Karl-Friedrich Fischbach
und Claudia A. O. Stuermer

Weg- und Zielfindung wachsender Nervenfasern

im Sehsystem von Fliegen und Fischen

Der Vergleich der Weg- und Zielfindung von Sehfasern bei Fliegen und Fischen ist attraktiv, da die wachsenden Nervenfasern trotz der verschiedenen Augenformen möglicherweise vergleichbare Strategien verwenden. Es ist sogar möglich, daß die grundlegenden Mechanismen der Zellerkennung bereits so früh in der Evolution erworben wurden, daß homologe molekulare Komponenten bei Vertebraten und Invertebraten hieran beteiligt sind.

Nervensysteme zeichnen sich durch eine außerordentliche Genauigkeit in der Verbindung ihrer für bestimmte Funktionen spezialisierten Nervenzellgruppen aus. Ein weitverbreitetes Ordnungsprinzip sind topographische Verbindungen zwischen Zellgruppen verschiedener Hirngebiete. In Sehsystemen sind solche, hier retinotop genannte Verschaltungen besonders anschaulich. In Vertebraten z. B. ziehen die Axone der Retinaganglienzellen zu den oft weit entfernt gelegenen visuellen Zentren im Gehirn und endigen dort so, daß die relative Ordnung der Ursprungszellen auf der Ebene ihrer Axonendigungen im Zielgebiet widerspiegelt wird, oder anders ausgedrückt: die Position der Retinaganglienzellen ist entscheidend dafür, mit welchen Zellen des Zielgebietes die Axone Kontakte aufnehmen. So wird ein Bild der Umwelt über die Retina im ZNS abgebildet, und dieses Ordnungsgefüge bildet die Grundlage für visuomotorisch gesteuerte Verhaltensweisen.

Retinotop Projektionen sind nicht nur den Wirbeltieren, sondern ebenso den Wirbellosen zu eigen. Eine der zentralen Fragen, an deren Lösung die Entwicklungsneurobiologen seit vielen Jahrzehnten forschen, ist die, wie die auswachsenden Fortsätze neugebildeter Zellen, z. B. in der Retina, den Weg zu den ihnen als Ziel vorbestimmten Hirnarealen finden und wie sie dann in diesem Hirngebiet die ihrer positionellen Herkunft in der Retina entsprechenden Zielzellen erkennen. Geleistet wird diese Aufgabe der Weg- und Zielfindung von spezialisierten Strukturen an den Spitzen der wachsenden Axone, den Wach-

tumskegeln (*growth cones*). Diese *growth cones* sind äußerst mobile Elemente, die mit der zellulären und extrazellulären Umgebung wechselwirken und eine Differenzierungs- und Erkennungsfähigkeit besitzen.

Ordnung auf der Ebene der Axonendigungen könnte relativ einfach dadurch gewährleistet werden, daß die Axone in zeitlich und räumlich geordneter Folge auswachsen, ihre Nachbarschaftsbeziehungen entlang ihres Weges zum Zielgebiet aufrechterhalten und in definierter Reihenfolge Kontakte mit den Zielzellen erstellen [1–3]. Diesem Mechanismus, der die Bildung retinotoper Ordnung auf zeitlich und räumlich geordnete Entwicklungsprozesse zurückführt, kommt mit Sicherheit einige Bedeutung zu, denn die Raum-Zeit-Ordnung ist in der relativen Ordnung der Axone zueinander wiederzufinden. Wir wollen jedoch in diesem Artikel seine Unzulänglichkeit aufzeigen und auf die Bedeutung von spezifischer Zellerkennung hinweisen. Die Notwendigkeit spezifischer Erkennung wird besonders dann deutlich, wenn die Axone ihre Zielgebiete trotz einer Störung der zeitlichen und räumlichen Wachstumsordnung auffinden. Solche Störungen können entweder experimentell oder genetisch verursacht werden. Die kleine Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, das klassische Versuchsobjekt der Genetiker, ist hervorragend für den genetischen Ansatz geeignet, das Sehsystem der Fische eher für die experimentelle Manipulation. Die Sehnerven von Fischen wie Amphibien zeichnen sich zudem durch die Fähigkeit aus, nach ihrer operativen Durchtrennung zu regenerieren. Somit kann untersucht werden, ob und wie sich eine retinotop Projektion ohne die in der Embryonalentwicklung vorgegebene Raum-Zeit-Ordnung wiederherstellt.

Weg- und Zielfindung retinaler Ganglienzellaxone im Sehsystem der Fische

Die Sehbahnen der Fische sind gekreuzt (Abbildung 1). Die Axone der retinalen Gan-

glienzellen eines Auges ziehen über den optischen Nerven und Trakt zu ihrem Zielgebiet, dem kontralateralen Mittelhirndach (Tectum opticum) und endigen dort in spezifischen Schichten in retinotoper Ordnung.

Das retinotectale System der Fische diente seit den frühen Arbeiten Sperry's als klassisches Versuchsobjekt für die Klärung der Frage, wie retinotop organisierte Nervenzellverbindungen erstellt werden. Jedoch beschränken sich die Untersuchungen auf die Wiederherstellung dieser Projektion nach Verletzung des optischen Nerven. Die Embryonalentwicklung wurde vor weniger als einem Jahr aufgedeckt, und zwar im Zebrafisch [4].

