

**Funktionelle Analyse der beiden Zinkfinger-
Homöodomänentranskriptionsfaktoren Zfh-1 und Zfh-2
während der Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila
melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

**Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Georg Vogler

geboren am 15.01.1976 in Aurich/Ostfriesland

Mainz im Juni 2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Entwicklung des Nervensystems von <i>Drosophila</i>	1
1.2.	Funktion und Klassifikation von Transkriptionsfaktoren	4
1.3.	Die Zinkfingerhomöodomänen - Transkriptionsfaktoren Zfh1 und Zfh2.....	7
1.4.	Ziele der Arbeit.....	9
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Futtermedien und Fliegenzucht.....	10
2.1.1.	Eiablagen	10
2.1.2.	Larvenhaltung.....	10
2.2.	Fliegenstämme	11
2.3.	Genetische Kreuzungen	13
2.3.1.	Rekombination.....	13
2.4.	Das Gal4/UAS-System	14
2.5.	Die MARCM-Technik	17
2.6.	Immunohistochemie	20
2.6.1.	verwendete Antikörper	20
2.6.2.	Fixierung der Embryonen für Antikörperfärbung.....	22
2.6.3.	Präparation spätlarvaler Gehirne und Bauchmark	22
2.6.4.	Präparation von Embryonen des Stadium 17 und L1-Larven.....	23
2.6.5.	Präparation der peripheren Muskulatur von späten L3-Larven im Wanderstadium	24
2.6.6.	Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern.....	24
2.6.7.	Bestimmung der Größe neuromuskulärer Verbindungen.....	25
2.7.	Molekularbiologische Methoden	26
2.7.1.	Präparation von DNA.....	26

2.7.2.	Herstellung von cDNA aus <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	26
2.7.3.	PCR und Sequenzierung	27
2.7.4.	Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese.....	27
2.7.5.	Konstruktion von P-Elementen und die Herstellung transgener Fliegen	28
2.7.6.	Bestimmung der Integrationsorte von P-Elementen durch inverse PCR und Plasmid-Resuce.....	29
2.8.	Chemikalien, Lösungen und Geräte.....	30
2.9.	Dokumentation, Software	30
3.	Ergebnisse	31
A.	Molekulare und funktionelle Charakterisierung des <i>zfh2</i>-Gens	31
3.1.	Molekulare Analyse und Klonierung der cDNA von <i>zfh2</i>	33
3.1.1.	Identifizierung alternativer Spleißformen.....	33
3.1.2.	Klonierung der cDNA von <i>zfh2</i>	38
3.1.3.	Polymorphismen in der kodierenden Sequenz von <i>zfh2</i>	40
3.1.4.	Klonierung von <i>zfh2</i> cDNA in pP-UAST	41
3.2.	Charakterisierung verschiedener Allele von <i>zfh2</i>	42
3.2.1.	Molekulare Charakterisierung von <i>zfh2</i> ^{M707} und <i>zfh2</i> ^{LP30}	42
3.2.2.	Das Expressionsmuster und Hinweise auf die Funktion von Zfh2 im embryonalen ZNS	44
3.3.	Abhängigkeit der Zfh2-Expression von Hunchback	45
B.	Charakterisierung und funktionelle Analyse des <i>zfh1</i>-Gens	49
B.1.	Charakterisierung des Expressionsmuster von Zfh1 im embryonalen und larvalen Nervensystem	51
3.4.	Zfh1 wird in identifizierbaren Neuronen und Glia exprimiert.....	51
3.4.1.	Kokalisation mit Even-skipped (Eve)	51
3.4.2.	Kokalisation mit Spalt (Sal)	52
3.4.3.	Kokalisation mit Optomotor-blind (Omb)	52
3.4.4.	Zfh1 wird in allen Motoneuronen exprimiert.....	54

3.5.	Zfh1 wird in vielen Subtypen von Gliazellen exprimiert.....	58
3.5.1.	Zfh1 wird in einigen Subtypen lateraler Gliazellen des ZNS exprimiert	59
3.5.2.	Alle peripheren Gliazellen sind Zfh1-positiv.....	61
3.5.3.	Zfh1-Expression im optischen Lobus und in der Augenantennen- imaginalscheibe	62
3.6.	Zfh1 wird in vielen neuropeptidergen Neuronen exprimiert	66
3.6.1.	Dimmed, <i>c929</i> -Gal4	66
3.6.2.	Proctolin (Proc)	66
3.6.3.	Allatostatin-A (Ast-A)	70
3.6.4.	Teile der Ringdrüse exprimieren Zfh1	70
3.6.5.	Leucokinin (Lki)	70
3.6.6.	FMRFamid (FMRFa)	72
3.6.7.	Crustacean-cardioactive peptide (CCAP).....	74
B.2.	Analyse der neuralen Genfunktion von <i>zfh1</i>	77
3.7.	Verlust von Zfh1 führt zu einem irregulären Muster lateraler Glia	77
3.8.	Verlust von Zfh1 führt zu einer Reduktion der Anzahl efferenter Neurone	80
3.9.	Das Wachstum von neuromuskulären Endplatten ist von Zfh1 abhängig	80
3.9.1.	Das hypomorphe Allel <i>zfh1</i> ⁸⁶⁵ führt zu verkleinerten neuromuskulären Endplatten	82
3.9.2.	Überexpression von Zfh1 in glutamatergen Neuronen führt zu größeren NMJs sowie neurologischen Defekten	86
3.10.	Zfh1 und genetische Interaktion mit dem TGFβ-Signalweg	87
3.11.	Mosaikanalyse mit MARCM	90
3.11.1.	Übersicht über die Technik.....	90
3.11.2.	Embryonal induzierte Flp-Klone lassen sich im vNS von L3 Larven nachweisen	92

3.11.3.	Mit der MARCM-Technik lassen sich alle Typen von Motoneuronen darstellen und identifizieren	99
3.11.4.	Die MARCM-Analyse bestätigt den vermuteten Auswachsungsphänotyp in <i>zfh1</i> -Nullmutanten.....	102
3.11.5.	Klone <i>zfh1</i> -mutanter Motoneurone zeigen verkleinerte neuromuskuläre Endplatten	103
3.12.	Die Funktion von Zfh1 während der Myogenese ist dosisabhängig...	104
3.13.	Ektopische Expression von Zfh1 mit anderen neurospezifischen Gal4-Linien.....	108
3.14.	<i>zfh1</i> ist notwendig für die Expression einiger Neuropeptide	114
3.14.1.	Die Expression von Proctolin ist nicht abhängig von <i>zfh1</i>	114
3.15.	Die Leucokinin-Expression ist teilweise gestört im abdominalen vNS hypomorpher <i>zfh1</i> ⁸⁶⁵ -Larven.....	115
3.16.	<i>zfh1</i> ⁸⁶⁵ -mutante Larven zeigen einen Verlust von FMRFa-Expression	117
3.16.1.	Die Expression von FMRFa wird unterdrückt durch Zfh1-Überexpression	117
3.16.2.	Der Verlust an FMRFa ist keine Folge programmierten Zelltods.....	118
3.16.3.	Das Neurohämälorgan ist auch in hypomorphen Larven vorhanden	119
3.16.4.	Das Tv-Neuron-spezifische Reporterkonstrukt PWF besitzt eine konservierte Homöodomänenbindestelle und ist abhängig von der Zfh1-Dosis	121
3.17.	Überexpression von Zfh1 in CCAP-positiven Neuronen verhindert die Entfaltung der Flügel nach Schlupf	124
3.17.1.	Durch Zfh1-Überexpression verursachte Flügelphänotypen.....	125
3.17.2.	Die Expression von CCAP ist unabhängig von <i>zfh1</i>	125
4.	Diskussion	128
4.1.	<i>zfh2</i> wird durch temporäre Spezifizierungsgene reguliert	128
4.2.	Alternatives Spleißen ermöglicht eine Vielzahl an Zfh2-Proteinen.....	131
4.3.	Die Rolle von <i>zfh1</i> im ventralen Nervensystem ist vielfältiger Natur.	132

4.3.1.	Gliazellen und die Funktion von Zfh1 für die Migration von Zellen..	132
4.3.2.	Die Entwicklung und Funktion von Motoneuronen ist abhängig von Zfh1.....	135
4.3.3.	Die Aufrechterhaltung der larvalen Expression des Neuropeptids FMRFa ist von Zfh1 abhängig	141
4.4.	Die MARCM-Technik kann für die klonale Analyse mutanter Motoneurone verwendet werden	144
5.	Zusammenfassung	147
6.	Literaturverzeichnis	149
7.	Anhang	162
7.1.	Liste der verwendeten Primer	162
7.2.	Integrationsorte von P-Elementlinien	164
7.3.	Puffer und Lösungen	164
7.4.	Geräte + Software	168

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Schema der Neurogenese im <i>Drosophila</i> Embryo	3
Abb. 2	Molekularer Aufbau und Verteilung der DNA-bindenden Domänen der beiden Zinkfingerhomöodomänen-Transkriptionsfaktoren Zfh1 und Zfh2... 6	6
Abb. 3	Beispiele identifizierter Domänen der Zfh1- und Zfh2-Homologen von Vertebraten.....	6
Abb. 4	Schematische Darstellung des Gal4/UAS-Systems	15
Abb. 5	Prinzip der MARCM-Technik	16
Abb. 6	MARCM Kreuzungsschema	18
Abb. 7	Verteilung der für die molekulare Analyse von <i>zfh2</i> synthetisierten Primer 33	33
Abb. 8	Identifizierung unterschiedlicher Spleißformen von <i>zfh2</i>	33
Abb. 9	Isolierte Amplikons zweier RT-PCR-Ansätze.....	35
Abb. 10	Sequenzierte Klone mit unterschiedlichen Spleißformen	35
Abb. 11	Übersicht über die klonierten Spleißvarianten und möglichen Proteine.....	36
Abb. 12	Mit <i>Pfu</i> -Polymerase amplifizierte Teilstücke von <i>zfh2</i>	36
Abb. 13	Übersichtsschema über die Klonierungsstrategie für die <i>zfh2</i> -cDNA.....	40
Abb. 14	PCR-Test auf Vollständigkeit von UAS- <i>zfh2</i>	41
Abb. 15	Kolokalisation von Zfh2 und Hunchback.....	46
Abb. 16	Überexpression von Hunchback führt zu Repression von <i>zfh2</i>	47
Abb. 17	Für die Expression von Zfh2 muss Hunchback herunterreguliert werden... 48	48
Abb. 18	Kolokalisation von Even-skipped und Zfh1	51
Abb. 19	Kolokalisation von Spalt (Sal) und Zfh1	53
Abb. 20	Kolokalisation von Optomotor-blind (Omb) und Zfh1	54
Abb. 21	Lokalisation von Medea im embryonalen ZNS.....	55
Abb. 22	Zfh1 wird in allen TGFβ-aktivierten Zellen exprimiert.....	56
Abb. 23	Expressionsmuster von <i>DVGluT</i> -Gal4 (OK371-Gal4) im Verhältnis zur endogenen Zfh1-Expression in spätlarvalen vNS.....	57
Abb. 24	Viele Gliazellen im vNS exprimieren Zfh1.....	61
Abb. 25	Alle peripheren Gliazellen exprimieren Zfh1	61

Abb. 26 Zfh1-Expression der Augenantennenimaginalscheibe.....	62
Abb. 27 Die sich differenzierenden Photorezeptoren sind Zfh1-negativ	63
Abb. 28 Aus dem optischen Lobus auswandernde Gliazellen sind Zfh1-positiv	65
Abb. 29 Im optischen Lobus sind nur die Zellen der Lamina und des inneren Proliferationszentrums Zfh1-positiv	65
Abb. 30 Expressionsmuster von <i>dimmed</i> -Gal4 (C929-Gal4) und Zfh1 in spätlarvalen vNS (Übersicht)	67
Abb. 31 Proctolinerge Neurone sind Zfh1-positiv	68
Abb. 32 Expressionsmuster von Allatostatin-C und Zfh1 in spätlarvalen vNS (Übersicht)	70
Abb. 33 Die Corpora cardiaca der Ringdrüse sind Zfh1-positiv	71
Abb. 34 Die Expression von Leucokinin (Lki) ist abhängig von Zfh1	72
Abb. 35 Tv Neurone und die dorsalen Neurohämorgane (DNH) sind Zfh1-positiv	74
Abb. 36 Expressionsmuster von <i>apterous</i> -Gal4 und Zfh1 in spätlarvalen vNS (Übersicht)	75
Abb. 37 CCAP-Neurone sind Zfh1-positiv und die Expression von CCAP unabhängig von Zfh1.....	76
Abb. 38 Expressionsmuster von CCAP-Gal4 und Zfh1 in spätlarvalen vNS (Übersicht)	76
Abb. 39 Zfh1 ist notwendig für die Positionierung von Gliazellen.....	78
Abb. 40 Zfh1 ist notwendig für das korrekte Auswachsen von Motoneuronen.....	79
Abb. 41 Die Größe neuromuskulärer Verbindungen hängt von der Dosis an Zfh1 ab	86
Abb. 42 Überexpression von Zfh1 in glutamatergen Neuronen führt zu neurologischen Defekten.....	87
Abb. 43 NMJ-Phänotypen von <i>wishful-thinking</i> -Mutanten lassen sich durch Dosisreduktion von <i>zfh1</i> nicht weiter verstärken.....	89

Abb. 44 Mit <i>hsflp</i> ¹²² lassen sich eine Vielzahl unterschiedlicher neuronaler MARCM-Klone induzieren	93
Abb. 45 Projektionen motoneuronaler MARCM-Klone im späten L3-Larvenstadium	98
Abb. 46 Beispiele für Projektionen von durch MARCM markierten Motoneuronen	100
Abb. 47 <i>zfh1</i> -Mutanten haben Defekte in der somatischen Muskulatur	107
Abb. 48 Mesodermale Überexpression von <i>Zfh1</i> führt zu Defekten in der somatischen Muskulatur	107
Abb. 49 Die panneuronale Überexpression von <i>Zfh1</i> erzeugt keine bzw. nur subtile Phänotypen des axonalen Projektionsmusters	110
Abb. 50 Die panneuronale Überexpression von <i>Zfh1</i> zeigt keine Phänotypen des axonalen Projektionsmusters sensorischer Neurone	110
Abb. 51 Expressionsmuster von <i>OK6-Gal4</i> im Verhältnis zur endogenen <i>Zfh1</i> -Expression in spätlarvalen vNS (Übersicht).....	112
Abb. 52 Überexpression von <i>Zfh1</i> mit <i>OK6-Gal4</i> hat einen systemischen Effekt auf die Larvalentwicklung.....	112
Abb. 53 Vergleich der Expression von <i>MzVUM-Gal4</i> mit der endogenen <i>zfh1</i> -Expression	113
Abb. 54 Die Expression von Proctolin ist unabhängig von <i>zfh1</i>	115
Abb. 55 Die Expression von <i>FMRFa</i> ist abhängig von <i>Zfh1</i>	116
Abb. 56 Überexpression von <i>Zfh1</i> in Ap-Neuronen reprimiert <i>FMRFa</i>	116
Abb. 57 Die Reduktion von <i>FMRFamid</i> in <i>zfh1</i> -mutanten Tv-Neuronen kommt nicht durch programmierten Zelltod zustande	119
Abb. 58 Das dorsale Neurohämalorgan (DNH) ist in hypomorphen <i>zfh1</i> ⁸⁶⁵ -Mutanten vorhanden.....	120
Abb. 59 Schematische Darstellung des Tv-spezifischen Enhancers von <i>fmrfamid</i> und Vergleich der <i>Zfh1</i> -Bindestellen.....	121
Abb. 60 Reduktion von <i>Zfh1</i> führt zum Verlust der Expression eines Tv Neuron-spezifischen <i>fmrfamid</i> -Reportergens	123

Abb. 61 Überexpression von Zfh1 reprimiert ein Tv-Neuron-spezifischen <i>fmr/famid</i> -Enhancer	123
Abb. 62 Durch Überexpression von Zfh1 lassen sich verschiedene Flügel- und Cuticulaphänotypen erzeugen	126
Abb. 63 Überexpression von Zfh1 mit CCAP-Gal4 hat in Larven keinen Einfluß auf die CCAP-Expression	127
Tab. 1 Bestimmung der Insertionsorte einiger P-Element Linien.....	30
Tab. 2 Expressionsmuster von Zfh2 und Phänotypen in <i>zfh2</i> -Mutanten	44
Tab. 3 Überlebensrate verschiedener transheterozygoter und homozygoter <i>zfh1</i> -Allele	82
Tab. 4 Größe der neuromuskulären Verbindung in Abhängigkeit von der Zfh1-Dosis.....	84
Tab. 5 Größenvergleich der neuromuskulären Verbindung zwischen <i>wit</i> und <i>zfh1</i> , <i>wit</i> Doppelmutanten	90
Tab. 6 Normalisierte Häufigkeiten durch MARCM-Technik gewonnener motoneuronaler Projektionen (Wildtyp und Mutante)	102

1. Einleitung

Das Ziel neuroentwicklungsbiologischer Forschung liegt darin, die grundlegenden Mechanismen der Neurogenese zu entschlüsseln, welche zur Differenzierung neuraler Zellen und zur Bildung eines funktionellen Nervensystems führen. Auf der Ebene der Genregulation spiegeln sich diese Differenzierungsprozesse in der Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wider, von deren Wirkung letztlich alle Aspekte der neuralen Morphogenese abhängig sind. Die Analyse solcher Transkriptionsfaktoren und die Identifikation ihrer Zielgene bietet daher die Möglichkeit, die Kontrolle morphogenetischer Abläufe zu verstehen. Dies soll in der vorliegenden Arbeit anhand der Transkriptionsfaktoren *zfh1* und *zfh2* untersucht werden.

1.1. Die Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila*

Das Nervensystem von *Drosophila* stellt eine hochkomplexe, dreidimensionale Struktur dar, dessen funktionales Grundmuster während der Embryogenese angelegt wird. Die Entwicklung des Nervensystems beginnt im frühen Embryo, wo durch sukzessive regionale Spezifizierung neurogene Bereiche im Ektoderm definiert werden: die procephale neurogene Region (pNR), aus der das Gehirn hervorgehen wird, und die ventrale neurogene Region (vNR), aus der das ventrale Nervensystem (vNS) gebildet wird. In der vNR kann zwischen einem mesektodermalen und einem neuroektodermalen Anteil unterschieden werden, in denen zwei Typen neuraler Vorläuferzellen spezifiziert werden. Die Mesektodermzellen sind Mittellinienvorläufer (Poulson, 1950), welche sich nur wenige Male teilen und die Neurone und Gliazellen der Mittellinie bilden. Im Neuroektoderm entstehen die Neuroblasten (NB), aus denen durch eine Reihe von Teilungen der Großteil der Zellen des Bauchmarks hervorgeht. Die regionale Spezifizierung des Ektoderms ist eine

Konsequenz der frühen embryonalen Musterbildung, verursacht durch die kaskadenartige Genexpression von Lückengenen, Paarregelgenen und Segmentpolaritätsgenen entlang der anterior-posterioren sowie von Genen der dorso-ventralen Achse. Diese Spezifizierung setzt sich unter Mitwirkung proneuraler und neurogener Gene im Neuroektoderm räumlich und zeitlich weiter fort, sodass 30 Neuroblasten innerhalb eines jeden Hemisegments gebildet werden, die unterschiedliche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren (TFs) und anderen Determinanten aufweisen (Broadus et al., 1995; Chu et al., 1998; Skeath, 1999). Infolgedessen zeigen die NB unterschiedliche Teilungsmuster und generieren unterschiedliche Typen von Tochterzellen. Die Position identischer Neuroblasten wiederholt sich von Segment zu Segment (seriellen Homologe). Zusätzlich finden sich tagmaspezifische Unterschiede zwischen thorakalen und abdominalen Neuroblasten, die durch die unterschiedliche Expression homöotischer Gene verursacht werden (Prokop und Technau, 1994).

Nachdem die Neuroblasten aus dem Neuroektoderm delaminiert sind, teilen sie sich im Stammzellmodus, sodass aus dieser Teilung ein Neuroblast und eine kleinere Gangliennutterzelle (GMZ) hervorgehen (Abb. 1). Die GMZ selbst teilt sich in der Regel noch einmal, und die entstandenen Tochterzellen differenzieren zu Neuronen und/oder Gliazellen aus. Der Neuroblast selbst kann sich noch mehrere Male teilen, die Anzahl der Teilungen ist zwischen den NB unterschiedlich. Das Teilungsmuster und die Identität der Nachkommen individueller NBs sind invariant, d. h. aus einem NB gehen immer dieselben Zellen hervor (Neuroblastenstammbaum). Im Embryo und in der Larve konnten durch DiI-Markierung und genetische Mosaikanalyse der größte Teil der NB-Stammbäume dargestellt und beschrieben werden, sodass der klonale Ursprung der etwa 350 Neurone und Gliazellen eines jeden Segments bekannt ist (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Truman et al., 2004).

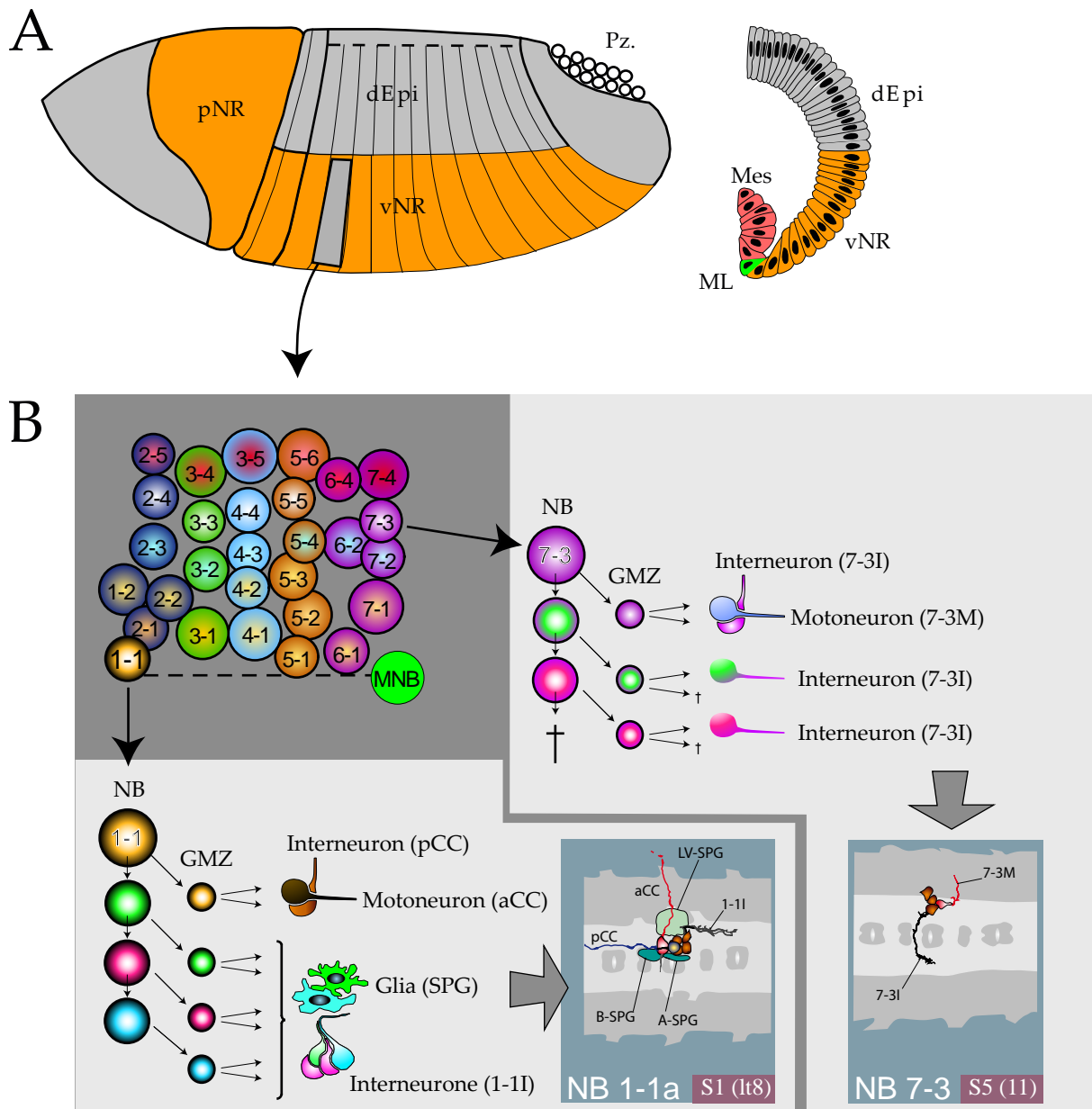


Abb. 1 Schema der Neurogenese im *Drosophila* Embryo

A. Anlagenkarte des frühen Embryo. pNR = procephale neurogene Region; vNR = ventrale neurogene Region; dEpi = dorsale Epidermis; Pz. = Polzellen; Mes = Mesoderm; ML = Mittellinie.

B. Neuroblastenkarte eines Hemisegments (dunkelgrau unterlegtes Feld). Jeder Neuroblast (NB) unterscheidet sich durch die individuelle Expression bestimmter dorso-ventraler und anterior-posteriorer Musterbildungsgene (angedeutet durch Farbverläufe in den NB). MNB = Mittellinienneuroblast. Exemplarisch sind die Neuroblastenstammbäume für NB1-1 und NB7-3 schematisch dargestellt (hellgrau unterlegte Felder). Sequenzielle Genexpression im NB führt zur voneinander verschiedenen Nachkommenzellen (Farbänderung im NB und GMZ). GMZ = Ganglienmutterzelle. SPG = Subperineurialglia. I = Interneuron; M = Motoneuron.

Zur Spezifizierung der Nachkommenzellen eines Neuroblasten tragen sowohl zellintrinsische, teilungsabhängige und –unabhängige Mechanismen, als auch Zell-Zell-Interaktion bei (Wai et al., 1999).

Im Neuroblasten ändert sich mit jeder Zellteilung das Expressionsmuster bestimmter Determinanten, und diese temporären Unterschiede werden an die Nachkommenzellen weitergegeben (Abb. 1). Während der nachfolgenden Teilung der GMZ werden weitere Faktoren asymmetrisch an die Tochterzellen vererbt, welche diese letztlich voneinander verschieden macht (Wai et al., 1999). Die Unterscheidung zwischen neuronalem und glialem Schicksal äußert sich in der Expression des gliaspezifischen Schaltergens *glial-cells-missing* (*gcm*), welches zur Ausprägung des glialen Charakters einer Zelle führt (Akiyama-Oda et al., 1998; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996). Am Ende der embryonalen Neurogenese finden sich eine Vielzahl von neuronalen Zelltypen, die miteinander interagieren und deren koordinierte Verschaltung und Interaktion ein gerichtetes larvales Verhalten ermöglichen. Diese Zellen unterscheiden sich in einer ganzen Reihe von Merkmalen, z. B. ihrer Morphologie, der Ausstattung an Membranproteinen oder den verschiedenen Neurotransmittern und Neuropeptiden. Die Gründe für die Ausprägung solcher Unterschiede sind letztlich auf der Ebene der Genregulation zu suchen, und werden vor allem durch die differenzielle Aktivität von Faktoren bestimmt, die die Transkription regulieren. Die Kontrolle der neuronalen Transkriptionsregulation zu verstehen stellt deshalb eine der Kernfragen der Neuroentwicklungsbiologie dar.

1.2. Funktion und Klassifikation von Transkriptionsfaktoren

Die während der Neurogenese aus der sukzessiven Teilung neuraler Vorläuferzellen hervorgegangen Neurone und Gliazellen exprimieren eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, welche die weitere Spezifizierung und Differenzierung dieser Zellen steuern. Viele dieser Transkriptionsfaktoren, die bei der frühen Embryonalentwicklung wichtige Funktionen übernehmen, werden während der Neurogenese wieder verwendet. Wegen ihrer frühen Funktion als Lückengene bezeichnete TFs,

wie z. B. die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Hunchback oder Krüppel, spezifizieren während der Neurogenese frühe Schicksale innerhalb eines Neuroblastenstammbaums (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Segmentidentitätsgene wie das HOX-Gen *abdominal-A* bestimmen später, ob sich ein Neuroblast weiter teilt oder ob er durch programmierten Zelltod die Proliferation einstellt (Bello et al., 2003). Auch Paarregelgene, wie z. B. *even-skipped* oder *fushi-tarazu* oder Segmentpolaritätsgene wie z. B. *engrailed* finden sich in vielen Zellen des sich entwickelnden ZNS wieder und erfüllen dort spezifische Funktionen (Pym et al., 2006). Daneben existieren aber auch eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren, die postmitotisch nur in neuronalen oder bereits sehr weit differenzierten Zellen anderer Gewebe exprimiert werden (siehe z. B. Brody et al., 2002). Solche nur in postmitotischen Zellen exprimierten TFs dürften eine besondere Rolle bei der terminalen Differenzierung dieser Zelle spielen, da ihre transkriptionelle Aktivität spezifisch während dieser späten Prozesse benötigt wird. Sie sind daher von besonderem Interesse, weil sie möglicherweise sehr direkt die morphogenetischen Abläufe z. B. während des axonalen Wachstums und der Wegfindung oder der Synaptogenese steuern und man durch ihre Analyse ein besseres Verständnis über diese Abläufe erlangen kann.

Transkriptionsfaktoren werden in der Regel aufgrund des Vorhandenseins einer oder mehrerer DNA-bindender Domänen innerhalb der Proteinsequenz klassifiziert, z. B. Zinkfingerdomänen, Homöodomänen oder basische Helix-loop-helix TFs (für eine Übersicht siehe Wingender et al., 2000). Diese erkennen spezifische DNA-Sequenzen und binden an die DNA, um nachfolgend die Transkription eines Gens zu erleichtern, zu unterdrücken oder generell zu ermöglichen. Die Spezifität für eine DNA-Bindestelle wird in der Regel durch die Aminosäuren innerhalb der Bindedomäne erzeugt, welche in die große Furche der DNA greifen und mit den Nukleobasen interagieren (Alberts, 2002). Daneben besitzen TFs auch Protein-Protein-Bindestellen, welche die Interaktion mit anderen Faktoren, z. B. mit der generellen Transkriptionsmaschinerie der RNA-Polymerase II, erlauben. Ob ein TF

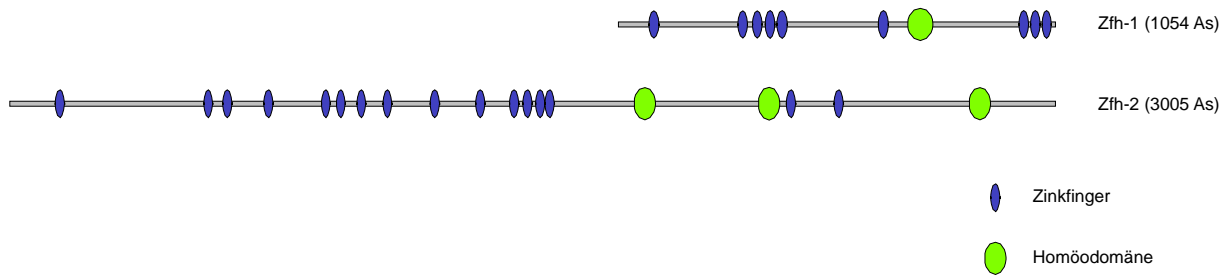


Abb. 2 Molekularer Aufbau und Verteilung der DNA-bindenden Domänen der beiden Zinkfingerhomöodomänen-Transkriptionsfaktoren Zfh1 und Zfh2

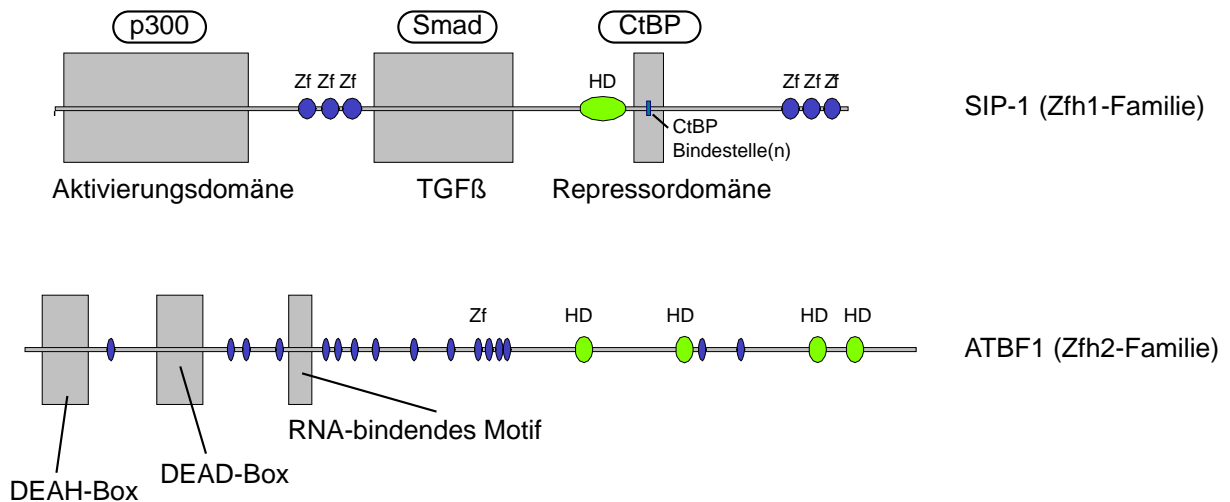


Abb. 3 Beispiele identifizierter Domänen der Zfh1- und Zfh2-Homologen von Vertebraten

eine reprimierende oder aktivierende Wirkung auf die Transkription hat, hängt demnach von solchen transaktivierenden oder reprimierenden Domänen ab. Beispielsweise lassen sich künstliche Hybrid-TFs konstruieren, indem man ein DNA-Bindemotiv eines eigentlich aktivierend wirkenden TFs mit der Repressordomäne eines anderen TFs fusioniert. Auf diese Weise kann man z. B. künstliche dominant-

negative Allele eines TFs erzeugen und damit die Genexpression von Zielgenen unterbinden (siehe z. B. Soustelle et al., 2004).

Neben Proteinen mit nur einer DNA-Bindedomäne gibt es auch Proteine, die mehrere solcher Domänen tragen (z. B. Hunchback: vier Zinkfinger) oder Kombinationen verschiedener Domänen (z. B. Pdm-1: POU-Domäne und Homöodomäne; PAX-6: Paired-Domäne und Homöodomänen). Mit der Entdeckung der beiden Zinkfinger-Homöodomänenproteine Zfh1 und Zfh2 bei *Drosophila* (Fortini et al., 1991; Lai et al., 1991) wurden der Klasse der Homöodomänenproteine ein neuer Typ DNA-bindender Proteine hinzugefügt, die zusätzlich mehrere Zinkfinger haben.

1.3. Die Zinkfingerhomöodomänen - Transkriptionsfaktoren Zfh1 und Zfh2

Bei *zfh1* und *zfh2* handelt es sich um zwei Gene, die u. a. im sich entwickelnden Nervensystem von *Drosophila* Embryonen exprimiert werden. Das drittmolekulare Gen *zfh1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer Homöodomäne und neun Zinkfingern, wohingegen das viertmolekulare lokalisierte *zfh2*-Gen für ein Protein mit drei Homöodomänen und 16 Zinkfingern kodiert (Abb. 2, Fortini et al., 1991; Lai et al., 1991).

Es wurden Orthologe dieser Gene sowohl bei anderen Invertebraten wie z. B. *Caenorhabditis elegans* gefunden (*zfh1*: *zag-1* (Clark und Chiu, 2003; Wacker et al., 2003); *zfh2*: ZC123.3 (WormBase, 2005)), und auch bei Vertebraten konnten *zfh*-Gene identifiziert werden (*zfh1*: *deltaEF-1* (Funahashi et al., 1993) und *sip-1* (Verschuere et al., 1999); *zfh2*: *atbf-1* (Morinaga et al., 1991) und *zfh4* (Nogami et al., 2005)). Bei allen ist der strukturelle Aufbau, d. h. die Abfolge der Zinkfinger und die relative Lokalisation der Homöodomäne(n) ähnlich, allerdings besitzen die *zfh2*-homologen Vertreter von Vertebraten vier Homöodomänen.

Bei beiden Transkriptionsfaktoren konnten weitere funktionelle Domänen identifiziert werden (Abb. 3). Das *zfh2*-Homologe ATBF-1 hat neben den DNA-bindenden Domänen auch Sequenzen, die ähnlich zu DEAD/DEAH-Boxen von

DNA-Helikasen sind, sowie eine RNA-bindendes Motiv (Miura et al., 1995). Bei allen Proteinen der Zfh1-Familie finden sich ein oder mehrere Bindestellen für den Korepressor CtBP (PLDLS, Postigo und Dean, 1999), welcher möglicherweise notwendig für die beschriebene Repressoreigenschaft von Zfh1-Proteinen ist. Darüber hinaus wurde bei Vertebraten die Interaktion mit den transkriptionellen Koaktivatoren p300/CBP (Postigo et al., 2003) und der TGF β -Signalkomponente phospho-SMAD (Postigo, 2003) nachgewiesen.

Neben diesen strukturellen Gemeinsamkeiten haben die zu *Drosophila zfh1* und *zfh2* orthologen Gene anderer Organismengruppen auch Ähnlichkeiten im Expressionsmuster. Zfh1 wird im *Drosophila*-Embryo in bestimmten Geweben exprimiert (ZNS, Gonadenmesoderm, Myoblasten, Perikardzellen, vgl. Broihier et al., 1998; Lai et al., 1991; Lai et al., 1993; Su et al., 1999), und diese Gewebespezifität ist auch bei Vertebraten zu finden (Liu et al., 2006; van Grunsven et al., 2001). Die Expression von Zfh2 beschränkt sich im *Drosophila*-Embryo vor allem auf das ZNS und den Enddarm, schwache Expression findet sich auch in der Epidermis und den Tracheen (Lai et al., 1991). Bei Mäusen sind ATBF1 und Zfh4 ebenfalls im ZNS, den Lungen und den Zellen des Enddarms zu finden (Nogami et al., 2005; Sakata et al., 2000). Hypermorphe Allele des *zfhx1b* Gens zeigen eine Repression von E-Cadherin, was zu verringerter Zell-Zell-Adhäsion führt und einen wichtigen Schritt für die epidermale-mesenchymale Transition (EMT) darstellt und damit epitheliale Tumorbildung fördern kann (Comijn et al., 2001; Remacle et al., 1999). Funktionsverlust von *zfhx1b* führt außerdem beim Menschen zum Mowat-Wilson-Syndrom, welches durch Mikrozephalie, mentale Beeinträchtigung und eine Reihe anderer Effekte charakterisiert ist (Mowat et al., 2003). Mutationen des *zfh2*-homologen ATBF1 führen zu verschiedenen Typen von malignen Tumoren des Magens und der Prostata (Dong, 2006; Kataoka et al., 2001). Wegen der strukturellen und der aus der Expression abgeleiteten sehr wahrscheinlich funktionellen Ähnlichkeiten sollte man aus der Analyse der *zfh1*- und *zfh2*-Genfunktion bei *Drosophila* auch für andere Organismen geltende wichtige Antworten auf entwicklungsbiologische

Fragestellungen erhalten können. Vor Kurzem konnte tatsächlich gezeigt werden, dass das *zfh1*-homologe SIP-1 in der Lage ist, während der Herzentwicklung von *Drosophila* die *zfh1*-Genfunktion zu ersetzen (Liu et al., 2006), was auf einen hohen Grad funktioneller Konservierung hinweist und die klinische Relevanz daher unterstreicht.

1.4. Ziele der Arbeit

Obwohl unser Verständnis über die frühen Spezifizierungsprozesse neuraler Vorläuferzellen und über die Prinzipien des Zustandekommens der zellulären Vielfalt im ZNS recht ausgereift ist, wissen wir vor allem über die transkriptionelle Kontrolle später neuraler Differenzierungsprozesse relativ wenig. Zwar kennt man viele Beispiele für Transkriptionsfaktoren, die in bestimmten Populationen neuraler Zellen exprimiert werden, allerdings spielen diese sehr oft schon eine Rolle in den Vorläuferzellen. Ihre funktionelle Kapazität unterscheidet sich daher von jener ausschließlich postmitotisch exprimierter Transkriptionsfaktoren. Bei *Zfh1* und *Zfh2* handelt es sich um im ZNS von *Drosophila* exprimierte Transkriptionsfaktoren, die sich durch eine solche postmitotische Expression auszeichnen. Die Charakterisierung ihrer Funktion während der embryonalen und larvalen Entwicklung des Nervensystems steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Hierfür soll sowohl das wildtypische Expressionsmuster beschrieben werden als auch durch die Analyse von Mutanten¹ und durch Überexpressionsexperimente die Bedeutung von *zfh1* und *zfh2* für die Funktion des Nervensystems herausgearbeitet werden. Das Ziel ist daher, ihre Rolle für die transkriptionelle Regulation postmitotischer Differenzierungs- und Wachstumsprozesse zu untersuchen.

¹ Die Analyse der wildtypischen Verteilung und die phänotypische Analyse der *zfh2*-Mutanten hat Dip.Biol. Carola Döffinger in ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung durchgeführt. Sie fließen in dieser Arbeit in tabellarischer Form im Ergebnisteil mit ein.

2. Material und Methoden

2.1. Futtermedien und Fliegenzucht

Für die Haltung von *Drosophila*-Stämmen wird ein Standardmedium verwendet, bei dem es sich um einen mit Agar verfestigten Brei aus Hefe, Soja, Mais, Malzextrakt und Sirup handelt, und zur Konservierung mit Nipagin und Propionsäure versetzt wird. Die Fliegen werden bei 25°C alle 14 Tage, bei 18°C alle vier bis sechs Wochen auf frische Röhren gesetzt.

2.1.1. Eiablagen

Für Eiablagen werden die Fliegen in Käfige gesetzt, die einen mit etwas Trockenhefe versetzten Boden aus mit Agar verfestigtem Apfelsaft besitzen. Vom Zeitpunkt der Eiablage („after egg laying - AEL“) lässt man eine gewünschte Zeit vergehen, um Embryonen einer bestimmten Altersspanne zu erhalten. Diese kann man weiterentwickeln lassen, bis sie das gewünschte Embryonalstadium erreicht haben.

2.1.2. Larvenhaltung

Um eine kontrollierte Entwicklung der Larven zu garantieren, gibt man späte Embryonen oder geschlüpfte L1-Larven in mit Trockenhefe versetztes *Drosophila* Instantmedium (Carolina Biological Supplies). Ein Teelöffel dieses Mediums wird mit etwas Wasser zum Quellen gebracht und soviel Wasser zugesetzt, bis es eine feuchte Konsistenz hat. Die Zahl der Larven sollte relativ gering gehalten werden, da sich Übervölkerung negativ auf die Entwicklung der Larven auswirken kann. Nach vier Tagen (bei 25°C) haben die Larven das Wanderstadium erreicht, was daran zu erkennen ist, dass sie an der Gefäßwandung emporkriechen, um sich zu verpuppen.

2.2. Fliegenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
Oregon-R	Wildtyp	Bloomington (BL-5)
<i>zfh1</i> ²	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; FRT82B <i>zfh1</i> ² / TM6b	Z.C. Lai (Lai et al., 1993)
<i>zfh1</i> ⁵	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; FRT82B <i>zfh1</i> ⁵ / TM6b	Z.C. Lai (Lai et al., 1993)
<i>zfh1</i> ⁸⁶⁵	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>zfh1</i> ⁸⁶⁵ / TM6b	Bloomington (BL-11515); (Justice et al., 1995)
<i>zfh1</i> ^{CB-0034-3}	<i>zfh1</i> ^{CB-0034-3} / TM6c	Szeged Stock Center (CB-0034-3)
<i>zfh1</i> ^{GMrox1}	<i>w</i> ; <i>zfh1</i> ^{GMrox1}	Richard Kelley (Kelley und Kuroda, 2003)
<i>wit</i> ^{A12}	<i>y,w; bw; wit</i> ^{A12} , <i>st</i> / TM6b	Michael O'Connor (Marques et al., 2002)
<i>wit</i> ^{B11}	<i>y,w; wit</i> ^{B11} , <i>st</i> / TM6b	Michael O'Connor (Marques et al., 2002)
<i>Mad</i> ^{k00237}	<i>Mad</i> ^{k00237} / <i>CyO</i>	Bloomington (BL-10474)
<i>hitw</i> ^{EMS} , <i>Mhc-CD8-Shaker-GFP</i>		Stephan Siegrist (Zito et al., 1999)
<i>hitw</i> ^{ND9}		Stephan Siegrist (Wu et al., 2005)
andere Konstrukte		
<i>hszfh1</i>	<i>hszfh1</i>	Z.C. Lai (Lai et al., 1991)
<i>hsflp</i> ¹²²	<i>y,w^A, hsflp</i> ¹²²	Gert O. Pflugfelder (Kopp et al., 1997)
<i>y,w;; FRT82B tubP-Gal80</i>		Bloomington (BL-5135)
<i>PWFE17-E1</i>	<i>w</i> ¹¹¹ , <i>PWFE17</i>	Paul Taghert (Benveniste und Taghert, 1999)
UAS-Linien		
UAS- <i>zfh1</i>	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>zfh1</i>	Bloomington (BL-6879)
UAS- <i>zfh1</i> ^{A_{CID}}	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>zfh1</i> ^{A_{CID}}	Bloomington (BL-6880)
UAS- <i>zfh1</i> ^{A_{HD}}	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>zfh1</i> ^{A_{HD}}	Bloomington (BL-6881)
UAS- <i>lacZ</i> ^{NLS}	<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>lacZ</i> ^{NLS}	Bloomington (BL-3955 und BL-3956)
UAS- <i>FMRFa</i>		Michael O'Connor (Marques et al., 2003)
UAS- <i>hb</i>	UAS- <i>hb</i> ; UAS- <i>hb</i>	Joachim Urban (Wimmer et al., 2000)
Gal4-Linien		
<i>elav</i> ^{C155} -Gal4, UAS- <i>mCD8::GFP</i> , <i>hsflp</i> ¹		Bloomington (BL-5146)
<i>apterous</i> -Gal4 / <i>CyO</i> ; UAS- <i>mCD8::GFP</i>		Andreas Prokop (Calleja et al., 1996)
OK371-Gal4	OK371-Gal4	Hermann Aberle (Mahr und Aberle, 2006)
C929-Gal4	C929-Gal4	Paul Taghert (Hewes et al., 2003)

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
OK6-Gal4	OK6-Gal4	Andreas Prokop (Aberle et al., 2002; Marques et al., 2003)
CCAP-Gal4	<i>y,w</i> ; CCAP-Gal4	John Ewer (Park et al., 2003)
<i>omb</i> -Gal4	<i>omb</i> -Gal4	Gert O. Pflugfelder (Nr. 47)
<i>zfh2</i> ^{LP30}	<i>zfh2</i> ^{LP30} / <i>M</i>	Ernesto Sanchez-Herrero
MzVUM-Gal4	MzVUM-Gal4	Olaf Vef (Landgraf et al., 2003b)
24B-Gal4	<i>w</i> ; <i>how</i> ^{24B} -Gal4	Bloomington (BL- 1767)

Balancer-Stämme

<i>w</i> ; TM3, <i>Sb</i> , <i>Ser</i> , <i>e</i> / TM6b, <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>	Olaf Vef
+; TM6b, <i>Tb</i> , <i>Ant-Hu</i> , <i>e</i> / TM3 <i>ftz-lacZ</i>	Olaf Vef
<i>w</i> ; <i>Pm</i> / CyO	Olaf Vef
FM6 <i>grh-lacZ</i> / <i>kus</i> ; <i>noc</i> ^{ScO} / CyO <i>wg-lacZ</i>	Olaf Vef
FM7a;; UAS- <i>bifid</i> / TM3 <i>ftz-lacZ</i> , <i>Sb</i> , <i>e</i>	Olaf Vef
<i>yw</i> , <i>N</i> ¹ / FM7c, <i>twi</i> -Gal4, UAS- <i>eGFP</i>	Bloomington (BL-6873)
<i>yw</i> ; <i>D</i> / TM3 <i>Kr</i> -Gal4, UAS- <i>GFP</i>	Bloomington (BL-5195)
<i>w</i> ; <i>Pm</i> / CyO <i>twi</i> -Gal4, UAS- <i>GFP</i> ; CxD / TM3 <i>twi</i> -Gal4, UAS- <i>GFP</i>	Olaf Vef
FM7a;; UAS- <i>bifid</i> / TM6b <i>Ant-Hu</i> , <i>Tb</i> , <i>e</i>	Olaf Vef
<i>w</i> ; <i>Pm</i> , <i>b</i> , <i>dp</i> / CyO <i>cn</i> , <i>pr</i> , <i>dp</i> ^{1V1} ; CxD / TM6b, <i>Hu</i> , <i>Tb</i> , <i>e</i>	Olaf Vef
<i>ci</i> ^w	Bloomington (BL-646)
C(4)RM, <i>sz</i> ^{spa-pol} (Ringchromosom)	Bloomington (BL-3698)

eigene Linien

<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>zfh1</i>	Georg Vogler (64A2)
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>zfh1</i>	Georg Vogler (84F6)
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>zfh1</i>	Georg Vogler (48D5)
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; UAS- <i>zfh1</i> RNAi	Georg Vogler (5 unabhängige Linien)

MARCM-Stämme

<i>elav</i> ^{C155} -Gal4, UAS- <i>mCD8::GFP</i> , <i>hsflp</i> ¹ ; FRT82B <i>tubP</i> -Gal80	maternaler Stamm
<i>hsflp</i> ¹²² ; FRT82B	paternaler Stamm WT-Klone
<i>hsflp</i> ¹²² ; FRT82B <i>zfh1</i> ⁵ / TM6b, <i>Tb</i>	paternaler Stamm <i>zfh1</i> -Klone

2.3. Genetische Kreuzungen

Für die Etablierung neuer Stämme zur Kombination unterschiedlicher Allele verschiedener Gene werden die Elterntiere der Ausgangsstämme miteinander verkreuzt. Wichtig für das Gelingen genetischer Kreuzungen sind die Kenntnis und der Einsatz dominanter genetischer Marker und Balancerchromosomen (Ryder et al., 2004). Außerdem ist darauf zu achten, dass die Weibchen des einen Stammes noch nicht von den Männchen desselben Stammes befruchtet wurden, d. h. jungfräulich sind. Da vom Zeitpunkt des Schlüpfens bis zur vollständigen Aushärtung der Kutikula und damit bis zur Funktionsfähigkeit des Geschlechtsapparates ca. fünf Stunden vergehen, genügt es, alle bisher geschlüpften Tiere zu entfernen und anschließend alle in einem Zeitraum von vier Stunden geschlüpften Weibchen abzusammeln. Nach ca. zwei Tagen kann man diese Weibchen mit den Männchen des gewünschten Genotyps verkreuzen, weil sie dann erst mit der Produktion von Eiern beginnen. Im Abstand von wenigen Tagen sollte man die Kreuzung auf ein neues Zuchtgefäß umsetzen, um diese nicht mit Larven zu überbevölkern. Nach etwa zehn Tagen schlüpfen die Tiere der F1-Generation, die man nun auf das Vorhandensein genetischer Marker überprüft, um auf den Genotyp des Tieres schließen zu können. Von diesen Tieren können nun wiederum Jungfrauen und Männchen voneinander getrennt gesammelt werden, um die Folgekreuzungen anzusetzen.

2.3.1. Rekombination

Liegen zwei Gene, von denen man unterschiedliche Allele miteinander kombinieren möchte, auf demselben Chromosom, muss man die beiden Gen tragenden Abschnitte miteinander rekombinieren. Aus dem Abstand der Gene auf dem Chromosom lässt sich die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der ein solches Rekombinationsereignis auftritt (Einheit: 1 centi-Morgan (1 cM) = 1% Rekombinationswahrscheinlichkeit, abhängig vom Locus etwa 300-500kBp Abstand bei *Drosophila*). Jene Männchen der Filialgeneration, die ein mögliches Insertionsereignis tragen, werden anschließend

mit unabhängigen Allelen zurückgekreuzt und damit auf das Vorhandensein beider Allele überprüft (Komplementationstest). Diese Unabhängigkeit ist deshalb notwendig, weil die mutanten Stämme über die Zeit Letalfaktoren akkumulieren („second site hits“). Durch die Rekombination schafft man künstlich einen genetischen Flaschenhals und selektiert möglicherweise auch einen solchen Letalfaktor. Kreuzt man mit dem Ausgangsstamm zurück, würde auf diese Weise irrtümlich ein Rekombinationsereignis angezeigt, das aber nicht auf der gewünschten Mutation, sondern auf eben diesem Letalfaktor basiert.

2.4. Das Gal4/UAS-System

Für die gezielte Überexpression von Genen wird bei *Drosophila* in der Regel das Gal4/UAS-System verwendet (Brand et al., 1994; Brand und Perrimon, 1993). Dieses heterologe System besteht aus dem transkriptionellen Aktivator Gal4 aus der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher spezifisch an UAS-Sequenzen (UAS: „upstream activating sequence“) bindet und damit zur Transkription eines beliebigen, hinter die UAS-Sequenzen klonierten Gens führt (Abb. 4). Diese Trennung hat den Vorteil, dass man durch Kreuzung unterschiedlicher Gal4-Stämme mit unterschiedlichen UAS-Stämmen eine große Bandbreite von experimentellen Möglichkeiten hat, da mittlerweile tausende von Gal4-Linien zur Verfügung stehen, die Gal4 gewebe- oder zellspezifisch exprimieren. Ebenso existiert eine Vielzahl an UAS-Konstrukten, welche die Expression sowohl von verschiedensten Zellmarkern als auch beliebigen Entwicklungsgenen ermöglichen. Um die Expressionsstärke zu reduzieren, um z. B. Pulse-Chase-Experimente durchzuführen, kann man die sich entwickelnden Tiere bei 16°C oder 18°C halten, was die Transkriptionsaktivität von Gal4 drastisch verringert, und zum gewünschten Zeitpunkt bei 25°C oder 29°C eine starke Expression des gewünschten Gens induzieren.

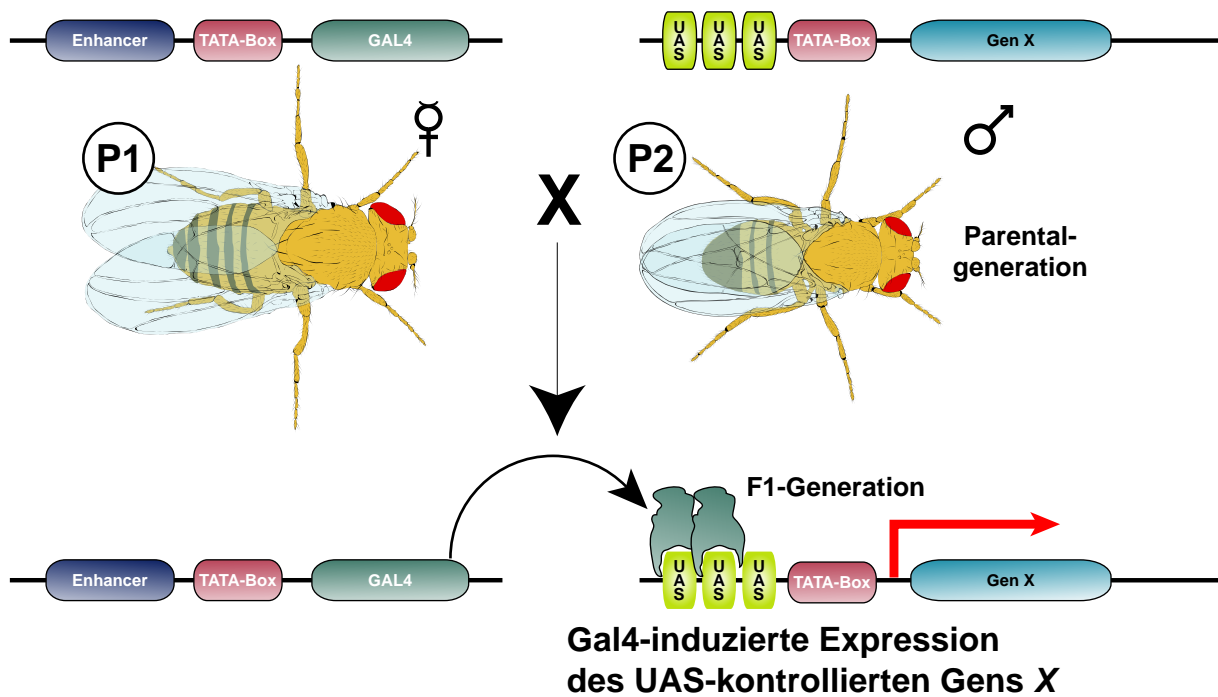


Abb. 4 Schematische Darstellung des Gal4/UAS-Systems

Tiere des Gal4-Stammes (P1) exprimieren Gal4 unter der Kontrolle eines lokalen Enhancers. Diese werden mit Tieren des UAS-Stammes (P2) verkreuzt. In den Nachkommen kann Gal4-Protein an UAS-Sequenzen binden, was zur Aktivierung des dahinter klonierten Gens X führt. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Christian Berger.

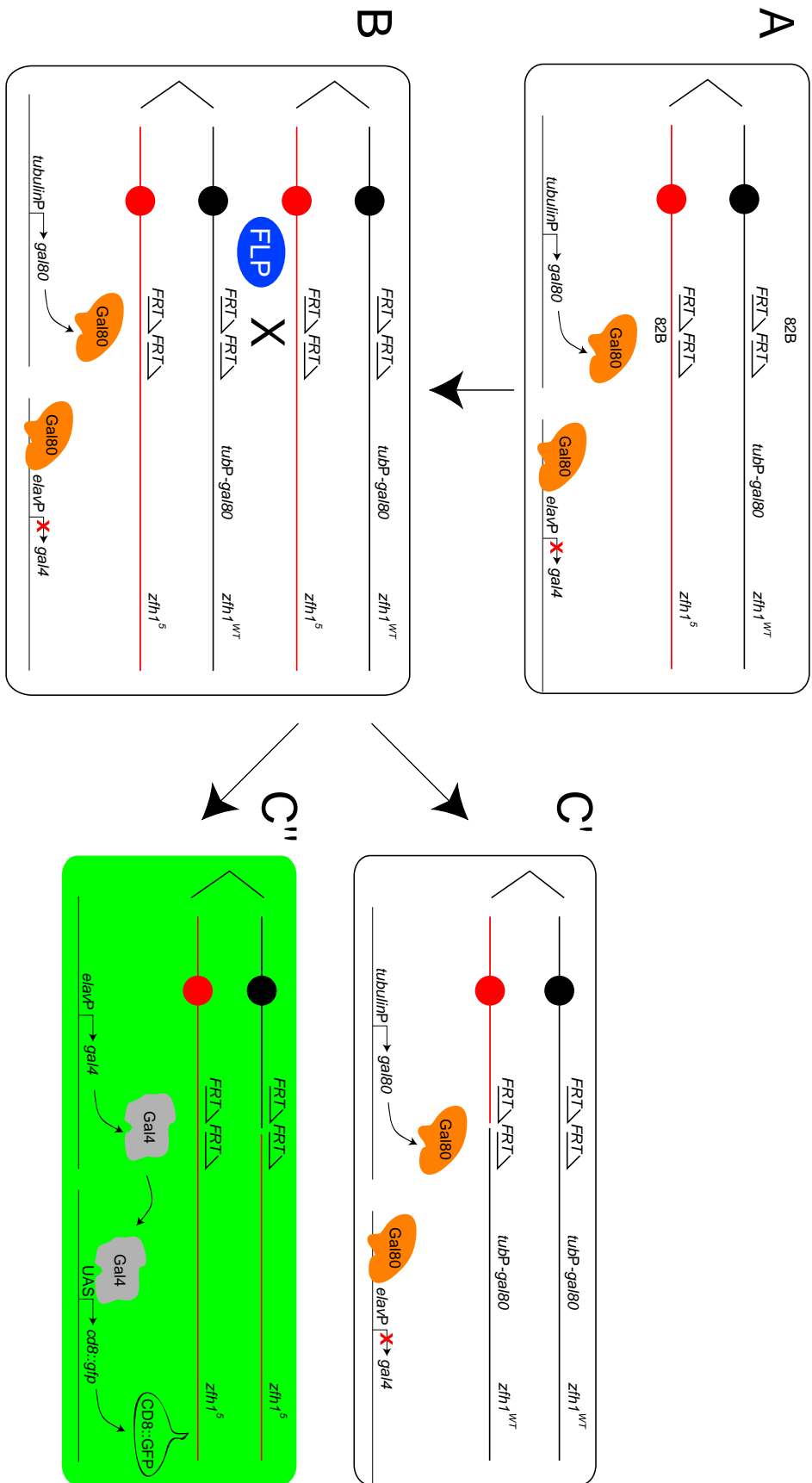
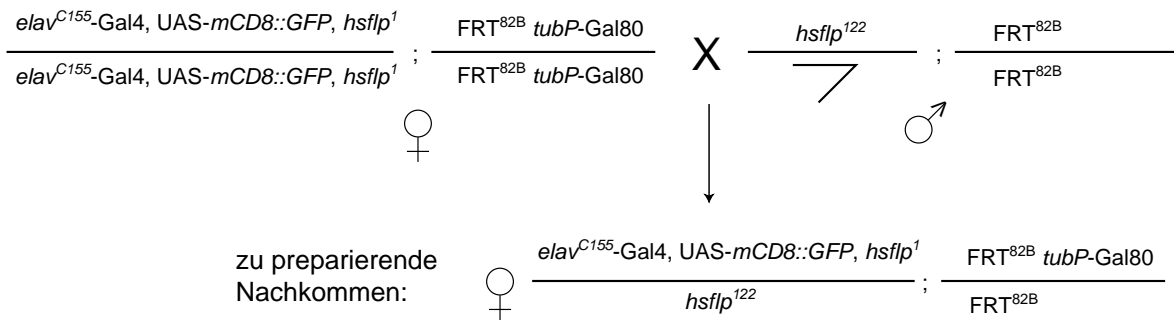


Abb. 5

2.5. Die MARCM-Technik

Mit der Einführung der MARCM-Technik (Lee und Luo, 1999; Lee und Luo, 2001) bei *Drosophila* war es zum ersten Mal möglich, positiv markierte genetische Mosaike von Funktionsverlustmutationen zu generieren. Das Prinzip der Technik beruht auf zwei unterschiedlichen Mechanismen (Gal4/UAS-Technik und FLP/FRT-Rekombination), bei der ein wildtypisches Allel genetisch an ein Gal4-Repressormolekül (Gal80, Ma und Ptashne, 1987) gekoppelt wird, sodass heterozygote Zellen keine Gal4-Aktivität zeigen. Erst durch FLP/FRT-induzierte Rekombination (Golic und Lindquist, 1989; Xu und Rubin, 1993) werden homozygot mutante Zellen erzeugt, was nachfolgend die Aktivierung von Gal4 durch den mit der Rekombination verbundenen Verlust des Gal80-Repressors zur Konsequenz hat. Die Aktivität von Gal4 wird nun genutzt, um beispielsweise membranständiges Maus-CD8-GFP zu exprimieren, sodass man die Gestalt der mutanten Zelle darstellen kann (siehe Schema Abb. 5). Die Technik unterliegt dabei zum einen der Einschränkung, dass man nur jene Klone positiv markiert, die auch Gal4-Expression zeigen würden. Ein *elav*-Gal4 basierter Klon markiert daher nur mutante Neurone, d. h. andere mutante Zellen oder Gewebe werden nicht markiert. Der zweite Nachteil liegt in der großen Menge maternal deponierten Gal80-Proteins aufgrund des verwendeten ubiquitären *tubulin*-Promoters (O'Donnell et al., 1994). Hierdurch wird die Aktivität von Gal4 im Embryo auch dann noch reprimiert, wenn das Promoterkonstrukt selbst schon herausrekombiniert worden ist. Beide Nachteile spielen für Analysen von Larven keine große Rolle, da man den Einfluss pleiotroper Effekte durch Wiederholungsexperimente reduzieren kann und in spätlarvalen Stadien das überschüssige Gal80-Protein längst abgebaut worden ist. Um die niedrige Effizienz, mit der sich im Embryo geborene Motoneurone markieren lassen (Lee und Luo, 1999; Truman et al., 2004), zu verbessern, habe ich das Flippasekonstrukt *hsflp*¹²² verwendet (Kopp et al., 1997; Luschnig et al., 2004), das im Embryo eine sehr viel höhere Aktivität zeigt als die standardmäßig eingesetzte *hsflp*¹.

