscam* $\Delta P^{4.3-4.7}$, in dem 5 alternative Exons deletiert sind, zeigt hingegen eine Penetranz von 33%. Die Ausprägung des Phänotyps ist deutlich stärker und gleicht der des Konstrukts *Dscam* $\Delta P^{4.4-4.12}$. Das größte Deletionskonstrukt, *Dscam* $\Delta P^{4.4-4.12}$, zeigt mit 76,% zugleich auch die höchste phänotypische Penetranz. Da die Phänotypen in allen drei analysierten Deletions-Konstrukten recht ähnlich sind, scheint der Verlust bestimmter Isoformen für diese Klassen keine besondere Rolle zu spielen. Die Korrelation zwischen verfügbarer Diversität und phänotypischer Penetranz ist hingegen deutlich.

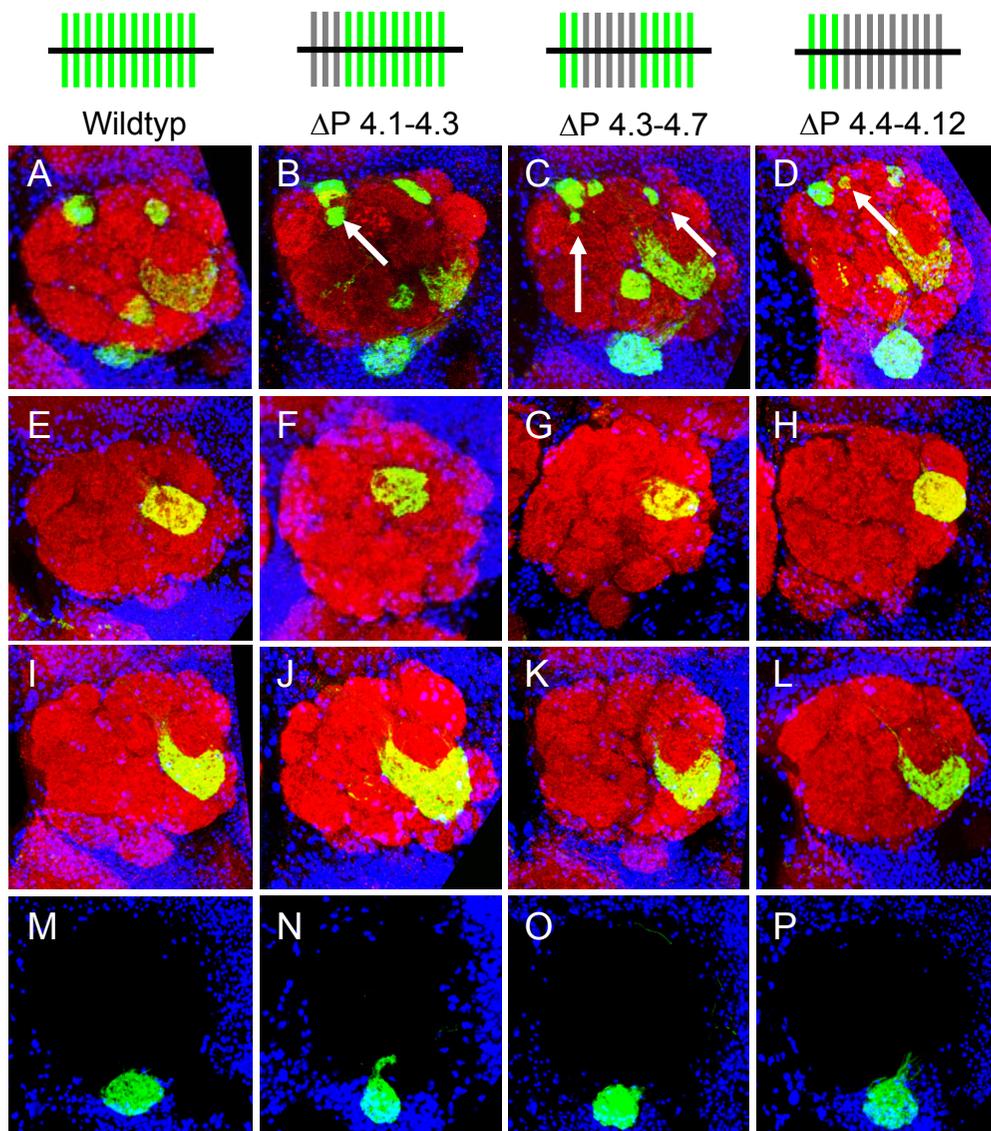


Abb. 67: Reduktion der Dscam-Diversität in Exon 4 (1). Die Reduktion der Dscam-Diversität in ORNs zeigt im Vergleich zum wildtypischen Expressionsmuster des MM1-Markers (A) für alle untersuchten Konstrukte ektopische glomeruläre Strukturen im dorsalen AL (Pfeile in B-D). Weder die Analyse der einzelnen ORN-Klasse 88a (E-H), 47b (I-L) oder 21a (M-P) zeigen ein vom Wildtyp abweichendes Projektionsmuster (Wildtypen in E, I und M). Genotypen: (A, E, I, M) *eyFLP, FRTG13/FRTG13; OR-Gal4 UAS-sytGFP/+* (B, F, J, N) *eyFLP, FRTG13 Dscam Δ P^{4.1-4.3}/FRTG13; OR-Gal4 UAS-sytGFP/+* (C, G, K, O) *eyFLP; FRTG13 Dscam Δ P^{4.3-4.7}/FRTG13; OR-Gal4 UAS-sytGFP/+* (D, H, L, P) *eyFLP; FRTG13 Dscam Δ P^{4.4-4.12}/FRTG13; OR-Gal4 UAS-sytGFP/+*. Verwendete OR-Gal4 Marker: (A-D) OR21a-Gal4 OR23a-Gal4 OR46a-Gal4 OR47a-Gal4 OR47b-Gal4 (E-H) OR88a-Gal4 (I-L) OR47b-Gal4 (M-P) OR21a-Gal4 UAS-CD2. Die hier abgebildeten AL wurden mit α -GFP bzw. α -CD2 (grün), α -Ncad (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

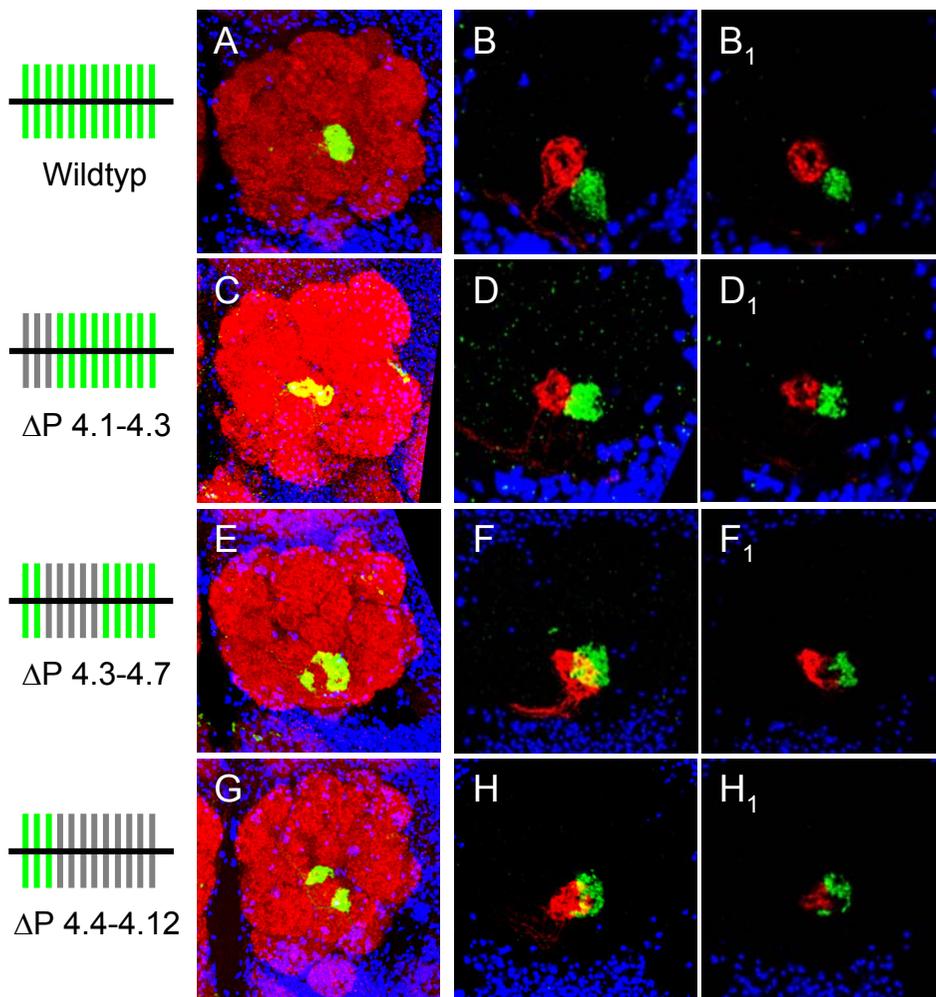


Abb. 68: Reduktion der Dscam Diversität in Exon 4 (2). Im Vergleich zum Wildtyp (A) führt die Reduktion der Dscam-Diversität mittels der Konstrukte *Dscam* Δ P^{4.1-4.3}(C), *Dscam* Δ P^{4.3-4.7} (E) und *Dscam* Δ P^{4.4-4.12} (G) in ORN46a Axonen zum Verlust der Konvergenz in einen kompakten Glomerulus. Die Glomeruli wirken fragmentiert. Der mit dem Konstrukt *Dscam* Δ P^{4.1-4.3}(C) erzielte Effekt ist jedoch schwächer verglichen mit den beiden anderen Konstrukten. Eine gleichzeitige Markierung der benachbarten Klasse ORN71a zeigt, daß die Axone einer ORN-Klasse eine unregelmäßige Abgrenzung zu ihrem Nachbar-Glomerulus ausbilden. Axone beider Klassen greifen ineinander und wirken verschachtelt, anstatt klar abgegrenzte glomeruläre Strukturen auszubilden (F₁ und H₁). Genotypen: (A-B) *eyFLP*, *FRTG13*/*FRTG13*; *OR-Marker*/+ (C-D) *eyFLP*, *FRTG13* *Dscam* Δ P^{4.1-4.3}/*FRTG13*; *OR-Marker*/+ (E-F) *eyFLP*; *FRTG13* *Dscam* Δ P^{4.3-4.7}/*FRTG13*; *OR-Marker*/+ (G-H) *eyFLP*; *FRTG13* *Dscam* Δ P^{4.4-4.12}/*FRTG13*; *OR-Marker*/+. Verwendete OR-Marker: (A, C, E, G) *OR46a-Gal4 UAS-sytGFP* (B, D, F, H) *OR46a::sytGFP* *OR71a-Gal4 UAS-CD2*. (A-H) sind Projektionen mehrerer konfokaler Ebenen, (B₁-H₁) sind einzelne Schnittebenen aus den Projektionen (B-H). Alle abgebildeten AL wurden mit α -GFP (grün), α -Ncad bzw. α -CD2 (rot) und toto3 (blau) gefärbt.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt die Analyse von Genfunktionen, die für die synaptische Spezifität von ORN-Axonen notwendig sind. Der erste Teil der Arbeit umfaßt einen systematische, phänotypische Mutantanalyse, in der über 100 Mutationen isoliert wurden, die zu einer Veränderung des synaptischen Innervationsmusters von ORN-Axonen führen.

Die bisherige Kartierung der hier isolierten Mutationen führte zur Identifizierung von Genfunktionen, deren Funktion bisher im Zusammenhang mit Prozessen wie z.B. Termination der Translation, Golgi-Organisation, der Atmungskette oder auch Phospholipidsynthese involviert sind.

Der zweite Teil dieser Arbeit stellt die vergleichende funktionelle Charakterisierung von zwei Transmembranmolekülen dar, SEMAPHORIN1A und DSCAM, die an unterschiedlichen Schritten in der synaptischen Verschaltung der ORN Axone beteiligt sind.

4.1 Die phänotypische Mutantanalyse

Eine wichtige Voraussetzung für die phänotypische Mutantanalyse war der stereotype Aufbau des olfaktorischen Systems in *Drosophila*. Die Anordnung der verschiedenen Glomeruli innerhalb des AL im Wildtyp ist in allen Gehirnen stets in der gleichen Ausprägung wiederzufinden und läßt sich immer eindeutig den Synapsen einer bestimmten ORN-Klasse mit ihren korrespondierenden PNs zuordnen (Couto et al., 2005; Laissue et al., 1999). Durch die Markierung einer Auswahl von ORN-Klassen wurde in dieser Arbeit Mutationen isoliert, die zu einem Defekt im Verschaltungsmuster des olfaktorischen Systems führen.

4.1.1 EMS-Mutagenese

In *Drosophila* wurden bereits einige Mutantanalysen zur Untersuchung von Genfunktionen für die axonale Wegfindung durchgeführt. Als Modellsystem dienten hier z.B. die myotopische Verschaltung der Motoneuronen (Meyer and Aberle, 2006; Vactor et al., 1993), die Entwicklung des embryonalen ZNS (Seeger et al., 1993) oder die Verschaltung der Photorezeptorneurone (Choe et al., 2006; Clandinin et al., 2001; Newsome et al., 2000).

In dieser Arbeit konnte unter den insgesamt, auf einen Phänotyp hin analysierten, letalen Mutationen in 6% der Fälle ein vom Wildtyp abweichendes Projektionsmuster gefunden werden. Da hier vor allem solche Phänotypen interessant waren, die eine Fehlverschaltung der ORNs zeigen, wurde für Mutationen aus den Gruppen ‚*Fehlprojektion einzelner ORN-Axone*‘, ‚*Defekte in der Glomerulus-Form und Struktur*‘ und ‚*ektopische glomeruläre Strukturen*‘ versucht, die letale Mutation zu kartieren. Die bisherigen

Komplementationsanalysen mit verschiedenen Defizienzen ergaben, daß auf dem linken Arm eines mutagenisierten Chromosoms 1-2 Letalmutationen liegen, die sich mit den hier verwendeten Defizienzen aufdecken lassen. Da jedoch nicht alle in der phänotypischen Analyse identifizierten Mutationen kartiert wurden und keine Komplementationsanalysen mit Defizienzen des rechten Chromosomenarms durchgeführt wurden, läßt sich über die durchschnittliche Anzahl an Letalmutationen pro Chromosom keine eindeutige Aussage treffen.

Einen Hinweis darauf, ob die hier durchgeführte Mutagenese gesättigt ist, d.h. ob Mutationen in allen Genen, die den Prozeß der synaptischen Spezifität regulieren induziert wurden, geben Komplementationsanalysen mit bereits beschriebenen Mutationen. Auf dem hier untersuchten Chromosom 2L sind unter anderem *Ncad* (36E1) und *dock* (21D3) lokalisiert. Neben der Rolle von *NCad* in der Protoglomerulus-Bildung (Hummel and Zipursky, 2004) wurde auch für den Verlust der *dock* Funktion ein starker Defekt in der Projektion der ORNs beschrieben (Ang et al., 2003). Die in der Mutantenanalyse identifizierten Mutationen, die einen deutlichen Projektionsdefekt der ORNs zeigten, wurden auf ihr Komplementationsverhalten gegenüber *NCad* und *dock* getestet. Fünf Mutanten konnten *NCad* nicht komplementieren und zeigten zudem den charakteristischen Konvergenzdefekt der ORNs. Unter den weiter untersuchten Mutanten (siehe Tabelle 9) konnten jedoch keine *dock* Allele gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Da der ORN Projektionsdefekt der *dock* Mutante im klonalen Hintergrund eher mild ist, ist es möglich, daß eventuelle *dock* Allele phänotypisch gar nicht erst aufgefallen sind und so aussortiert wurden.

Um weitere, neue Komplementationsgruppen aufzudecken wurden alle in Tabelle 9 aufgelisteten Mutationen außerdem untereinander verkreuzt. Hierbei konnten keine Komplementationsgruppen aufgedeckt werden. Da jedoch nicht alle isolierten Mutationen in die Komplementationsanalysen mit einbezogen wurden ist es möglich, daß unter den bisher nicht analysierten Mutationen weitere Allele der hier kartierten Mutanten, *NCad* oder *dock* zu finden sind.

Insgesamt wurden die isolierten Mutationen auf dem linken Arm des Chromosoms 2 zu wenig charakterisiert, um eindeutige Aussagen über den Sättigungsgrad der Mutagenese zu machen.

4.1.2 Sensitivität des verwendeten ORN-Markers (MM1)

Ob tatsächlich alle am zu untersuchenden Prozeß beteiligten Gene in einer phänotypischen Mutantenanalyse aufgedeckt werden können, ist stark von der Durchführung der phänotypischen Analyse und der Markierung des zu untersuchenden Gewebes abhängig (St Johnston, 2002). Die Darstellung der synaptischen Spezifität durch eine Auswahl unterschiedlicher ORN-Klassen (MM1-Marker, Tabelle 1) erwies sich für die Identifizierung

von Mutationen, die zu ORN-Projektionsdefekten führen, als ausreichend. Untersuchungen an *acj6*, das einen POU-Transkriptionsfaktor codiert, haben bereits gezeigt, daß ein Funktionsverlust des Gens nicht alle ORN Klassen in gleicher Weise betrifft (Komiyama et al., 2004). Die Markierung mehrerer Glomeruli hat die Chancen, bestimmte Mutationen zu identifizieren, erhöht. Erwartungsgemäß sind in einigen Mutationen nicht alle der im MM1-Muster markierten ORN-Klassen betroffen.

Die Markierung der synaptischen Bereiche im Zielgebiet der ORN-Axone ermöglichte es, einige Mutationen aufzudecken, die zu einer Fehlverschaltung der markierten ORN-Klassen führen. Da jedoch das SYNAPTOTAGMIN Protein entlang des Axons zur Synapse transportiert wird (Littleton et al., 1993), sollten auch Mutationen, die Defekte im subzellulären Proteintransport haben, ein verändertes ORN-Projektionsmuster zeigen. Die im MM1-Muster beobachteten Phänotypen können daher ohne genaue Charakterisierung nicht eindeutig einem defekten Wegfindungsmechanismus zugeordnet werden.

4.1.3 Die Analyse genetischer Mosaik

Die früheren systematischen Mutantanalysen wurden an homozygot mutanten Embryonen, durchgeführt (Schmucker et al., 1997; Seeger et al., 1993; Vactor et al., 1993). Da viele Mutationen in der weiteren Entwicklung zur Letalität führen können, kann so lediglich ihr Effekt in der frühen embryonalen Entwicklung analysiert werden. Um diese frühe Letalität zu umgehen, bieten sich genetische Mosaik an, in denen nur die zu untersuchenden Zellen homozygot für das mutante Chromosom sind. In früheren Mutantanalysen wurden Klone durch den Einsatz von Röntgenstrahlung induziert (Perrimon et al., 1984). Die Verwendung der FLP Rekombinase aus der Hefe unter einem gewebe- oder zeitspezifischen Promotor ermöglicht hingegen eine gezielte mitotische Rekombination (Golic and Lindquist, 1989). Es wurden bereits einige Mosaik-basierte Mutantanalysen durchgeführt, in denen Mutationen sowohl über phänotypischen Charakterisierung (Babcock et al., 2003; Janody et al., 2004; Newsome et al., 2000; Reuter et al., 2003; Slack et al., 2006) als auch über Verhaltensänderungen identifiziert wurden (Choe et al., 2006; Clandinin et al., 2001). Für die Analyse der synaptischen Verschaltung von ORNs bieten *eyFLP* induzierte Mosaik (Newsome et al., 2000) die Möglichkeit, homozygot mutante ORNs zu erhalten.

Bei etwa 18h APF erreichen die ersten ORN Axone den pupalen AL. Die Dendriten der PNs innervieren zu diesem Zeitpunkt bereits distinkte Bereiche und bilden so eine grobe erste Karte des späteren Verschaltungsmusters (Jefferis et al., 2004). Die einwachsenden ORNs müssen nun den für ihre ORN-Klasse richtigen von PN-Dendriten innervierten Bereich finden. Es liegt nahe, daß bestimmte Oberflächenmoleküle der jeweiligen PN-Dendriten als attraktives oder repulsives Signal für die ORN Axone wirken könnten. Eine falsche

Positionierung der PN-Innervation könnte so auch zu einer Fehlprojektion der Axone führen. Die Analyse von eyFLP induziertem Mosaik-Gehirnen schließt mögliche Sekundäreffekte, die ein zusätzlich mutantes ZNS mit sich bringen könnte aus.

Das Ausschalten von Genfunktionen speziell in den ORNs ermöglichte es, gezielt die in ORNs benötigten Signal-Mechanismen zu stören. So sollten auch Wegfindungs-Mechanismen, die auf einer direkten ORN-PN-Interaktion beruhen, identifiziert werden können. Zudem sollten auch Mechanismen aufgedeckt werden können, die auf einer Axon-Axon-Interaktion beruhen.

4.1.4 Phänotypische Klassen

Die synaptischen Verschaltung der ORNs mit PN-Zielzellen im AL lässt sich grob in verschiedene Schritte unterteilen. Zunächst erfolgt das Auswachsen der ORN-Axone im antennalen bzw. maxillaren Nerv, dann die Wegfindung der ORNs auf der Oberfläche des AL, die Erkennung der Zielregion, die anschließende Konvergenz der Axone und die Ausbildung von Synapsen mit den ZNS-Zielzellen. Die in dieser Arbeit generierten Mutationen wurden ihren Phänotypen entsprechend in die folgenden phänotypischen Kategorien eingeteilt:

- Verlust synaptischer Markierung einzelner ORN-Klassen
- unvollständige Innervation von Glomeruli
- ektopische glomeruläre Strukturen
- Fehlprojektion von ORN-Axonon
- Defekte in Form und Struktur eines Glomerulus
- NCad-ähnlicher Phänotyp

Diese phänotypische Klassifizierung lässt auch Rückschlüsse auf Defekte in den oben genannten Entwicklungsschritten zu.