Die Entwicklung der retinotectalen Verbindung

Zebrafischembryonen schlüpfen am 3. Tag nach der Befruchtung aus dem Ei. Gerade zu diesem Zeitpunkt, etwa ab der 70. Stunde nach der Befruchtung, haben die retinalen Axone ihre retinotopen Zielgebiete im Tectum opticum erreicht. Die ersten Axone, und es sind zunächst nicht mehr als zwei bis sechs, verlassen das Auge bereits in der 34. bis 36. Stunde nach der Befruchtung. Auf dem gesamten Weg zum Tectum, der ca. 300 µm beträgt, ziehen diese ersten Axone den nachfolgenden Axone stammen offenbar nicht von einer definierten Gruppe von Ganglienzellen, sondern es scheint mehr oder weniger zufällig zu sein, welche Axone zuerst auswachsen. Somit gibt es keine Hinweise auf Pioniere, die den Weg zum Tectum vorbereiten. Schon relativ bald wird erkennbar, daß sich die Axone entlang ihres Weges zum Tectum in definierter Ordnung zueinander befinden. Axone von der oberen (dorsalen) und unteren (ventralen) Retinahälfte ziehen dicht neben-, jedoch getrennt voneinander durch den optischen Trakt zum Tectum. Kurz vor dem Tectum trennen sie sich und treten über zwei Äste des Traktes in ihre korrekten tectalen Regionen, nämlich in die dorsale und ventrale Tectum-

Abb. 1. Retinotectale Projektion der Fische: Die Abkürzungen T, N, V, D, R und C geben die Positionen der Retinae (unten) und der beiden tectalen Hemisphären (oben) an. T = temporal, N = nasal, D = dorsal, V = ventral, R = rostral, C = caudal. Axone der ventralen Halbretna (blau) endigen im dorsalen Halbtectum (blau), die Axone der dorsalen Retina (braun) im ventralen Halbtectum (braun). Die tectale Zielregion der temporalen Axone ist das rostrale Halbtectum, die der nasalen Axone das caudale Halbtectum.

Abb. 2. Kristalle der fluoreszierenden Farbstoffe Di I (gelb) und Di O (grün) wurden in die dorsale und ventrale Hälfte der Retina eines 48 Stunden alten Embryos appliziert. Im Ganzpräparat des Gehirns dieses Embryos zur 72. Stunde wird deutlich, daß die gelben (dorsalen) und grünen (ventralen) Axone getrennt zu ihren retinotop korrekten Zielregionen in der ventralen und dorsalen Tectumhälfte ziehen und dort endigen. Abkürzungen wie in Abbildung 1. Maßstab 300 µm.

hälfte ein (Abbildung 2). Die Axone der vorderen (nasalen) und hinteren (temporalen) Retinahälfte, deren Zielgebiete das hintere (caudale) und vordere (rostrale) Tectum sind, werden zunächst ebenfalls getrennt, mischen sich aber kurz vor dem Tectum und laufen gemeinsam (in beiden Ästen des optischen Traktes) in das rostrale Tectum ein (Abbildung 3). Bis zur 56. Stunde nach der Befruchtung bleiben diese Axonpopulationen im vorderen Tectum zusammen. Dann jedoch dringen selektiv die nasalen Axone in ihr korrektes caudales Tectumterritorium vor, während die temporalen Axone sich an diesem Vormarsch nicht beteiligen und ausschließlich auf der vorderen Tectumhälfte verharren [4].

Wachsende Axone erkennen ihre retinotop Zielgebiete

Welche Mechanismen steuern nun die Besiedlung korrekter Territorien durch die retinalen Axone? Da die dorsalen und ventralen Axone bereits im Nerven vorsortiert sind und bis ins Tectum getrennt bleiben, wäre ihr Vorstoß in die entsprechenden oberen und unteren Tectumhälften beinahe ohne ordnungsgebende Wechselwirkung mit dem Tectum denkbar und vielleicht durch ihre Anordnung im Nerven und Trakt erklärbar. Anders ist dies für die temporalen und nasalen Axone, die bei Eintritt ins Tectum durchmischen, jedoch getrennte, nämlich die vordere bzw. hintere Tectumhälfte zu besiedeln haben. Es scheint, als besäße die caudale Tectumhälfte eine besondere Anziehungskraft für die nasalen Axone – und ebenso wohl die rostrale Tectumhälfte für die temporalen Axone. Dies wird durch experimentelle Eingriffe bestä-

tigt, in denen die temporale Retina (oder die nasale Retina) noch vor dem Zeitpunkt, an dem die Axone das Auge verlassen, chirurgisch entfernt wird. In diesen Experimenten wachsen die nasalen Axone über das freie rostrale Tectum hinweg, um selektiv ihre caudalen Tectumterritorien zu besiedeln. Das Umgekehrte gilt für die temporalen Axone in der Abwesenheit der nasalen Axone. Auch sie besiedeln ausschließlich ihre korrekten, nämlich die rostralen Tectumhälften, so daß die caudale Tectumhälfte schlicht leer bleibt. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Axone offenbar über die Fähigkeit verfügen, ihre spezifischen Zielregionen im Tectum zu erkennen und dort, und nur dort, zu endigen [4].

Weg- und Zielfindung regenerierender Axone

Schon 1963 entwickelte Sperry die Theorie, daß die Erkennung von Axonen und ihren Zielzellen durch spezifische Erkennungsmoleküle vermittelt würde. Seine Vorstellungen erlangte Sperry aus sehr eindrucksvollen Verhaltensexperimenten am Frosch. Wie eingangs erwähnt, besitzen die Sehfaseren von Amphibien und Fischen die Fähigkeit zu regenerieren und zum Tectum zurückzukehren, wenn der optische Nerv durchgeschnitten wird. Frösche, denen der optische Nerv durchtrennt und gleichzeitig das Auge um 180° verdreht wurde, zeigten ein abnormales, aber erklärbares Verhalten. Bietet man Fröschen eine Fliege im oberen Gesichtsfeld an, so springen die Tiere normalerweise nach oben in die Richtung der Beute. Tiere mit 180° verdrehten Augen und regenerierten Nervenver-

Abb. 3. Kristalle der fluoreszierenden Farbstoffe Di I (gelb) und Di O (grün) wurden in die temporale und nasale Hälfte der Retina eines 48 Stunden alten Embryos appliziert. Die Aufsicht auf das Gehirn dieses Embryos zur 72. Stunde zeigt, daß die gelben (temporalen) und grünen (nasalen) Axone vor ihrem Eintritt ins Tectum durchmischt sind. Die temporalen Axone endigen im rostralen Tectum, während die nasalen Axone zwischen den temporalen Axonen hindurch wachsen, ins caudale Tectum vordringen und dort endigen. Abkürzungen wie in Abbildung 1. Maßstab 150 μ m.