Kreuzungsschema (wildtypische Klone)



Kreuzungsschema (mutante Klone)

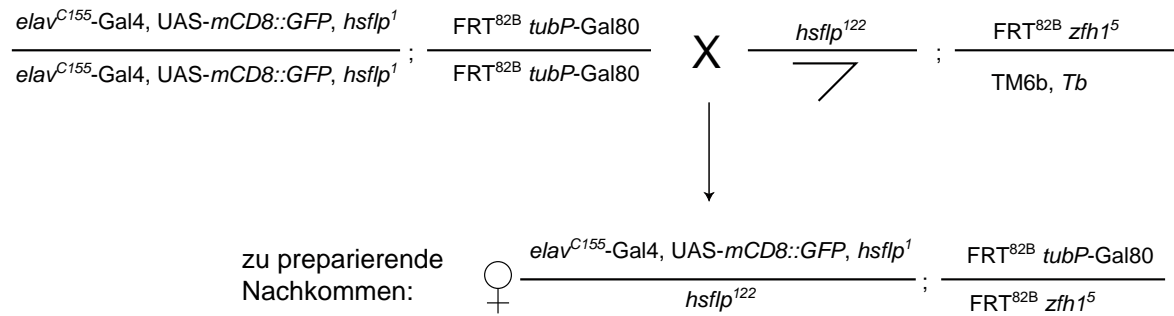


Abb. 6 MARCM Kreuzungsschema

Es sind nur die Genotypen der Eltern und der zu präparierenden Nachkommen angegeben. Die zu erwartende Ausbeute an weiblichen Larven des gewünschten Genotyps beträgt 100% für den Wildtyp und für die Mutanten 50%.

Für die MARCM-Experimente habe ich drei Ausgangsstämme erzeugt, um wildtypische und mutante Klone erzeugen zu können (siehe Kreuzungsschema Abb. 6). Der maternale Ausgangsstamm wurde zuvor verbreitert, sodass man aus einer großen Zahl Zuchtgefäße eine Vielzahl an Jungfrauen absammeln kann. Zu diesen Jungfrauen wurden jeweils Männchen des wildtypischen bzw. mutanten Stammes hinzugefügt und beide Kreuzungen für zwei bis drei Tage angefüttert. Anschließend wurden die Fliegen auf große, mit etwas Trockenhefe versetzte Apfelsaftagar-Röhrchen gesetzt, um bei 25°C für zwei Stunden Eiablagen zu erhalten. Diese 0-2 Stunden alten Embryonen (Stadium 0-4) wurden anschließend für weitere drei Stunden bei 25°C gehalten (Stadium 6-10) und dann für eine Stunde die *hsflp*¹²² bei 37°C aktiviert. Die frühe Neurogenese beginnt im Stadium 8, d. h. nach Ende des Hitzeschocks kann die Flippase in allen segregierten Neuroblasten Rekombination induzieren. Da Motoneurone in der Regel früh geboren werden (Isshiki et al., 2001 und persönliche Mitteilung Christof Rickert), habe ich auf eine späte Induktion der Flippase, d. h. nach Stadium 10, verzichtet.

Nach dem Hitzeschock wurden die Röhrchen zurück auf 25°C gebracht und dort für mindestens weitere zwölf Stunden gehalten. Anschließend schlämmt man die geschlüpften L1-Larven mit Wasser auf und transferiert diese in *Drosophila* Instantmedium, dem man etwas hitzeinaktivierte Hefe zugefügt hat. Dadurch verhindert man einen Überschuss an Lebendhefe, was durch hohe CO₂-Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die larvale Entwicklung haben könnte. Diese Larven hält man dann bei 25°C, bis sie nach etwa vier Tagen das Wanderstadium erreicht haben. An der Gefäßwandung empor kriechende Larven werden mit der Pinzette abgesammelt und anschließend für Antikörperfärbung präpariert (siehe unten). Hierbei ist darauf zu achten, dass man nur weibliche Larven verwendet, da nur sie die Kombination aus *elav*-Gal4 (für die Markierung) und *hsflp*¹²² (für eine effiziente Zahl von Klonen) tragen. Diese lassen sich sehr leicht von männlichen Larven durch die Morphologie ihrer Gonaden unterscheiden. Zudem darf man für mutante Klone nur solche Larven verwenden, die keinen *Tubby* (*Tb*)-

Phänotyp zeigen, da bei diesen keine Rekombination stattgefunden haben kann (vgl. Kreuzungsschema Abb. 6). Für die Visualisierung der Klone und neuromuskulären Verbindungen im Präparat wird anschließend gegen Maus-CD8 (Klon) und Disc-large (Muskel) gefärbt, die Präparate werden eingedeckelt und am konfokalen Lasermikroskop dokumentiert. Für die weiteren Analysen habe ich die Motoneurone aufgrund des Projektionsmusters und der Innervierung des jeweiligen Muskels identifiziert, ihre Häufigkeit notiert sowie die Morphologie wildtypischer und mutanter Klone miteinander verglichen.

2.6. Immunohistochemie

2.6.1. verwendete Antikörper

Antikörper	Tier	Verd.	Herkunft
primäre Antikörper			
anti-Zfh1-a	Maus	1:200	Zhi-Chun Lai
anti-Zfh1-d	Kaninchen	1:2000	Ruth Lehmann
anti-Zfh1-c	Meerschweinchen	1:1000	Jim Skeath
anti-Zfh2	Maus	1:200	Zhi-Chun Lai
anti-Zfh2	Ratte	1:100	Martha Lundell
anti-Omb	Kaninchen	1:1000	Gert O. Pflugfelder
anti-EcR-B1 (15C3)	Maus	1:50	DSHB
anti-FMRFa	Kaninchen	1:1000	Paul Taghert
anti-Proctolin	Kaninchen	1:2000	Dick Nässel
anti-Leucokinin	Kaninchen	1:1000	Rafael Cantera
anti-CCAP	Kaninchen	1:1000	Hans-Jürgen Agricola
anti-Ast (5F10)	Maus	1:20	DSHB
anti-Elav (7E8A10)	Ratte	1:1000	DSHB
anti-βGal (#Z3781)	Maus	1:750	Promega
anti-βGal	Kaninchen	1:1000	Cappel

Antikörper	Tier	Verd.	Herkunft
anti-Maus-CD8	Ratte	1:10	Caltag Laboratories
anti-Repo (8D12)	Maus	1:10	DSHB
anti-Repo (4 α 3)	Kaninchen	1:100	Joachim Urban
anti-Dachshund (2-3)	Maus	1:5	DSHB
anti-Eve	Kaninchen	1:1000	Manfred Frasch
anti-Eve (3C10)	Maus	1:2	DSHB
anti-Fas2 (ID42)	Maus	1:10	DSHB
anti-Fas3 (7G10)	Maus	1:5	DSHB
anti-Dlg	Kaninchen	1:1000	Natalia Sanchez-Soriano
anti-Dlg (4F3)	Maus	1:10	DSHB
anti-Futsch (22C10)	Maus	1:10	DSHB
anti-DvgluT	Kaninchen	1:400	Hermann Aberle
anti-Hunchback	Meerschweinchen	1:1000	Joachim Urban
anti-Eagle	Kaninchen	1:1000	Joachim Urban
anti-pMad	Kaninchen	1:400	Peter ten Dijke
anti-Medea	Kaninchen	1:1000	Laurel Raftery
anti-Sal	Kaninchen	1:50	Rafael Cantera
sekundäre Antikörper			
anti-Kaninchen-FITC	Ziege	1:500	Jackson Labs.
anti-Kaninchen-Cy3	Ziege	1:500	Jackson Labs.
anti-Kaninchen-Cy5	Ziege	1:500	Jackson Labs.
anti-Kaninchen-Biotin	Ziege	1:500	Jackson Labs
anti-Maus-Alexa488	Ziege	1:500	Molecular Probes
anti-Maus-Cy3	Ziege	1:500	Jackson Labs.
anti-Maus-Cy5	Ziege	1:500	Jackson Labs.
anti-Maus-Biotin	Ziege	1:500	Jackson Labs.
anti-Meerschweinchen-Cy3	Ziege	1:500	Jackson Labs.
anti-Meerschweinchen-Cy5	Ziege	1:500	Jackson Labs.

2.6.2. Fixierung der Embryonen für Antikörperfärbung

Eiablagen werden mit dem Pinsel vorsichtig in einen Trichter mit Auffangnetzchen transferiert und anschließend mit 6%iger Chlorbleichlauge für drei Minuten inkubiert, wodurch sich das Chorion ablöst. Danach wird kräftig mit Leitungswasser gewaschen und die dechorionisierten Embryonen werden mit einem Skalpell in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches ein zweiphasiges Gemisch aus einem Volumen Heptan und einem Volumen Fixativ (4% Formaldehyd in 1xPBS) enthält. Das verschlossene Gefäß wird 20 bis 25 Minuten auf dem Rüttler inkubiert, anschließend die Fixativphase (i. d. R. untere Phase) entfernt und durch dasselbe Volumen Methanol ersetzt. Durch kräftiges Schütteln verlieren die Embryonen an der Grenzfläche zwischen Heptan und Methanol die Vitellinhülle und sinken auf den Boden des Reaktionsgefäßes ab. Die Methanolphase wird entfernt und noch zweimal erneuert und geschüttelt. Dann entfernt man das Heptan vollständig und wäscht mehrere Male mit Methanol. Die so fixierten Embryonen können über einen längeren Zeitraum bei -20°C in Methanol aufbewahrt werden. Für Antikörperfärbungen müssen die Embryonen wieder rehydriert werden, d. h. man ersetzt das Methanol durch 50% Methanol/PBT und dann durch PBT.

2.6.3. Präparation spätlarvaler Gehirne und Bauchmark

Für Antikörperfärbungen am larvalen ZNS muss dieses aus Larven des gewünschten Stadiums freipräpariert werden. Die Präparation erfolgt unter dem Binokular mittels zweier feiner Pinzetten (Fine Science Tools 55) in PBS. Die Larven werden dorsal im vorderen Viertel geöffnet und der Kopf wird vorsichtig vom Rest der Larve entfernt, ohne das Bauchmark abzureißen. Anschließend entfernt man Reste des Darmes und transferiert das Präparat in eiskaltes PBS. Hat man genügend präpariert, ersetzt man das PBS durch Fixativ und inkubiert eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Fixierung tauscht man das Fixativ durch PBT und wäscht mehrere Male. Nachdem man die Antikörperfärbung (siehe unten) durchgeführt hat, lässt man die Gehirne

über Nacht in 70% Glycerol und präpariert anschließend unter dem Binokular die Nervensysteme frei.

2.6.4. Präparation von Embryonen des Stadium 17 und L1-Larven

Um Antikörperfärbungen an späten Embryonen mit schon ausgebildeter Kutikula oder an L1-Larven durchzuführen, muss die Kutikula vorher geöffnet werden. Weil sich zudem eine fixierte Kutikula nicht mehr in eine für die Analyse notwendige flache Form bringen lassen würde, muss die Präparation vor der Fixierung geschehen. Die Larve wird auf sylgardbeschichteten Deckgläschen verankert; hierzu verwendet man Histoacryl-Gewebeklebstoff (Braun, Melsungen). Um den Klebstoff dosieren zu können, nimmt man eine fein ausgezogene Kapillare (GB 100-T8P, Science Tools) mit einem feinen Schlauch und einer umgekehrt aufgesteckten 1ml-Pipettenspitze als Mundstück. Die Präparation erfolgt in Brodie&Bate(B&B)-Puffer, der normalerweise für Elektrophysiologie verwendet wird und den Klebstoff nicht zu schnell aushärten lässt (Brodie und Bate, 1993). Mit einer zweiten Glaskapillare wird die Larve, falls nötig, bewegt. Nachdem man mit zwei Tropfen Klebstoff die Larve gestreckt fixiert hat, wird mit zwei feinen Nadeln (im Elektrolysebad ausgedünnte Wolframnadeln, TW 5-3, Science Tools) die Kutikula durch Scherbewegungen aufgeschnitten und mit einer breiteren Kapillare der Darm abgesaugt. Anschließend spannt man mit vier Klebstofftropfen die Larve auf und ersetzt den B&B-Puffer durch PBS und dann durch Fixativ (4% Paraformaldehyd). Nach der Fixierung (45 min) wird mindestens für eine Stunde mit PBT gewaschen und die Antikörperfärbung auf dem Deckgläschen in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um das Präparat später wieder abzulösen, wird es mit kleinen Splittern einer Rasierklinge von den Klebepunkten abgeschnitten und mit einer Nadel vorsichtig auf einen Objektträger überführt. Diese Methode bietet sich für die Darstellung larvaler neuromuskulärer Verbindungen ebenso an wie für Färbungen des frühlarvalen ZNS, da dieses im Präparat fixiert bleibt.

2.6.5. Präparation der peripheren Muskulatur von späten L3-Larven im Wanderstadium

Wanderlarven werden auf Sylgard 184-beschichteten Schälchen in einem Tropfen PBS mit feinen Nadeln festgesteckt und mit einer feinen Schere (Fine Science Tools Nr. 15004-08) entlang der dorsalen (bzw. ventralen) Mittellinie aufgeschnitten. Entscheidend hierfür ist, ob man die dorsale oder ventrale Muskulatur darstellen möchte. Für die dorsale Muskulatur öffnet man die Larven ventral und umgekehrt. Anschließend wird die aufgeschnittene Larve mit weiteren Nadeln aufgespannt und der Darm vorsichtig entfernt. Auf diese Weise lassen sich etwa 15 Larven innerhalb eines Schälchens präparieren. Dann ersetzt man das PBS durch Fixativ und inkubiert unter dem Abzug für 45 Minuten. Das Fixativ wird durch PBT ersetzt und die Larven werden für mindestens eine Stunde gewaschen. Mit der Pinzette werden vorsichtig Fettkörper und Tracheen entfernt, danach kann man die Nadeln entfernen und die Präparate in Reaktionsgefäße mit PBT überführen und die Antikörperfärbung durchführen. Indem man zuvor Larven verschiedener Genotypen individuell anschneidet (z. B. das Hinterende, das Vorderende, beide), kann man Präparate mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund unter identischen Bedingungen inkubieren und hat somit eine hervorragende experimentelle Kontrolle.

2.6.6. Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Die verwendeten primären Antikörper wurden in der vorgegebenen Verdünnung in PBT mit 0,01% Natriumazid als Konservierungsmittel angesetzt. Die Embryonen und Präparate wurden in der Regel über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nachdem mehrere Male mit PBT gewaschen wurde, inkubiert man für zwei bis drei Stunden in einer Lösung der sekundären Antikörper und wäscht anschließend erneut mehrere Male mit PBT.

2.6.6.1. Fluoreszenzfärbung

Für Fluoreszenzfärbungen verwendet man normalerweise mit FITC-, Alexa488-, Cyanin3- oder Cyanin5-Farbstoff konjugierte sekundäre Antikörper. Nachdem man überschüssigen Antikörper abgewaschen hat, werden die Präparate mit PBS gewaschen und anschließend in 70% Glycerol bei 4°C dunkel gelagert. Für die Analyse am Fluoreszenzmikroskop oder konfokalen Lasermikroskop werden die Präparate in „Mounting Medium“ (Vectashield) überführt, ein Deckgläschen wird aufgebracht und mit Nagellack versiegelt.

Da einige Antikörper nur ein sehr schwaches Signal liefern, muss dieses künstlich verstärkt werden. Dies wurde mit dem TSA-Kit (Tyramide Signal Amplification Kit, Perkin Elmer) erreicht.

2.6.6.2. Sichtbare Färbung mit Biotin und DAB

Sichtbare Färbungen von Embryonen wurden mittels Biotin-gekoppelter sekundärer Antikörper durchgeführt. Zu diesen Biotinmolekülen wird nach mehrmaligem Waschen ein zuvor angesetzter Avidin-Streptavidin-Meerrettichperoxidasekomplex (AB-Komplex, Vectastain Elite ABC, Vector Labs) hinzugegeben und inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBT wird nun eine Lösung aus DAB (Diaminobenzidin) und 0,03% H₂O₂ zugegeben. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von DAB zu einem bräunlichen Niederschlag. Die Farbreaktion kann unter dem Binokular verfolgt und bei genügender Differenzierung durch Waschen mit PBT beendet werden. Die Embryonen werden anschließend in PBS und dann in 70% Glycerol überführt und für die mikroskopische Analyse eingedeckelt.

2.6.7. Bestimmung der Größe neuromuskulärer Verbindungen

Für den Größenvergleich von neuromuskulären Endplatten verschiedener Genotypen wurde bei spätlarvalen Stadien (Wanderlarven) die Zahl der anti-Dlg-positiven Typ-Ib-Boutons eines definierten Muskels bestimmt und die Muskeloberfläche vermessen (analySIS-Software, SIS). Der Quotient aus Boutonzahl und Muskeloberfläche stellt ein standardisiertes Maß für die Größe einer

neuromuskulären Verbindung dar. Änderungen diese Größe wurden durch statistische Auswertung auf ihre Signifikanz hin überprüft (SigmaStat 3.0, SPSS).

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. Präparation von DNA

Für die meisten molekularbiologischen Arbeiten an DNA benötigt man diese in größeren Mengen, weshalb sie in der Regel als Plasmid-DNA kloniert vorliegt. Durch Transformation kompetenter Bakterien kann diese vermehrt und nachfolgend chemisch und chromatographisch aufgereinigt werden (alkalische Lyse und Aufreinigung an Silicasäulen, Plasmid Mini Kit, QIAGEN). Für die Injektion von P-Element-DNA in *Drosophila*-Embryonen wurde Plasmid-DNA im Midi-Maßstab gewonnen und aufgereinigt (Plasmid Midi Kit, QIAGEN). Zur Analyse genomischer *Drosophila*-DNA (z. B. für inverse PCR, siehe unten) werden Wanderlarven in einem salz- und detergenzhaltigen Puffer zermahlen und bei 65°C inkubiert. Anschließende Salzfällung mit Lithiumchlorid/Kaliumazetat-Lösung und ethanolische Fällung liefert relativ saubere genomische DNA, die man durch Phenol-Chloroform-extraktion weiter aufreinigen kann. Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde diese elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten, Agarose mit Guanidinthiocyanat aufgelöst, die DNA an Silicasäulen gebunden und in Tris-Puffer eluiert (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN).

2.7.2. Herstellung von cDNA aus *Drosophila*-Embryonen

Bei cDNA handelt es sich um revers-komplementär transkribierte RNA, die mir als Vorlage diente, um alternative Spleißformen von *zfh2* zu bestimmen. In einem ersten Schritt wird aus Embryonen später Entwicklungsstadien Gesamt-RNA aufgereinigt (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) und anschließend die polyadenylierte mRNA durch reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern (Invitrogen) und reverser Transkriptase (*Superscript II*, Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Die entstandenen RNA:DNA-

Heteroduplexe werden dann mit NaOH inkubiert, um den RNA-Anteil zu hydrolysieren, mit HCl neutralisiert und die DNA-Einzelstränge aufgereinigt (PCR Purification Kit, QIAGEN). Die Ausbeute für einen Embryo liegt bei etwa 1ng polyA⁺-RNA, was für die Abschätzung der zu erwartenden Ausbeute einberechnet werden muss.

2.7.3. PCR und Sequenzierung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erlaubt die Amplifikation definierter DNA-Fragmente ausgehend von unterschiedlichsten DNA-Matrizen. In dieser Arbeit wurden durch PCR an embryonaler *zfh2*-cDNA mit *Taq*-DNA-Polymerase (Fermentas) verschiedene Transkripte amplifiziert (RT-PCR) und auf alternatives Spleißen untersucht (Primersequenzen siehe Anhang). Des Weiteren wurden definierte Abschnitte der *zfh2*-cDNA mit einer fehlerkorrigierenden Polymerase (*Pfu*-Polymerase, Fermentas) amplifiziert. Diese Abschnitte sollten benutzt werden, um zu einer vollständigen cDNA zusammengesetzt zu werden, weshalb auf eine geringe Fehlerrate Wert gelegt wurde. Sofern die PCR-Produkte kloniert werden mussten, wurde sie aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) und in einen kommerziellen T-Vektor kloniert (TOPO Cloning Kit, Invitrogen). Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise, Mainz, durchgeführt.

2.7.4. Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese

Sowohl zur molekularen Charakterisierung (analytischer Verdau) als auch für die Herstellung zueinander kompatibler DNA-Enden für neue Konstrukte wird DNA mit Restriktionsenzymen versetzt und in der Regel bei 37°C inkubiert. Alle hier eingesetzten Enzyme stammen von Fermentas und New England Biolabs. Zur weiteren Analyse der DNA nach Restriktion oder PCR wird diese im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Konzentration der Agarose betrug zwischen 0,5% für sehr große (> 3kb) und 1% für kleine DNA-Fragmente (< 1kb). Als Elektrophoresepuffer wurde ausschließlich TAE-Puffer verwendet und das EtBr vor

dem Gießen des Gels zur warmen Agaroselösung zugegeben. Als Größenreferenz wurden verschiedene DNA-Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung mit aufgetrennt (λ -DNA x *HinDIII*, GeneRuler 100bp-Ladder-plus, beide Fermentas).

2.7.5. Konstruktion von P-Elementen und die Herstellung transgener Fliegen

In dieser Arbeit habe ich transgene Fliegen durch P-Element-Transformation mit zwei unterschiedlichen P-Elementen hergestellt (UAS-*zfh1*^{WT}, UAS-*zfh1*^{RNAi}). Zur gezielten Überexpression von *Zfh1* mit UAS-*zfh1*^{WT} wurde ein 4,8kb *EcoRI*-Fragment von *zfh1* aus dem Klon p19A (*zfh1* in pBluescript KS-II, Z.C. Lai) in gleichfalls mit *EcoRI*-verdauten pUAST-Vektor einligiert und kloniert (Brand und Perrimon, 1993). Um *zfh1* mit Hilfe der RNA-interference-Technik (RNAi) gezielt abzuschalten (Packard et al., 2002), wurde durch PCR ein Teil von *zfh1* amplifiziert und zweimal gerichtet in einen besonderen UAS-RNAi-Vektor inkloniert, sodass durch Gal4-induzierte Transkription eine für den RNAi-Effekt notwendige Haarnadelstruktur dieses *zfh1*-Transkriptes entsteht (Nagel et al., 2002).

Die P-Element-DNA der fertigen Konstrukte wurde im Midi-Maßstab amplifiziert und aufgereinigt. Anschließend injiziert man sie zusammen mit einem plasmidären *transposase*-Gen in den posterioren Pol *white*-mutanter *Drosophila*-Embryonen (Stadium 1-3, synzytiales Blastoderm). Als Reportergen tragen beide P-Elemente ein Mini-*white*-Gen, um erfolgreiche Integrationsereignisse in das Genom normalerweise *white*-mutanter, weißäugiger Fliegen erkennen zu können. Sofern der Transposase die Integration des P-Elements in die embryonalen Polzellen (Keimbahnzellen) gelungen ist, entstehen nach erneuter Kreuzung mit *white*-mutanten Fliegen transgene Nachkommen, die eine rötliche Augenfarbe aufweisen.

2.7.6. Bestimmung der Integrationsorte von P-Elementen durch inverse PCR und Plasmid-Rescue

Die bei der Herstellung transgener Fliegen verwendeten P-Elemente besitzen grundsätzlich ein Markergen, mit dem sich das Vorhandensein des P-Elementes überprüfen lässt (z. B. *white*-Minigen, *rosy*-Gen, *neomycin*-Resistenzgen). Durch andere dominante Marker ist es dann sehr einfach, das Chromosom zu bestimmen, auf dem der Integrationsort liegt. Den chromosomalen Abschnitt kann man durch in situ-Hybridisierung an Polytänochrosomen auf 100-200kbp genau bestimmen, jedoch ist dies relativ aufwendig und für manche Anwendung zu ungenau (z. B. Nutzung von P-Element-Linien als hypomorphe oder amorphe Allele). Der Integrationsort lässt sich allerdings sehr exakt dadurch bestimmen, dass man die das P-Element umgebende genomische Sequenz durch molekularbiologische Methoden amplifiziert und sequenziert. Diese Methoden, inverse PCR und Plasmid-Rescue, sind sich insofern ähnlich, als dass durch die Wahl eines geeigneten Restriktionsenzym beim Verdau transgener genomischer DNA ein Fragment entstehen soll, welches einen P-Element-Anteil und flankierend ein Stück unbekannter genomischer DNA enthält. Dem Restriktionsverdau schließt sich ein Ligationsschritt an, bei dem alle Restriktionsfragmente durch Inkubation mit T4-DNA-Ligase zirkularisiert werden. Sofern auf dem P-Element-Anteil ein „origin-of-replication“ (ori) und ein Resistenzgen (in der Regel Ampicillin) liegen, kann man das gewünschte Fragment durch Transformation kompetenter Bakterien klonieren und sequenzieren („Plasmid Rescue“). Fehlen diese für die bakterielle Amplifikation notwendigen Komponenten oder ist das „Rescue“-Fragment zu groß, lässt sich alternativ der genomische Bereich durch auf dem P-Element-Anteil liegende, entgegengesetzt orientierte Primer mittels PCR amplifizieren (inverse PCR). Für die inverse PCR nimmt man normalerweise Restriktionsenzyme, die häufiger schneiden (alle 256bp), um kleine Fragmente zu erzeugen und die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche PCR zu erhöhen. Ich habe beide Methoden für eine Reihe von P-

Element-Linien durchgeführt und so die Lokalisation der P-Elemente bestimmt (siehe Tab. 1 und Anhang).

Tab. 1 Bestimmung der Insertionsorte einiger P-Element Linien

Stamm	Restriktionsenzym(e)	Methode
<i>zfh2^{LP30}</i>	<i>SalI</i>	Plasmid Rescue
<i>hsflp¹²²</i>	<i>HpaII / MboI / Hin6I</i>	inverse PCR
UAS- <i>mCD8::GFP</i> (X. Chr.)	<i>HpaII / MboI / Hin6I</i>	inverse PCR
UAS- <i>zfh1</i> (eigene Linien)	<i>HpaII / MboI / Hin6I</i>	inverse PCR

2.8. Chemikalien, Lösungen und Geräte

siehe Anhang

2.9. Dokumentation, Software

siehe Anhang

3. Ergebnisse

A. Molekulare und funktionelle Charakterisierung des *zfh2*-Gens

Zfh2 wurde 1991 erstmals isoliert und beschrieben (Screen zur Identifizierung von opsin Regulatoren: Fortini et al., 1991; Lai et al., 1991). Durch Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, dass Zfh2 stark im embryonalen ZNS exprimiert wird - über die Funktion von Zfh2 ist allerdings sehr wenig bekannt. Da die Messenger-RNA von *zfh2* mit 10,5kb ein verhältnismäßig langes Transkript ist, sahen die Autoren damals keine Möglichkeit, das gesamte Transkript zu klonieren. Stattdessen wurden einander überlappende Klone isoliert und sequenziert und die vollständige Sequenz daraus abgeleitet. Die Analyse von Northern-blot ergab drei detektierbare Banden auf dem Blot. Färbungen mit Antikörper an fixierten Embryonen, die gegen verschiedene Bereiche von Zfh2 gerichtet waren, zeigten jedoch übereinstimmende Muster. Hieraus schlossen die Autoren, dass nur ein offener Leserahmen verwendet und damit auch nur ein Protein gebildet werden würde. Dies habe ich in der vorliegenden Arbeit durch reverse Transkription der mRNAs von *zfh2* überprüft. Ich konnte feststellen, dass *zfh2* wahrscheinlich für eine Vielzahl von alternativen Spleißformen und damit ähnlichen, aber unterschiedlichen Zfh2-Proteinen kodiert.

Trotz des auffälligen neuralen Expressionmusters von Zfh2 war zudem über die Notwendigkeit der Funktion von *zfh2* während der Neurogenese nicht viel bekannt. Für diese funktionelle Analyse von Zfh2 wurde eine Funktionsverlustmutante von *zfh2* (*zfh2*^{LP30}, zur Verfügung gestellt von Ernesto Sanchez-Herrero, Madrid) durch Carola Döffinger in ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung charakterisiert. Sie hat des Weiteren Northern-blot-Analysen von *zfh2* durchgeführt, um die von mir bestimmten alternativen Spleißformen zu überprüfen.

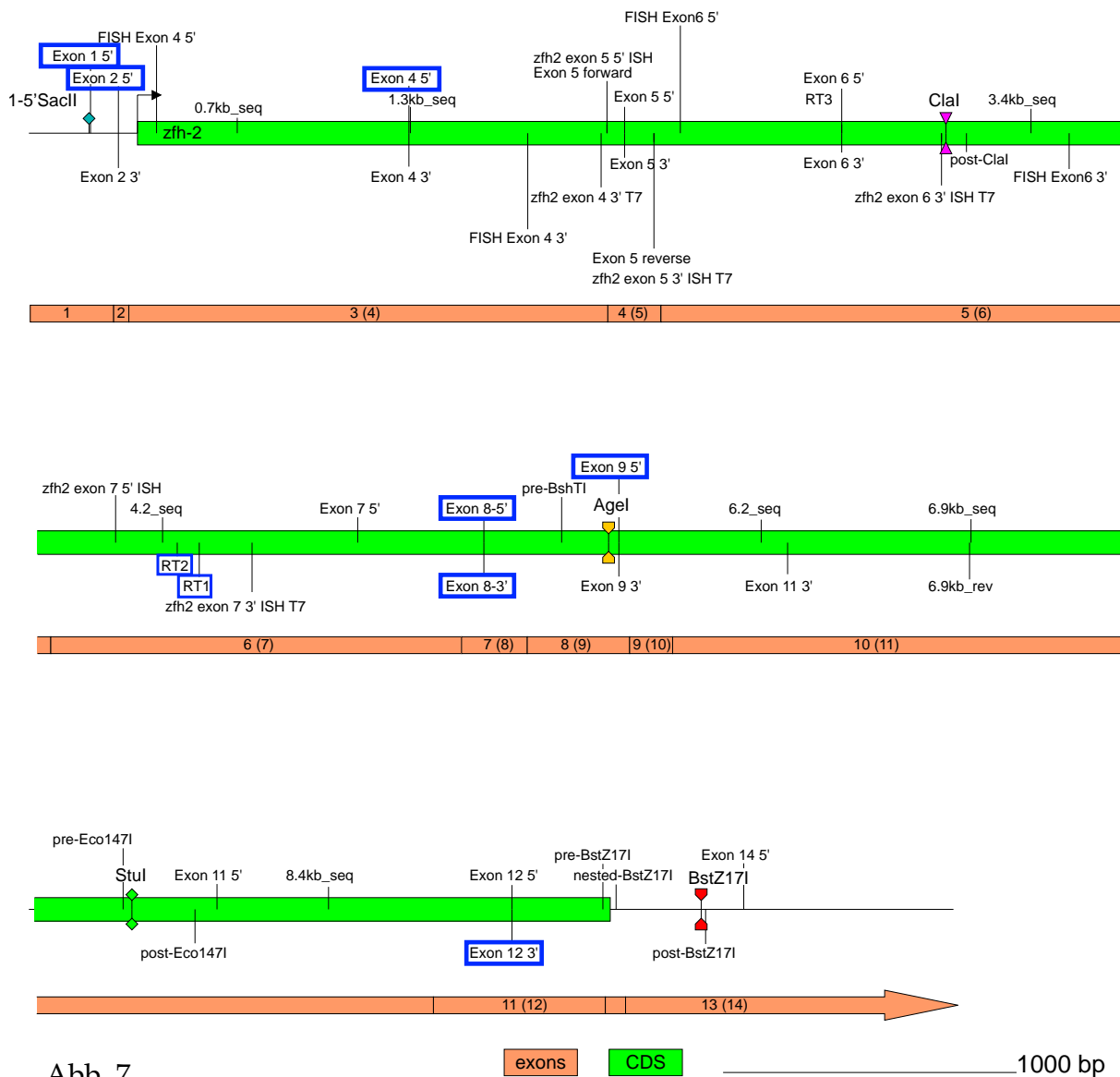


Abb. 7

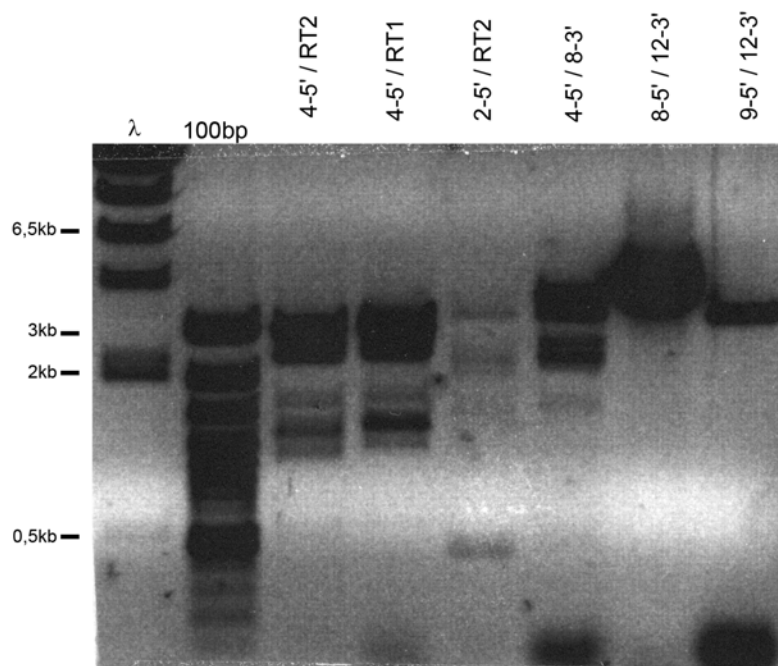


Abb. 8

3.1. Molekulare Analyse und Klonierung der cDNA von *zfh2*

Die Vielzahl an Zinkfinger- (16) und Homöodomänen (3) von Zfh2 sowie die detektierten drei Banden der Northern-blots ließen vermuten, dass mehrere Zfh2-Proteine mit unterschiedlicher Domänenzusammensetzung existieren könnten (Fortini et al., 1991; Lai et al., 1991). Des Weiteren existierten bis dato weder eine vollständige klonierte *zfh2*-cDNA noch UAS-P-Element-Linien zur gezielten Überexpression von Zfh2 oder Konstrukte zur Rettung von Phänotypen. Durch RT-PCR an wildtypischen Embryonen konnte ich verschiedene alternative Spleißformen von *zfh2* nachweisen sowie die vollständige cDNA von *zfh2* klonieren.

3.1.1. Identifizierung alternativer Spleißformen

Basierend auf der publizierten Sequenz des vermutlichen Transkriptes von *zfh2* (Genbank Nr. M63450) habe ich verschiedene Oligonukleotide entworfen, die eine Amplifizierung definierter Bereiche dieses Transkriptes ausgehend von synthetisierter embryonaler cDNA ermöglichen sollten (Abb. 7). Die Verwendung des XL-PCR-Kits (Roche) sollte dabei sicherstellen, dass bei den zu erwartenden Größen der Amplikons von bis zu ca. 4kb (in der Kombination Primer 1-5' und Primer RT1) überhaupt PCR-Produkte entstehen können.

Die RT-PCRs zeigen für unterschiedliche Bereiche der cDNA eine unterschiedliche Anzahl von Produkten (Abb. 8). Diese beinhalten sowohl Fragmente der erwarteten Länge als auch kürzere Produkte. Dies deutet stark darauf hin, dass unterschiedliche

Abb. 7 Verteilung der für die molekulare Analyse von *zfh2* synthetisierten Primer

Die blau umrahmten Primer bezeichnen die für die Charakterisierung der Spleißformen verwendeten Primer. (Sense-Primer liegen oberhalb, Antisense-Primer unterhalb der CDS). Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme (*SacII*, *Clal*, *AgeI*, *StuI*, *BstZ17I*) sind durch farbige Symbole gekennzeichnet. Die Exons (orange) tragen zwei Bezeichnungen, wobei die in Klammern stehenden Zahlen eine künstlich verwendete Nummerierung darstellen, die sich in den Namen der Primer wieder findet.

Abb. 8 Identifizierung unterschiedlicher Spleißformen von *zfh2*

Durch Primer der Exons 3 bis 7 lassen sich mehrere Amplikons erzeugen, während sich zwischen Exon 7 bzw. 8 und 11/12 nur eine Bande nachweisen lässt. λ , 100bp: DNA-Marker zur Größenabschätzung (λ x *HinDIII* und GeneRuler 100bp Ladder). 4-5' / RT2, 4-5' / RT1, 2-5' / RT2, 4-5' / 8-3', 8-5' / 12-3' und 9-5' / 12-3' entsprechen verschiedenen Kombinationen von Primerpaaren (siehe vorherige Abb.).

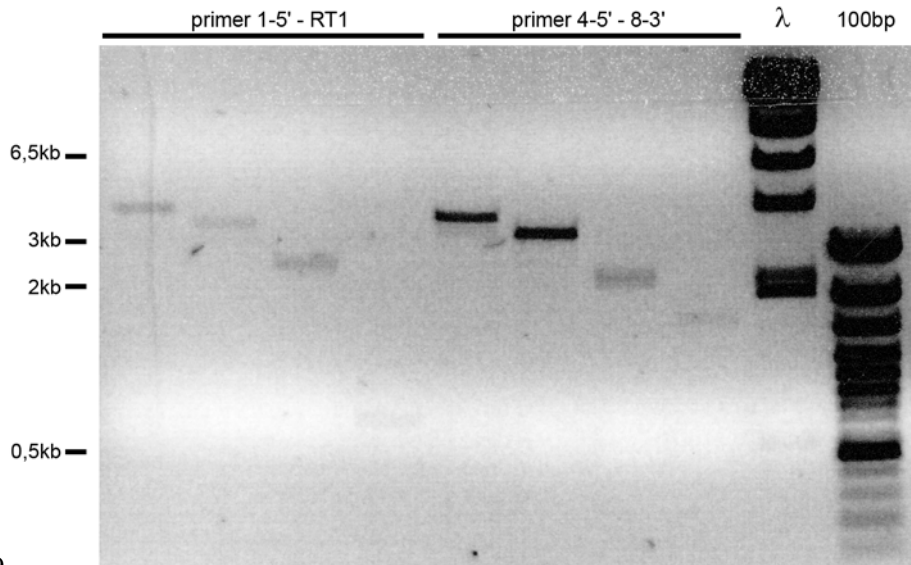


Abb. 9

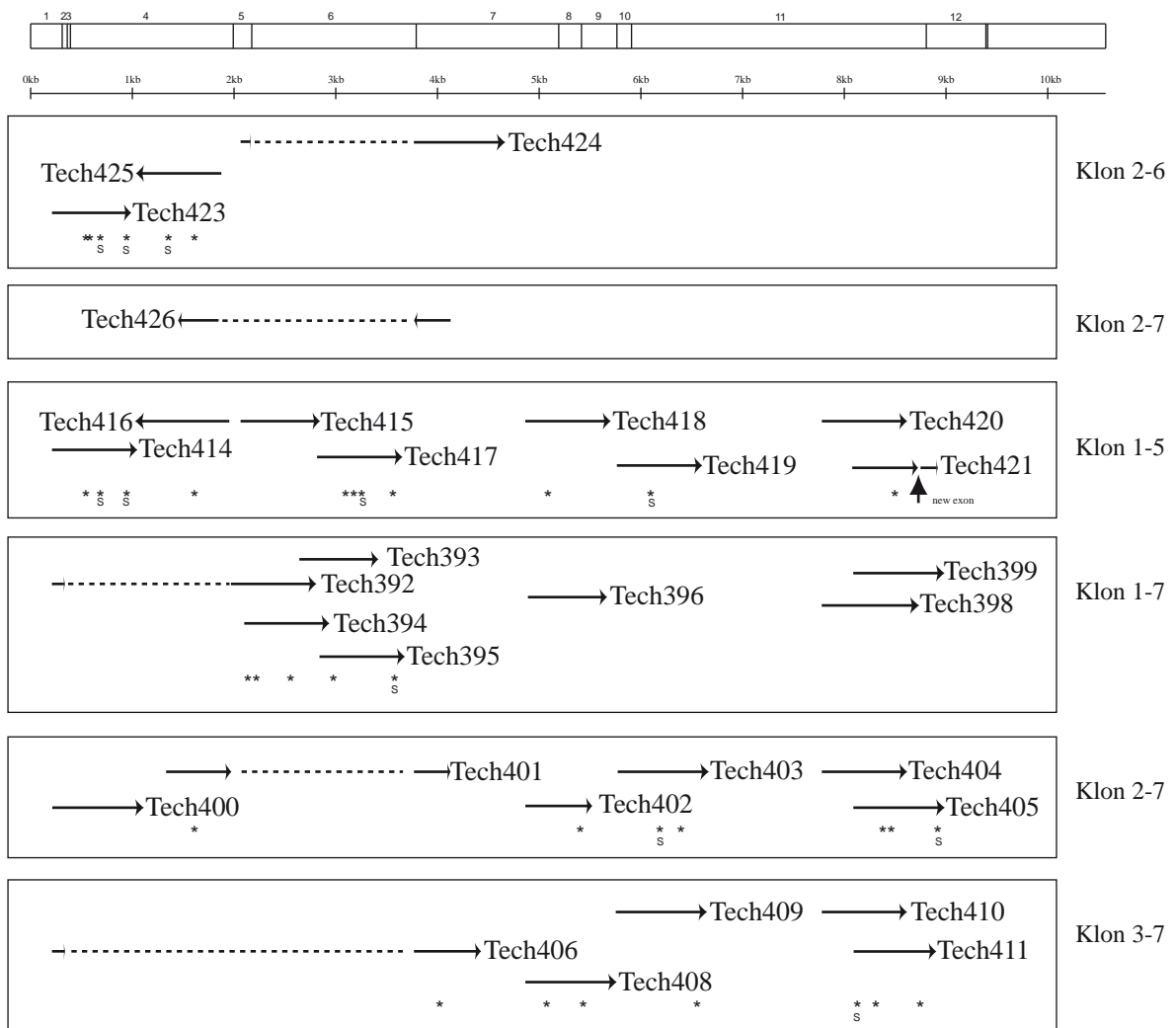


Abb. 10

zfh2 Transkripte existieren, die als Vorlage für die PCR dienen können. Da bei anderen RT-PCRs, mit welchen die Bereiche von Exon 7/8 bis Exon 11 amplifiziert wurden, nur eine Bande der erwarteten Größe auftritt, scheinen sich die Spleißformen nur im 5'-Bereich und damit am N-Terminus des Zfh2-Proteins zu unterscheiden. Zur weiteren Charakterisierung dieser Spleißformen wurden die PCR-Produkte durch Gelextraktion isoliert und anschließend kloniert und sequenziert (Abb. 9 und 10). Weil unterschiedliche 5' und 3' Primer verwendet wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass die Vielzahl an Amplikons durch unspezifisches Binden der Primer zustande kommt. Eine weitere Ursache für PCR-Produkte unterschiedlicher Größe hätte in der Amplifikation heterogener nukleärer RNA (hnRNA, primäres Transkript von *zfh2* mit Introns und ohne polyA-Schwanz) liegen können, die dann aber zu größeren Amplikons hätten führen müssen. Weil durch die Verwendung von Oligo-(dT)_n-Primern bei der reversen Transkription nur polyadenylierte mRNAs in cDNA umgeschrieben werden, sollte diese Möglichkeit aber ausgeschlossen werden. Tatsächlich war keines der detektierten PCR-Produkte größer als erwartet, d. h. es wurden keine Primärtranskripte amplifiziert. Zudem habe ich bei der Sequenzierung auch keine Intronsequenzen gefunden, d. h. es wurde keine teilweise gespleißte mRNA in detektierbaren Mengen amplifiziert. Alle klonierten PCR-Produkte ließen sich sequenzieren und setzen sich aus verschiedenen Kombinationen von Exons zusammen, d. h. sie repräsentieren unterschiedliche Spleißformen von *zfh2*. Neben der publizierten Spleißform (Fortini et al., 1991) konnte ich weitere Isoformen identifizieren, die sich letztlich in einer unter-

Abb. 9 Isolierte Amplikons zweier RT-PCR-Ansätze

Die bei der RT-PCR entstandenen Amplikons wurden durch Gelextraktion isoliert, um sie anschließend zu klonieren und zu sequenzieren. λ , 100bp: DNA-Marker zur Größenabschätzung. 1-5' – RT1 und 4-5' – 8-3' sind die für diese RT-PCRs verwendeten Primerpaare.

Abb. 10 Sequenzierte Klone mit unterschiedlichen Spleißformen

Die horizontalen Pfeile geben an, welcher Bereich der cDNA durch die Sequenzierung abgedeckt wurde. Die gestrichelten Linien zeigen jene Exons, die in dem jeweiligen Klon nicht vorhanden sind. Im Klon vorliegende Punktmutationen sind durch ein „*“ gekennzeichnet, stille Substitutionen zusätzlich durch ein „S“. Klon 1-5 enthält ein neues, zuvor nicht beschriebenes Exon, das in anderen Klonen fehlt (vertikaler Pfeil).

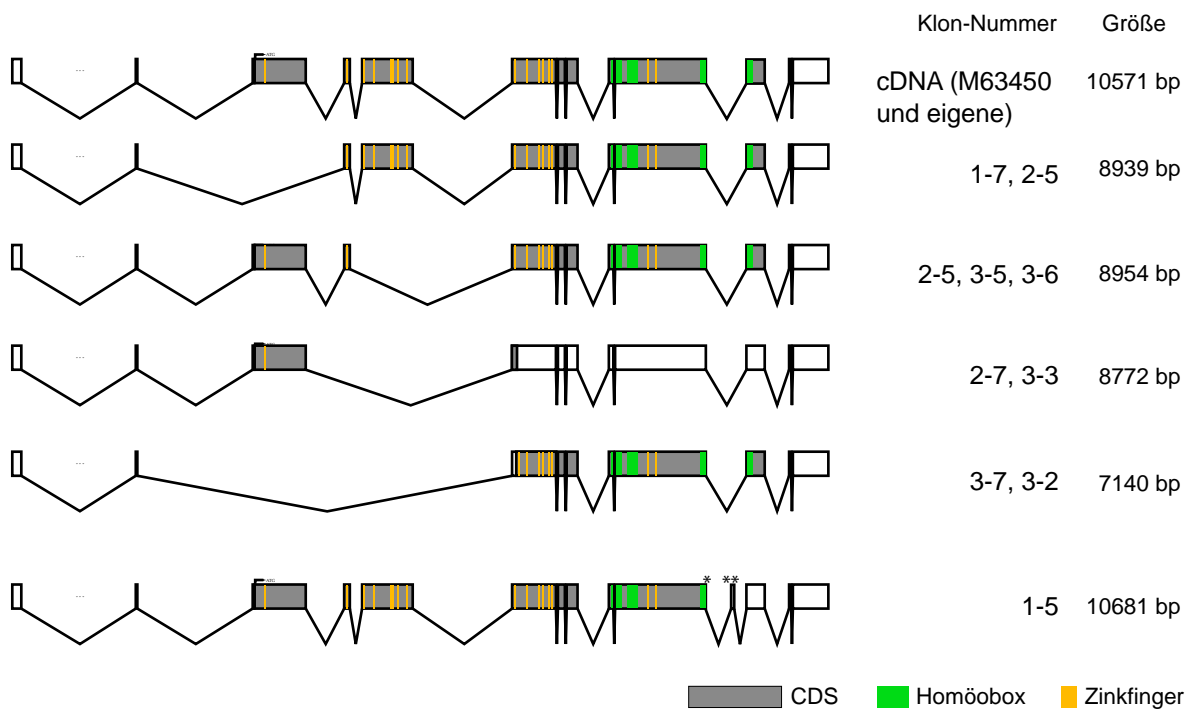


Abb. 11 Übersicht über die klonierten Spleißvarianten und möglichen Proteine

Die charakterisierten Spleißformen lassen sich in drei Größenordnungen sortieren (10,5kb / 8,9kb / 7,1 kb). Die verkürzte Homöobox 3 in Klon 1-5 ist durch ein „*“ gekennzeichnet, das neue alternative Exon 11 durch „**“.

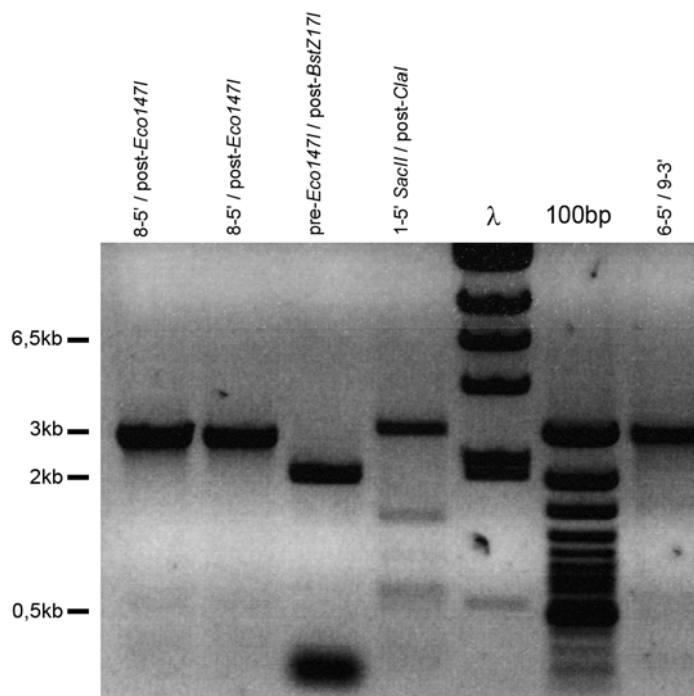


Abb. 12 Mit *Pfu*-Polymerase amplifizierte Teilstücke von *zfh2*

Die multiplen Banden in Spur 4 kommen höchstwahrscheinlich durch alternative Spleißformen zustande. λ, 100bp: DNA-Marker zur Größenabschätzung.

schiedlichen Anzahl und Zusammensetzung der N-terminalen Zinkfinger äußern (Abb. 11). Der C-terminale Bereich, in welchem sich die Homöodomänen befinden, wäre nur in einer Spleißform (Klon 1-5) betroffen. Diese zeichnet sich durch das Vorhandensein eines zwischen Exon 10 und Exon 11 inserierten, sehr kurzen Exons (110bp) aus, welches durch die Intronsequenzen „...AG“ und „GT..“ flankiert wird. Das Vorhandensein dieses Exons würde zu einem frühzeitigen Stopp des Proteins innerhalb der dritten Helix der Homöodomäne 3 führen. Der Vergleich der genomischen Sequenz zwischen *Drosophila melanogaster* und *D. pseudoobscura* zeigt in diesem Bereich kaum Konservierung. Die näher verwandten Arten *Drosophila simulans* und *D. yakuba* zeigen diese Spleißstellen allerdings noch.

Außerdem wurden zwei Klone (Klone 2-7, 3-3) identifiziert, in denen die Exons 4 und 5 herausgespleißt sind. Das Fehlen dieser Exons würde zu einem stark verkürzten Protein mit nur einem Zinkfinger führen. Ob das dadurch entstehende Transkript den dann vorhandenen 3' UTR von 8kb behält oder das polyA-Signal früher gesetzt wird, konnte nicht gezeigt werden.

Die im Rahmen ihrer Diplomarbeit von Carola Döffinger durchgeführten Experimente zur weiteren Charakterisierung der Transkripte von *zfh2* konnten diese Ergebnisse stützen. Northern-blots an Gesamt-RNA von Wildtyp-Embryonen zeigten die Präsenz von zwei hochmolekularen Transkripten, entsprechend der vier 10,5kb- bzw. 8,9kb-Spleißformen, sowie eine schwach sichtbare Bande um 3-4kb. Durch Hybridisierung mit Exon-spezifischen RNA-Sonden (Exon 3, 4, 5, 12) konnte sie zeigen, dass diese Exons tatsächlich alternativ gespleißt werden. Mit einer Sonde gegen Exon 12 war die 3-4kb Bande nicht zu detektieren, was darauf schließen lässt, dass möglicherweise eine kurze Spleißform mit einer nach 5' verschobenen Polyadenylierungsstelle unter Ausschluss der 3' gelegenen Exons vorliegt, entsprechend dem Transkript für Klon 2-7. Leider waren uns keine Westernblot-Analysen möglich, da die Proteingröße von Zfh2 (3005 A.s. = 332kDa) eine solche Analyse erschwert. Die durch die RT-PCR vorhergesagte kleinste Proteinversion

(Klone 2-7 und 3-3) hätte nicht dargestellt werden können, da die publizierten Antikörper erst weiter C-terminal binden.

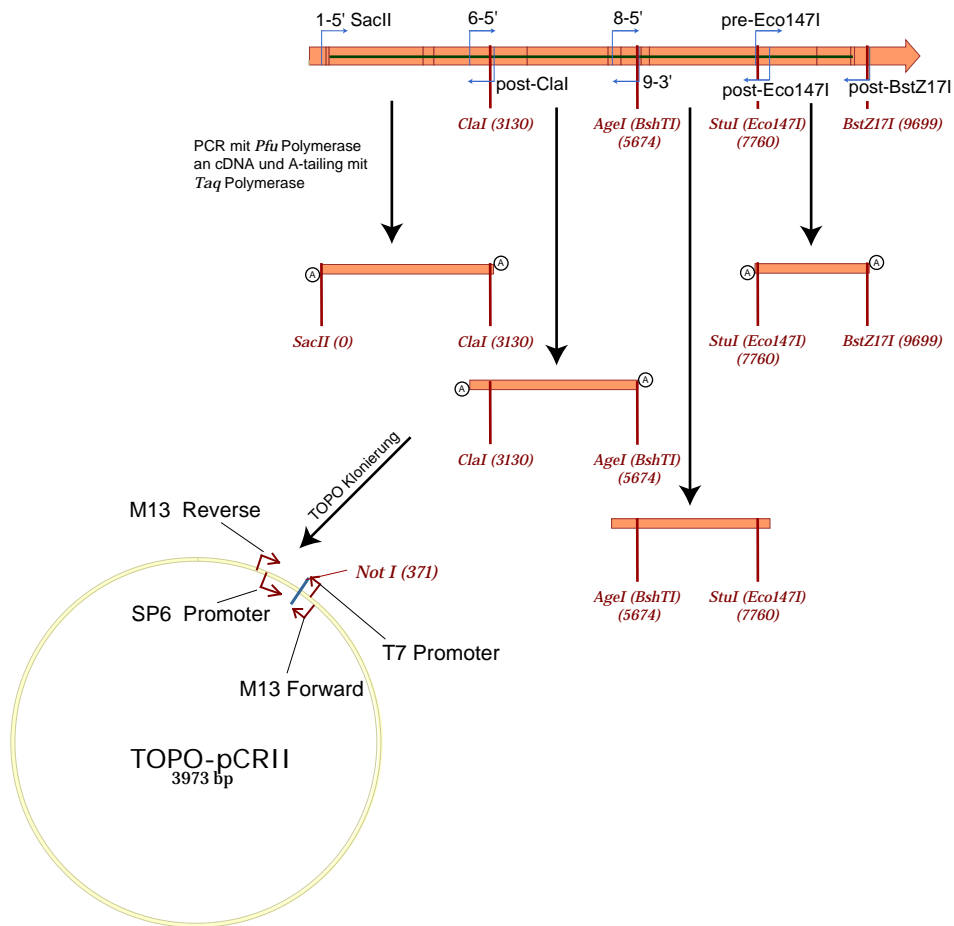
Des Weiteren hat Frau Döffinger überprüft, ob es Hinweise auf eine differentielle Expression der alternativen Spleißformen gibt. Hierfür hat sie Antikörperfärbungen an embryonalen ZNS mit gegen die N-terminalen Zinkfinger und gegen die Homöodomäne gerichteten Antikörpern durchgeführt. Diese haben in allen Zellen kolokalisiert, d. h. es gibt keinen Teil des *Zfh2*-Proteins, der auf zellulärer Ebene nicht mit der Homöodomäne kolokalisiert. Zusätzlich hat sie durch in situ-Hybridisierungen gegen verschiedene Exons überprüft, ob sich Unterschiede im Expressionsmuster ergeben. Dies war aber nicht der Fall.

Neben den oben genannten Spleißformen wurden außerdem drei Fälle von so genanntem „kryptischen Spleißen“ gefunden. Dabei wurden nicht die eigentlichen Donor- und Akzeptorstellen der Introns genommen, sondern weiter im Exon gelegene. Dies betraf ausschließlich die Exons 3 und 5, wobei Exon 3 früher endet und Exon 5 später beginnt. Auf Proteinebene würde sich dies wegen eines durch Leserahmenverschiebung erzeugten Stoppcodons erneut in einem verkürzten Protein äußern. Da die Spleißstellen dieser Introns nicht der klassischen „GT-AG“-Regel folgen, muss angenommen werden, dass es sich um Spleißartefakte handelt.

3.1.2. Klonierung der cDNA von *zfh2*

Die Länge der cDNA von 10,5kb wurde in der Originalarbeit zu *zfh2* (Fortini et al., 1991) als Hauptproblem dargestellt, weshalb kein kompletter cDNA-Klon zu erhalten war. In der EST-Bibliothek des Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP, Bergman et al., 2002) findet sich ein Eintrag für einen EST (GH11902), der aber nur das letzte kodierende Exon und Teile des nachfolgenden Introns beinhaltet. Für Überexpressionsstudien und ektopische Expression muss man aber mit der vollständigen cDNA von *zfh2* arbeiten. Es war deshalb notwendig, den kompletten offenen Leserahmen von *zfh2* zu klonieren. Um das Risiko zu minimieren, dass durch den Amplifikationsprozess Punktmutationen entstehen, wurde zur Amplifikation

A.



B.

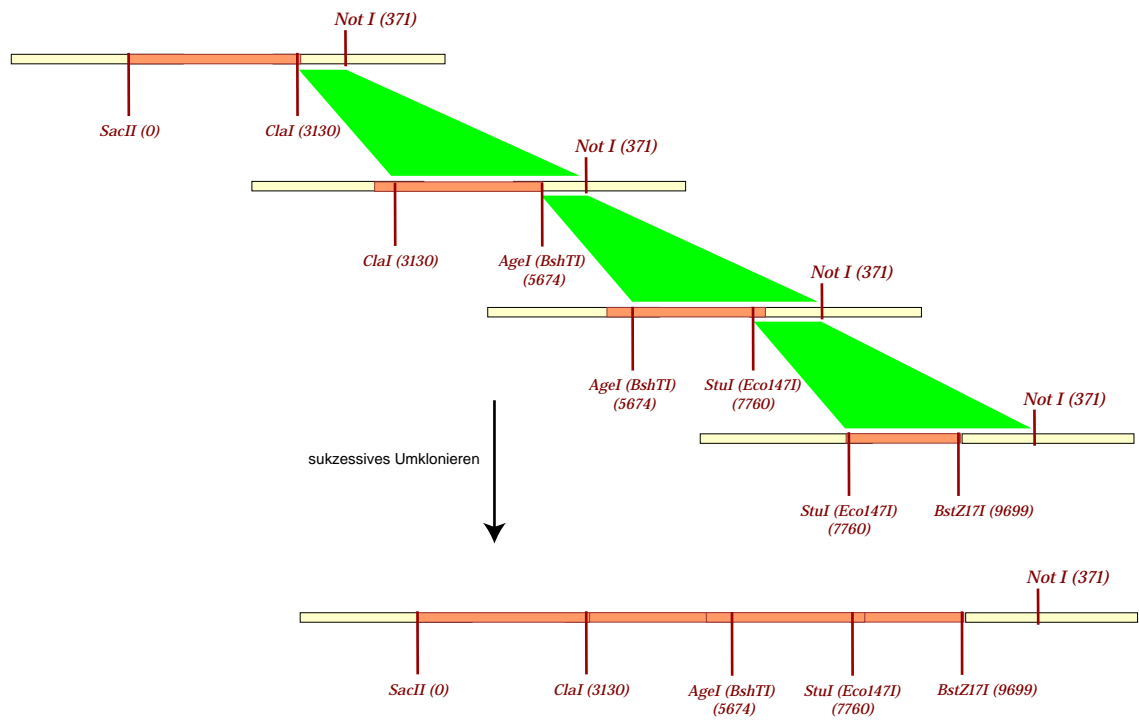


Abb. 13

ausschließlich die *Pfu*-Polymerase verwendet, die eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Da nur Fragmentlängen von bis zu 2kb bei dieser Polymerase genügend klonierbares Produkt liefern, wurden überlappende 2kb-Fragmente amplifiziert (Abb. 12), und die cDNA schrittweise, unter Verwendung von einmalig in der cDNA vorhandener Restriktionsenzymstellen kloniert (Schema siehe Abb. 13). Zusätzlich wurde am 5' Ende eine *SacII*-Schnittstelle eingefügt, damit die cDNA im Anschluss gerichtet als *SacII/NotI*-Fragment in pP-UAST umkloniert werden kann. Alle Teilstücke ließen sich amplifizieren, geextrahieren und klonieren. Da die PCR für den 5'-Teil der cDNA (1-5' *SacII*- und post-*Clal*-Primer) mehrere Fragmente ergab, wurden diese separat kloniert, um die Möglichkeit zu haben, alternative Spleißformen der kompletten cDNA herzustellen. Die Fragmente wurden anschließend zu einer vollständigen cDNA zusammengesetzt und diese sequenziert.

3.1.3. Polymorphismen in der kodierenden Sequenz von *zfh2*

Natürlicherweise auftretende Polymorphismen in den wildtypischen Stämmen der Stammzucht des Instituts zeigen sich beim Sequenzieren als Abweichungen vom annotierten *Drosophila*-Genom. Um auszuschließen, dass bei der PCR spontane Basenaustausche entstanden sind, welche zu einem Funktionsverlust des Proteins führen würden, muss der cDNA-Klon vollständig sequenziert werden. Insgesamt fanden sich elf Basenaustausche, die sich ungleichmäßig über die gesamte cDNA verteilen. Sechs Austausch liegen zwischen den ersten 0,5 und 1,5kb, drei Austausch bei ca. 3kb und zwei Austausch in den restlichen 8kb der sequenzierten cDNA. Diese Mutationen führen auf Proteinebene zu insgesamt nur sechs Aminosäureaustauschen, d. h. die Hälfte der Basenaustausche sind stille Substitutionen. Von den Aminosäureaustauschen finden sich drei Aminosäuren auch

Abb. 13 Übersichtsschema über die Klonierungsstrategie für die *zfh2*-cDNA

A. Überlappende Teile der cDNA werden mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert und jeweils in den TOPO-Vektor kloniert. Es werden nur solche Klone verwendet, bei denen das 3'-Ende des Fragmentes proximal zur *NotI*-Schnittstelle des TOPO-Vektors liegt.