4.1.4.1 Reduktion des ORN-Projektionsmusters

In etwa 50% der Mutationen, die zu einem vom Wildtyp abweichenden Projektionsmuster führen, kommt es zur Reduktion des ORN-Markers. Die eine Hälfte dieser Mutationen zeigt eine reduzierte Innervation eines oder mehrerer Glomeruli. In der anderen Hälfte kommt es zum kompletten Verlust der synaptischen Markierung einer oder mehrerer ORN-Klassen. Eine nahe liegende Erklärung für eine fehlende oder reduzierte synaptische Markierung ist der Verlust bestimmter ORNs. Aus diesem Grund wurden während der phänotypischen Mutantanalyse die Mutationen aussortiert, die in Homozygose zu offensichtlichen Defekten an den peripheren Organen (z.B. verkleinerte Antennen oder Verlust von Sensillen) führten. Dennoch konnte in einigen Mutationen neben dem Verlust des GFP-Signals auch

der Verlust des eigentlich innervierten Zielglomerulus im α -NCAD-Muster beobachtet werden. Es ist möglich, daß das Fehlen einer einzelnen ORN-Klasse bzw. vereinzelter ORNs sich in der äußeren Morphologie der Antenne nicht bemerkbar macht.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den Verlust oder die Reduktion synaptischer Innervation ist, daß die ORN-Axone überhaupt nicht in den AL einwachsen, d.h. den ersten Schritt in der Projektion der ORN-Axone nicht vollziehen. Das Auswachsen eines Axons ist von vielen Faktoren abhängig. Die Attraktion oder Repulsion des Wachstumskegels hat eine dynamische Umorganisation des axonalen Zytoskeletts und so eine Richtungsänderung zur Folge. Die kleinen GTPasen der RHO-Familie (z.B. RAC, RHO, und CDC42) sind hierbei Schlüssel-Regulatoren. Die Aktivierung von Rac und Cdc42 durch attraktive Signalmoleküle fördert die Aktin-Polymerisation und bedingt somit das Auswachsen des Wachstumskegels. Durch repulsive Signale aktiviertes Rho hingegen bedingt einen Rückzug des Wachstumskegels (Kalil and Dent, 2005). Ng et al. konnten z.B. zeigen, daß der Verlust von *rac* das Auswachsen von Pilzkörperneuronen verhindert (Ng et al., 2002a). Mutationen, die eine Elongation der ORN-Axone in Richtung ihres Zielgebiets verhindern, könnten theoretisch in einen Verlust der synaptischen Markierung resultieren.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist das Fehlen des GFP markierten SYNAPTOTAGMINS im synaptischen Bereich des Axons. Für Mutationen, die zum Funktionsverlust des KINESIN Proteins führen, wurde bereits eine Auswirkung auf die Ausbildung von Synapsen beschrieben (Gho et al., 1992; Hurd and Saxton, 1996). Der in diesem Labor für das Chromosom 2R durchgeführte Screen (Steffes, unveröffentlicht) führte unter anderem zur Identifizierung einer Mutation im *kinesin heavy chain* (KHC) Locus (Vedder, 2006). Die im MM1-Projektionsmuster entdeckte Fehllokalisation des SYTGFP Proteins bzw. das Fehlen der Markierung im Zielglomerulus ist hier also nicht auf einen Wegfindungs- oder Verschaltungsdefekt der ORNs zurückzuführen. Auch Reuter et al. fanden in ihrem Mosaik-Screen zur neuronalen Morphogenese von Pilzkörperneuronen ebenfalls mehrere Mutationen, die eher den axonalen Transport betreffen (Reuter et al., 2003).

In diesem Labor wurde zudem eine Mutation in dem Gen *opa1-like* auf dem 2R Chromosom identifiziert. In Mosaik-Gehirnen führt diese zur Degeneration homozygot mutanter ORNs (persönliche Mitteilung von Ö. Aydemir, unveröffentlicht). In der frühen pupalen Entwicklung kann zunächst eine ORN-Innervation beobachtet werden. Ab einem bestimmten Zeitpunkt degenerieren jedoch die Axone und die GFP-Markierung der ORNs ist nicht mehr zu sehen.

4.1.4.2 Projektion von ORN-Axonon in ektopische AL-Regionen

Diese phänotypische Gruppe ist in Bezug auf die zu untersuchende synaptische Spezifität besonders interessant. Mutationen, die in diese Gruppe eingeordnet wurden, zeigen meist eine deutliche synaptische Markierung im AL. Der erste Schritt in der ORN-Projektion, d.h.

die Wegfindung der Axone zum AL scheint hier nicht betroffen zu sein. Vielmehr zeigt diese Gruppe Phänotypen, welche vermutlich durch Defekte in der Sortierung der ORN-Axone in ihrer Projektion über den AL entstehen.

Bei 30 Mutationen konnten in der phänotypischen Analyse beobachtet werden, daß es zur Lokalisation des SYNAPTOTAGMINGFP Signals in normalerweise nicht markierte Bereiche des AL kommt. In zehn Mutationen kommt es außerdem, abgesehen von der Fehlprojektion der Axone, auch zur Konvergenz in kompakte glomeruläre Strukturen. Innerhalb dieser phänotypischen Klasse muß jedoch unterschieden werden, ob die Axone in einen fremden ORN Glomerulus konvergieren oder, ob sie neue, ektopische Glomeruli bilden.

Einzelklassen-Analysen mit verschiedenen Mutanten haben gezeigt, daß die ORN Axone einer Klasse teilweise in von ihrem Zielglomerulus weit entfernte Regionen projizieren können (Göllner, 2007; Schulte, 2005). Die Chance unter den hier zugeordneten Mutanten solche zu finden, die an der Wegfindung und Sortierung der ORN Axone im AL beteiligt sind ist hier besonders hoch. Daher wurden für weitere phänotypische Analysen und die Kartierung zunächst letale Mutationen dieser phänotypischen Gruppe ausgewählt.

4.1.4.2.1 Identifizierung von Genfunktionen, die zur Fehlprojektion von ORN-Axonon führen

Der Phänotyp von *I2-063* zeigt im MM1-Projektionsmuster neben der Innervation der eigentlichen Zielglomeruli auch einzelne markierte Axone, die in dazwischen liegende Bereiche projizieren und sogar in eine kompakte glomeruläre Struktur im posterioren AL konvergieren (Göllner, 2007). Die Kartierung ergab eine letale Mutation im CG6094, dessen Basensequenz einen putativen *peptide chain release factor* (engl.: Peptidketten-Freisetzung-Faktor) der Klasse 1 codiert. Diese Faktoren sind an der Termination der mRNA-Translation beteiligt. Sie binden an Ribosomen, an deren A-Position ein Stop-Codon auf der zu translatierenden mRNA lokalisiert ist. Die Bindung führt dazu, daß die im Ribosom wirkende PEPTIDYLTRANSFERASE das Carboxylende des Polypeptids freigibt und das fertige Protein ins Zytoplasma entlassen wird (Bertram et al., 2001; Kisselev and Buckingham, 2000). Untersuchungen von Chao et al. haben gezeigt, daß nicht nur die Erkennungssequenz des Stop-Codons (UAA, UAG und UGA) für die Termination notwendig ist. Auch der Kontext, d.h. die vor- und nachgestellten Tripletts, zwischen denen das Stop-Codon auf der mRNA lokalisiert ist, spielt eine Rolle. Eine Nullmutation in *eRF1* führt z.B. nur zur Suppression von solchen Nonsense-Mutationen (z.B. in *wg*, *en*, *shn*, *arm* und *Egfr*), in denen auf das Stop-Codon ein für Cystein codierendes Triplet folgt (Chao et al., 2003). Diese Sequenz-Spezifität von Terminations-Faktoren könnte dazu führen, daß der Funktionsverlust eines solchen Faktors die Freisetzung von Proteinen verhindert oder es zu einer verlängerten Translation in ein nicht funktionelles Protein kommt. Die Fehlprojektion

der ORN Axone könnte womöglich durch den Verlust wichtiger Proteine induziert werden, die für die korrekte Projektion der Axone notwendig sind.

Die letale Mutation *J1-059* konnte auf das CG9140 kartiert werden (Göllner, 2007). Die Sequenz des CGs weist starke Homologien zu einer 51 kDa Untereinheit des NADH Dehydrogenase Komplex 1 auf. Der NADH Dehydrogenase Komplex 1 ist der größte der an der mitochondrialen Atmungskette beteiligten Komplexe. Er stellt den Elektronen-Akzeptor für NADH dar und überträgt diese weiter an das CoenzymQ (Saraste, 1999; Smeitink et al., 2001). Die hier betroffene 51 kDa Untereinheit ist nicht im mitochondrialen Genom zu finden, wird also in nukleären Genom codiert (Brandt, 2006). Mutationen, die die Atmungskette betreffen, führen zu einem Zusammenbruch der Energieversorgung einer Zelle und so zwangsläufig zur Degeneration der Zellen. Es sind diverse Erkrankungen beschrieben worden, die mit Mutationen in der mitochondrialen Atmungskette assoziiert sind (Smeitink et al., 2001). Der Phänotyp, den *J1-059* mutanten ORNs im Mosaik-Gewebe zeigen, ist jedoch eher spezifisch für bestimmte ORN-Klassen und ist somit kaum mit einem Zusammenbruch der oxidativen Phosphorylierung zu erklären.

Soltys et al. beschreiben verschiedene, nukleär codierte, mitochondriale Proteine, für die auch eine Lokalisation außerhalb der Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (Soltys and Gupta, 1999; Soltys et al., 2000). Auch eine weitere Untereinheiten des NADH Dehydrogenase Komplex 1 konnte bereits außerhalb der mitochondrialen Membran nachgewiesen werden. Gingrich et al. haben gezeigt, daß die mitochondrial codierte Untereinheit ND2 als Adaptor für die Protein-Tyrosin-Kinase SRC wirkt und diese so an den NMDA Rezeptor-Komplex in der Präsynapse bindet (Gingrich et al., 2004). In Zusammenhang mit dem SEMA1A/PLEXINA-Signalweg in *Drosophila* wurde ebenfalls die Funktion einer Oxidoreduktase beschrieben. Es wurde gezeigt, daß MICAL, eine Flavoprotein-Oxidoreduktase, die zudem einige Domänen zur Interaktion mit Zytoskelett-Komponenten besitzt, mit PLEXIN interagiert und für die Axon-Repulsion notwendig ist (Pasterkamp et al., 2006; Terman et al., 2002). Es gibt also einige Hinweise darauf, daß mitochondriale Proteine im Zytoplasma oder gar in synaptischen Bereichen lokalisiert sind und dort auch eine Funktion in verschiedenen Signalwegen besitzen.

Die Mutation *F2-130* konnte mittels Defizienzen-Kartierung zunächst auf den Bereich 26F4-5 eingegrenzt werden und in nachfolgenden Komplementationsanalysen konnte ein allelisches Verhalten zur P-Element Insertion P{lacW}k14206 (Milchanowski et al., 2004) gezeigt werden. Die Letalität der P-Element Insertion wurde in der Literatur mit zwei CGs in Zusammenhang gebracht, zum einen mit CG11098 und zum anderen mit CG31635. Das CG11098 wurde bereits in einer RNAi-basierten Mutantenanalyse zur Identifizierung von Genen, die an der Protein-Sekretion beteiligt sind, identifiziert. Das Genprodukt des CG11098, TANGO1, ist in der Golgi-Membran lokalisiert. Am amino-terminalen Ende des

Proteins befindet sich eine SH3-Domäne, gefolgt von zwei coiled-coil Domänen, zwei Transmembran-Domänen und einer Prolin-reichen Domäne. In S2-Zellen induziert das *tango1a*-RNAi Konstrukt die Fusion von Golgi-Membranen mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Bard et al., 2006).

Ein weiterer Kandidat für die die Mutation *F2-130* ist CG31635. Die Nucleotid-Sequenz zeigt Homologien zu einigen LRR-Domänen („Leucine rich repeat“) vom Ribonuklease Inhibitor Typ. LRR-Motive treten in zahlreichen Proteinen auf. Obwohl diese Proteine die unterschiedlichsten Funktionen haben, sind sie alle an Protein-Protein Interaktionen beteiligt. Beispielsweise interagieren alle drei ROBO Proteine mit einer bestimmten LRR-Domäne des SLIT Proteins (Howitt et al., 2004). In *Drosophila* sind zahlreiche weitere LRR-Proteine bekannt, wie z.B. der Rezeptor TOLL (Kim et al., 2006; Schuster and Nelson, 2000), CONNECTIN (Fambrough and Goodman, 1996; Nose et al., 1997) oder auch die Transmembranproteine TARTAN und CAPRICIOUS (Krause et al., 2006; Shinza-Kameda et al., 2006). Für einige sind bereits Funktionen für die axonale Wegfindung und Verschaltung beschrieben worden. Die Einzelklassen-Analyse der Mutation *F2-130* ergab, daß nur wenige ORN-Klassen einen Projektionsdefekt zeigen (Göllner, 2007). Diese Klassen-spezifischen Defekte geben zumindest einen Hinweis darauf, daß hier kein genereller, für das axonale Wachstum wichtiger Prozeß betroffen ist.

Die Kartierung der Mutation *U2-017* ergab, daß es sich um ein Allel von *lace* handelt. Das LACE Protein ist eine Untereinheit der Serin Palmitoyltransferase (SPT). Der SPT Komplex besteht neben LACE (Spt-II) aus der Untereinheit SPT-I. In der Mutantenanalyse für den rechten Arm des zweiten Chromosoms konnte auch *Spt-I* identifiziert werden. Mutationen in *Spt-I* wurden als Ursache für die hereditäre sensorische Neuropathie Type I beschrieben (Gable et al., 2002; McCampbell et al., 2005). Der Phänotyp der in der Mutantenanalyse identifizierten *Spt-I* Mutation ist dem der *lace*^{*U2-017*} Mutante vergleichbar. Arbeiten mit Zellkulturen von Yasuda et al. haben gezeigt, daß das Vorkommen von LACE abhängig ist vom Vorhandensein von SPT-I (Yasuda et al., 2003). SPT katalysiert den ersten Schritt in der Sphingolipid Synthese (Hanada, 2003). Für *Drosophila* wurde beschrieben, daß Imaginalscheiben die mutant für ein *lace* Hypomorph sind, eine erhöhte Apoptose Rate zeigen. Hier ist der Zelltod mit der ektopischen Aktivierung des Janus Kinase (JNK)-Signalwegs assoziiert (Adachi-Yamada et al., 1999). Der Verlust von *lace* oder SPT-I führt zur Verminderung der *de novo* Synthese von Sphingolipid-Metaboliten, unter denen sich auch ‚second messenger‘ befinden (Hofmann and Dixit, 1998).

Sphingolipide sind in *Drosophila* auch ein Bestandteil der sogenannten Lipidrafts (Rietveld et al., 1999). Diese Lipid-Mikrodomänen in der Membran sind für die Lokalisation bestimmter Membranproteine im Axon und somit für die Wegfindungsfunktion des Wachstumskegels wichtig (Guirland et al., 2004; Ibanez, 2004). Der in *lace*^{*U2-017*} beobachtete Projektionsdefekt

könnte so auch die Fehllokalisierung bestimmter Rezeptor- oder Adhäsionsmoleküle innerhalb des auswachsenden Axons zur Ursache haben. Analysen zur genetischen Interaktion von *Spt-1* und bekannten Rezeptormolekülen, wie z.B. DSCAM, geben zudem erste Hinweise auf die Funktion von Lipidrafts in Zusammenhang mit der Verschaltung von ORN-Axonon (Steffes, 2007).

4.1.4.3 Konvergenzverlust in *NCad* mutanten ORN-Axonon

Insgesamt wurden fünf Mutationen in der Mutantanalyse identifiziert, in denen Axone zwar in ihre Zielregionen im AL projizieren, jedoch keinen kompakten Glomerulus bilden. Dieser Phänotyp wurde bereits für Mutationen in *NCad* beschrieben. NCAD wirkt zellautonom und ist essentiell für die Konvergenz von ORN-Axonon in ihren Zielglomerulus. *NCad* mutante Axone finden zwar ihr Zielgebiet, bleiben jedoch außerhalb des Glomerulus und innervieren diesen nicht (Hummel and Zipursky, 2004). Zudem scheinen alle analysierten ORN-Klassen in gleichem Maße von einem NCAD-Verlust betroffen zu sein.

Alle in dieser Arbeit induzierten Mutationen, die diesen charakteristischen Phänotyp zeigen, stellten sich in der Komplementationanalyse als *NCad*-Allele heraus. Auch in der phänotypischen Mutantanalyse für den rechten Chromosomenarm konnten keine Mutationen identifiziert werden, die zu einem mit *NCad* vergleichbaren Phänotyp führen. *NCad* scheint also eine Schlüsselfunktion für die Konvergenz der ORN-Axonon zu haben. Zumindest auf dem zweiten Chromosom scheinen keine weiteren Genfunktionen zu liegen, die speziell für die Konvergenz notwendig sind.

4.1.4.4 Mutationen, die zu einer veränderten Glomerulus-Form führen

Nach dem Auswachsen der Axone, der Projektion zur Zielregion im AL und der axonalen Konvergenz folgt der letzte Schritt, die Bildung eines Glomerulus durch die Verschaltung mit den ZNS-Zielzellen und der klaren Abgrenzung von benachbarten Glomeruli.

Unter den Mutationen, in denen die glomerulären Strukturen betroffen sind, sind in einigen Fällen nicht klar abgegrenzten Glomeruli zu beobachten. Während im Wildtyp die Grenze eines markierten Glomerulus stets in einer klaren Linie verläuft, zeigen einige Mutationen hier eine ‚gezackte‘ Abgrenzung. Dies könnte z.B. auf einen Defekt in der Sortierung von ORN-Axonon benachbarter Klassen zurückzuführen sein. Besonders auffällig ist der Phänotyp der Mutation *F2-022* (Abb. 16 E). Hier sind im MM1-Muster häufig mehrere glomeruläre Strukturen zu sehen, die ihrer äußeren Form nach keiner der markierten ORN-Klassen zugeordnet werden können. Hier stellt sich die Frage, wie die stereotype äußere Form eines Glomerulus reguliert wird. Im Vergleich zur teilweise variablen Anordnung der Glomeruli im olfaktorischen Bulbus der Vertebraten, auch lokale Permutation genannt (Schaefer et al., 2001; Strotmann et al., 2000), ist die glomeruläre Anordnung im AL in

Drosophila hoch stereotyp. Zudem haben einige Glomeruli nicht die in Vertebraten übliche kugelige Form, sondern zeigen eine längliche oder auch V-förmige Morphologie. Diese besonderen Eigenschaften der synaptische Verschaltung von *Drosophila* ORNs müssen besonders genau reguliert sein. Die Analyse der in *F2-022* betroffenen Genfunktion könnte Hinweise auf die hier involvierten Regulationsmechanismen geben. Bisher konnten für *F2-022* mittels Defizienzen-Kartierung zwei letale Mutationen identifiziert und auf die Bereiche 26B01 bis 26D02 und 31B und 32D1 eingegrenzt werden.

In einzelnen Schnittebenen lassen sich anhand der ORN-Markierung im Wildtypglomerulus Bereiche erkennen, in denen die LN-Dendriten in den Glomerulus einwachsen. Einige Mutationen führen zu einer Veränderung dieser charakteristischen ORN Anordnung. In diesen Mutationen könnten möglicherweise Gene betroffen sein, die an Axon-Dendrit-Erkennung oder der Ausbildung von funktionellen Synapsen beteiligt sind. In *T3-022* Mutanten weisen die ORN-Axone innerhalb der Glomeruli z.B. starke Verdickungen auf, die an Boutons der Motoneurone bei der Innervation der Muskeln erinnern. Die in *T3-022* betroffene Genfunktion scheint also vor allem die synaptische Organisation innerhalb der Glomeruli und somit den finalen Schritt der ORN-Verschaltung zu treffen.

4.1.5 Beurteilung der phänotypischen Mutantenanalyse

Die grobe phänotypische Unterteilung der in dieser Arbeit identifizierten Mutationen läßt sich rückblickend mit den verschiedenen Entwicklungsschritten der ORN-Verschaltung in Zusammenhang bringen. Zu Beginn der Mutantenanalyse wurde erwartet, daß sich unter den induzierten Mutationen vor allem solche befinden, die für die Zell-Zell-Erkennung wichtige Moleküle betreffen. Neben den bereits beschriebenen Rezeptoren und Liganden, für die Funktionen in der axonalen Wegfindung beschrieben sind, wurde erwartet, daß unter den Mutationen auch Gene für verschiedene Adhäsionsmoleküle betroffen sind.

Abgesehen vom hier identifizierten *sema1a*-Allel *V2-013* (siehe auch 4.2.), den *NCad* Allelen und einem weiteren *Dscam* Allel (Steffes, unveröffentlicht) wurden in der Mutantenanalyse für das zweite Chromosom bisher keine weiteren Wegfindungs- oder Adhäsionsmoleküle gefunden. Für einige Zelladhäsionsmoleküle wurde sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* eine funktionelle Redundanz für die axonale Wegfindung beschrieben (Kristiansen et al., 2005; Speicher et al., 1998). Möglicherweise ist der Funktionsverlust eines Zelladhäsionsmoleküls in der ORN Projektion nicht ausreichend um eine Fehlprojektion zu verursachen.

Unter den zweitchromosomalen Mutationen befanden sich des Weiteren auch Transkriptionsfaktoren (Steffes, unveröffentlicht), deren Funktionsverlust möglicherweise die Expression nachgeschalteter Wegfindungsmoleküle beeinträchtigt, sowie Zytoskelett-assoziierte Proteine. Reuter et al. haben in einer MARCM-basierten Mutantenanalyse zur

Identifizierung von Genen, die die Morphogenese der Pilzkörperneurone regulieren, ebenfalls eine Vielzahl von Zytoskelett oder Proteintransport assoziierten Genfunktionen identifiziert. Auch hier konnte bisher nur ein Adhäsionsmolekül, FLAMINGO, aufgedeckt werden (Reuter et al., 2003). Die bisherige Kartierung der in dieser Arbeit generierten Mutationen, führte auch zur Identifizierung von Genfunktionen, die bisher nicht im Kontext der axonalen Wegfindung beschrieben wurden. Auf dem Chromosom 2L wurden so Genfunktionen identifiziert, die mit Protein-Termination, Sphingolipidsynthese und der mitochondrialen Atmungskette assoziiert sind. Eine detaillierte Funktionsanalyse muß erst zeigen, wie diese Gene die betroffenen Entwicklungsschritte der ORN-Verschaltung regulieren.

4.2 Die Analyse der Mutation *sema1a*^{V2-013}

Die Mutation *V2-013* fiel im phänotypischen Screen auf, da neben ektopischen Glomeruli in der Nähe des SOG auch häufiger ektopische Glomeruli innerhalb des AL sowie eine deutliche Elongation des ORN47b Glomerulus zu beobachten waren. Die Komplementationsanalysen mit verschiedenen *sema1a*-Mutationen konnten zeigen, daß *V2-013* ein *sema1a*-Allel ist (Schulte, 2005).

Die Familie der Semaphorine umfaßt sowohl Membran-assoziierte als auch sekretierte Proteine. Alle besitzen eine etwa 500 Aminosäuren umfassende Sema-Domäne. Anhand weiterer struktureller Domänen lassen sich die Semaphorine in acht Klassen unterteilen, von denen drei in Invertebraten, die anderen in Vertebraten vorkommen (Pasterkamp and Kolodkin, 2003; Raper, 2000). Sowohl Transmembran-SEMAPHORINE (SEMA1A, SEMA1B, SEMA5C) als auch sekretierte SEMAPHORINE (SEMA2A, SEMA2B) wurden in *Drosophila* nachgewiesen (Khare et al., 2000). Das in dieser Arbeit identifizierte *sema1a* codiert ein Transmembranprotein, das neben seiner charakteristischen N-terminalen Sema-Domäne C-terminal keine weiteren bekannten Struktur-Motive besitzt (Yu and Kolodkin, 1999). Godenschwege et al. identifizierten zudem eine funktionelle ENA-Bindungs-Domäne sowie eine weitere Domäne, die möglicherweise die Bindung von PDZ-Proteinen ermöglicht (Godenschwege et al., 2002).