Abb. 4. Ein Frosch mit einem 180° gedrehten Auge und nach Regeneration der retinotectalen Projektion springt bei Darbietung einer Beute hinten oben fälschlicherweise nach vorne unten [aus 5].

Abb. 5. Diese Camera-lucida-Zeichnungen stellen den Weg einer kleinen Gruppe HRP-markierter Axone von der dorso-temporalen Retina in Ganzpräparaten des Tectum opticum dar. Die tectale Hemisphäre wurde aus präparativen Gründen von hinten her eingeschnitten, wodurch die caudale Hälfte zweizipfelig wird. Abkürzungen wie in Abbildung 1. Die Axone treten von vorne (rostral) ins Tectum ein. In a) sind die Wege und Endigungsorte normaler dorso-temporaler Axone dargestellt. Sie ziehen geordnet, geradlinig und beschränkt auf das retinotop korrekte ventrale Halbtectum zu ihren retinotop korrekten Zielorten (zwischen den Pfeilen) im rostralen Tectum. In b) werden die Wege regenerierender Axone gleiches retinalen Ursprungs veranschaulicht, 28 Tage nach einer Nervdurchtrennung. Anders als im Normaltier kreuzen die regenerierenden Axone durch alle Bereiche des Tectums und haben ihr Zielgebiet (zwischen den großen Pfeilen) noch nicht erreicht. Die kleinen Pfeile und der Pfeilkopf weisen auf einzelne Axone hin. Maßstab 1 mm.

bindungen springen jedoch auf einen solchen Reiz hin nach unten, also von der Beute weg (Abbildung 4). Dieses Verhalten läßt Schlüsse auf die Verteilung der regenerierten Axone im Tectum zu. Die regenerierten Axone sind offenbar an die Plätze zurückgekehrt, die sie ehemals im normalen Tier innehatten, d. h. sie suchen die ihrer Herkunft in der Retina

entsprechenden retinotopen Zielorte im Tectum auf, unabhängig von der aktuellen Position des Auges im Tier [5].

Wie regenerierende Axone zu ihren Zielorten im Tectum wachsen, ist jedoch komplexer als Sperry seinerzeit annahm. Sperry nämlich behauptete, daß die regenerierenden Axone entlang ihrer normalen Wege und ähnlich wie embryonale Axone geradlinig zu ihren retinotopen Endigungsstellen gelangen sollten [6]. Unsere Untersuchungen [7, 8] an Fischen haben aber gezeigt, daß die regenerierenden Axone dies nicht tun. Stattdessen wachsen sie nach einer Nervdurchtrennung von dem augennahen Stumpf völlig ungeordnet aus und erreichen das Tectum in zufälliger zeitlicher und völlig abnormaler räumlicher Ordnung zueinander. So treten die dorsalen und ven-

tralen Axone (statt wie im Normaltier getrennt) gemischt durch beide Äste des optischen Traktes ins Tectum ein, so daß fast die Hälfte der dorsalen und entsprechend der ventralen Axone sich in der falschen Tectumhälfte befinden. Darüber hinaus irren auch temporale Axone in die nicht retinotopen caudalen Tectumregionen (Abbildung 5b; 7).

Wie finden nun die irrlaufenden Axone ihre retinotopen Zielregionen? Eine Methode, die Zielfindung der wachsenden Axone zu entschlüsseln, beruht darin, die Wege von kleinen Gruppen von Axonen aus definierten Arealen in der Netzhaut zu verschiedenen Zeiten nach der Nervdurchtrennung durch

Abb. 6. Ein typischer *growth cone* an der Spitze eines regenerierenden Axons (28 Tage nach Nervdurchtrennung) aus dem Tectum. Maßstab: 10 µm.

Abb. 7. a) Wege regenerierender Axone von der dorsotemporalen Retina 1 Jahr nach der Durchtrennung des optischen Nerven. Die abnormalen Wege persistieren, jedoch haben die Axone Kurskorrekturen vorgenommen, streben in großen Bögen oder nach rechtwinkligen Kursänderungen gerichtet auf ihr Zielgebiet zu und endigen gedrängt in 3 Gruppen (sogenannten „clustern“) an retinotop korrekten Orten. Einige der abnormalen, jedoch zielgerichteten Wege aus a) sind in b) noch einmal verdeutlicht. Das Zielgebiet der Axone ist durch die gestrichelten Linien eingegrenzt. Abkürzungen wie in Abbildung 1. Maßstäbe a, b: 1 mm.

Färbung mit HRP (Meerrettichperoxidase) sichtbar zu machen. Angefärbt ist im Tectum dann eben nur diese kleine Gruppe von Axonen, von denen sich genau vorhersagen läßt, wo sie im Tectum endigen sollten (Abbildung 5a, b). Analysiert man in frühen Regenerationsstadien den Aufenthaltsort der Axonen, so zeigt sich, daß die Axone keineswegs ihre korrekten Zielterritorien aufgefunden haben. Stattdessen kreuzen sie auf abnormalen Wegen durch fast alle Bereiche des Tectums, und ihre Endigungen sind weit verteilt. Die Verzweigungen dieser Axone sind jedoch nicht die endgültigen Axonendbäume, wie sie später gebildet werden, wenn das Axon sein Ziel erreicht hat. Wachsende Axone besitzen in diesen frühen Phasen der Regeneration an ihren Spitzen *growth cones* und Filopodien, also die mobilen Elemente, die während des Wachstums des Axons mit der zellulären und extrazellulären Umgebung wechselwirken (Abbildung 6). Prinzipiell scheinen die regenerierenden Axone zwei Strategien zu benutzen, eine einfache und eine komplexe. Einige Axone nämlich, die nur von einem *growth cone* an ihrer Spitze geführt werden, biegen unvermittelt in rechtwinkligen oder in großen Bögen von ihren ursprünglichen Wachstumsrichtungen ab und wachsen dann gerichtet auf ihr Zielgebiet zu. Anderen Axonen scheint eine solche direkte Kurskorrektur und Zielannäherung nicht möglich zu sein. Sie senden Seitenäste wie Späher in alle Richtungen des Tectums aus. Diese Seitenäste besitzen eine Vielzahl von *growth cones* und Filopodien, mit denen die Axone ihre Umgebung explorieren.