B. Aus den einzelnen Klonen werden die Teilfragmente sukzessive miteinander zur vollständigen cDNA verknüpft.

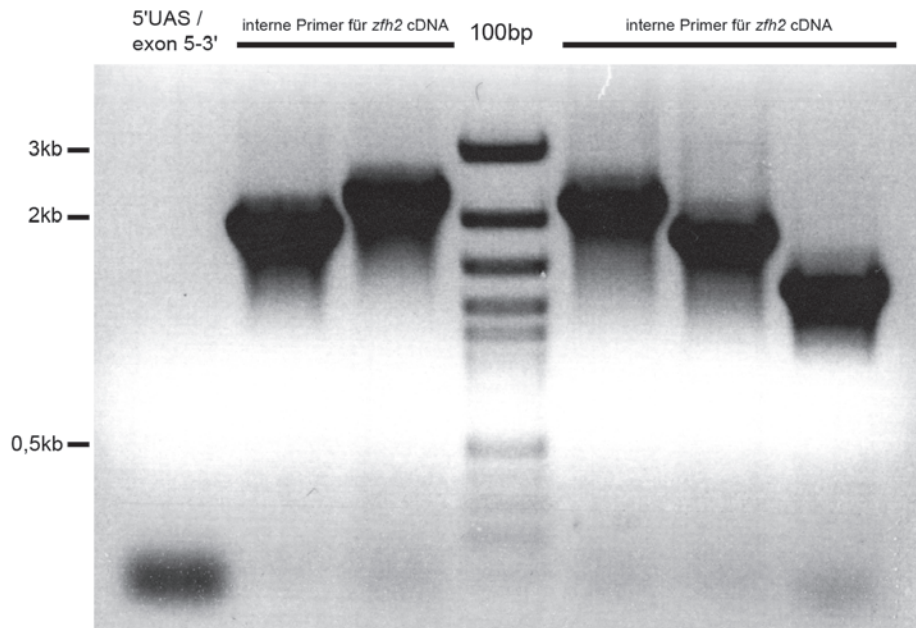


Abb. 14 PCR-Test auf Vollständigkeit von UAS-*zfh2*

Die gewählten Primerpaare decken den UAS- und Promoterbereich des P-Elements sowie die gesamte cDNA von *zfh2* ab. Die erste Spur zeigt das Fehlen eines wichtigen Teils des P-Elements an. Die internen Primer liefern Amplikons der erwarteten Größe. 100bp: DNA-Marker zur Größenabschätzung

an dieser Stelle im vorhergesagten Zfh2-Protein von *Drosophila pseudoobscura*, und zwei der veränderten Aminosäuren liegen in einem bei *D. pseudoobscura* deletierten Bereich. Ein Austausch (Serin-927 > Glyzin) liegt innerhalb einer Serin-reichen Sequenz (S-S-S₉₂₇-A-S-S-E), zwischen den Zinkfingern 5 und 6. Die Ursache für diesen Austausch liegt in einer Transition (AGC → GGC) an Position 3148bp.

3.1.4. Klonierung von *zfh2* cDNA in pP-UAST

Zur gewebespezifischen Überexpression von Zfh2 war es notwendig, die cDNA in den pP-UAST P-Element-Vektor umzuklonieren (Brand und Perrimon, 1993). Das Einfügen der cDNA erfolgte als *SacII/NotI*-Fragment in den Polylinker von pUAST. Als problematisch erwies sich dabei, dass das gesamte Konstrukt (P-Elementvektor mit Integrat) mit einer Größe von 19,5kb außerordentlich groß werden würde. Transformante Kolonien zeigten nach Restriktionsverdau grundsätzlich zu kleine

Fragmente, was stark darauf hindeutete, dass Teile des *zfh2*-pUAST-Plasmids vom Bakterium entfernt worden sind. Um die Wahrscheinlichkeit von Deletionen zu verringern, wurden Transformante bei Raumtemperatur über mehrere Tage kultiviert und anschließend präpariert und analysiert. Unter diesen Transformanten fand sich nur eine mit einem Plasmid der gewünschten Größe. Allerdings zeigt sich durch PCR-Analyse, dass auch in diesem Plasmid mindestens der 5' Teil der cDNA fehlte (Abb. 14) - genauer der 5' Teil, der die Gal4-Bindestelle und den Promoter enthalten soll. Da es nicht möglich war, eine vollständige cDNA-Sequenz in den pUAST-Vektor zu klonieren, wurden diese Bemühungen eingestellt und die Funktionsanalyse nur anhand von Funktionsverlustmutanten durchgeführt.

3.2. Charakterisierung verschiedener Allele von *zfh2*

3.2.1. Molekulare Charakterisierung von *zfh2*^{M707} und *zfh2*^{LP30}

Eine wertvolle Quelle hypomorpher und amorpher Mutationen stellen Enhancer-trap-Linien dar. Für den *zfh2*-Lokus existieren mittlerweile eine Reihe von P-Element-Linien, die dort inserieren und möglicherweise die Regulation des benachbarten *zfh2*-Gens beeinträchtigen können. In meinen Analysen habe ich mich auf die einzigen zu der Zeit erhältlichen Linien beschränkt: *zfh2*^{M.707} (auch M.707, Sun et al., 2000a) und *zfh2*^{LP30} (oder LP30). Der Stamm M.707 wurde zur Analyse von Positionseffekten erzeugt (Sun et al., 2000a) und basiert auf dem pCaSpeR-Element. Bei dem Fliegenstamm *zfh2*^{LP30} handelt es sich um eine pGawB-Enhancer-trap-Linie, bei der ein pGawB-P-Element zufällig in den *zfh2* Genloкус inseriert worden ist. Durch diese Insertion wird, in Abhängigkeit von den umgebenden regulatorischen Sequenzen, das Reportergen *gal4* exprimiert.

Um den genauen Insertionsort zu bestimmen, mussten für die P-Elemente verschiedene Verfahren verwendet werden. pGawB besitzt einen Plasmidanteil, welcher die Möglichkeit bietet, aus der DNA ein dem P-Element benachbartes

genomisches Fragment zu klonieren und zu sequenzieren („Plasmid Rescue“). Dieser Plasmidanteil ist in pCaSpeR nicht mehr vorhanden, allerdings lässt sich aufgrund bekannter Sequenzen aus dem P-Element der Insertionsort durch inverse PCR bestimmen. Durch diese Verfahren konnte ich zeigen, dass beide P-Elemente in der 5'-Region von *zfh2* inseriert sind (M.707 liegt 211bp, LP30 2090bp vor der TATA-Box von *zfh2*). Für das Allel *zfh2*^{M.707} wurde berichtet, dass es homozygot lebensfähige Nachkommen geben würde (Whitworth und Russell, 2003), d. h. trotz der Nähe zum Promoter wäre der Effekt hypomorpher Natur. Im Vergleich dazu sind Tiere mit der Mutation *zfh2*^{LP30} immer balanciert, d. h. mindestens pupal letal. Zudem zeigt Anti-Zfh2-Antikörperfärbung an Nachkommen von heterozygoten *zfh2*^{LP30} für ein Viertel der Embryonen keine Färbung, weshalb ich vermutete, dass es sich bei *zfh2*^{LP30} um ein amorphes Allel handeln könnte. Durch Verkreuzen von *zfh2*^{LP30} mit UAS-GFP habe ich außerdem feststellen können, dass erst im späten Embryonalstadium 17 nennenswerte GFP-Expression zu erkennen ist (nicht dargestellt). Zusätzliche anti-Zfh2-Antikörperfärbung zeigte, dass die Gal4-Expression zu diesem Zeitpunkt die endogene *zfh2*-Expression nachvollzieht. Der Gal4-Enhancertrap wird daher offensichtlich nur durch den späten *zfh2*-Enhancer kontrolliert, sodass möglicherweise die Ursache für die embryonale Letalität in der Zerstörung des frühen *zfh2*-Enhancers durch die Insertion liegt. Für die Analyse der Genfunktion habe ich daher ausschließlich das stärkere Allel *zfh2*^{LP30} verwendet. Um sicherzugehen, dass man homozygote Tiere von heterozygoten unterscheiden kann, wurde der viertchromosomale *cubitus-interruptus* (*ci*) Enhancer-trap-Stamm *ci*^W verwendet, der β -Galaktosidase im Muster dieses Segmentpolaritätsgens exprimiert. Carola Döffinger hat diesen Stamm mit dem *zfh2*^{LP30} Allel verkreuzt und letzteren näher charakterisiert. Sie konnte zeigen, dass *zfh2*^{LP30} homozygote Embryonen weder detektierbare Mengen an Zfh2-Protein noch *zfh2*-mRNA aufweisen. *zfh2*^{LP30} stellte deshalb einen idealen Kandidaten zur Analyse der Zfh2-Funktion im ZNS dar.

3.2.2. Das Expressionsmuster und Hinweise auf die Funktion von Zfh2 im embryonalen ZNS

Antikörper	Kolokalisation in Wildtyp	Phänotyp in <i>zfh2^{LP30}/zfh2^{LP30}</i> bzw. <i>zfh2^{LP30} / -</i>
anti-Zfh2 und in situ	immer	keine mRNA und kein Protein
anti-Zfh1	teilweise überlappende Expression	keine Veränderung der Zellzahl
anti-Hunchback	kaum Überlappung (nur U2 Neuron und zwei unbekannte Zellen, s. u.)	keine Veränderung
anti-Eve	U2-U5, einige EL-Zellen (s. u.)	keine Veränderung
anti-Acj6	starke Überlappung, nicht in Mittellinienzellen und dorsalen Zellen	keine Veränderung
anti-pMad	einige laterale Zellen, inkl. VUM-Neurone	keine Veränderung
anti-DVGlut	teilweise Koexpression	keine Veränderung
anti-Serotonin und <i>dSerT</i> -in situ	laterales serotonerges Neuron (EW2, Novotny et al., 2002)	keine Veränderung
anti-Eagle	EW2 und EW3	keine Veränderung
anti-Futsch	teilweise Koexpression	keine Veränderung
anti-Fas3		keine Veränderung
anti-Fas2		lateralster Trakt mit Unterbrechungen; fehlt in Hemizygoten <i>zfh2^{LP30}</i> ; PNS unverändert
anti-Repo	Cellbodyglia, Channelglia, Longitudinale Glia (stark); Subperineurialglia (schwach)	Mispositionierung der Longitudinalen Glia

Tab. 2 Expressionsmuster von Zfh2 und Phänotypen in *zfh2*-Mutanten

Um Rückschlüsse auf die Funktion von *zfh2* während der embryonalen Neurogenese von *Drosophila* ziehen zu können, hat Carola Döffinger unter meiner Anleitung eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um das wildtypische Expressionsmuster von

zfh2 genauer zu beschreiben und *zfh2*-Funktionsverlustmutanten auf Phänotypen zu untersuchen (siehe Tab. 2). Dabei konnte sie feststellen, dass Zfh2 in allen neuronalen Zelltypen exprimiert wird (Interneurone, Motoneurone, Gliazellen) und dass der Verlust von Zfh2 vor allem die Positionierung der Longitudinalen Glia und das Projektionsmuster Fas2-positiver Neurone stört. Diese Phänotypen ließen sich verstärken, indem man künstlich für das vierte Chromosom hemizygot Embryonen erzeugt². Letzteres war ein Hinweis darauf, dass es sich bei *zfh2*^{LP30} als stärkstem verfügbarem Allel, trotz nicht nachweisbarer mRNA- und Proteinexpression, nicht um ein amorphes Allel handelt. Die komplizierte Genetik, bedingt durch die viertchromosomale Lokalisation von *zfh2*, und das Fehlen von UAS-Konstrukten zur Überprüfung und eventuellen Rettung von Phänotypen haben es zudem unmöglich gemacht, weitergehende Analysen durchzuführen oder auf genetische Interaktionen zu testen. Ein direkte Abhängigkeit der Serotonin-Expression von *zfh2*, wie sie wegen einer möglicherweise vorhandenen Bindestelle für Zfh2 im *Ddc*-Enhancer (Dopa-Decarboxylase) postuliert worden ist (vgl. Lundell und Hirsh, 1992), konnte nicht gezeigt werden. Die Ursache für den neuronalen bzw. glialen Phänotyp konnte zudem nicht ermittelt werden.

3.3. Abhängigkeit der Zfh2-Expression von Hunchback

Der Zfh2-Antikörper wird sehr häufig für die Identifikation von Zellen im Nervensystem und damit als Marker verwendet (Cleary und Doe, 2006; Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Innerhalb des Stammbaumes des Neuroblasten 7-3 (NB7-3), welcher vier Nachkommenzellen generiert, sind nur die beiden spätgeborenen Zellen (EW2 und EW3) Zfh2-positiv, d. h. die, die keine Expression

² Dies wurde durch Verkreuzung von *zfh2*^{LP30}/*ci*^w mit Tieren mit einem Ringchromosom erreicht, das aus zwei gekoppelten vierten Chromosomen besteht. Die F1-Generation besteht dann zu 50% aus fehlentwickelten Tieren mit einer Trisomie für das 4. Chromosom und aus 25% hemizygot *zfh2*-mutanten bzw. 25% wildtypischen Tieren.

des temporären Spezifizierungsmarkers Hunchback zeigen (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Ähnliches wurde für die späten U2/3/4/5-Motoneurone beobachtet, die vom Neuroblasten 7-1 abstammen und bis auf das U2-Neuron Zfh2-positiv und Hunchback-negativ sind (Isshiki et al., 2001; Pearson und Doe, 2003). Das Hb⁺/Zfh2⁺ U2-Motoneuron hat allerdings eine im Vergleich zum U1-Neuron abgeschwächte Expression von Hunchback. Antikörperdoppelfärbung gegen Hunchback und Zfh2 zeigt außerdem, dass beide Proteine in nur drei Zellen je abdominalem Hemisegment kolokalisieren (Abb. 15). Daher war die Vermutung, dass Hunchback ein negativer Regulator von Zfh2 sein könnte. In einem Pilotexperiment habe ich Hunchback mit dem Gal4/UAS-System in jedem Segment im posterioren Kompartiment mithilfe von *engrailed*-Gal4 überexprimiert. Anschließende Antikörperfärbung gegen Zfh2 zeigte, dass die Expression von Zfh2 in diesem Kompartiment verloren gegangen ist (Abb. 16). Dies war ein weiteres Indiz dafür, dass Hunchback in der Lage ist, die Expression von *zfh2* zu reprimieren. Ein reziproker Ansatz sollte zeigen, dass der Verlust von Hunchback zur Expression von Zfh2 führen kann. Hierfür habe ich mir den Neuroblasten NB7-3 in der Zellzyklusmutante *CyclinA*³ (*CycA*³) angeschaut. Diese *CycA*-Mutante zeichnet sich dadurch aus, dass

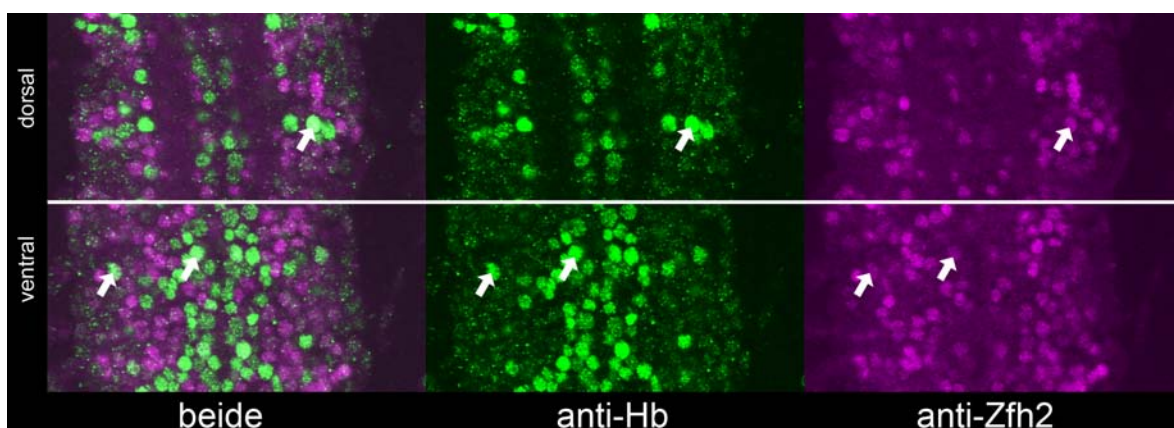


Abb. 15 Kolokalisation von Zfh2 und Hunchback

Kolokalisation von Hunchback (grün) und Zfh1 (magenta). Dargestellt sind zwei Fokusebenen abdominalen Segmente eines vNS in Embryonalstadium 16. Es sind nur drei Zellen je Segment doppelt gefärbt.

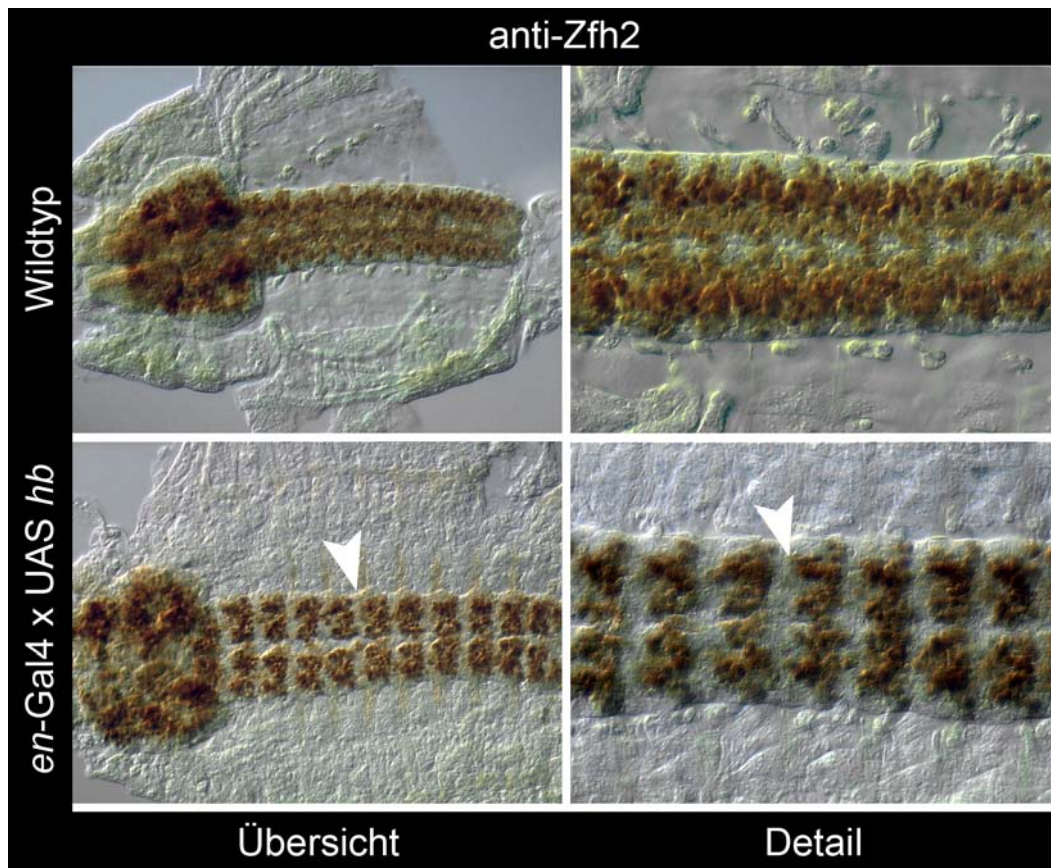


Abb. 16 Überexpression von Hunchback führt zu Repression von *zfh2*

Spätembryonale ZNS verschiedener Genotypen, gefärbt gegen Zfh2. Im ZNS sind sehr viele Zellen Zfh2-positiv. Durch lokale Überexpression von Hunchback in der Domäne des Segmentpolaritätsgens *engrailed* kann dort die Expression von Zfh2 unterdrückt werden (Pfeilspitze).

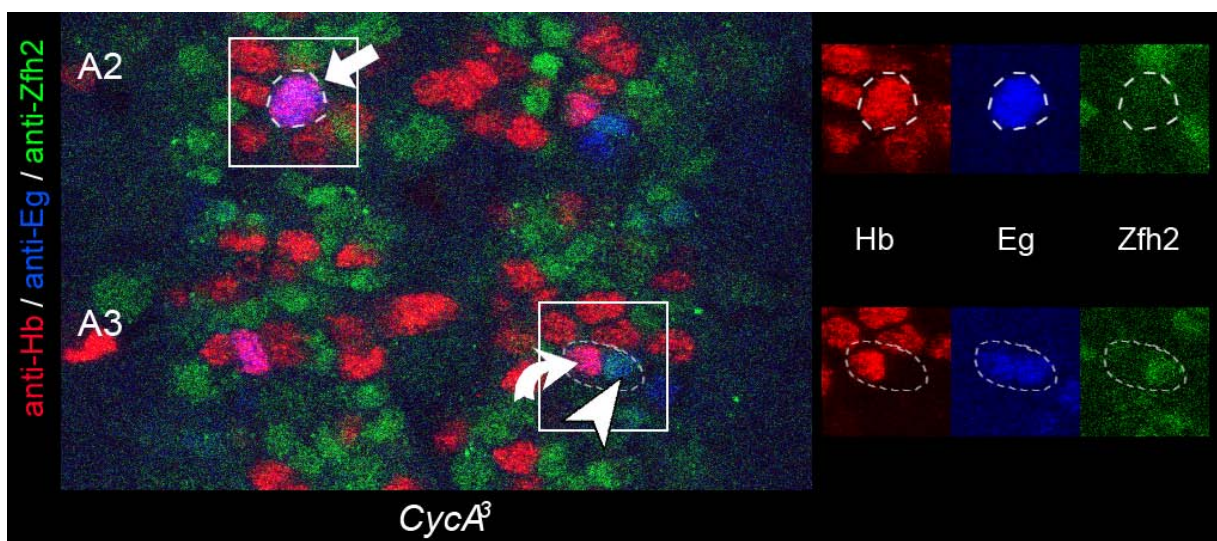


Abb. 17

Abb. 17 Für die Expression von Zfh2 muss Hunchback herunterreguliert werden

Dargestellt sind zwei abdominale Segmente im vNS eines *CycA³*-mutanten Embryos im Stadium 15. In diesen Mutanten teilt sich der Neuroblast verspätet bzw. gar nicht. Der Neuroblast und die Nachkommen des NB7-3 können mit anti-Eagle (blau) identifiziert werden. In Segment A2 findet sich ein Neuroblast, der Hunchback (Hb) exprimiert (rot, Pfeil), aber Zfh2-negativ ist. In A3 hat der Neuroblast sich einmal geteilt. Eine Nachkommenzelle bleibt Hb-positiv und Zfh2-negativ (gebogener Pfeil), die andere Zelle ist Hb-negativ und jetzt Zfh2-positiv (grün). Keine der Zellen ist Hb- und Zfh2-positiv. Die einzelnen Kanäle wurden zur besseren Darstellung separiert (rechts).

Neuroblasten sich nur noch in seltenen Fällen mehr als einmal teilen, sodass sich in späten Stadien Neuroblastenstammbäume finden mit einer, zwei oder drei Zellen (Novotny et al., 2002). Im Wildtyp würde Zfh2 erst in den postmitotischen Nachkommenzellen des NB7-3 exprimiert werden, d. h. mit zeitlicher Verzögerung nachdem der Neuroblast Hb-negativ geworden ist. Neuroblasten, die sich nicht geteilt haben, exprimieren Hunchback und zeigen keine Zfh2-Expression (Abb. 17). Daneben gibt es aber auch viele Fälle von 2-Zellstadien, in denen sich der Neuroblast einmal geteilt hat. Hier beobachtet man eine Hb⁺-Zelle, und daneben eine Zelle, die nun Zfh2 exprimiert. Diese Zelle entspricht einem Hb-negativen Neuroblasten, was die Hypothese unterstützt, dass Hb die Expression von Zfh2 unterdrückt und erst durch das Entfernen von Hunchback aus der Zelle Zfh2 angeschaltet werden kann.

Die gemachten Beobachtungen sind starke Hinweise darauf, dass es sich bei *zfh2* um ein direktes Zielgen von Hunchback handeln könnte und rechtfertigen daher eine weitergehende Analyse dieser Beziehung, was aber nicht mehr Gegenstand meiner Arbeit war.

B. Charakterisierung und funktionelle Analyse des *zfh1*-Gens

Der Transkriptionsfaktor *zfh1* wurde wie *zfh2* in demselben Screen identifiziert und beschrieben (Fortini et al., 1991). Er wird in einer Reihe von Geweben exprimiert, darunter ebenfalls im embryonalen ZNS. Funktionsverlustmutanten von *zfh1* weisen eine Vielzahl von mesodermalen Defekten auf, aber es konnten keine Phänotypen im embryonalen ZNS gefunden werden (Lai et al., 1993). Aus diesem Grund habe ich die wildtypische Expression von Zfh1 näher charakterisiert sowie *zfh1*-mutante Embryonen und Larven untersucht. Aufgrund der starken mesodermalen Defekte war es notwendig, neben Funktionsverlustmutanten und Überexpressionsexperimenten auch hypomorphe Allele zu untersuchen, in der Annahme, dass hier die Mesodermdefekte geringer sind. Schließlich habe ich durch die Verwendung der MARCM-Technik die Auswirkung des Verlusts von Zfh1 auf die Morphologie und Entwicklung embryonaler und larvaler Motoneurone unabhängig von pleiotropen Effekten, z. B. Defekten in der Muskulatur, analysiert.

Für die Analyse der neuralen Genfunktion von *zfh1* war es daher zunächst notwendig, das wildtypische Expressionsmuster von Zfh1 genauer zu bestimmen, sowohl im Embryo als auch in der Larve. Hierfür habe ich mit verschiedenen Zfh1-Antikörpern und einer Reihe von Markern der Zellen des ZNS und PNS gearbeitet.

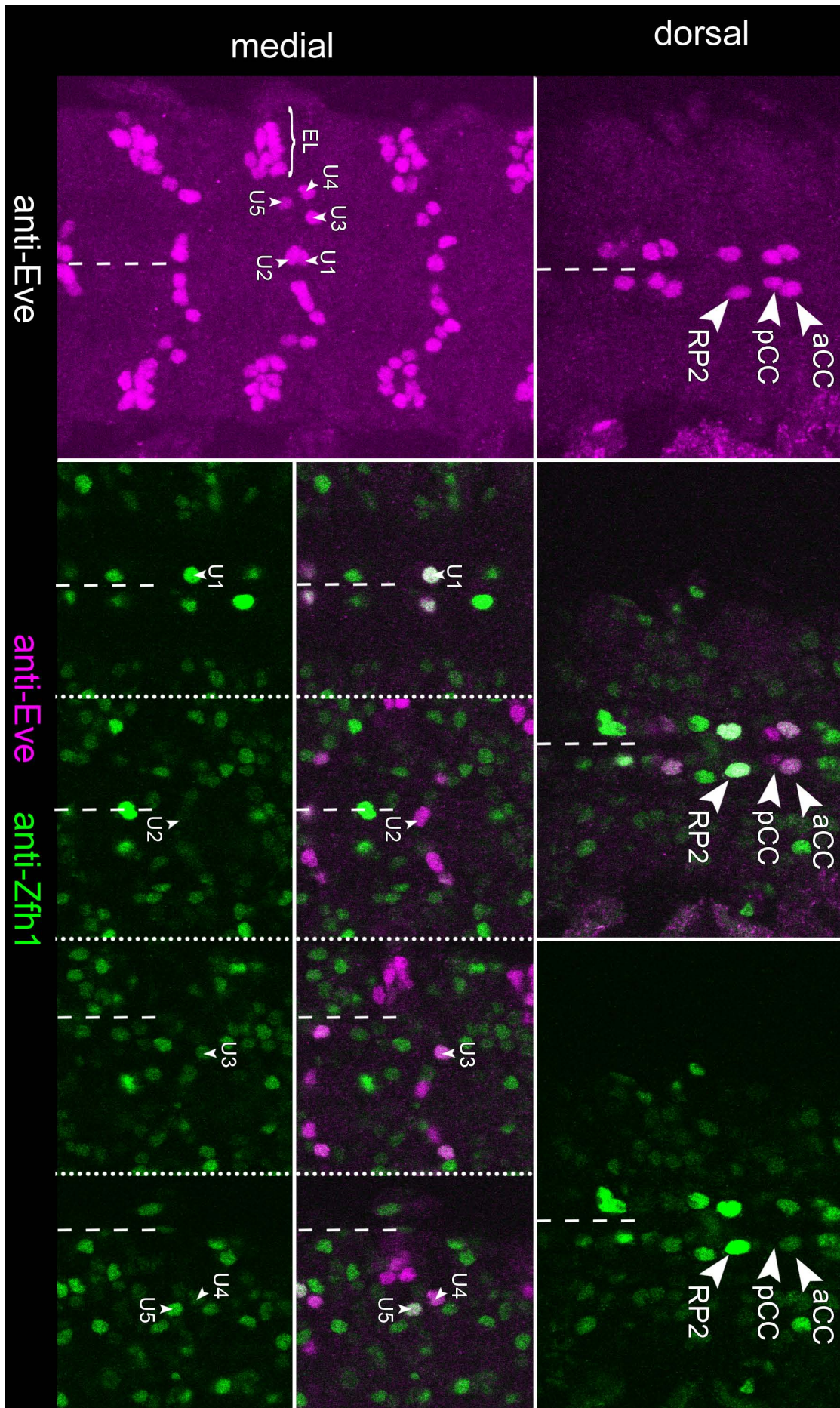


Abb. 18

B.1. Charakterisierung des Expressionsmuster von Zfh1 im embryonalen und larvalen Nervensystem

3.4. Zfh1 wird in identifizierbaren Neuronen und Glia exprimiert

Motoneurone und Gliazellen stellen zwei für ein funktionierendes Nervensystem wichtige Typen von Zellen dar, die in *Drosophila* zudem experimentell gut zugänglich sind. Weil bereits bekannt war, dass Zfh1 in einer Reihe identifizierbarer Motoneurone exprimiert wird (Lai et al., 1991), war eines der Hauptaugenmerke, diese Expressionsmuster zu verifizieren und mit weiteren Markern zu präzisieren.

3.4.1. Kolokalisation mit Even-skipped (Eve)

Das Paarregelgen *even-skipped* (*eve*) wird im embryonalen ventralen Bauchmark in den Interneuronen pCC, U1 und denen des EL-Clusters sowie in den Pioniermotoneuronen aCC, RP2 und U2-U5-Neuronen exprimiert (Bossing et al., 1996; Broadus et al., 1995; Frasch et al., 1987; Patel et al., 1992; Schmidt et al., 1997). Aufgrund des Zfh1-Expressionmusters wurde schon früher vermutet, dass Zfh1 in einigen dieser Motoneurone exprimiert werden würde (Lai et al., 1991). Bei Zfh1/Eve-Doppelfärbungen findet man tatsächlich Zfh1-Protein in den dorsal gelegenen Motoneuronen aCC und RP2, wohingegen das Interneuron pCC keine Zfh1-Immunoreaktivität aufweist (Abb. 18). Auch die U-Neurone, inklusive dem Interneuron U1, sind alle Zfh1-positiv, das EL-Cluster hingegen negativ. Auffällig sind außerdem die Unterschiede in der Stärke der Zfh1-Expression in den Eve-Motoneuronen: RP2 ist stark Zfh1-positiv, aCC und U2-U5 sind dagegen sehr viel schwächer gefärbt.

Abb. 18 Kolokalisation von Even-skipped und Zfh1

Dargestellt sind abdominale Segmente eines spätembryonalen vNS, gefärbt gegen Eve (magenta) und Zfh1 (grün). Die Lage der Mittellinie ist gestrichelt eingezeichnet. Dorsal im vNS sind nur die beiden Motoneurone aCC und RP2 Eve- und Zfh1-positiv (aCC ist sehr viel schwächer Zfh1-positiv als RP2). Die Eve-positiven lateralen Zellen (EL-Neurone) und pCC sind Zfh1-negativ. Die U-Neurone sind alle Zfh1-positiv, allerdings unterschiedlich stark (U1 > U5 > U3 > U4 > U2).

3.4.2. Kolokalisation mit Spalt (Sal)

Das ZNS *zfh1*⁵ mutanter Embryonen scheint gegen Ende der Embryogenese (Stadium 17) seine Integrität zu verlieren und auseinanderzufallen (eigene Beobachtung). Da für den Transkriptionsfaktor *spalt* (*sal*) gezeigt wurde, dass er für die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Proteinen des Zytoskeletts im ZNS notwendig ist (Cantera et al., 2002), habe ich überprüft, ob Sal und Zfh1 in ähnlichen Populationen von Zellen des ZNS zu finden sind (Abb. 19). Überraschenderweise überlappt die Expression der beiden Gene kaum. Obwohl Spalt und Zfh1 in sehr vielen Zellen des ZNS exprimiert werden, kolokalisieren sie nur in sehr wenigen Neuronen (Abb. 19). Von den mit anti-Zfh1 ansprechbaren Neuronen aCC, RP2 und VUM exprimieren nur aCC und RP2 beide Gene, die VUM-Motoneurone sind Spalt-negativ.

3.4.3. Kolokalisation mit Optomotor-blind (Omb)

Ein Zielgen des Homologen von Zfh1 in Vertebraten, δ EF-1, ist der T-Box-Transkriptionsfaktor *brachyury* (*bra*) (Remacle et al., 1999). Brachyenteron, das *Drosophila* Homologe zu Brachyury, wird im Mesoderm exprimiert, ist dort allerdings kein Zielgen von Zfh1 (Broihier et al., 1998). Ein T-Box-Transkriptionsfaktor, welcher im Nervensystem exprimiert wird, ist *optomotor-blind* (*omb*) (Poeck et al., 1993). Antikörperdoppelfärbung gegen Omb und Zfh1 zeigt, dass die meisten Omb-Zellen auch *zfh1* exprimieren (Abb. 20). aCC und RP2 sind beide Omb/Zfh1-positiv, wohingegen die VUM-Motoneurone keine Omb-Färbung zeigen (Abb. 20). Obwohl die Omb- und Zfh1-Expression im ZNS überlappt, ist in *zfh1*-Nullmutanten das Expressionmuster von Omb unverändert (nicht dargestellt).

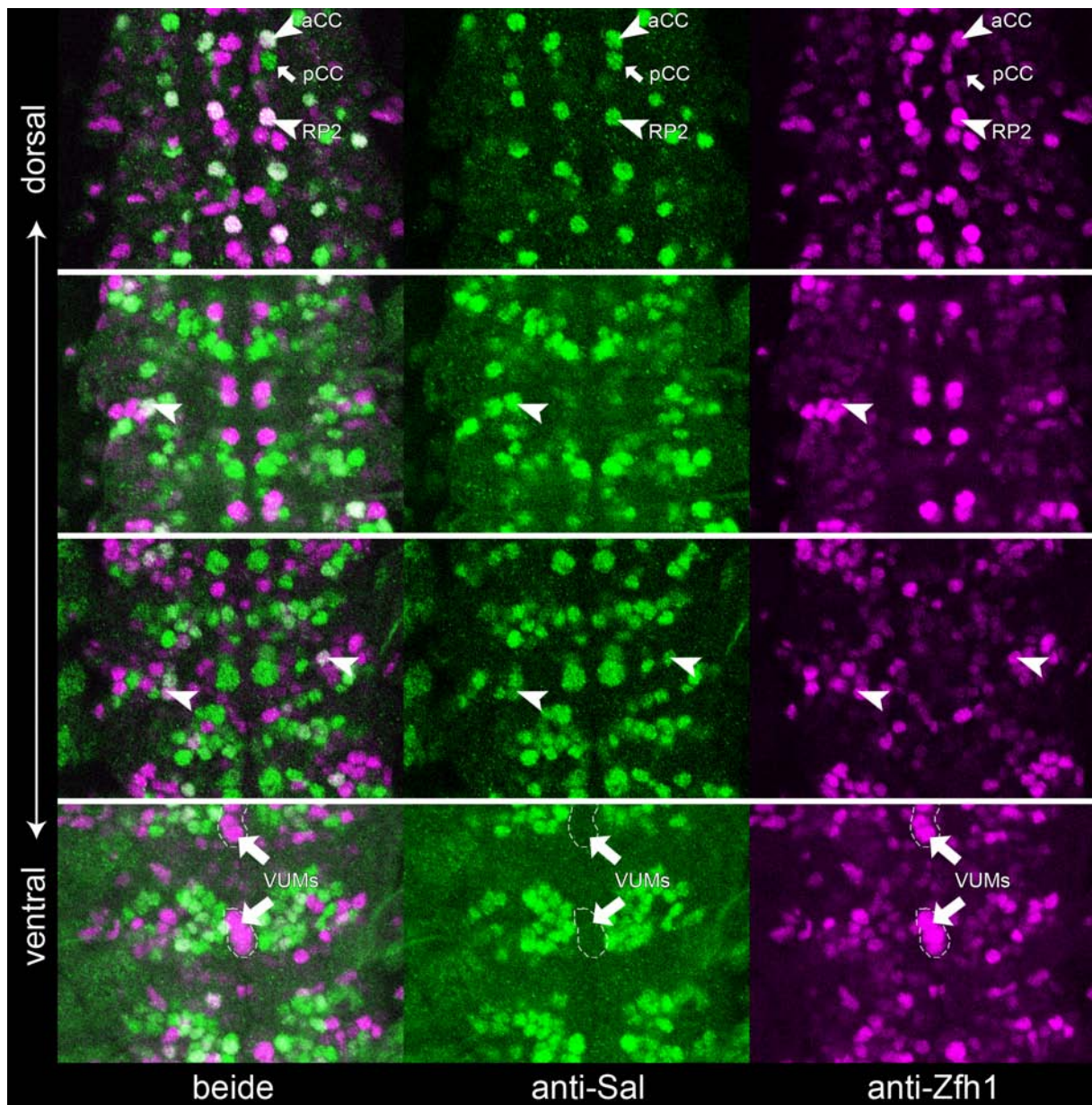


Abb. 19 Kolokalisation von Spalt (Sal) und Zfh1

Verschiedene Fokusebenen zweier abdominalen Segmente des vNS im Embryonalstadium 16. Nur wenige Sal-positive Zellen (grün) sind auch Zfh1-positiv (magenta, Pfeilspitze). Erkennbar verschieden sind pCC (nur Sal) und die VUM-Neurone (nur Zfh1).

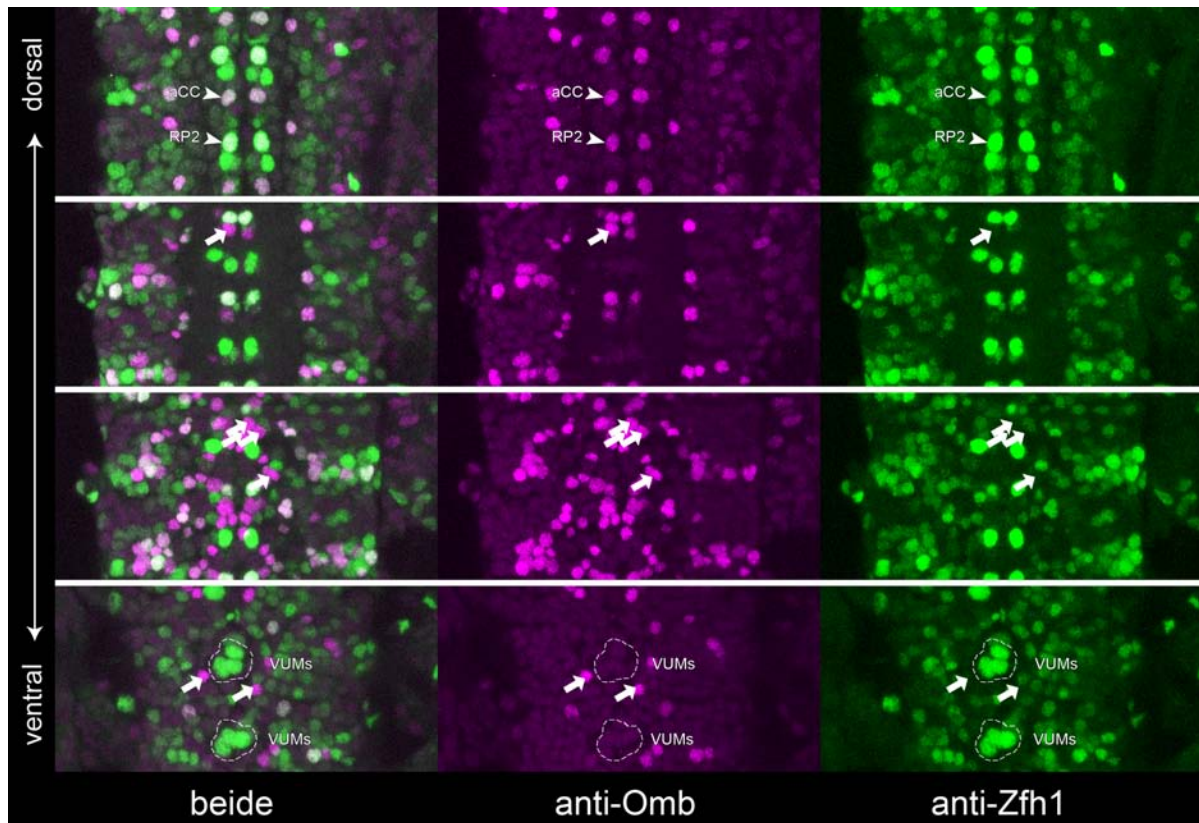


Abb. 20 Kolokalisation von Optomotor-blind (Omb) und Zfh1

Verschiedene Fokusebenen zweier abdominaler Segmente des vNS im Embryonalstadium 16. Dorsal sind die meisten Omb-positiven Zellen (magenta) auch Zfh1-positiv (grün, Pfeilspitze). Medio-ventral sind viele Zellen nicht mehr doppelt gefärbt (Pfeile).

3.4.4. Zfh1 wird in allen Motoneuronen exprimiert

3.4.4.1. Kolokalisation mit pMad und Medea

Nachdem gezeigt war, dass Zfh1 in den Eve-positiven Motoneuronen exprimiert wird und - aufgrund morphologischer Kriterien - möglicherweise auch in den Motoneuronen RP1/3/4/5, habe ich Antikörperdoppelfärbungen gegen phosphoryliertes *Drosophila* SMAD, Mother-against-Dpp (phospho-Mad) und das co-SMAD Medea durchgeführt. Beides sind Komponenten des TGF β -Signaltransduktionswegs („Transforming growth factor beta“, TGF β) und regulieren in Abhängigkeit von TGF β -Rezeptoren die Genexpression. Hierbei aktiviert ein externes TGF β -Signal (Affolter et al., 2001; Yu et al., 2000) TGF β -Rezeptoren vom Typ-II, die ihrerseits Typ-I-Rezeptoren aktivieren. Diese phosphorylieren intrazelluläres Mad-Protein, welches

nachfolgend mit Medea Heterodimere bildet, sich im Kern anreichert und dort Gene aktiviert oder inhibiert (ten Dijke und Hill, 2004). Im ZNS von *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass dieser Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt im larvalen Wachstum neuromuskulärer Verbindungen (Marques et al., 2002), und schon im Embryo sind hohe Mengen an pMad in motoneuronalen Zellkernen zu finden (Rawson et al., 2003). Außerdem zeigt mindestens ein neuropeptiderges Neuron (Tv-Neuron) ebenfalls hohe Mengen an pMad (Allan et al., 2003). Mittels eines pMad-spezifischen Antikörpers (Persson et al., 1998) kann man diese Zellen anfärben und ihre Expression mit der von Zfh1 vergleichen. Die Expression von Medea ist ubiquitär und nur in wenigen Zellen ist eine nukleäre Anreicherung von Medea zu sehen (Abb. 21). Deutlicher lässt sich die Lokalisation von pMad nachweisen, welches nur im Kern lokalisiert (Abb. 22). Bis auf wenige Zellen sind alle pMad-positiven Zellen auch Zfh1-positiv. Weil sich diese vereinzelt Zfh1-negativen Zellen von Segment zu Segment allerdings stark in ihrer Position unterscheiden, habe ich daraus geschlossen, dass bei diesen Zellen die Menge an Zfh1 so niedrig sein muss, dass sie in manchen Segmenten unterhalb der Detektionsgrenze liegt, und manchmal darüber. Daher kann angenommen werden, dass Zfh1 in allen Motoneuronen exprimiert wird. Zfh1 ist damit der erste Transkriptionsfaktor, der in allen somatischen Motoneuronen des *Drosophila*-Embryos exprimiert wird.

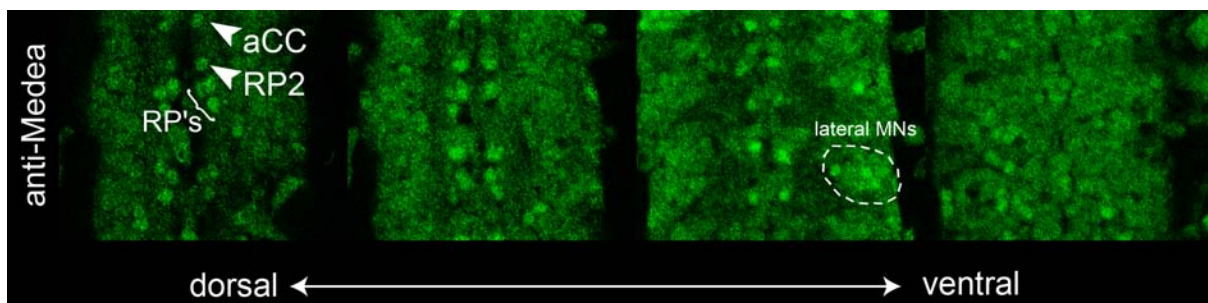


Abb. 21 Lokalisation von Medea im embryonalen ZNS

Dargestellt sind zwei abdominale Segmente eines spätembryonalen vNS (Stadium 16). Medea (grün) wird ubiquitär exprimiert, allerdings lassen sich Zellen mit nukleärer Anreicherung identifizieren, die in ihrer Lage und Position Motoneuronen entsprechen müssten.

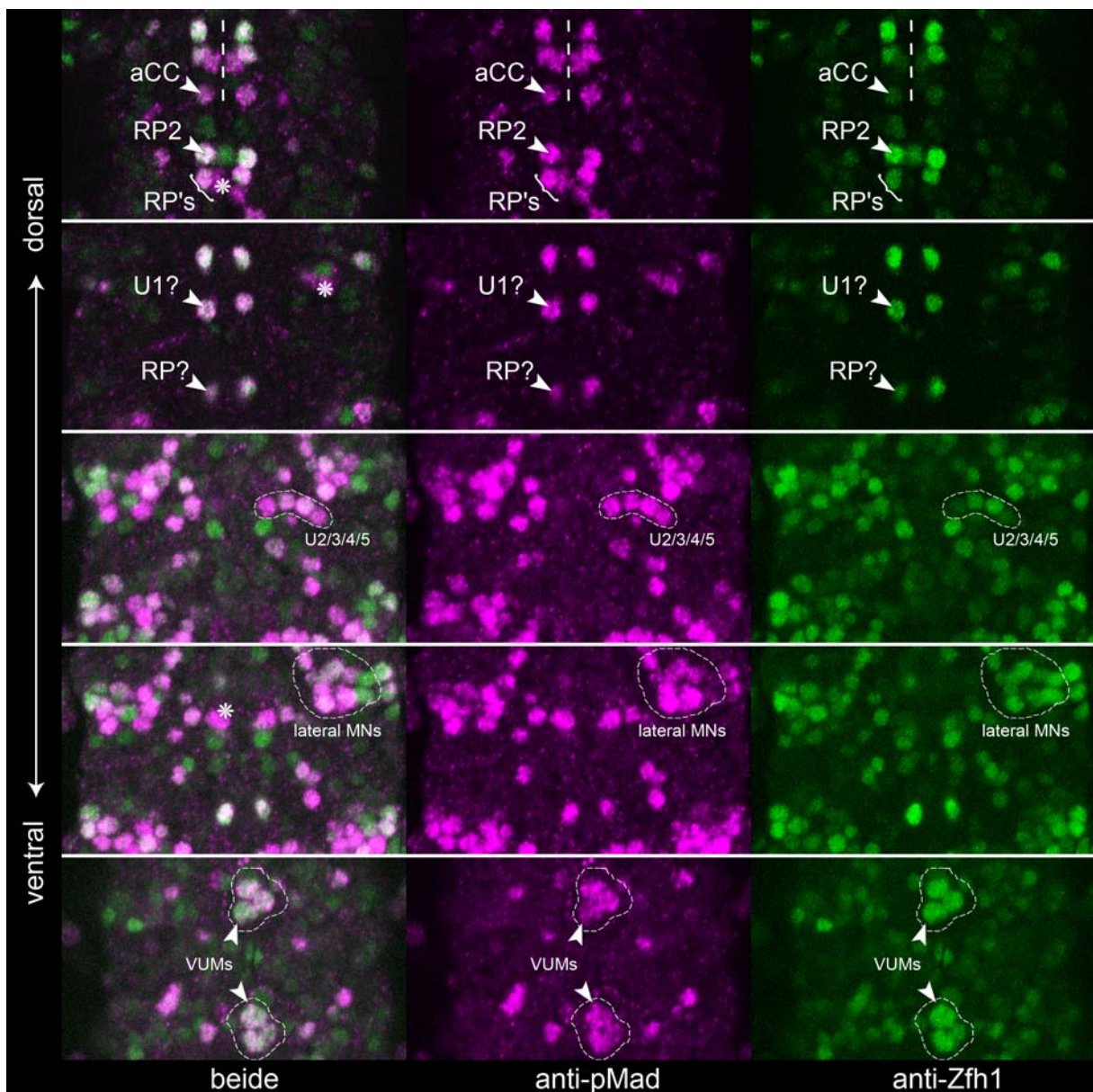


Abb. 22 Zfh1 wird in allen TGF β -aktivierten Zellen exprimiert

Dargestellt sind verschiedene Fokusebenen (von dorsal nach ventral) zweier abdominaler Segmente eines vNS im spätembryonalen Stadium 16. Die Mittellinie ist gestrichelt eingezeichnet. Fast alle phospho-Mad-positiven Zellen (pMad, magenta) exprimieren auch Zfh1 (grün). In seltenen Fällen sind einzelne Zellen zu finden, die nur pMad exprimieren (Sternchen).

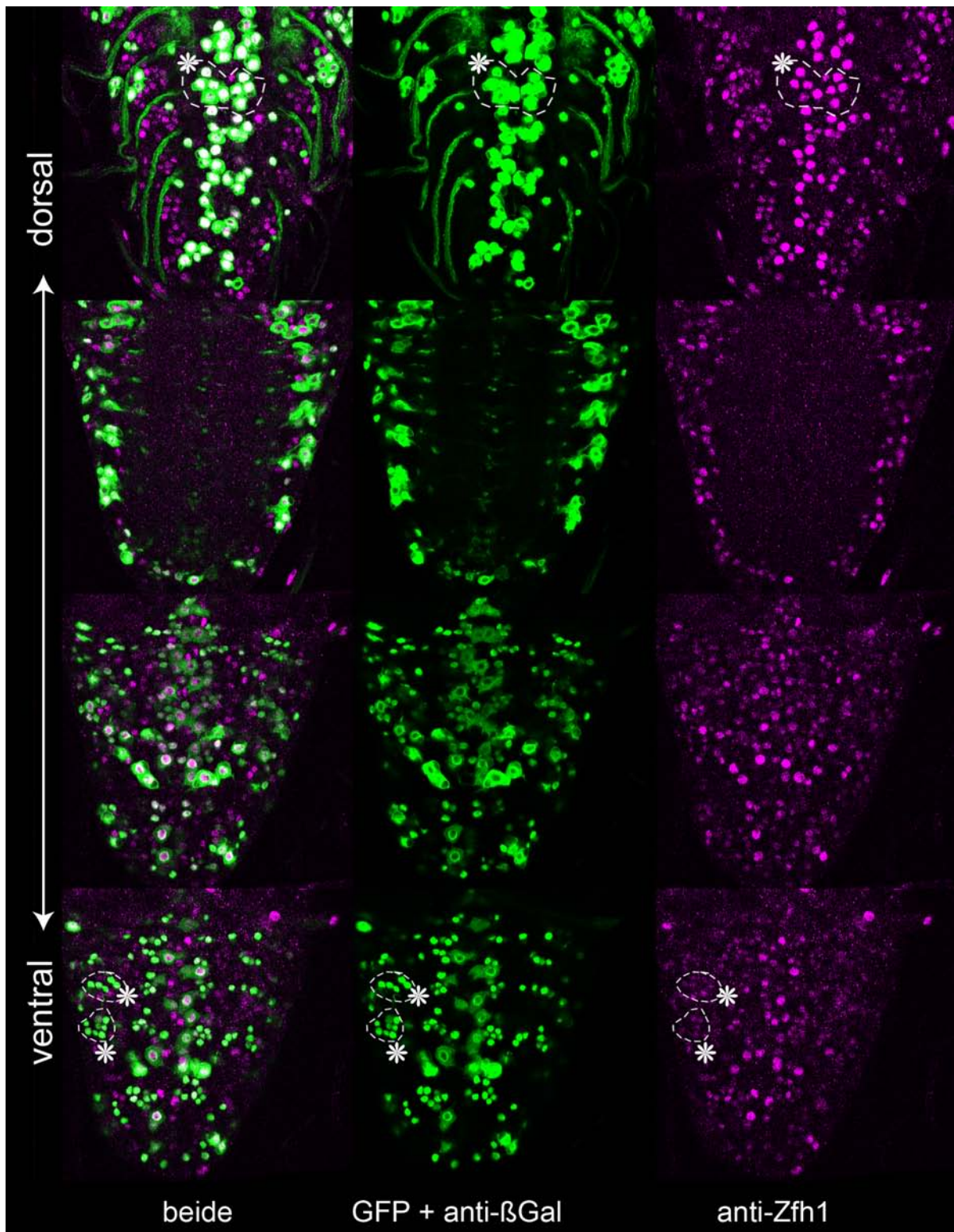


Abb. 23 Expressionsmuster von *DVGlut-Gal4* (OK371-Gal4) im Verhältnis zur endogenen *Zfh1*-Expression in spätlarvalen vNS

Dargestellt sind verschiedene Fokusebenen (von dorsal nach ventral). Gal4-abhängige Expression von β Gal (grün) und CD8-GFP (grün) zeigt eine Vielzahl von Zellen. Alle dieser glutamatergen Neurone sind ebenfalls *Zfh1*-positiv (magenta), allerdings unterschiedlich stark (vergleiche dorsale Gruppe und ventrale Gruppe, umrahmt, mit Sternchen).

3.4.4.2. Kolokalisation mit dem Glutamat-Transporter *DvGluT*

Weil die Mehrzahl der Motoneurone bei *Drosophila* Glutamat als vorrangigen Neurotransmitter verwenden (Jan und Jan, 1976; Johansen et al., 1989), kann man als Alternative zu Antikörperfärbungen gegen phospho-Mad stattdessen die Motoneuron-spezifische Treiberlinie *OK371-Gal4* verwenden (Mahr und Aberle, 2006). Dieser Gal4-Enhancer-trap-Stamm inseriert in der Nähe der regulatorischen Sequenz von *DvGluT* (*Drosophila vesicular Glutamate Transporter*, CG9887) und vollzieht das Expressionmuster dieses Gens vollständig nach. *OK371* hat damit den großen Vorteil gegenüber anderen motoneuronalen Gal4-Linien, dass die Gal4-Expression in allen glutamatergen Neuronen und in allen Stadien (Embryo, Larve, Fliege) zu finden ist. Außerdem ist *OK371* homozygot lebensfähig, d. h. nicht letal.

Durch die Antikörperdoppelfärbung gegen *Zfh1* und den *OK371*-Reporter bestätigt sich auch für larvale Stadien, dass mindestens alle glutamatergen Motoneurone *Zfh1*-positiv sind (Abb. 23). Da sich der phospho-Mad-Antikörper nicht sehr gut für Färbungen des spätlarvalen ZNS eignet (eigene Beobachtung), konnte auf diesem Weg gezeigt werden, dass Motoneurone ihre *Zfh1*-Expression auch in postembryonalen Stadien aufrechterhalten. Dies bedeutet, dass *Zfh1* auch eine postembryonale Funktion innehaben könnte, was ich in weiteren Experimenten überprüft habe.

3.5. *Zfh1* wird in vielen Subtypen von Gliazellen exprimiert

Gliazellen sind für das Nervensystem von zentraler Bedeutung und notwendig für das Funktionieren von Neuronen. In *Drosophila* kann man eine Vielzahl von Gliazellen aufgrund ihrer morphologischen und molekularen Eigenschaften identifizieren und voneinander unterscheiden (Ito et al., 1995). So lassen sich mithilfe eines Antikörpers gegen das Homöodomänenprotein Reversed-polarity (Repo) alle lateralen Glia des ZNS und peripheren Gliazellen markieren (Halter et al., 1995). Im Folgenden habe ich analysiert, welche Gliazellen *zfh1* exprimieren und ob der Verlust von *Zfh1* sich auf die Anzahl und Verteilung der Gliazellen auswirkt.

3.5.1. Zfh1 wird in einigen Subtypen lateraler Gliazellen des ZNS exprimiert

Im abdominalen ventralen Bauchmark von *Drosophila* lassen sich ca. 60 Gliazellen je Neuromer identifizieren (Ito et al., 1995). Von diesen zeigen im Stadium 16 viele Zellen Zfh1-Immunoreaktivität, je nach Zelltyp mit unterschiedlicher Stärke (Abb. 24). Die oberflächenassoziierten Subperineurialglia (SPG) und Channelglia (CG) sind alle Zfh1-positiv, ebenso die intersegmentale Nervenwurzelglia (ISNG) aus der Klasse der neuropilassozierten Gliazellen. Im Gegensatz dazu sind in Stadium 16 die kortikal gelegenen Cellbodyglia (CBG) Zfh1-negativ, ebenso die dorsal vom Neuropil gelegenen Longitudinalen Glia (LG). Generell scheint es so zu sein, dass solche Gliazellen, die großflächigen Kontakt zur Hämolymphe haben, Zfh1-positiv sind, wohingegen innen gelegene Glia, z. B. Longitudinale Glia und Cellbodyglia, zu diesem späten Zeitpunkt kein Zfh1 exprimieren.

Zu früheren Zeitpunkten ist dies anders: In den Embryonalstadien 11 und 12 sind eine Reihe von Gliazellen Zfh1-positiv, die es in Stadium 16 nicht mehr sind. Durch Antikörperdoppelfärbung mit anti-Eagle, welcher unter anderem den Neuroblasten NB6-4 und dessen Nachkommenzellen markiert, lässt sich die von diesem Neuroblasten abstammende Cellbodyglia nachweisen (Schmidt et al., 1997). Diese Gliazellen wandern nach ihrer Geburt Richtung medial und scheinen ihre Zfh1-Expression nach Erreichen ihrer finalen Position zu verlieren (nicht dargestellt). Dasselbe kann auch für den Longitudinalen Glioblasten (LG) und seine Nachkommen gesagt werden, der sich aufgrund seiner relativen Position zu den Neuronen des NB6-4 ansprechen lässt und in frühen Stadien ebenfalls stark Zfh1-positiv ist. Diese Expression ist in Stadium 16 abgeschaltet (nicht dargestellt).