Für die ORN Projektion und Konvergenz im olfaktorischen System der Vertebraten wurde für das sekretierte Sema3A eine Funktion beschrieben. Das SEMA3A Signal wird von Gliazellen im ventromedialen Bulbus exprimiert und ist für die korrekte Projektion der, den Rezeptor NEUROFILIN-1 exprimierenden ORN Axone verantwortlich (Schwartz et al., 2000; Taniguchi et al., 2003). Der Verlust von Sema3A führt neben der Fehlprojektion von NPN-1 positiven ORNs auch zur ektopischen Konvergenz der NPN-1 negativen P2 ORNs im Bulbus (Schwartz et al., 2004). Für die Transmembran-Semaphorine (Klasse 6) wurde im olfaktorischen System der Vertebraten bisher keine Funktion beschrieben.

Die Sequenzierung des hier identifizierten Allels *V2-013* ergab bisher lediglich einen Basenaustausch in Exon 21 (persönliche Mitteilung von M. Lattemann). Die Analyse der Expression des SEMA1A Proteins in *sema1a*^{V2-013} Mosaik-Gewebe in Antennen zeigte jedoch, daß in mutanten ORNs das Protein nicht länger im Axon lokalisiert ist, sondern im Zellkörper liegt. Die induzierte Mutation führt daher zu einer Fehllokalisierung des Proteins und kann funktionell als Null-Allel interpretiert werden.

4.2.1 SEMA1A ist differentiell exprimiert und hat eine Klassen-spezifische Funktion in der Konvergenz von ORN-Axonen

In Zusammenarbeit mit Marc Lattemann wurden die verschiedenen ORN-Klassen auf einen Phänotyp in *sema1a*-Mosaik-Gehirnen hin untersucht. Der *sema1a* Verlust führt in einigen ORN-Klassen zur Fehlprojektion der Axone in benachbarte Bereiche, so daß die betroffenen Glomeruli nicht klar abgegrenzt sind und weniger kompakt wirken (Typ1 Konvergenzdefekt). In anderen ORN-Klassen projizieren die Axone in vom eigentlichen Zielglomerulus entfernte Regionen und konvergieren in kompakte ektopischen Neuropil-Bereiche (Typ2-Konvergenzdefekt). Einige ORN-Klassen sind von einem *sema1a* Verlust hingegen nicht betroffen.

Die Analyse der SEMA1A Expression in den Antennen und Maxillarpalpen zeigte, daß das Protein in den auswachsenden Axonen lokalisiert ist. Die Expression im pupalen AL zeigte außerdem, daß Axone verschiedener ORN-Klassen unterschiedlich starke Expressionslevel zeigen. Dies steht im Gegensatz zu bisher beschriebenen Genen, wie z.B. *Dscam* oder *NCad*, die eine ubiquitäre Expression im pupalen AL zeigen (Hummel et al., 2003; Hummel and Zipursky, 2004). Die Expressions-Stärke in den verschiedenen ORN-Klassen zeigt keine Korrelation zur Art und Ausprägung der Konvergenzdefekte. ORN-Klassen mit starker SEMA1A Expression liegen in direkter Nachbarschaft zu ORN-Glomeruli mit intermediärer oder ohne SEMA1A Expression. Ein klarer Gradient der Expression innerhalb des AL ist nicht zu erkennen. In AL bei etwa 20h APF, also vor Ankunft der ORN-Axone, ist auch eine Expression in PN-Dendriten zu erkennen, die allerdings eher gleichmäßig wirkt. Komiyama und Luo diskutieren in ihrer Arbeit einen dorsolateralen-ventromedialen Gradienten in der SEMA1A-Expression in PN-Dendriten (Komiyama and Luo, 2007).

Da die Expression des SEMA1A-Proteins in adulten Gehirnen nicht mehr nachgewiesen werden kann, deutet dies auf eine dynamische Expression hin. Möglicherweise ändert sich die Stärke der Expression innerhalb einer ORN-Klasse bereits in Lauf der pupalen Entwicklung.

4.2.2 Der Verlust der *sema1a* Funktion führt zu Defekten in der ORN- und Glomerulus-Sortierung

Die Analyse verschiedener Doppelmarkierungen benachbarter ORN-Klassen zeigte, daß die Klassen-spezifische Trennung der ORN-Axone in *sema1a* Mutanten nicht beeinträchtigt ist. Zwar sind die glomerulären Grenzen teilweise stark betroffen, so daß z.B. in benachbarten maxillaren ORN-Klassen Akkumulationen multipler Axontermini zu sehen sind (Typ1 Konvergenzdefekt), diese bestehen jedoch stets aus Axonen einer ORN-Klasse. Auch nach *sema1a* Überexpression kommt es zwar zum Verlust klarer Glomeruli Grenzen, eine Co-Konvergenz von Axonen unterschiedlicher Klassen kann dennoch nicht beobachtet werden. Die Klassen-spezifische Identität der ORNs wird demnach nicht über SEMA1A vermittelt. Zudem ist auch die Innervation der Glomeruli durch PNs in *sema1a*-Mosaik-Gehirnen nicht betroffen. *sema1a* spielt daher auch keine Rolle in der ORN-PN-Erkennung.

Zum einen scheint *sema1a* die strikte Aussortierung von ORN-Axonen bestimmter Klassen in abgegrenzte Bereiche zu regulieren. In diesen Klassen führt der *sema1a* Verlust zu Typ 1 Konvergenzdefekten. In anderen Klassen ist es an der Bildung der Glomerulus-Form und deren Positionierung beteiligt. Die anfängliche Aussortierung von *sema1a* mutanten ORN47b und ORN88a Axonen im pupalen AL erfolgt zunächst wie im Wildtyp. Bei etwa 50h APF bleibt die im Wildtyp beobachtete Retraktion der dorsalen Spitze des ORN47b Glomerulus jedoch aus, was in einen elongierten Glomerulus resultiert (Typ 2 Konvergenzdefekt). Dieser Entwicklungsphänotyp gibt Hinweise darauf, daß im olfaktorischen System von *Drosophila* abgesehen von der ORN Zielfindung, Sortierung und anfänglichen Konvergenz auch eine spätere Verfeinerung der glomerulären Form stattfindet.

4.2.3 *sema1a* wirkt überwiegend nicht zellautonom

Die Analyse von reversen MARCM-Klonen konnte zeigen, daß der *sema1a* Verlust in einigen ORNs die Projektion der wildtypischen Axone beeinflusst. Vor allem die wildtypischen ORN47b Axone zeigten im *sema1a*-Mosaik-Gewebe besonders deutliche Konvergenzdefekte. Dies gibt erste Hinweise auf eine nicht zellautonome Funktion von *sema1a*. Die Analyse von *hsFLP* induzierten, *sema1a* mutanten Einzel-Zell-Klonen zeigte in den meisten ORN-Klasse ebenfalls keinen Phänotyp. Überwiegend scheint *sema1a* in der Axon-Sortierung also nicht zellautonom zu wirken. Lediglich einzelne mutante ORN21a Axone konvergierten in einen ektopischen Glomerulus. *sema1a* könnte speziell in ORN21a Axonen eine zellautonome Funktion haben.

Für die korrekte Projektion der R-Zellen im visuellen System von *Drosophila* konnte ebenfalls eine zellautonome Funktion von *sema1a* gezeigt werden (Cafferty et al., 2006). Godenschwege et al. konnten zudem zeigen, daß der Verlust der *sema1a* Funktion neben Wegfindungsdefekten der ‚Giant fiber‘ (GF) auch zu Defekten in der Ausbildung einer

funktionellen Synapse im Thorax führt. *sema1a* ist hier sowohl prä- als auch postsynaptisch für die Bildung der zentralen Synapse notwendig (Godenschwege et al., 2002). Überexpressionsexperimente deuten darauf hin, daß SEMA1A hier selbst Rezeptorfunktion besitzt und möglicherweise über ENA Signale in die Zelle weitergibt. SEMA1A scheint demnach in einen bi-direktionalen Signalweg involviert zu sein. Dementsprechend postulierten auch Toyofuku et al. für SEMA6D, das nächste Vertebratenhomolog zu SEMA1A, einen bi-direktionalen Signalmechanismus in der Herzentwicklung (Toyofuku et al., 2004). Auf dem rechten Arm des Chromosoms 2 wurden während der Mutantenanalyse auch zwei *ena*-Allele identifiziert (Seidl, 2006). Im Rahmen der Diplomarbeit von S. Seidl wurde bereits eine Rolle für ENA in der ORN-Projektion beschrieben. Der *ena*^{10B07}-Verlust-Phänotyp zeigt unter anderem auch die ektopische Konvergenz von ORN21a Axonen in einen zusätzlichen Glomerulus. Es ist also durchaus denkbar, daß *sema1a* in dieser Klasse eine Rezeptorfunktion hat und über ENA Signale an das Zytoskelett weitergibt.

4.2.4 SEMA1A vermittelt axonale Repulsion

Die Analyse der *sema1a*-Verlust-Phänotypen deutet auf eine frühe Funktion von SEMA1A in der ORN-ORN-Sortierung sowie eine spätere Funktion in der Sortierung und Formgebung der reifenden Glomeruli hin. Wie vermittelt SEMA1A jedoch die Sortierung von ORN-Axonen? Auch im olfaktorischen System der Maus wurde gezeigt, daß der Verlust des sekretierten SEMA3F zu einer Fehlsortierung von vomeronasalen und akzessorischen sensorischen Neuronen führt (Cloutier et al., 2004). Für die sekretierten SEMAPHORINE der Vertebraten wurden zwar hauptsächlich repulsive Funktionen beschrieben (Kruger et al., 2005; Puschel et al., 1995), es gibt jedoch auch Beispiele für attraktive Wirkungen (de Castro et al., 1999; Polleux et al., 2000; Spassky et al., 2002). In *Drosophila* wurde für die Ausbildung der neuromuskulären Synapsen gezeigt, daß *sema1a* an bestimmten Abschnitten des Projektionswegs von Motoneuronen für die Defaszikulation notwendig ist (Yu et al., 1998), d.h. Repulsion vermittelt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Überexpression des wildtypischen SEMA1A Proteins in verschiedenen Gruppen von ORNs weist ebenfalls auf eine repulsive Funktion im olfaktorischen System hin. Die Überexpression führt zum Verlust der glomerulären Abgrenzungen zwischen den überexprimierenden ORN-Klassen. Da eine Überexpression zugleich einen Verlust der differentiellen Expressionslevel bedeutet, gibt der Überexpressionsphänotyp Hinweise darauf, daß die Expressionsunterschiede in benachbarten ORN-Klassen für die korrekte Sortierung im Wildtyp verantwortlich sind. Da das Allel *sema1a*^{V2-013} auch bereits in Heterozygose leichte Konvergenzdefekte zeigt, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß die ORN-Sortierung sehr sensitiv auf Veränderungen des SEMA1A-Levels reagiert.

In Vertebraten führt die Expression eines OR „A“ zu einer hohen Kirrel2 und Ephrin-A5 Expression, während die Expression eines OR „B“ in benachbarten ORNs eine starke Kirrel3 und Eph-A5 Expression bewirkt (Serizawa et al., 2006). Serizawa et al. zeigten in Mosaikanalysen, in denen einige ORNs der Klasse „A“ nun zusätzlich zum OR Kirrel2 überexprimieren, daß sich die ORNs entsprechend der Kirrel2 Expression sortieren und in benachbarte Glomeruli konvergieren. Dieser Phänotyp zeigt einige Parallelen zu den hier beobachteten Defekten in *sema1a* Mutanten. Auch hier scheint das jeweilige Expressionslevel für die Axon Sortierung benachbarter ORNs verantwortlich zu sein.

Die Tatsache, daß die wildtypischen Axone in den elongierten Teil des ORN47b Glomerulus konvergieren und der in der Entwicklung beobachtete Retraktions-Defekt, geben ebenfalls Hinweise auf eine Axon-Axon-Sortierung entsprechend der unterschiedlichen Stärke der *sema1a* Expression. Abbildung 69 zeigt ein Modell zur Axon-Axon-Sortierung durch Repulsion für die Klassen ORN47b und ORN21a.

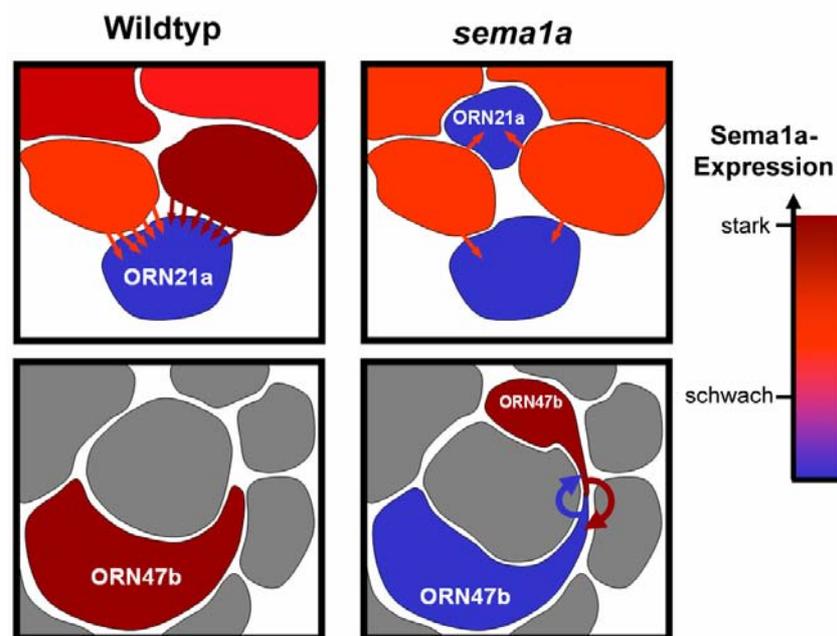


Abb. 69: Modell zur Entstehung des ORN21a und ORN47b Konvergenzdefekts in *sema1a* Mutanten. Im Wildtyp führt die SEMA1A vermittelte Repulsion einiger Glomeruli mit hohem Expressionslevel zur ventralen Positionierung des ORN21a Glomerulus, der selbst keine SEMA1A Expression zeigt. Die SEMA1A Reduktion in Mosaik-Gewebe führt so zu einer Fehllokalisierung von ORN21a Axonen in weiter dorsale Regionen. Klassenspezifische, adhäsive Eigenschaften könnten zur anschließenden Konvergenz führen. Der *sema1a* Verlust in einigen ORN47b Axonen resultiert in der Aussortierung wildtypischer Axone in den dorsalen Bereich des Glomerulus. Durch SEMA1A vermittelte Repulsion werden die mutante Axone zurückgedrängt.

Die differentielle SEMA1A Expression könnte eine unterschiedlich starke Repulsion der verschiedenen ORN-Klassen induzieren. Ein ähnliches Modell wurde auch bereits für die Funktion adhäsiver Moleküle vorgeschlagen (Steinberg and Takeichi, 1994). Zellen mit höherer Expression adhäsiver Moleküle sortieren sich von Zellen mit geringerem Expressionsniveau aus.

Bei einer Aussortierung von ORN-Axonen über Repulsion müssen jedoch weitere Klassenspezifische Moleküle für die Adhäsion der Axone innerhalb der gleichen ORN-Klasse sorgen. Als Rezeptoren für SEMAPHORINE wurden die PLEXINE identifiziert, die direkt mit SEMAPHORINEN interagieren (Comeau et al., 1998; Winberg et al., 1998) oder, im Fall der sekretierten SEMAPHORINE in Vertebraten, NEUROPILINE als Co-Rezeptoren nutzen (Tamagnone et al., 1999). Für das *Drosophila* SEMA1A konnte für die Projektion der Motoneurone die Funktion von PLEXINA als Rezeptor identifiziert werden (Winberg et al., 1998). Die Analyse von *sema1a^{V2-013}/plexinA* doppel-heterozygoten AL zeigte deutlich, daß auch für die hier postulierte ORN-Sortierung eine SEMA1A/PLEXINA-Interaktion verantwortlich ist. Zudem haben Analysen der PlexinA Expression im pupalen AL gezeigt, daß PLEXINA in den ORN-Axonon exprimiert ist (Sweeney et al., 2007).

4.3 Die Analyse der Mutation *Dscam*

Dscam codiert ein Transmembranprotein der Immunoglobulin (Ig) Superfamilie. Die extrazelluläre Hälfte des Proteins besteht aus Ig- und Fibronectin-Domänen (FNIII), die häufig in Rezeptormolekülen, wie z.B. ROBO (Kidd et al., 1998) oder FRAZZLED (Kolodziej et al., 1996), gefunden werden. Es wurde bereits an einigen Beispielen gezeigt, daß *Dscam* eine Funktion in der neuronalen Verschaltung hat. So führt der Verlust von *Dscam* im embryonalen ZNS zu Defekten in der Ausbildung der Konnektive, im Bolwig's Nerv zu Fehlprojektionen und vorzeitigem Stoppen von Axonen (Schmucker et al., 2000). Desweiteren wurde für die Wegfindung des Bolwig's Nerv gezeigt, daß *Dscam* mit *dock* und *Pak* interagiert, was eine Verbindung zur Regulation des Zytoskeletts schafft (Schmucker et al., 2000). Einige Arbeiten beschäftigten sich auch mit der *Dscam* Funktion in der Projektion und axonalen Verzweigung von Pilzkörper Neuronen (Wang et al., 2004; Wang et al., 2002; Zhan et al., 2004). Der Verlust von *DSCAM* führt hier zum einen zur Ausbildung zahlreicher axonaler Verzweigungen, zum anderen projizieren die axonalen Verzweigungen nun parallel anstatt in verschiedene Richtungen auszuwachsen (Wang et al., 2002).

4.3.1 Der Verlust der *Dscam* Funktion induziert die ektopische Konvergenz von ORN Axonen

Untersuchungen im olfaktorischen System von *Drosophila* haben gezeigt, daß der Verlust von *Dscam* in MARCM-Klonen, zur axonalen Konvergenz von ORNs in ektopische glomeruläre Strukturen entlang ihres Projektionswegs führt (Hummel et al., 2003). Die phänotypische Penetranz wird durch die größeren *Minute*-Klone für einige ORN-Klassen verstärkt. Für die Klassen ORN22a und ORN23a, die in *Dscam* MARCM-Klonen bisher lediglich eine reduzierte kontralaterale Projektion zeigten (Hummel et al., 2003), konnte so auch eine ektopische Konvergenz induziert werden. Die Tatsache, daß hier eine erhöhte Anzahl mutanter ORNs den Phänotyp verändern kann, deutet darauf hin, daß diese Klassen eine kritische Masse mutanter Axone benötigen, um in einen ektopischen Glomerulus zu konvergieren. *Dscam* hat hier möglicherweise eine nicht zellautonome Funktion.

Analysen reverser MARCM-Klone haben jedoch gezeigt, daß *Dscam* mutante Axone keinen Einfluß auf die Projektion der wildtypischen Nachbar-Axone haben. Hier scheint *Dscam* zellautonom zu wirken. Hummel et al. haben am Beispiel der Klasse ORN47a zudem gezeigt, daß auch einzelne mutante Axone in ektopische Glomeruli konvergieren können. Da es experimentell nicht möglich ist, reverse MARCM-Klone in einem *Minute*-Hintergrund zu generieren, kann die Frage der Zellautonomie in den Klassen ORN22a und ORN23a nicht eindeutig geklärt werden.

Für die Projektion von Pilzkörper-Neuronen wurde ebenfalls ein nicht zellautonomer Effekt in *Dscam* MARCM-Klonen beobachtet. Kommt es in Neuroblasten-Klonen zu einer Fehlprojektion der α/β Neurone in zwei parallel verlaufende Kern-Faszikel, so projizieren auch die nachfolgenden wildtypischen Axone in diese Richtung (Wang et al., 2002). Wang et al. erklären diesen Phänotyp mit der Pionier-Funktion der frühen α/β Neurone; nachfolgende wildtypische Neurone orientieren sich an der vorgegebenen Projektionsrichtung. Für die meisten der bisher analysierten Typen von Neuronen bzw. Prozesse, wie z.B. die axonale Verzweigung, wurde allerdings eine zellautonome *Dscam* Funktion beschrieben (Chen et al., 2006; Wang et al., 2002).

Es ist durchaus möglich, daß die verschiedenen ORN-Klassen unterschiedliche Strategien nutzen, um in ihr korrektes Zielgebiet zu projizieren. Möglicherweise orientieren sich Axone der Klassen ORN22a und 23a während der Projektion stärker an ihren Nachbar-Axonon als Axone anderer Klassen. Die höhere Anzahl mutanter ORNs im *Minute*-Mosaikgewebe könnte so die Fehlprojektion von ORN23a und ORN22a Axonen durch *Dscam* unabhängige Interaktionen mit Axonen benachbarter Klassen verursachen.

4.3.2 DSCAM verhindert eine vorzeitige Axon-Konvergenz indem es sowohl inter- als auch intra-axonale Repulsion vermittelt

Bisher konnte eine Co-Konvergenz von ORNs verschiedener Klassen in ektopische Glomeruli nicht ausgeschlossen werden. Die hier analysierten, differentiellen Markierungen benachbarter ORN-Klassen haben nun gezeigt, daß *Dscam* mutante Axone einer Klasse sich stets von Axonen anderer Klassen aussortieren. DSCAM codiert also nicht die „Klassen-Identität“ von ORNs.

Dscam mutante Axone der verschiedenen ORN-Klassen konvergieren jeweils in bevorzugte Regionen. Die ektopischen Glomeruli sind hauptsächlich entlang der üblichen Projektionsrouten der ORNs über den AL lokalisiert. Der Verlust der *Dscam* Funktion führt also dazu, daß Axone vorzeitig, d.h. vor Erreichen des Ziels, in einen ektopischen Glomerulus konvergieren. Zusammen mit der hier festgestellten, überwiegend zellautonomen Funktion von *Dscam* läßt sich für die Entstehung ektopischer Glomeruli folgendes Modell postulieren: Einzelne Axone stoppen vor Erreichen des Zielglomerulus und adhäsive Eigenschaften zwischen Axonen einer ORN-Klasse führen dazu, daß weitere Axone ebenfalls an dieser Stelle konvergieren. Die von Schmucker et al. gezeigte genetische Interaktion von *Dscam* mit *dock* und *Pak*, die eine Verknüpfung zur Regulation des Zytoskeletts darstellt (Schmucker et al., 2000), könnte den Zusammenhang zwischen dem Verlust von *Dscam* und dem vorzeitigen Stoppen von ORN Axonen erklären.