Es ist bislang nicht möglich, das Verhalten der wachsenden Axone im lebenden Tier zu verfolgen. Von Beobachtungen an wachsenden Axonen in Zellkultur jedoch wissen wir, daß solche Äste, die sich in einer für sie günstigen Umgebung befinden, verlängert und andere Äste eingeschmolzen werden. Ähnlich verhalten sich vermutlich die weitverzweigten Axone im Tectum, indem sie zielorientierte Äste erhalten und verlängern und fehlgerichtete Äste verlieren. So nähern sich die Axone allmählich über einen Mechanismus der präferentiellen Selektion von Seitenästen ihrem Zielgebiet. Daß die Axone sich morphologisch verändern und Seitenäste abbauen, zeigen Präparationen von Tecta zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Regeneration (Abbildung 7). In solchen Stadien herrschen Axone vor, die von ektopischen Orten aus in großen oder kleinen Bögen auf ihr Zielgebiet hin gerichtet wachsen. Ihre Seitenäste sind

Abb. 8. Fluoreszenzmarkierte Axone von einem Explantat eines temporalen Retinasegmentes (zur Linken außerhalb des Bildes) wachsen auf einer Unterlage, die aus Membranen des Tectums bestehen. Diese Membranen stammen vom rostralen (R) und caudalen (C) Tectum und sind in alternierenden Streifen aufgetragen. Die Axone sammeln sich präferentiell auf den Membranen des rostralen Tectums, also auf den Membranen ihres retinotop korrekten Halbtectums. Maßstab 200 µm.

Abb. 9. Tangentialer Semidünnschnitt durch das Komplexauge von *Drosophila*. Die durch Pigmentgranula (P) optisch voneinander isolierten Facetten (Ommatidien) sind quer getroffen. Die Rhabdomere, die das Sehpigment enthaltenden Membranstapel der Lichtsinneszellen, sind blau angefärbt. Deutlich sichtbar sind die 6 äußeren Rhabdomere der Sehzellen R1–6 mit großem Querschnitt (1–6) und das dünnere, zentrale Rhabdomer, das in der Schnittebene von der Sehzelle R7 und tiefer im Auge von der Sehzelle R8 gebildet wird. Die Axone der zentralen Sehzellen projizieren retinotop bis in die Medulla, das zweite optische Ganglion (s. auch Abbildung 10). Maßstab 5 µm.

Abb. 10. Horizontaler, silbergefärbter Schnitt (Holmes-Blest-Methode) durch die optischen Ganglien von *Drosophila* zur Sichtbarmachung der Untergliederung der Medulla in Säulen und querverlaufende Schichten. X1 = erstes (äußeres) optisches Chiasma. X2 = zweites (inneres) optisches Chiasma. La = Lamina. Me = Medulla. Lp = Lobulaplatte. Lo = Lobula. Maßstab 10 µm.

weitestgehend verloren und sie werden nur noch von einem *growth cone* an ihren wachsenden Spitzen geführt. Zu einem noch weiter fortgeschrittenen Stadium in der Regeneration enden die Axone an ihren retinotopen Zielorten. Dann besitzen sie keinerlei Seitenäste und *growth cones* mehr und enden in einem für sie typischen Axonendbaum definierter Größe und Form.

Erkennung von positions-spezifischen Unterschieden tectaler Membranen in Zellkultur

Für die Erkennung zwischen Axonen und Zellen ihrer Zielregionen sprechen nicht zu-

letzt auch Experimente in Zellkultur [9]. In solchen Experimenten wird die Retina in schmale Streifen bekannter Orientierung und definierter Position zerlegt. Von solchen schmalen Streifen aus können retinale Ganglienzellaxone *in vitro* auswachsen. Von der rostralen und caudalen Tectumhälfte werden nun präparativ Zelloberflächenmembranen gewonnen und in alternierenden schmalen Bahnen den Axonen als Substrat geboten. Konfrontiert mit diesen Membranbahnen vom rostralen und caudalen Tectum zeigen Axone von Explantaten der temporalen Retina ein interessantes Verhalten. Sie sammeln sich nämlich alle auf den Membranen des rostralen Tectums, also auf den Membranen ihres retinotop korrekten Zielgebietes (Abbildung 8). Das zeigt deutlich, daß Axone Unterschiede zwischen Membranen aus verschiedenen Bereichen des Tectums erkennen können. Weiterhin zeigt dieses Experiment an, daß die relevante Positionsinformation offenbar mit den Komponenten der Oberflächen tectaler Zellen assoziiert ist.

Weg- und Zielfindung von Axonen im Sehsystem der Fliege

Das Sehsystem von Fliegen ist ein präzise gebauter Apparat zur Analyse der visuellen Umwelt. Abbildung 9 zeigt den Aufbau des Komplexauges aus praktisch identischen Untereinheiten, den sogenannten Ommatidien. Blau angefärbt sind die Rhabdomere, die lichtempfindlichen Membranstapel der peripheren Lichtsinneszellen R1–6 (mit großem Rhabdomerdurchmesser) und der Sehzellen R7 und R8. Letztere bauen gemeinsam das zentrale Rhabdomer mit kleinerem Durchmesser auf. In Abbildung 10 wird deutlich, daß die Axone der Lichtsinneszellen geordnet in den optischen Lobus, einen Teil des Gehirns, einwachsen. Auch die Untergliederungen, die Ganglien des optischen Lobus sind untereinander mit retinotop geordneten Faserbündeln verbunden.