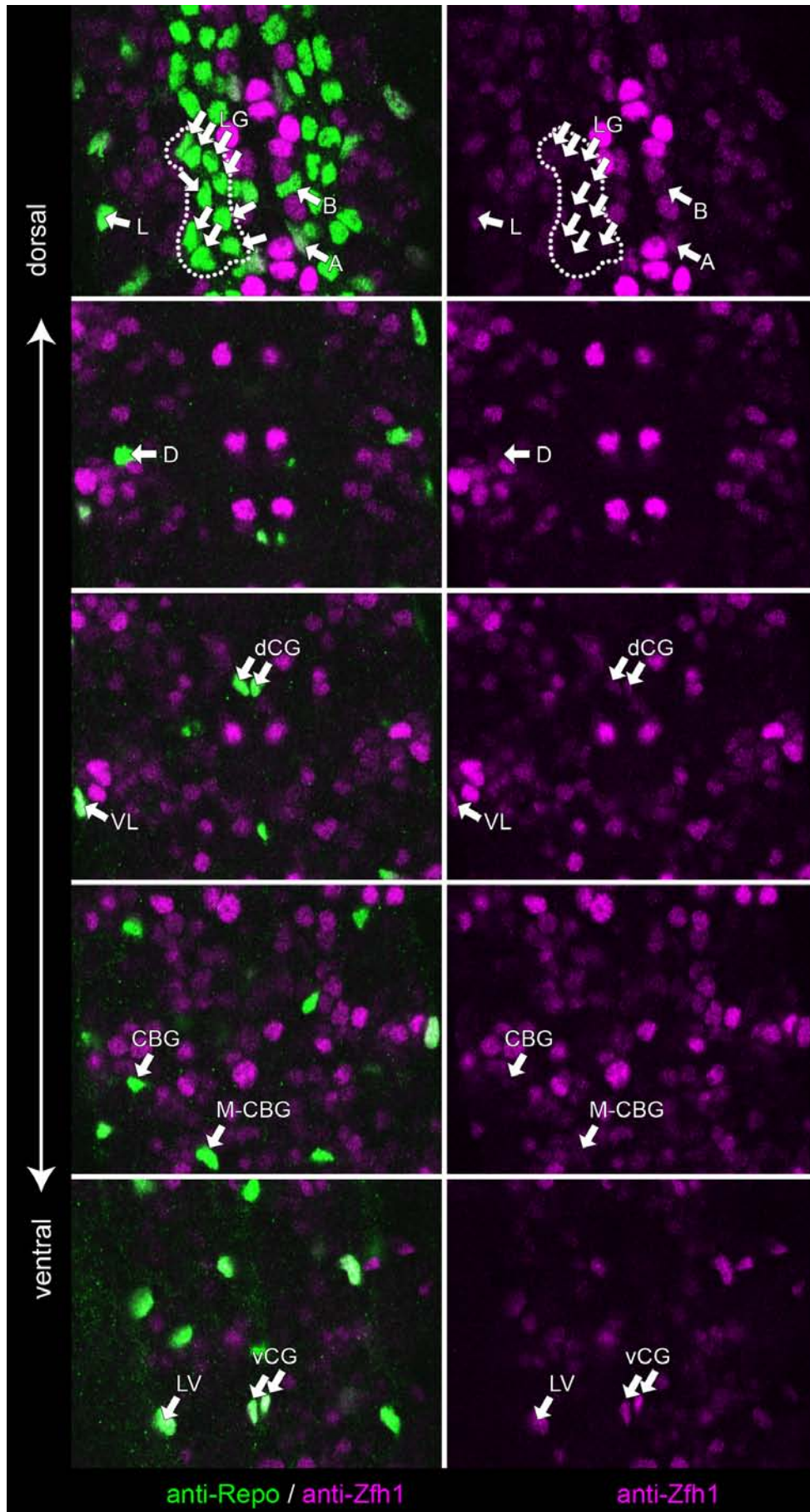


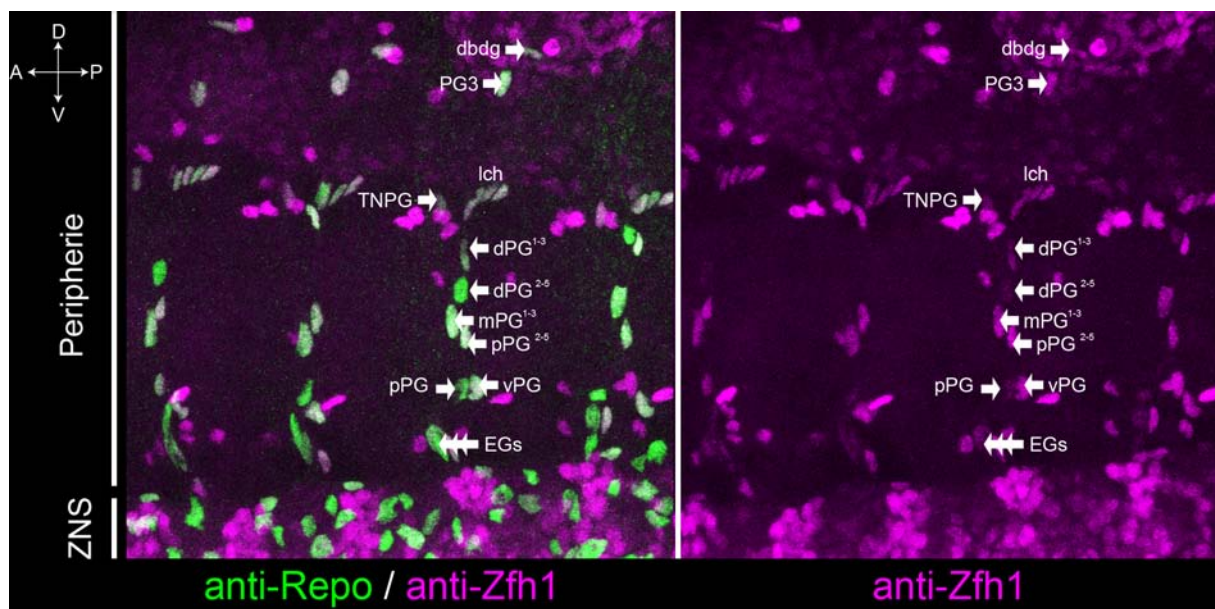
Abb. 24

Abb. 24 Viele Gliazellen im vNS exprimieren Zfh1

Dargestellt sind zwei Abdominalsegmente eines wildtypischen Embryos in Stadium 16. Die Gliazellen (grün) lassen sich mit anti-Repo-Antikörpern spezifisch anfärben und individuell bezeichnen (LG = Longitudinale Glia; SPG = Subperineurialglia; CG = Channelglia; CBG = Cellbodyglia). Zu den Zfh1-positiven Gliazellen gehören die A-SPG, B-SPG, L-SPG, alle CG, VL-SPG und die LV-SPG. Bei diesen Gliazellen handelt es sich ausschließlich um Zellen, die außen auf dem ZNS lokalisiert sind und damit Kontakt zur Hämolymphe haben. Nicht dargestellt: CBG exprimieren zu frühen Zeitpunkten (Stadium 12) noch Zfh1.

3.5.2. Alle peripheren Gliazellen sind Zfh1-positiv

Zu den lateralen Gliazellen, welche Repo-positiv sind, zählen auch die aus dem ZNS auswandernden Gliazellen und die des peripheren Nervensystems. Dies umfasst jene Gliazellen, die für die Umhüllung der segmentalen Nerven sorgen (PGs und EGs) oder am Transversalnerv liegen (TNPG), die zum Chordotonalorgan gehörenden Ligamentzellen, sowie die zum dorsalen bipolaren dendritischen Neuron gehörende Glia (DBDG). Alle diese Gliazellen exprimieren in Stadium 16, verschieden stark, Zfh1 (Abb. 25). In wiefern dies auch schon für frühere Stadien gilt, konnte aufgrund fehlender Marker nicht gezeigt werden.

**Abb. 25 Alle peripheren Gliazellen exprimieren Zfh1**

Dargestellt sind vier Hemisegmente eines wildtypischen Embryos in Stadium 16. Die Gliazellen (grün) lassen sich mit anti-Repo-Antikörpern spezifisch anfärben und individuell bezeichnen (PG = periphere Glia, d = dorsal bzw. distal, m = medial, v = ventral, p = proximal; EG = Exitglia; TNPG = periphere Glia des Transversalnervs; lch = laterales Chordotonalorgan; Zahl im Index = originärer Neuroblast; dbdg = zum Dorsalen bipolaren Dendriten gehörende Glia).

3.5.3. Zfh1-Expression im optischen Lobus und in der Augenantennen- imaginalscheibe

Da Zfh1 zu verschiedenen Zeitpunkten in allen Gliazellen exprimiert zu werden scheint, habe ich mir angeschaut, ob Zfh1 auch in den Gliazellen des optischen Lobus und der Augenantennenimaginalscheibe zu finden ist. Diese Zellen können ebenfalls mithilfe des Repo-Antikörpers sowie mit anti-Omb identifiziert werden (Poeck et al., 1993). Präparierte Augen-Antennenimaginalscheiben zeigen Zfh1-positive Zellen an beiden Enden der Imaginalscheibe: eine Population von Zellen an der Spitze der Antennenimaginalscheibe sowie eine größere Anzahl von Zellen am posterioren Ende der Augenimaginalscheibe (Abb. 26). Hier lassen sich Neurone bzw. Gliazellen durch den neuronalen Marker anti-Elav bzw. anti-Repo-Färbung genauer charakterisieren, und ich konnte zeigen, dass es sich bei den Zfh1-positiven Zellen um Gliazellen handelt (Abb. 27 und 28). Diese Gliazellen werden im optischen Lobus der jeweiligen Gehirnhemisphäre geboren und wandern anschließend entlang der

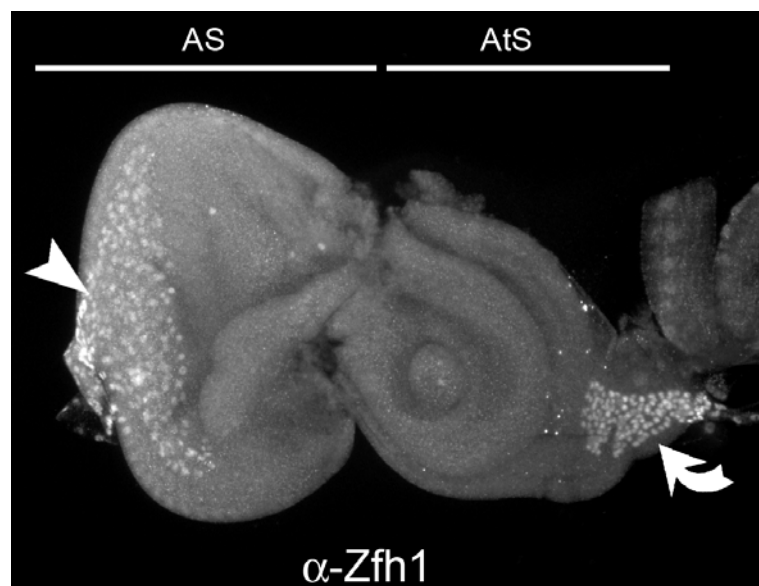


Abb. 26 Zfh1-Expression der Augenantennenimaginalscheibe

Zwei Populationen von Zellen der Augenantennenimaginalscheibe sind Zfh1-positiv. Eine Population im Augenteil (AS, Pfeilspitze) sowie eine im antennalen Teil (AtS, gebogener Pfeil).

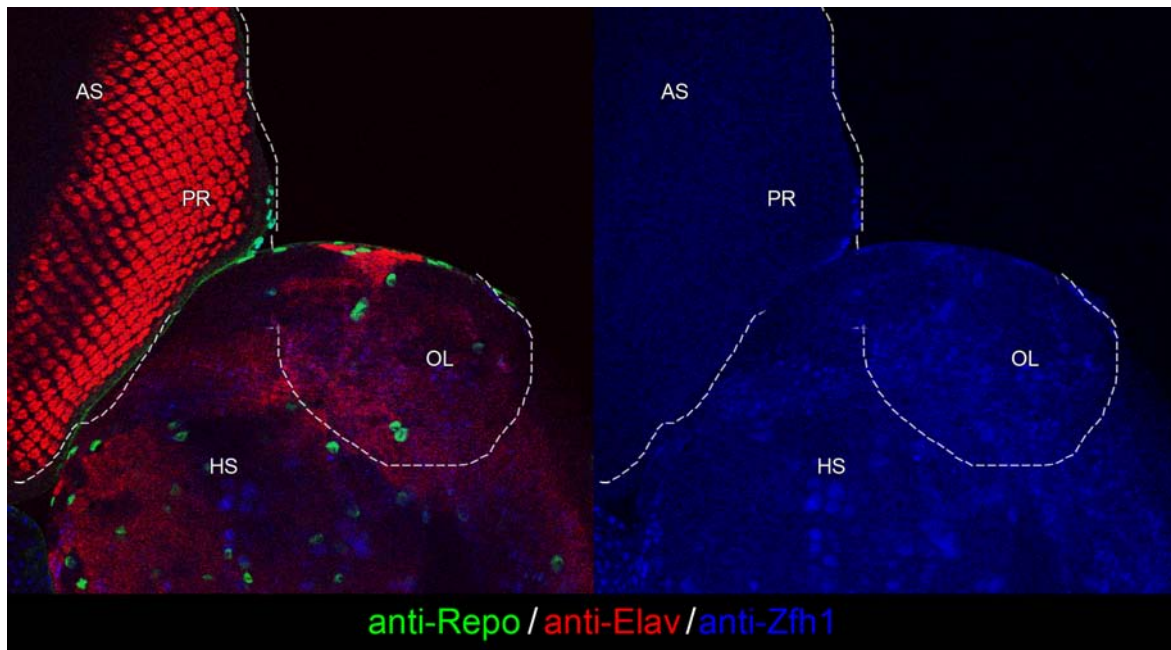


Abb. 27 Die sich differenzierenden Photorezeptoren (PR, rot) sind Zfh1-negativ (blau)

Dargestellt ist ein Teil einer Augenimaginalscheibe (AS) sowie eine Gehirnhemisphäre (HS) inkl. optischem Lobus (OL). Neurone lassen sich mit anti-Elav (rot) anfärben, Gliazellen mit anti-Repo (grün).

Photorezeptoraxone, die den optischen Stiel bilden, in die Augenimaginalscheibe ein (Rangarajan et al., 1999). Dabei habe ich festgestellt, dass im optischen Lobus noch weitere Zellen Zfh1-positiv sind. Mittels verschiedener Antikörper gegen Vorläuferzellen oder sich differenzierende neurale Zellen (anti-Optomotor-blind, anti-Dachshund) konnte ich zeigen, dass Zfh1 in den Zellen der Lamina, in einigen Vorläuferzellen der Lamina sowie in den inneren Vorläuferzellen exprimiert wird (Abb. 29). Die Elav-positiven Neurone im Lobulakortex sind Zfh1-negativ.

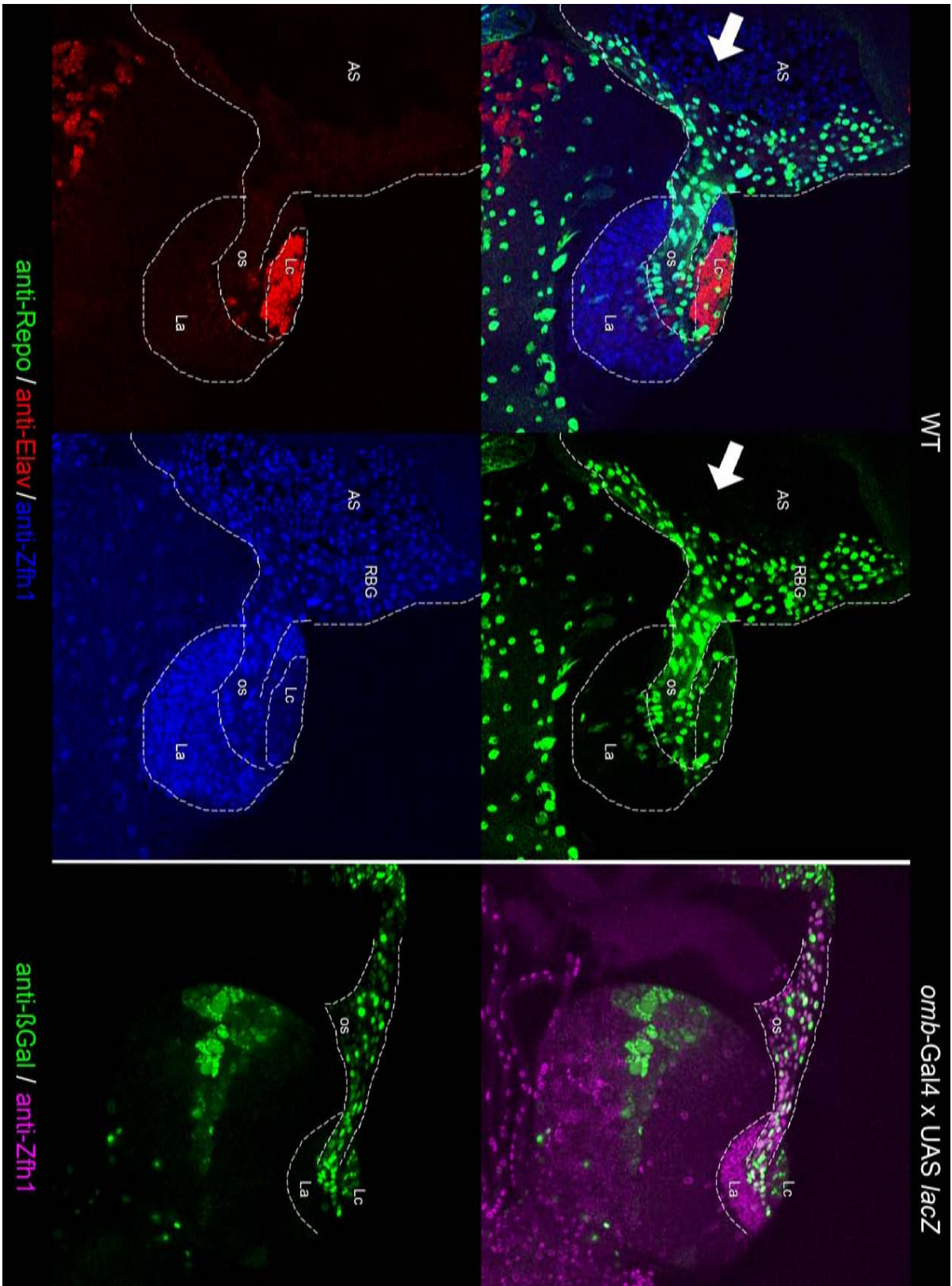


Abb. 28

Abb. 28 Aus dem optischen Lobus auswandernde Gliazellen sind Zfh1-positiv

Links und Mitte: Retinobasalgliazellen (RBG, grün) wandern entlang des optischen Stiels (os) in die Augenimaginalscheibe (AS) ein. Die Neurone im Laminakortex (Lc, rot) sind Zfh1-negativ, die Lamina (La) Zfh1-positiv. Eine weitere, nicht identifizierte Population von Zellen in der AS sind ebenfalls Zfh1-positiv (Pfeil). **Rechts:** Mit *omb*-Gal4 lassen sich die wandernden Gliazellen ebenfalls ansprechen (grün).

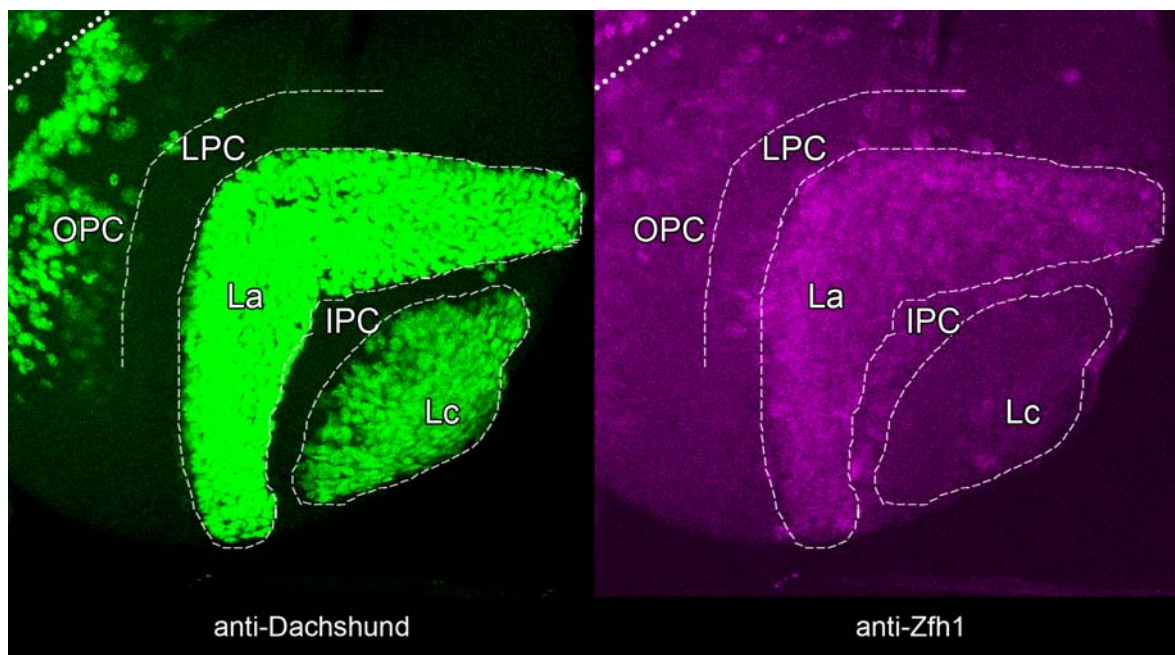


Abb. 29 Im optischen Lobus sind nur die Zellen der Lamina (La) und des inneren Proliferationszentrums (IPC) Zfh1-positiv (magenta)

Dargestellt ist eine Gehirnhemisphäre im späten Larvenstadium 3. Die anterior-posteriore Achse ist gepunktet eingezeichnet. Der Transkriptionsfaktor Dachshund (grün) wird im äußeren Proliferationszentrum (OPC), der Lamina (La) und im Laminakortex (Lc) exprimiert. Dieses Muster dient als Orientierung, um die einzelnen Regionen des optischen Lobus zu unterscheiden.

3.6. Zfh1 wird in vielen neuropeptidergen Neuronen exprimiert

Zur weiteren Charakterisierung der Expression von Zfh1 habe ich nach Genen gesucht, die im spät-larvalen ZNS exprimiert werden, und zwar möglichst in identifizierbaren Zellen. Eine besondere Gruppe stellen hierbei jene Gene dar, die für Neuropeptide kodieren und von deren Regulation und Funktion wir teilweise sehr genaue Kenntnisse haben. Für diese existieren eine Vielzahl von Antikörpern (Nassel, 2002), und ich habe daher Antikörperfärbungen gegen diese Neuropeptide im Wildtyp durchgeführt und analysiert, ob Zfh1 auch in dieser Population von Neuronen exprimiert wird.

3.6.1. Dimmed, c929-Gal4

Um einen generellen Überblick über die Anzahl neuropeptiderger Zellen zu bekommen, die Zfh1-positiv sind, kann man Antikörperfärbungen gegen den bHLH-Transkriptionsfaktor Dimmed bzw. den *dimmed*-Reporter *c929-Gal4* und gegen Zfh1 durchführen (Hewes et al., 2003). Hiermit konnte ich zeigen, dass eine Vielzahl neuropeptiderger Neurone Zfh1 positiv ist (Abb. 30). Für die weitere Charakterisierung habe ich einzelne Neuropeptide ausgewählt und auf ihre Koexpression mit Zfh1 überprüft.

3.6.2. Proctolin (Proc)

Das Neuropeptid Proctolin ist bei Insekten weit verbreitet und kann durch Antikörperfärbung auch im ZNS von *Drosophila* nachgewiesen werden (Anderson et al., 1988; Taylor et al., 2004). Bei einigen proctolinergen Zellen handelt es sich um die dMP2-Neurone, Nachkommen des Neuroblasten MP2, der sich nur einmal teilt und eine dorsale (dMP2) und ventrale (vMP2) Nachkommenzelle generiert (Spana et al., 1995). Das dMP2-Neuron stirbt im späten Embryo in allen Segmenten bis auf A6-A8 ab; die überlebenden dMP2 innervieren den *Drosophila* Enddarm und exprimieren Proctolin (Miguel-Aliaga und Thor, 2004). Die Identität der anderen Neurone war

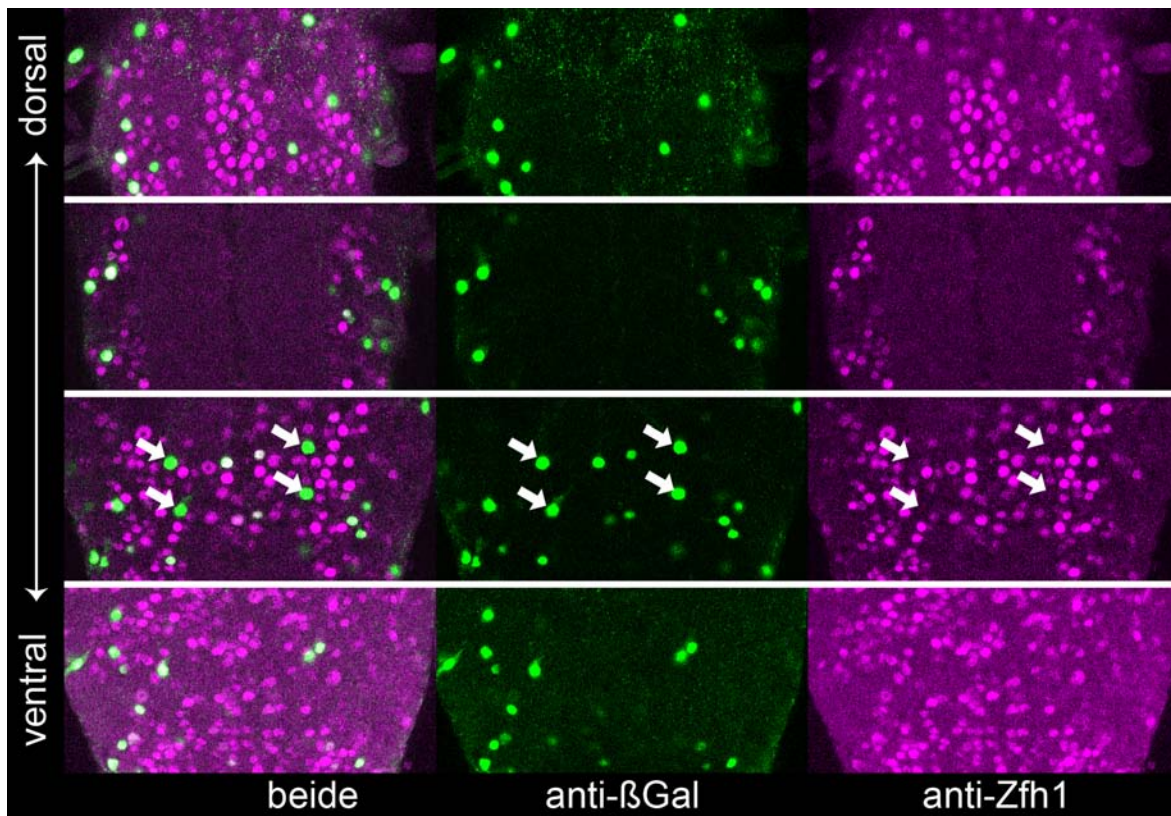


Abb. 30 Expressionsmuster von *dimmed*-Gal4 (C929-Gal4) und Zfh1 in spätlarvalen vNS (Übersicht)

Dargestellt sind verschiedene Fokusebenen (von dorsal nach ventral). Gal4-abhängige Expression von β Gal (grün) zeigt Ap-Neurone an. Die meisten dieser Neurone sind ebenfalls Zfh1-positiv (magenta), allerdings gibt es einige wenige Zfh1-negative Neurone (Pfeile).

unklar, allerdings zeigen eine Reihe von Motorendplatten der Muskulatur der Körperwand Proctolin-Immunoreaktivität, sodass angenommen werden muss, dass einige Motoneurone Proc-positiv sein müssten (Anderson et al., 1988). Im ZNS lokalisiert der Proc-Antikörper vor allem im Zellkörper, mit besonders starker Expression in den dorsalsten Zellen. Durch Antikörperdoppelfärbung gegen Zfh1 und Proctolin konnte ich zeigen, dass die meisten proctolineren Neurone auch Zfh1-positiv sind (Abb. 31). Bei den dorsalen Zellen handelt es sich um Motoneurone, wie ich durch den Vergleich der Zfh1/Proc-Expression mit der motoneuronalen Gal4-Linie *OK371* zeigen konnte (nicht dargestellt).

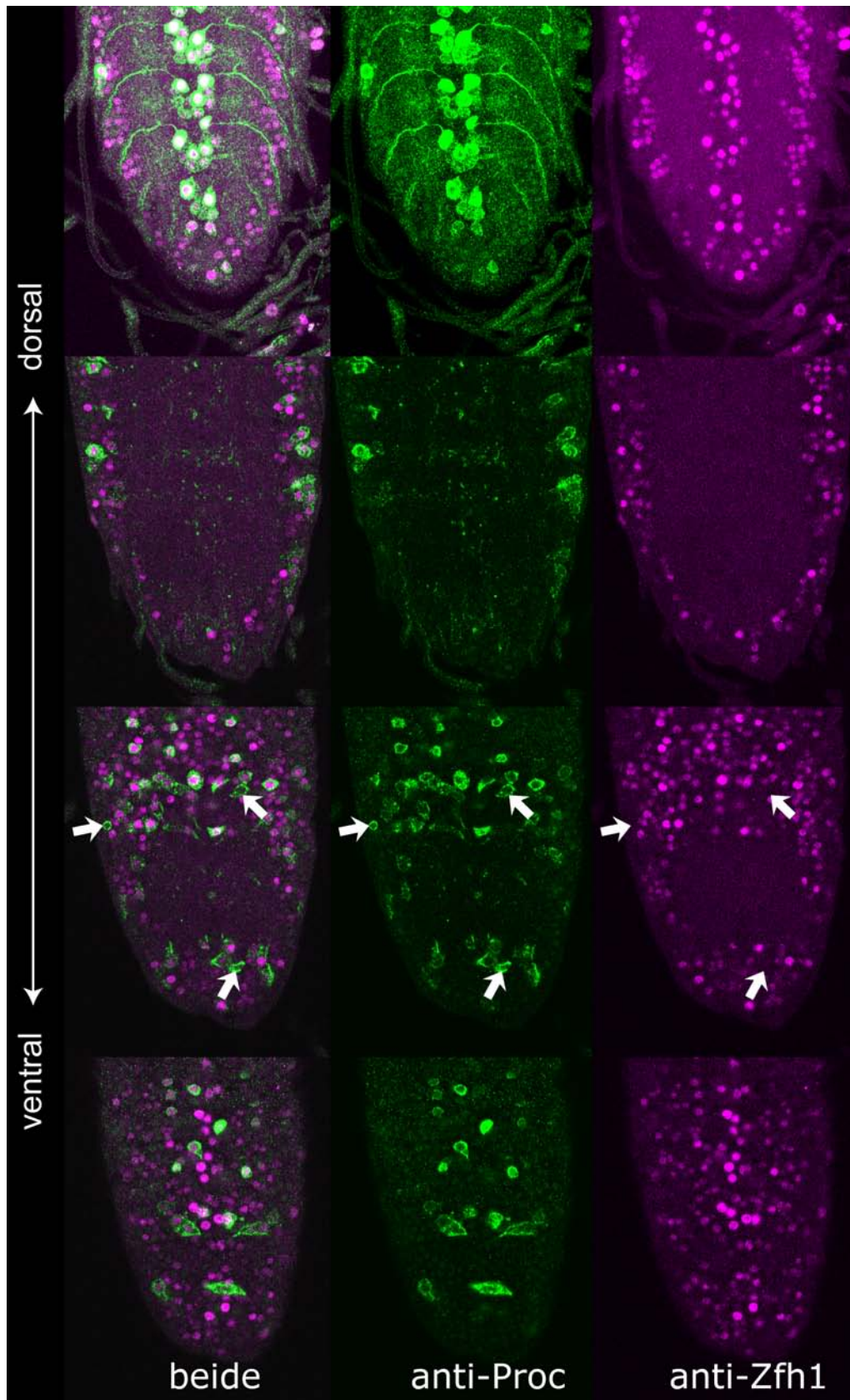


Abb. 31 Proctolinerge Neurone sind Zfh1-positiv

Dargestellt sind verschiedene Fokusebenen abdominaler Segmente eines vNS im späten L3-Larvenstadium. Es lassen sich eine Vielzahl Proctolin-positiver Neurone (grün) nachweisen, von denen die meisten Zfh1-positiv sind (magenta). Nicht Zfh1-positiv sind proctolinerge Neurone sind markiert (Pfeile).

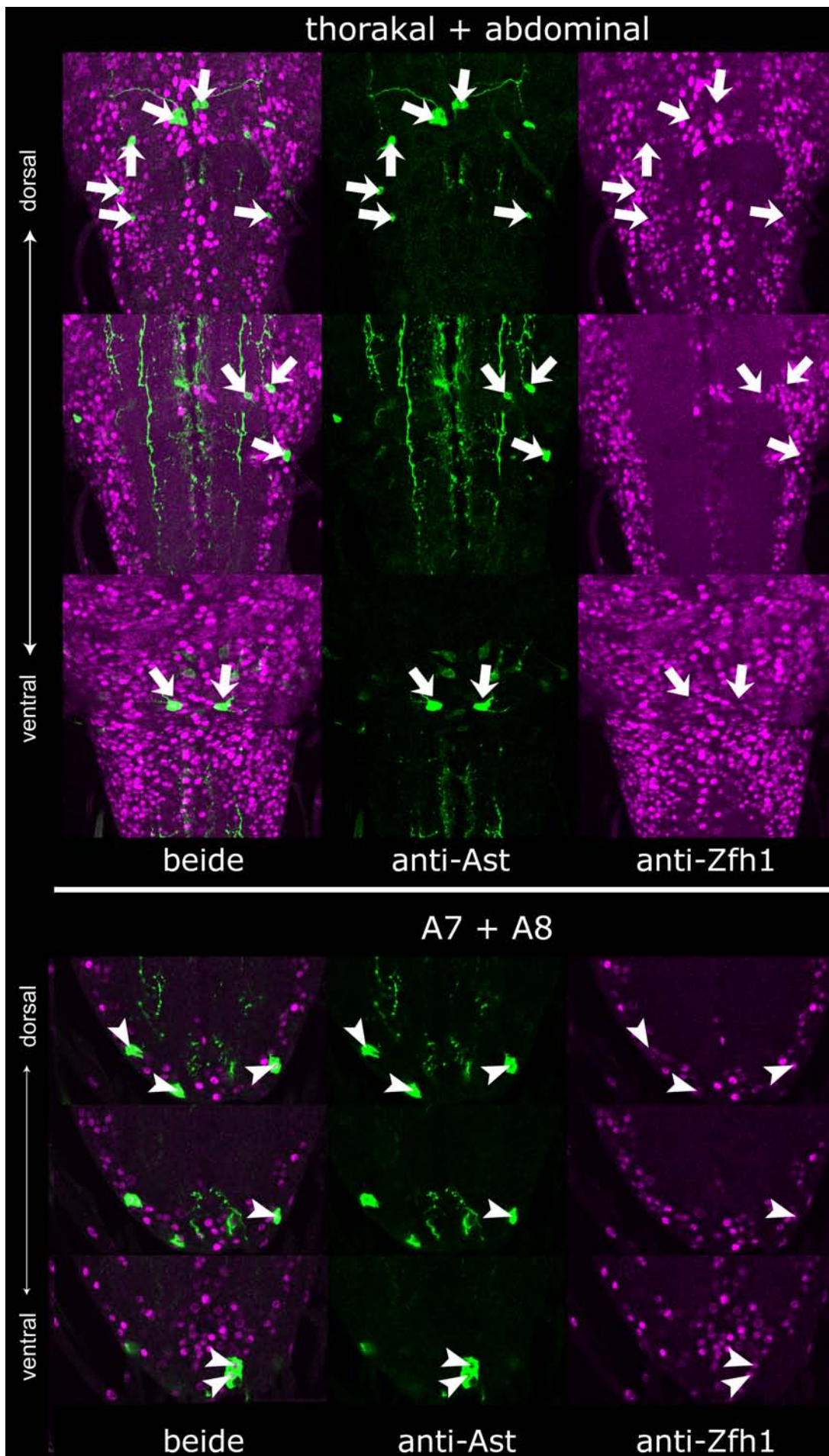


Abb. 32

Abb. 32 Expressionsmuster von Allatostatin-C und Zfh1 in spätlarvalen vNS (Übersicht)

Dargestellt sind verschiedene Fokusebenen (von dorsal nach ventral). Antikörperfärbung gegen Allatostatin (Ast, grün) markiert im Vergleich zu anti-Zfh1 (magenta) nur wenige Neurone. Die anterioren Ast-positiven Neurone sind Zfh1-negativ (weiße Pfeile), die posterioren (in A7 und A8) gelegenen Neurone sind dagegen Zfh1-positiv (Pfeilspitzen)

3.6.3. Allatostatin-A (Ast-A)

Es gibt drei verschiedene Typen von Allatostatinen (Typ -A, -B, und -C), Neuropeptiden, welche bei Insekten die Bildung von Juvenilhormon negativ regulieren. Der von mir verwendete Antikörper anti-Ast-A ist gegen ein Epitop des Ast-A-Proteins aus der Schabe *Diploptera punctata* gerichtet und erkennt im abdominalen vNS ca. zwölf Neurone (Stay et al., 1992). Doppelfärbung gegen Ast-A und Zfh1 zeigt, dass nur die im abdominalen Segment A8 gelegenen DLAA-Neurone Zfh1-positiv sind, wohingegen die im anterioren Teil lokalisierten Neurone keine Zfh1-Färbung zeigen (Abb. 32). Ich habe daher keine weiteren Experimente bezüglich dieses Neuropeptids durchgeführt.

3.6.4. Teile der Ringdrüse exprimieren Zfh1

Bei der Ringdrüse handelt es sich um ein neurosekretorisches Organ, welches anterior-dorsal zwischen den beiden Gehirnhemisphären lokalisiert. Die Prothorakaldrüse macht dabei den größten Teil der Ringdrüse aus und lässt sich mit einem Antikörper gegen den Ecdysonrezeptor EcR-B1 anfärben (Fujiwara et al., 1995). Ventral davon liegen die Corpora cardiaca und dorsal die Corpora allata. Ich konnte feststellen, dass nur der ventrale Teil der Ringdrüse, also das C. cardiacum, Zfh1-positiv ist (Abb. 33).

3.6.5. Leucokinin (Lki)

Das Neuropeptid Leucokinin (Lki) gehört zu einer sehr großen Gruppe von Neuropeptiden, die auch Myokinine genannt werden und sowohl

myomodulatorische als auch diuretische Funktion haben (Terhzaz et al., 1999). Im vNS von *Drosophila* sind 14 Zellen Lki-positiv (Cantera und Nassel, 1992). Dabei handelt es sich um Motoneurone mit Motorendplatten vom Typ-3v, welche den Muskel 12 (VL1) innervieren (Landgraf et al., 2003b) und zudem nicht glutamaterg sind (keine Kolokalisation mit *OK371*, nicht dargestellt). Ihr motoneuronaler Charakter machte es sehr wahrscheinlich, dass sie auch *Zfh1*-positiv sein könnten, was sich durch Doppelfärbung gegen *Zfh1* und Lki bestätigt (Abb. 34).

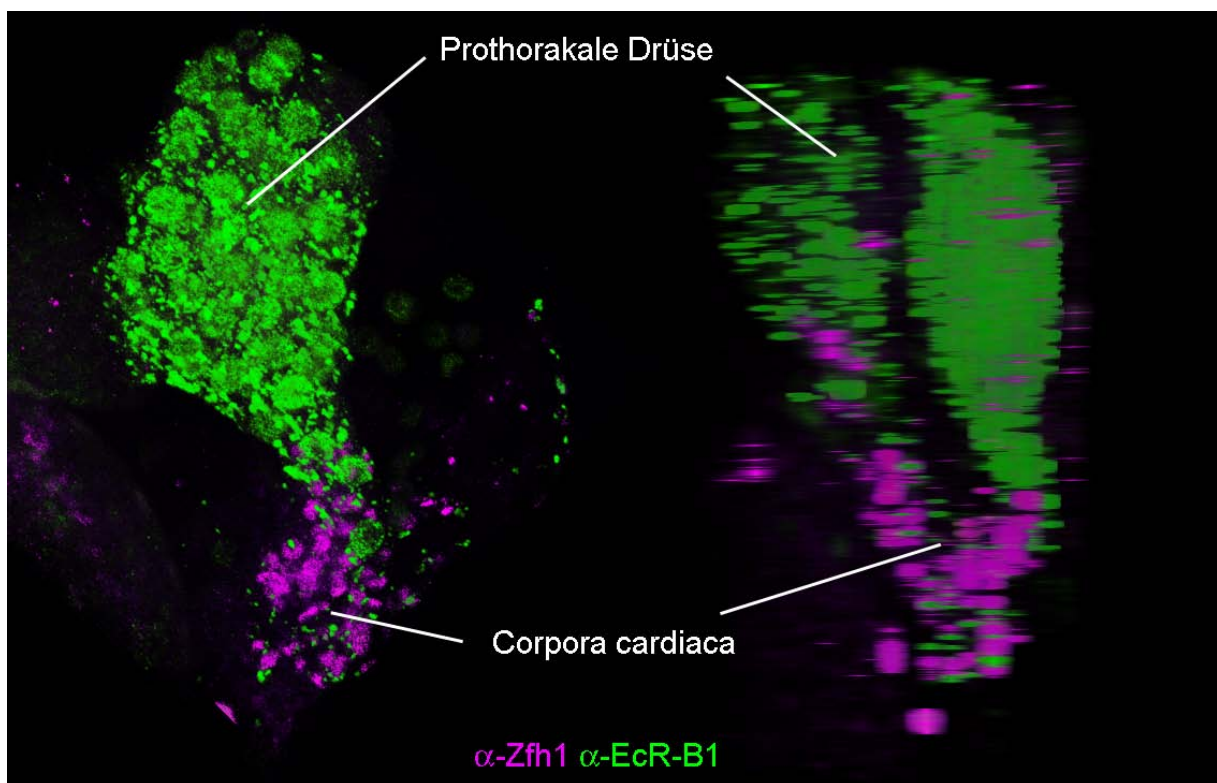


Abb. 33 Die Corpora cardiaca der Ringdrüse sind *Zfh1*-positiv

Ansicht von der Seite und schräg. Die paarig angelegte Ringdrüse besteht aus den Corpora cardiaca, den Prothorakaldrüsen (PG) und den (nicht dargestellten) Corpora allata. Die PG exprimieren den Subtyp B1 des Ecdysonrezeptors und sind *Zfh1*-negativ. Die ventral der PG gelegenen Corpora cardiaca sind dagegen stark *Zfh1*-positiv.

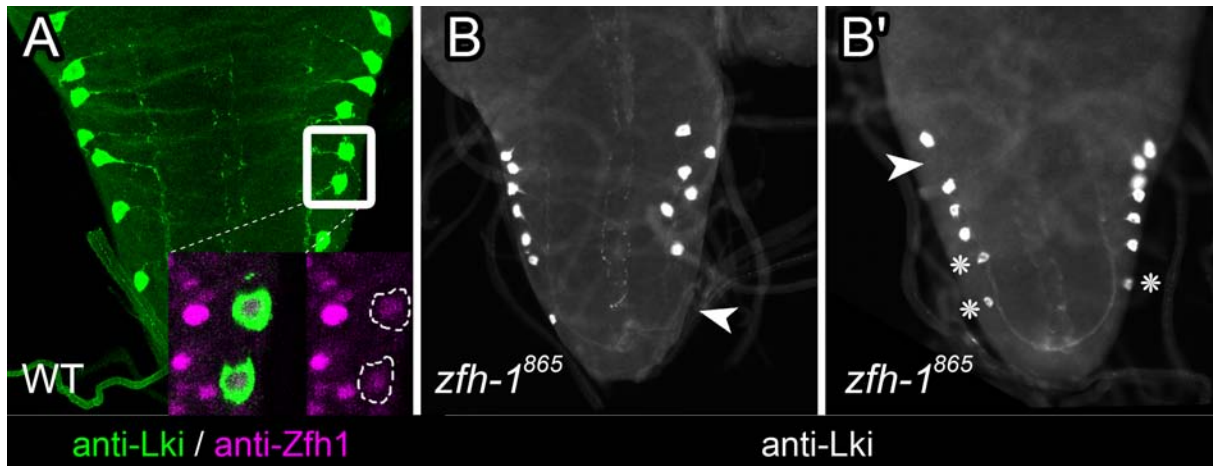


Abb. 34 Die Expression von Leucokinin (Lki) ist abhängig von Zfh1

A. Abdominale Segmente eines vNS, gefärbt gegen Lki (grün) und Zfh1 (magenta). Im Wildtyp sind 14 Neurone stark Lki-positiv. Detailansicht: Die leucokinergen Neurone exprimieren geringe Mengen an Zfh1. **B, B':** zwei Exemplare hypomorpher *zfh1*⁸⁶⁵-Mutanten. Die Expression von Lki fehlt in einzelnen Hemisegmenten (Pfeilspitze) oder scheint manchmal reduziert zu sein (Sternchen).

3.6.6. FMRFamid (FMRFa)

Das Neuropeptid FMRFamid (FMRFa) wird in etwa 44 Neuronen im ZNS von *Drosophila* exprimiert (Schneider et al., 1993) und gehört zu einer sehr gut charakterisierten Gruppe von hormonell aktiven Neuropeptiden bei Insekten, den FaRPs („FMRFamide-related proteins“). Besonders starke anti-FMRFa-Immunoreaktivität zeigen in den sechs thorakalen Hemisegmenten die zum lateralen Cluster Apterous-positiver Zellen gehörenden Tv-Neurone (Benveniste et al., 1998), welche das aus den Dorsalzellen hervorgegangene dorsale Neurohämalorgan (DNH) innervieren. Das *fmrfa* Gen kodiert für ein Vorläuferprotein, das in sieben physiologisch aktive Peptide proteolytisch gespalten wird (Hewes et al., 1998). Die Induktion der Expression von *fmrfa* ist durch eine Reihe von Arbeiten relativ gut verstanden (Allan et al., 2005; Allan et al., 2003; Benveniste und Taghert, 1999; Marques et al., 2003; Miguel-Aliaga et al., 2004). Hierbei sekretiert das Neurohämalorgan den TGFβ-Liganden Glass-bottom-boat (Gbb) und aktiviert dadurch im Tv-Neuron den TGFβ-Signalweg, indem Gbb dort an den Rezeptor Wishful-thinking (Wit) bindet und dieses Mad-Protein dann zu transkriptionell aktivem pMad

phosphoryliert. pMad führt dann im Konzert mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Apterous, Dimmed oder Eyes-absent, zur Expression von FMRFa. Fehlt einer dieser Faktoren, ist die FMRFa-Expression teilweise oder vollständig gestört, wohingegen die gemeinsame ektopische Expression dieser Faktoren im vNS von *Drosophila* die FMRFa-Expression ektopisch induzieren kann. Bei der Regulation von FMRFa handelt es sich um ein Musterbeispiel für einen kombinatorischen Kode, welcher das Zellschicksal (hier: FMRFa-Expression) eines einzelnen, postmitotischen Neurons festlegen kann. Da die panneuronale Expression dieser Faktoren nicht zu panneuronalem FMRFa führt, müssen aber noch weitere Faktoren existieren, die an der Regulation von *frmfamid* beteiligt sind. Wegen der starken Koexpression von pMad und Zfh1 (siehe oben) habe ich überprüft, ob Zfh1 im Thorax auch in den Tv-Neuronen exprimiert wird und durch Mutantanalyse, ob Zfh1 an der *frmfamid*-Regulation beteiligt ist.

3.6.6.1. Zfh1 wird im Tv-Neuron und im Neurohämalorgan exprimiert

Ich konnte bereits zeigen, dass Zfh1 sowohl in pMad-positiven Zellen, als auch in vielen Dimmed-positiven Zellen (*c929-Gal4*) exprimiert werden. Es war deshalb nicht überraschend, dass die pMad- und Dimmed-positiven Tv-Neurone (Allan et al., 2005; Hewes et al., 2003) ebenfalls Zfh1-positiv sind (Abb. 35). Interessanterweise ist auch das Neurohämalorgan stark Zfh1-positiv, eine Beobachtung, die für die bekannten Spezifizierungsfaktoren des Tv-Neurons nicht gilt und die zudem Implikationen für einen eventuellen Zfh1-Phänotyp haben könnte (siehe unten).

Das Tv-Neuron gehört zu einer Gruppe von Zellen, die alle den Homöodomänen-transkriptionsfaktor Apterous exprimieren („laterales Apterous-Cluster“). Diese vier Neurone unterscheiden sich in der Expression anderer Faktoren, z. B. Squeeze oder Dimmed (Allan et al., 2005). Ich habe daher auch die Zfh1-Expression in den anderen Ap-Neuronen überprüft, und konnte feststellen, dass Zfh1 in allen vier Neuronen des lateralen Ap-Clusters exprimiert wird. Zwei Zellen zeigen dabei stärkere und zwei Zellen schwächere Zfh1-Expression. In späten larvalen Stadien exprimieren, bis auf eine mediolaterale Zelle, alle Ap-positiven Zellen Zfh1 (Abb. 36).

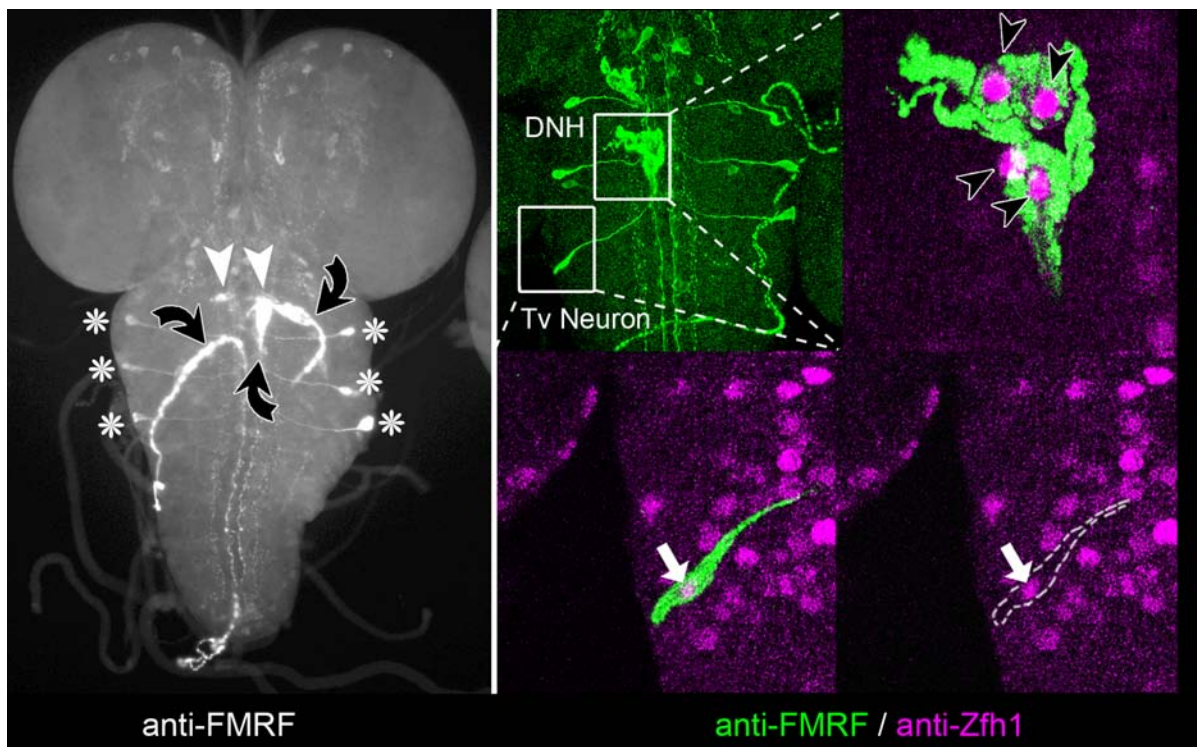


Abb. 35 Tv-Neurone und die dorsalen Neurohämialorgane (DNH) sind Zfh1-positiv

Links: Spätlarvales Gehirn und Bauchmark. Antikörperfärbung gegen FMRFa zeigt im Thorax sechs Tv-Neurone (Sternchen) und drei Neurohämialorgane (schwarze gebogene Pfeile). Die SE2-Neurone stellen ein weiteres Paar FMRFa-positiver Neurone dar (weiße Pfeilspitzen). **Rechts:** Detailansichten konfokaler Aufnahmen zweier Neurohämialorgane (rechts oben) und eines Tv-Neurons (unten). Die aus je zwei Zellen bestehenden DNH sind Zfh1-positiv (magenta, schwarze Pfeilspitzen). Auch die Tv-Neurone zeigen Zfh1-Immunoreaktivität (magenta, weißer Pfeil).

3.6.7. Crustacean-cardioactive peptide (CCAP)

Der Name von CCAP geht darauf zurück, dass es ursprünglich aus der Strandkrabbe und dem Flusskrebs isoliert worden ist und dort an der Regulation der Herzfrequenz beteiligt ist. Sowohl das Peptid, als auch dessen Funktion finden sich auch bei Insekten konserviert. Durch weitere Analysen konnte gezeigt werden, dass es hier sowohl eine Rolle spielt beim Schlüpfen der Imago, als auch aufgrund seiner Expression im ZNS neurale Funktionen zu haben scheint.

Im larvalen vNS von *Drosophila* exprimieren in den abdominalen Segmenten jeweils zwei Paare von Neuronen das Peptid CCAP. Durch CCAP-Antikörperfärbung sowie den Vergleich des CCAP-Gal4-Musters mit der endogenen *zfh1* Expression kann man zeigen, dass diese Zellen ebenfalls Zfh1-positiv sind (Abb. 37 und 38).

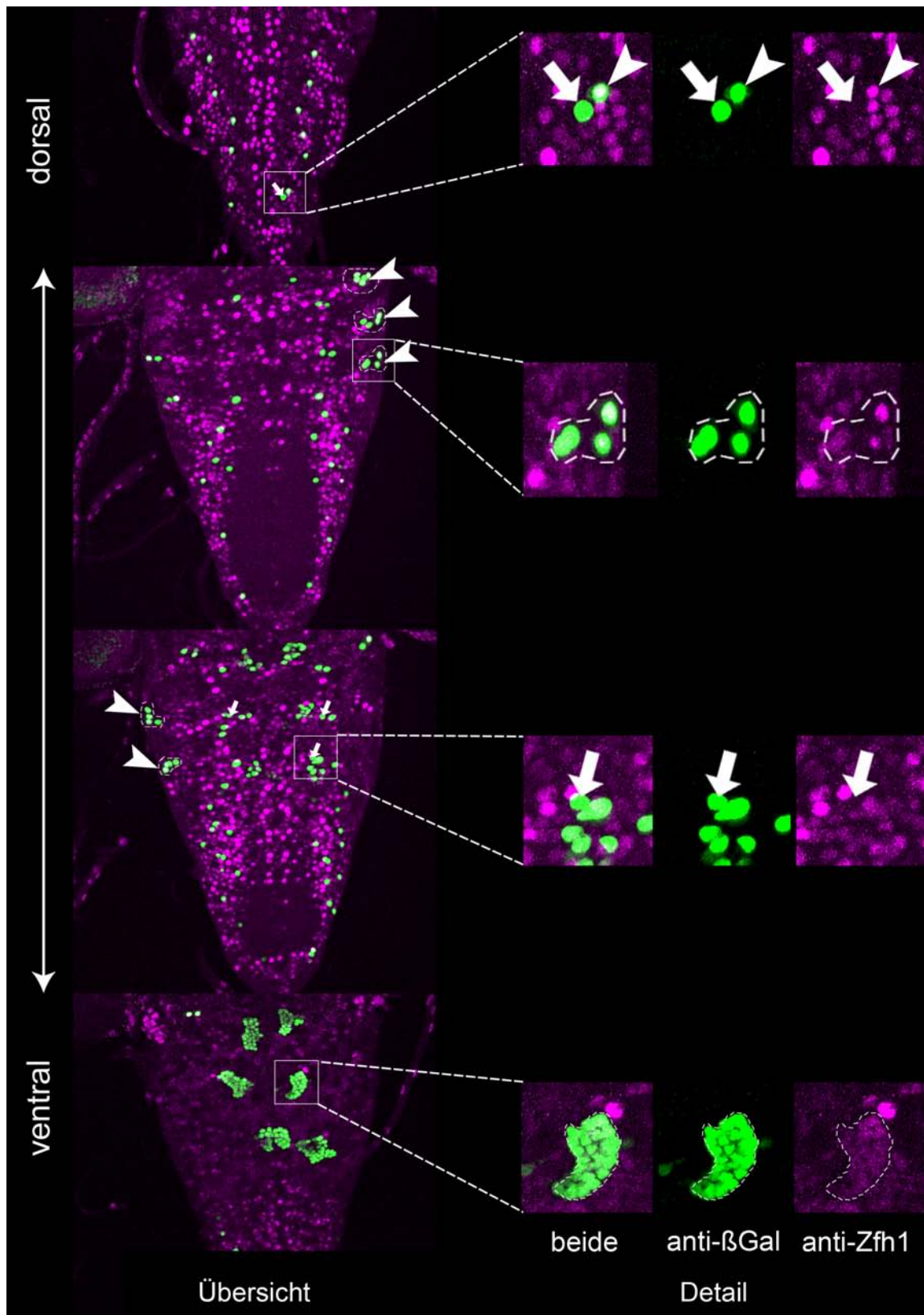


Abb. 36 Expressionsmuster von *apterous*-Gal4 und *Zfh1* in spätlarvalen vNS (Übersicht)

Dargestellt sind verschiedene Fokusebenen (von dorsal nach ventral). Gal4-abhängige Expression von β Gal (grün) zeigt Ap-Neurone an. Die meisten dieser Neurone sind ebenfalls *Zfh1*-positiv (magenta), allerdings gibt es einige wenige *Zfh1*-negative Neurone (Pfeile), bei denen es sich aufgrund der relativ ventralen Position sehr wahrscheinlich um die vAp-Neurone handelt. Von den lateralen Ap-Neuronen (eingekreist, Pfeilspitzen) sind alle Ap- und *Zfh1*-positiv.

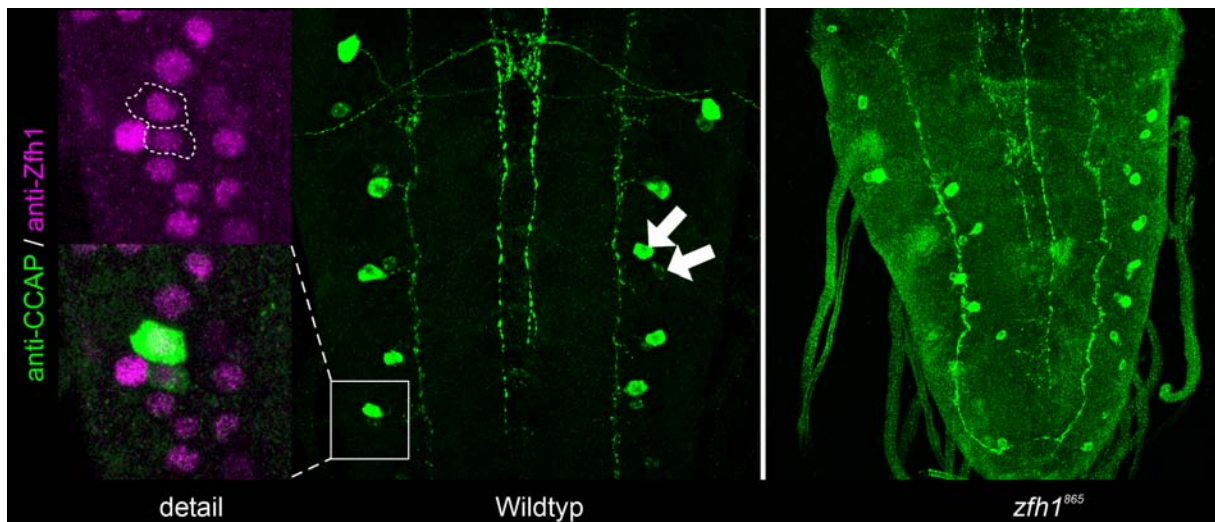


Abb. 37 CCAP-Neurone sind Zfh1-positiv und die Expression von CCAP unabhängig von Zfh1

Dargestellt sind abdominale Segmente eines vNS im späten L3-Larvenstadium. **Mitte:** Es sind jeweils zwei Neurone CCAP-positiv je Hemisegment (grün, Pfeile). **Links:** Beide CCAP-Neurone sind Zfh1-positiv (magenta). **Rechts:** In *zfh1⁸⁶⁵*-mutanten Larven ist die CCAP-Expression normal.

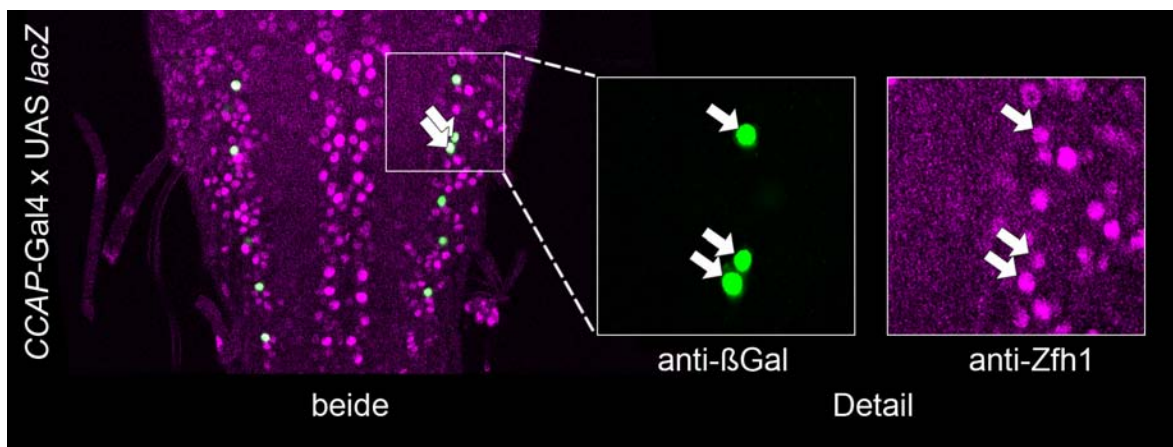


Abb. 38 Expressionsmuster von CCAP-Gal4 und Zfh1 in spätlarvalen vNS (Übersicht)

Gal4-abhängige Expression von β Gal (grün) zeigt CCAP-Neurone an. Alle diese Neurone sind ebenfalls Zfh1-positiv (magenta, Pfeile).

B.2. Analyse der neuralen Genfunktion von *zfh1*

3.7. Verlust von *Zfh1* führt zu einem irregulären Muster lateraler Glia

Aufgrund der glialen Expression von *Zfh1* ist zu erwarten gewesen, dass der Verlust von *Zfh1* Auswirkungen auf die Entwicklung der Gliazellen hat. Ich habe daher in *Zfh1*-Funktionsverlustmutanten das Vorhandensein und die Anordnung von lateralen Gliazellen analysiert. Dabei konnte ich feststellen, dass die Gesamtzahl der Gliazellen gegenüber dem Wildtyp unverändert war. Auch in der Peripherie waren alle im ZNS oder PNS geborenen Glia vorhanden. Auffällig war allerdings die gestörte Anordnung der Gliazellen: die Longitudinalen Glia (LG) liegen normalerweise hochgeordnet dorsal des Neuropils (Abb. 39). Aufgrund der Position kann man die LG auch in *zfh1* Mutanten identifizieren, allerdings sind sie nicht mehr so regelmäßig angeordnet wie im Wildtyp. Außen auf dem ZNS lassen sich Subperineurialglia eindeutig ansprechen und entlang der Motoprojektionen sind auch alle Exit- und peripheren Gliazellen vorhanden, genauso wie die zum Chordotonalorgan und zum Dorsal-Bipolar-Dentrischen Neuron gehörenden Gliazellen. Abweichend vom Wildtyp liegt die PG3 in Stadium 16 regelmäßig zu weit dorsal, und die peripheren Gliazellen, die entlang des Segmentalnervs und Intersegmentalnervs lokalisieren, wandern nicht weit genug in die Peripherie aus. Weil sich Gliazellen bei ihrer Wanderung durchaus an ihrer Umgebung orientieren, könnte das aberrante Muster sowohl zellautonom (also gliaspezifisch) als auch nichtzellautonom zustande gekommen sein, verursacht durch mutantes neuronales oder mesodermales Gewebe.