Die Analyse der DSCAM Überexpression in ORNs zeigte einen stark repulsiven Effekt. Axone projizieren eher oberflächlich über die Zielregion hinweg und konvergieren nicht mehr richtig in ihren Zielglomerulus. Dieser Überexpressionsphänotyp zeigt starke Ähnlichkeit mit dem für NCAD beschriebenen Verlust-Phänotyp, bei dem mutante ORNs ihre Konvergenz zueinander verlieren und ihren Zielglomerulus nicht mehr richtig innervieren (Hummel and Zipursky, 2004). Die starke Repulsion zwischen Axonen, die eine DSCAM-Isoform überexprimieren wurde auch für die Neurone der Pilzkörper beobachtet (Wang et al., 2004; Zhan et al., 2004). Für das humane DSCAM konnte, durch die Aggregation von transfizierten Mauszellen *in vitro*, eine homophile Interaktion gezeigt werden (Agarwala et al., 2000). Weitere Analysen von Wojtowicz et al. haben gezeigt, daß das *Drosophila* DSCAM über die variablen Ig-Domänen Ig2, Ig3 und Ig7 homophil interagiert (Wojtowicz et al., 2004). Hier zeigten nur identische Isoformen eine homophile Bindung.

Die Expression identischer DSCAM Moleküle in einer Vielzahl benachbarter Axone führt zur homophilen Repulsion und verhindert somit die axonale Konvergenz im Zielgebiet. Interessanterweise zeigte die Überexpression in einzelnen ORN-Axonen einen vergleichbaren Phänotyp und weist somit auf einen zellautonomen Effekt, d.h. intra-axonale Repulsion, hin.

Für andere Struktur-verwandte Rezeptoren der Ig-Superfamilie konnten bereits Interaktionen in cis nachgewiesen werden. Untersuchungen von Stein et al. konnten zeigen, daß die Bindung von NETRIN-1 an den Rezeptor DCC eine Rezeptor-Multimerisierung, d.h. eine homophile Interaktion in cis, induziert (Stein et al., 2001). Zudem können die Rezeptormoleküle DCC und ROBO-1 auch Heterodimere bilden (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Inwieweit die in der Überexpression beobachtete intra-axonale Repulsion im Wildtyp tatsächlich stattfindet, ist jedoch unklar. Die Expression einer ektoptischen Zahl von DSCAM Molekülen in einer Zelle könnte auch artifizielle Effekte hervorrufen.

4.3.3 Die Erkennung zwischen ORNs und ihren ZNS Zielzellen ist *Dscam* unabhängig

DSCAM ist sowohl in ORNs als auch in ihren ZNS-Zielzellen, den PNs, exprimiert. In *Dscam* transheterozygoten Gehirnen konnte, abgesehen von einer 100%igen phänotypischen Penetranz, keine Verstärkung in Anzahl oder Lokalisation ektoptischer Glomeruli festgestellt werden. Wenn DSCAM eine Interaktion zwischen PNs und ORNs vermitteln würde, so wäre eine stärkere Fehlprojektion der ORN-Axone zu erwarten gewesen. Auch Zhu et al. haben mit der Analyse von Neuroblasten-Klonen gezeigt, daß der Verlust von *Dscam* in PNs nicht zur Fehlprojektion der Dendriten führt. Lediglich die Innervation innerhalb eines Glomerulus ist reduziert (Zhu et al., 2006).

Die Analyse der dendritischen Innervation ektoptischer Glomeruli durch die ZNS Zielzellen ergab, daß innerhalb des AL liegende ektoptische Glomeruli immer von LN-Dendriten innerviert werden. Auch Glomeruli maxillärer ORN-Axone, die ventral zu den regulären AL-Glomeruli liegen, zeigten eine deutliche LN Innervation. Die hier analysierte Gruppe von LNs zeigt also eine hohe Flexibilität in der Innervation, so daß sie auch über ihren eigentlichen Wirkungsradius hinaus, ektoptische ORN-Glomeruli innerviert.

Fehllokalisierte ORNs sind zwar generell in der Lage auch PNs über relativ weite Distanzen zu „rekrutieren“, die unterschiedlichen *GH146* positiven PNs unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrem Innervationsverhalten. Möglicherweise bilden hier repulsive Dendrit-Dendrit-Interaktionen verschiedener PNs eine Barriere, die das Auswachsen in eine bestimmte Richtung verhindert. Die dendritische Innervation ektoptischer Glomeruli verschiedener ORN-Klassen durch PNs ist demnach abhängig von der jeweiligen Lokalisation. Die Analyse des Innervationsmusters von *MZ19* positiven PNs in *Dscam Minute*-Klonen zeigte außerdem, daß zumindest für die Klassen ORN47b und ORN88a die PN Innervation noch spezifisch ist. Interessanterweise sehen sich die Phänotypen *Dscam* mutanter ORNs und DSCAM überexprimierender PNs (Daten nicht gezeigt) sehr ähnlich. Die DSCAM Überexpression in *MZ19* führt ebenfalls zur Positionsverschiebung des VA1d Glomerulus. Das

Innervationsmuster der später einwachsenden wildtypischen ORNs spiegelt diese Positionsverschiebung wieder (Zhu et al., 2006).

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, daß sich ORNs und PNs zunächst unabhängig voneinander sortieren und sich später entsprechend verschalten. Fehllokalisationen sowohl von PNs als auch von ORNs haben so Einfluß auf die spätere glomeruläre Organisation. Auch in Vertebraten gibt es Hinweise darauf, daß sich ORNs unabhängig von ihren ZNS-Partnern sortieren und Protoglomeruli bilden. In der embryonalen Entwicklung des olfaktorischen Systems zeigen ORNs bereits in Stadium E20 die Bildung von Protoglomeruli. Die Dendriten der Mitralzellen scheinen zu diesem Zeitpunkt eher verteilt (Bailey et al., 1999; Treloar et al., 1999). Bulfone et al. konnten zudem zeigen, daß in *Tbr-1* mutanten Mäusen, in denen ein Teil der Mitralzellen fehlt, die ORN Axone trotzdem in Glomeruli konvergieren (Bulfone et al., 1998). Die ZNS-Zielzellen scheinen also für die initiale Bildung der Glomeruli eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.3.4 Mögliche Funktion von *Dscam* in der axonalen Wegfindung antennaler ORNs

Einige Klassen zeigen auch ektopische Glomeruli im AL, die nicht unmittelbar am Projektionsweg der ORNs liegen. ORN47b Axone zeigen z.B. neben einem lokalen Konvergenzdefekt (Aufteilung der Axone in zwei größere Bereiche in der Zielregion) auch vereinzelt ektopische Glomeruli in weiter posterior gelegene Regionen. Inwieweit der *Dscam*-Verlust auch eine Fehlprojektion von Axonen im AL verursacht muß allerdings weiter analysiert werden. Es ist unklar, ob es tatsächlich festgelegte Projektionsrouten für verschiedene ORN-Klassen gibt. Zwar zeigen ORNs einer Klasse meist 1-2 Haupt-Routen entlang derer sie projizieren, es sind jedoch auch im Wildtyp immer wieder vereinzelte Axone zu sehen, die einen abweichenden Projektionsweg wählen (persönliche Mitteilung von Ch. Scheper). Um eine Rolle von *Dscam* in der axonalen Wegfindung im AL zu bestätigen, muß zunächst das Projektionsverhalten der einzelnen Klassen detaillierter analysiert werden.

Für maxillare ORN-Klassen wurde bereits die Konvergenz in Glomeruli außerhalb des AL beschrieben. Die hier durchgeführten Analysen von *Minute*-Klonen ergaben, daß auch antennale ORN-Klassen außerhalb des AL ektopisch konvergieren. Die Axone der ORNs projizieren zusammen mit anderen sensorischen Neuronen im antennalen Nerv zum Gehirn (Sivan-Loukianova and Eberl, 2005). Histologische Untersuchungen von Kamikouchi et al. zeigen, daß ORNs und auditorische Neurone (aN) sich im oberen Bereich des Nervs in distinkte Bereiche verteilen. Die ORNs bilden drei Faszikel, die um die aN herum angeordnet sind. Während die auditorischen Neurone den antennalen Nerv verlassen und posterior-ventral ins AMMC projizieren, wachsen die ORNs weiter bis in den AL (Kamikouchi et al., 2006). In *Dscam* Mutanten scheinen einige ORNs nun dem Weg der aN in den AMMC zu

folgen. Neben der Funktion, ein Stoppen und so die vorzeitige Konvergenz von Axonen vor Erreichen der Zielregion zu verhindern, könnte *Dscam* also auch eine Funktion in der Aussortierung antennaler ORNs von anderen sensorischen Neuronen im antennalen Nerv haben. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche, zusätzliche Rezeptorfunktion von DSCAM. Es gibt hierzu erste Hinweise, daß DSCAM in der Entwicklung des embryonalen ZNS möglicherweise einen neuen Rezeptor für NETRIN darstellt (Andrews, "Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity" Meeting CSH 2006). Inwieweit dies auch für die axonale Wegfindung im olfaktorischen System zutrifft, muß jedoch erst überprüft werden.

4.3.5 Modell zur *Dscam* Funktion in der ORN Verschaltung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, daß *Dscam* in den einwachsenden ORN-Axonen eine vorzeitige Konvergenz inhibiert. In den meisten ORN-Klassen geschieht dies zellautonom. Die Schemata in Abbildung 70 und 71 zeigen Modelle zur DSCAM Funktion zum Zeitpunkt der ORN-Projektion (en route Status) bzw. während der axonalen Konvergenz im Zielgebiet.

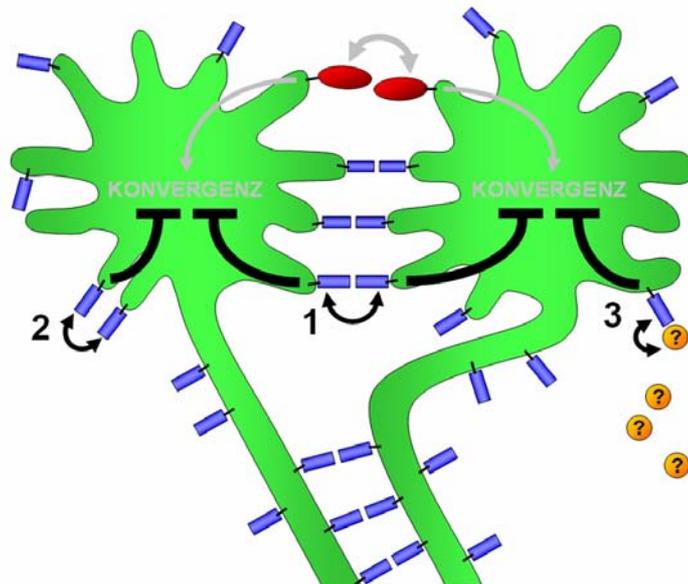


Abb. 70: DSCAM vermittelte Inhibition axonaler Konvergenz während der ORN-Projektion. ORN Axone exprimieren während der Entwicklung ein oder mehrere Moleküle, die die Identität, d.h. die Klassen-Zugehörigkeit von ORNs, bestimmen (rote Moleküle). Adhäsive Kräfte zwischen ORNs der gleichen Klasse ermöglichen eine Konvergenz der Axone. Während der Projektion der ORNs über den AL vermittelt *Dscam* (blaue Moleküle) über die homophile Interaktion gleicher Isoformen in *trans* die Repulsion zwischen den ORN-Axonen (1) und verhindert so die vorzeitige Konvergenz. Auch die intra-axonale Repulsion über DSCAM Interaktion in *cis* ist denkbar (2). Die Aktivierung eines *Dscam*-Signalwegs, führt zum weiteren Auswachsen des Axons. In einigen ORN-Klassen könnte DSCAM zudem eine Rezeptorfunktion besitzen, die zur Wegfindung im AL beiträgt (3).

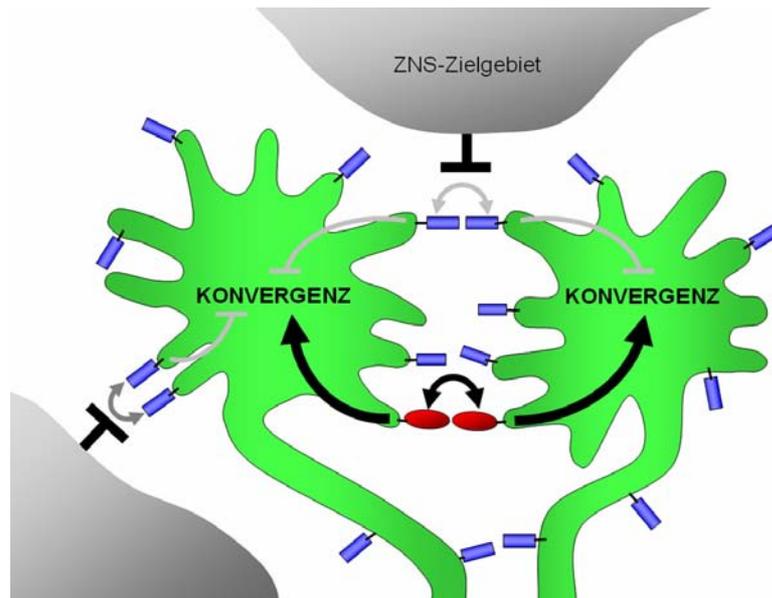


Abb. 71: Axonale Konvergenz im Zielgebiet. Im Zielgebiet angekommen wird die DSCAM vermittelte Inhibition aufgehoben. Dies kann zum einen durch Regulation der DSCAM-Expression erfolgen, zum anderen auch durch direkte Protein-Interaktionen von Molekülen im Zielgebiet mit DSCAM. Ohne die *Dscam* vermittelte Inhibition kommt es zur Konvergenz der ORN Axone durch Klassen-spezifische Adhäsion.

4.3.6 Die Konvergenz maxillarer ORN Axone ist von einer hohen DscAM Diversität abhängig

In der Entwicklung des Nervensystems muß sich jedes Neuronen mit bestimmten Zielzellen verschalten. Dies bedeutet, daß jedes Neuron eine bestimmte „Identität“ haben muß, die der Unterscheidung und Erkennung durch andere Zellen dient. Zum einen könnten einige wenige Oberflächen-Moleküle durch eine bestimmte Kombinatorik die „Identität“ eines Neurons darstellen. Zum anderen könnten jedoch auch einzelne Moleküle, die eine hohe Diversität zeigen, die „Identität“ eines Neurons codieren.

Es sind einige Beispiele für molekulare Diversität von Rezeptormolekülen bekannt. In Vertebraten werden durch alternative Promotoren und Spleißen tausende verschiedener NEUREXINE generiert (Rissone et al., 2007; Rowen et al., 2002; Tabuchi and Sudhof, 2002). In *Xenopus* konnte auch eine zeitlich und räumlich regulierte Expression der verschiedenen NEUREXIN Isoformen gezeigt werden (Zeng et al., 2006). Auch für das *Drosophila* NCAD können durch alternatives Spleißen 12 mögliche Isoformen generiert werden. Für die Projektion der Photorezeptorneurone wurde gezeigt, daß der Verlust von *NCad* zu einer R7 Fehlprojektion führt (Ting et al., 2005). Dieser Phänotyp konnte allerdings mit jeder der 12 Isoformen gerettet werden. Die Untersuchungen von Yonekura et al. bestätigten zudem, daß verschiedene Klassen von Photorezeptorneuronen ein eher ähnliches Repertoire an NCAD

Isoformen exprimieren. So haben Zellkultur-Experimente gezeigt, daß diese unterschiedlichen Isoformen eine gestaffelte, homophile Adhäsion vermitteln können (Yonekura et al., 2006).

Die DSCAM Diversität, mit 38016 möglichen Isoformen, zeigt wohl die bisher größte Diversität. Die in dieser Arbeit verwendeten Deletionskonstrukte ermöglichten es in Kombinationen, nacheinander alle der 12 Alternativen für Exon 4 auszuschalten. Celotto und Graveley konnten zeigen, daß das alternative Spleißen des Exon 4 Clusters in der *Drosophila* Entwicklung reguliert ist (Celotto and Graveley, 2001). Das am stärksten regulierte Exon, 4.2, wird im Embryo z.B. seltener verwendet, ist in adulten Tieren jedoch stark exprimiert. Zudem wurde gezeigt, daß in den verschiedenen adulten Geweben auch unterschiedliche DSCAM Kollektionen zu finden sind. Die Expression verschiedener DSCAM Isoformen scheint sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert.

Neves et al. konnten zudem zeigen, daß selbst unterschiedliche Klassen von Photorezeptorneuronen jeweils ein bestimmtes Repertoire an DSCAM Isoformen exprimieren (Neves et al., 2004). Einzelne Neurone der gleichen Klasse exprimieren verschiedene Isoformen aus diesem Repertoire. Ähnliche Ergebnisse ergab auch die Analyse der Expressionprofile in den Neuronen der Pilzkörper. Es wurde gezeigt, daß ein einzelnes Neuron multiple Isoformen exprimiert und daß das Exon 9 hier besonders häufig exprimiert wird (Zhan et al., 2004).

Eine Einschränkung der DSCAM Diversität mittels der Deletionskonstrukte führte in den ORNs zu unterschiedlichen Konvergenzdefekten (siehe 3.1.5.5). Zum einen kommt es zur ektopischen Konvergenz in kompakte Strukturen wie sie im MM1-Muster zu sehen waren. Im Vergleich dazu verteilten sich die Axontermini der maxillaren Klassen auf eine breitere Region und zeigten eher einen Konvergenzverlust. Eine eingeschränkte DSCAM Diversität führt nicht zu einer Co-Konvergenz von unterschiedlichen ORN-Klassen. Die "neuronale Identität" scheint daher nicht über die Diversität codiert zu sein.

Für das olfaktorische System ist bisher nicht bekannt, ob auch die ORN-Klassen ein definiertes DSCAM Repertoire exprimieren. Die beiden unterschiedlichen Phänotypen, ektopische Konvergenz und Konvergenzverlust, könnten jedoch ein Hinweis darauf sein, daß maxillare ORN-Klassen möglicherweise andere Isoformen benötigen als die im MM1-Muster markierten antennalen Klassen. Es ist jedoch auch möglich, daß die Diversität, in den später einwachsenden maxillaren ORNs, eine andere Rolle übernimmt.

Die Ausprägung des Phänotyps war mit allen analysierten Konstrukten gleich. Lediglich die phänotypische Penetranz steigerte sich mit abnehmender Diversität. Chen et al. konnten hingegen zeigen, daß der durch Deletionen induzierte Verlust bestimmter Isoformen, unterschiedliche Phänotypen im axonalen Verzweigungsmuster der multisensorischen

Neurone im Thorax hervorruft (Chen et al., 2006). Die Rolle einzelner Isoformen oder der Diversität scheint also kontextabhängig zu sein.

Die Tatsache, daß die ORN-Konvergenzdefekte mit allen hier analysierten Konstrukten ähnlich sind, spricht eher dafür, daß vor allem die Vielfalt der Isoformen, in Axonen einer ORN-Klasse, für eine korrekte Konvergenz notwendig ist. Wie bereits für die Photorezeptoren beschrieben (Neves et al., 2004), könnten auch Axone der gleichen ORN-Klassen unterschiedliche Isoformen aus einem Klassen-spezifischen Repertoire exprimieren. Eine reduzierte DSCAM Diversität führt dazu, daß die Axone einer ORN-Klasse nun ähnliche Isoformen exprimieren und sich voneinander abstoßen (DSCAM vermittelte Repulsion).

4.4 Die Regulation synaptischer Spezifität im olfaktorischen System

Die präzisen Verschaltungen der ORNs mit ihren ZNS Zielzellen erfolgt in verschiedenen Entwicklungsschritten. Zunächst müssen die ORN Axone aus den peripheren Organen auswachsen und ihr Zielgebiet im AL erreichen. Das hier analysierte Gen *Dscam* verhindert eine vorzeitige Konvergenz der einwachsenden ORN Axone. Dies zeigt, daß die ORN Axone der verschiedenen Klassen bereits vor Erreichen des eigentlichen Zielgebiets alle zur Konvergenz notwendigen Eigenschaften besitzen. Zudem ist *Dscam* in einigen ORN Klassen aktiv als möglicher Rezeptor für Richtungsentscheidungen des auswachsenden Axons verantwortlich.

Während die Axone über den AL projizieren scheint bereits eine Sortierung in Klassen-spezifische Projektionsrouten zu erfolgen (persönliche Mitteilung Ch. Scheper). Die Analyse der pupalen Glomerulus-Entwicklung hat gezeigt, daß sich ORNs der unterschiedlichen Klassen zunächst aus gemeinsamen, breiteren Domänen aussortieren, um dann in kompakte Glomeruli zu konvergieren. An dieser Sortierung von ORN Axonen ist in einigen Klassen *sema1a* involviert.

Der Verlust von *sema1a* resultiert in diesen ORN Klassen in einen Verlust der axonalen Konvergenz. Einzelne Axone einer ORN Klasse ragen in benachbarte Bereiche anstatt in ihren Zielglomerulus zu konvergieren. Auch Axone maxillarer ORNs, in denen die Diversität der möglichen DSCAM Isoformen eingeschränkt wurde, zeigen einen deutlichen Konvergenzdefekt. Die betroffenen ORNs projizieren zwar in ihre Zielregion, konvergieren jedoch nicht mehr in kompakte Glomeruli.

Obwohl beide Moleküle, SEMA1A und DSCAM, Repulsion vermitteln, sind die Mechanismen hier doch unterschiedlich. Die *sema1a* abhängige Sortierung erfolgt eher über unterschiedliche Expressionslevel in benachbarten ORN Klassen. In der *Dscam* abhängigen Sortierung spielt hier die Diversität der exprimierten DSCAM-Moleküle eine Rolle.

Nach Bildung der Protoglomeruli in der pupalen Entwicklung der AL können weitere Verschiebungen und Form-Änderungen beobachtet werden. Auch hier wirkt *sema1a* in einigen ORN-Klassen. Die Analyse der PN Innervation von ektopisch konvergierten *sema1a* oder *Dscam* mutanten Axonen hat zudem gezeigt, daß das anfänglich gebildete Innervationsmuster noch veränderbar ist und die Synaptogenese sich an Fehlprojektionen anpassen kann.

Im olfaktorischen System der Vertebraten erfüllen die ORs die Funktion eines „Identitätssignals“. Der Verlust eines OR Rezeptors resultiert im Verlust von axonaler Konvergenz im Bulbus (Wang et al., 1998). Die Arbeiten von Serizawa et al. und Imai et al. haben gezeigt, daß die OR-Expression und Aktivität in direktem Zusammenhang mit der komplementären Expression von Adhäsions- und Wegfindungsmolekülen wie KIRREL2, KIRREL3, EPHA5, EPHRIN-A5 und NPN-1 in den ORNs steht (Imai et al., 2006; Serizawa et al., 2006).

In *Drosophila* konnte bisher kein vergleichbares Identität gebendes Signal identifiziert werden. Mit *sema1a* und *Dscam* wurden hier zwei Genfunktionen analysiert, die vielmehr die Axon-Axon-Sortierung regulieren. Die Frage, wie die Expression solcher Zell-Erkennungsmoleküle in *Drosophila* reguliert wird, bleibt zunächst offen. Möglicherweise wird eine kombinatorische Expression verschiedener Zell-Erkennungsmoleküle in einzelnen ORN-Klassen über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Analyse der Expressionsmuster vom Transkriptionsfaktor ENGRAILED und *connectin*, das als potentiell ENGRAILED Zielgen beschrieben wurde (Solano et al., 2003), geben hierzu erste Hinweise. *en* und *con* sind in komplementären Bereichen des AL exprimiert (siehe Anhang). Die kombinatorische Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *engrailed*, *acj6* (Komiyama et al., 2004) oder auch *sequoia* (Petrovic, unveröffentlicht), und deren Zielgene könnte so eine „neuronalen Identität“ codieren.