Noch im letzten Jahrzehnt glaubte man, daß diese retinotop Organisation des optischen Lobus bei Invertebraten vollständig durch das zeitlich und räumlich geordnete Einwachsen der Rezeptoraxone aus dem Komplexauge erklärbar sei [10]. Untersuchungen an Strukturmutanten bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* haben inzwischen jedoch dazu beigetragen, diese Hypothese zu verwerfen. Denn die Wege, über die Axone in diesen Mutanten zu ihren Zielzellen gelangen, deuten daraufhin, daß Zellerkennungs-

mechanismen auch die Weg- und Zielfindung dieser Axone vermitteln.

Augenlose Fliegenmutanten

Die Maden der Fruchtfliege besitzen keine Komplexaugen. Diese entstehen als imaginale Struktur aus den Augenimaginalscheiben während der Metamorphose. Der optische Lobus wird auch erst in dieser Zeit gebildet. Seine Zellen werden durch die intensive Teilungsaktivität von Neuroblasten hergestellt, die sich seitlich an den larvalen Gehirnhemisphären befinden (Abbildung 11). Für diese Zellvermehrung des optischen Lobus ist eine Innervation vom Auge her nicht notwendig, wohl aber für ein Überleben der neu gebildeten Neurone. Dieses Wissen verdanken wir der Existenz augenloser Mutanten. Bei der Mutante *sine oculis* (lat. „ohne Augen“) lassen sich z. B. Individuen finden, die im dritten Larvenstadium keine Augenimaginalscheibe besitzen, folglich können auch keine Lichtsinneszellaxone in das Gehirn einwachsen. Das hat verheerende Folgen für die Entwicklung des optischen Lobus. Sehr viele Neurone sterben ab, da ihnen der normale sensorische Input vorenthalten bleibt [11]. So ist der optische Lobus in augenlosen Fliegen entsprechend verkleinert (Abbildung 12a). Dieses Rudiment ist jedoch nicht völlig chaotisch angeordnet. Geordnete Punkt-zu-Punkt-Verbindungen zwischen den noch ansprechbaren Untergliederungen des optischen Lobus (Medulla, Lobula und Lobulaplatte, s. Abbildung 10) lassen sich beispielsweise mit der Golgi-Methode nachweisen [12]. Diese Organisation kann nicht von der Peripherie aufgeprägt worden sein. Zur Erforschung der hier wirksamen organisatorischen Prinzipien hat das Studium von Strukturmutanten beigetragen, bei denen die Lichtsinneszellaxone der Komplexaugen zwar vorhanden sind, aber nicht in das Gehirn einwachsen, und die unser Augenmerk auf die Bedeutung des larvalen Sehsystems lenken.

Das Sehsystem der Larven ist der „Kristallisationskeim“ für das Sehsystem der Fliegen

Drosophila-Maden haben zwar kein Komplexauge, aber ein kleines larvales Sehorgan im Inneren des Körpers auf beiden Seiten des pharyngealen Skeletts. Die Axone dieser Sehzellen bilden den larvalen Sehnerv (Bolwigs Nerv). Dieser kontaktiert im Wildtyp bei seinem Weg ins Gehirn die Augenimaginalscheibe und induziert dort die Bildung des

optischen Stiels [13], durch den die Lichtsinneszellaxone des Komplexauges später ins Gehirn einwachsen (Abbildung 13). Interessanterweise besitzen alle Larven der oben erwähnten *sine oculis*-Mutanten, denen im Adultstadium das Komplexauge fehlt, dieses larvale Sehorgan und den dazugehörigen larvalen Sehnerv (Abbildung 14). Bei *sine oculis* finden die sich differenzierenden visuellen Interneurone also zumindest ein intaktes larvales Sehsystem vor. Anders ist das bei der Mutante *disconnected* (*disco*), bei welcher der larvale Sehnerv zwar vorhanden ist, aber falsch wächst und in vielen Fällen weder die Augenimaginalscheibe noch das Gehirn erreicht [13]. Hier muß sich der optische Lobus ohne die Grundlage eines intakten larvalen Sehsystems und ohne einwachsende imaginale Lichtsinneszellaxone entwickeln. Das Resultat ist wesentlich dramatischer als im Fall der augenlosen *sine oculis*-Mutante (s. Abbildung 12b). Praktisch alle Neurone des optischen Lobus degenerieren, so daß nur ein winziges Rudiment übrigbleibt, das im wesentlichen von Tangentialzellen gebildet wird, die auch in anderen Gehirnbereichen beträchtlich verzweigt sind und wohl deshalb überleben können.

Diese Befunde legen nahe, daß die Bedeutung des Bolwig-Nerven für die Entwicklung des imaginalen optischen Lobus sich nicht in der Herbeiführung der Axone der Rezeptorzellen aus dem Komplexauge erschöpft. Auch innerhalb des sich entwickelnden optischen Lobus kommt ihm eine organisatorische Aufgabe zu (Abbildung 14). In Kooperation mit G. M. Technau und S. Tix (Universität Köln) konnte in der Tat gezeigt werden, daß der Bolwig-Nerv auch als Wegbereiter für das Auswachsen imaginaler Interneurone dient. Zu dieser Einsicht verhalf eine besondere Technik: Nach Injektion des Enzyms Meerrettich-Peroxidase (HRP) in ein frühes, noch syncytiales Keimstadium bleibt HRP während der Entwicklung des Organismus nur in solchen Zellen hochkonzentriert, die ihre Teilungsaktivität früh eingestellt haben, sich also früh differenziert haben [14]. Solche Zellen können dann durch einen Aktivitätsnachweis für HRP sichtbar gemacht werden. Diese Methode stellt auch den Bolwig-Nerv dar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von U. Boschert (Universität Freiburg) haben ergeben, daß im optischen Lobus Axone von später gebildeten imaginalen Interneuronen entlang der Bahn des HRP-markierten Bolwig-Nerven auswachsen. Aber nicht nur der Bolwig-Nerv, sondern auch Interneurone des