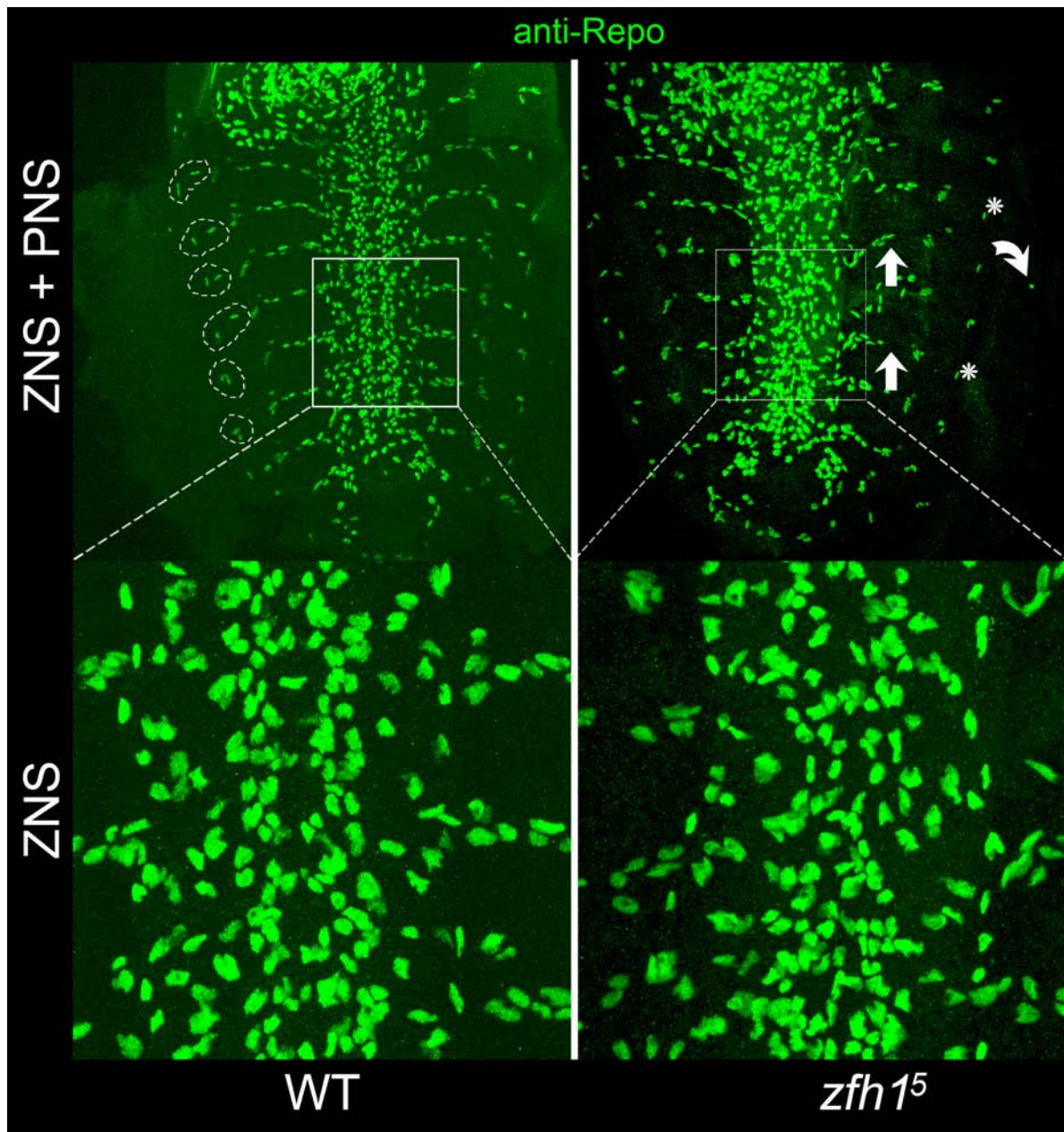


Abb. 39 Zfh1 ist notwendig für die Positionierung von Gliazellen

Vergleich des spätembrionalen Gliazellmusters (anti-Repo, grün) zwischen Wildtyp (links) und *zfh1⁵*-Mutante (rechts). **Links oben:** In der Peripherie sind die beiden dorsalsten Gliazellen (PG3 und DBDG) in A1-A6 umkreist. **Rechts oben:** In der Mutante wandert die PG3 offensichtlich nicht immer nach ventral (gebogener Pfeil) und fehlt manchmal, was durch die Präparation zustande gekommen sein kann (Sternchen). Die peripheren Gliazellen des ZNS wandern ebenfalls nicht vollständig aus (gerader Pfeil). **Unten:** Im vNS sind die Gliazellen im Vergleich zum Wildtyp ungeordneter.

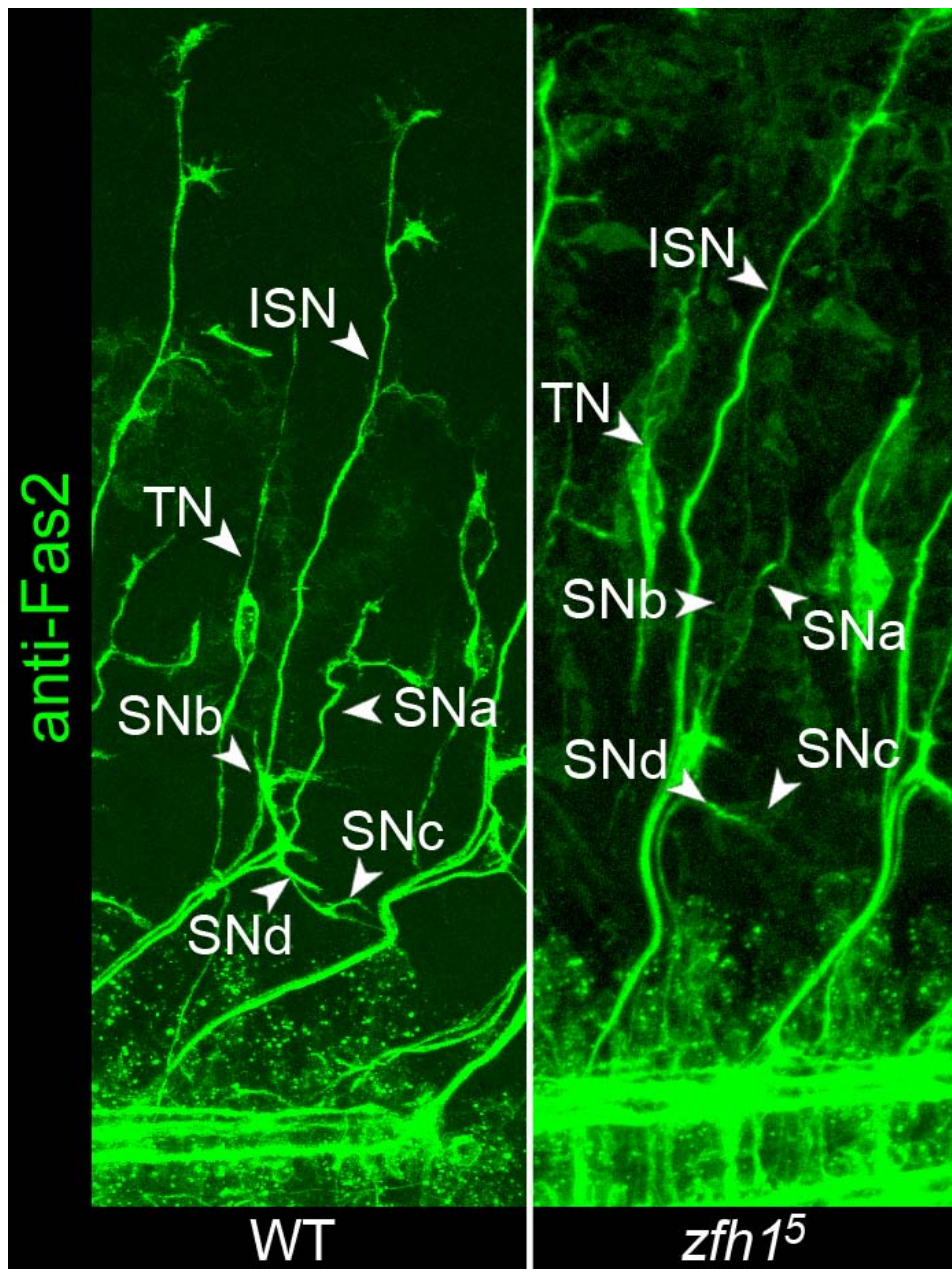


Abb. 40 Zfh1 ist notwendig für das korrekte Auswachsen von Motoneuronen

Links: Wildtypisches Projektionsmuster der die abdominale Muskulatur innervierenden Motoneurone im späten Embryo (Stadium 16, anti-Fasciclin2, grün). Je Hemisegment lassen sich drei Nerven unterscheiden (Transversalnerv (TN), Intersegmentalnerv (ISN) und Segmentalnerv (SN)). Der Segmentalnerv verzweigt sich in vier Äste (a, b, c und d). **Rechts:** In *zfh1⁵*-Funktionsverlustmutanten sind der ISN und TN immer vorhanden; der Segmentalnerv dagegen ist schwächer gefärbt und die einzelnen Äste sind kaum zu erkennen.

3.8. Verlust von *Zfh1* führt zu einer Reduktion der Anzahl efferenter Neurone

Die efferenten Motoneurone formieren zusammen mit den afferenten sensorischen Neuronen zwei Nerven: den Segmentalnerv (SN) und den Intersegmentalnerv (ISN). Der SN spaltet sich in der Peripherie in vier Seitenäste auf, die individuell angesprochen werden können (SNa, SNb, SNC, SNd). Bei *Drosophila* lassen sich die Axone der Motoneurone mit einem Antikörper gegen das Zelladhäsionsmolekül Fasciclin2 (Fas2) anfärben (Schuster et al., 1996a; Schuster et al., 1996b). Zusätzlich ist der Transversalnerv (TN) Fas2-positiv, der dorsomedian an der Grenze zweier Segmente liegt. Da ich zeigen konnte, dass alle Motoneurone *Zfh1* exprimieren, habe ich analysiert, wie das Projektionsmuster der Motoneurone in *zfh1*-Mutanten aussieht. Es zeigt sich, dass sowohl der ISN als auch der SN vorhanden sind. Der ISN projiziert wie im Wildtyp nach dorsal, allerdings scheinen an bestimmten Stellen Verzweigungen schwächer ausgeprägt zu sein oder zu fehlen (Abb. 40). Ein solcher Phänotyp zeigt sich auch, wenn man sich den Segmentalnerv betrachtet. Auch hier sind die vier Äste prinzipiell vorhanden, der SNb ist allerdings kaum noch zu erkennen, ebenso wie der SNC.

Da der Fas2-Antikörper den gesamten ISN und SN anfärbt, lässt sich nicht sagen, ob generell Motoneurone fehlen oder falsch projizieren. Ein Fehlen von Motoneuronen könnte durch programmierten Zelltod verursacht sein, allerdings war die Zahl apoptotischer Zellen in *zfh1*⁵ Mutanten gegenüber dem Wildtyp nicht erhöht (Ana Rogulja-Ortmann, pers. Mitteilung).

3.9. Das Wachstum von neuromuskulären Endplatten ist von *Zfh1* abhängig

Motoneurone innervieren die Muskulatur durch spezielle Endigungen, die motorischen Endplatten (neuromuskuläre Endplatte, engl. „neuromuscular

junctions“, NMJ). Hier lokalisieren jene Synapsen, welche die Reizweiterleitung vom Motoraxon zum Muskel bewerkstelligen. NMJs verändern sich im Laufe der larvalen Entwicklung, um sich dem Größenwachstum und Erfordernissen des Muskels anzupassen. Dabei nimmt auch die Zahl der Synapsen zu, deren individuelle Charakteristika allerdings gleich bleiben (Prokop und Meinertzhagen, 2006). Bei *Drosophila* lassen sich aufgrund ihrer molekularen Struktur vier Typen von NMJs unterscheiden: NMJs vom Typ-1b und den kleineren Typ-1s liegen im Muskel versenkt und sind vom subsynaptischen Reticulum umgeben, welches u. a. das MAGUK-Strukturprotein Discs-large (Dlg) enthält (Woods und Bryant, 1991). Diese beiden Typen lassen sich daher postsynaptisch mit anti-Dlg-Antikörpern anfärben. Typ-2 und Typ-3-Motorendplatten sind kleiner und liegen zwischen der Basalmembran und Muskelzelloberfläche (Landgraf et al., 2003b). Nicht alle Typen von Endplatten sind auf allen Muskeln zu finden. NMJs vom Typ-3 lokalisieren auf den Muskeln 8 (SBM) und 12 (VL1), während Typ-1b, -1s und Typ-2 auf allen somatischen Muskeln zu finden sind. Die Typ-2-Endplatten gehören zu den VUM-Motoneuronen („ventral unpaired median“), drei Mittellinienzellen, die symmetrisch die gesamte Muskulatur in beiden Hemisegmenten innervieren. Im Folgenden habe ich mich vor allem auf NMJs vom Typ-1s und -b konzentriert, weil sie sich im Gegensatz zu Typ-2 und -3 mit anti-Dlg nachweisen lassen.

Mutationen in Genen, die für Komponenten der neuromuskulären Verbindungen kodieren, können sowohl auf funktioneller als auch auf struktureller Ebene Auswirkungen auf NMJs haben, weshalb die Analyse solche Mutanten bislang höchst erfolgreich zur Struktur- und Funktionsaufklärung von motorischen Endplatten bei *Drosophila* geführt hat. Aufgrund seiner Motoneuron-spezifischen Expression und weil bisher kaum Transkriptionsfaktoren bekannt sind, die für die Entwicklung von neuromuskulären Verbindungen notwendig sind, schien die Analyse von *Zfh1* in diesem Kontext geboten und viel versprechend.

3.9.1. Das hypomorphe Allel *zfh1*⁸⁶⁵ führt zu verkleinerten neuromuskulären Endplatten

Für das Nullallel *zfh1*⁵ konnte ich eine Reihe von Defekten zeigen, die eine wichtige Rolle von *Zfh1* im sich entwickelnden embryonalen ZNS widerspiegeln. Darüber hinaus habe ich gezeigt, dass *Zfh1* in Larvenstadien exprimiert wird, was auf eine postembryonale Funktion schließen lässt. Ich habe daher nach Allelen von *zfh1* gesucht, die sich auch über das Embryonalstadium hinaus entwickeln können und damit eine Analyse in postembryonalen Stadien erlauben. Eine Quelle solcher hypomorpher Allele stellen P-Element-Linien dar, welche häufig in den Promoter- oder Enhancerbereich von Genen inserieren und die Regulation eines Gens stören, ohne zu einem totalen Ausfall der Genfunktion zu führen. Für *Zfh1* habe ich drei Linien gefunden, die eine solche Insertion im oder in der Nähe des *Zfh1*-Gens haben: *zfh1*^{GMroX1} (Kelley und Kuroda, 2003), *zfh1*^{CB} (Ryder et al., 2004) und *zfh1*⁸⁶⁵ (Braun et al., 1997). Bei allen Linien handelt es sich um letale bzw. semiletale Insertionen, d. h. es finden sich in der Regel nur balancierte Tiere in einer Population. Um die larvale Letalität dieser Linien zu überprüfen, habe ich zunächst jedes der Allele mit *zfh1*-Nullmutanten verkreuzt und beobachtet, wie hoch die Verpuppungsrate dieser Transheterozygoten ist. Das schwächste Allel war *zfh1*^{GMroX1}, welches bei 18°C eine

	WT	<i>zfh1</i> ⁵ / <i>zfh1</i> ^{GMroX}	<i>zfh1</i> ⁵ / <i>zfh1</i> ^{CB}	<i>zfh1</i> ⁵ / <i>zfh1</i> ⁸⁶⁵	<i>zfh1</i> ⁸⁶⁵ / <i>zfh1</i> ⁸⁶⁵
nach...	n = 144	n = 43	n = 28	n = 42	n = 15
6 Tagen (AEL)	67%	37%	7%	-	-
7 Tagen (AEL)	83%	84%	46%	-	-
8 Tagen (AEL)	95%	-	57%	5%	60%
larvale Letalität	5%	16%	43%	95%	40%

Tab. 3 Überlebensrate verschiedener transheterozygoter und homozygoter *zfh1*-Allele

Frühe Larven eines definierten Genotyps wurden bei 25°C inkubiert und nach 6-8 Tagen die Zahl an Puppen bzw. L3-Larven bestimmt. *zfh1*⁸⁶⁵ hat eine um 1-2 Tage verlängerte Larvalentwicklung. AEL = nach Eiablage („after egg laying“).

stark verminderte Letalität und daraus resultierend eine Vielzahl homozygoter Tiere zeigt. Das Allel *zfh1⁸⁶⁵* stellte sich als das stärkste Allel heraus, mit einer etwas verlängerten Larvalentwicklung und einer äußerst geringen Zahl sich verpuppender Tiere (Tabelle 3). Daneben habe ich versucht, die Expression von *zfh1* durch RNA-Interferenz (RNAi) zu reduzieren. Hierfür habe ich einen Teil der kodierenden Sequenz von *zfh1* in einen RNAi-P-Element-Vektor (pUDS-GFP, Nagel et al., 2002) kloniert und mehrere transgene Stämme erzeugt. Trotz der gezielten Expression des RNAi-Konstruktes in neuralen und neuronalen Zellen konnte ich keinen sichtbaren Effekt erzielen, sodass ich diese Technik nicht weiter verwendet habe.

Bei dem Allel *zfh1⁸⁶⁵* handelt es sich um einen Enhancer-trap-Stamm, bei dem ein *lacZ*-P-Element in die Nähe des am weitesten 5' gelegenen *zfh1*-Promoters inseriert ist (Justice et al., 1995). Das Muster der *lacZ*-Expression zeichnet bei dieser Linie das endogene *Zfh1*-Muster vollständig nach (nicht dargestellt). Färbt man das vNS homozygoter Larven gegen *Zfh1*, so lässt sich *Zfh1*-Protein nachweisen, im Vergleich zum Wildtyp allerdings sehr viel schwächer (nicht dargestellt). Populationen von Larven des balancierten Stamms setzen sich fast ausschließlich aus Heterozygoten zusammen, erst durch die Selektion homozygoter *zfh1⁸⁶⁵*-Embryonen entwickeln sich diese auch zu L3-Wanderlarven. Zum Teil verpuppen sie sich, allerdings sterben die meisten als pharate Imago. In sehr seltenen Fällen schlüpfen auch Adultfliegen, die allerdings keine morphologischen Auffälligkeiten außer einer sehr kurzen Überlebensrate (1-3 Tage) aufweisen. Daraus lässt sich schließen, dass dieses Allel insgesamt eine gewisse Variabilität der Letalität aufweist und in gemischten Populationen von Homo- und Heterozygoten homozygote *zfh1⁸⁶⁵*-Larven stark benachteiligt sind. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass ihre larvale Entwicklung sehr viel länger dauert als bei Wildtypen (etwa um das 1,5-bis 2-fache). Da transheterozygote Tiere vom Genotyp *zfh1¹⁵/zfh1⁸⁶⁵* in der Regel sehr viel früher sterben (im ersten Larvenstadium) als homozygote *zfh1⁸⁶⁵*-Tiere, ist die Letalität von *zfh1⁸⁶⁵* sehr wahrscheinlich auf das *zfh1*-Gen selbst zurückzuführen und nicht auf andere, zufällige Mutationen des dritten Chromosoms. Die verringerte Menge an

Zfh1-Protein und seine späte Letalität machen dieses hypomorphe Allel damit zum idealen Kandidaten für die larvale Analyse der Funktion von *zfh1*.

Für die Präparation larvaler somatischer Muskulatur wurden wildtypische und mutante Larven im Wanderstadium selektiert. Dies dient der Vergleichbarkeit, da die Larven sich trotz unterschiedlicher Entwicklungsdauer in demselben Entwicklungsstadium befinden und auch eine ähnliche Größe aufweisen. Die fixierten Präparate wurden anschließend gegen das postsynaptische Markerprotein Discs-large gefärbt. Dies visualisiert die gesamte Muskulatur sowie, weil dort in höherer Konzentration vorhanden, die neuromuskulären Verbindungen. Ich habe dann für die Muskeln 1 (DA1), 9 (DO1), 3 (DA3) und 4 (LL1) die Zahl der Boutons bestimmt und zur Muskeloberfläche normalisiert, was man als standardisiertes Maß für die Größe der NMJ heranziehen kann und verschiedene Individuen und Genotypen vergleichbar macht (Coyle et al., 2004). Es zeigt sich, dass *zfh1*-mutante Larven signifikant kleinere neuromuskuläre Verbindungen haben als der Wildtyp (Abb. 41, Tabelle 4). In absoluten Bouton-Zahlen wäre der Unterschied noch deutlicher. Durch die Normierung auf eine standardisierte Muskelgröße wird dieser geringer, da die mutanten Larven eine etwas geringere Muskeloberfläche haben. Inwieweit auch die elektrischen oder ultrastrukturellen Eigenschaften der NMJ durch die *zfh1*-Mutation beeinflusst sind, konnte nicht untersucht werden, da die dafür notwendige Expertise im Labor fehlt. Solche Analysen würden weitergehende Einblicke in den NMJ-Phänotyp der hypomorphen Mutation *zfh1*⁸⁶⁵ geben.

Muskel	WT	n=	<i>zfh1</i> ⁸⁶⁵	n=	OK371 x UAS <i>zfh1</i>	n=
1	0,56 ± 0,22	54	0,36 ± 0,13	46	1,12 ± 0,25	22
9	0,69 ± 0,17	53	0,45 ± 0,12	46	0,99 ± 0,20	23
3	0,45 ± 0,17	49	0,36 ± 0,11	44	0,66 ± 0,18	25
4	0,81 ± 0,36	23	0,59 ± 0,22	46	1,09 ± 0,21	25

Tab. 4 Größe der neuromuskulären Verbindung in Abhängigkeit von der Zfh1-Dosis

(Anzahl der Boutons x 1000 : Muskeloberfläche; Mann-Whitney Rank Sum Test, P < 0,001)

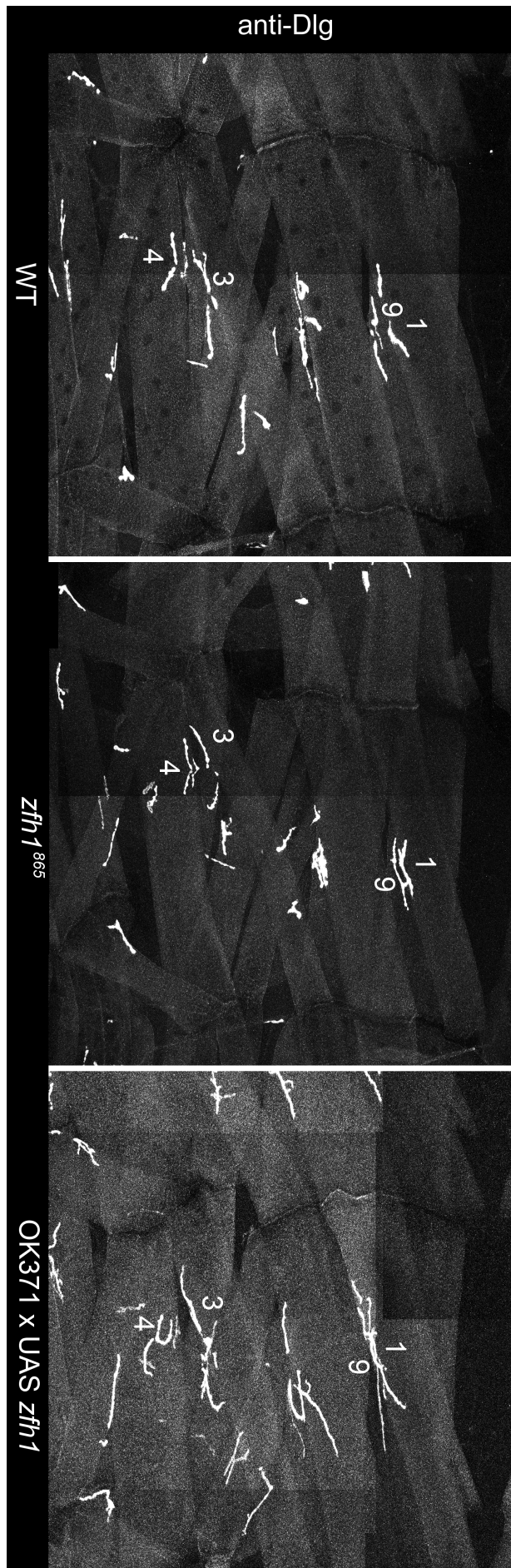


Abb. 41

3.9.2. Überexpression von Zfh1 in glutamatergen Neuronen führt zu größeren NMJs sowie neurologischen Defekten

Da ich gezeigt habe, dass reduzierte Mengen von Zfh1-Protein in Motoneuronen, wie es bei *zfh1⁸⁶⁵* der Fall ist, zu verkleinerten neuromuskulären Endplatten führen, habe ich anschließend überprüft, ob man durch Erhöhung der Menge von Zfh1 die Zahl der Boutons neuromuskulärer Endplatten vergrößern kann.

Die Kreuzungen von *OK371* mit *UAS-zfh1* erlaubt die Überexpression von Zfh1 in glutamatergen Neuronen (und damit in den meisten Motoneuronen) ab Embryonalstadium 15 bis ins Adultstadium. Ich habe dann L3-Wanderlarven präpariert und erneut die Zahl der Boutons für die Muskeln 1, 9, 3 und 4 bestimmt. Wie erwartet zeigte sich, dass die Motorendplatten von Larven mit motoneuronaler Zfh1-Überexpression stark vergrößert sind (Abb. 41, Tab. 4). Trotz der kontinuierlichen Expression von Zfh1 kann man nur eine geringe larvale Letalität feststellen; viele der Individuen sterben allerdings als pharate Adulttiere in der Puppenhülle. Geschlüpfte Adulttiere zeigen deutliche neurologische Defekte: verlängerte Aufwachphase und unkoordiniertes Zucken der Beinpaare nach CO₂-Betäubung, fehlendes Flugverhalten und eine unkoordinierte Beinstellung beim Laufen (Abb. 42). Dies lässt auf eine gestörte Funktionalität der adulten glutamatergen Neurone schließen, wie es auch z. B. bei *shaker* Mutanten auftritt (einem spannungsgesteuerten Kaliumkanal, Kaplan und Trout, 1969).

Wegen der sehr spezifischen motoneuronalen Überexpression muss angenommen werden, dass diese Phänotypen alleine durch die erhöhte Menge an Zfh1-Protein im Motoneuron zustande gekommen sind.

Abb. 41 Die Größe neuromuskulärer Verbindungen hängt von der Dosis an Zfh1 ab

Dargestellt ist der dorsale Teil eines abdominalen Hemisegments (A4, Muskel 1 bis Muskel 12). Die neuromuskulären Verbindungen und die Muskulatur sind durch anti-Dlg-Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Analysierte Muskeln sind bezeichnet (1, 9, 3, 4; siehe Tab. 4). Im Vergleich zum Wildtyp (links) sind die motoneuronalen Kontakte in hypomorphen *zfh1⁸⁶⁵*-Mutanten kleiner (Mitte), bei Zfh1-Überexpression (rechts) mit einer Motoneuron-spezifischen Gal4-Linie (*OK371*) dagegen stark vergrößert.

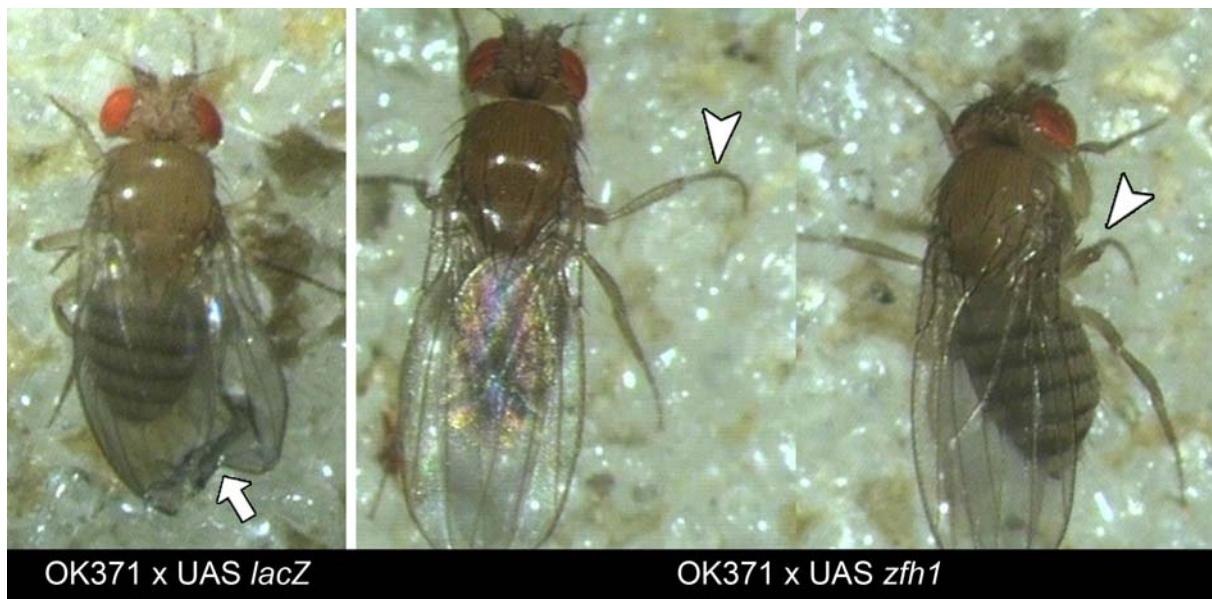


Abb. 42 Überexpression von Zfh1 in glutamatergen Neuronen führt zu neurologischen Defekten

Links: Experimentelle Kontrolle. Um ein Wegfliegen der Tiere zu verhindern, wurden die Flügel verklebt (Pfeil). **Mitte/Rechts:** Durch Zfh1-Überexpression können solche Adultfliegen ihre Beine nicht mehr koordiniert bewegen (Pfeilspitzen). Die Tiere zittern und verkrampfen beim Laufen. Außerdem können sie nicht mehr koordiniert fliegen. Sie benötigen sehr viel länger, um aus der CO₂-Narkose aufzuwachen (nach Abschalten des CO₂: WT ca. 60 Sek., OK371 x UAS *zfh1* > 140 Sek.).

3.10. Zfh1 und genetische Interaktion mit dem TGF β -Signalweg

Für das larvale Wachstum der neuromuskulären Verbindung sind verschiedene Signaltransduktionswege notwendig, welche zwischen den Muskeln und den Motoneuronen vermitteln und damit das Größenwachstum des Muskels und die notwendige Zunahme des synaptischen Inputs koordinieren (Collins et al., 2006; Haghghi et al., 2003; McCabe et al., 2004; Packard et al., 2002). Da es sich bei Zfh1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der dosisabhängig das Wachstum neuromuskulärer Verbindungen reguliert, wollte ich testen, ob *zfh1* möglicherweise genetisch mit einem dieser Signaltransduktionswege interagiert. Bei Vertebraten wurde tatsächlich gezeigt, dass die Zfh1-homologen Proteine mit dem TGF β -Signalweg interagieren, weil sie phosphoryliertes SMAD-Protein binden können (Nishimura et al., 2006; Postigo, 2003). Wegen der augenscheinlichen Kolo-kalisation von Zfh1 und pMad im *Drosophila*-Embryo (s. oben) habe ich getestet, ob sich Phänotypen von TGF β -mutanten Larven durch Reduktion der Zfh1-Dosis verstärken lassen. Ich habe sowohl eine Mutante des TGF β -Signal vermittelnden *Mad*-Gens

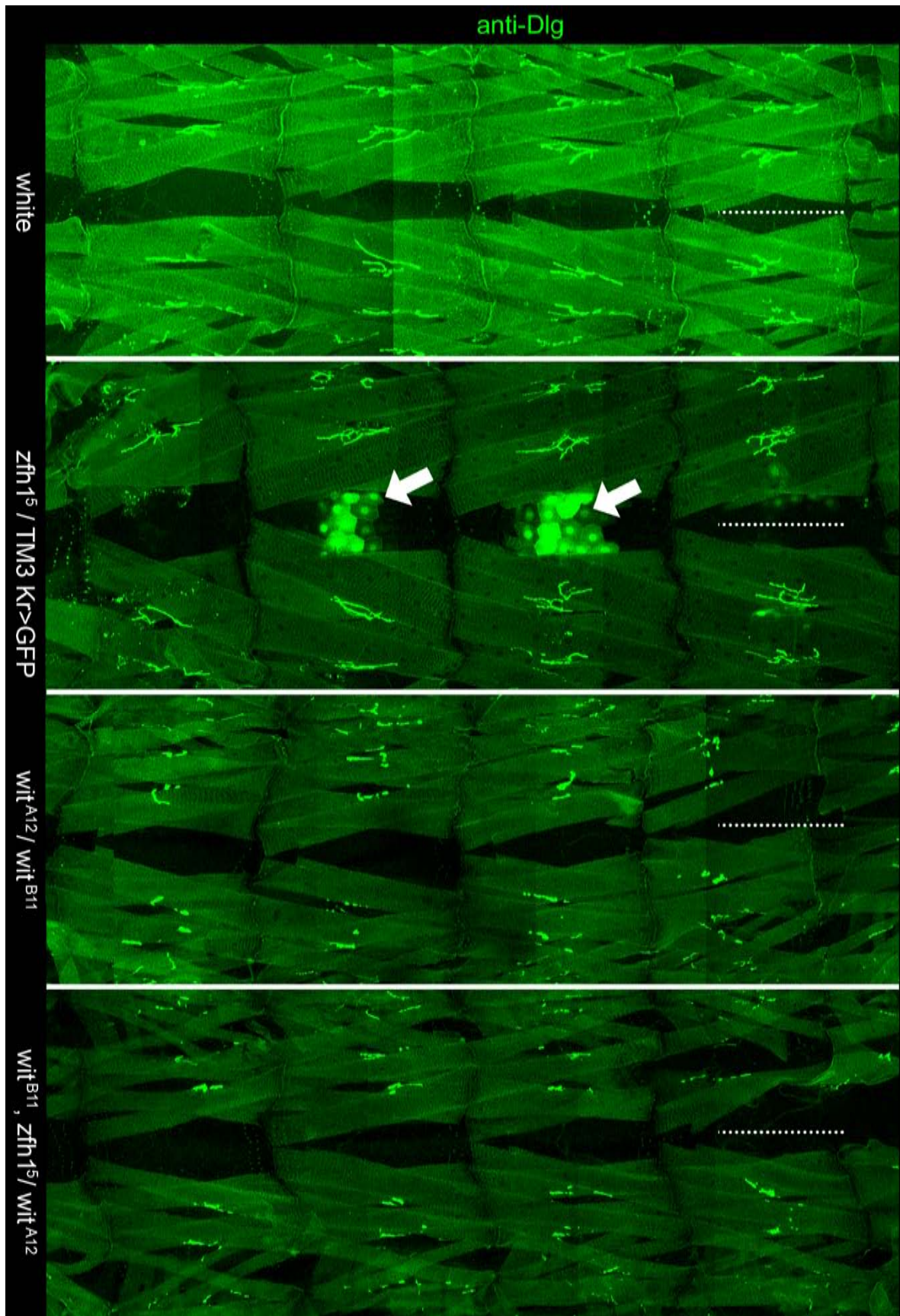


Abb. 43

Abb. 43 NMJ-Phänotypen von *wishful-thinking*-Mutanten lassen sich durch Dosisreduktion von *zfh1* nicht weiter verstärken

Dargestellt sind Filetpräparate später L3-Larvenstadien, gefärbt gegen anti-Dlg (grün). Es sind jeweils die dorsalen Hälften der Muskulatur abdominaler Hemisegmente zu sehen (die Mittellinie ist gepunktet eingezeichnet). Die neuromuskulären Verbindungen in *wit*-Mutanten (zweite von rechts) sind sehr viel kleiner als der Wildtyp (*white*, links) oder heterozygote *zfh1*-Mutanten (zweite von links). Eine Halbierung der *zfh1* Dosis in *wit*-mutantem Hintergrund kann den Phänotyp nicht signifikant verstärken (rechts). Die streifenförmige GFP-Expression (weiße Pfeile) kommt durch das GFP-Balancerchromosom zustande.

als auch eine Mutante des TGF β -Rezeptors *wishful-thinking* (*wit*) mit einer *zfh1*-Funktionsverlustmutante zu kombinieren versucht. Für das zweitchromosomale *Mad* ließen sich keine *Mad; zfh1⁵*-transheterozygoten Adulttiere erhalten, d. h. ich konnte daraus bislang keine für genetische Interaktionsexperimente notwendigen Stämme erzeugen. Im Gegensatz zu *Mad*, das in vielen morphogenetischen Prozessen eine Rolle spielt, wird der TGF β -Rezeptor Wishful-Thinking in wenigen Geweben exprimiert, unter anderem in Motoneuronen und bestimmten neurosekretorischen Zellen des vNS. *wit* Mutanten haben sehr kleine neuromuskuläre Endplatten (Aberle et al., 2002; Marques et al., 2002), und bei gegebener genetischer Interaktion von *zfh1* mit *wit* hätte eine Verringerung der Menge an Zfh1 diesen Phänotyp weiter verstärken können. Ich habe daher die neuromuskulären Verbindungen homozygoter *wit*-Mutanten mit denen homozygot *wit*- und heterozygot *zfh1*-mutanter Larven verglichen (Abb. 43). Die Auszählung der Anzahl von Boutons auf den dorsalen Muskeln 1 (DA1) und 9 (DO1) und Normalisierung zur Muskeloberfläche zeigt für beide Genotypen keinen signifikanten Unterschied (Tab. 5). Damit ist zwar gezeigt, dass *wit* epistatisch über *zfh1* zu sein scheint, aber ob sie in diesem entwicklungsbiologischen Prozess genetisch interagieren oder nicht, konnte noch nicht gezeigt werden. Zudem weisen *wit*-mutante Larven, die zusätzlich eine mutante *zfh1*-Kopie tragen, eine stark erhöhte Letalität auf, ähnlich wie ich es schon bei *Mad*-Mutanten beobachten konnte. Aufgrund des neuromuskulären Phänotyps lässt sich daher nicht auf genetische Interaktion schließen, und es müssen weitere

Experimente durchgeführt werden, um die Frage nach genetischer Interaktion zwischen *zfh1* und TGF β beantworten zu können.

Muskel	<i>wit</i> ^{B11} / <i>wit</i> ^{A12}	n=	<i>wit</i> ^{B11} , <i>zfh1</i> ⁸⁶⁵ / <i>wit</i> ^{A12}	n=
1 + 9	0,114 \pm 0,03	23	0,1 \pm 0,03	24

Tab. 5 Größenvergleich der neuromuskulären Verbindung zwischen *wit* und *zfh1*, *wit* Doppelmutanten

(Muskel 1 + 9: aufsummierte Anzahl der Boutons \times 1000 : Summe der Muskeloberflächen; Mann-Whitney Rank Sum Test, P = 0,054)

3.11. Mosaikanalyse mit MARCM

Das Kernproblem der Funktionsanalyse von *Zfh1* in Motoneuronen liegt in der Schwierigkeit, zellautonome Effekte von nichtautonomen unterscheiden zu können. *Zfh1* wird in Motoneuronen, Gliazellen und in sich differenzierenden Muskeln exprimiert. Somit kann der Verlust von *Zfh1* in jeder dieser Zelltypen Auswirkungen auf die Funktionalität der Motoneurone haben. Es war deshalb notwendig eine Möglichkeit zu finden, neben vollständig mutanten Embryonen und Larven auch mutante Motoneurone in einer ansonsten wildtypischen Umgebung zu analysieren. Die MARCM-Technik stellt für solche Experimente die Methode der Wahl dar.

3.11.1. Übersicht über die Technik

Die Herstellung von genetischen Mosaiken ist eine sehr elegante und einfache Methode, um mutante Zellen in einer wildtypischen Umgebungen zu analysieren (Perrimon, 1998; Xu und Harrison, 1994). Durch die Verwendung eines heterologen Systems (FLP/FRT-System, Golic und Lindquist, 1989) war es möglich, zeit- (durch Hitzeschockpromotoren) oder gewebe gesteuert (durch Gal4/UAS) eine FLP-Rekombinase aus Hefe zu exprimieren, welche an definierten Stellen des Genoms (FRT: Flp-Recognition-Target) DNA-Doppelstränge miteinander rekombinieren kann. Dadurch lassen sich homozygot mutante Zellen erzeugen, welche sich in einer heterozygoten Umgebung befinden (Abb. 5). Koppelt man genetisch den

wildtypischen Chromosomenarm (oder -abschnitt) mit einem ubiquitär exprimierten Protein (β Gal, GFP), lässt sich der mutante klonale Anteil anhand der Abwesenheit des Markers identifizieren, während der ebenfalls entstehende homozygote Geschwisterklon („twin spot“) eine doppelt so starke Markerexpression aufweist. Würde man umgekehrt den mutanten Abschnitt markieren, unterscheidet sich dieser bestenfalls in der Expressionsstärke (2 Kopien) von heterozygoten Zellen (1 Kopie), weshalb man keine eindeutige Identifizierungsmöglichkeit der mutanten Zellen mehr hätte. Da es wünschenswert war, eine positive Markierung der mutanten Zellen in einem nichtmarkierten Wildtyphintergrund zur Verfügung zu haben, konstruierte man ein Zwei-Komponenten-System mit einem Repressormolekül, bei dessen Anwesenheit keine Gal4-abhängige GFP- oder β Gal-Expression stattfinden kann. Ein solches System wurde durch die Einführung des Gal80-Proteins aus Hefe in *Drosophila* verwirklicht (MARCM, Mosaic Analysis using a Repressible Cell Marker, Lee und Luo, 1999). Gal80 fungiert als Repressor von Gal4, indem es dessen Aktivierungsdomäne maskiert und damit die Gal4-gesteuerte Transkription von UAS-Konstrukten (beispielsweise UAS-*mCD8::GFP*) inhibiert (Ma und Ptashne, 1987). Erst durch Rekombination wird das Gal80-Markergen aus jetzt homozygot mutanten Zellen entfernt und Gal4 kann seine Aktivität entfalten. In den homo- und heterozygoten Wildtypzellen verbleibt das Gal80, und die Gal4-Aktivität wird weiterhin reprimiert. Mit diesem System lassen sich Mosaike positiv markieren, in Abhängigkeit von der gewählten Gal4-Linie.

Allerdings gab und gibt es einige Einschränkungen dieser eleganten Technik. Zum einen lässt sich das System nicht für die Analyse im *Drosophila*-Embryo anwenden, da durch den *tubulin*-Promoter, mit welchem die ubiquitäre Gal80-Expression erreicht wird, schon in der Oozyte sehr viel Gal80-Protein deponiert wird. Die Zellen des Embryos besitzen daher große Mengen des Repressorproteins, gleichgültig ob sie selbst Gal80 exprimieren oder nicht. Erst durch weitere Zellteilungen und Proteinabbau wird das maternale Gal80 aus der Zelle entfernt und die Gal4-Aktivität

sichtbar. Ich musste meine Experimente daher auf spätlarvale Stadien beschränken, um überhaupt markierte mutante Zellen detektieren zu können.

Zum anderen ist die effiziente Analyse von MARCM-Klonen abhängig von der Zahl der induzierten Klone. Für die Analyse von Motoneuronen in *Drosophila*-Larven wies das bestehende MARCM-System nur eine sehr geringe Ausbeute an Klonen im vNS auf (durchschnittlich 1 Klon je 2 Larven). Den limitierenden Faktor stellt die Menge an Flippase dar, welche durch Hitzeschock induziert werden kann. Je nach Insertionsort im Genom sind unterschiedliche Hitzeschockpromoter-gekoppelte *flp*-Konstrukte verschieden stark in ihrer Expression, sodass ich zusätzlich zur *hsflp¹* des MARCM-Systems eine weitere Flippase, *hsflp¹²²*, verwendet habe (Kopp et al., 1997). Für diese ist gezeigt worden, dass sie eine weitaus höhere Aktivität aufweist als andere Hitzeschock-FLP-Linien (Luschnig et al., 2004). Die Verwendung dieser Flippase ermöglicht die Erzeugung mehrerer Klone je vNS (Abb. 44), was den effizienten Vergleich zwischen mutanten und wildtypischen Klonen erlaubt.

Die für neuronale MARCM-Klone verwendeten Fliegenstämme tragen in der Regel eine Gal4-Insertion im *elav*-Lokus (*elav^{C155}*), welches zur neuronalen Expression eines durch Fusion mit Maus-CD8-Protein membranständig gemachten GFP (mCD8::GFP) führt. Dies hat zur Folge, dass die gesamte Zelloberfläche eines Neurons mit anti-mCD8-Antikörpern anfärbbar ist, sowohl mit Fluoreszenz- als auch mit sichtbaren Färbetechniken.

3.11.2. Embryonal induzierte Flp-Klone lassen sich im vNS von L3 Larven nachweisen

Die MARCM-Technik wurde bislang vor allem in der Larve oder Puppe zur Herstellung mutanter Klone eingesetzt (Chen et al., 2006; Jefferis et al., 2001; Li und Gao, 2003; Truman et al., 2004). Im Embryo wurde die Technik aufgrund der niedrigen Effizienz mit *hsflp¹* nur einmal verwendet, und zwar für die zeitliche Charakterisierung von Neuroblastenstambäumen (Truman et al., 2004). In einem Pilotexperiment habe ich daher getestet, ob sich mithilfe der stärker aktiven *hsflp¹²²*

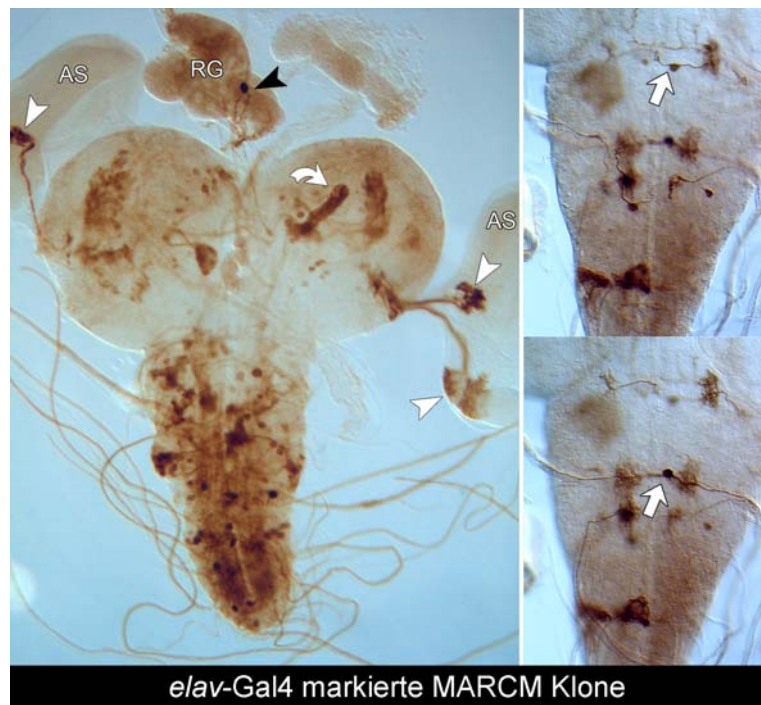


Abb. 44 Mit *hsflp*¹²² lassen sich eine Vielzahl unterschiedlicher neuronaler MARCM-Klone induzieren

Links: Gehirn und Bauchmark im spätlarvalen Stadium. Man erkennt Projektionen von Photorezeptoren (weiße Pfeilspitze) aus der Augenimaginalscheibe (AS), Projektionen (schwarze Pfeilspitze) von und zur Ringdrüse (RG) und Anteile von Pilzkörperneuronen (gebogener weißer Pfeil). In Gehirn und Bauchmark sind eine ganze Reihe weiterer Neurone markiert. **Rechts:** Beispiele von bipolaren Zellen, die in die Peripherie projizieren (weißer Pfeil).

ebenfalls Klone erzeugen lassen und wie hoch die Ausbeute dabei sein würde. Die Klone wurden im Embryo durch einen einstündigen Hitzeschock (37°C) erzeugt. Die Embryonen befanden sich dabei zwischen Stadium 6 und 10, und damit in einem Zeitfenster, das alle frühen Neuroblastenstammbäume einschließt. Da ich an der Erzeugung markierter Motoneurone interessiert war und diese mehrheitlich aus frühen NBs hervorgehen, war dieses Zeitfenster sinnvoll.

Bei diesem Pilotexperiment zeigte sich, dass mit der MARCM-Technik in Verbindung mit *hsflp*¹²² eine Vielzahl von Klonen erzeugt werden kann. Dabei lassen sich verschiedenste Typen von Klonen identifizieren: klonale Anteile der Pilzkörper und anderer Gehirnneuroblasten, Neurone, die aus der Augenimaginalscheibe ins Gehirn projizieren, Mittellinienklone und Neurone im vNS (Abb. 44). Meine Präparate

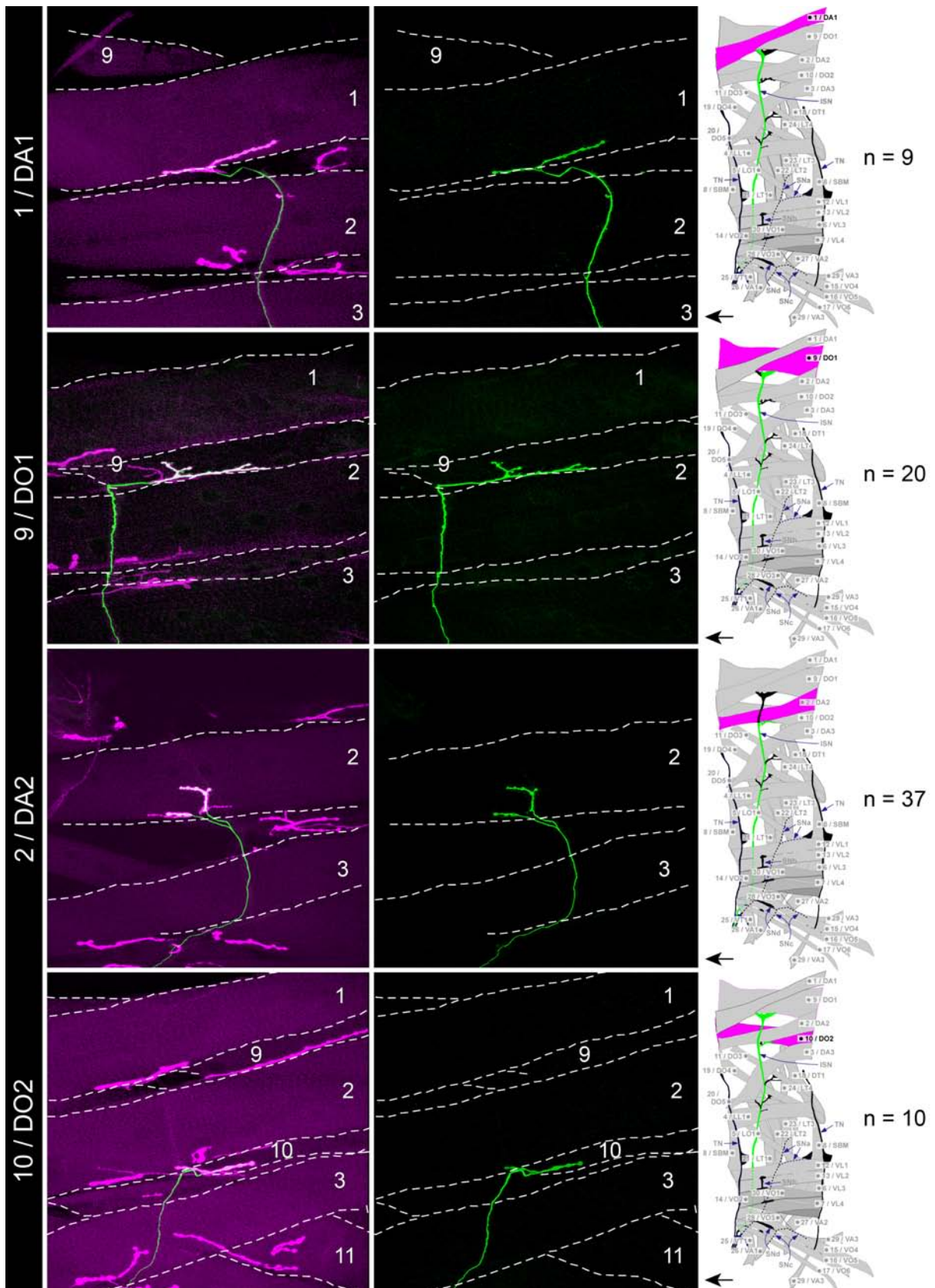


Abb. 45

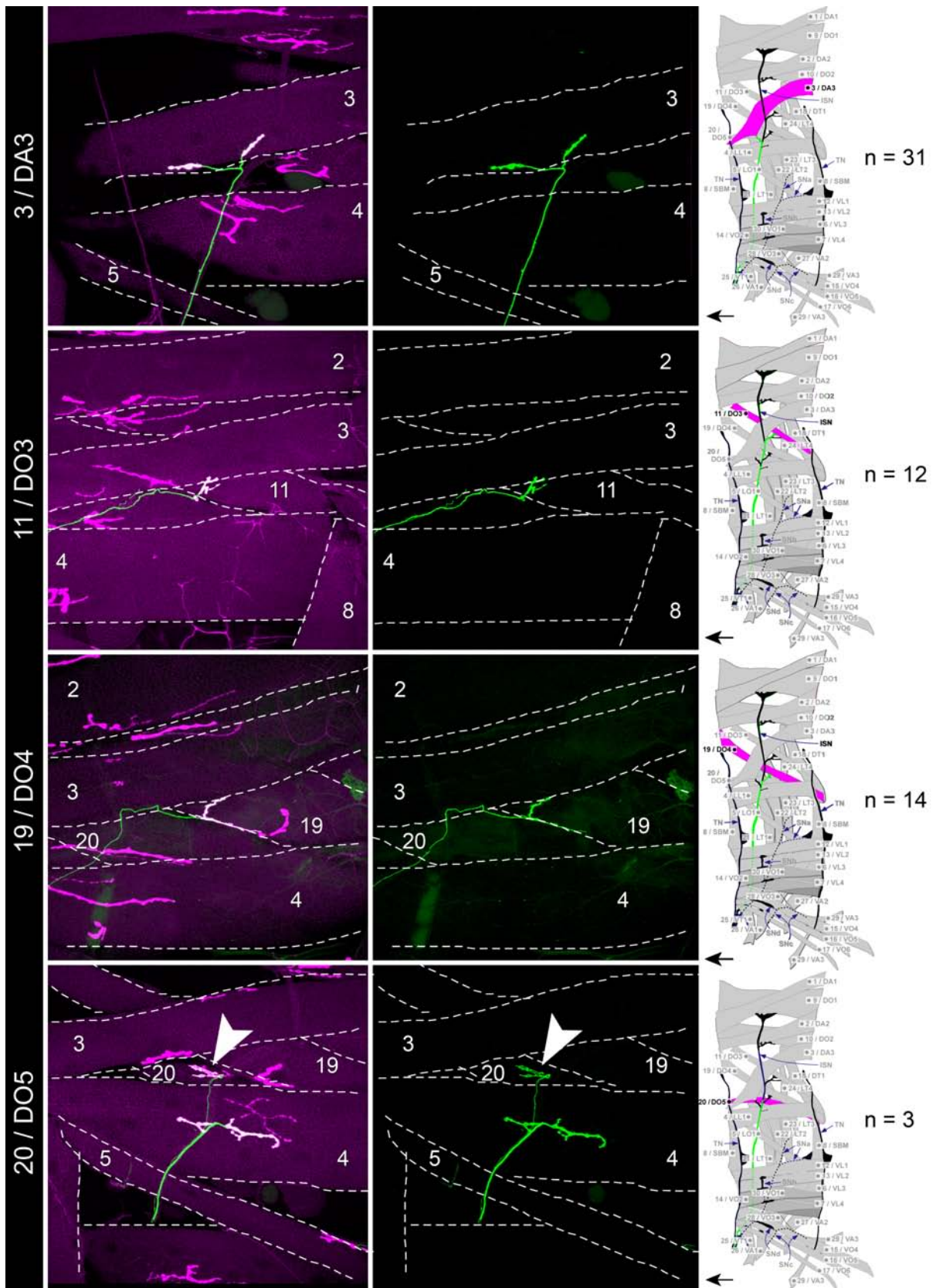


Abb. 45

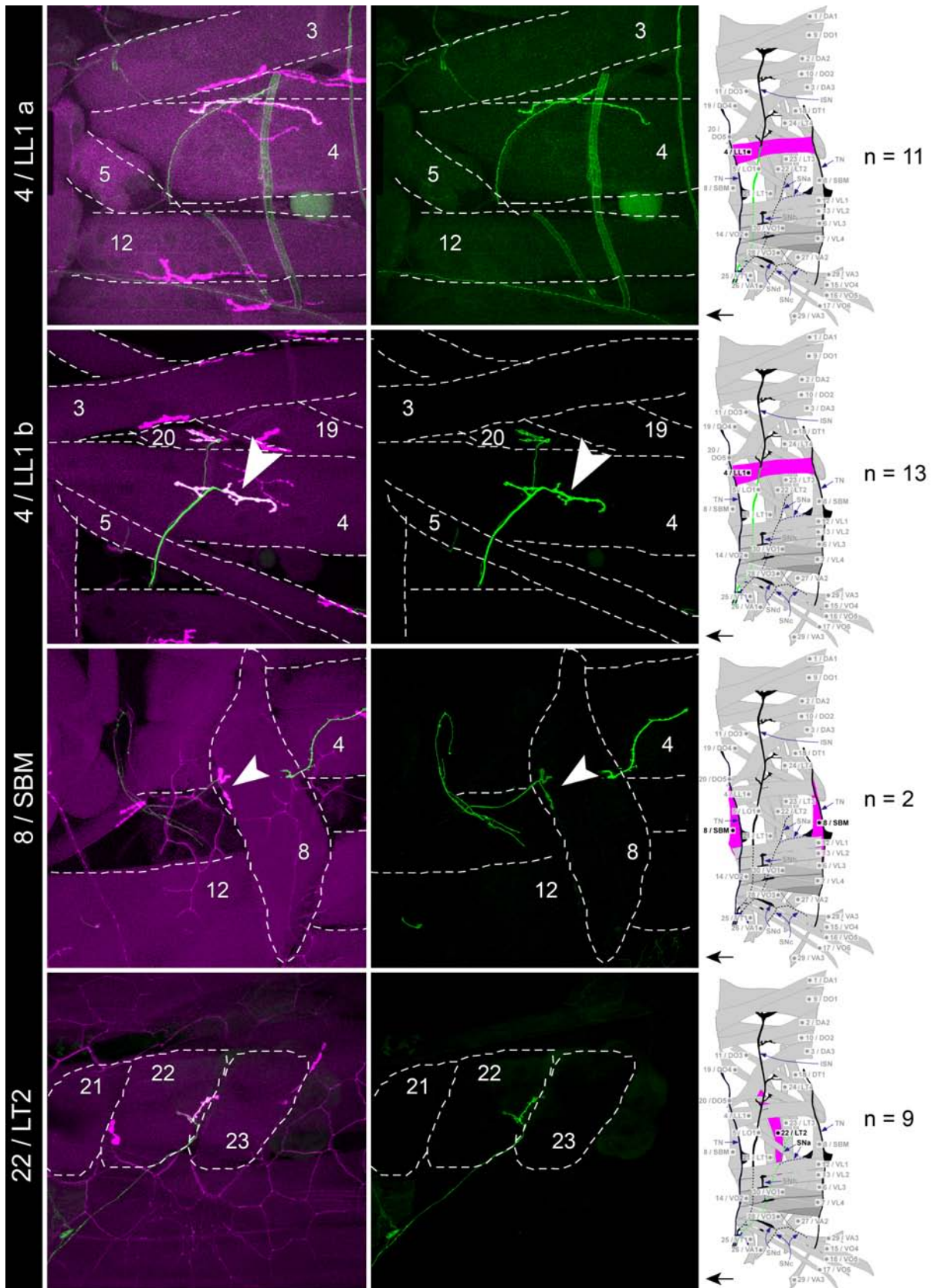


Abb. 45

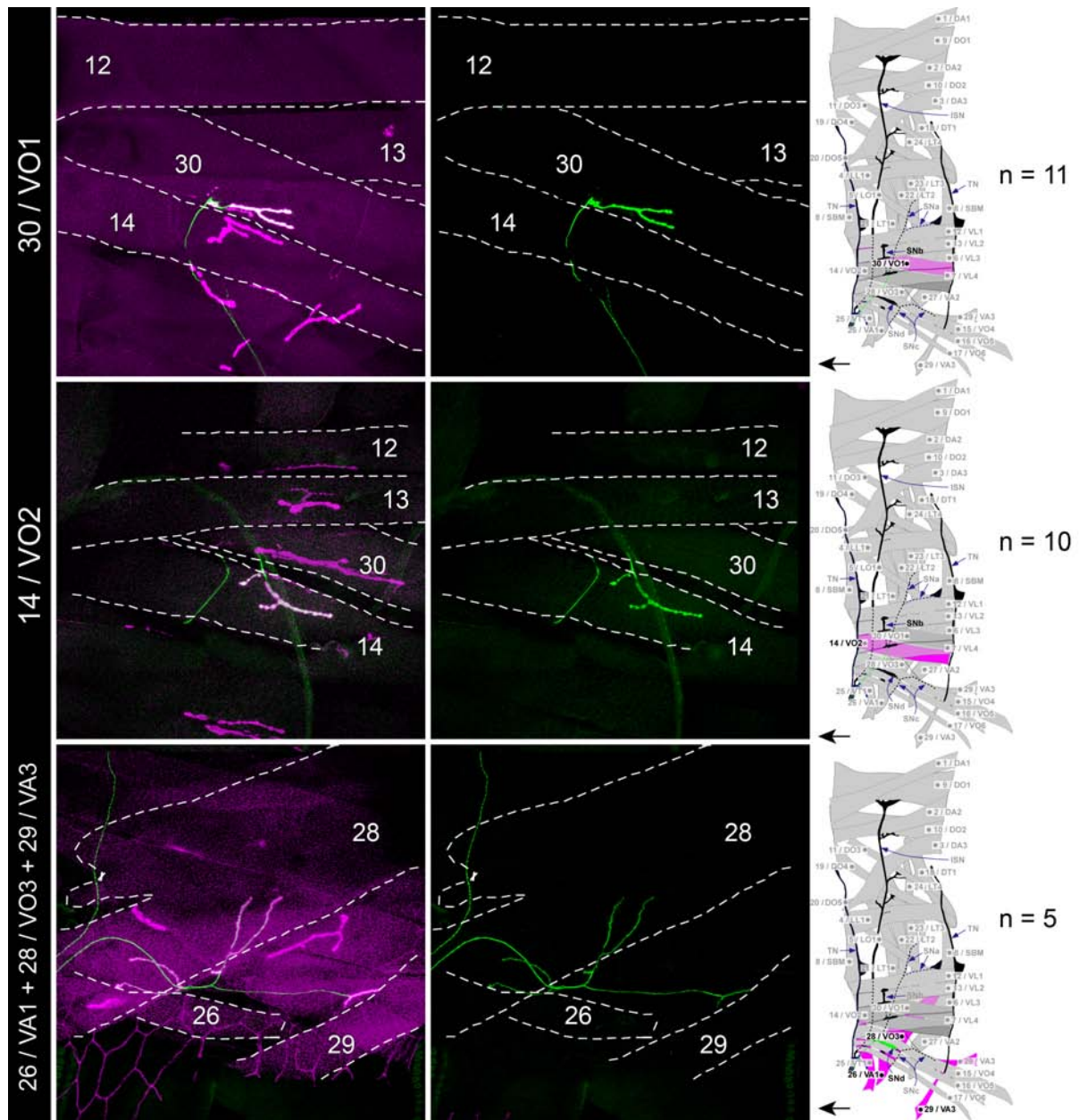


Abb. 45 Projektionen motoneuronaler MARCM-Klone im späten L3-Larvenstadium

Linke Spalte: Die Klone exprimieren ein Maus-CD8::GFP-Fusionsprotein, das durch Antikörperfärbung gegen Maus-CD8 (grün) sichtbar gemacht wird. Discs-large (magenta) lokalisiert in der Muskulatur und wird an der postsynaptischen neuromuskulären Verbindung angereichert. **Mittlere Spalte:** Die Morphologie MARCM markierter Projektionen ist leicht zu dokumentieren und erlaubt daher auch den Vergleich zwischen wildtypischen und mutanten Klonen. **Rechte Spalte:** Übersichtsschema über die somatische Muskulatur eines abdominalen Hemisegments und Häufigkeit an wildtypischen Klonen, die den hervorgehobenen Muskel innervieren (n). Innervierter Muskel (magenta), innervierender Nerv (grün), übrige Nerven und Nervenäste (schwarz).

zeigen dabei, dass sich eine Vielzahl von Klonen innerhalb eines Nervensystems induzieren lassen, was eine drastische Verbesserung der Effizienz der MARCM-Technik darstellt. Dieses Ergebnis rechtfertigte somit den Einsatz dieser Technik für die Analyse von wildtypischen Motoneuronen und den Vergleich mit *zfh1⁵*-mutanten Motoneuronen in spätlarvalen Stadien.