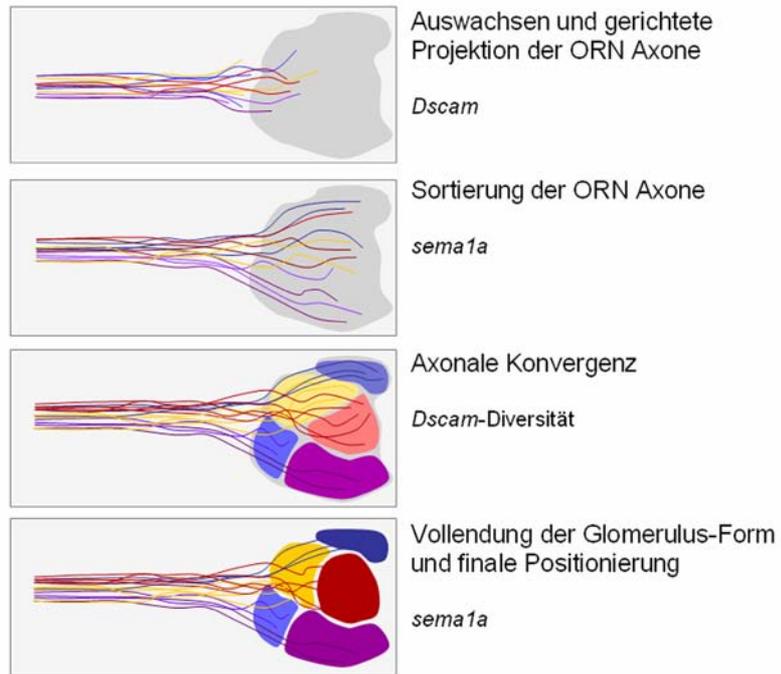


Abb. 72: Funktionen von *sema1a* und *Dscam* während der verschiedenen Entwicklungsschritte der ORN Verschaltung.

5 Zusammenfassung

Die sensorischen Neurone des olfaktorische Systems (ORNs) von *Drosophila* zeigen ein hohes Maß an synaptischer Spezifität. Die Axone der ORNs projizieren ins Gehirn und konvergieren dort in Klassen-spezifische Glomeruli, indem sie sich mit ihren ZNS Zielzellen verschalten. Dieses präzise Verschaltungsmuster erfordert eine genaue genetische Regulation.

Um Gene zu identifizieren, die die synaptische Spezifität der ORNs regulieren, wurden 1800 letale Mutationen auf eine Veränderung in der ORN-Verschaltung hin untersucht. In einer systematischen Mosaikanalyse konnten 110 Mutationen identifiziert werden, die zu einem defekten ORN-Verschaltungsmuster führen.

Unter den so isolierten Mutationen befand sich auch *semaphorin1a*. Funktionelle Analysen ergaben, daß *sema1a* in der Sortierung von ORN Axonen nicht zellautonom wirkt. Hierbei ist die differentielle Expression von *sema1a* in benachbarten ORN-Klassen entscheidend. *sema1a* ist außerdem in der finalen Glomerulus-Positionierung innerhalb des AL involviert. Analysen zur genetischen Interaktion von *sema1a* und *plexinA* konnten zudem zeigen, daß die ORN-Sortierung und Konvergenz über die Interaktion von SEMA1A mit dem Rezeptor PLEXINA erfolgt.

Funktionelle Analysen von *Dscam* ergaben, daß die Konvergenz der ORN Axone vor Erreichen ihres eigentlichen Zielgebiets im AL verhindert wird. In einigen ORN Klassen ist *Dscam* zudem aktiv an der Wegfindung der Axone in den AL beteiligt. Die Analyse verschiedener Arten von Klonen ergab desweiteren, daß *Dscam* in den ORNs zellautonom wirkt. Durch die Reduktion der Gesamtzahl von DSCAM Isoformen konnte gezeigt werden, daß eine hohe molekulare Diversität von *Dscam* für die korrekte Konvergenz der maxillaren ORN Axone von Bedeutung ist.

6 Literatur

- Acebes, A. and Ferrus, A.** (2001). Increasing the number of synapses modifies olfactory perception in *Drosophila*. *J Neurosci* **21**, 6264-73.
- Adachi-Yamada, T., Gotoh, T., Sugimura, I., Tateno, M., Nishida, Y., Onuki, T. and Date, H.** (1999). De novo synthesis of sphingolipids is required for cell survival by down-regulating c-Jun N-terminal kinase in *Drosophila* imaginal discs. *Mol Cell Biol* **19**, 7276-86.
- Agarwala, K. L., Nakamura, S., Tsutsumi, Y. and Yamakawa, K.** (2000). Down syndrome cell adhesion molecule DSCAM mediates homophilic intercellular adhesion. *Brain Res Mol Brain Res* **79**, 118-26.
- Andrews, G. L. a. K., Thomas.** ("Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity" Meeting CSH 2006). Novel Netrin Receptors required for midline crossing: Abstract Book; Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Ang, L. H., Kim, J., Stepensky, V. and Hing, H.** (2003). Dock and Pak regulate olfactory axon pathfinding in *Drosophila*. *Development* **130**, 1307-16.
- Babcock, M. C., Stowers, R. S., Leither, J., Goodman, C. S. and Pallanck, L. J.** (2003). A genetic screen for synaptic transmission mutants mapping to the right arm of chromosome 3 in *Drosophila*. *Genetics* **165**, 171-83.
- Bailey, M. S., Puche, A. C. and Shipley, M. T.** (1999). Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J Comp Neurol* **415**, 423-48.
- Bard, F., Casano, L., Mallabiabarrena, A., Wallace, E., Saito, K., Kitayama, H., Guizzunti, G., Hu, Y., Wendler, F., Dasgupta, R. et al.** (2006). Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization. *Nature* **439**, 604-7.
- Berdnik, D., Chihara, T., Couto, A. and Luo, L.** (2006). Wiring stability of the adult *Drosophila* olfactory circuit after lesion. *J Neurosci* **26**, 3367-76.
- Bertram, G., Innes, S., Minella, O., Richardson, J. and Stansfield, I.** (2001). Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology* **147**, 255-69.
- Bossing, T. and Brand, A. H.** (2002). Dephrin, a transmembrane ephrin with a unique structure, prevents interneuronal axons from exiting the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **129**, 4205-18.
- Boyle, M., Nighorn, A. and Thomas, J. B.** (2006). *Drosophila* Eph receptor guides specific axon branches of mushroom body neurons. *Development* **133**, 1845-54.
- Brandt, U.** (2006). Energy Converting NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem.*
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T.** (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806.
- Brown, A., Yates, P. A., Burrola, P., Ortuno, D., Vaidya, A., Jessell, T. M., Pfaff, S. L., O'Leary, D. D. and Lemke, G.** (2000). Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell* **102**, 77-88.
- Buck, L. and Axel, R.** (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-87.

- Bulfone, A., Wang, F., Hevner, R., Anderson, S., Cutforth, T., Chen, S., Meneses, J., Pedersen, R., Axel, R. and Rubenstein, J. L.** (1998). An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* **21**, 1273-82.
- Cafferty, P., Yu, L., Long, H. and Rao, Y.** (2006). Semaphorin-1a functions as a guidance receptor in the *Drosophila* visual system. *J Neurosci* **26**, 3999-4003.
- Celotto, A. M. and Graveley, B. R.** (2001). Alternative splicing of the *Drosophila* Dscam pre-mRNA is both temporally and spatially regulated. *Genetics* **159**, 599-608.
- Chao, A. T., Dierick, H. A., Addy, T. M. and Bejsovec, A.** (2003). Mutations in eukaryotic release factors 1 and 3 act as general nonsense suppressors in *Drosophila*. *Genetics* **165**, 601-12.
- Chen, B. E., Kondo, M., Garnier, A., Watson, F. L., Puettmann-Holgado, R., Lamar, D. R. and Schmucker, D.** (2006). The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell* **125**, 607-20.
- Choe, K. M., Prakash, S., Bright, A. and Clandinin, T. R.** (2006). Liprin-alpha is required for photoreceptor target selection in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11601-6.
- Clandinin, T. R., Lee, C. H., Herman, T., Lee, R. C., Yang, A. Y., Ovasapyan, S. and Zipursky, S. L.** (2001). *Drosophila* LAR regulates R1-R6 and R7 target specificity in the visual system. *Neuron* **32**, 237-48.
- Cloutier, J. F., Sahay, A., Chang, E. C., Tessier-Lavigne, M., Dulac, C., Kolodkin, A. L. and Ginty, D. D.** (2004). Differential requirements for semaphorin 3F and Slit-1 in axonal targeting, fasciculation, and segregation of olfactory sensory neuron projections. *J Neurosci* **24**, 9087-96.
- Clyne, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J. and Carlson, J. R.** (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* **22**, 327-38.
- Comeau, M. R., Johnson, R., DuBose, R. F., Petersen, M., Gearing, P., VandenBos, T., Park, L., Farrah, T., Buller, R. M., Cohen, J. I. et al.** (1998). A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* **8**, 473-82.
- Couto, A., Alenius, M. and Dickson, B. J.** (2005). Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr Biol* **15**, 1535-47.
- Cutforth, T., Moring, L., Mendelsohn, M., Nemes, A., Shah, N. M., Kim, M. M., Frisen, J. and Axel, R.** (2003). Axonal ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell* **114**, 311-22.
- de Bruyne, M., Foster, K. and Carlson, J. R.** (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* **30**, 537-52.
- de Castro, F., Hu, L., Drabkin, H., Sotelo, C. and Chedotal, A.** (1999). Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J Neurosci* **19**, 4428-36.
- Dickson, B. J.** (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-64.
- Dobritsa, A. A., van der Goes van Naters, W., Warr, C. G., Steinbrecht, R. A. and Carlson, J. R.** (2003). Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* **37**, 827-41.
- Edenfeld, G.** (2004). Die Entwicklung der peripheren Gliazellen von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Westfälische Wilhelms Universität.
- Engelen, D.** (2005). Axon-Axon und Axon-Dendrit-Interaktionen im olfaktorischen System von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität.

- Estes, P. S., Ho, G. L., Narayanan, R. and Ramaswami, M.** (2000). Synaptic localization and restricted diffusion of a *Drosophila* neuronal synaptobrevin--green fluorescent protein chimera in vivo. *J Neurogenet* **13**, 233-55.
- Fambrough, D. and Goodman, C. S.** (1996). The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell* **87**, 1049-58.
- Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A. and Mombaerts, P.** (2004). Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor. *Cell* **117**, 833-46.
- Feinstein, P. and Mombaerts, P.** (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* **117**, 817-31.
- Feldheim, D. A., Kim, Y. I., Bergemann, A. D., Frisen, J., Barbacid, M. and Flanagan, J. G.** (2000). Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* **25**, 563-74.
- Fishilevich, E. and Vosshall, L. B.** (2005). Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Curr Biol* **15**, 1548-53.
- Flanagan, J. G. and Vanderhaeghen, P.** (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* **21**, 309-45.
- Gable, K., Han, G., Monaghan, E., Bacikova, D., Natarajan, M., Williams, R. and Dunn, T. M.** (2002). Mutations in the yeast LCB1 and LCB2 genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* **277**, 10194-200.
- Gao, Q. and Chess, A.** (1999). Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics* **60**, 31-9.
- Gho, M., McDonald, K., Ganetzky, B. and Saxton, W. M.** (1992). Effects of kinesin mutations on neuronal functions. *Science* **258**, 313-6.
- Gingrich, J. R., Pelkey, K. A., Fam, S. R., Huang, Y., Petralia, R. S., Wenthold, R. J. and Salter, M. W.** (2004). Unique domain anchoring of Src to synaptic NMDA receptors via the mitochondrial protein NADH dehydrogenase subunit 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6237-42.
- Godenschwege, T. A., Hu, H., Shan-Crofts, X., Goodman, C. S. and Murphey, R. K.** (2002). Bi-directional signaling by Semaphorin 1a during central synapse formation in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **5**, 1294-301.
- Goldman, A. L., Van der Goes van Naters, W., Lessing, D., Warr, C. G. and Carlson, J. R.** (2005). Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron* **45**, 661-6.
- Golic, K. G. and Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Göllner, B.** (2007). Analyse von Kontrollmechanismen synaptischer Spezifität in *Drosophila*.: Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität.
- Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B. and Zheng, J. Q.** (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* **42**, 51-62.
- Halbleib, J. M. and Nelson, W. J.** (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* **20**, 3199-214.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788-92.

- Hallem, E. A., Ho, M. G. and Carlson, J. R.** (2004). The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* **117**, 965-79.
- Hanada, K.** (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1632**, 16-30.
- He, Z. and Tessier-Lavigne, M.** (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* **90**, 739-51.
- Hofmann, K. and Dixit, V. M.** (1998). Ceramide in apoptosis--does it really matter? *Trends Biochem Sci* **23**, 374-7.
- Howitt, J. A., Clout, N. J. and Hohenester, E.** (2004). Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *Embo J* **23**, 4406-12.
- Hummel, T., Vasconcelos, M. L., Clemens, J. C., Fishilevich, Y., Vosshall, L. B. and Zipursky, S. L.** (2003). Axonal targeting of olfactory receptor neurons in *Drosophila* is controlled by Dscam. *Neuron* **37**, 221-31.
- Hummel, T. and Zipursky, S. L.** (2004). Afferent induction of olfactory glomeruli requires N-cadherin. *Neuron* **42**, 77-88.
- Hurd, D. D. and Saxton, W. M.** (1996). Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 1075-85.
- Ibanez, C. F.** (2004). Lipid rafts as organizing platforms for cell chemotaxis and axon guidance. *Neuron* **42**, 3-5.
- Imai, T., Suzuki, M. and Sakano, H.** (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* **314**, 657-61.
- Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A. and Sakano, H.** (2001). Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes Cells* **6**, 71-8.
- Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D. and Strausfeld, N. J.** (1998). The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* **5**, 52-77.
- Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M. and Uemura, T.** (1997). Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the *Drosophila* embryonic CNS. *Neuron* **19**, 77-89.
- Janody, F., Lee, J. D., Jähren, N., Hazelett, D. J., Benlali, A., Miura, G. I., Draskovic, I. and Treisman, J. E.** (2004). A mosaic genetic screen reveals distinct roles for trithorax and polycomb group genes in *Drosophila* eye development. *Genetics* **166**, 187-200.
- Jefferis, G. S. and Hummel, T.** (2006). Wiring specificity in the olfactory system. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 50-65.
- Jefferis, G. S., Marin, E. C., Stocker, R. F. and Luo, L.** (2001). Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* **414**, 204-8.
- Jefferis, G. S., Marin, E. C., Watts, R. J. and Luo, L.** (2002). Development of neuronal connectivity in *Drosophila* antennal lobes and mushroom bodies. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 80-6.
- Jefferis, G. S., Vyas, R. M., Berdnik, D., Ramaekers, A., Stocker, R. F., Tanaka, N. K., Ito, K. and Luo, L.** (2004). Developmental origin of wiring specificity in the olfactory system of *Drosophila*. *Development* **131**, 117-30.

- Jhaveri, D., Saharan, S., Sen, A. and Rodrigues, V.** (2004). Positioning sensory terminals in the olfactory lobe of *Drosophila* by Robo signaling. *Development* **131**, 1903-12.
- Kalil, K. and Dent, E. W.** (2005). Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 521-6.
- Kamikouchi, A., Shimada, T. and Ito, K.** (2006). Comprehensive classification of the auditory sensory projections in the brain of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **499**, 317-56.
- Keleman, K. and Dickson, B. J.** (2001). Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* **32**, 605-17.
- Khare, N., Fascetti, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R. and Baumgartner, S.** (2000). Expression patterns of two new members of the Semaphorin family in *Drosophila* suggest early functions during embryogenesis. *Mech Dev* **91**, 393-7.
- Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* **96**, 785-94.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Tear, G.** (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**, 205-15.
- Kim, S., Chung, S., Yoon, J., Choi, K. W. and Yim, J.** (2006). Ectopic expression of Tollo/Toll-8 antagonizes Dpp signaling and induces cell sorting in the *Drosophila* wing. *Genesis* **44**, 541-9.
- Kisselev, L. L. and Buckingham, R. H.** (2000). Translational termination comes of age. *Trends Biochem Sci* **25**, 561-6.
- Knoll, B., Schmidt, H., Andrews, W., Guthrie, S., Pini, A., Sundaresan, V. and Drescher, U.** (2003). On the topographic targeting of basal vomeronasal axons through Slit-mediated chemorepulsion. *Development* **130**, 5073-82.
- Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J. and Ginty, D. D.** (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**, 753-62.
- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J. and Goodman, C. S.** (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* **75**, 1389-99.
- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87**, 197-204.
- Komiyama, T., Carlson, J. R. and Luo, L.** (2004). Olfactory receptor neuron axon targeting: intrinsic transcriptional control and hierarchical interactions. *Nat Neurosci* **7**, 819-25.
- Komiyama, T. and Luo, L.** (2007). Intrinsic control of precise dendritic targeting by an ensemble of transcription factors. *Curr Biol* **17**, 278-85.
- Krause, C., Wolf, C., Hemphala, J., Samakovlis, C. and Schuh, R.** (2006). Distinct functions of the leucine-rich repeat transmembrane proteins capricious and tartan in the *Drosophila* tracheal morphogenesis. *Dev Biol* **296**, 253-64.
- Kristiansen, L. V., Velasquez, E., Romani, S., Baars, S., Berezin, V., Bock, E., Hortsch, M. and Garcia-Alonso, L.** (2005). Genetic analysis of an overlapping functional requirement for L1- and NCAM-type proteins during sensory axon guidance in *Drosophila*. *Mol Cell Neurosci* **28**, 141-52.
- Kruger, R. P., Aurandt, J. and Guan, K. L.** (2005). Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 789-800.

- Kullander, K., Mather, N. K., Diella, F., Dottori, M., Boyd, A. W. and Klein, R.** (2001). Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron* **29**, 73-84.
- Laissue, P. P., Reiter, C., Hiesinger, P. R., Halter, S., Fischbach, K. F. and Stocker, R. F.** (1999). Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **405**, 543-52.
- Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H. and Vosshall, L. B.** (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* **43**, 703-14.
- Lattemann, M.** (2004). Genetische Untersuchung zur synaptischen Spezifität des olfaktorischen Systems von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität.
- Lattemann, M., Zierau, A., Schulte, C., Seidl, S., Kuhlmann, B. and Hummel, T.** (2007). Semaphorin-1a controls receptor neuron-specific axonal convergence in the primary olfactory center of *Drosophila*. *Neuron* **53**, 169-84.
- Lee, C. H., Herman, T., Clandinin, T. R., Lee, R. and Zipursky, S. L.** (2001). N-cadherin regulates target specificity in the *Drosophila* visual system. *Neuron* **30**, 437-50.
- Lee, R. C., Clandinin, T. R., Lee, C. H., Chen, P. L., Meinertzhagen, I. A. and Zipursky, S. L.** (2003). The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the *Drosophila* visual system. *Nat Neurosci* **6**, 557-63.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Lee, T. and Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-4.
- Li, H. S., Chen, J. H., Wu, W., Fagaly, T., Zhou, L., Yuan, W., Dupuis, S., Jiang, Z. H., Nash, W., Gick, C. et al.** (1999). Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* **96**, 807-18.
- Lin, D. M. and Goodman, C. S.** (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**, 507-23.
- Lin, D. M. and Ngai, J.** (1999). Development of the vertebrate main olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 74-8.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The genome of *drosophila melanogaster*. Academic Press.
- Littleton, J. T., Bellen, H. J. and Perin, M. S.** (1993). Expression of synaptotagmin in *Drosophila* reveals transport and localization of synaptic vesicles to the synapse. *Development* **118**, 1077-88.
- Marin, E. C., Watts, R. J., Tanaka, N. K., Ito, K. and Luo, L.** (2005). Developmentally programmed remodeling of the *Drosophila* olfactory circuit. *Development* **132**, 725-37.
- McCampbell, A., Truong, D., Broom, D. C., Allchorne, A., Gable, K., Cutler, R. G., Mattson, M. P., Woolf, C. J., Frosch, M. P., Harmon, J. M. et al.** (2005). Mutant SPTLC1 dominantly inhibits serine palmitoyltransferase activity in vivo and confers an age-dependent neuropathy. *Hum Mol Genet* **14**, 3507-21.
- Meadows, L. A., Gell, D., Broadie, K., Gould, A. P. and White, R. A.** (1994). The cell adhesion molecule, connectin, and the development of the *Drosophila* neuromuscular system. *J Cell Sci* **107** (Pt 1), 321-8.
- Meyer, F. and Aberle, H.** (2006). At the next stop sign turn right: the metalloprotease Tolloid-related 1 controls defasciculation of motor axons in *Drosophila*. *Development* **133**, 4035-44.

- Milchanowski, A. B., Henkenius, A. L., Narayanan, M., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2004). Identification and characterization of genes involved in embryonic crystal cell formation during *Drosophila* hematopoiesis. *Genetics* **168**, 325-39.
- Miyamichi, K., Serizawa, S., Kimura, H. M. and Sakano, H.** (2005). Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J Neurosci* **25**, 3586-92.
- Mombaerts, P.** (2001). How smell develops. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1192-8.
- Mombaerts, P.** (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* **5**, 263-78.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. and Axel, R.** (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675-86.
- Neuhaus, E. M., Gisselmann, G., Zhang, W., Dooley, R., Stortkuhl, K. and Hatt, H.** (2005). Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* **8**, 15-7.
- Neves, G., Zucker, J., Daly, M. and Chess, A.** (2004). Stochastic yet biased expression of multiple Dscam splice variants by individual cells. *Nat Genet* **36**, 240-6.
- Newsome, T. P., Asling, B. and Dickson, B. J.** (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* **127**, 851-60.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J. and Luo, L.** (2002a). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* **416**, 442-7.
- Ng, M., Roorda, R. D., Lima, S. Q., Zemelman, B. V., Morcillo, P. and Miesenbock, G.** (2002b). Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly. *Neuron* **36**, 463-74.
- Nose, A., Mahajan, V. B. and Goodman, C. S.** (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* **70**, 553-67.
- Nose, A., Umeda, T. and Takeichi, M.** (1997). Neuromuscular target recognition by a homophilic interaction of connectin cell adhesion molecules in *Drosophila*. *Development* **124**, 1433-41.
- Pasterkamp, R. J., Dai, H. N., Terman, J. R., Wahlin, K. J., Kim, B., Bregman, B. S., Popovich, P. G. and Kolodkin, A. L.** (2006). MICAL flavoprotein monooxygenases: expression during neural development and following spinal cord injuries in the rat. *Mol Cell Neurosci* **31**, 52-69.
- Pasterkamp, R. J. and Kolodkin, A. L.** (2003). Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 79-89.
- Perrimon, N., Engstrom, L. and Mahowald, A. P.** (1984). The effects of zygotic lethal mutations on female germ-line functions in *Drosophila*. *Dev Biol* **105**, 404-14.
- Polleux, F., Morrow, T. and Ghosh, A.** (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* **404**, 567-73.
- Puschel, A. W., Adams, R. H. and Betz, H.** (1995). Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* **14**, 941-8.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. J.** (2000). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* **103**, 1033-45.