Abb. 11. Rasterelektronenmikroskopisches Bild des ZNS (G. M. Technau) mit Augen-anlage (AA) einer *Drosophila*-Larve kurz vor der Verpuppung. GH = Gehirnhemisphäre, Z = Zapfen (Ventralganglion), SN = Segmentale Nerven. Maßstab 25 µm.

larvalen Sehsystems, die sogenannten OLP-Zellen, werden mit der HRP-Methode dargestellt [14]. Diese Zellen überdauern die Metamorphose. Im adulten Nervensystem der Fliege verlaufen ihre Axone im ersten optischen Chiasma. Sie könnten die Wegweiser für die Ausbildung dieses Chiasmas während des dritten Larvenstadiums und der Metamorphose sein [14].

Mutanten mit fehlgeleiteten Faserbündeln im Sehsystem

Gestützt wird die obige Annahme durch die Isolierung von Mutanten mit irregulären optischen Chiasmata [15]. Bei der *irreC*-Mutante verlaufen die Axone der OLP-Zellen nicht im 1. optischen Chiasma, sondern quer durch das Neuropil der Medulla [16]. Dieser Defekt hat offenbar zur Folge, daß die sich zuerst differenzierenden Axone – dies sind die Axone von den posterioren Zellen in Retina und Lamina – ihren normalen Weg durch das erste optische Chiasma nicht finden können ([15]; s. Abbildung 15a). Anstatt wie die später gebildeten medianen und anterioren Faserbündel den kürzesten Weg durch das Chiasma zu nehmen, laufen die posterioren Retina- und Laminafasern in großen Umwegen zu ihren retinotopischen Orten in der Medulla. Sie wachsen am hinteren Rand der Me-

dulla nach zentral, wenden sich dann aber zwischen innerer Medulla und Lobulaplatte nach vorne. Anschließend wachsen sie von zentral nach peripher durch das Medullaneuropil und gewinnen wieder Anschluß an die Fasertrakte des ersten optischen Chiasmas. Sie terminieren schließlich in der anterioren Medulla in ihren retinotopischen Positionen. Dort bilden sie ihre normalen und charakteristischen Endspezialisierungen aus. Dies bedeutet, daß die Retina- und Laminafasern trotz der abnormalen Wege ihre korrekten Zielgebiete finden. Ganz besonders aufschlußreich ist das Verhalten der in Abbildung 15b gezeigten, Golgi-imprägnierten Laminamonomopolarzelle vom Typ L3. Sie bildet in der ihr zukommenden Medullaschicht ihre charakteristischen Endverzweigungen aus, obwohl ihr Axon aus der „falschen“ Richtung in diese Schicht einwächst.

Dieses Verhalten kann nur so erklärt werden, daß die Axone ihr Zielgebiet erkennen und ihre Zielfindung somit unabhängig von der Richtung des Einwachsens ist. Hiermit in Übereinstimmung ist die Beobachtung, daß in Mutanten und selbst im normalen optischen Lobus ab und zu Axone angefärbt werden, die offenbar im ersten Anlauf ihre Zielzellen im Zielgebiet verfehlt haben, dann umkehren und es schließlich doch schaffen, in der richtigen Schicht ihre Endverzweigungen auszubilden (Abbildung 16). Dieses Verhalten erinnert an einen Ortsfremden, der eine bestimmte Hausnummer sucht. Er wird sich zunächst am Nummerngradienten ausrichten. Verpaßt er sein Ziel im ersten Anlauf, muß er umkehren. Bei Mutanten mit verringerter Zellzahl im optischen Lobus (Baulücken) ist

dieses Verhalten von Axonen vermutlich deshalb besonders häufig zu beobachten, weil die Wahrscheinlichkeit, nicht auf Anhieb den richtigen synaptischen Partner aufzufinden, erhöht ist.

Diskussion der Wegfindungsmechanismen und Vergleich der besprochenen Systeme

Wir haben die Bildung der Nervenverbindungen zwischen Retina und Gehirn bei Fliegen und Fischen vorgestellt. Typisch für beide Sehsysteme ist die retinotopische Organisation der Axonendigungen im Gehirn. Wie eingangs erwähnt, ist das Hauptmerkmal der Retinotopie, daß die Endigungen benachbarter Ganglienzellen wieder Nachbarn im Zielgebiet sind. Unsere Befunde haben gezeigt, daß räumliche Vorordnung zur Bildung retinotoper Ordnung im Zielgebiet nicht ausreicht. Die Herstellung der Retinotopie ist nicht daran gebunden, daß die Axone auf ihrem Weg zum Zielgebiet diese Nachbarschaftsbeziehungen aufrechterhalten. Tatsächlich zeigen die *irreC*-Mutanten bei *Drosophila* sowie Regenerationsexperimente bei Fischen, daß zunächst fehlgeleitete Axone ihr Zielgebiet trotzdem finden können. Die fehlgeleiteten Axone scheinen in beiden Fällen nicht zufällig und ziellos umherzuirren, sondern ab einem bestimmten Punkt gerichtet auf ihr Zielgebiet zuzuwachsen. Einmal am Ziel angekommen, und zwar nur dort, bilden die Axone ihre typischen Endverzweigungen. Zielfindung trotz abnormaler Wege wird erklärbar, wenn die wachsenden Axone fähig sind, die Positionsunterschiede der Zellen ihres Zielgebietes zu erkennen und mit den richtigen Zellen Kontakte aufzunehmen. Die vorliegenden Befunde bei Fliegen und Fischen sprechen dafür, daß die Erkennung zwischen den wachsenden Axonen und den Zellen des Zielgebietes über Zelloberflächenmoleküle vermittelt wird.