3.11.3. Mit der MARCM-Technik lassen sich alle Typen von Motoneuronen darstellen und identifizieren

Die Motoneurone im Abdomen von *Drosophila*-Larven stellen eine gut charakterisierte Population von Neuronen dar. Durch Anfärbung mit diffusiblen Farbstoffen und durch subtypspezifische Gal4-Linien konnte die Gesamtheit dieser Zellen sowie z. T. auch ihr klonaler Ursprung aufgeklärt werden (Hoang und Chiba, 2001; Landgraf et al., 1997; Landgraf et al., 2003a; Landgraf et al., 2003b). Dies gestattete mir, jedes durch MARCM-Technik markierte Motoneuron individuell anzusprechen und die Häufigkeit und seine Morphologie aufzuzeichnen. Generell konnte ich zeigen, dass sich prinzipiell jedes abdominale Motoneuron markieren lässt (Abb. 45). Es finden sich Motoneurone mit neuromuskulären Verbindungen aller vier Typen wieder (Typ-1b,-1s, -2, -3, Abb. 46), allerdings mit unterschiedlichen Häufigkeiten (Tab.6). Damit konnte ich zeigen, dass sich die MARCM-Technik für die Analyse von Genfunktionen in individuellen Motoneuronen verwenden lässt, insbesondere auch für die Analyse der Funktion von *zfh1*.

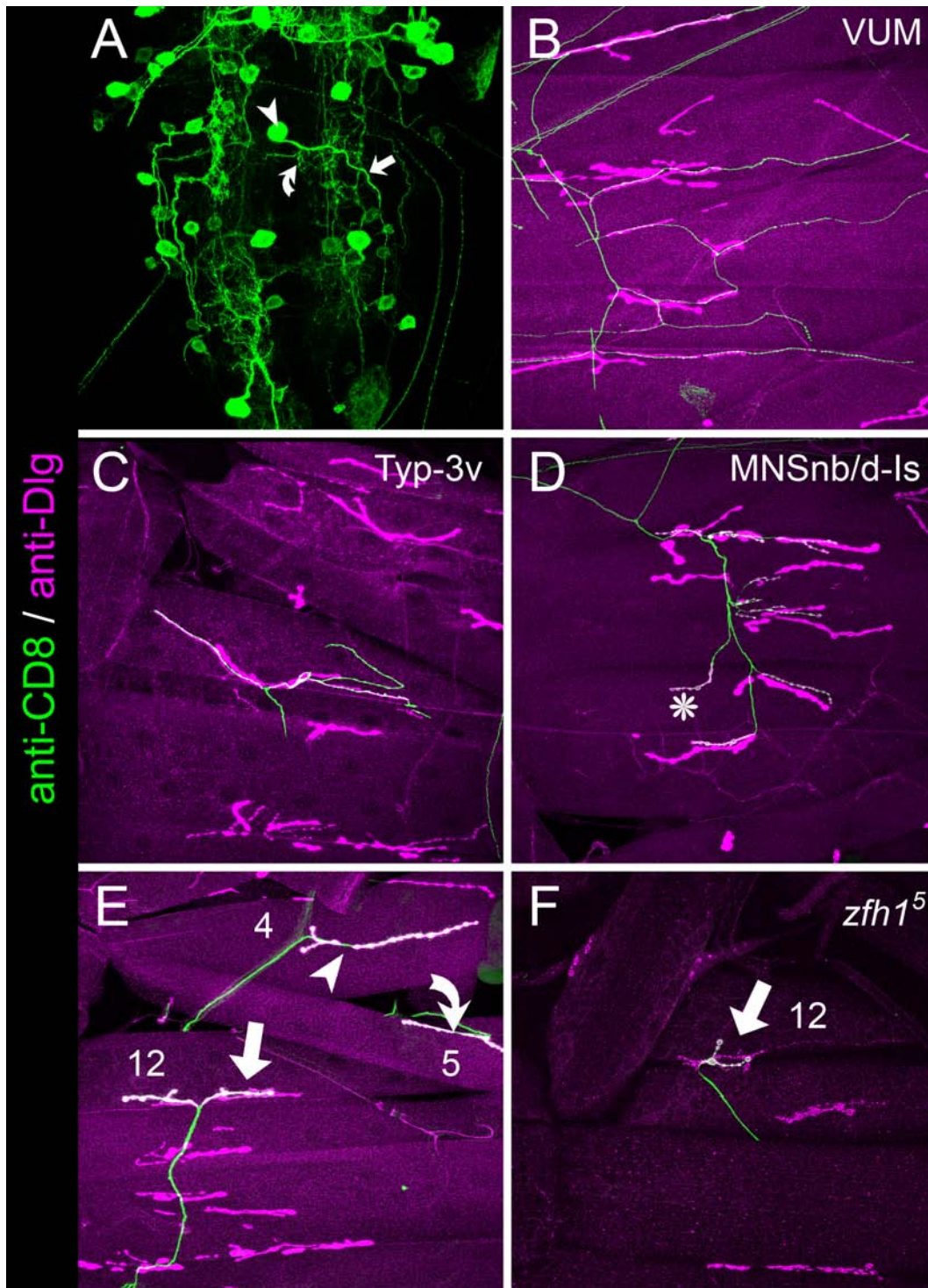
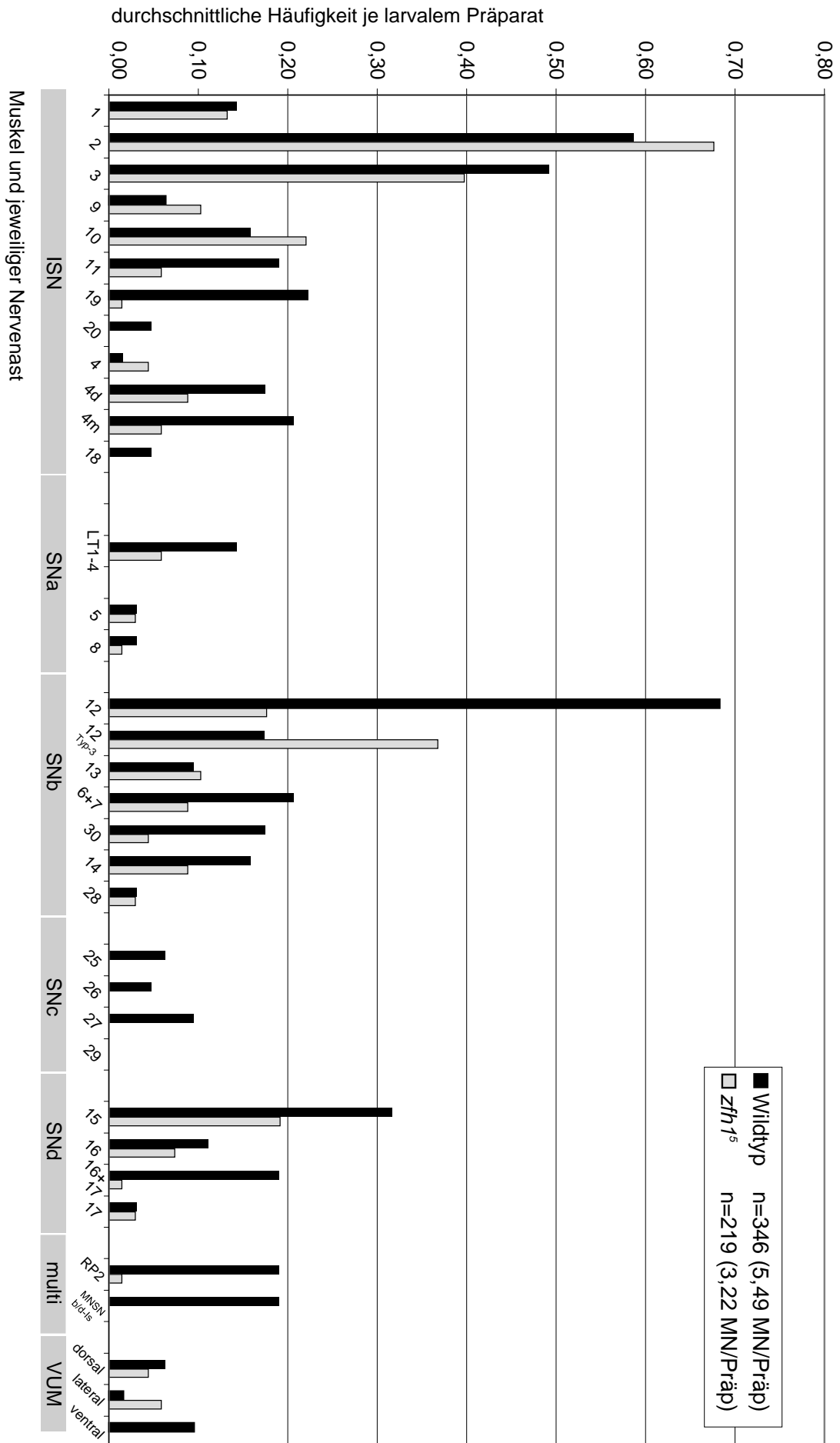


Abb. 46 Beispiele für Projektionen von durch MARCM markierten Motoneuronen

A. Spätlarvales vNS, B-F. Motoneuronale Projektionen und Körperwandmuskulatur spätlarvaler Stadien. A. Es sind eine Vielzahl von Motoprojektionen markiert, und man erkennt sowohl individuelle Zellkörper (Pfeilspitze), als auch dendritische (gebogener Pfeil) und axonale (gerade Pfeil) Bereiche. B. Beispiel für ein ventrales VUM-Neuron (grün), das eine Vielzahl von Muskeln innerviert und nur Dlg-negative neuromuskuläre Verbindungen aufweist (Typ-2). C. Beispiel für ein Typ-3v Neuron, das den Muskel 12 innerviert. Seine neuromuskulären Verbindungen sind ebenfalls Dlg-negativ. D. Beispiel für ein Typ-1s Motoneuron. Es innerviert mehrere ventrale Muskeln und seine neuromuskulären Verbindungen sind schwach Dlg-positiv (Sternchen). E. Verschiedene Typ-1b Motoneurone der Muskeln 4, 5 und 12. Ihre neuromuskulären Verbindungen sind stark Dlg-positiv. F. Projektion eines *zfh1⁵*-mutanten Motoneurons vom Typ-1b.



3.11.4. Die MARCM-Analyse bestätigt den vermuteten Auswachungsphänotyp in *zfh1*-Nullmutanten

Bei der Analyse der motoneuronalen Projektionen von *zfh1*⁵-mutanten Embryonen mit anti-Fasciclin2-Antikörpern zeigte sich, dass bestimmte Nervenäste sehr viel schwächer gefärbt sind und dass dies eine Folge des Fehlens oder Fehlprojizierens von Motoneuronen sein könnte (siehe oben). Ein solcher Phänotyp müsste sich in den MARCM-Experimenten als veränderte Häufigkeiten der als Motoneuron identifizierbaren Zellen in mutanten Klonen gegenüber denen in Wildtypklonen widerspiegeln. Vergleicht man die durchschnittliche Zahl der Motoneurone je larvalem vNS, so findet man tatsächlich 40% weniger *zfh1*-mutante Motoneurone als wildtypische (3,22 (n=219) *zfh1*⁵ zu 5,49 (n=346) WT). Betrachtet man zusätzlich, welche Neurone betroffen sind, so fehlen - ähnlich wie im Embryo - oft die ventralen Motoneurone des ISN sowie des SNb, SNc und SNd (Tab.6). Einzig die Motoneurone, welche die Muskeln 1, 2, 9, 10, 3 und 4 innervieren, zeigen keine größeren Abweichungen. Diese Muskeln werden im Wildtyp durch die Motoneurone aCC, RP2 und die U-Neurone innerviert (Landgraf et al., 1997), allerdings konnte ich das RP2-Motoneuron in keinem einzigen Fall identifizieren. Beim RP2-Neuron handelt es sich um ein die dorsalen Muskeln innervierendes

Tab. 6 Normalisierte Häufigkeiten durch MARCM-Technik gewonnener motoneuronaler Projektionen (Wildtyp und Mutante)

Angegeben ist die durchschnittliche Zahl individueller Projektionen pro larvalem Präparat (MN/Präp). Schwarze Balken: Wildtyp, graue Balken: *zfh1*⁵. Die Balken geben die Zahl an Klonen für die angegebenen Muskeln normalisiert auf ein larvales Präparat an. Die Muskeln sind gruppiert nach den sie innervierenden Nervenästen (Nomenklatur nach Landgraf et al., 1997; Landgraf et al., 2003b). Für den Muskel 4 konnten drei Typen von NMJs identifiziert werden: dorsal (4d), medial (4m) und mit nur einem Bouton (4). Multi: Motoneurone, die mehrere Muskeln gleichzeitig innervieren (RP2, MNSNb/d-Is Hoang und Chiba, 2001). Ventrale mutante MN kommen in geringerer Häufigkeit vor als dorsale mutante MN. Innerhalb des ISN gibt es ebenfalls Unterschiede: Die Muskeln 3 und 19 haben eine ähnliche dorso-ventrale Position, aber die Zahl der sie innervierenden Klone unterscheidet sich deutlich (weniger Klone für Muskel 19 im Vergleich zu Muskel 3).

Motoneuron (NMJ-Typ Is), welches im Wildtyp – im Gegensatz zu aCC und den U-Neuronen - sehr stark *Zfh1*-positiv ist.

Dies bestätigt die eingangs gemachte Vermutung, dass *Zfh1* im Embryo durchaus eine Funktion für das Auswachsen bestimmter Motoneurone zu haben scheint, und dieser Phänotyp unabhängig von der *zfh1*-Funktion in der Muskulatur oder den Gliazellen ist. Bei einem Teil der Motoneurone, wie z. B. den Pionierneuronen aCC und den U-Neuronen (Sanchez-Soriano und Prokop, 2005) scheint *Zfh1* dagegen nicht für das Auswachsen benötigt zu werden.

3.11.5. Klone *zfh1*-mutanter Motoneurone zeigen verkleinerte neuromuskuläre Endplatten

Obwohl die neuromuskulären Endplatten der hypomorphen *zfh1*⁸⁶⁵-mutanten Larven auch nach Normalisierung auf die Größe der Muskeloberfläche signifikant kleiner waren als die des Wildtyps, bestand weiterhin die Möglichkeit, dass dies auf einen Defekt während der Differenzierung der Muskulatur zurückzuführen sein könnte. Mittels der MARCM-Technik sollte deshalb überprüft werden, ob der einseitige Verlust von *Zfh1* im Motoneuron tatsächlich ausreicht, um zu einem geringeren Wachstum der NMJs zu führen, ähnlich wie es in den Hypomorphen beobachtet werden kann. Als besondere Schwierigkeit erwies sich der „Auswachsungsphänotyp“, da ich für die meisten Motoneurone nicht genügend mutante Klone erzeugen konnte, um die Notwendigkeit der Aktivität von *Zfh1* beim Wachstum der NMJs für jedes Motoneuron zu bestimmen. Für das den Muskel 3 (DA3) innervierende Neuron gelang dies trotzdem, da sich hier genügend auswertbare Motorendplatten dokumentieren ließen. Tatsächlich weisen *zfh1*-mutante Motoneurone, die diesen Muskel innervieren, weisen signifikant weniger Boutons auf als die Kontrollen (*zfh1*⁵ = $9,4 \pm 2,8$ (n=17) gegenüber Wildtyp = $13,1 \pm 2,6$ (n=25); t-test mit $P < 0.001$).

Für andere Motoneurone konnte ich dieselbe Tendenz beobachten (Abb. 46). Auch hier waren die Endplatten der mutanten Motoneurone in der Regel kleiner als im

Wildtyp. Allerdings gab es auch neuromuskuläre Verbindungen, die durchaus die Größe des Wildtyps erreichen. Inwiefern die elektrischen oder ultrastrukturellen Eigenschaften *zfh1*-mutanter Synapsen gestört sind, konnte ich leider nicht analysieren. Jedoch würde die MARCM-Technik diese Analysen erlauben: An GFP-positiven Motoneuronen und den entsprechenden innervierten Muskeln könnten im lebenden Tier Ableitungen vorgenommen werden, und angefärbte Klone ließen sich für elektronenmikroskopische Untersuchungen aufbereiten.

3.12. Die Funktion von *Zfh1* während der Myogenese ist dosisabhängig

Zfh1 wird während der frühen Embryonalentwicklung ab Stadium 7 im Mesoderm und später in den Muskelvorläuferzellen und Muskeln exprimiert (Lai et al., 1991). Funktionsverlustmutationen von *zfh1* sollen zu starken Defekten der sich entwickelnden Muskulatur führen (Lai et al., 1993), was ich anhand von präparierten *zfh1²*-mutanten Embryonen nachvollzogen habe (Abb. 47). Es sind insbesondere ventrale Muskeln betroffen: Sie sind im Vergleich zum Wildtyp zu klein oder lassen sich aufgrund ihrer Lage und Morphologie keinem bestimmten Muskel zuordnen. *Zfh1* scheint daher notwendig für die Ausdifferenzierung der somatischen Muskulatur zu sein. Da es sich hierbei um das Zielgewebe der auswachsenden Motoneurone handelt, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die mesodermalen Defekte auch auf die Projektionen der Motoneurone rückwirken. Allerdings haben die MARCM-Experimente gezeigt, dass es sich hierbei um zellautonome Effekte handelt. Um zu testen, inwieweit die Dosis von *zfh1* bei der Differenzierung der Muskulatur eine Rolle spielt, habe ich *Zfh1* mit dem mesodermalen Gal4-Treiber *24B* (Insertion in den *how*-Lokus, Fyrberg et al., 1997) überexprimiert und den Effekt auf die Muskulatur und die Innervierung durch die Motoneurone analysiert. Es zeigte sich, dass die Überexpression mit *Zfh1* zu spätembryonaler Letalität führt. Man kann ähnliche Defekte der somatischen Muskulatur beobachten wie in den Funktionsverlustmutanten (Abb. 48). Eine Antikörperfärbung gegen den moto-

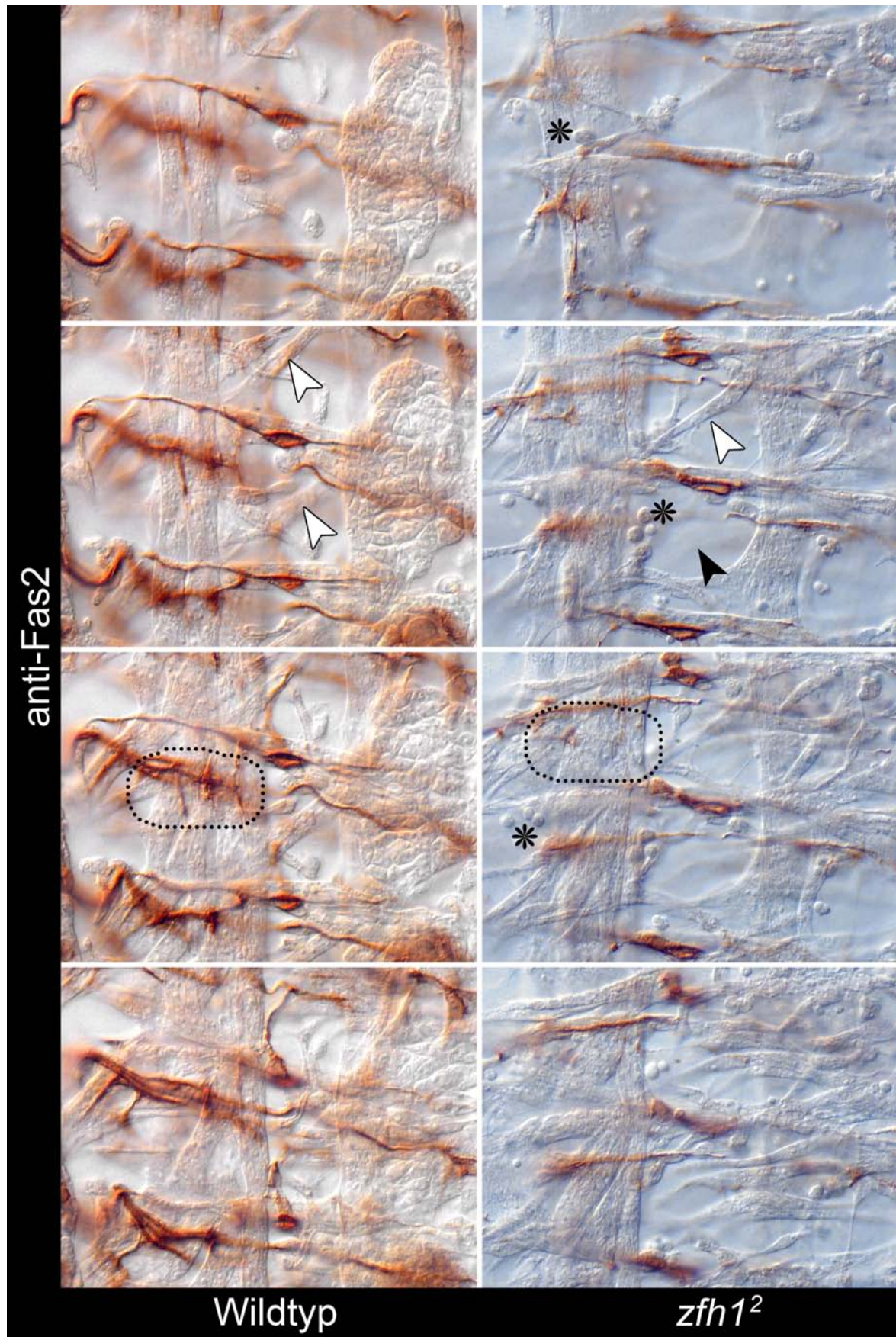


Abb. 47

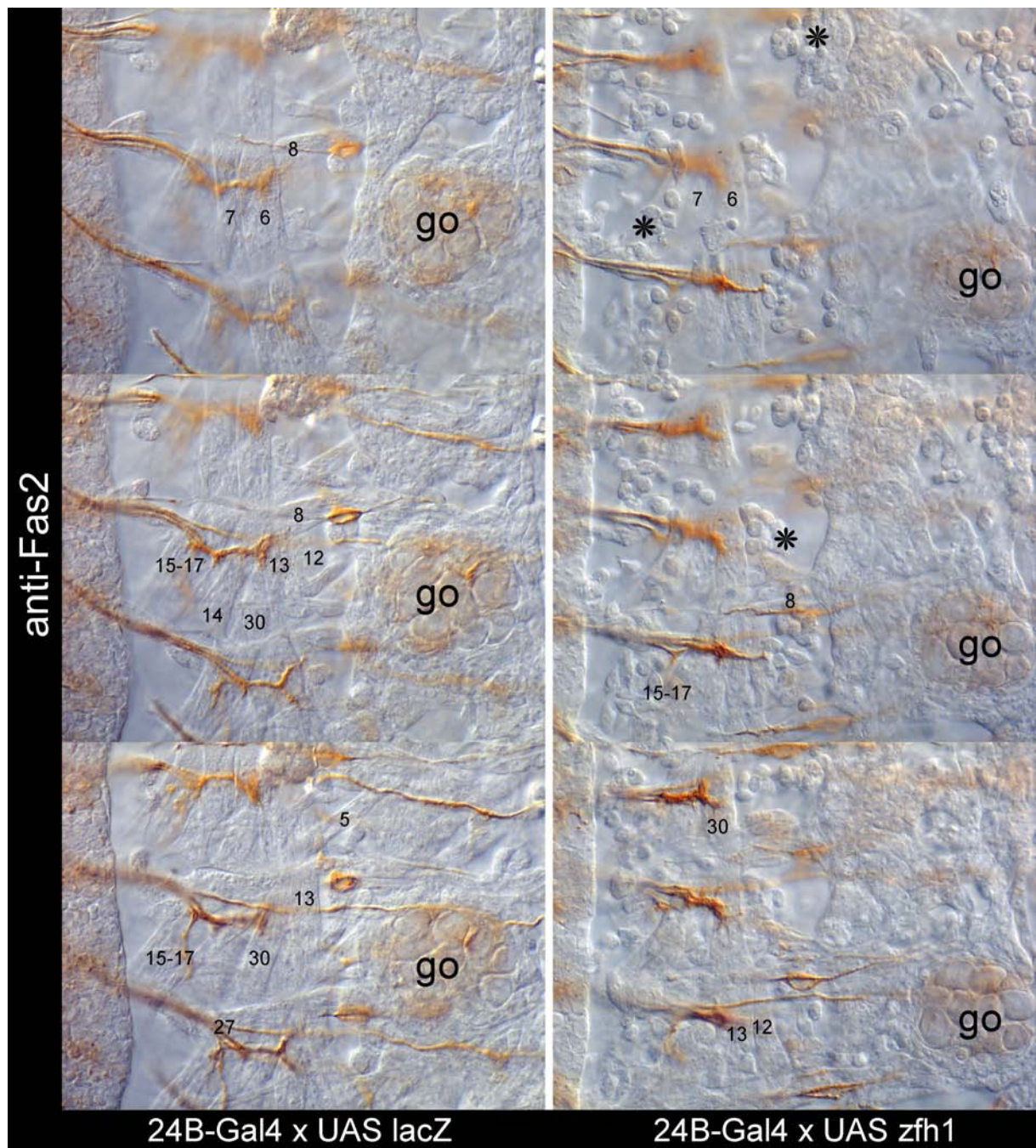


Abb. 48

neuronalen Marker Fascilin2 zeigte allerdings keine Auffälligkeiten. Die Vielzahl an runden Zellen in der Gegend der Muskeln deutet stark auf nicht fusionierte Myoblasten hin, was ich aber nicht weiter analysiert habe. Die Dosisabhängigkeit der Zfh1-Funktion macht es somit unmöglich, ein Rettungsexperiment der Muskulatur in *zfh1*-Nullmutanten zur Analyse der Unabhängigkeit des motoneuronalen Defekts durchzuführen. Es war deshalb sinnvoll, andere Wege zur Charakterisierung der Rolle von Zfh1 in Motoneuronen zu wählen, also die geschilderte Verwendung spezifischer motoneuronaler Gal4-Linien, hypomorpher Mutanten sowie die MARCM-Analyse (siehe oben).

Abb. 47 *zfh1*-Mutanten haben Defekte in der somatischen Muskulatur

Filetpräparation von Embryonen im späten Stadium 16. Dargestellt sind jeweils zwei abdominale Hemisegmente (A5-A6) in vier Fokusebenen (von dorsal nach ventral). Das ZNS liegt jeweils außerhalb des linken Bildrandes. **Links:** Wildtypische Morphologie der Körperwandmuskulatur und normales Projektionsmuster ventraler Motoneurone (anti-Fas2, braun). **Rechts:** In *zfh1*²-Funktionsverlustmutanten sind die Muskeln z. T. identifizierbar (z. B. Muskel 5, weiße Pfeilspitze). Allerdings scheinen sie in ihrer Morphologie eher spindelförmig bzw. schmaler zu sein, und teilweise fehlen Muskeln (schwarze Pfeilspitze: fehlender Muskel 5). Es finden sich außerdem verstreut einzelne Myoblasten, die nicht fusioniert zu sein scheinen (Sternchen). Das Projektionsmuster der Motoneurone ist ebenfalls verändert. Der die ventralen Muskeln innervierende Segmentalnerv (SN, gepunktet eingekreist) ist stark reduziert.

Abb. 48 Mesodermale Überexpression von Zfh1 führt zu Defekten in der somatischen Muskulatur

Filetpräparation von Embryonen im späten Stadium 16. Dargestellt sind jeweils drei abdominale Hemisegmente (A4-A6) in drei Fokusebenen (von dorsal nach ventral). Das ZNS liegt jeweils am linken Bildrand. **Links:** Überexpression von β Gal als experimentelle Kontrolle hat keinen Effekt auf die Differenzierung der Körperwandmuskulatur (eingetragen sind die Muskeln 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15-17, 30 und 27). Auch das Projektionsmuster ventraler Motoneurone und die Positionierung der Gonaden (go) sind normal. **Rechts:** In der Überexpression sind nur noch einige wenige Muskeln identifizierbar. Morphologie und Anordnung der meisten Muskeln sind stark verändert, zudem scheinen viele Myoblasten nicht zu vollständigen Muskeln fusioniert zu sein (Sternchen). Das Projektionsmuster der Motoneurone ist unverändert. Die Gonaden, die in ihrer Entwicklung mit mesodermalem Gewebe interagieren, lokalisieren korrekt und scheinen unauffällig.

3.13. Ektopische Expression von Zfh1 mit anderen neurospezifischen Gal4-Linien

Wie ich schon durch mesodermale Überexpression von Zfh1 gezeigt habe, können solche Experimente drastische Effekte auf die Entwicklung der betroffenen Organe haben. Dies gilt generell für den sich entwickelnden Embryo, aber umso weniger, je später die Überexpression in der Entwicklung stattfindet. Durch Hitzeschock-Experimente mit *hs-zfh1* (eigene unveröffentlichte Daten sowie Fortini et al., 1991) oder Überexpression von Zfh1 mit dem neuroektodermalen Treiber *scabrous*-Gal4 (Layden et al., 2006) kann man feststellen, dass ein frühe Überexpression, d. h. schon im Neuroblasten, zu dramatischen neuralen Defekten führt. Gibt man den Hitzeschock in etwas späteren Stadien, wirkt sich dies weniger stark auf die Morphologie des ZNS aus. Für ektopische Expressionsexperimente bedeutet dies, dass es sehr wohl darauf ankommt, ob die Zelle noch Teilungen durchlaufen muss, oder ob es sich um eine postmitotische Zelle handelt. Weil Zfh1 in den Neuronen des vNS postmitotisch exprimiert wird, habe ich meine Überexpressionsexperimente daher auf postmitotische Gal4-Linien beschränkt. Neben der schon beschriebenen Gal4-Linie *OK371* habe ich weitere Gal4-Linien auf ihre Verwendbarkeit für *zfh1*-Überexpressionsexperimente getestet.

elav-Gal4

Überraschenderweise zeigen Embryonen, die Zfh1 mit dem panneuronalen Treiber *elav*^{C155}-Gal4 überexprimieren, keinen offensichtlichen morphologischen Defekt: Sowohl das Muster der Fas2-Färbung (Abb. 49) als auch das Muster der 22C10-Färbung, (ein Antikörper, der vor allem sensorische Neurone anfärbt; Abb. 50), sind gegenüber dem Wildtyp unauffällig, obwohl Zfh1 jetzt in allen Neuronen des ZNS exprimiert wird. Die spätembryonale Letalität zeigt allerdings an, dass es sehr wohl zu Entwicklungsdefekten kommt, die ich mit den mir zur Verfügung stehenden Mitteln aber nicht weiter analysieren konnte.

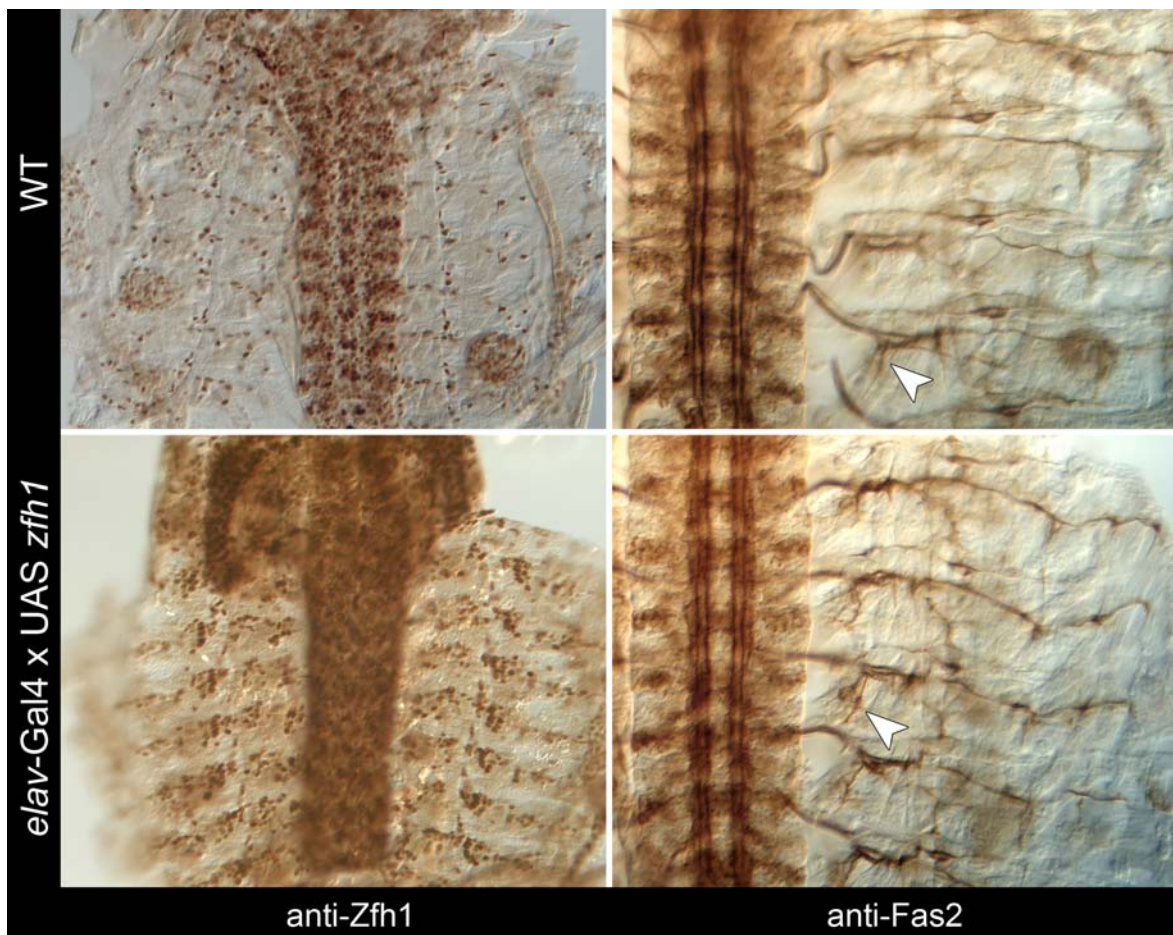


Abb. 49

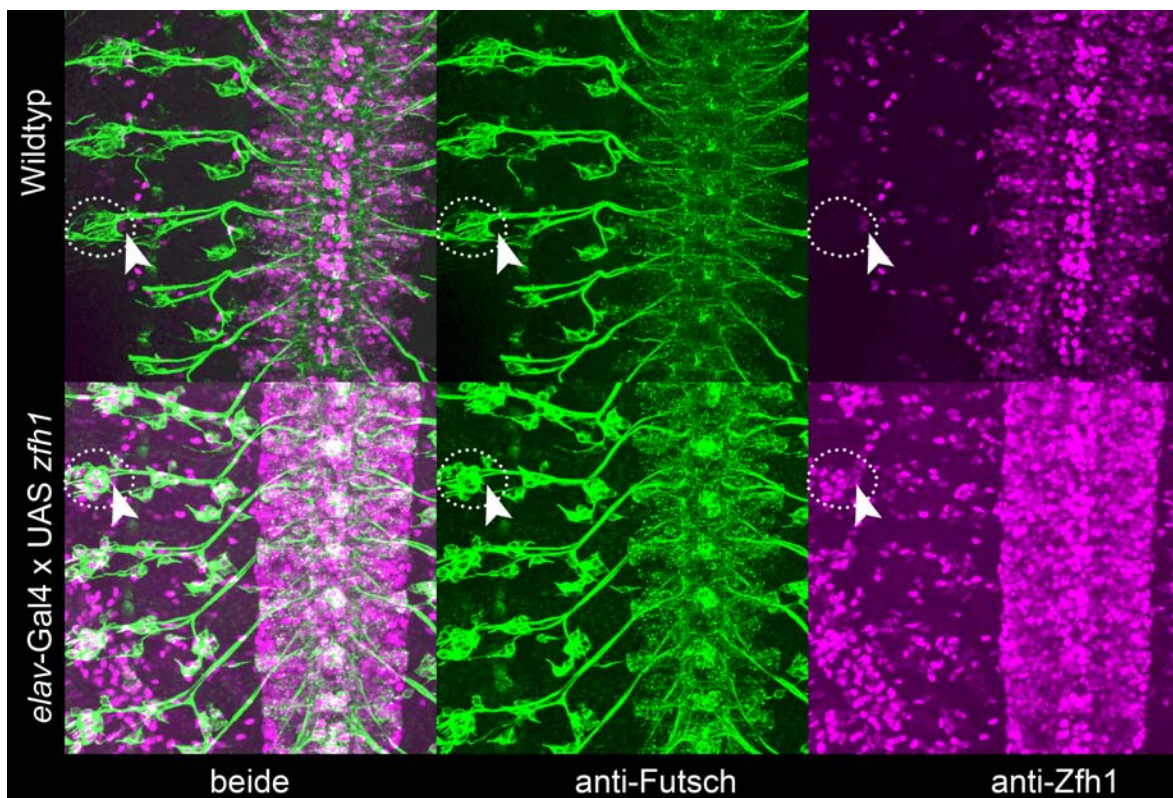


Abb. 50

Abb. 49 Die panneuronale Überexpression von Zfh1 erzeugt keine bzw. nur subtile Phänotypen des axonalen Projektionsmusters

Links oben: Wildtypisches Expressionmuster von Zfh1. **Links unten:** Überexpression von Zfh1 mit *elav*-Gal4. Im vNS und PNS zeigt eine Vielzahl von Zellen ektopische Zfh1-Expression. **Rechts oben:** Axonales Projektionsmuster Fas2-positiver Neurone. Der SNd ist markiert (Pfeilspitze). **Rechts unten:** Trotz panneuronaler Expression von Zfh1 zeigen sich keine Abweichungen im Projektionsmuster von Fas2. Evtl. ist der SNd (Pfeilspitze) etwas kräftiger gefärbt, was auf ektopische Projektionen in diesem Nerv hindeuten würde.

Abb. 50 Die panneuronale Überexpression von Zfh1 zeigt keine Phänotypen des axonalen Projektionsmusters sensorischer Neurone

Dargestellt sind abdominale Segmente spätembryonaler vNS (Stadium 16). **Obere Reihe:** Wildtypisches Expressionmuster des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Futsch (grün) und Zfh1 (magenta). Die Gliazellen des lateralen Chordotonalorgans (eingekreist) sind Zfh1-positiv (weiße Pfeilspitze). **Untere Reihe:** Panneuronale Überexpression von Zfh1 mit *elav*-Gal4. Die sensorischen Neurone des lateralen Chordotonalorgans exprimieren ektopisch Zfh1, ebenso wie Neurone im vNS (unten rechts). Das Projektionsmuster von Futsch entspricht dem Wildtypmuster.

OK6-Gal4

Die Expression von *OK6-Gal4* wurde als spezifisch für Motoneurone und Tv-Neurone beschrieben (Aberle et al., 2002; Marques et al., 2003), weshalb ich diese Linie ursprünglich für *Zfh1*-Überexpressionsexperimente verwenden wollte. Tatsächlich sind die *OK6*-positiven Zellen im ventralen ZNS bis auf wenige Ausnahmen alle auch *Zfh1*-positiv (Abb. 51). Allerdings zeigt sich, dass L1-Larven mit dem Genotyp *OK6-Gal4* x *UAS-zfh1* nicht in der Lage sind, das nächste Larvenstadium zu erreichen, sondern sehr bald sterben. Larven, die bei 18°C gehalten werden, zeigen eine verringerte Letalität, bleiben aber in ihrer Körperlänge beschränkt. Die Tracheenäste legen sich in Schleifen und die Larven wirken zusammengezogen (Abb. 52). Dies könnte auf ein Häutungsproblem hindeuten, jedenfalls handelt es sich nicht um einen Phänotyp, der sich durch eine rein motoneuronale Überexpression erklären ließe.

Tatsächlich zeigte sich, dass bei diesem Stamm auch die Zellen der Prothorakaldrüse starke Gal4-Expression aufweisen (Abb. 52). Da diese Drüse die Hauptquelle für das larvale Häutungshormon Ecdyson darstellt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die

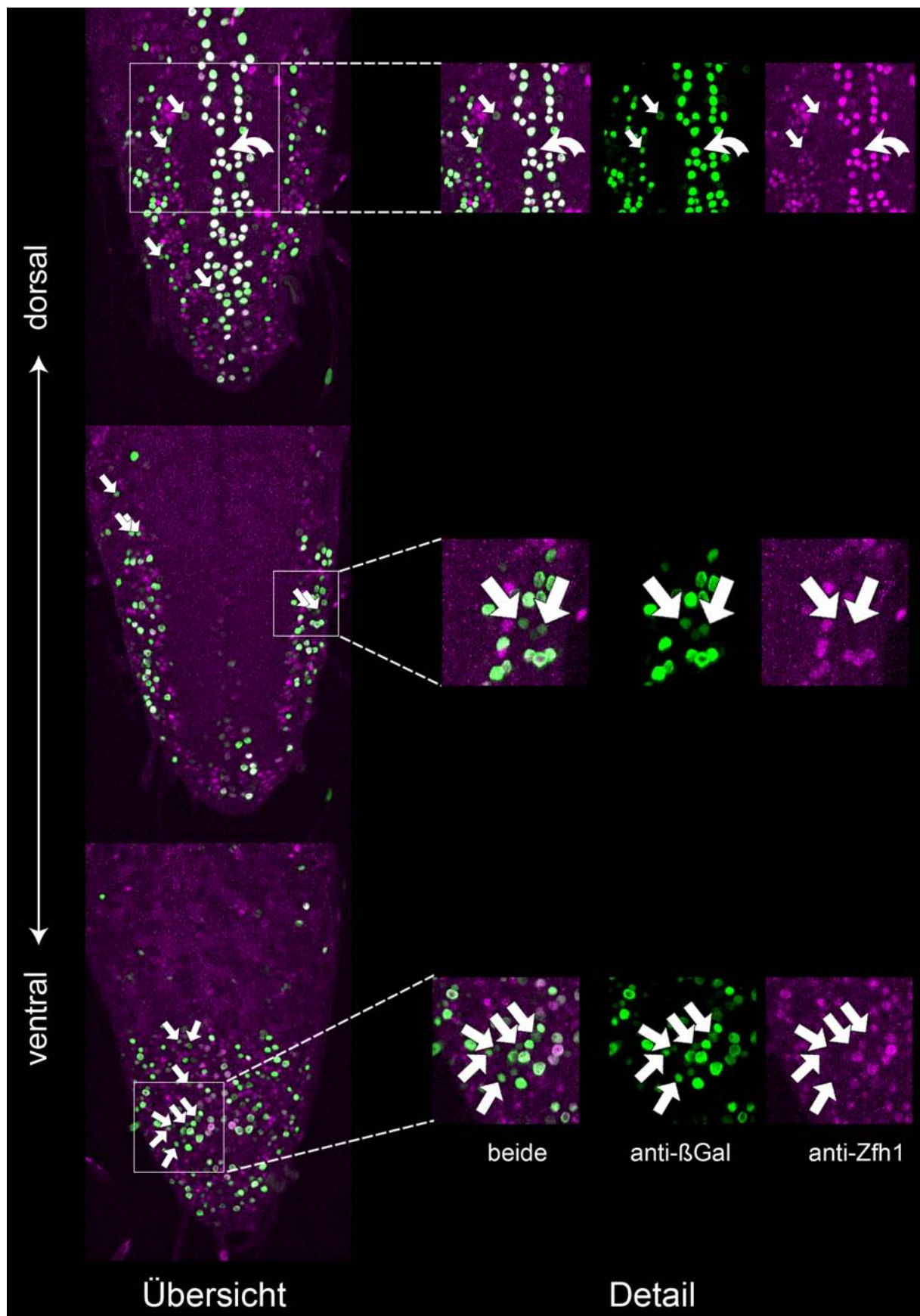


Abb. 51

Abb. 51 Expressionsmuster von *OK6-Gal4* im Verhältnis zur endogenen *Zfh1*-Expression in spätlarvalen vNS (Übersicht)

Dargestellt sind verschiedene Fokusebenen (von dorsal nach ventral). Gal4-abhängige Expression von β Gal (grün) zeigt eine Vielzahl von Zellen, darunter viele Motoneurone (gebogener Pfeil), an. Die meisten dieser Neurone sind ebenfalls *Zfh1*-positiv (magenta), allerdings gibt es auch eine Reihe *Zfh1*-negativer Neurone (Pfeile).

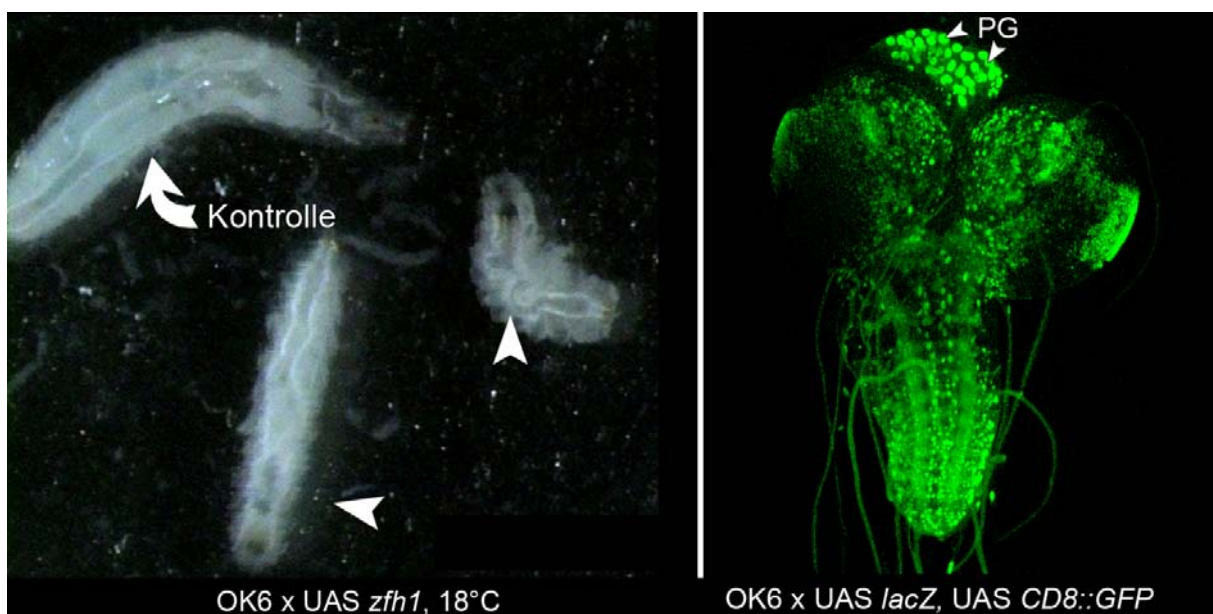


Abb. 52 Überexpression von *Zfh1* mit *OK6-Gal4* hat einen systemischen Effekt auf die Larvalentwicklung

Rechts: Bei gleichaltrigen Larven zeigen Tiere mit geringer *Zfh1*-Überexpression (durch Haltung bei 18°C) ein geringeres Wachstum. Die Larven häuten sich nicht und erscheinen daher geschrumpft, was an den in Schleifen gelegten Tracheen zu erkennen ist. Überexpression bei 25°C führt zu frühem larvalem Tod (nicht dargestellt). **Rechts:** Analyse der *OK6*-Expression zeigt, dass neben Gehirn und Bauchmark auch die Prothorakaldrüsen (PG, Pfeilspitzen) Gal4-Expression zeigen. Diese sezernieren normalerweise häutungssaktive Substanzen (Ecdyson).

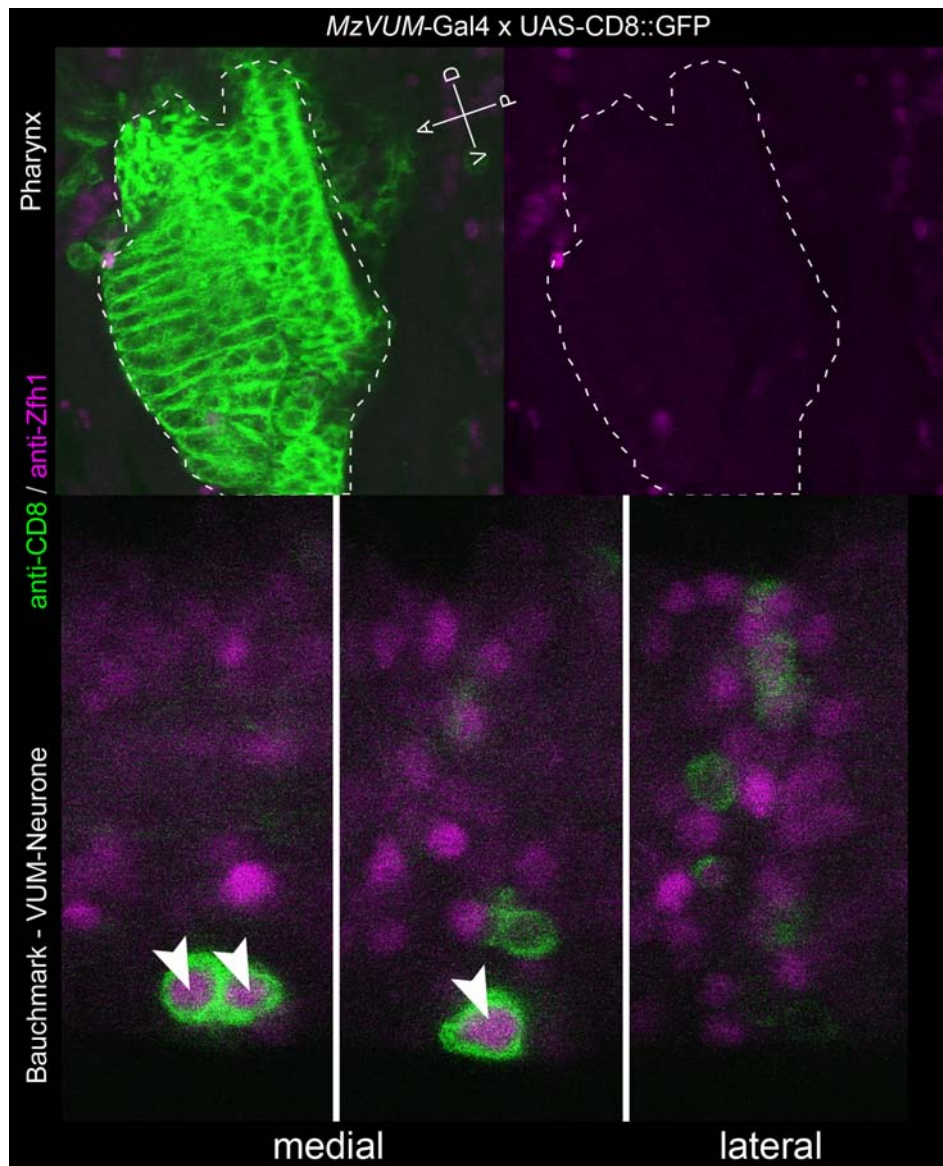


Abb. 53 Vergleich der Expression von MzVUM-Gal4 mit der endogenen *zfh1*-Expression

Die Gal4-Linie MzVUM exprimiert in der Pharynxmuskulatur (visualisiert mit anti-CD8, grün) und einigen Neuronen im Bauchmark, darunter sind auch die VUM-Neurone (weiße Pfeilspitzen). Ansichten konfokaler Ebenen (Medianebene von medial nach lateral). Die Orientierung des Pharynx ist eingezeichnet. Der Pharynx ist *Zfh1*-negativ (obere Reihe), die VUM-Neurone exprimieren *Zfh1* (magenta).

ektopische Expression von *Zfh1* in dieser Drüse für den drastischen Phänotyp verantwortlich ist. Aufgrund dieser Beobachtung ist diese Linie nur von limitiertem Nutzen gewesen (siehe unten).

MzVUM-Gal4

Diese Linie wurde im Institut für Genetik, Mainz, durch P-Element-Mutagenese mit Hilfe des P-GawB Gal4-P-Elements erzeugt (Ito et al., 1995). Der Insertionsort liegt in

der Enhancerregion von *CG15781* (Landgraf et al., 2003b) und die Linie exprimiert in den VUM-Motoneuronen sowie in etwa zwölf weiteren Neuronen je Hemineuromer. Die Überexpression von *Zfh1* mit *MzVUM-Gal4* führt zu larvaler Letalität, d. h. die Larven sterben im ersten Larvalstadium ab. Die Ursache ist hier vor allem darin zu suchen, dass die *Gal4*-Expression neben dem ZNS auch und sehr viel früher (Stadium 14) im sich entwickelnden Pharynx zu finden ist. Konfokale Aufnahmen von ektopischer Expression von *Zfh1* im Pharynx und der Vergleich mit der endogenen *Zfh1*-Expression zeigt, dass *Zfh1* normalerweise nicht im Pharynx exprimiert wird (Abb. 53). Die künstliche Expression von *Zfh1* in der Pharynxmuskulatur hat zur Folge, dass dieser seine geordnete Struktur verliert und die Larven daher sehr wahrscheinlich verhungern (nicht dargestellt). Die Linie wurde somit nicht weiter verwendet.

3.14. *zfh1* ist notwendig für die Expression einiger Neuropeptide

3.14.1. Die Expression von Proctolin ist nicht abhängig von *zfh1*

Wegen der deutlichen Kolo-kalisation von Proctolin mit *Zfh1* habe ich überprüft, ob die Expression von Proc im hypomorphen Allel *zfh1⁸⁶⁵* affiziert ist. Weil ich keine Abschwächung oder Veränderung der Proctolin-Expression feststellen konnte (nicht dargestellt), habe ich zusätzlich MARCM-Klone des vNS mit anti-Proctolin gegengefärbt. Weil ich in *zfh1*-mutanten Klonen ebenfalls keine Reduktion von Proc feststellen konnte (Abb. 54), scheint die Expression von Proctolin nicht direkt und alleine von *Zfh1* abhängig zu sein. Allerdings ist das Neuropeptid selbst ein hervorragender Marker für die Zellkörper einer Subpopulation von *Zfh1*-positiven Zellen, insbesondere von larvalen Motoneuronen.

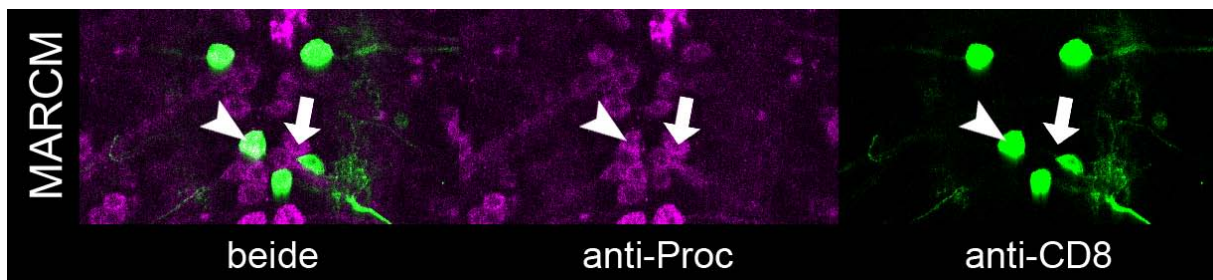


Abb. 54 Die Expression von Proctolin ist unabhängig von *zfh1*

Dargestellt ist eine dorsale Reihe von Motoneuronen zweier abdominalen Segmente im spätlarvalen vNS. MARCM induzierte *zfh1⁵* mutante Neurone können mit anti-CD8 nachgewiesen werden (grün). Beide Motoneurone eines Segments sind Proctolin-positiv (Pfeilspitze und Pfeil, magenta), obwohl eines für *zfh1* mutant ist (Pfeilspitze).

3.15. Die Leucokinin-Expression ist teilweise gestört im abdominalen vNS hypomorpher *zfh1⁸⁶⁵*-Larven

Bei den leucokinergen Neuronen handelt es sich um Motoneurone vom Typ-3v, und ich konnte zeigen, dass diese ebenfalls positiv für Zfh1 sind. Es schien daher möglich, dass die Expression von Leucokinin *zfh1*-abhängig ist, weshalb ich dies am hypomorphen Allel *zfh1⁸⁶⁵* überprüft habe. Antikörperfärbung gegen Lki bestätigte diese Vermutung, denn die Lki-Expression geht in manchen Motoneuronen verloren (Abb. 34). Aufgrund der Schwäche des Phänotyps (nur eine von sieben Zellen je Hemineuromer) habe ich dies jedoch vorläufig nicht weiter analysiert.

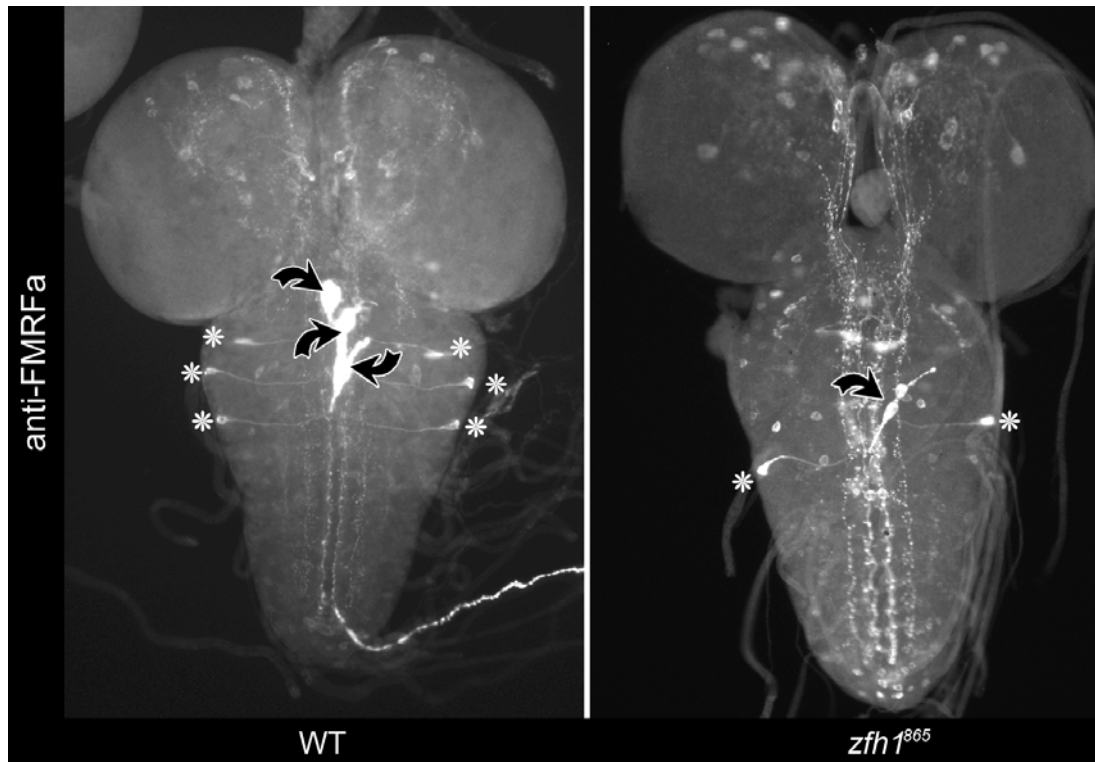


Abb. 55 Die Expression von FMRFa ist abhängig von Zfh1

Links: Wildtypisches Gehirn und Bauchmark. Zu erkennen sind drei dorsale Neurohämorgane (gebogener Pfeil) und sechs Tv-Neurone, die starke FMRFa-Expression aufweisen. **Rechts:** Gehirn und Bauchmark einer hypomorphen *zfh1*⁸⁶⁵-Mutante. Es fehlen die FMRFa-Expression in T1 und T2 sowohl in den Tv-Neuronen als auch in den DNH.

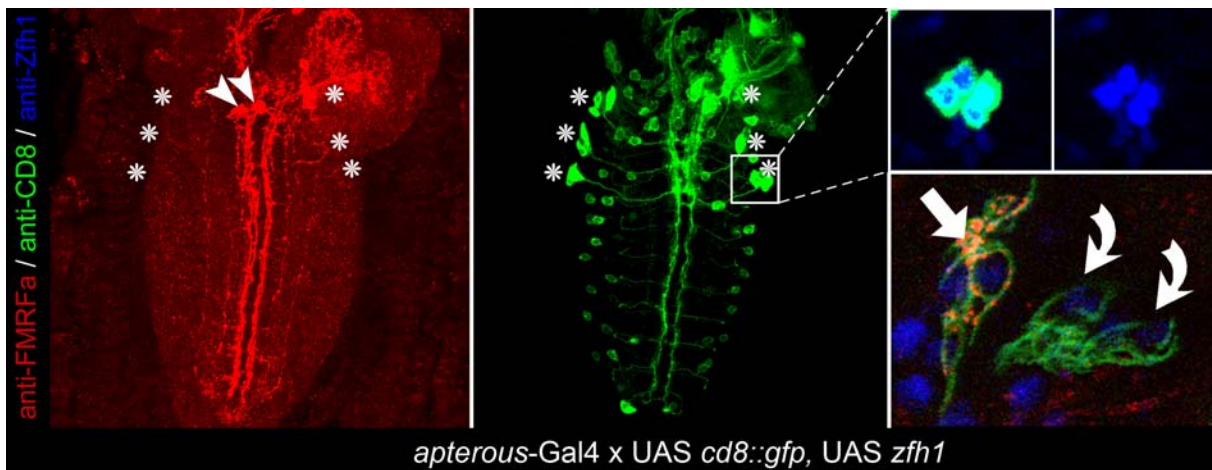


Abb. 56 Überexpression von Zfh1 in Ap-Neuronen reprimiert FMRFa

Dargestellt ist das vNS einer L1-Larve. **Links:** Es lässt sich keine Expression von FMRFa (rot) mehr in den Tv-Neuronen nachweisen (Sternchen). Die Ap-negativen SE2-Neurone zeigen noch FMRFa-Immunoreaktivität (Pfeilspitzen). **Mitte:** Expressionsmuster von *apterous*-Gal4, visualisiert durch Gal4-abhängige Expression von membranständigem CD8::GFP (grün). Weißes Quadrat: laterale Ap-Neurone in T3. **Rechts oben:** alle vier lateralen Ap-Neurone (grün) inkl. dem Tv-Neuron sind vorhanden und zeigen starke Zfh1-Expression (blau). **Rechts unten:** die dorsalen Neurohämorgane (grün) sind FMRFa-negativ (gebogene Pfeile) bzw. zeigen noch Reste von FMRFa (Pfeil).