- Raper, J. A.** (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 88-94.
- Ray, A., van Naters, W. G., Shiraiwa, T. and Carlson, J. R.** (2007). Mechanisms of odor receptor gene choice in *Drosophila*. *Neuron* **53**, 353-69.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L. and Buck, L. B.** (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* **73**, 597-609.
- Reuter, J. E., Nardine, T. M., Penton, A., Billuart, P., Scott, E. K., Usui, T., Uemura, T. and Luo, L.** (2003). A mosaic genetic screen for genes necessary for *Drosophila* mushroom body neuronal morphogenesis. *Development* **130**, 1203-13.
- Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K. and Eaton, S.** (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem* **274**, 12049-54.
- Rissone, A., Monopoli, M., Beltrame, M., Bussolino, F., Cotelli, F. and Arese, M.** (2007). Comparative genome analysis of the neurexin gene family in *Danio rerio*: insights into their functions and evolution. *Mol Biol Evol* **24**, 236-52.
- Rowen, L., Young, J., Birditt, B., Kaur, A., Madan, A., Philipps, D. L., Qin, S., Minx, P., Wilson, R. K., Hood, L. et al.** (2002). Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics* **79**, 587-97.
- Saraste, M.** (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**, 1488-93.
- Schaefer, M. L., Finger, T. E. and Restrepo, D.** (2001). Variability of position of the P2 glomerulus within a map of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* **436**, 351-62.
- Schmucker, D., Clemens, J. C., Shu, H., Worby, C. A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J. E. and Zipursky, S. L.** (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**, 671-84.
- Schmucker, D., Jackle, H. and Gaul, U.** (1997). Genetic analysis of the larval optic nerve projection in *Drosophila*. *Development* **124**, 937-48.
- Schulte, C. J.** (2005). Genetische Untersuchungen zur neuronalen Verschaltung im olfaktorischen System von *Drosophila*.: Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität.
- Schuster, J. M. and Nelson, P. S.** (2000). Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol* **67**, 767-73.
- Schwarting, G. A., Kostek, C., Ahmad, N., Dibble, C., Pays, L. and Puschel, A. W.** (2000). Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* **20**, 7691-7.
- Schwarting, G. A., Raitcheva, D., Crandall, J. E., Burkhardt, C. and Puschel, A. W.** (2004). Semaphorin 3A-mediated axon guidance regulates convergence and targeting of P2 odorant receptor axons. *Eur J Neurosci* **19**, 1800-10.
- Scott, K., Brady, R., Jr., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C. and Axel, R.** (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* **104**, 661-73.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D. and Goodman, C. S.** (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* **10**, 409-26.
- Seidl, S.** (2006). Identifikation und Charakterisierung präsynaptischer Faktoren der neuronalen Verschaltung im olfaktorischen System von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität.

- Senti, K. A., Usui, T., Boucke, K., Greber, U., Uemura, T. and Dickson, B. J.** (2003). Flamingo regulates R8 axon-axon and axon-target interactions in the *Drosophila* visual system. *Curr Biol* **13**, 828-32.
- Serizawa, S., Miyamichi, K. and Sakano, H.** (2004). One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet* **20**, 648-53.
- Serizawa, S., Miyamichi, K., Takeuchi, H., Yamagishi, Y., Suzuki, M. and Sakano, H.** (2006). A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* **127**, 1057-69.
- Shang, Y., Claridge-Chang, A., Sjulson, L., Pypaert, M. and Miesenbock, G.** (2007). Excitatory local circuits and their implications for olfactory processing in the fly antennal lobe. *Cell* **128**, 601-12.
- Shinza-Kameda, M., Takasu, E., Sakurai, K., Hayashi, S. and Nose, A.** (2006). Regulation of layer-specific targeting by reciprocal expression of a cell adhesion molecule, capricious. *Neuron* **49**, 205-13.
- Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (2000a). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* **103**, 1019-32.
- Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S.** (2000b). Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* **28**, 753-66.
- Sivan-Loukianova, E. and Eberl, D. F.** (2005). Synaptic ultrastructure of *Drosophila* Johnston's organ axon terminals as revealed by an enhancer trap. *J Comp Neurol* **491**, 46-55.
- Slack, C., Somers, W. G., Sousa-Nunes, R., Chia, W. and Overton, P. M.** (2006). A mosaic genetic screen for novel mutations affecting *Drosophila* neuroblast divisions. *BMC Genet* **7**, 33.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L. and DiMauro, S.** (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* **2**, 342-52.
- Solano, P. J., Mugat, B., Martin, D., Girard, F., Huibant, J. M., Ferraz, C., Jacq, B., Demaille, J. and Maschat, F.** (2003). Genome-wide identification of in vivo *Drosophila* Engrailed-binding DNA fragments and related target genes. *Development* **130**, 1243-54.
- Soltys, B. J. and Gupta, R. S.** (1999). Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported? *Trends Biochem Sci* **24**, 174-7.
- Soltys, B. J., Kang, D. and Gupta, R. S.** (2000). Localization of P32 protein (gC1q-R) in mitochondria and at specific extramitochondrial locations in normal tissues. *Histochem Cell Biol* **114**, 245-55.
- Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Queraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chedotal, A., Zalc, B. and Thomas, J. L.** (2002). Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci* **22**, 5992-6004.
- Speicher, S., Garcia-Alonso, L., Carmena, A., Martin-Bermudo, M. D., de la Escalera, S. and Jimenez, F.** (1998). Neurotactin functions in concert with other identified CAMs in growth cone guidance in *Drosophila*. *Neuron* **20**, 221-33.
- St Johnston, D.** (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **3**, 176-88.
- Stein, E. and Tessier-Lavigne, M.** (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-38.
- Stein, E., Zou, Y., Poo, M. and Tessier-Lavigne, M.** (2001). Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* **291**, 1976-82.

- Steinberg, M. S. and Takeichi, M.** (1994). Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 206-9.
- Stocker, R. F.** (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* **275**, 3-26.
- Stocker, R. F., Heimbeck, G., Gendre, N. and de Belle, J. S.** (1997). Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. *J Neurobiol* **32**, 443-56.
- Stortkuhl, K. F., Hofbauer, A., Keller, V., Gendre, N. and Stocker, R. F.** (1994). Analysis of immunocytochemical staining patterns in the antennal system of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* **275**, 27-38.
- Strotmann, J., Conzelmann, S., Beck, A., Feinstein, P., Breer, H. and Mombaerts, P.** (2000). Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* **20**, 6927-38.
- Sweeney, L. B., Couto, A., Chou, Y. H., Berdnik, D., Dickson, B. J., Luo, L. and Komiyama, T.** (2007). Temporal target restriction of olfactory receptor neurons by Semaphorin-1a/PlexinA-mediated axon-axon interactions. *Neuron* **53**, 185-200.
- Tabuchi, K. and Sudhof, T. C.** (2002). Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* **79**, 849-59.
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M. et al.** (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* **99**, 71-80.
- Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi, Y. K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K. and Shimizu, T.** (2003). Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J Neurosci* **23**, 1390-7.
- Terman, J. R., Mao, T., Pasterkamp, R. J., Yu, H. H. and Kolodkin, A. L.** (2002). MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**, 887-900.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-33.
- Ting, C. Y., Yonekura, S., Chung, P., Hsu, S. N., Robertson, H. M., Chiba, A. and Lee, C. H.** (2005). *Drosophila* N-cadherin functions in the first stage of the two-stage layer-selection process of R7 photoreceptor afferents. *Development* **132**, 953-63.
- Tissot, M., Gendre, N., Hawken, A., Stortkuhl, K. F. and Stocker, R. F.** (1997). Larval chemosensory projections and invasion of adult afferents in the antennal lobe of *Drosophila*. *J Neurobiol* **32**, 281-97.
- Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Suto, F., Kamei, J., Aoki, K., Yabuki, M., Hori, M., Fujisawa, H. et al.** (2004). Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev* **18**, 435-47.
- Treloar, H. B., Purcell, A. L. and Greer, C. A.** (1999). Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* **413**, 289-304.
- Vactor, D. V., Sink, H., Fambrough, D., Tsoo, R. and Goodman, C. S.** (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* **73**, 1137-53.
- Vassar, R., Ngai, J. and Axel, R.** (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* **74**, 309-18.

- Vedder, E.** (2006). Untersuchung präsynaptischer Faktoren der neuronalen Verschaltung von *Drosophila*: Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität.
- Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A. and Axel, R.** (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* **96**, 725-36.
- Vosshall, L. B., Wong, A. M. and Axel, R.** (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* **102**, 147-59.
- Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M. and Axel, R.** (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* **93**, 47-60.
- Wang, J., Ma, X., Yang, J. S., Zheng, X., Zugates, C. T., Lee, C. H. and Lee, T.** (2004). Transmembrane/juxtamembrane domain-dependent Dscam distribution and function during mushroom body neuronal morphogenesis. *Neuron* **43**, 663-72.
- Wang, J., Zugates, C. T., Liang, I. H., Lee, C. H. and Lee, T.** (2002). *Drosophila* Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron* **33**, 559-71.
- Wilson, R. I. and Laurent, G.** (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *J Neurosci* **25**, 9069-79.
- Winberg, M. L., Noordermeer, J. N., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Spriggs, M. K., Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1998). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **95**, 903-16.
- Wojtowicz, W. M., Flanagan, J. J., Millard, S. S., Zipursky, S. L. and Clemens, J. C.** (2004). Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* **118**, 619-33.
- Wong, A. M., Wang, J. W. and Axel, R.** (2002). Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell* **109**, 229-41.
- Xiao, T., Shoji, W., Zhou, W., Su, F. and Kuwada, J. Y.** (2003). Transmembrane sema4E guides branchiomotor axons to their targets in zebrafish. *J Neurosci* **23**, 4190-8.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Xu, X. M., Fisher, D. A., Zhou, L., White, F. A., Ng, S., Snider, W. D. and Luo, Y.** (2000). The transmembrane protein semaphorin 6A repels embryonic sympathetic axons. *J Neurosci* **20**, 2638-48.
- Yang, M. Y., Armstrong, J. D., Vilinsky, I., Strausfeld, N. J. and Kaiser, K.** (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* **15**, 45-54.
- Yasuda, S., Nishijima, M. and Hanada, K.** (2003). Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* **278**, 4176-83.
- Yonekura, S., Ting, C. Y., Neves, G., Hung, K., Hsu, S. N., Chiba, A., Chess, A. and Lee, C. H.** (2006). The variable transmembrane domain of *Drosophila* N-cadherin regulates adhesive activity. *Mol Cell Biol* **26**, 6598-608.
- Yu, H. H., Araj, H. H., Ralls, S. A. and Kolodkin, A. L.** (1998). The transmembrane Semaphorin Sema I is required in *Drosophila* for embryonic motor and CNS axon guidance. *Neuron* **20**, 207-20.
- Yu, H. H., Huang, A. S. and Kolodkin, A. L.** (2000). Semaphorin-1a acts in concert with the cell adhesion molecules fasciclin II and connectin to regulate axon fasciculation in *Drosophila*. *Genetics* **156**, 723-31.
- Yu, H. H. and Kolodkin, A. L.** (1999). Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* **22**, 11-4.

- Zeng, Z., Sharpe, C. R., Simons, J. P. and Gorecki, D. C.** (2006). The expression and alternative splicing of alpha-neurexins during *Xenopus* development. *Int J Dev Biol* **50**, 39-46.
- Zhan, X. L., Clemens, J. C., Neves, G., Hattori, D., Flanagan, J. J., Hummel, T., Vasconcelos, M. L., Chess, A. and Zipursky, S. L.** (2004). Analysis of Dscam diversity in regulating axon guidance in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* **43**, 673-86.
- Zhang, X., Rodriguez, I., Mombaerts, P. and Firestein, S.** (2004). Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. *Genomics* **83**, 802-11.
- Zhu, H., Hummel, T., Clemens, J. C., Berdnik, D., Zipursky, S. L. and Luo, L.** (2006). Dendritic patterning by Dscam and synaptic partner matching in the *Drosophila* antennal lobe. *Nat Neurosci* **9**, 349-55.
- Zhu, H. and Luo, L.** (2004). Diverse functions of N-cadherin in dendritic and axonal terminal arborization of olfactory projection neurons. *Neuron* **42**, 63-75.
- Zou, D. J., Feinstein, P., Rivers, A. L., Mathews, G. A., Kim, A., Greer, C. A., Mombaerts, P. and Firestein, S.** (2004). Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* **304**, 1976-9.
- Zou, Z., Horowitz, L. F., Montmayeur, J. P., Snapper, S. and Buck, L. B.** (2001). Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* **414**, 173-9.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

2L	linker Arm des zweiten Chromosoms
2R	rechter Arm des zweiten Chromosoms
7-TM-Domäne	7-Transmembran-Domäne
AAS	Augen-Antennen-Imaginalscheibe
AL	Antennaler Lobus
aN	antennaler Nerv
APF	‚after puparium formation‘ = nach Bildung des Pupariums
Ar	Arista
EMS	Ethylmethylsulfonat
kDa	kilo Dalton
LN	Lokales Interneuron
MARCM	‚mosaic analysis with a repressible cell marker‘
mN	maxillarer Nerv
NFL	‚nerve fiber layer‘ = Schicht aus Nervenfasern
OR	olfaktorischer Rezeptor
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
PN	Projektionsneuron
PNS	Peripheres Nervensystem
RT	Raumtemperatur
SC	Superior Colliculus
SOG	Suboesophagialganglion
Ü.N.	über Nacht
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 01: Verschaltungsmuster des olfaktorischen Systems der Vertebraten.
- Abb. 02: Schematische Übersicht über den Aufbau des olfaktorischen Systems von *Drosophila*.
- Abb. 03: Erzeugung homozygot mutanter Bereiche im Mosaik-Gewebe.
- Abb. 04: Innervationsmuster des ORN-Markers MM1 im Wildtyp.
- Abb. 05: Darstellung der kontralateralen Projektion.
- Abb. 06: Etablierung homozygot letaler Mutationen.
- Abb. 07: Kreuzungsschema zur Durchführung der phänotypischen Mutantanalyse.
- Abb. 08: Übersicht zur phänotypischen Klassifizierung I.
- Abb. 09: Übersicht zur phänotypischen Klassifizierung II.
- Abb. 10: Prozentuale Verteilung der analysierten Mutationen auf die phänotypischen Klassen.
- Abb. 11: Heterogenität und Expressivität mutanter Phänotypen.
- Abb. 12: Verlust der synaptischen Markierung einzelner ORN Klassen.
- Abb. 13: Unvollständige Innervation eines Glomerulus.
- Abb. 14: Fehlprojektion von ORN-Axonem.
- Abb. 15: Ektopische glomeruläre Strukturen.
- Abb. 16: Defekte in Form und Struktur eines Glomerulus.
- Abb. 17: Die Komplementationsgruppe *NCad*.
- Abb. 18: Projektionsdefekte von ORN-Axonem in *sema1a* Klonen.
- Abb. 19: Der Verlust der *sema1a* Funktion führt in antennalen ORN-Klassen zu unterschiedlichen Projektionsdefekten.
- Abb. 20: Der Verlust der *sema1a* Funktion in maxillaren ORN-Klassen (1).
- Abb. 21: Der Verlust der *sema1a* Funktion in maxillaren ORN-Klassen (2).
- Abb. 22: Konvergenzdefekte *sema1a* mutanter ORN47b Axone.
- Abb. 23: *sema1a* mutante ORN21a Axone konvergieren in einen neuen ektopischen Glomerulus.
- Abb. 24: SEMA1A Expression in den peripheren olfaktorischen Sinnesorganen.
- Abb. 25: Die Lokalisation des SEMA1A Proteins im *sema1a* mutanten Hintergrund.
- Abb. 26: Differentielle Expression von SEMA1A im antennalen Lobus.
- Abb. 27: Entwicklung des antero-lateralen Glomerulus-Komplexes in *sema1a* mutanten Fliegen.
- Abb. 28: Vergleich von *Minute*- und MARCM-Klonen.
- Abb. 29: Selektive Markierung wildtypischer und mutanter Axone im *sema1a* mutanten Klon.

- Abb. 30: Innervation verschiedener Glomeruli durch heterozygote PN-Dendriten und *sema1a* mutante ORNs (1).
- Abb. 31: Innervation verschiedener Glomeruli durch heterozygote PN-Dendriten und *sema1a* mutante ORNs (2).
- Abb. 32: Innervation ektopischer ORN21a und ORN47b Glomeruli durch LN-Dendriten.
- Abb. 33: Überexpression verschiedener UAS-*sema1a* Konstrukte mit *en*-Gal4 und 72OK-Gal4.
- Abb. 34: Darstellung einzelner ORN-Klassen nach Überexpression von SEMA1A (1).
- Abb. 35: Darstellung einzelner ORN-Klassen nach Überexpression von SEMA1A (2).
- Abb. 36: Genetische Interaktion von *plexinA* und *sema1a*.
- Abb. 37: Quantifizierung der Projektionsdefekte in *sema1a* und *plexA* heterozygoten Gehirnen.
- Abb. 38: Überexpression von PlexinA in der *en*-Domäne.
- Abb. 39: Projektionsdefekte *Dscam* mutanter ORN-Axone (1).
- Abb. 40: Projektionsdefekte *Dscam* mutanter ORN-Axone (2).
- Abb. 41: Vergleich der Penetranz von *Dscam*²¹ Verlust-Phänotypen in MARCM- und *Minute*-Klonen.
- Abb. 42: Projektionsdefekte *Dscam* mutanter ORN Axone (3).
- Abb. 43: Übersicht über die Lokalisation ektopischer Glomeruli in *Dscam* Mutanten.
- Abb. 44: Innervation *Dscam* mutanter ORN47b und ORN88a Axone.
- Abb. 45: Innervation *Dscam* mutanter ORN47a und ORN22a Axone.
- Abb. 46: Innervation *Dscam* mutanter ORN Axone der maxillaren ORN Klassen 71a, 46a und 59c.
- Abb. 47: Selektive Markierung homozygot *Dscam* mutanter und wildtypischer ORN Axone.
- Abb. 48: Projektionsdefekte verschiedener ORN Klassen in *Dscam* transheterozygoten Fliegen.
- Abb. 49: Dendritische Innervation ektopischer ORN47a Glomeruli durch PNs.
- Abb. 50: Analyse zur dendritischen Innervation ektopischer ORN47a Glomeruli.
- Abb. 51: Dendritische Innervation ektopischer ORN22a Glomeruli durch PNs.
- Abb. 52: Analyse zur dendritischen Innervation ektopischer ORN22a Glomeruli.
- Abb. 53: Dendritische Innervation ektopischer ORN47b Glomeruli durch PNs.
- Abb. 54: Analyse zur dendritischen Innervation ektopischer ORN47b Glomeruli.
- Abb. 55: Spezifität der ORN-PN-Erkennung in *Dscam* Mutanten (1).
- Abb. 56: Spezifität der ORN-PN-Erkennung in *Dscam* Mutanten (2).
- Abb. 57: Innervation ektopischer Glomeruli durch LN-Dendriten (1).
- Abb. 58: Innervation ektopischer Glomeruli durch LN-Dendriten (2).

- Abb. 59: Aufbau der durch die UAS-Konstrukte exprimierten Dscam Isoformen.
- Abb. 60: Überexpression von Dscam (1).
- Abb. 61: Überexpression von Dscam (2).
- Abb. 62: Pupale Entwicklung des *Dscam* Überexpressionsphänotyps.
- Abb. 63: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen des pupalen AL im Wildtyp.
- Abb. 64: Überexpression von Dscam in einzelnen ORN Axonen.
- Abb. 65: Expression unterschiedlicher Dscam Isoformen in *Sg18.1-Gal4*.
- Abb. 66: Reduktion der Dscam-Diversität durch Deletionen alternativer Exons.
- Abb. 67: Reduktion der Dscam-Diversität in Exon 4 (1).
- Abb. 68: Reduktion der Dscam-Diversität in Exon 4 (2).
- Abb. 69: Modell zur Entstehung des ORN21a und ORN47b Konvergenzdefekts in *sema1a* Mutanten.
- Abb. 70: *Dscam* vermittelte Inhibition axonaler Konvergenz während der ORN-Projektion.
- Abb. 71: Axonale Konvergenz im Zielgebiet.
- Abb. 72: Funktionen von *sema1a* und *Dscam* während der verschiedenen Entwicklungsschritte der ORN Verschaltung.