Solche Zelloberflächenmoleküle könnten theoretisch sehr spezifisch sein, und – wie Sperry [5] seinerzeit annahm – bestimmte Axone und deren Zielzellen individuell markieren. Etwa so, als seien die Axone ausgerüstet mit bestimmten Schlüsseln und deren Zielzellen mit den entsprechenden Schlössern. Jedem Axon käme somit die Aufgabe zu, ein zu ihm passendes Schloß aufzufinden. Ohne ein zusätzliches richtungsgebendes Ordnungsgefüge wären die Axone in einem solchen Modell jedoch gezwungen, nach Versuch und Irrtum durchs Zielgebiet zu kreu-

12a

Abb. 12. a) Größenvergleich des optischen Lobus beim Wildtyp (WT) mit dem einer augenlosen *sine-oculis*-Mutante (*so*). Die Größe des Zentralhirns (ZH) ist in *so* kaum verändert. Genetische Mosaikfliege (b) mit wildtypischem optischen Lobus rechts und dem *disconnected* (*disco*)-Phänotyp links. Auf der *disco*-Seite ist in dieser Schnittebene überhaupt kein Rudiment des optischen Lobus sichtbar. Maßstäbe 50 µm.

12b

Abb. 13. Mit Antikörper markierte Axone (G. M. Technau) aus der Augenimaginalscheibe (AA) im optischen Stiel (OS). Gut sichtbar ist der larvale Sehnerv (Bolwigs Nerv; BN), der auch durch den optischen Stiel in die Gehirnhemisphäre (GH) eintritt. Maßstab 20 µm.

13

Abb. 14. Der Einfluß von Bolwig-Nerv und Retinulazellaxonen auf die Entwicklung der optischen Loben: Bei einer wildtypischen Larve im dritten Stadium wird das Gehirn vom larvalen Sehnerv (Bolwigs Nerv) und von den Retinulazellaxonen des sich entwickelnden Komplexauges innerviert. Es resultiert ein normaler optischer Lobus in der Fliege (Imago). Bei vielen Larven der Mutante *sine oculis* wird das Gehirn nur vom larvalen Sehnerv innerviert, die imaginalen Augenanlagen degenerieren. Der hierdurch indirekt verursachte, nachfolgende Tod von Nervenzellen führt zu einer drastischen Größenreduktion des optischen Lobus in augenlosen Fliegen. In *disconnected*-Larven schließlich wird das Gehirn weder vom larvalen Sehnerv noch von den imaginalen Sehzellen innerviert. Im Vergleich zu *sine oculis* resultiert in *disconnected* eine noch wesentlich ausgeprägtere Größenreduktion des optischen Lobus.

zen, bis sie durch Zufall die zu ihnen passenden Zellen auffinden. Regenerierende Axone kreuzen zwar auf abnormalen, jedoch keinesfalls auf zufälligen Bahnen oder ziellos durchs Tectum [7, 8]. Im Gegenteil, selbst von völlig ektopischen Orten aus scheinen sie zielgerichtete Wege zu den weit entfernt liegenden Zielregionen erstellen zu können, was darauf hinweist, daß den wachsenden Axonen wegweisende Marker zur Verfügung stehen. Eine Wegweisung wäre gewährleistet, wenn solche Markermoleküle nicht lokalspezifisch sind, sondern systematisch und in gradierter Form, also in einem Konzentrationsgefälle über die Achsen des Tectums und der

14

15a

15b

Abb. 15. a) Silbergefärbter optischer Lobus der *irreC*-Mutante (Holmes-Blest-Methode, U. Boschert). Deutlich sichtbar ist ein fehlgeleitetes Axonbündel (Pfeilspitzen), das aus der hinteren Lamina austritt und nicht durch das 1. optische Chiasma in die vordere Medulla zieht, sondern einen elegant geschwungenen, weiten Umweg zu den retinotopischen Zielorten nimmt. Das Axon (b) einer Laminamonopolarzelle (L3; Golgi-Methode, U. Boschert) bildet in der ihm entsprechenden Tiefe der Medulla seine typische Endspezialisierung, obwohl es im ektopischen Bündel diesen Medullabereich aus der zum Normalfall entgegengesetzten Richtung erreicht hat. Das Komplexauge (Ka) wurde zur Lokalisierung der Golgi-Anfärbung lokal zerstört. Abkürzungen s. Abbildung 10. Maßstäbe 10 µm.

Abb. 16. Camera-lucida-Zeichnung des in der Lobula irregeleiteten Axons eines Säulen-neurons bei einer Gehirnmutante, bei der die Zellzahl im optischen Lobus reduziert ist. Das Axon stammt von einer Zelle des Typs TM1. Diese Zellen terminieren normalerweise in der vordersten Schicht der Lobula. Im vorliegenden Falle hat das Axon seine terminalen Spezialisierungen zunächst nicht ausgebildet und ist durch die Lobula hindurchgewachsen, um sich dann jedoch wieder rückwärts zu orientieren. Die nun in der vordersten Lobulaschicht ausgebildete Endverzweigung ist umfangreicher als im Normalfall. Interpretation s. Text. Abkürzungen s. Abbildung 10. Maßstab 10 µm.

16

Retina verteilt wären [17]. Dazu würden für jede Hauptachse der Retina und des Tectums zwei verschiedene Moleküle (also acht insgesamt) ausreichen, die in gegenläufigen Gradientenkonzentrationen ausgebildet sein sollten, um die Axone und ihre Zielzellen zu markieren. In diesem Modell sollte jedes Axon an beliebigen Orten seine aktuelle Position wahrnehmen und die Richtung zum Zielgebiet ermitteln können [17].