3.16. *zfh1*⁸⁶⁵-mutante Larven zeigen einen Verlust von FMRFa-Expression

Ich habe bereits gezeigt, dass Wanderlarven, die homozygot für das hypomorphe Allel *zfh1*⁸⁶⁵ sind, reduzierte neuromuskuläre Verbindungen aufweisen, und darüber hinaus die Expression des Neuropeptids Leucokinin affiziert ist. Ich habe nun ventrale Nervensysteme solcher Larven auf ihre Expression von FMRFa überprüft. Dabei konnte ich zeigen, dass die Tv-Neurone in 60% aller Fälle kein FMRFa mehr exprimieren, bzw. in 13% aller Fälle nur noch sehr schwach (n=198, Abb. 55). Die Expression von FMRFa in den *Zfh1*-negativen SE2-Zellen war dagegen nicht betroffen (nicht gezeigt). Ich habe ebenfalls versucht, die Expression von FMRFa in spätebryonalen *zfh1*⁵-mutanten Embryonen durchzuführen, was sich aufgrund der durch die Mutation verursachten Gewebedefekte nicht bewerkstelligen ließ. Die Präparation des vNS durch die in diesem Stadium bereits ausgebildete Kutikula hindurch ist außerordentlich schwierig, sodass man nur eine geringe Ausbeute an Präparaten bekommt. Zusätzlich muss man zum Nachweis von FMRFa mit Peroxidase-vermittelter Signalamplifikation arbeiten, d. h. das fixierte Gewebe wird zusätzlich chemischem Stress ausgesetzt, und so war es mir nicht möglich, die Situation in Nullmutanten darzustellen. Ich konnte somit nur mit den hypomorphen Allelen den dokumentierten Nachweis liefern, dass *zfh1*-Mutation die Expression von FMRFa stört.

3.16.1. Die Expression von FMRFa wird unterdrückt durch *Zfh1*-Überexpression

Bei der Differenzierung des Mesoderms, aber auch beim Wachstum neuromuskulärer Verbindungen spielt die Dosis an *Zfh1* eine entscheidende Rolle. Um zu überprüfen, ob durch die Erhöhung der Menge an *Zfh1* im Tv-Neuron die Menge an FMRFa über das normale Niveau hinaus gesteigert werden kann, habe ich mit *apterous*-Gal4 *Zfh1* in allen *Apterous*-positiven Neuronen, und damit auch in

den Tv-Neuronen überexprimiert. Ich wollte damit außerdem überprüfen, ob sich FMRFa in anderen Neuronen anschalten lässt, um die Direktheit der möglichen FMRFa-Regulation durch *Zfh1* zu testen. Überraschenderweise führt die Erhöhung der Dosis zu einem frühzeitigen Abschalten der FMRFa-Expression schon in L1 Larven (Abb. 56). Reste von FMRFa in den Kavitäten der Endigungen der Tv-Neurone zeigen, dass initial FMRFa exprimiert wird, diese Expression aber nicht aufrechterhalten werden kann.

3.16.2. Der Verlust an FMRFa ist keine Folge programmierten Zelltods

Zusätzlich führt die Überexpression zum Absterben der Larven schon im L1 Stadium, obwohl *apterous*-Gal4 nur in einer sehr begrenzten Anzahl von Zellen exprimiert. Ich habe die Ursache für den verfrühten larvalen Tod nicht weiter verfolgt, allerdings war es notwendig, zu zeigen, dass das Abschalten der FMRFa-Expression keine Folge des larvalen Absterbens oder des Absterbens der Tv-Neurone ist. Hierzu habe ich das Überexpressionsexperiment wiederholt, allerdings zusätzlich kernständiges β Gal in *Apterous*-positiven Zellen exprimiert, um die Morphologie der Zellkerne darstellen zu können. Würden die Tv-Neurone absterben, hätte ich erwartet, dass als eines der ersten apoptotischen Merkmale die Kerne aufgelöst und fragmentieren würden (Abrams et al., 1993; White et al., 1994) und dass Reste von FMRFa noch vorhanden sein würden. Da allerdings alle Tv-Neurone intakte Zellkerne aufweisen, obwohl sie ihr Reservoir an FMRFa bereits vollständig verloren haben (Abb. 57), habe ich geschlossen, dass der Verlust an FMRFa nicht durch programmierten Zelltod, sondern durch Störung der Regulation von FMRFa zustande gekommen sein muss. Als komplementäres Experiment habe ich durch Antikörperfärbung nach Hinweisen auf aktivierte Caspase im Tv-Neuron gesucht und konnte zu keinem Zeitpunkt anti-Caspase-Immunoreaktivität in den Tv-Neuronen feststellen (nicht dargestellt). Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass der Verlust von FMRFa durch Absterben der Tv-Neurone verursacht wird.

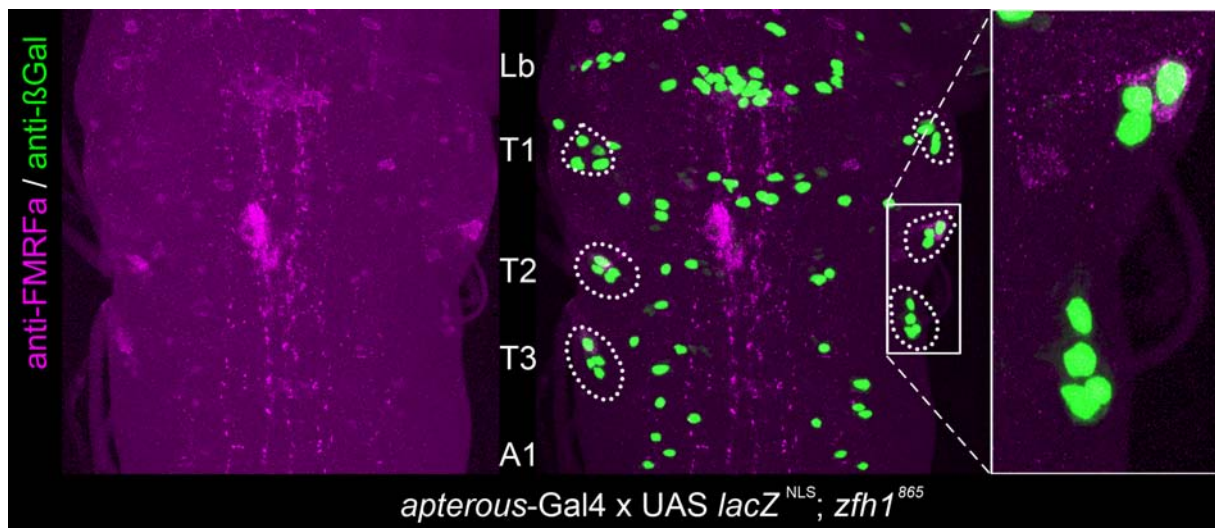


Abb. 57 Die Reduktion von FMRFamid in *zfh1*-mutanten Tv-Neuronen kommt nicht durch programmierten Zelltod zustande

Dargestellt ist ein vNS im späten L3 Stadium, Segmente Labial (Lb) bis Abdominalsegment A1. Grün: *apterous*-Gal4-positive Neurone; Magenta: anti-FMRFa. Wie im Wildtyp kann man in den lateralen Ap-positiven Zellen (punktiert umrahmt) vier Neurone identifizieren, deren Zellkerne intakt sind. Weißer Kasten: Ap-positive Gruppe in den thorakalen Hemisegmenten T2 und T3. In T2 ist ein Neuron nicht in der Fokusebene, deshalb sind nur drei Kerne erkennbar. Ein Tv-Neuron zeigt noch schwache FMRFa-Expression, in T3 ist keine Expression mehr erkennbar.

3.16.3. Das Neurohämalorgan ist auch in hypomorphen Larven vorhanden

Eine notwendige Komponente für die Expression von FMRFa stellt der TGF β -Signaltransduktionsweg dar. In Mutanten für den TGF β -Rezeptor Wishful-thinking findet man mit sehr hoher Penetranz kein FMRFa, wohingegen Mutanten anderer für die Expression von FMRFa notwendiger Faktoren eine gewisse Variabilität aufweisen. Da das TGF β -Signal in Form von sekretiertem BMP („bone morphogenetic protein“, hier: Glass-bottom-boat, Gbb) durch das Neurohämalorgan zu Verfügung gestellt wird, und weil *Zfh1* bei der Spezifizierung des Mesoderms und damit möglicherweise auch des Neurohämalorgans eine Rolle spielt, habe ich überprüft, ob der FMRFa-Phänotyp in *zfh1*⁸⁶⁵-mutanten Larven präsynaptischer (also im Tv-

Neuron) oder postsynaptischer (also im DNH) Natur ist. Mangels DNH-spezifischer Gal4-Linien konnte ich kein Experiment zur Rettung der Zfh1-Expression im DNH durchführen. Allerdings zeigen hypomorphe Allele geringe Zfh1-Immunoreaktivität, und im DNH vergleichsweise stärker als im vNS (Abb. 58). Darüber hinaus sind die DNH auch in jenen Segmenten nachweislich vorhanden, deren Tv-Neurone keine FMRFa-Expression mehr zeigen (Abb. 58). Weil ich keine Hinweise auf ein Fehlen oder einen Defekt des DNH feststellen kann, ist es daher sehr wahrscheinlich, dass der FMRFa-Phänotyp präsynaptischer Natur ist.

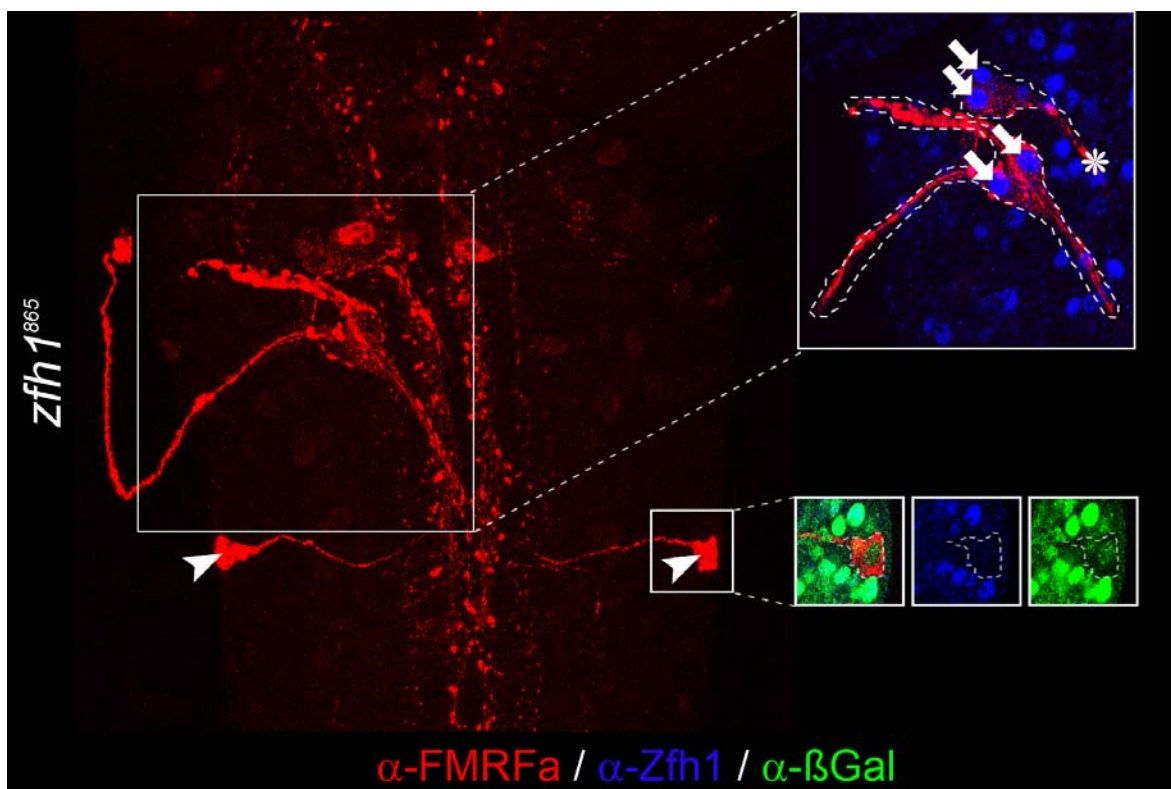


Abb. 58 Das dorsale Neurohämälorgan (DNH) ist in hypomorphen *zfh1*⁸⁶⁵-Mutanten vorhanden

Links: Maximalprojektion eines mutanten vNS, gegen FMRFa gefärbt (rot). Nur noch im thorakalen Segment T3 sind die Tv-Neurone FMRFa-positiv (Pfeilspitzen). Kleines Quadrat: Das Tv-Neuron zeigt noch Reste von FMRFa-Expression, aber keine erkennbare Zfh1-Expression und schwache β Gal-Reporter-Expression, verursacht durch den *zfh1*⁸⁶⁵-Enhancertrap. Großes Quadrat, links: Nur ein dorsales Neurohämälorgan (vermutlich T3) ist deutlich FMRFa-positiv, andere DNH sind nicht durch anti-FMRFa zu identifizieren. Großes Quadrat, rechts: Aufgrund der kernständigen Zfh1-Expression lassen sich zwei DNH identifizieren (je zwei weiße Pfeile). Das anterior gelegene DNH zeigt noch Reste von FMRFa (Sternchen), obwohl in diesem Segment keine Tv-Neuron-spezifische FMRFa-Expression nachweisbar ist.

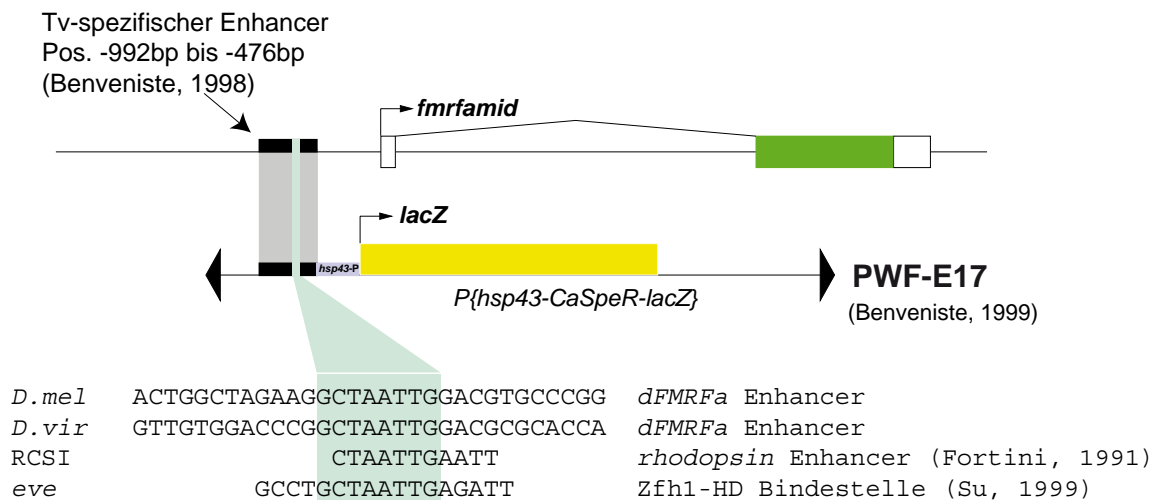


Abb. 59 Schematische Darstellung des Tv-spezifischen Enhancers von *fmr famid* und Vergleich der Zfh1-Bindestellen

hsp43-P: Promoter des Hitzschockprotein *hs43*. *D.mel*: *Drosophila melanogaster*; *D.vir*: *Drosophila virilis*; *eve* = *even-skipped*.

3.16.4. Das Tv-Neuron-spezifische Reporterkonstrukt PWF besitzt eine konservierte Homöodomänenbindestelle und ist abhängig von der Zfh1-Dosis

Der LIM-Homöodomänenfaktor Apterous war der erste identifizierte Faktor, der an der Regulation der Expression von FMRFa beteiligt ist (Benveniste et al., 1998). Durch Analyse eines Enhancer-Reporterkonstrukts, welches die Expression von FMRFa im Tv-Neuron nachvollzieht (PWF, Abb. 59) konnte gezeigt werden, dass Apterous im Enhancer von *fmr famid* binden kann, und notwendig für die Spezifikation des Tv-Neurons ist. In diesem Enhancer konnten drei Homöodomänen (HD)-Bindestellen identifiziert werden, an welche Apterous-Protein in vivo zu binden vermag, und Sequenzvergleiche zwischen der genomischen *fmr famid*-Enhancerregion von *D. melanogaster* und *D. virilis* zeigen, dass zwei dieser HD-Bindestellen konserviert geblieben sind (Benveniste und Taghert, 1999; Benveniste et

al., 1998). Die Expression von *lacZ* im ZNS hängt dabei vom Vorhandensein aller drei HD-Bindestellen ab (Benveniste et al., 1998). Die Sequenz der dritten, am 3' Ende gelegenen HD-Bindestelle weist starke Übereinstimmung mit der postulierten Zfh1-HD-Bindestelle auf (GCTAATTGA, siehe Fortini et al., 1991; GCTAATTGA, siehe Su et al., 1999). Diese Bindestelle ist außerdem notwendig für die robuste Expression des Reporters (Benveniste et al., 1998). Es schien daher möglich, dass die Expression von FMRFa direkt abhängig von Zfh1 sein könnte, was sich dann auch auf die Reporterexpression auswirken müsste. Ich habe daher getestet, ob das PWF-Konstrukt in *zfh1*-hypomorphem (PWF; *zfh1*⁸⁶⁵) und *zfh1*-Überexpressionshintergrund (PWF; *apterous*-Gal4; UAS-*zfh1*) einen Einfluss auf das Reporterkonstrukt hat. Ich konnte beobachten, dass im hypomorphen genetischen Hintergrund die Expression des *lacZ*-Reporters verloren geht, ganz ähnlich, wie ich es für das endogene FMRFa festgestellt habe (Abb. 60 und 61). Ebenso verhielt es sich mit der Überexpression: auch hier geht die Reporterexpression verloren, und zwar auch sehr viel eher und deutlicher als in der hypomorphen Mutante. Die Präsenz der Zellen im Apterous-Cluster habe ich hier durch Koexpression von UAS-mCD8::GFP überprüft (Abb. 61), und es gab auch hier keinen Hinweis auf einen Verlust an Tv-Neuronen. Dies bedeutet, dass Zfh1 direkt oder indirekt auf die im *lacZ*-Konstrukt befindliche Regulatorregion von *fmrfa* wirkt, da ich sowohl für das prozessierte Genprodukt als auch für einen künstlichen *fmrfa*-Reporter dieselben Beobachtungen machen konnte. Die Präsenz einer möglichen und für die Expression notwendigen Zfh1-Bindestelle im Enhancer von *fmrfa* liefert dabei einen Hinweis auf eine möglicherweise direkte Regulation durch Zfh1.

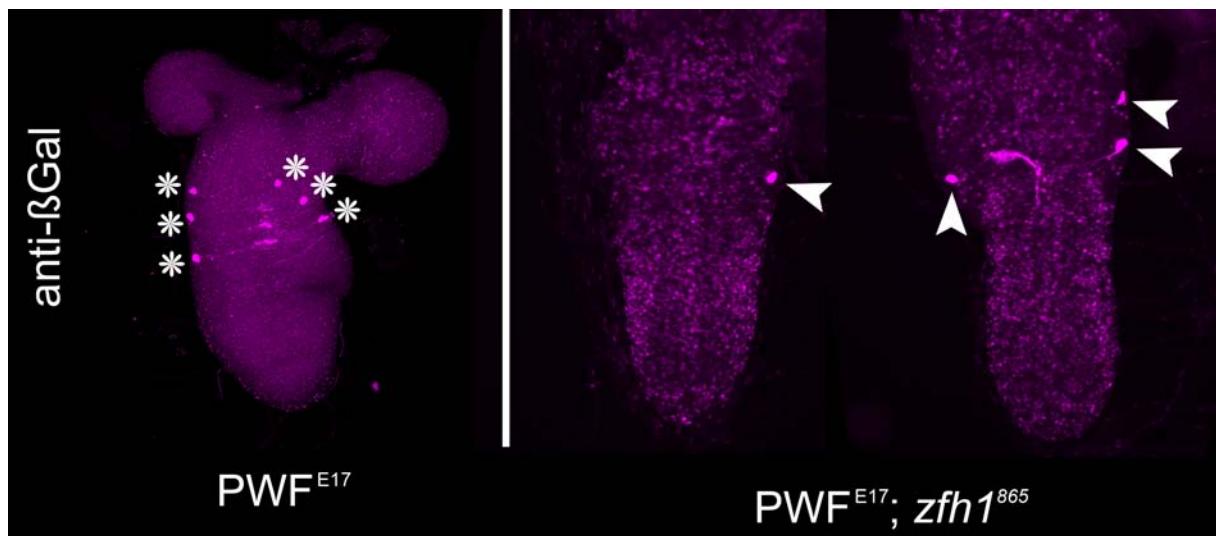


Abb. 60 Reduktion von *Zfh1* führt zum Verlust der Expression eines Tv-Neuron-spezifischen *fmrfa*-Reportergens

Dargestellt sind Gehirn und Bauchmark des Larvenstadiums L1 (rechts) bzw. L3 (links). Das *lacZ*-Muster ist in L3 im Wildtyp identisch zu L1 (nicht dargestellt). **Links:** Ein *lacZ*-Reporterkonstrukt (PWF-E17, Benveniste und Taghert, 1999) vollzieht die endogene Expression von FMRFa in den Tv-Neuronen nach (Sternchen). **Rechts:** Verlust bzw. Reduktion von *Zfh1* in *zfh1*⁸⁶⁵-Mutanten führt dazu, dass die Reporterexpression verloren geht und nur noch vereinzelt Tv-Neurone den *lacZ*-Reporter exprimieren (Pfeilspitzen). Weil es sich bei *zfh1*⁸⁶⁵ selbst um einen *lacZ*-Enhancertrap-Stamm handelt, wird außerhalb der Tv-Neurone kernständiges β Gal in Abhängigkeit des *zfh1*-Enhancers exprimiert.

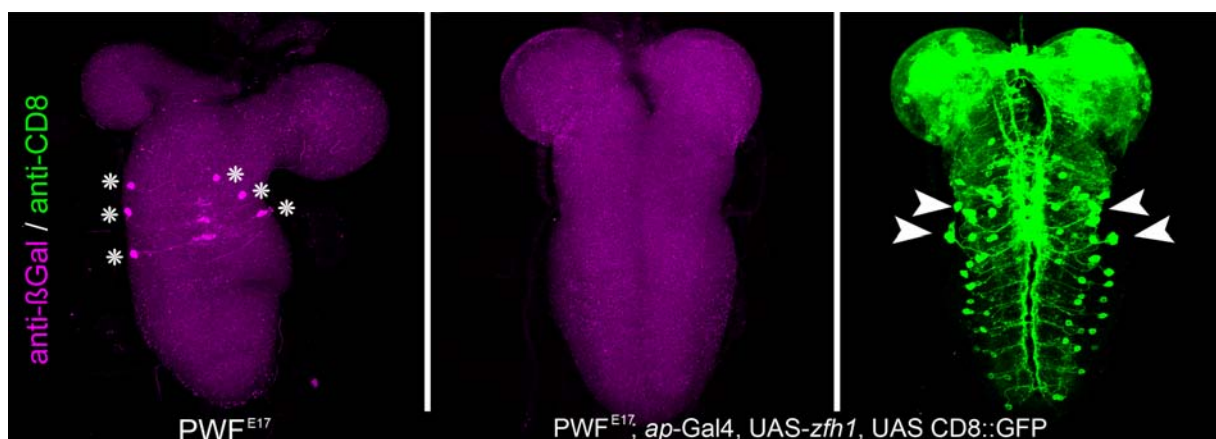


Abb. 61 Überexpression von *Zfh1* reprimiert ein Tv-Neuron-spezifischen *fmrfa*-Enhancer

Dargestellt sind Gehirn und Bauchmark des Larvenstadiums L1. **Links:** Ein *lacZ*-Reporterkonstrukt (PWF-E17, Benveniste und Taghert, 1999) vollzieht die endogene Expression von FMRFa in den Tv-Neuronen nach (Sternchen). **Mitte:** Überexpression von *Zfh1* mit *apterous*-Gal4 unterdrückt die Expression des *lacZ*-Reporters. Dies geschieht nicht durch programmierten Zelltod, da die lateralen Ap-Neurone weiterhin vorhanden sind (Pfeilspitzen, links).

3.17. **Überexpression von Zfh1 in CCAP-positiven Neuronen verhindert die Entfaltung der Flügel nach Schlupf**

In einigen Experimenten habe ich ein mutiertes Allel von Zfh1 (UAS-*zfh1* Δ CID) in einer Gruppe neuronaler Zellen überexprimiert. Bei dem Allel *zfh1* Δ CID handelt sich um eine künstlich eingebrachte Deletion der Proteinbindestelle zu dem transkriptionellen Korepressor CtBP („C-terminal binding protein“). Die Eigenschaft von Zfh1 als transkriptionellem Repressor würde dadurch zumindest verringert (Postigo und Dean, 2000). Tatsächlich konnte ich beobachten, dass die frühlarvale Letalität bei Überexpression dieses Konstruktes mit *OK6*-Gal4 im Vergleich zu wildtypischem Zfh1 (siehe oben) stark reduziert wird. Solche Larven entwickeln sich sogar bis zur Imago, allerdings haben diese Fliegen einen Flügelphänotyp, der auf eine Funktion von Zfh1 in einer weiteren Population neuropeptiderger Zellen hindeutet (Abb. 62). Solch ein Phänotyp wird dadurch verursacht, dass sich der in Falten gelegte pupale Flügel nach dem Schlüpfen nicht entfaltet. Dies geschieht normalerweise durch Einfüllen von Hämolymphe, und zwar bevor die Kutikula aushärtet. Es sind eine Reihe von Mutationen beschrieben, die zu einem solchen Flügelphänotyp führen können (Bantignies et al., 2000; Luan et al., 2006; Marques et al., 2003; Park et al., 2003), vor allem das Hormon Bursicon und bestimmte neurosekretorische Zellen spielen bei diesem Prozess eine Rolle (Luan et al., 2006; Luo et al., 2005). Letztere sind dadurch charakterisiert, dass sie in der Larve und Puppe das Peptid CCAP („Crustacean-cardioactive peptide“) produzieren. Zudem induzieren sie die Bildung und Sekretion des Hormons Bursicon (Luan et al., 2006), welches bei Insekten eine Schlüsselrolle als Schlupfhormon hat, indem es das Aushärten der Kutikula und Auseinanderfalten der Flügel steuert (Ewer und Reynolds, 2002). Ich habe bereits das Expressionsmuster von CCAP und Zfh1 miteinander verglichen (siehe oben), und nun den Einfluss von Zfh1 auf CCAP sowie die Vorgänge während des Schlüpfens näher angeschaut.

3.17.1. Durch Zfh1-Überexpression verursachte Flügelphänotypen

Durch die Überexpression von Zfh1 Δ CID mit OK6-Gal4 war ich in der Lage, reproduzierbar das Entfalten der Flügel nach dem Schlüpfen zu inhibieren. Diesen Phänotyp konnte ich auch durch Verwendung der neuropeptidergen Gal4-Linie C929 erzeugen, allerdings mit einer viel geringeren Penetranz. In der Literatur existiert neben dem Modell CCAP > Bursicon (s. oben) noch ein weiteres Modell, bei welchem das Neuropeptid FMRFa eine Rolle spielt. Beide Gal4-Linien (OK6 und C929) treiben Expression auch in den Tv-Neuronen, welche das Neuropeptid FMRFa exprimieren. Die Expression von FMRFa selbst ist abhängig vom TGF β -Signalweg, und *wishful-thinking* TGF β -Rezeptormutanten zeigen als pharate Adulttiere ebenfalls diesen Flügelphänotyp, der durch Reexpression von FMRFa in *wit*-mutantem Hintergrund gerettet werden kann (Marques et al., 2003). Überexpression von Zfh1 Δ CID mit OK6-Gal4 führt, ähnlich wie wildtypisches Zfh1 mit *apterous*-Gal4 (siehe oben), zum Verlust der Expression von FMRFa in den Tv-Neuronen (nicht dargestellt), sodass hierin eine Erklärungsmöglichkeit liegen könnte. Allerdings konnte durch gleichzeitige Expression von UAS-*zfh1* Δ CID und UAS-*fmrfa* der Flügelphänotyp nicht vermindert werden, sodass angenommen werden muss, dass der Phänotyp über einen anderen Mechanismus zustande kommt.

Ich habe daher überprüft, ob die gezielte Expression von Zfh1 Δ CID und Zfh1 in den CCAP-Neuronen ebenfalls zu einem Flügelphänotyp führt und ob Zfh1 möglicherweise eine Funktion in diesen Neuronen haben könnte.

3.17.2. Die Expression von CCAP ist unabhängig von *zfh1*

Wanderlarven des hypomorphen Allels *zfh1*⁸⁶⁵ zeigen keine Veränderung in der Expression von CCAP (Abb. 37), und in den wenigen Fällen, in denen aus diesen Tieren Adultfliegen geschlüpft sind, waren die Flügel immer entfaltet (nicht dargestellt). Eine Verringerung der Zfh1-Dosis hat also weder erkennbaren Einfluss auf die CCAP-Expression noch auf die CCAP-Neurone, deren Funktionalität für die Sekretion von Bursicon und damit für das Aufblasen der Flügel und Aushärten der

Kutikula notwendig ist (Luan et al., 2006). Allerdings weisen CCAP-Funktionsverlustmutanten selbst auch keinen Flügelphänotyp auf (Hoose et al., 2006), sodass CCAP für die Funktion dieser Neurone beim Schlüpfen entbehrlich zu sein scheint. Die Überexpression von *zfh1* und *zfh1 Δ CID* mit CCAP-Gal4 hingegen führt sehr wohl zu einer Inhibition der Flügelentfaltung, und zwar bei allen geschlüpften Adulttieren (Abb. 62). Beide Konstrukte (*zfh1* und *zfh1 Δ CID*) unterscheiden sich in ihrer Wirkung, denn bei UAS-*zfh1* zeigen die Flügel überhaupt keine Entfaltung, während bei *Zfh1 Δ CID* in 100% der Fälle immerhin ein teilweises Aufblasen der Flügel zu finden ist.

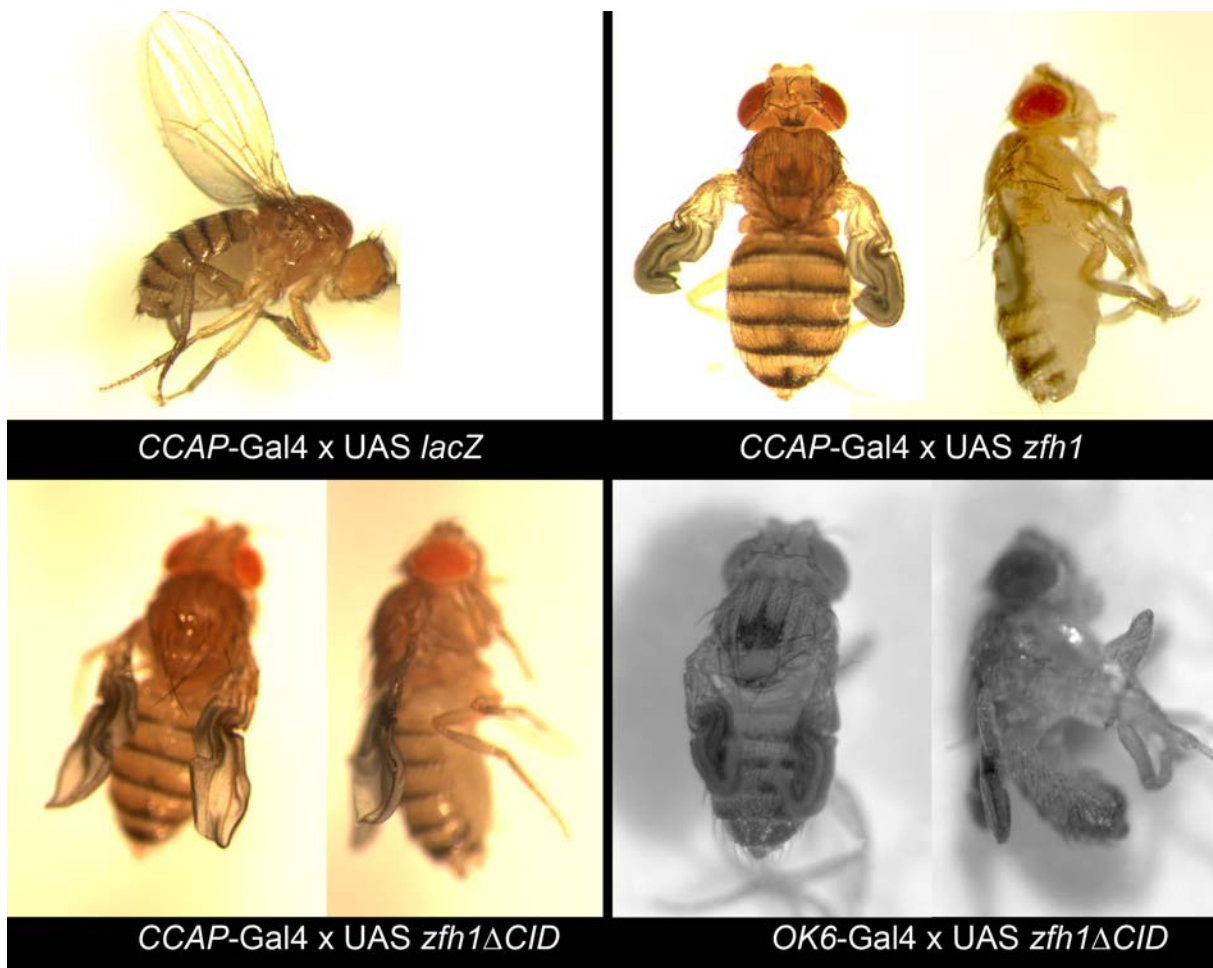


Abb. 62 Durch Überexpression von *Zfh1* lassen sich verschiedene Flügel- und Kutikulaphänotypen erzeugen

Oben links: Experimentelle Kontrolle durch Überexpression von *lacZ*. Die Flügel sind voll entfaltet und die Kutikula ist ausgehärtet und glänzend. **Oben rechts:** Überexpression von *Zfh1* in CCAP-Neuronen. Die Flügel bleiben zusammengefaltet und die Kutikula ist weich. **Unten links:** Bei Überexpression von *Zfh1 Δ CID* werden die Flügel teilweise entfaltet und die Kutikula härtet aus. **Unten rechts:** Überexpression desselben Konstrukts mit *OK6-Gal4* führt zu einem Nichtentfalten der Flügel und Aushärten der Kutikula.

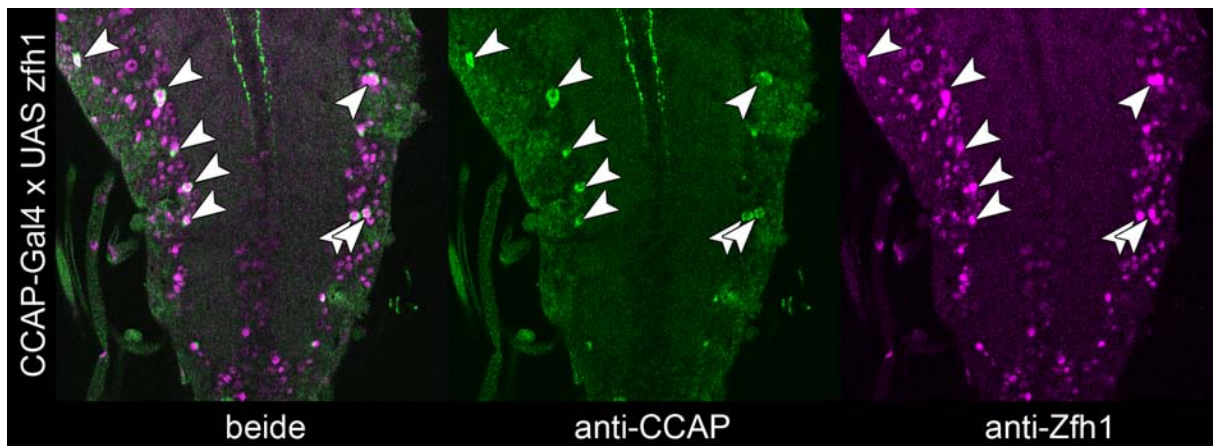


Abb. 63 Überexpression von *Zfh1* mit *CCAP-Gal4* hat in Larven keinen Einfluss auf die *CCAP*-Expression

Dargestellt ist eine Fokusebene eines vNS im späten L3-Larvenstadium. *CCAP*-Expression (grün) ist vorhanden, auch wenn dieselben Neurone ein stark erhöhtes Niveau von *Zfh1* zeigen (magenta, Pfeilspitzen).

Für den Phänotyp gibt es eine Reihe von Erklärungsmöglichkeiten, z. B. Absterben der *CCAP*-Neurone, Verlust ihrer neuronalen Funktion oder Repression des Hormons Bursicon (Luan et al., 2006; Luo et al., 2005; Park et al., 2003). Da die Überexpression von *Zfh1* während der gesamten Larvalphase hindurch erfolgt und die *CCAP*-Neurone noch in spätlarvalen Stadien detektierbar sind (Abb. 63), müsste das Absterben frühestens in der pupalen Phase der Entwicklung einsetzen. Gegen ein Absterben der *CCAP*-Neurone spricht allerdings, dass bei der Expression von *Zfh1* Δ CID keine Abstufungen des Phänotyps zu erkennen sind. Da es sich beim teilentfalteten Flügel um einen intermediären Phänotyp handelt, zudem mit hundertprozentiger Penetranz, scheint die *zfh1*-Überexpression in den *CCAP*-Neuronen bestimmte Mechanismen grundlegend zu stören. Es müsste nämlich sonst auch Fälle geben, in denen die Flügel voll oder überhaupt nicht entfaltet sind, wenn die Zahl überlebender *CCAP*-Neurone nicht ausreichend ist, z. B. für die Induktion bestimmter Mengen von Bursicon.

Weil weitere Analysen (Bursicon-Expression, Präsenz und Aktivität der *CCAP*-Neurone) vor allem in pupalen Stadien notwendig gewesen wären, habe ich die weitere Analyse der *Zfh1*-Funktion in *CCAP*-Neuronen aus technischen und zeitlichen Gründen nicht weiterführen können.

4. Diskussion

Während der Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila melanogaster* lassen sich eine Reihe verschiedener Spezifizierungsschritte unterscheiden, die dazu führen, dass eine Vielzahl unterscheidbarer Zelltypen hervorgebracht wird. Man kennt viele Faktoren, die während dieser frühen Prozesse in den neuronalen Vorläuferzellen (Neuroblasten und Gangliemutterzellen) exprimiert werden. Durch sukzessive Einschränkung der Kompetenz dieser Vorläuferzellen mündet die Entwicklung schließlich in ein neuronales oder gliales Schicksal. Die nachfolgenden postmitotischen Differenzierungsprozesse, welche im Embryo z. B. zum Auswachsen der Neurite und zur Verschaltung der Neurone untereinander führen, werden auf der Ebene der Genregulation sowohl von diesen frühen Determinanten kontrolliert, als auch durch explizit postmitotisch exprimierte Transkriptionsfaktoren, zu denen die in dieser Arbeit charakterisierten Gene *zfh1* und *zfh2* gehören. Beide Transkriptionsfaktoren werden in Neuronen und Gliazellen exprimiert und sind, wie ich zeigen konnte, notwendig für die korrekte Entwicklung des embryonalen, und mindestens im Fall von *zfh1* auch des larvalen Nervensystems. Ein Beispiel dafür, wie sich frühe Determinanten auf die späte Differenzierung einer Zelle auswirken können, stellt in diesem Zusammenhang die wahrscheinlich direkte Regulation von *zfh2* durch das temporäre Spezifizierungsgen *hunchback* dar.

4.1. *zfh2* wird durch temporäre Spezifizierungsgene reguliert

Die Beobachtung, dass es im Bauchmark von *Drosophila* eine Schichtung von neuronalen Zellen mit unterschiedlicher Markerexpression gibt, führte letztlich zu dem Modell der temporären Spezifizierung von Neuroblasten und deren Nachkommenzellen (Cleary und Doe, 2006; Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998; Mettler et al., 2006; Novotny et al., 2002; Pearson und Doe, 2003). Innerhalb eines Neuroblastenstammbaums unterscheidet sich das Expressionmuster eines frühen Neuroblasten

von dem eines späteren, und dadurch unterscheiden sich frühe Nachkommenzellen auch von später geborenen. Für den Transkriptionsfaktor Hunchback (Hb) konnte gezeigt werden, dass er frühe Zellschicksale determiniert (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Künstliche Verkürzung oder Verlängerung der Hb-Expression führt zu einer Verringerung bzw. Vermehrung von Zellen mit frühgeborenem Schicksal, was sich anhand ihrer Markerexpression nachweisen lässt. Hunchback ist also in der Lage, ein frühes Schicksal (Pearson und Doe, 2003) zu determinieren. Aufgrund meiner Beobachtung, dass es die Expression von *zfh2* zu reprimieren vermag, stellen sich zwei Fragen: Ist diese Repression direkt oder indirekt? Und was kann man aus dieser Beziehung über die Funktion von Hb und *zfh2* lernen?

Für die Analyse und Modellierung der Wirkmechanismen, durch die Hb ein frühes Zellschicksal festlegt, ist es unabdingbar, Zielgene von Hb zu identifizieren. Die Reprimierbarkeit von *zfh2* durch Expression von Hb und das Einsetzen von *zfh2*-Expression, nachdem *hb* in Zellzyklusmutanten herunterreguliert wurde, deuten darauf hin, dass *zfh2* ein direktes Ziel von Hb darstellen könnte. Dies wird durch die Beobachtungen erhärtet, dass in hypomorphen Mutanten von *hb* in einigen Neuronen (aCC, pCC, RP2) eine Derepression von *zfh2* gefunden wurde (persön. Mitteilung U. Mettler sowie Isshiki et al., 2001) und im Enhancer von *zfh2* Bindestellen für Hb existieren (persön. Mitteilung von S. Jansen). Allerdings scheint Hb das Potential *zfh2* zu reprimieren, in postmitotischen Zellen zu verlieren. Expression von Hb in schon *Zfh2*-positiven Zellen vermag nicht, die Menge an *Zfh2* zu verringern (nicht dargestellt). Für die Regulation von Zellschicksalen durch Hunchback bedeutet dies, dass das Zeitfenster, in dem Hb seine determinierende Wirkung ausüben kann, nicht beliebig groß ist, was auch gezeigt werden konnte (Pearson und Doe, 2003). Um zu verstehen, welche molekularen Ursachen diesem unterschiedlichen Potential von Hb zugrunde liegen, scheint die Analyse der Regulation von *zfh2* durch Hb daher ein viel versprechender experimenteller Ansatz zu sein.

Der gegenseitige Ausschluss der Expression von *hb* und *zfh2* wirft außerdem die Frage nach der entwicklungsbiologischen Bedeutung hierfür auf. Mit dem „*zfh2*-Schicksal“ spätgeborener Zellen könnten weitere Gemeinsamkeiten verbunden sein, die vom frühen „*hb*-Schicksal“ verschieden wären. Würde man mehr Details über die Funktion der jeweiligen Gene kennen, ließe sich möglicherweise auch etwas über diese gegenseitige Beziehung ableiten. Leider ist die Analyse von *Zfh2* sehr schwierig, da weder die Mutantanalyse noch die Herstellung von Konstrukten zur Überexpression trivial sind. Es wäre sehr interessant, in frühgeborenen Zellen *zfh2* überzuexprimieren und den Effekt zu beobachten. Die phänotypische Analyse *zfh2*-mutanter Embryonen zeigte Störungen in der Anordnung der Gliazellen und Defaszikulation dreier Trakte im vNS, und damit die generelle Notwendigkeit für seine Genfunktion während der Neurogenese. Diese Phänotypen treten bei einer Vielzahl anderer Mutationen ebenfalls auf, sodass sich hieraus alleine keine spezifischeren Aussagen über *zfh2* treffen lassen. Bei Vertebraten weiß man, dass das *zfh2*-homologe ATBF1 als Tumorsuppressor wirkt und den Zellzyklus negativ beeinflusst. Wegen der Expression von *zfh2* in postmitotischen Zellen, die aus späten Teilungsphasen der Neuroblasten hervorgegangen sind, wäre eine ähnliche Funktion denkbar. Zudem führt die Überexpression von *Hb* zu einer Überproliferation, und es wäre daher spannend zu testen, ob *Zfh2* diese Überproliferation inhibieren kann. Auch wenn unsere Analysen von *zfh2*-mutanten Embryonen keine erkennbare Zunahme der Zellzahl bei den verwendeten Markern zeigen, können wir eine solche Funktion nicht ausschließen. Erst wenn die genetischen Werkzeuge für die Analyse von viertchromosomalen Genen zur Verfügung stehen (Balancerchromosomen mit dominanten Markern, gezielter „knock-out“), lässt sich sinnvoll an die Beantwortung dieser Frage herangehen.

4.2. Alternatives Spleißen ermöglicht eine Vielzahl an Zfh2-Proteinen

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte molekulare Analyse der *zfh2*-Transkripte und die Identifikation neuer, alternativer Spleißformen von *zfh2* wurden neue Aspekte aufgezeigt, auf welche Weise *zfh2* seine Funktion ausüben könnte.

Mit Hilfe von EST- und Genomsequenzierungen hat man feststellen können, dass es bei vielzelligen Organismen in vielen Fällen zu alternativem Spleißen (AS) der Primärtranskripte von Genen kommt. Durch die gezielte Analyse mit Hilfe von Microarray-Expressionsprofilen konnte man zeigen, dass es sich dabei um außerordentlich häufige Ereignisse handelt und die Zahl möglicher Proteine damit die Zahl der Gene eines Organismus um ein Vielfaches übersteigt. Da das alternative Spleißen ebenfalls reguliert werden muss, wird der Ebene der Genregulation eine weitere Kontrollinstanz hinzugefügt, welche das Spleißen verschiedener Exons entwicklungsabhängig steuert. Die dadurch zustande kommende Vielfalt an Proteinen (z. B. Dscam mit mehr als 38.000 Spleißvarianten, Schmucker et al., 2000) wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, u. a. durch in trans wirkende RNA-bindende Proteine oder auch durch Sekundärstrukturen der Introns (zusammengefasst siehe z. B. Blencowe, 2006). Mittlerweile wurden eine Vielzahl alternativ gespleißter Transkriptionsfaktoren identifiziert und man hat im Mausmodell feststellen können, dass AS bei Transkriptionsfaktoren sogar überdurchschnittlich häufig vorkommt (Taneri et al., 2004). Auch vom *zfh2*-homologen *atbf1* existieren mindestens zwei Isoformen (Miura et al., 1995) und es war deshalb wenig überraschend, dass auch *zfh2* alternativ gespleißt wird. Was allerdings überraschte, war zum einen die Vielzahl an Isoformen, welche die Zahl der von ATBF1 bekannten weit übersteigt. Zum anderen gilt für die meisten Formen alternativen Spleißens, dass das Spleißen gewebeabhängig erfolgt, d. h. dass in individuellen Geweben nur eine Isoform zu finden ist. Diese Gewebespezifität liegt wahrscheinlich in der differentiellen Expression von Spleißfaktoren begründet. Für *Zfh2* haben wir keine solchen Unterschiede festmachen können, und auch innerhalb

des vNS zeigen verschiedene neuronale Zellen keinen Unterschied, allerdings war die experimentelle Auflösung z. T. sehr gering (in situ-Hybridisierung gegen verschiedene Exons an „whole-mount“-Embryonen). Der Vergleich der Präsenz verschiedener Zfh2-Epitope mit zwei unterschiedlichen Antikörpern konnte auf Einzelzellebene auch keine differenzielle Expression aufzeigen, allerdings hätte dies nur Rückschlüsse auf ein Transkript (*zfh2^{Δ4-5}*) zugelassen, bei dem frühzeitig ein Stoppcodon durch Auslassen zweier Exons erzeugt wird. Bei dieser Spleißform handelt es sich möglicherweise um ein regulatorisches Ereignis, das zum Abbau von *zfh2*-mRNA führt ("nonsense-mediated mRNA decay, NMD", Lewis et al., 2003).

Für zukünftige Analysen der *zfh2*-Funktion muss auf diese Vielfalt Rücksicht genommen werden, und möglicherweise erlauben Rettungsexperimente mit dem Gal4/UAS-System unter Verwendung unterschiedlicher Isoformen nähere Aufschlüsse über den funktionellen Hintergrund von alternativem Spleißen bei *zfh2*.

4.3. Die Rolle von *zfh1* im ventralen Nervensystem ist vielfältiger Natur

Im Unterschied zu *zfh2*, dessen Expression man einem bestimmten Zeitfenster innerhalb eines Neuroblastenstammbaums zuordnen kann, gibt es keine Indizien dafür, dass man *zfh1* in ein frühes oder anderes Zeitfenster einordnen kann. Stattdessen lässt sich *zfh1* bestimmten Populationen von Zellen zuordnen, vor allem Motoneuronen, neuropeptidergen Zellen sowie verschiedenen Subtypen von Gliazellen.

4.3.1. Gliazellen und die Funktion von Zfh1 für die Migration von Zellen

Für die Funktionalität des Nervensystems sind Gliazellen ebenso notwendig wie Neurone, und die Analyse der Gliogenese, also der Entwicklung der Gliazellen, ist ein bedeutender Teilaspekt der Neurogenese. Ein wichtiges Merkmal der Gliogenese bei *Drosophila* stellt die Spezifizierung glialer Zellen durch das Schlüsselgen *glial-*

cells-missing dar, dessen Expression notwendig und ausreichend ist für die Ausbildung glialer Merkmale und die Unterdrückung des neuronalen Schicksals sowohl auf morphologischer Ebene als auch auf Ebene der Genexpression (Akiyama-Oda et al., 1998; Altenhein et al., 2006; Bernardoni et al., 1998; Schreiber et al., 1997). Im Embryo werden Gliazellen verschiedener Subtypen im ZNS und auch im PNS generiert und nehmen in der weiteren Entwicklung durch Migration ihre endgültige Position im Nervensystem ein (siehe Übersichtsartikel Jones, 2001). Sie legen dabei wie im Fall der peripheren Glia (PG) (Sepp et al., 2000) oder auch der Retinobasalglia (RBG, Perez und Steller, 1996) sehr große Entfernungen zurück. Während der Entwicklung stellen sie Wegmarken für auswachsende Neurone dar (PG \Rightarrow sensorische Neurone (Sepp und Auld, 2003); RBG \Rightarrow Photorezeptorneurone (Rangarajan et al., 1999)), orientieren sich aber auch selbst an anderen Zellen (PG \Rightarrow Motoneurone (Sepp et al., 2000); RBG \Rightarrow Wingless-positive Neurone (Dearborn und Kunes, 2004)).

Eine Gemeinsamkeit dieser migrierenden Gliazellen sowohl im Embryo als auch im larvalen Gehirn, ist, dass sie alle *Zfh1*-positiv sind. Darüber hinaus zeigen im Embryo die Gliazellen des Neuroblasten NB6-4, aus dem zwei Typen der Cellbodyglia (CBG) hervorgehen (Schmidt et al., 1997), ebenfalls *Zfh1*-Immunoreaktivität, solange sie von ihrem Geburtsort im Kortex des vNS zur Mittellinie wandern. Die Distanz, die sie dabei zurücklegen, beträgt nur einige wenige Zelldurchmesser, aber wie allen anderen migrierenden Gliazellen ist ihnen die Expression von *Zfh1* gemeinsam. In späten Embryonalstadien sind dann nur noch solche Gliazellen *Zfh1*-positiv, welche die Neurone nach außen von der Hämolymphe abtrennen. Leider lassen sich aufgrund der embryonalen Phänotypen von *zfh1*-Funktionsverlustmutanten keine eindeutigen Aussagen über die Funktion von *Zfh1* in Gliazellen treffen. Tatsächlich ist vor allem das Muster der Longitudinalen Glia gestört, die im Wildtyp später *Zfh1*-negativ sind. Deshalb könnte es sich um einen nicht-autonomen Effekt handeln, möglicherweise verursacht durch neuronalen *zfh1*-Verlust. Die Zahl der anderen Gliazellen im Bauchmark und

in der Peripherie ist dagegen unauffällig und inwieweit ihre Funktion gestört ist, lässt sich mit den verwendeten Analysemethoden nicht sagen. Wegen der gegenseitigen funktionellen Abhängigkeit sind die beobachteten Defekte der Positionierung der peripheren Glia möglicherweise ebenfalls durch das gestörte motoneuronale Projektionsmuster zu erklären. Dies ließe sich experimentell überprüfen, indem man bei *zfh1*-Funktionsverlustmutanten z. B. durch *repo*-Gal4 (Sepp et al., 2001) *zfh1* spezifisch in Gliazellen überexprimieren würde und testet, ob sich die beobachteten Phänotypen retten lassen. Umgekehrt weiß man, dass der motoneuronale Phänotyp unabhängig von der glialen *zfh1*-Funktion ist (Layden et al., 2006). Für die Analyse der glialen Funktion von *zfh1* ist es daher unabdingbar, durch z. B. klonale Analysen oder weitere RNAi-Techniken den zellautonomen Effekt auf Gliazellen zu untersuchen. Die in dieser Arbeit erstmalig vorgenommene Charakterisierung des neuronalen *zfh1*-Expressionsusters liefert verschiedene experimentelle Zugänge, die solche Analysen sowohl im Embryo als auch in der Larve erlauben würden (z. B. MARCM-Analyse der Migration der Retinobasalgia unter Verwendung von *omb*-Gal4 als zellspezifische Treiberlinie).

Neben den Gliazellen findet sich eine Reihe weiterer migrierender Zellen, v. a. in mesodermalen Geweben, die Zfh1-positiv sind (Perikardzellen (Su et al., 1999); Gonadenmesoderm (Broihier et al., 1998); Muskelvorläuferzellen (Lai et al., 1991)). Veränderungen der Dosis an Zfh1 haben drastische Auswirkungen auf die Differenzierung dieser Gewebe, wie ich am Beispiel der embryonalen Myogenese zeigen konnte. Bei Vertebraten exprimiert eine wichtige Population migrierender Zellen, die cranialen Neuralleistenzellen, das *zfh1*-homologe SIP-1 (Van de Putte et al., 2003) und es wurde nachgewiesen, dass der Verlust von SIP-1 dazu führt, dass diese Zellen zwar korrekt spezifiziert werden, dass sie aber die Region ihres Ursprungsortes nicht verlassen können. Als ursächlich wird hier die ektopische Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin angesehen, welches bei Vertebraten als direktes Zielgen von SIP-1 identifiziert worden ist (Comijn et al., 2001; Stemmler et al., 2003). Das Abschalten von E-Cadherin ist ein wichtiger Schritt

während der so genannten epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) (Rosivatz et al., 2002), die es diesen Zellen ermöglicht, den epithelialen Zellverband verlassen können. Einblicke in die Funktion von Zfh1/SIP-1 sind somit auch relevant für die Tumorforschung (Rosivatz et al., 2004; Vandewalle et al., 2005), stellt die EMT doch einen entscheidenden Schritt für die Metastasierung von Tumoren dar. Man weiß nicht, ob Zfh1 auch bei *Drosophila* an der Regulation von E-Cadherin mitwirkt. Für die Entwicklung der Keimzellen und des gonadalen Mesoderms sind sowohl E-Cadherin als auch Zfh1 notwendig (Broihier et al., 1998; Van Doren et al., 2003), aber ob diese Beziehung auch im neuralen Kontext eine Rolle spielt, ist nicht klar.

4.3.2. Die Entwicklung und Funktion von Motoneuronen ist abhängig von Zfh1

Das Hauptziel dieser Arbeit lag darin, die Funktion von Zinkfinger-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren in sich differenzierenden neuralen Zellen zu analysieren. Mit der Beobachtung, dass Zfh1 im Embryo in vielen durch morphologische Kriterien ansprechbaren Motoneuronen exprimiert wird (Lai et al., 1991), eröffnete sich die Möglichkeit, die Rolle von *zfh1* an einer gut charakterisierten und experimentell zugänglichen Population von Neuronen zu untersuchen. Die während der frühen Differenzierung ablaufenden morphogenetischen Prozesse müssen sowohl zur Ausprägung motoneuronaler Merkmale (axonales Wachstum aus dem ZNS zur Muskulatur hin, Innervierung über neuromuskuläre Verbindungen und Ausschüttung der adäquaten Neurotransmitter), als auch individueller Merkmale führen (Projektionsmuster, Innervierung der richtigen Muskeln). Wie diese Prozesse trotz der vielfältigen Herkunft der Motoneurone (36 Motoneurone aus 15 Neuroblasten, siehe u. a. Landgraf et al., 1997) in ein gemeinsames motoneuronales Schicksal münden, ist nicht klar. Man kennt eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die für das individuelle Projektionsmuster eines Motoneurons eine Rolle spielen (Certel und Thor, 2004; Landgraf et al., 1999; Thor et

al., 1999), wie auch die Abhängigkeit von Signaltransduktionswegen und deren Integration (Crowner et al., 2003; Desai et al., 1996; Fambrough und Goodman, 1996; Furrer et al., 2003; Keleman und Dickson, 2001) oder die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle (Chiba et al., 1995; Davis et al., 1996; Fambrough und Goodman, 1996). Eine Schlüsselfrage der Neuroentwicklungsbiologie ist daher, wie diese Komponenten auf der Ebene der Genregulation orchestriert werden. Unter diesem Blickwinkel ist die panmotoneuronale Expression von *zfh1* besonders interessant, weil dieser Faktor für solche gemeinsamen Merkmale notwendig sein könnte. Durch meine Analysen an diesem Gen konnte ich feststellen, das *zfh1* mindestens zwei Funktionen hat: eine frühe, für das Auswachsen notwendige Funktion, und eine späte Funktion bei der Regulation des Wachstums neuromuskulärer Verbindungen.

4.3.2.1. Zfh1 wird für das Auswachsen von Motoneuronen benötigt

Einer der ersten morphogenetischen Prozesse während der neuronalen Differenzierung ist das Auswachsen der Axone entlang bestimmter Wegmarken in die jeweilige Zielregion. Interneurone und Motoneurone projizieren ipsi- oder kontralateral, d. h. auch über die Mittellinie hinweg (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Dabei wird von der Mittellinie sekretiertes Slit-Protein vom Wachstumskegel des Neurons über Robo-Rezeptoren wahrgenommen (Keleman et al., 2002; Rajagopalan et al., 2000; Sun et al., 2000b) und je nach Identität kreuzt die Zelle die Mittellinie oder nicht. Im Unterschied zu Interneuronen projizieren Motoneurone zusätzlich aber aus dem ZNS heraus und innervieren dort spezifisch einen (oder mehrere) Muskeln. Obwohl es eine Reihe von Hinweisen gibt, welche Mechanismen für das axonale Auswachsen in Richtung Muskulatur notwendig sein könnten (möglicherweise Netrin-Perzeption durch Unc-5, Keleman und Dickson, 2001), ist die eigentliche Ursache für dieses Verhalten bei *Drosophila* noch nicht identifiziert. Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten (Layden et al., 2006) deuten stark darauf hin, dass *Zfh1* an der Regulation motoneuronalen Auswachsens beteiligt ist. Bei

Funktionsverlustmutanten des Transkriptionsfaktors *Nkx6* konnte ein Ausfall ventral projizierender Neurone beobachtet werden (Broihier et al., 2004), sodass *Zfh1* und *Nkx6* bei *Drosophila* damit die einzigen bislang bekannten Transkriptionsfaktoren sind, bei deren Ausfall Motoneurone das ZNS z. T. nicht mehr verlassen können. Durch MARCM-Analysen konnte ich nun zusätzlich für *zfh1* nachweisen, dass auch einige dorsale Motoneurone häufiger fehlen. Auf Einzelzellebene zeigen bis auf aCC und die U-Neurone alle Motoneurone prinzipiell Ausfälle. Das aCC-Neuron ("anterior corner cell", Goodman et al., 1982) und die U- (oder auch CQ-) Neurone gehören zu den Pioniermotoneuronen, die für die axonale Wegfindung nachfolgender Motoneurone notwendig sind (Sanchez-Soriano und Prokop, 2005). Die Expression von *Zfh1* ist in diesen Motoneuronen relativ schwach, sodass sich der Verlust von *zfh1* möglicherweise weniger drastisch bemerkbar macht als bei stärker *Zfh1*-positiven Neuronen (z. B. RP2) und damit, dass in Pionierneuronen *Zfh1* weniger für das Auswachsen benötigt wird als in den nachfolgenden Motoneuronen. Worin liegt nun die Ursache für das fehlende Auswachsen der Motoneurone? Die Möglichkeit, dass durch *zfh1*-Mutation falsch spezifizierte Motoneurone andere Muskeln innervieren, müsste sich in einer Veränderung der Häufigkeit von MARCM-Klonen bemerkbar machen, und manche Muskeln müssten mehrfache Innervierung zeigen. Beides konnte ich nicht beobachten. Es kommt auch nicht zu einer Häufung programmierten Zelltods in *zfh1*-Mutanten (A. Rogulja-Ortmann, pers. Mitteilung), d. h. die Projektionen von Motoneuronen werden entweder gar nicht ausgebildet oder verbleiben innerhalb des Bauchmarks. Layden et al. (2006) konnten in *zfh1*-Mutanten durch Markierung spezifischer Motoneurongruppen zeigen, dass diese in vielen Fällen tatsächlich im ZNS in Richtung Peripherie wachsen, es dann aber nicht schaffen, das ZNS zu verlassen. Initial wandern die Wachstumskegel dieser Motoneurone offensichtlich in die korrekte Richtung, hören dann allerdings mit dem axonalen Wachstum auf. Darüber hinaus konnte ich viele Fälle finden, bei denen Motoneurone trotz fehlender *Zfh1*-Funktion in der Peripherie die korrekten Muskeln innervieren. Es ist daher wahrscheinlich, dass *Zfh1* parallel zu oder in

Kombination mit anderen, spezifischen Faktoren wirkt. So spezifizieren z. B. die Transkriptionsfaktoren *Even-skipped* und *Grain* zusammen mit *Zfh1* Aspekte des dorsal projizierenden aCC-Motoneurons (Garces und Thor, 2006). Sie konnten zeigen, dass der Verlust von *grain*-Funktion teilweise durch ektopisches *Zfh1* gerettet werden kann. Ebenfalls für parallele Mechanismen spricht die Beobachtung, dass durch Überexpression von *Eve* und *Grain* ein ähnlicher Phänotyp wie durch Überexpression von *Zfh1* erzeugt werden kann. Für die Identität ventraler Motoneurone gilt, dass sie durch die Transkriptionsfaktoren *Nkx6* und *Hb9* spezifiziert werden (Broihier et al., 2004), und *Nkx6* notwendig für deren axonales Auswachsen ist. Auch hier käme *zfh1* eine parallele Funktion zu, weil auch bei Verlust von *zfh1* ventrale Motoneurone prinzipiell auswachsen können. Die molekularen Ursachen für diese Phänotypen könnten in einer Fehlspezifizierung von Motoneuronen liegen, die nun eine „interneuronal“ Identität haben und daher im ZNS verbleiben. Weil aber während der axonalen Wegfindung des Motoneurons eine Vielzahl von morphogenetischen Prozessen ablaufen und eine Vielzahl von Signalwegen und Zelladhäsionsmolekülen involviert sind, ist der Phänotyp sicherlich komplexerer Natur. Erst mit der Identifikation von Zielgenen von *Zfh1* könnte man hier weitere Einblicke erhalten und damit neue Erkenntnisse der frühen morphogenetischen Abläufe während der frühen Entwicklung von Motoneuronen.