7.2 Analyse der Expressionsmuster der hier verwendeten Gal4-Aktivatorlinien *en-Gal4* und *con-Gal4*.

ORN-Klasse	Sensille	Glomerulus	<i>con</i> positiv	<i>en</i> positiv
ORN10a	ab1	DL1		
ORN13a	ai1	DC2		X
ORN19a/b	at3	DC1		X
ORN21a	ab1	V		
ORN22a/b	ab3	DM2	X	
ORN23a	at2	DA3	X	
ORN2a	at3	DA4l	X	
ORN33c/85e	pb2	VC1		X
ORN35a	ac1	VC3		
ORN42a	pb1	VM7	X	
ORN42b	ab1	DM1	(schwache Expression)	
ORN43a	at3	DA4m	X	X
ORN43b	ab8	VM2		X
ORN46a	pb2	VA7l/m		X
ORN47a	ab5	DM3		
ORN47b	at4	VA1v	X	
ORN49b	ab6	VA5		
ORN56a	ab4	DA2		X
ORN59b	ab2	DM4		
ORN59c	pb3	1		
ORN65a/b/c	at4	DL3	X	
ORN67a	ab10	DM6	X	
ORN67b	ab9	VA3	X	
ORN67c	ab7	VC4		
ORN67d	at1	DA1	X	
ORN69aA/B	ab9	D		
ORN71a	pb1	VC2	(schwache Expression)	X
ORN7a	ab4	DL5		X
ORN82a	ab5	VA6		X
ORN83c	at2	DC3		
ORN85a	ab2	DM5	X	
ORN85b (?)		VM5d	X	

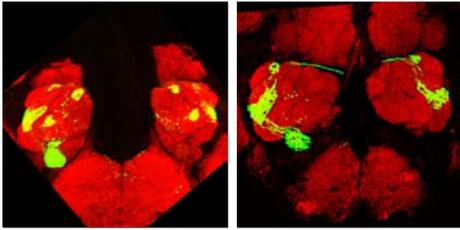
ORN85d	pb3	VA4	X	
ORN85f/49a	ab10	DL4	X	
ORN88a	at4	VA1d	X	
ORN92a	ab1	VA2	X	
ORN98a	ab7	VM5v		
ORN9a	ab8	VM3		X
		D		
		DP1m		X
		DC4		X
		DP1l		
		VM1		X
		VL2p		X
		DL2		
		VM4		
		VL1	X	
		VL2a		
		VM6		X

7.3

Übersicht über die identifizierten Mutationen, die zu ORN Verschaltungsdefekten führen

Mutante

A1-002

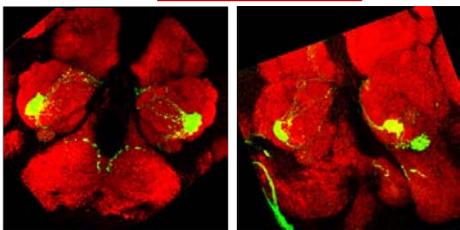


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

A1-004

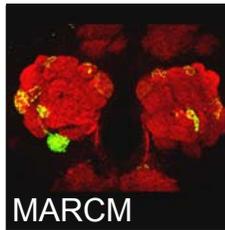
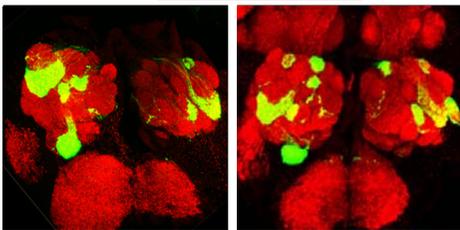


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

A1-005

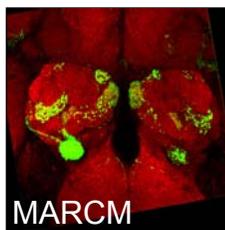
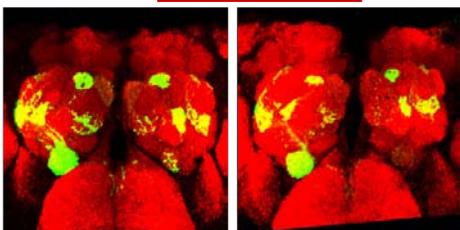


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

B1-031

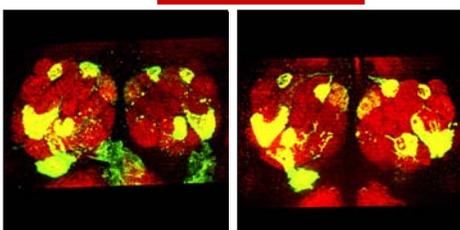


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

C1-010

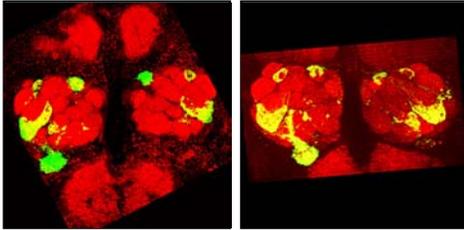


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

C1-012

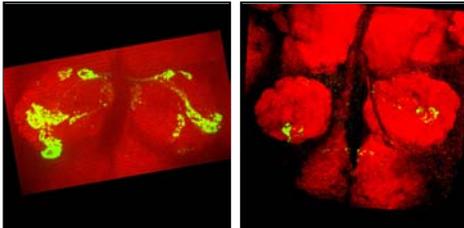


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

C1-014

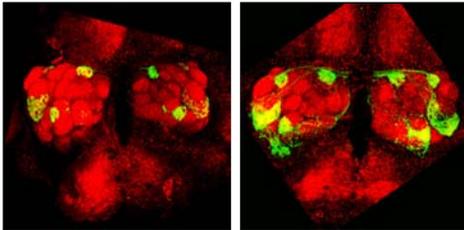


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

C1-020

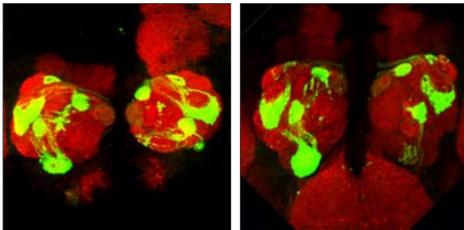


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

C1-024

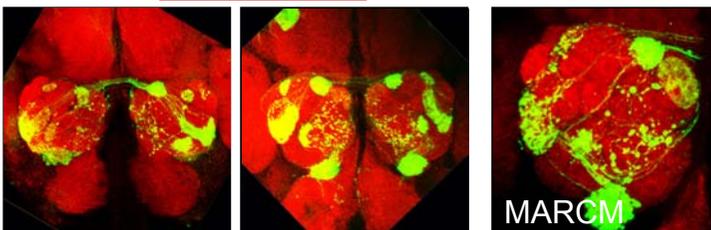


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

C1-055

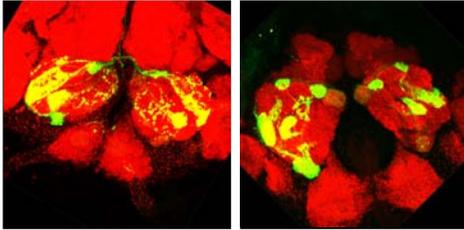


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

D1-007

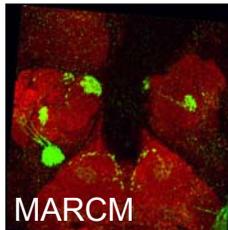
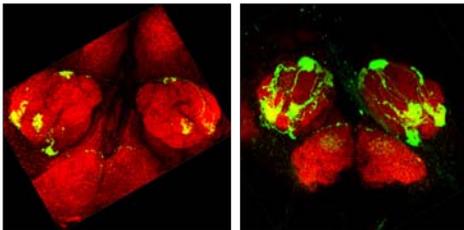


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

D1-011

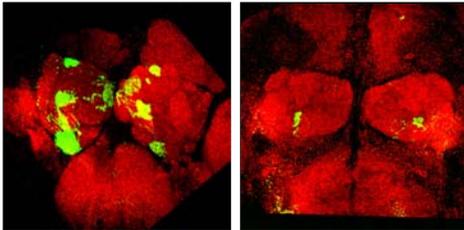


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

D1-013

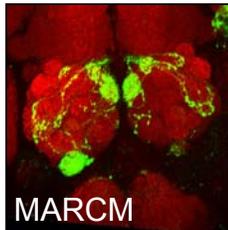
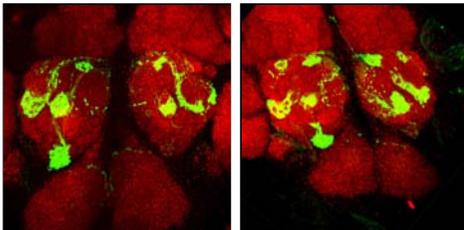


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

D1-016

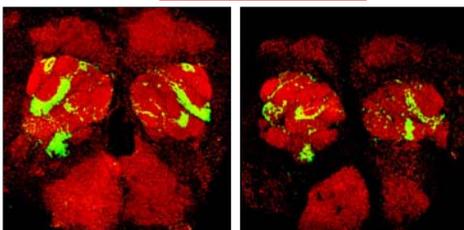


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

D1-030

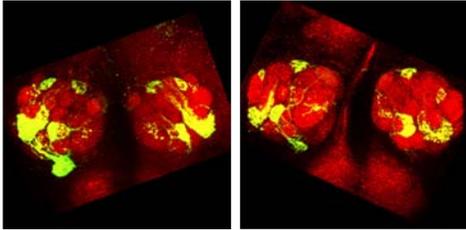


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

D1-031

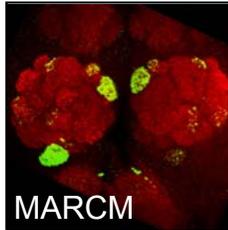
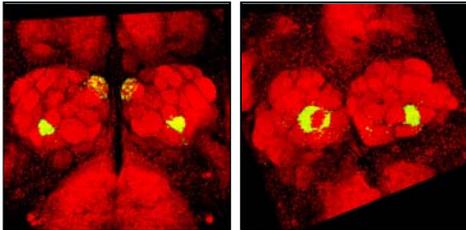


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

D1-040

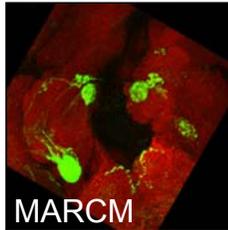
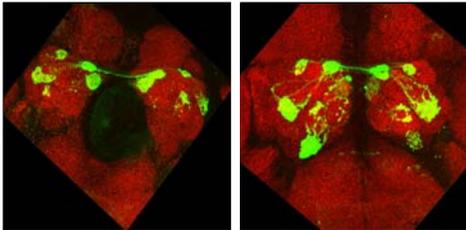


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

D1-044

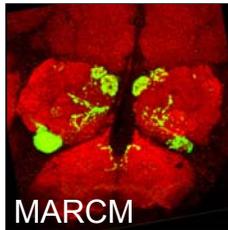
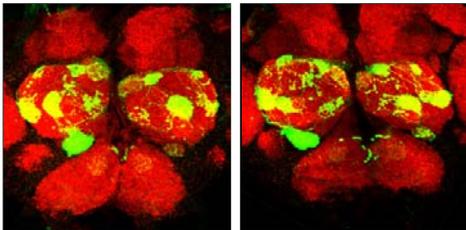


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

E1-001

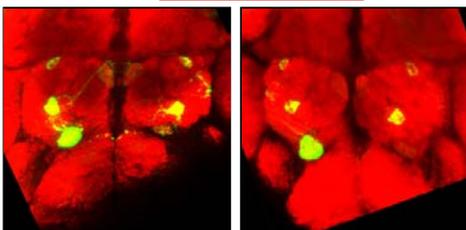


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

E1-013

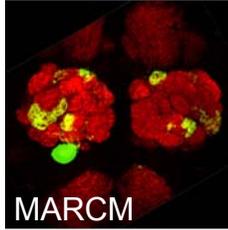
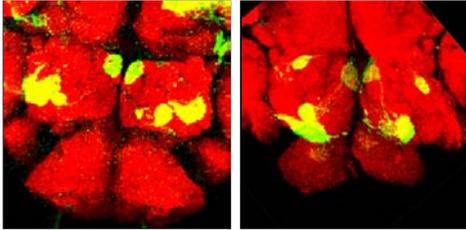


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

E1-034

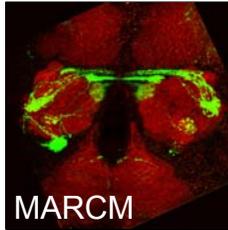
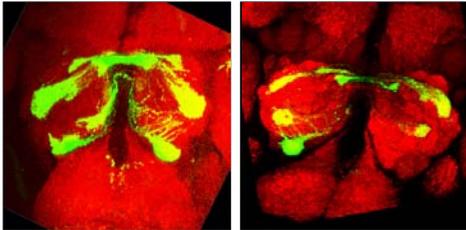


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

E2-023

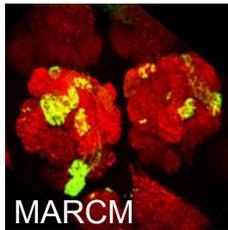
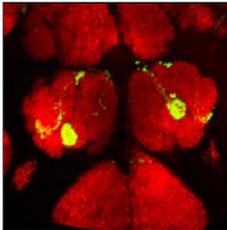


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Ncad-Phänotyp

Mutante

E2-028

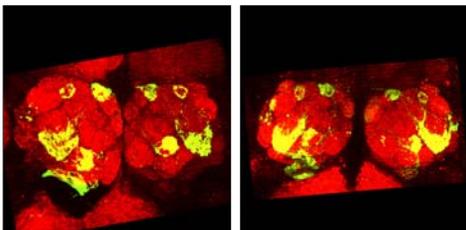


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

F1-020

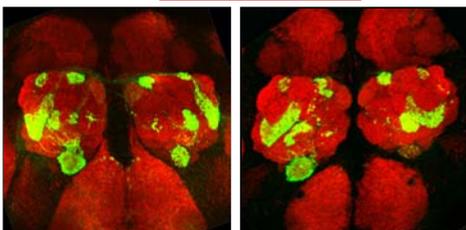


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

F1-025

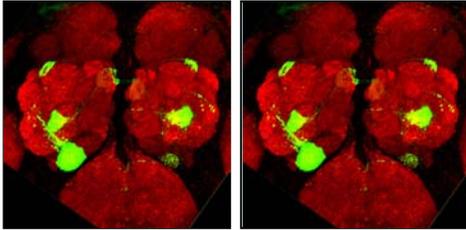


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

F2-012

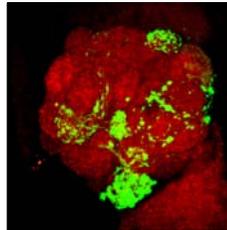
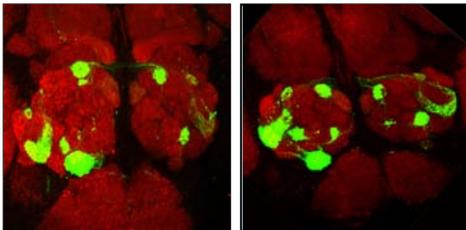


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

F2-021

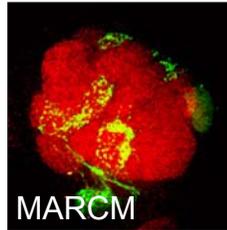
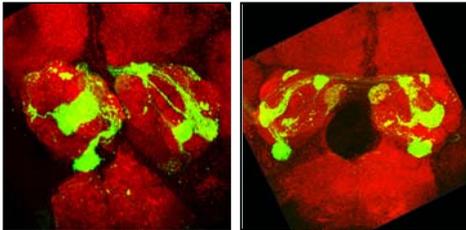


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

F2-022

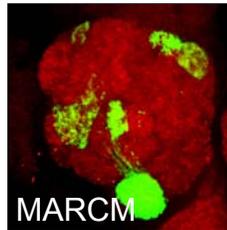
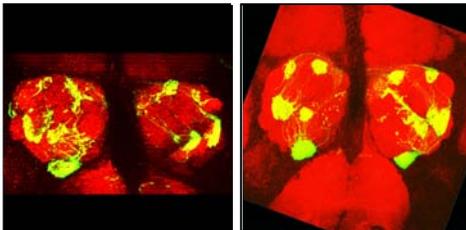


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

F2-042

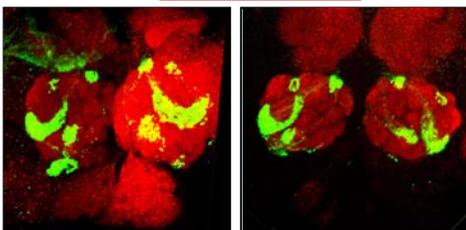


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

F2-074

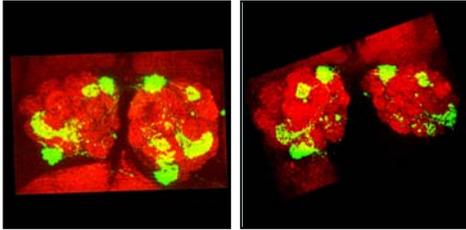


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

F2-084

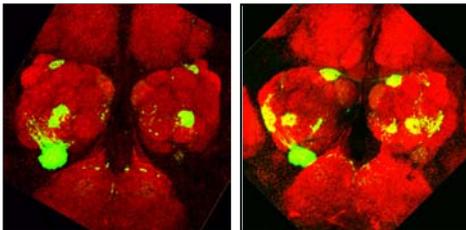


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

F2-085

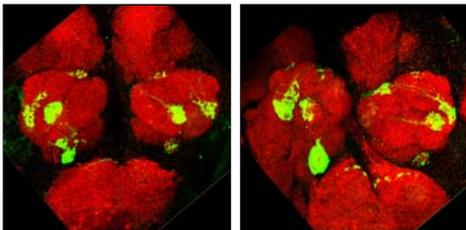


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

F2-096

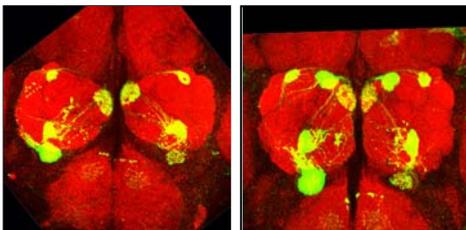


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

F2-113

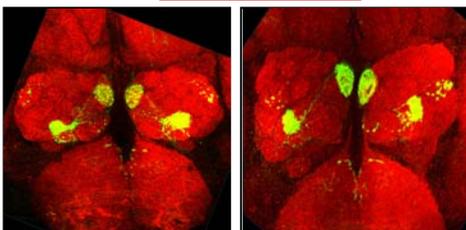


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

F2-116

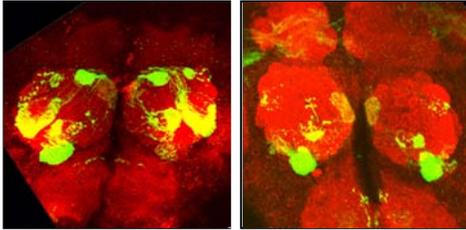


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

F2-123

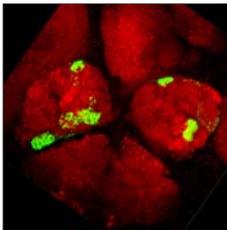


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

F2-125

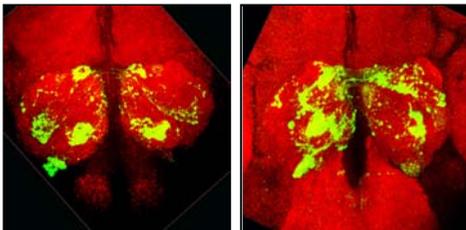


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

F2-129

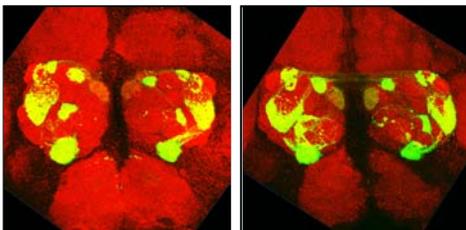


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

F2-130

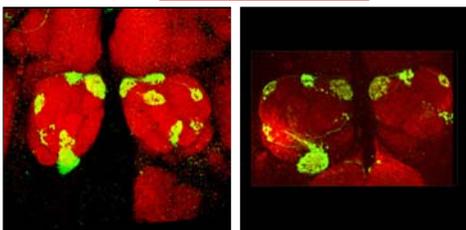


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

G1-002

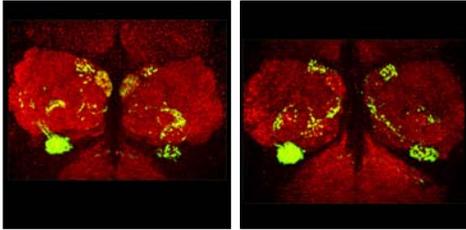


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

G1-040

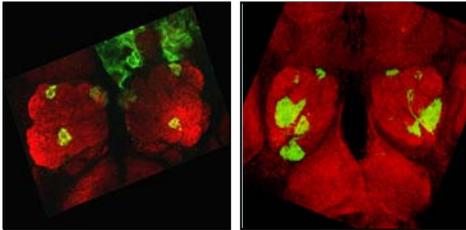


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

G1-060

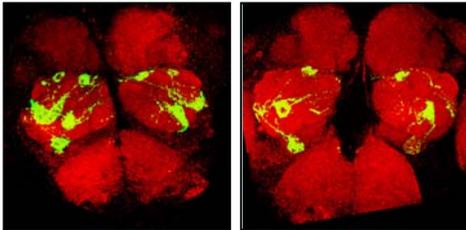


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

G2-034

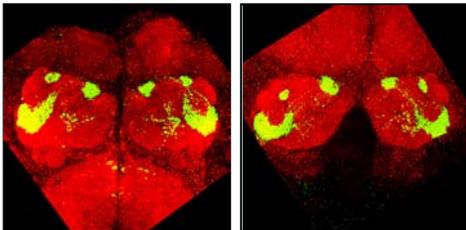


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

G2-036

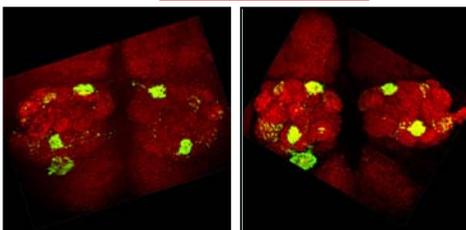


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

G2-037

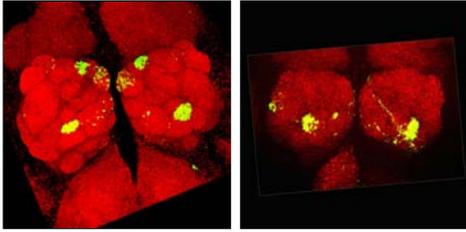


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

G2-072

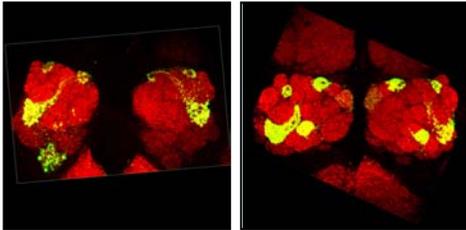


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

G2-073

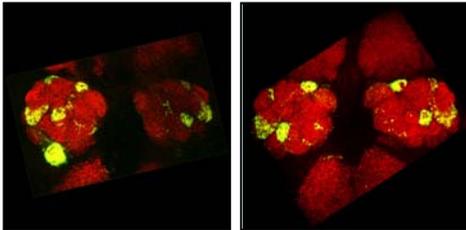


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

G2-101

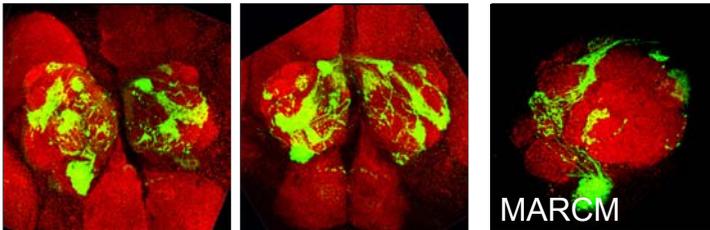


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

H1-002

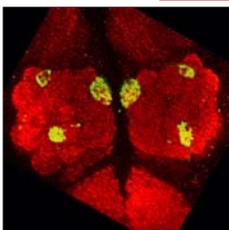


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

H1-004

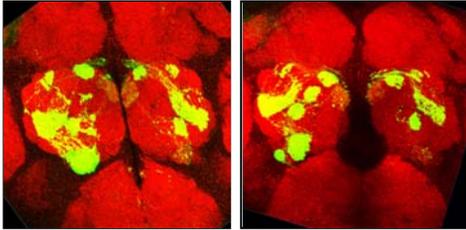


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

H1-006

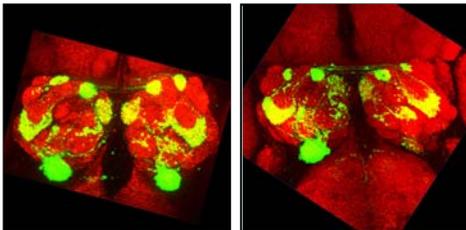


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

H1-013

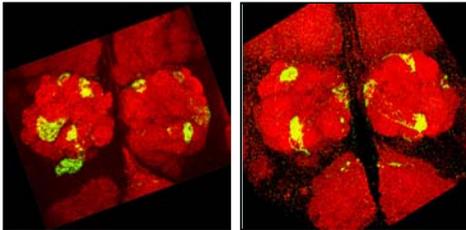


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

H1-037

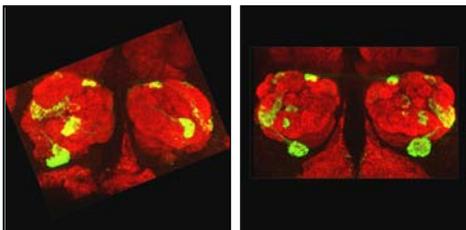


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

H1-038

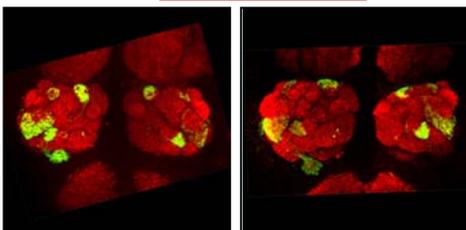


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

H1-039

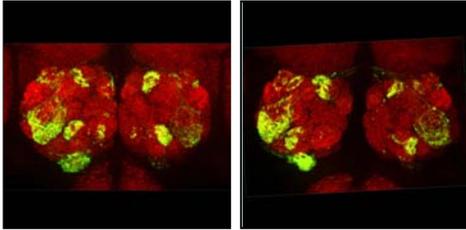


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

H1-040

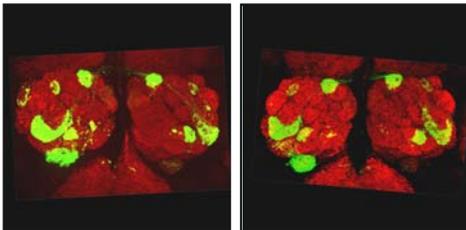


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

H1-044

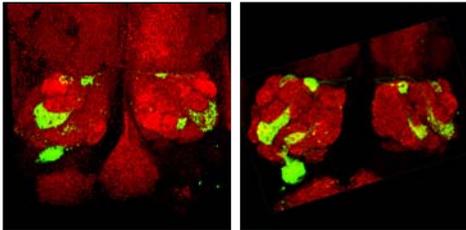


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

H1-045

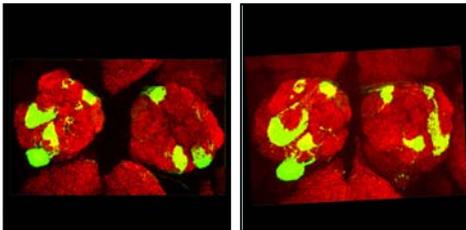


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

H1-046

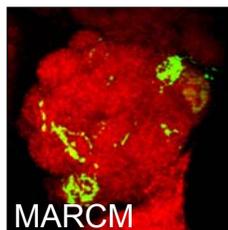
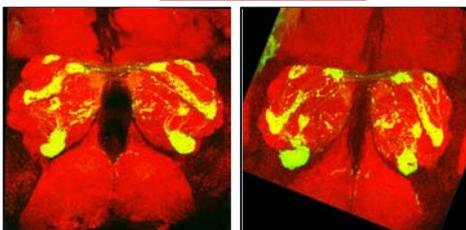