Obwohl die Entstehung des Nervensystems zur Zeit auch beim Zebrafisch zunehmend mit Hilfe der Mutantenanalyse untersucht wird, ist absehbar, daß Gene für Positionscodierungsproteine zuerst bei *Drosophila* kloniert werden. Einige wenige Zelloberflächenmoleküle, die eine Rolle bei der axonalen Wegfindung im frühen Embryo spielen, sind von der Arbeitsgruppe Goodman bei Insekten bereits nachgewiesen und die entsprechenden Gene identifiziert worden [18, 19]. Dies läßt hoffen, daß das auch für das visuelle System gelingen wird. Da wachsende Axone der Vertebraten in vitro auf positionsabhängige Unterschiede von Zelloberflächenmembranen reagieren, ist es wahrscheinlich, daß auch hier Oberflächenmoleküle im Spiel sind. Gibt es Homologie zwischen den entsprechenden molekularen Systemen, könnten die *Drosophila*-Gene als Sonden für die Klonierung der Vertebratengene eingesetzt werden.

Literatur

- [1] V. A. Lopresti, E. R. Macagno, C. Levinthal (1973) Structure and development of neural connections in isogenic organisms. *PNAS* 70, 433–437.
- [2] M. Bate (1978) in: *Development of Sensory Systems*. Ed. M. Jacobsen. Springer Verlag, Berlin.
- [3] N. Bodick and C. Levingthal (1980) Growing optic nerve fibres follow neighbors during embryogenesis. *PNAS* 77, 4374–4378.
- [4] C. A. O. Stuermer (1988a) Path- and homefinding of regenerating retinal axons in goldfish. In: *Post-lesion neural plasticity*. Ed. H. Flohr, Springer Verlag, Berlin. *Neuroscience* 8, 4513–4530.
- [5] R. W. Sperry (1956) The eye and the brain. *Sci. Am.* 194, 48–52.
- [6] D. G. Attardi und R. W. Sperry (1964) Preferential selection of central pathways by regenerating optic fibers. *Exp. Neurol.* 7, 46–64.
- [7] C. A. O. Stuermer (1988b) The trajectories of regenerating retinal axons in the goldfish. I. A comparison of normal and regenerated axons at late regeneration stages. *J. Comp. Neurol.* 267, 55–68.
- [8] C. A. O. Stuermer (1988c) The trajectories of regenerating retinal axons in the goldfish. II. Exploratory branches and growth cones on axons at early regeneration stages. *J. Comp. Neurol.* 267, 69–91.
- [9] J. Vielmetter und C. A. O. Stuermer (1989) Goldfish retinal axons respond to position-specific properties of tectal cell membranes in vitro. *Neuron* 2, 1331–1339.
- [10] I. A. Meinertzhagen (1973) Development of the compound eye and optic lobe of insects. In: *Developmental Neurobiology of Arthropods*. Ed. D. Young, Cambridge University Press.
- [11] K. F. Fischbach und G. Technau (1984) Cell degeneration in the developing optic lobes of the sine oculis and small optic lobes mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 104, 219–239.
- [12] K. F. Fischbach (1983) Neural cell types surviving congenital sensory deprivation in the optic tract of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 95, 1–18.
- [13] H. Steller, K. F. Fischbach und G. M. Rubin (1987) Disconnected: A locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila*. *Cell* 50, 1139–1153.
- [14] S. Tix, J. S. Minden und G. M. Technau (1989) Pre-existing neuronal pathways in the developing optic lobes of *Drosophila*. *Development*, im Druck.
- [15] U. Boschert und K. F. Fischbach (1987) Mutants with irregular optic chiasms in *Drosophila melanogaster*. In: *New Frontiers in Brain Research*. Eds.: N. Elsner, O. Creutzfeld. Thieme Verlag, Stuttgart.
- [16] U. Boschert, S. Tix, G. M. Technau, R. J. Jäger, R. G. P. Ramos und K. F. Fischbach (1989) Genetic and developmental analysis of *irreC*, a *Drosophila* gene required for optic chiasm formation. *J. Neurogenetics*, eingereicht.
- [17] A. Gierer (1987) Directional cues for growing axons forming the retinotectal projection. *Development* 101, 479–489.
- [18] M. J. Bastiani, A. L. Harrelson, P. M. Snow and C. Goodman (1987) Expression of Fasciclin I and II Glycoproteins on Subsets of Axon Pathways during Neuronal Development in the Grasshopper. *Cell* 48, 745–755.
- [19] N. H. Patel, P. M. Snow and C. Goodman (1987) Characterization and Cloning of Fasciclin III: A Glycoprotein Expressed on a Subset of Neurons and Axon Pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975–988.

Danksagung:

Wir bedanken uns bei U. Boschert, J. Vielmetter und Dr. G. Technau für die Bereitstellung bisher unpublizierter Abbildungen und bei Prof. H.-Ch. Spatz, Prof. R. Hertel und M. Bastmeyer für kritische Kommentare zum Manuskript. Die vorliegende Arbeit wurde von der DFG im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Dynamik und Stabilisierung neuronaler Strukturen“ gefördert (Fi336/3-1 und Stu112/4-1).

Karl-Friedrich Fischbach, geb. 1948 in Siegen. Studium der Biologie (Hauptfach Genetik) in Freiburg und der Biochemie in London. Promotion 1976 in Freiburg. Habilitation 1983 in Würzburg mit der Schrift „Neurogenetik am Beispiel des visuellen Systems von *Drosophila melanogaster*“. Heisenbergstipendiat 1984. Seit 1985 Professor für Biophysik und Molekularbiologie in Freiburg.

Claudia A. O. Stürmer, geb. 1950 in Essen. Studium der Biologie (Hauptfach Zoologie) in Freiburg, Salzburg und Münster. Promotion 1978 in Freiburg. Habilitation 1985 in Tübingen im Fach Entwicklungsneurobiologie. Seit 1986 Leiterin einer selbständigen Arbeitsgruppe in Tübingen am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft.

Anschriften:

Prof. Dr. Karl-Friedrich Fischbach, Institut für Biologie III, Schänzlestr. 1, D-7800 Freiburg.

Priv.-Doz. Dr. Claudia A. O. Stuermer, Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Spemannstr. 37–39, D-7400 Tübingen.