4.3.2.2. *Zfh1* ist beteiligt an der transkriptionellen Regulation neuromuskulärer Verbindungen

Die motoneuronale Entwicklung endet allerdings nicht mit der Innervierung der Muskulatur am Ende der Embryogenese, sondern bleibt auch während der larvalen Entwicklung zugänglich für morphologische Veränderungen. Motorendplatten müssen sich während der gesamten Larvalentwicklung an das Größenwachstum der Muskulatur und die damit verbundene geringere Erregbarkeit anpassen (synaptische Homöostase, Davis und Goodman, 1998). Der Muskel signalisiert dem Motoneuron eine zu geringe Innervierung durch ein retrogrades Signal (Aberle et al., 2002;

Haghighi et al., 2003; Marques et al., 2002), und das Motoneuron antwortet darauf, indem es die Menge an Neurotransmitter oder die Zahl an Synapsen und Boutons erhöht. Obwohl man über den molekularen Aufbau neuromuskulärer Verbindungen bei *Drosophila* recht gute Vorstellungen hat (siehe Übersichtsartikel Prokop und Meinertzhagen, 2006) und auch einige Elemente des retrograden Signalwegs kennt (TGF β -Rezeptor, CaMKII), weiß man über die transkriptionelle Regulation von Strukturkomponenten der Synapsen und die Kontrolle des Größenwachstums neuromuskulärer Verbindungen recht wenig. Regulative Einflüsse auf die Zahl und die Stärke der Synapse können genetisch voneinander unterschieden werden: Die Zahl der Synapsen ist genetisch abhängig vom Zelladhäsionsmolekül Fasciclin2 (Schuster et al., 1996a; Schuster et al., 1996b) und dem Transkriptionsfaktor Adf-1 (DeZazzo et al., 2000), wohingegen die Stärke der Synapse und damit verbunden die Veränderung der Transmitterausschüttung vom Transkriptionsfaktor CREB abhängig ist (Davis et al., 1996).

Man weiß von zwei Komponenten von Signaltransduktionswegen, dass sie für diese Veränderungen notwendig sind: die MAP-Kinase JNK und der TGF β -Rezeptor Wishful-thinking (Wit). JNK und Wit wirken unterschiedlich auf die Struktur und Funktion von Synapsen, und es ist nicht klar, durch welche Faktoren sie die Genexpression synaptischer Komponenten regulieren. Durch JNK wird die Aktivität des transkriptionell aktiven Heterodimers aus D-Fos und D-Jun (AP-1, Sanyal et al., 2002) und D-Fos unabhängig von D-Jun (Collins et al., 2006) reguliert, die auf das Wachstum der neuromuskulären Verbindung und auf die Stärke der Synapse Einfluss nehmen. Der TGF β -Signalvermittler Mad wird durch Wit phosphoryliert und damit aktiviert, und kann durch Bindung an das Co-SMAD Medea Zielgene anschalten. Funktionsverlust bzw. Überaktivierung des TGF β -Signalwegs ändern die Morphologie der NMJs und auch die Stärke ihre Synapsen nimmt stark ab bzw. erhöht sich (Rawson et al., 2003).

Mit Zfh1 konnte ich nun einen weiteren Transkriptionsfaktor identifizieren, der für das Größenwachstum von neuromuskulären Verbindungen notwendig ist bzw.

durch Überexpression zur Vergrößerung dieser führt. Ich konnte zeigen, dass die Größe der neuromuskulären Verbindung auch von der Menge an Zfh1-Protein abhängt und dies könnte eine direkte regulatorische Bedeutung haben, da in Motoneuronen Zfh1 unterschiedlich stark exprimiert wird. Im ZNS gehören das RP2-Motoneuron und die drei VUM-Neurone zu den am stärksten Zfh1-positiven Neuronen, und beide innervieren, im Gegensatz zu den meisten anderen Motoneuronen, eine Vielzahl an Muskeln (Hoang und Chiba, 2001; Landgraf et al., 2003b). Darüber hinaus lassen sich nur noch wenige stark Zfh1-positive Neurone ausmachen, und ob es sich dabei um die verbleibenden, mehrere Muskeln innervierenden Typ-Is Motoneurone handelt, kann man aufgrund fehlender Marker momentan nicht sagen. Diese Beziehung der Zfh1-Dosis zu der Zahl innervierter Muskeln, und damit auch zur Zahl der Synapsen spricht jedenfalls für einen Einfluss von *zfh1*. Aufgrund dieser Beobachtung und der beschriebenen Phänotypen ist es daher wahrscheinlich, dass Zfh1 eine wichtige Funktion bei der Anpassung der neuromuskulären Verbindungen an das larvale Wachstum hat.

Ist Zfh1 hierbei Teil eines retrograden Signalwegs, und wirkt es in einem oder mehreren solcher mit? Bei Vertebraten konnte gezeigt werden, dass die *zfh1*-Homologen δ EF-1 und SIP-1 an phosphoryliertes SMAD-Protein binden können, und somit einen Teil der Spezifität des TGF β -Signalwegs vermitteln (Nishimura et al., 2006; Postigo, 2003; Postigo et al., 2003). Wegen der beschriebenen funktionellen Konservierung von Zfh1/SIP-1 (Liu et al., 2006) und auch wegen der Korrelation von Zfh1-Expression und kernständigem pMad und Medea spricht einiges dafür, dass bei *Drosophila* Zfh1 ebenfalls Teil des TGF β -Signalwegs ist. Dagegen spricht zwar, dass sich bei ersten Tests auf genetische Interaktion ein TGF β -Phänotyp durch Reduktion der Dosis an *zfh1* nicht verstärken ließ, ein solcher Effekt könnte jedoch durch die Stärke des beobachteten TGF β -Phänotyps maskiert worden sein. Mutanten des TGF β -Rezeptors *wishful-thinking* (*wit*) haben sehr stark verkleinerte neuromuskuläre Verbindungen, sodass die Funktion des TGF β -Signalwegs möglicherweise für die generelle Synaptogenese notwendig ist. *wit* wäre deshalb

epistatisch über *zfh1* und es wäre für die initiale Größe der NMJ gleichgültig, ob *Zfh1* vorhanden ist oder nicht. Andere Experimente zum Test genetischer Interaktion scheiterten bislang aufgrund der Letalität der Transheterozygoten, wodurch sich kein Stamm etablieren ließ. Tatsächlich spricht dies sogar für eine Interaktion zwischen *Zfh1* und TGF β , der experimentelle Beweis steht bislang aber aus. Es sind daher weitere Versuche zum Test genetischer Interaktion notwendig. Beispielsweise wären weitere transheterozygote Kombinationen von Mutanten des TGF β -Signalwegs und *zfh1*-Allelen denkbar, und bei Wahl geeigneter Allele wahrscheinlich auch durchführbar.

Weil es sich bei der neuromuskulären Verbindung um eine hervorragend charakterisierte „Modellsynapse“ handelt, bietet sie zudem vielfältige Möglichkeiten, genetische Interaktion von *zfh1* und anderen Komponenten, z. B. weiteren Signaltransduktionswegen wie des JNK-Signalwegs oder auch strukturellen Komponenten, die für das neuromuskuläre Wachstum notwendig sind, durch morphologische oder elektrophysiologische Analysen zu überprüfen. Bei gegebener genetischer Interaktion würden sich neuromuskuläre Phänotypen aufzeigen oder verstärken lassen, und somit mögliche Zielgene von *Zfh1* ausmachen.

Diese Experimente ließen sich sehr gut komplementieren, indem man durch eine Reihe von Techniken die Zielgene von *Zfh1* zu identifizieren versucht ("whole genome tiling arrays", Biemar et al., 2006; "DamID-Technik", Choksi et al., 2006; "ChIP-on-chip", Negre et al., 2006) und diese mit den bekannten, für die Entwicklung der neuromuskulären Verbindung notwendigen Genen abgleicht (Prokop und Meinertzhagen, 2006).

4.3.3. Die Aufrechterhaltung der larvalen Expression des Neuropeptids FMRFa ist von *Zfh1* abhängig

Neben der Regulation der Größe von neuromuskulären Verbindungen während der larvalen Entwicklung scheint auch die Expression bestimmter Neuropeptide von *zfh1*

abhängig zu sein. Hierbei handelt es sich um in neuronalen Geweben hergestellte Peptide, die sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. Sie haben in der Regel modulierende Funktion und werden entweder direkt an der Synapse ausgeschüttet oder in den Blut- oder Hämolymphekreislauf entlassen, wo sie eine hormonelle Wirkung entfalten. Bei *Drosophila* gibt es eine Vielzahl an Neuropeptiden, die jeweils charakteristische Expressionmuster im Gehirn und auch im vNS zeigen (siehe Übersichtsartikel Nassel, 2002). Wie diese Vielfalt transkriptionell reguliert wird, konnte beispielhaft durch die Analysen der Regulation des Neuropeptid-Gens *fmrfamid* gezeigt werden (Allan et al., 2005; Allan et al., 2003; Benveniste et al., 1998; Hewes et al., 2003; Marques et al., 2003; Miguel-Aliaga et al., 2004). *fmrfamid* wird in einer kleinen Zahl von Neuronen exprimiert und kodiert für ein Propeptid, aus welchem mehrere Peptide enzymatisch abgespalten und nachfolgend amidiert werden (Schneider und Taghert, 1988). Besonders starke FMRFa-Immunoreaktivität zeigen die im Thorax lokalisierten Tv-Neurone, die zu einer Zellgruppe gehören, welche das LIM-Homöodomänenprotein Apterous exprimiert (Ap-Cluster, Lundgren et al., 1995) und das dorsal vom vNS gelegene Neurohämalorgan innervieren. Apterous reguliert in Kombination mit den Transkriptionsfaktoren Dachshund, Squeeze und Eyes-Absent (Eya) die Expression von FMRFa, zudem wird ein vom Neurohämalorgan sekretiertes TGF β -Signal benötigt. Diese Kombinatorik reicht aus, um auch in anderen Zellen ektopisch FMRFa zu exprimieren (Allan et al., 2005; Miguel-Aliaga et al., 2004). Inwieweit diese Kombinatorik auch für die larvale Expression von FMRFa notwendig ist, die im Laufe der Entwicklung stark zunimmt, wurde jedoch nicht beleuchtet.

Mit *Zfh1* habe ich einen weiteren Faktor identifizieren können, der hier eine Rolle spielen könnte. Die Funktion von *Zfh1* ist notwendig, aber alleine nicht ausreichend für die larvale Expression von FMRFa. Diese Regulation ist sehr wahrscheinlich direkter Natur, da ein *fmrfa*-Enhancerkonstrukt (PWF^{E17}) eine zur *Zfh1*-Bindestelle identische und auch funktionelle Bindestelle aufweist (Benveniste et al., 1998; Su et al., 1999), und dieses Enhancerkonstrukt ebenfalls von *zfh1* abhängig ist. Damit

handelt es sich bei *fmrfa* um das erste identifizierte direkte neurale Zielgen von Zfh1. Weil es sich bei der identifizierten Bindestelle um eine Homöodomänenbindestelle handelt, bekommt sie wegen der Art und Weise, wie Zfh1-Proteine an DNA binden, zusätzliche Bedeutung. Verschiedene Arbeitsgruppen haben experimentelle Daten geliefert, dass Zfh1-Proteine mit den beiden Zinkfingergruppen an so genannte E-Boxen binden (Clark und Chiu, 2003; Ikeda und Kawakami, 1995; Remacle et al., 1999; Verschueren et al., 1999), bzw. die Homöodomäne die eigentliche DNA-bindende Domäne darstellt (Fortini et al., 1991; Su et al., 1999). Dabei handelt es sich wahrscheinlich nicht um Unterschiede zwischen den Organismengruppen, denn das Zfh1-homologe SIP-1 aus Vertebraten ist auch in *Drosophila* funktional (Liu et al., 2006). Möglicherweise sind aber auch beide DNA-Bindedomänen verwendbar, und es hängt vom jeweiligen Zielgen oder Kontext ab, auf welche Art und Weise die Interaktion mit der DNA geschieht. Durch die Identifizierung von *fmrfa* als Zielgen von Zfh1 sind nun weitergehende mechanistische Analysen möglich.

Weil einzelne Teile des kombinatorischen Codes aus Apterous, Squeeze oder Dachshund nicht in der Lage sind, die starke wildtypische FMRFa-Expression zu erzeugen, ist es möglich, dass alle zum kombinatorischen Code gehörenden Faktoren für eine starke Expression notwendig sind. Es wäre aber auch denkbar, dass Zfh1 an der Übersetzung des TGF β -Signals beteiligt ist und synergistisch mit dem Code agiert. In jedem Fall wäre Zfh1 dann eine weitere notwendige Komponente. Dafür spricht, dass die Überexpression von Dachshund und aktiviertem TGF β -Rezeptor mit *apterous-Gal4* nicht in allen Apterous-positiven Neuronen zur ektopischen FMRFa-Expression führt (Miguel-Aliaga et al., 2004). Bei diesen nicht-induzierbaren Neuronen handelt es sich um die vAp-Neurone, von denen ich hier zeigen konnte, dass sie Zfh1-negativ sind. Koexpression von Dachshund, aktiviertem TGF β -Rezeptor und Zfh1 müssten dann zur ektopischen Expression von FMRFa in allen Apterous-positiven Neuronen führen, sofern die Zfh1-Dosis dem nicht

entgegenwirkt, so wie ich es für die Tv-Neurone beobachten konnte. Wegen der Abhängigkeit von FMRFa vom TGF β -Signal wären außerdem weitere Experimente zur genetischen Interaktion von *zfh1* und TGF β in diesem zellulären Kontext denkbar.

Die Bedeutung von *Zfh1* für die neuronale Entwicklung sowohl von Motoneuronen als auch für neuropeptiderge Neurone zeigt, dass für den Differenzierungsprozess dieser Zellen nicht nur die Funktion früher Determinanten, sondern eben auch postmitotisch exprimierte Transkriptionsfaktoren notwendig sind. Ihre Expression stellt einen ebensolchen Aspekt der Differenzierung dar, wie die Transkription von Signal- oder Strukturproteinen, die für morphogenetische Prozesse und die Funktion des Neurons notwendig sind. Ihre Rolle kann dabei vielgestaltiger Natur sein und während verschiedener Entwicklungsstadien unterschiedliche Bedeutung für die Zelle haben. Durch die Identifikation derjenigen Gene, die von *zfh1* und *zfh2* reguliert werden, muss es daher möglich sein, neue Einblicke in die Orchestrierung neuraler und glialer Differenzierungsprozesse zu erhalten.

4.4. Die MARCM-Technik kann für die klonale Analyse mutanter Motoneurone verwendet werden

Die abdominalen Motoneurone der *Drosophila*-Larve stellen wegen ihrer experimentellen Zugänglichkeit ideale „Modellneurone“ dar, um eine Vielzahl von Aspekten der Neurogenese in vivo analysieren zu können. Im Embryo lassen sich Erkenntnisse über die morphogenetischen Grundlagen axonalen Wachstums und am Beispiel der Bildung neuromuskulärer Verbindungen auch über Mechanismen der Synaptogenese gewinnen. Im Verlauf der larvalen Entwicklung werden sowohl die Größe dieser neuromuskulären Verbindungen dem Muskelwachstum als auch die Stärke der Synapse in Abhängigkeit von der Aktivität des Muskels angepasst (synaptische Plastizität). Für die Untersuchung dieser Vorgänge kann auf eine große Bandbreite genetischer, histologischer und neurophysiologischer Methoden zurückgegriffen

werden. Besonders die Verfügbarkeit einer großen Zahl von Mutanten erlaubt die gezielte funktionelle Analyse neuraler Zielgene, und mit der Einführung fluoreszenzgekoppelter Markerproteine für die phänotypische Analyse massenhaft erzeugter Mutanten („Screening“) hat man eine Vielzahl neuer Komponenten identifizieren können. Dies alles unterstreicht die besondere Stellung von *Drosophila* als Modellorganismus für die Neuroentwicklungsbiologie.

Trotz des im Vergleich zu den neuronalen Strukturen z. B. des Bauchmarks oder der olfaktorischen Loben einfachen Aufbaus des Motorapparates ist es auch hier wünschenswert, die experimentelle Auflösung auf Einzelzellniveau zu steigern. Die Komplexität des Nervensystems und der nicht zu unterschätzende Einfluss nicht-neuraler Gewebe auf dessen korrekte Entwicklung lassen gerade bei der Analyse genereller Faktoren Fragen nach der Autonomie phänotypischer Effekte aufkommen. Um solche Effekte auf eine kleinere Population von Zellen zu beschränken, kann man genetische Mosaik erzeugen, und mit der Einführung der MARCM-Technik lassen sich tatsächlich einzelne mutante Neurone erzeugen und analysieren. Trotz der generellen neuronalen Anwendbarkeit wurde diese Technik vor allem erfolgreich in postlarvalen Strukturen z. B. des olfaktorischen Apparates eingesetzt (Luo, 2007). Dies kann an der geringen Ausbeute an neuronalen Klonen in Larvenstadien, also zu niedriger Rekombinationshäufigkeit gelegen haben, wie ich es ebenfalls beobachten konnte. Durch die Verwendung einer effizienteren Hitzeschock-Flippase konnte ich die Effizienz deutlich steigern, sodass es damit erstmals möglich geworden ist, einzelne mutante Motoneurone in experimentellem Maßstab zu erzeugen und unabhängig von nichtautonomen Effekten analysieren zu können.

Wie ich außerdem feststellen konnte, lassen sich die Phänotypen von *zfh1*-mutanten Embryonen auch in MARCM-Klonen vollständig wieder finden. Sowohl der embryonale Auswachsungsphänotyp, d. h. die reduzierte Anzahl von aus dem ZNS

herausprojizierenden Motoneuronen als auch die veränderte Größe der neuromuskulären Verbindung konnten qualitativ gezeigt werden. Darüber hinaus ließen sich aber auch quantitative Aussagen über das Fehlen bestimmter Motoneurone treffen, was bei Verwendung von Markern für ganze Gruppen von Motoneuronen wie z. B. Fasciclin2 nicht gelingen konnte. Zudem habe ich den von der Muskulatur unabhängigen Einfluss von Zfh1 auf die Anzahl der Boutons neuromuskulärer Verbindungen nachweisen können, was ohne die MARCM-Technik nur schwierig oder wegen negativer Nebeneffekte gar nicht möglich gewesen wäre (Re-Expression von Zfh1 in Motoneuronen oder der Muskulatur in ansonsten mutantem Hintergrund). Die Fluoreszenzmarkierung von Motoneuronen klonalen Ursprungs eröffnet außerdem weitere experimentelle Möglichkeiten. So kann man die Maus-CD8::GFP-positiven Motoneurone und die von ihnen innervierten Muskeln auch elektrophysiologisch untersuchen, und auch die Selektion mutanter NMJs für die elektronenmikroskopische Analyse wäre leicht durchführbar. Ich konnte dies im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr weiterverfolgen.

5. Zusammenfassung

Ich habe in dieser Arbeit das Expressionmuster der beiden im Nervensystem von *Drosophila* exprimierten Zinkfinger-Homöodomänentranskriptionsfaktoren *zfh1* und *zfh2* genauer charakterisiert und analysiert, ob Funktionsverlustmutanten neurale Phänotypen aufweisen. Aufgrund der Beobachtungen, dass bei Vertebraten *zfh2*-Gene alternativem Spleißen unterliegen (Miura et al., 1995), habe ich außerdem die Transkripte des *Drosophila zfh2*-Gens molekular charakterisiert. So konnte ich eine Vielzahl von Spleißformen identifizieren, welche das regulatorische Potential von Zfh2 enorm erweitern würden. Um Überexpressionsexperimente durchzuführen, habe ich erstmalig die cDNA des längsten *zfh2*-Transkriptes kloniert. Allerdings haben die Größe des *zfh2*-Gens und die viertchromosomale Lokalisation die Durchführung von Überexpressionsexperimenten und die genetische Analyse von *zfh2* und damit den experimentellen Test genetischer Interaktion erschwert, sodass ich für *zfh2* keine über die Beschreibung der Phänotypen hinausgehenden Erkenntnisse erlangen konnte.

Bei früheren Analysen der Funktion von *zfh1* wurde der Schwerpunkt auf seine Rolle während der Entwicklung mesodermaler Gewebe gelegt (Broihier et al., 1998; Lai et al., 1993; Su et al., 1999), weshalb zu Beginn meiner Arbeiten über seine neurale Funktion nichts bekannt war. Durch meine Analysen von *zfh1* Mutanten konnte ich zeigen, dass *zfh1* sowohl notwendig ist für die embryonale Entwicklung von Motoneuronen, als auch das larvale Wachstum motoneuronaler Endplatten reguliert. Wegen weit reichender pleiotroper Effekte, die *zfh1* Funktionsverlustmutanten haben, war es notwendig, neben dem Einsatz hypomorpher Allele auf die Analyse genetischer Mosaiketechniken auszuweichen. Die als MARCM-Technik (Lee und Luo, 1999) bezeichnete Methode habe ich durch die Verwendung einer effizienteren FLP-Rekombinase modifiziert und in dieser Arbeit erstmals für die Analyse mutanter

larvaler Motoneurone eingesetzt. Weitergehend konnte ich zeigen, dass Zfh1 notwendig ist für die larvale Expression des Neuropeptides FMRFamid. Anhand von Sequenzvergleichen und durch Verwendung eines *fmrfamid*-Promoterkonstruktes (Benveniste et al., 1998) konnte ich Hinweise dafür sammeln, dass die Zfh1-abhängige Regulation sehr wahrscheinlich direkter Natur ist. Damit handelt es sich bei *fmrfamid* um das erste identifizierte neurale Zielgen von Zfh1, an dem sich zudem modellhaft der molekulare Wirkmechanismus von Zfh1 erforschen lässt.

6. Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Haghghi, A. P., Fetter, R. D., McCabe, B. D., Magalhaes, T. R. und Goodman, C. S.** (2002). wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **33**, 545-58.
- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. und Steller, H.** (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
- Affolter, M., Marty, T., Vigano, M. A. und Jazwinska, A.** (2001). Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *Embo J* **20**, 3298-305.
- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. und Hotta, Y.** (1998). Alteration of cell fate by ectopic expression of *Drosophila* glial cells missing in non-neural cells. *Dev Genes Evol* **208**, 578-85.
- Alberts, B.** (2002). Molecular biology of the cell. New York: Garland Science.
- Allan, D. W., Park, D., St Pierre, S. E., Taghert, P. H. und Thor, S.** (2005). Regulators acting in combinatorial codes also act independently in single differentiating neurons. *Neuron* **45**, 689-700.
- Allan, D. W., St Pierre, S. E., Miguel-Aliaga, I. und Thor, S.** (2003). Specification of neuropeptide cell identity by the integration of retrograde BMP signaling und a combinatorial transcription factor code. *Cell* **113**, 73-86.
- Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D. und Technau, G. M.** (2006). Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Biol* **296**, 545-60.
- Anderson, M. S., Halpern, M. E. und Keshishian, H.** (1988). Identification of the neuropeptide transmitter proctolin in *Drosophila* larvae: characterization of muscle fiber-specific neuromuscular endings. *J Neurosci* **8**, 242-55.
- Bantignies, F., Goodman, R. H. und Smolik, S. M.** (2000). Functional interaction between the coactivator *Drosophila* CREB-binding protein und ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers. *Mol Cell Biol* **20**, 9317-30.
- Bello, B. C., Hirth, F. und Gould, A. P.** (2003). A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron* **37**, 209-19.
- Benveniste, R. J. und Taghert, P. H.** (1999). Cell type-specific regulatory sequences control expression of the *Drosophila* FMRF-NH2 neuropeptide gene. *J Neurobiol* **38**, 507-20.
- Benveniste, R. J., Thor, S., Thomas, J. B. und Taghert, P. H.** (1998). Cell type-specific regulation of the *Drosophila* FMRF-NH2 neuropeptide gene by Apterous, a LIM homeodomain transcription factor. *Development* **125**, 4757-65.
- Bergman, C. M., Pfeiffer, B. D., Rincon-Limas, D. E., Hoskins, R. A., Gnirke, A., Mungall, C. J., Wang, A. M., Kronmiller, B., Pacleb, J., Park, S. et al.** (2002). Assessing the impact of comparative genomic sequence data on the functional annotation of the *Drosophila* genome. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0086.

- Bernardoni, R., Miller, A. A. und Giangrande, A.** (1998). Glial differentiation does not require a neural ground state. *Development* **125**, 3189-200.
- Biemar, F., Nix, D. A., Piel, J., Peterson, B., Ronshaugen, M., Sementchenko, V., Bell, I., Manak, J. R. und Levine, M. S.** (2006). Comprehensive identification of *Drosophila* dorsal-ventral patterning genes using a whole-genome tiling array. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12763-8.
- Blencowe, B. J.** (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37-47.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. und Technau, G. M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41-64.
- Brand, A. H., Manoukian, A. S. und Perrimon, N.** (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol* **44**, 635-54.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates und generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Braun, A., Lemaitre, B., Lanot, R., Zachary, D. und Meister, M.** (1997). *Drosophila* immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap. *Genetics* **147**, 623-34.
- Broadie, K. S. und Bate, M.** (1993). Development of the embryonic neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* **13**, 144-66.
- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. und Doe, C. Q.** (1995). New neuroblast markers und the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **53**, 393-402.
- Brody, T., Stivers, C., Nagle, J. und Odenwald, W. F.** (2002). Identification of novel *Drosophila* neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen. *Mech Dev* **113**, 41-59.
- Broihier, H. T., Kuzin, A., Zhu, Y., Odenwald, W. und Skeath, J. B.** (2004). *Drosophila* homeodomain protein Nkx6 coordinates motoneuron subtype identity und axonogenesis. *Development* **131**, 5233-42.
- Broihier, H. T., Moore, L. A., Van Doren, M., Newman, S. und Lehmann, R.** (1998). *zfh-1* is required for germ cell migration und gonadal mesoderm development in *Drosophila*. *Development* **125**, 655-66.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. und Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.
- Cantera, R., Luer, K., Rusten, T. E., Barrio, R., Kafatos, F. C. und Technau, G. M.** (2002). Mutations in *spalt* cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **129**, 5577-86.
- Cantera, R. und Nassel, D. R.** (1992). Segmental peptidergic innervation of abdominal targets in larval und adult dipteran insects revealed with an antiserum against leucokinin I. *Cell Tissue Res* **269**, 459-71.
- Certel, S. J. und Thor, S.** (2004). Specification of *Drosophila* motoneuron identity by the combinatorial action of POU und LIM-HD factors. *Development* **131**, 5429-39.

- Chen, B. E., Kondo, M., Garnier, A., Watson, F. L., Puettmann-Holgado, R., Lamar, D. R. und Schmucker, D.** (2006). The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell* **125**, 607-20.
- Chiba, A., Snow, P., Keshishian, H. und Hotta, Y.** (1995). Fasciclin III as a synaptic target recognition molecule in *Drosophila*. *Nature* **374**, 166-8.
- Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E., van Steensel, B., Micklem, G. und Brand, A. H.** (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal und differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* **11**, 775-89.
- Chu, H., Parras, C., White, K. und Jimenez, F.** (1998). Formation und specification of ventral neuroblasts is controlled by vnd in *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* **12**, 3613-24.
- Clark, S. G. und Chiu, C.** (2003). *C. elegans* ZAG-1, a Zn-finger-homeodomain protein, regulates axonal development und neuronal differentiation. *Development* **130**, 3781-94.
- Cleary, M. D. und Doe, C. Q.** (2006). Regulation of neuroblast competence: multiple temporal identity factors specify distinct neuronal fates within a single early competence window. *Genes Dev* **20**, 429-34.
- Collins, C. A., Wairkar, Y. P., Johnson, S. L. und DiAntonio, A.** (2006). Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* **51**, 57-69.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D. und van Roy, F.** (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin und induces invasion. *Mol Cell* **7**, 1267-78.
- Coyle, I. P., Koh, Y. H., Lee, W. C., Slind, J., Fergestad, T., Littleton, J. T. und Ganetzky, B.** (2004). Nervous wreck, an SH3 adaptor protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **41**, 521-34.
- Crowner, D., Le Gall, M., Gates, M. A. und Giniger, E.** (2003). Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway. *Curr Biol* **13**, 967-72.
- Davis, G. W. und Goodman, C. S.** (1998). Genetic analysis of synaptic development und plasticity: homeostatic regulation of synaptic efficacy. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 149-56.
- Davis, G. W., Schuster, C. M. und Goodman, C. S.** (1996). Genetic dissection of structural und functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* **17**, 669-79.
- Dearborn, R., Jr. und Kunes, S.** (2004). An axon scaffold induced by retinal axons directs glia to destinations in the *Drosophila* optic lobe. *Development* **131**, 2291-303.
- Desai, C. J., Gindhart, J. G., Jr., Goldstein, L. S. und Zinn, K.** (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the *Drosophila* embryo. *Cell* **84**, 599-609.
- DeZazzo, J., Sandstrom, D., de Belle, S., Velinzon, K., Smith, P., Grady, L., DelVecchio, M., Ramaswami, M. und Tully, T.** (2000). nalyot, a mutation of the

- Drosophila myb-related Adf1 transcription factor, disrupts synapse formation und olfactory memory. *Neuron* **27**, 145-58.
- Dong, J. T.** (2006). Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* **97**, 433-47.
- Ewer, J. und Reynolds, S.** (2002). In *Hormones, Brains und Behavior*, vol. 3 (ed. D. Pfaff A. Arnold M. A. Etgen S. Fahrbach und R. T. Rubin), pp. 1-92: Academic, San Diego.
- Fambrough, D. und 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.
- Fortini, M. E., Lai, Z. C. und Rubin, G. M.** (1991). The Drosophila zfh-1 und zfh-2 genes encode novel proteins containing both zinc-finger und homeodomain motifs. *Mech Dev* **34**, 113-22.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H. und Levine, M.** (1987). Characterization und localization of the even-skipped protein of Drosophila. *Embo J* **6**, 749-59.
- Fujiwara, H., Jindra, M., Newitt, R., Palli, S. R., Hiruma, K. und Riddiford, L. M.** (1995). Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* und the developmental profile of its mRNA in wings. *Insect Biochem Mol Biol* **25**, 845-56.
- Funahashi, J., Sekido, R., Murai, K., Kamachi, Y. und Kondoh, H.** (1993). Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development* **119**, 433-46.
- Furrer, M. P., Kim, S., Wolf, B. und Chiba, A.** (2003). Robo und Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat Neurosci* **6**, 223-30.
- Fyrberg, C., Becker, J., Barthmaier, P., Mahaffey, J. und Fyrberg, E.** (1997). A Drosophila muscle-specific gene related to the mouse quaking locus. *Gene* **197**, 315-23.
- Garces, A. und Thor, S.** (2006). Specification of Drosophila aCC motoneuron identity by a genetic cascade involving even-skipped, grain und zfh1. *Development* **133**, 1445-55.
- Golic, K. G. und Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Goodman, C. S., Raper, J., Ho, R. K. und Chang, S.** (1982). Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. In *Developmental Order: Its Origin und Regulation*, (ed. S. Subtelny und P. B. Green), pp. 275-316. Lissabon, New York.
- Haghighi, A. P., McCabe, B. D., Fetter, R. D., Palmer, J. E., Hom, S. und Goodman, C. S.** (2003). Retrograde control of synaptic transmission by postsynaptic CaMKII at the Drosophila neuromuscular junction. *Neuron* **39**, 255-67.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. und Technau, G. M.** (1995). The homeobox gene repo is required for the differentiation und maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317-32.

- Hewes, R. S., Park, D., Gauthier, S. A., Schaefer, A. M. und Taghert, P. H. (2003). The bHLH protein Dimmed controls neuroendocrine cell differentiation in *Drosophila*. *Development* **130**, 1771-81.
- Hewes, R. S., Snowdeal, E. C., 3rd, Saitoe, M. und Taghert, P. H. (1998). Functional redundancy of FMRamide-related peptides at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Neurosci* **18**, 7138-51.
- Hoang, B. und Chiba, A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev Biol* **229**, 55-70.
- Hoose, W. A., Lahr, E. C. und Ewer, J. (2006). Role of the neuropeptide, crustacean cardioactive peptide (CCAP), in *Drosophila melanogaster* ecdysis. In *A. Dros. Res. Conf.*, (ed. 2006), pp. 630B. Houston: The Genetics Society of America.
- Ikeda, K. und Kawakami, K. (1995). DNA binding through distinct domains of zinc-finger-homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription. *Eur J Biochem* **233**, 73-82.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. und Doe, C. Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* **106**, 511-21.
- Ito, K., Urban, J. und Technau, G. M. (1995). Distribution, classification, und development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic und early larval ventral nerve cord. *Development Genes und Evolution* **204**, 284-307.
- Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1976). L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol* **262**, 215-36.
- Jefferis, G. S., Marin, E. C., Stocker, R. F. und Luo, L. (2001). Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* **414**, 204-8.
- Johansen, J., Halpern, M. E., Johansen, K. M. und Keshishian, H. (1989). Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* **9**, 710-25.
- Jones, B. W. (2001). Glial cell development in the *Drosophila* embryo. *Bioessays* **23**, 877-87.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. und Goodman, C. S. (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**, 1013-23.
- Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M. und Bryant, P. J. (1995). The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase und is required for the control of cell shape und proliferation. *Genes Dev* **9**, 534-46.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. und Odenwald, W. F. (1998). Regulation of POU genes by castor und hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev* **12**, 246-60.
- Kaplan, W. D. und Trout, W. E., 3rd. (1969). The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* **61**, 399-409.
- Kataoka, H., Miura, Y., Joh, T., Seno, K., Tada, T., Tamaoki, T., Nakabayashi, H., Kawaguchi, M., Asai, K., Kato, T. et al. (2001). Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATBF1. *Oncogene* **20**, 869-73.

- Keleman, K. und Dickson, B. J.** (2001). Short- und long-range repulsion by the Drosophila Unc5 netrin receptor. *Neuron* **32**, 605-17.
- Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L. A., Technau, G. M. und Dickson, B. J.** (2002). Comm sorts robo to control axon guidance at the Drosophila midline. *Cell* **110**, 415-27.
- Kelley, R. L. und Kuroda, M. I.** (2003). The Drosophila roX1 RNA gene can overcome silent chromatin by recruiting the male-specific lethal dosage compensation complex. *Genetics* **164**, 565-74.
- Kopp, A., Muskavitch, M. A. und Duncan, I.** (1997). The roles of hedgehog und engrailed in patterning adult abdominal segments of Drosophila. *Development* **124**, 3703-14.
- Lai, Z. C., Fortini, M. E. und Rubin, G. M.** (1991). The embryonic expression patterns of zfh-1 und zfh-2, two Drosophila genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins. *Mech Dev* **34**, 123-34.
- Lai, Z. C., Rushton, E., Bate, M. und Rubin, G. M.** (1993). Loss of function of the Drosophila zfh-1 gene results in abnormal development of mesodermally derived tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4122-6.
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G. M. und Bate, M.** (1997). The origin, location, und projections of the embryonic abdominal motoneurons of Drosophila. *J Neurosci* **17**, 9642-55.
- Landgraf, M., Jeffrey, V., Fujioka, M., Jaynes, J. B. und Bate, M.** (2003a). Embryonic Origins of a Motor System: Motor Dendrites Form a Myotopic Map in Drosophila. *PLoS Biol* **1**, E41.
- Landgraf, M., Roy, S., Prokop, A., VijayRaghavan, K. und Bate, M.** (1999). even-skipped determines the dorsal growth of motor axons in Drosophila. *Neuron* **22**, 43-52.
- Landgraf, M., Sanchez-Soriano, N., Technau, G. M., Urban, J. und Prokop, A.** (2003b). Charting the Drosophila neuropile: a strategy for the standardised characterisation of genetically amenable neurites. *Dev Biol* **260**, 207-25.
- Layden, M. J., Odden, J. P., Schmid, A., Garces, A., Thor, S. und Doe, C. Q.** (2006). Zfh1, a somatic motor neuron transcription factor, regulates axon exit from the CNS. *Dev Biol* **291**, 253-63.
- Lee, T. und Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Lee, T. und Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-4.
- Lewis, B. P., Green, R. E. und Brenner, S. E.** (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing und nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 189-92.
- Li, W. und Gao, F. B.** (2003). Actin filament-stabilizing protein tropomyosin regulates the size of dendritic fields. *J Neurosci* **23**, 6171-5.

- Liu, M., Su, M., Lyons, G. E. und Bodmer, R.** (2006). Functional conservation of zinc-finger homeodomain gene *zfh1/SIP1* in *Drosophila* heart development. *Dev Genes Evol* **216**, 683-93.
- Luan, H., Lemon, W. C., Peabody, N. C., Pohl, J. B., Zelensky, P. K., Wang, D., Nitabach, M. N., Holmes, T. C. und White, B. H.** (2006). Functional dissection of a neuronal network required for cuticle tanning und wing expansion in *Drosophila*. *J Neurosci* **26**, 573-84.
- Lundell, M. J. und Hirsh, J.** (1992). The *zfh-2* gene product is a potential regulator of neuron-specific dopa decarboxylase gene expression in *Drosophila*. *Dev Biol* **154**, 84-94.
- Lundgren, S. E., Callahan, C. A., Thor, S. und Thomas, J. B.** (1995). Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homeodomain gene *apterous*. *Development* **121**, 1769-73.
- Luo, C. W., Dewey, E. M., Sudo, S., Ewer, J., Hsu, S. Y., Honegger, H. W. und Hsueh, A. J.** (2005). Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2820-5.
- Luo, L.** (2007). Fly MARCM und mouse MADM: Genetic methods of labeling und manipulating single neurons. *Brain Res Rev.*
- Luschnig, S., Moussian, B., Krauss, J., Desjeux, I., Perkovic, J. und Nusslein-Volhard, C.** (2004). An F1 genetic screen for maternal-effect mutations affecting embryonic pattern formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 325-42.
- Ma, J. und Ptashne, M.** (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* **50**, 137-42.
- Mahr, A. und Aberle, H.** (2006). The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons und glutamatergic centers in the brain. *Gene Expr Patterns* **6**, 299-309.
- Marques, G., Bao, H., Haerry, T. E., Shimell, M. J., Duchek, P., Zhang, B. und O'Connor, M. B.** (2002). The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology und function. *Neuron* **33**, 529-43.
- Marques, G., Haerry, T. E., Crotty, M. L., Xue, M., Zhang, B. und O'Connor, M. B.** (2003). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development* **130**, 5457-70.
- McCabe, B. D., Hom, S., Aberle, H., Fetter, R. D., Marques, G., Haerry, T. E., Wan, H., O'Connor, M. B., Goodman, C. S. und Haghghi, A. P.** (2004). Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron* **41**, 891-905.
- Mettler, U., Vogler, G. und Urban, J.** (2006). Timing of identity: spatiotemporal regulation of hunchback in neuroblast lineages of *Drosophila* by Seven-up und Prospero. *Development* **133**, 429-37.
- Miguel-Aliaga, I., Allan, D. W. und Thor, S.** (2004). Independent roles of the *dachshund* und *eyes absent* genes in BMP signaling, axon pathfinding und neuronal specification. *Development* **131**, 5837-48.

- Miguel-Aliaga, I. und Thor, S.** (2004). Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Development* **131**, 6093-105.
- Miura, Y., Tam, T., Ido, A., Morinaga, T., Miki, T., Hashimoto, T. und Tamaoki, T.** (1995). Cloning und characterization of an ATBF1 isoform that expresses in a neuronal differentiation-dependent manner. *J Biol Chem* **270**, 26840-8.
- Morinaga, T., Yasuda, H., Hashimoto, T., Higashio, K. und Tamaoki, T.** (1991). A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains und seventeen zinc fingers. *Mol Cell Biol* **11**, 6041-9.
- Mowat, D. R., Wilson, M. J. und Goossens, M.** (2003). Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet* **40**, 305-10.
- Nagel, A. C., Maier, D. und Preiss, A.** (2002). Green fluorescent protein as a convenient und versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **212**, 93-8.
- Nassel, D. R.** (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* und other insects: multiple roles as neuromodulators und neurohormones. *Prog Neurobiol* **68**, 1-84.
- Negre, N., Hennetin, J., Sun, L. V., Lavrov, S., Bellis, M., White, K. P. und Cavalli, G.** (2006). Chromosomal distribution of PcG proteins during *Drosophila* development. *PLoS Biol* **4**, e170.
- Nishimura, G., Manabe, I., Tsushima, K., Fujiu, K., Oishi, Y., Imai, Y., Maemura, K., Miyagishi, M., Higashi, Y., Kondoh, H. et al.** (2006). DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation. *Dev Cell* **11**, 93-104.
- Nogami, S., Ishii, Y., Kawaguchi, M., Sakata, N., Oya, T., Takagawa, K., Kanamori, M., Sabit, H., Obata, T., Kimura, T. et al.** (2005). ZFH4 protein is expressed in many neurons of developing rat brain. *J Comp Neurol* **482**, 33-49.
- Novotny, T., Eiselt, R. und Urban, J.** (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **129**, 1027-36.
- O'Donnell, K. H., Chen, C. T. und Wensink, P. C.** (1994). Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha 1-tubulin gene. *Mol Cell Biol* **14**, 6398-408.
- Packard, M., Koo, E. S., Gorczyca, M., Sharpe, J., Cumberledge, S. und Budnik, V.** (2002). The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- und postsynaptic differentiation. *Cell* **111**, 319-30.
- Park, J. H., Schroeder, A. J., Helfrich-Forster, C., Jackson, F. R. und Ewer, J.** (2003). Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of *Drosophila* causes specific defects in execution und circadian timing of ecdysis behavior. *Development* **130**, 2645-56.
- Patel, N. H., Ball, E. E. und Goodman, C. S.** (1992). Changing role of even-skipped during the evolution of insect pattern formation. *Nature* **357**, 339-42.
- Pearson, B. J. und Doe, C. Q.** (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* **425**, 624-8.

- Perez, S. E. und Steller, H.** (1996). Migration of glial cells into retinal axon target field in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* **30**, 359-73.
- Perrimon, N.** (1998). Creating mosaics in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* **42**, 243-7.
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engstrom, U., Heldin, C. H., Funahashi, K. und ten Dijke, P.** (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett* **434**, 83-7.
- Poeck, B., Hofbauer, A. und Pflugfelder, G. O.** (1993). Expression of the *Drosophila* optomotor-blind gene transcript in neuronal und glial cells of the developing nervous system. *Development* **117**, 1017-29.
- Postigo, A. A.** (2003). Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *Embo J* **22**, 2443-52.
- Postigo, A. A. und Dean, D. C.** (1999). ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6683-8.
- Postigo, A. A. und Dean, D. C.** (2000). Differential expression und function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6391-6.
- Postigo, A. A., Depp, J. L., Taylor, J. J. und Kroll, K. L.** (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators und corepressors by ZEB proteins. *Embo J* **22**, 2453-62.
- Poulson, D. F.** (1950). Histogenesis, organogenesis, und differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. In *Biology of Drosophila.*, (ed. M. Demerec), pp. 168-274. New York: Wiley.
- Prokop, A. und Meinertzhagen, I. A.** (2006). Development und structure of synaptic contacts in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 20-30.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1994). Early tagma-specific commitment of *Drosophila* CNS progenitor NB1-1. *Development* **120**, 2567-78.
- Pym, E. C., Southall, T. D., Mee, C. J., Brand, A. H. und Baines, R. A.** (2006). The homeobox transcription factor Even-skipped regulates acquisition of electrical properties in *Drosophila* neurons. *Neural Develop* **1**, 3.
- Rajagopalan, S., Nicolas, E., Vivancos, V., Berger, J. und Dickson, B. J.** (2000). Crossing the midline: roles und regulation of Robo receptors. *Neuron* **28**, 767-77.
- Rangarajan, R., Gong, Q. und Gaul, U.** (1999). Migration und function of glia in the developing *Drosophila* eye. *Development* **126**, 3285-92.
- Rawson, J. M., Lee, M., Kennedy, E. L. und Selleck, S. B.** (2003). *Drosophila* neuromuscular synapse assembly und function require the TGF-beta type I receptor saxophone und the transcription factor Mad. *J Neurobiol* **55**, 134-50.
- Remacle, J. E., Kraft, H., Lerchner, W., Wuytens, G., Collart, C., Verschuere, K., Smith, J. C. und Huylebroeck, D.** (1999). New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *Embo J* **18**, 5073-84.

- Rosivatz, E., Becker, I., Bamba, M., Schott, C., Diebold, J., Mayr, D., Hofler, H. und Becker, K. F. (2004). Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer* **111**, 711-9.
- Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Luber, B., Busch, R., Hofler, H. und Becker, K. F. (2002). Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, und twist in gastric cancer. *Am J Pathol* **161**, 1881-91.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. et al. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 797-813.
- Sakata, N., Hemmi, K., Kawaguchi, M., Miura, Y., Noguchi, S., Ma, D., Sasahara, M., Kato, T., Hori, M. und Tamaoki, T. (2000). The mouse ZFH-4 protein contains four homeodomains und twenty-two zinc fingers. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 686-93.
- Sanchez-Soriano, N. und Prokop, A. (2005). The influence of pioneer neurons on a growing motor nerve in *Drosophila* requires the neural cell adhesion molecule homolog FasciclinII. *J Neurosci* **25**, 78-87.
- Sanyal, S., Sandstrom, D. J., Hoeffler, C. A. und Ramaswami, M. (2002). AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. *Nature* **416**, 870-4.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. und Technau, G. M. (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186-204.
- Schmucker, D., Clemens, J. C., Shu, H., Worby, C. A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J. E. und Zipursky, S. L. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**, 671-84.
- Schneider, L. E., Sun, E. T., Garland, D. J. und Taghert, P. H. (1993). An immunocytochemical study of the FMRFamide neuropeptide gene products in *Drosophila*. *J Comp Neurol* **337**, 446-60.
- Schneider, L. E. und Taghert, P. H. (1988). Isolation und characterization of a *Drosophila* gene that encodes multiple neuropeptides related to Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide). *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1993-7.
- Schreiber, J., Sock, E. und Wegner, M. (1997). The regulator of early gliogenesis glial cells missing is a transcription factor with a novel type of DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4739-44.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. und Goodman, C. S. (1996a). Genetic dissection of structural und functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization und growth. *Neuron* **17**, 641-54.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. und Goodman, C. S. (1996b). Genetic dissection of structural und functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron* **17**, 655-67.

- Sepp, K. J. und Auld, V. J.** (2003). Reciprocal interactions between neurons und glia are required for *Drosophila* peripheral nervous system development. *J Neurosci* **23**, 8221-30.
- Sepp, K. J., Schulte, J. und Auld, V. J.** (2000). Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* **30**, 122-33.
- Sepp, K. J., Schulte, J. und Auld, V. J.** (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* **238**, 47-63.
- Skeath, J. B.** (1999). At the nexus between pattern formation und cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* **21**, 922-31.
- Soustelle, L., Jacques, C., Altenhein, B., Technau, G. M., Volk, T. und Giangrande, A.** (2004). Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex. *Development* **131**, 4521-32.
- Spana, E. P., Kopczynski, C., Goodman, C. S. und Doe, C. Q.** (1995). Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Development* **121**, 3489-94.
- Stay, B., Chan, K. K. und Woodhead, A. P.** (1992). Allatostatin-immunoreactive neurons projecting to the corpora allata of adult *Diploptera punctata*. *Cell Tissue Res* **270**, 15-23.
- Stemmler, M. P., Hecht, A., Kinzel, B. und Kemler, R.** (2003). Analysis of regulatory elements of E-cadherin with reporter gene constructs in transgenic mouse embryos. *Dev Dyn* **227**, 238-45.
- Su, M. T., Fujioka, M., Goto, T. und Bodmer, R.** (1999). The *Drosophila* homeobox genes *zfh-1* und *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a numb-dependent lineage decision. *Development* **126**, 3241-51.
- Sun, F. L., Cuaycong, M. H., Craig, C. A., Wallrath, L. L., Locke, J. und Elgin, S. C.** (2000a). The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*: interspersed euchromatic und heterochromatic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5340-5.
- Sun, Q., Bahri, S., Schmid, A., Chia, W. und Zinn, K.** (2000b). Receptor tyrosine phosphatases regulate axon guidance across the midline of the *Drosophila* embryo. *Development* **127**, 801-12.
- Taneri, B., Snyder, B., Novoradovsky, A. und Gaasterland, T.** (2004). Alternative splicing of mouse transcription factors affects their DNA-binding domain architecture und is tissue specific. *Genome Biol* **5**, R75.
- Taylor, C. A., Winther, A. M., Siviter, R. J., Shirras, A. D., Isaac, R. E. und Nassel, D. R.** (2004). Identification of a proctolin preprohormone gene (*Proct*) of *Drosophila melanogaster*: expression und predicted prohormone processing. *J Neurobiol* **58**, 379-91.
- ten Dijke, P. und Hill, C. S.** (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**, 265-73.
- Terhzaz, S., O'Connell, F. C., Pollock, V. P., Kean, L., Davies, S. A., Veenstra, J. A. und Dow, J. A.** (1999). Isolation und characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **202**, 3667-76.

- Thor, S., Andersson, S. G., Tomlinson, A. und Thomas, J. B.** (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* **397**, 76-80.
- Truman, J. W., Schuppe, H., Shepherd, D. und Williams, D. W.** (2004). Developmental architecture of adult-specific lineages in the ventral CNS of *Drosophila*. *Development* **131**, 5167-84.
- Van de Putte, T., Maruhashi, M., Francis, A., Nelles, L., Kondoh, H., Huylebroeck, D. und Higashi, Y.** (2003). Mice lacking ZFHX1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* **72**, 465-70.
- Van Doren, M., Mathews, W. R., Samuels, M., Moore, L. A., Broihier, H. T. und Lehmann, R.** (2003). fear of intimacy encodes a novel transmembrane protein required for gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Development* **130**, 2355-64.
- van Grunsven, L. A., Schellens, A., Huylebroeck, D. und Verschueren, K.** (2001). SIP1 (Smad interacting protein 1) und deltaEF1 (delta-crystallin enhancer binding factor) are structurally similar transcriptional repressors. *J Bone Joint Surg Am* **83-A Suppl 1**, S40-7.
- Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F. und Berx, G.** (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* **33**, 6566-78.
- Verschueren, K., Remacle, J. E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B. S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M. T., Bodmer, R. et al.** (1999). SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins und binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* **274**, 20489-98.
- Vincent, S., Vonesch, J. L. und Giangrande, A.** (1996). Glide directs glial fate commitment und cell fate switch between neurones und glia. *Development* **122**, 131-9.
- Wacker, I., Schwarz, V., Hedgecock, E. M. und Hutter, H.** (2003). zag-1, a Zn-finger homeodomain transcription factor controlling neuronal differentiation und axon outgrowth in *C. elegans*. *Development* **130**, 3795-805.
- Wai, P., Truong, B. und Bhat, K. M.** (1999). Cell division genes promote asymmetric interaction between Numb und Notch in the *Drosophila* CNS. *Development* **126**, 2759-70.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. und Steller, H.** (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-83.
- Whitworth, A. J. und Russell, S.** (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **254**, 277-88.
- Wimmer, E. A., Carleton, A., Harjes, P., Turner, T. und Desplan, C.** (2000). Bicoid-independent formation of thoracic segments in *Drosophila*. *Science* **287**, 2476-9.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I. und Schacherer, F.** (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**, 316-9.

- Woods, D. F. und Bryant, P. J.** (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-64.
- WormBase.** (2005). <http://www.wormbase.org>, (ed.).
- Wu, C., Wairkar, Y. P., Collins, C. A. und DiAntonio, A.** (2005). Highwire function at the *Drosophila* neuromuscular junction: spatial, structural, und temporal requirements. *J Neurosci* **25**, 9557-66.
- Xu, T. und Harrison, S. D.** (1994). Mosaic analysis using FLP recombinase. *Methods Cell Biol* **44**, 655-81.
- Xu, T. und Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing und adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yu, K., Srinivasan, S., Shimmi, O., Biehs, B., Rashka, K. E., Kimelman, D., O'Connor, M. B. und Bier, E.** (2000). Processing of the *Drosophila* Sog protein creates a novel BMP inhibitory activity. *Development* **127**, 2143-54.
- Zito, K., Parnas, D., Fetter, R. D., Isacoff, E. Y. und Goodman, C. S.** (1999). Watching a synapse grow: noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **22**, 719-29.

7. Anhang

7.1. Liste der verwendeten Primer

Name	Sequenz
<i>zfh2</i> -spezifische Primer	
Exon 6.2 5'	GCTCAGACTCAGTATGCAGC
Exon 6.2 3'	CCAAATCCGTATGTGCGCAAG
RT1	TCGTACGATCAACTTCCTGTTGAGG
RT2	CTTGTCTTCATCGACGGTATCC
RT3	CTGATCTCGCTTACAACCAGGC
Exon 9 5'	CACCTCAAACCTCAGCTCAATGC
Exon 9 3'	GCATTGAGCTGAGTTTGAGGTG
Exon 8 5'	CTCCTATGTCCCTCGATTCC
Exon 8 3'	GGAATCGAGGGACATAGGAG
Exon 7 5'	CATGACTTTCAGGACCATTCC
Exon 6 5'	CTGATCTCGCTTACAACCAGGC
Exon 6 3'	GCCTGGTTGTAAGCGAGATCAG
Exon 5 5'	CCTGCAAGACTCTTAAATGTCC
Exon 5 3'	GGACATTTAAGAGTCTTGCAGG
Exon 4 5'	CACCATCGACATACGCATCC
Exon 4 3'	GGATGCGTATGTGCGATGGTG
Exon 2 5'	GGTAACTATGCGATTGACTCA
Exon 2 3'	TGAGTCAATCGCATAGTTACCC
Exon 1 5'	AATCGAACGCCCTTATTTGAAGG
Exon 14 5'	CCTAGCATTTGATTGCTTTTGC
Exon 12 5'	GCTCTATGCACAGAGCAATGG
Exon 12 3'	CCATTGCTCTGTGCATAGAGC
Exon 11 5'	CAGTACTACCAACTTAATGAGTCG
Exon 11 3'	CTTGCTCCCGAGCTGTCC
1-5' <i>SacII</i>	TCCCCGCGGGGAAATCGAACGCCCTTATTTGAAGG
new exon 3'	CTATCATTTAATAGGTGTGCGTTGC
pre- <i>Eco147I</i>	GATGAAATGCAGTCCTTGTTCGG
post- <i>Eco147I</i>	GATTTGCGCTCTTCATGTGTGC
pre- <i>BshTI</i>	CCTCAACTTCATGAACTTAGCAC
nested- <i>BstZ17I</i>	CCTTATAACCGTGGATAGTGG
pre- <i>BstZ17I</i>	CCATATCACCGTTATAGGTGG
post- <i>BstZ17I</i>	CATCTTGAATTGTTAAGGATTGCC
post- <i>Clal</i>	GATTCGTCTTGTAGTTGCACAGC

6.2_seq	GTTCCAGTTTCAACACCG
6.9kb_seq	CAAAGGACAGCGATCTCG
6.9kb_rev	GAGATCGCTGTCCTTTGG
1.3kb_seq	CATCGACATACGCATCCG
3.4kb_seq	GCACACACAACAGATGCG
4.2_seq	TGCTCTAGCTGCAGTGC
0.7kb_seq	GCTAACTCAACTTGTTCAGG
8.4kb_seq	GTATCTATGCACGAGATCC
5prime_BglII	AGATCTCATCTGCCACAAGGCCTTCG
3prime_KpnI	GGTACCGAACTCTGCTTGGCGAAGGC
FISH Exon6 3'	GCAATTGCTGATCTTCATCC
FISH Exon6 5'	CTGTAATACTCCACGACC
FISH Exon 4 5'	CATCGCCACAGATAAATACC
FISH Exon 4 3'	ATGTCAAGGAGTTCGCAGG
<i>zfh2</i> exon 4 3' T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGCACAGTCTACTCCTTGG</u>
<i>zfh2</i> exon 7 5' ISH	GTATTCAAGTGTAATCTCTGCG
<i>zfh2</i> exon 6 3' ISH T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGATCGATCTAGCAGCAAATGCTGG</u>
<i>zfh2</i> exon 7 3' ISH T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCTCTCGTAACGCTATGAACGC</u>
<i>zfh2</i> exon 5 3' ISH T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGCAAGGCAATAACCACAGGC</u>
<i>zfh2</i> exon 5 5' ISH	CTGTGAAATGCTTCTAAACTCGG
Exon 5 forward	CTGTGAAATGCTTCTAAACTCGG
Exon 5 reverse	CTGCAAGGCAATAACCACAGG
Exon6_rev_T7prom	<u>AAGTAATACGACTCACTATAGGGGATCGATCTAGCAGCAAATGCTGG</u>
Exon5_rev_T7prom	<u>AAGTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCAAGGCAATAACCACAGG</u>

inverse PCR

lac1	CACCCAAGGCTCTGCTCCCAAT
lac4	ACTGTGCGTTAGGTCCTGTTTATTGTT
ry2	CTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATT
Sp1	ACACAACCTTTCCTCTCAACAA
3'w+	GGTTCCGAGTGGTTCATTTTCGTC
IR	CGTCGGCAAGAGACATCCACTTAAC

Künstlich eingefügte Schnittstellen bzw. T7-Promotersequenzen sind unterstrichen.

7.2. Integrationsorte von P-Elementlinien

Stamm	benachbarte genomische Sequenz
<i>zfh2</i> ^{LP30}	CCGACCGAGC CGAACAGAAT CGAGTCATGC GTACAAATCA ACATTCAAGA GAGACACTGA
<i>zfh2</i> ^{M.707}	CCGGCAGGCA ACAGCAAGGC TTAAAAAGAA CCCAATTAAG TAAAAACCCT GATGTGCC
<i>hsflp</i> ¹²²	GGTGTGATGT TTCTCAAGAGC GATGAATTGT GGAAGTGCAT GGAAGGTGTT GAATATCTT
UAS- <i>mCD8::GFP</i> (X. Chr.)	AGACGGCGGG CGGAGGCTTG TGGATCCGTC GAGGAGCCGG AGAGAACACA ACGAATCGC
UAS- <i>zfh1</i> (eigene Linie)	AAAACATAAC TTAGTGCTGG CCTTCATGCC TAAAATACCA GTGAAACCCT TAAAAACAAA
UAS- <i>zfh1</i> (eigene Linie)	AGTCGCTGGC GCTCTGTCGC TGCCTCTGCC GCCGCTTCTG CCACCGTTAC CGCCTCT
UAS- <i>zfh1</i> (eigene Linie)	AGCTACGACT CGAGTTCTCG TCGGATAGCA GAACTCG

7.3. Puffer und Lösungen

Apfelsaft-Agar

28g Agar

1L Apfelsaft (100%)

aufkochen und abfüllen

LB-Medium

10g Bacto-Trypton

5g Bacto-Hefeextrakt

10g NaCl

in 900ml H₂O lösen

auf pH 7 mit 10N NaOH einstellen

auf 1L mit H₂O auffüllen

sofort autoklavieren

0,5M Na₂EDTA (pH 8,0)

186,12g Na₂EDTA · 2 H₂O

in 700ml H₂O lösen

auf pH 8 mit 10N NaOH einstellen

auf 1L mit H₂O auffüllen

sofort autoklavieren

TAE-Puffer (50x)

242g Tris

in 500ml H₂O lösen

100ml 0,5M Na₂EDTA (pH 8,0)

57,1ml Eisessig

auf 1L mit H₂O auffüllen

PBS (20x) – Phosphat-gepufferte Salzlösung (pH 7,4, 1 Liter)

151,94g NaCl

19,88g Na₂HPO₄ · 0 H₂O

8,28g NaH₂PO₄ · 1 H₂O

PBTween

1x PBS
0,1% Tween-20

PBTx

1x PBS
0,3% Triton-X-100

Broadie und Bates (B&B) – Puffer

135mM NaCl
5mM KCl
4mM MgCl₂
0,5mM CaCl₂
5mM TES (N-Tris [hydroxymethyl]-2-aminoethan-sulfonsäure
36mM D+Saccharose
pH 7,15

Puffer A

2,84g Na₂HPO₄ · 0 H₂O
in 100ml H₂O

Puffer B

2,76g NaH₂PO₄ · 1 H₂O
in 100ml H₂O

DAB-Färbelösung

1 Tab. 3,3'-Diaminobenzidin (10mg)

20ml 1 x PBS

aliquotieren und bei -20°C lagern

vor Gebrauch evtl. Schwebstoffe abzentrifugieren

Sylgard 184 – Silicone Elastomere (Dow Corning)

1 Vol. Curing Agent

5 Vol. Base

bei -20°C lagern

mit Zahnstocher auf Deckgläschen aufbringen

über Nacht bei 65°C aushärten lassen

4% Paraformaldehyd-Fixativ für L1-larvale Präparation

18ml Puffer A

25ml H₂O

2g Paraformaldehyd

lösen bei 65°C

7ml Puffer B

je 2ml Aliquots bei -20°C lagern

Puffer für Gewinnung genomischer DNA aus L3 Larven

100mM Tris-HCl (pH 7,5)

100mM EDTA

100mM NaCl

0,5% SDS

Salzlösung zur Fällung

1 Vol. 5M KAc

2,5 Vol. 6M LiCl

NaNO₂-Elektrolysebad zum Anspitzen von Wolframnadeln

71g NaNO₂

34g KOH

in 100ml H₂O

4V Spannung anlegen

7.4. Geräte + Software

Mikroskope, Binokular und

Axioplan	Zeiss
mit CCD-Kamera ProgRes 3012	Kontron
Axioskop 2 mot plus	Zeiss
mit CCD-Kamera Sony MC-3255	AVF Horn
BX50WI	Olympus
mit CCD-Kamera AxioCam MRm	Zeiss
Konfokales LSM TCS SP2	Leica
SCX12	Olympus
Micropipette Puller P-97 (horizontal)	Sutter Instrument Co.
Puller P-30 (vertikal)	Sutter Instrument Co.
Kapillare GB100-T8P	Science Products GmbH, Hofheim
Kapillare GB100-TF8P (mit Filament)	Science Products GmbH, Hofheim

Molekularbiologie

BioPhotometer	Eppendorf
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermocycler T-Gradient	Biometra
SpeedVac	Savant
HE33-Gel-Elektrophoresekammern	Hoefer
GPS 200/400	Gene Power Supply
P9I Thermodrucker	Mitsubishi, Gel-Dokumentationssystem
UV-Tisch Transilluminator	MS-Laborgeräte
Sigma 3K20 Zentrifuge	B.Braun

Software

Axiovision 4.1.1	Zeiss
Leica Confocal Software 2.00	Leica
analySIS pro 3.2	Olympus
SigmaStat 3.0	SPSS
GenePalette 1.21	U.C. San Francisco
Vector NTI 10	Invitrogen
Endnote 9	Thomson
Photoshop CS2	Adobe
Illustrator CS2	Adobe
Office 2003	Microsoft