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

H1-056

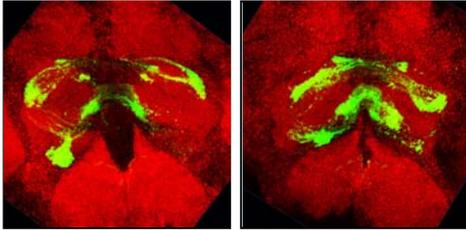


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

H2-096

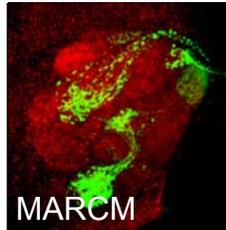
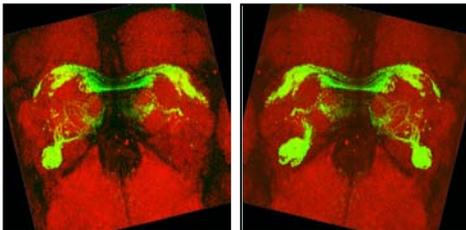


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Ncad-Phänotyp

Mutante

H2-115

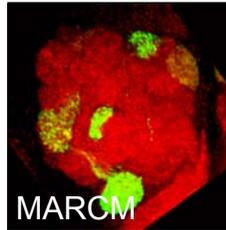
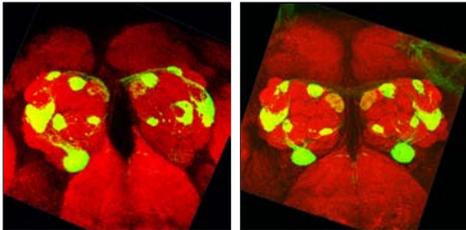


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Ncad-Phänotyp

Mutante

H2-126

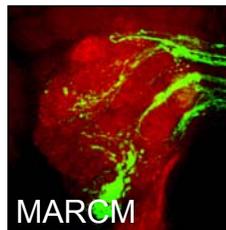
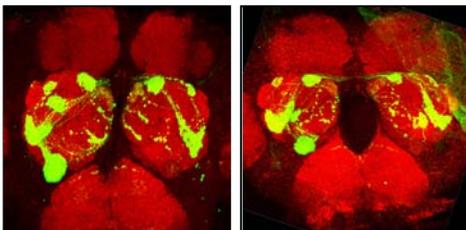


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

H2-134

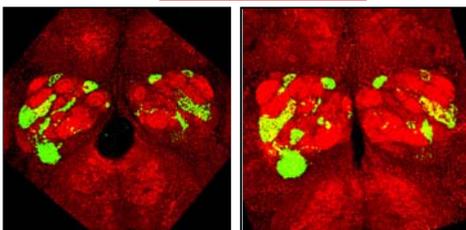


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

H2-180

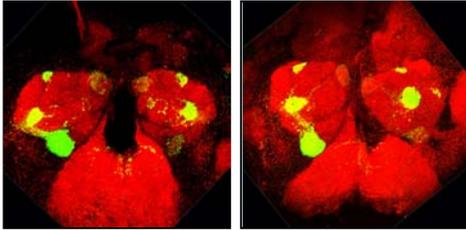


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

H2-195

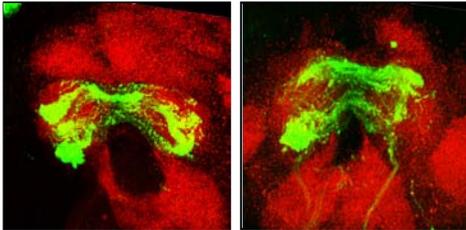


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

H2-237

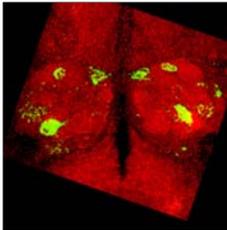


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Ncad-Phänotyp

Mutante

I1-031

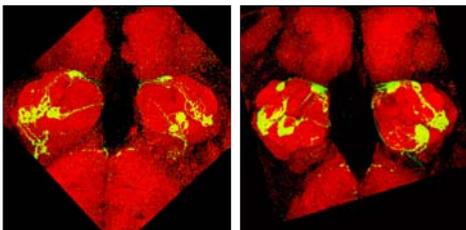


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

I1-051

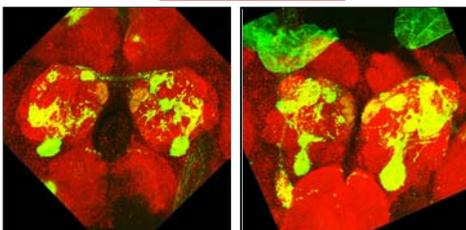


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

I1-070

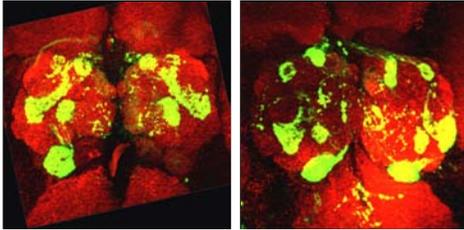


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

12-063

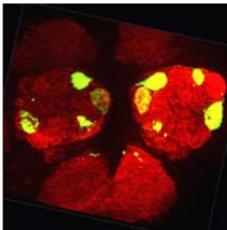


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

12-065

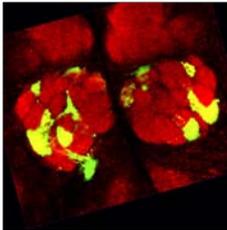


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

12-066

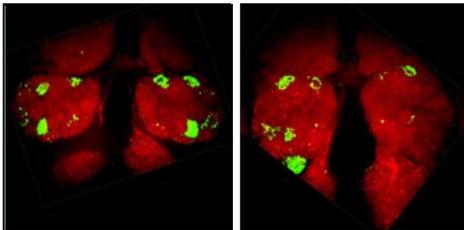


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

12-107

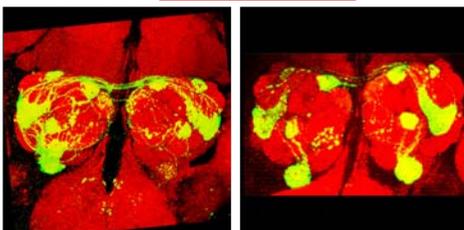


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

J1-024

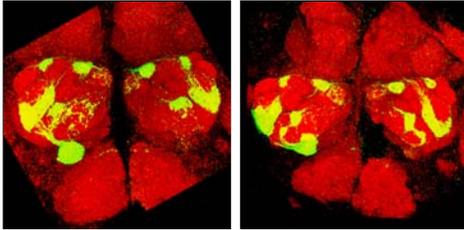


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

J1-049

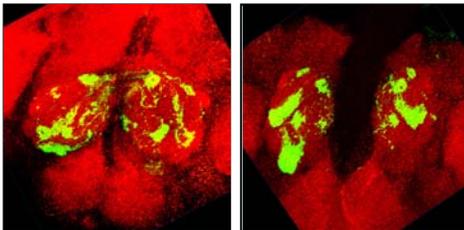


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

J1-059

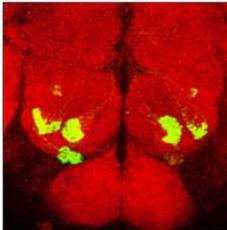


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

J1-076

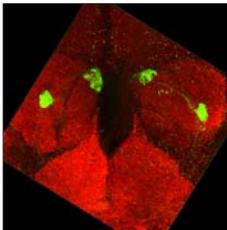


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

J2-038

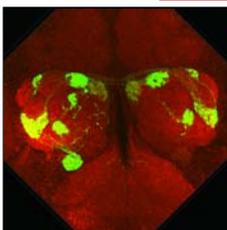


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

J2-064

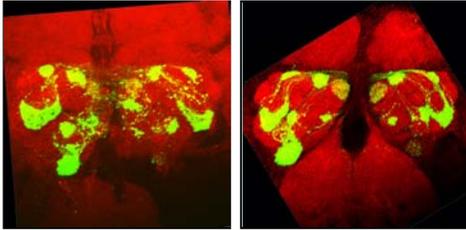


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

J2-071

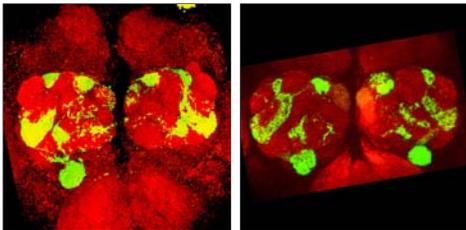


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

J2-072

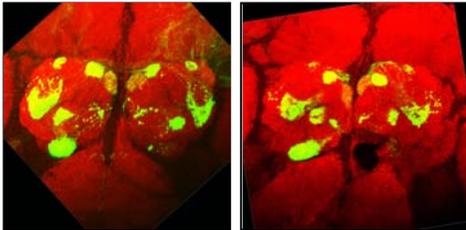


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

J2-075

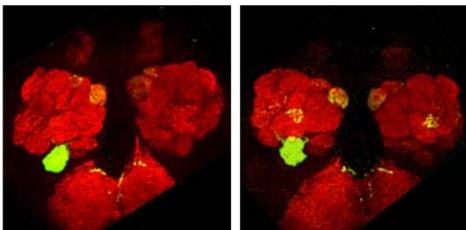


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

J3-003

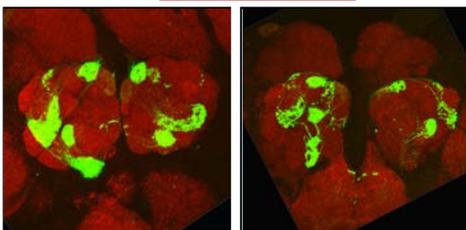


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

J3-023

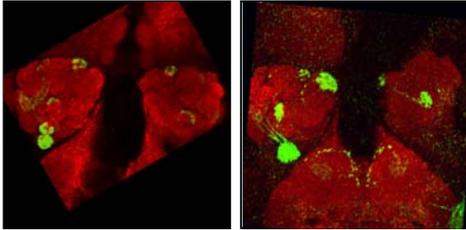


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

J3-044

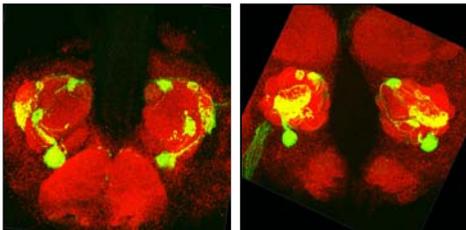


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

J3-047

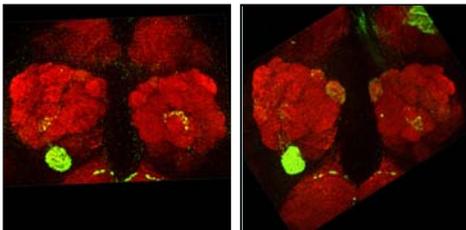


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

J3-066

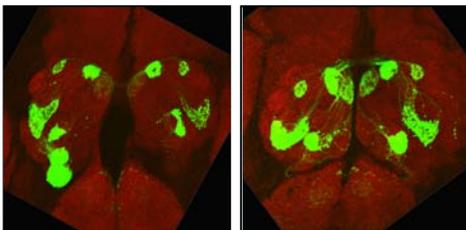


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

Verlust synaptischer
Markierungen

Mutante

K1-021

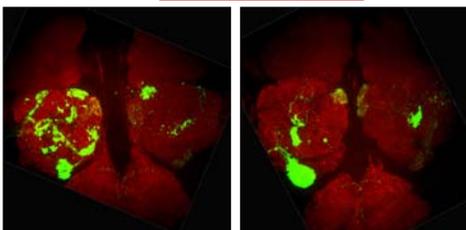


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

K1-070

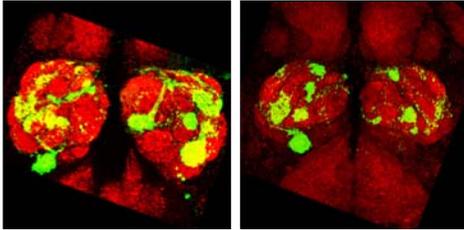


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

K2-073

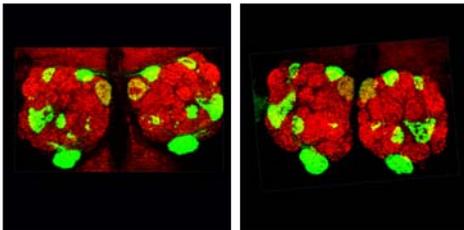


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

L1-020

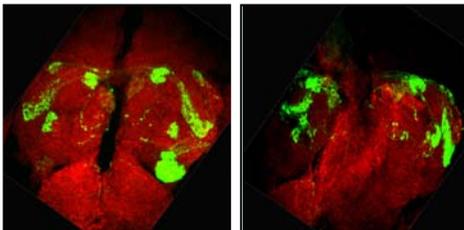


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

L1-063

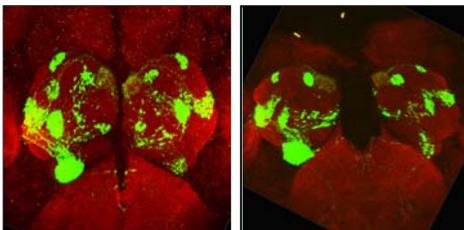


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

L2-004

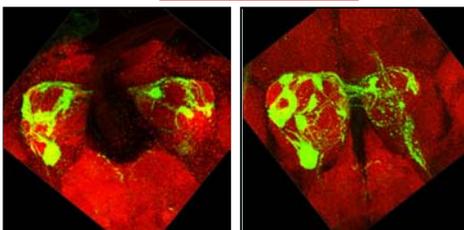


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

L2-026

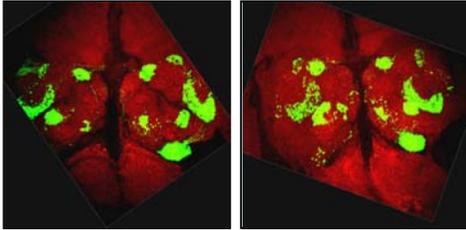


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

L2-033

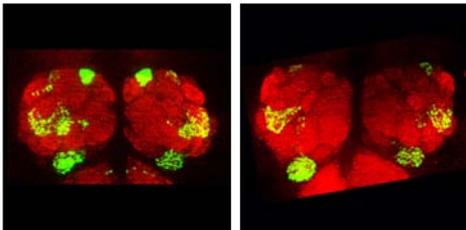


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

L2-039

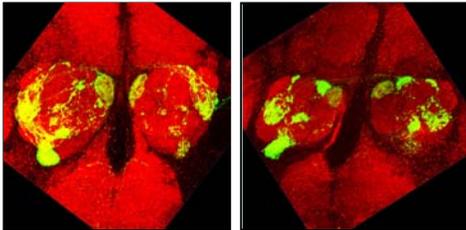


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

L2-080

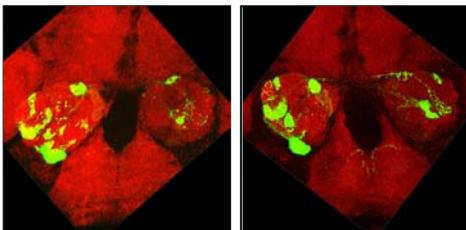


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

L2-081

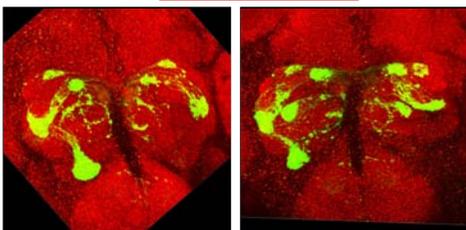


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

L2-105

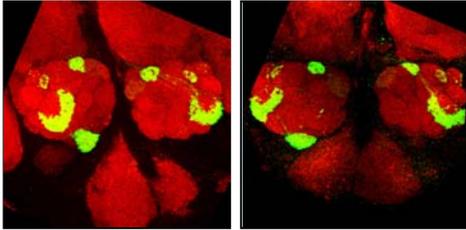


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

T1-036

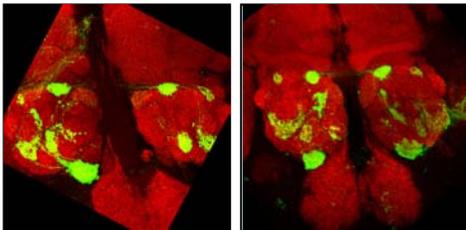


**Reduktion des
ORN-Projektionsmusters**

unvollständige Innervation
von Glomeruli

Mutante

T1-049

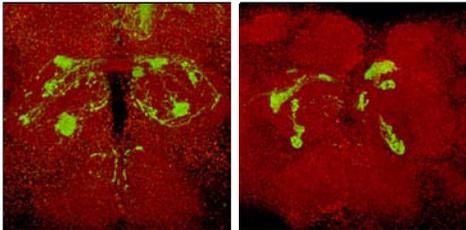


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

T3-022

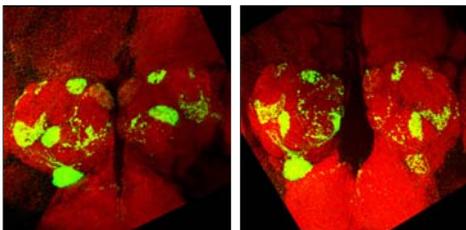


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

U1-016

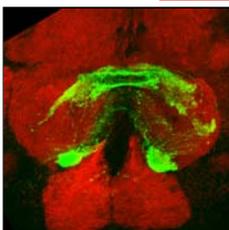


**Projektion in ektopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

U1-018

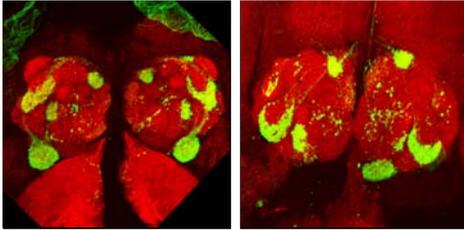


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Ncad-Phänotyp

Mutante

U1-032

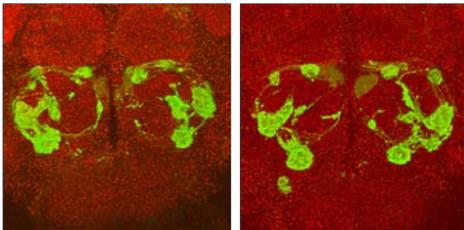


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Mutante

U2-017

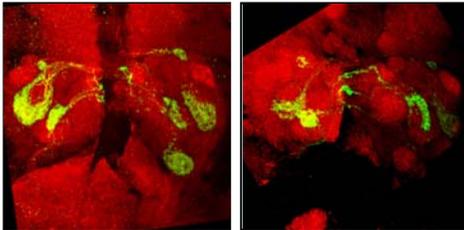


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

V1-019

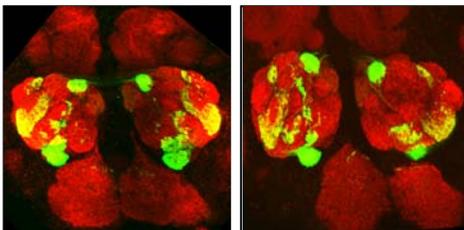


**Defekte in der
Glomerulus-Bildung**

Defekte in Form und
Struktur

Mutante

V2-013

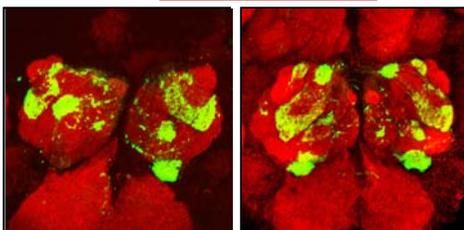


**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

ektopische glomeruläre
Strukturen

Mutante

W1-040



**Projektion in ectopische
AL-Regionen**

Fehlprojektion von ORN-
Axonen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Münster, den

