



**Segmentale Musterbildung in der terminalen
Abdominalregion des Zentralen Nervensystems von
*Drosophila melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität

Oliver Birkholz

geboren am 16.08.1979 in Bingen

Mainz, im Juli 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 08.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die embryonale Neurogenese von <i>Drosophila</i>	1
1.2	Geschlechtsspezifische Neuroblasten.....	6
1.3	<i>Hox</i> - und <i>ParaHox</i> -Gene vermitteln Segmentidentität.....	8
1.4	Ziele dieser Arbeit	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Verwendete Materialien	12
2.1.1	Chemikalien und Lösungen.....	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.3	Geräte	16
2.1.4	Software.....	17
2.2	Fliegenarbeit	17
2.2.1	Fliegenhaltung	17
2.2.2	Eiablagen	18
2.2.3	Gewinnung von Larven	18
2.2.4	Genetische Kreuzungen.....	18
2.2.5	Balancerchromosomen	19
2.2.6	Das Gal4/UAS-System.....	19
2.2.7	RNA-Interferenz.....	20
2.2.8	G-Trace.....	21
2.2.9	Flybow.....	22
2.2.10	Verwendete Fliegenstämme	23
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.3.1	Herstellung von RNA-Sonden.....	25
2.3.1.1	Polymerasekettenreaktion.....	25
2.3.1.2	Klonierung	26
2.3.1.3	<i>in vitro</i> -Transkription.....	26

2.4	Immunohistochemie	27
2.4.1	Fixierung	27
2.4.1.1	Fixierung von Embryonen	27
2.4.1.2	Fixierung des larvalen Zentralnervensystems.....	28
2.4.2	Antikörperfärbung	28
2.4.2.1	Inkubation von primären Antikörpern	28
2.4.2.2	Verwendete primäre Antikörper	29
2.4.2.3	Inkubation von sekundären Antikörpern	30
2.4.2.3.1	Fluoreszenzfärbungen	30
2.4.2.3.2	Sichtbarer Nachweis durch Alkalische Phosphatase	30
2.4.2.3.3	Sichtbarer Nachweis durch Meerrettichperoxidase.....	31
2.4.2.4	Verwendete sekundäre Antikörper	31
2.4.3	<i>in situ</i> -Hybridisierung mit anschließender Antikörperfärbung	32
2.4.4	Präparation und Dokumentation	33
2.4.4.1	Filetpräparation von Embryonen	33
2.4.4.2	Feinpräparation des larvalen Zentralnervensystems.....	34
2.4.4.3	Dokumentation	34
 3	 Ergebnisse	 35
3.1	Muster und Identität der Neuroblasten in der terminalen Abdominalregion.....	35
3.1.1	Gesamtanzahl und Verteilung der vorhandenen Neuroblasten	35
3.1.2	Identität der anwesenden Neuroblasten.....	36
3.1.2.1	Neuroblastenmarker.....	36
3.1.2.1.1	Segmentpolaritätsgene.....	37
3.1.2.1.2	Paarregelgene	39
3.1.2.1.3	Lückengene	40
3.1.2.1.4	dorso/ventrale Musterbildungsgene	42
3.1.2.1.5	Andere Gene.....	43
3.1.2.2	Marker, die in Tochterzellen von Neuroblasten exprimiert werden.....	45
3.1.2.2.1	Gliale Marker	45
3.1.2.2.2	Andere Marker	47
3.1.3	Zusammenfassung.....	49

3.2	Die Spezifizierung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten durch <i>doublesex</i>.....	52
3.2.1	Charakterisierung des <i>doublesex</i> -Expressionsmusters im embryonalen Bauchmark.....	52
3.2.1.1	Die Identität der geschlechtsspezifischen Neuroblasten.....	52
3.2.1.2	Die Identität der <i>doublesex</i> -Gal4-exprimierenden Zellen in der Mittellinie	54
3.2.2	Charakterisierung des <i>doublesex</i> -Expressionsmusters in den terminalen abdominalen Ganglien der L3-Wanderlarve und der weißen Puppe.....	55
3.2.2.1	Beschreibung der <i>doublesex</i> -exprimierenden Zellen.....	55
3.2.2.2	Der Ursprung der <i>doublesex</i> -Gal4-exprimierenden Zellen	56
3.2.2.3	Darstellung der männchenspezifischen Zellstammbäume durch Flybow-Analyse.....	58
3.2.2.4	Molekulare Marker für die männchenspezifischen Zellstammbäume.....	59
3.2.3	Geschlechtsspezifische Neuroblasten und ihre Zellstammbäume in der späten L2- und der frühen L3-Larve.....	62
3.2.4	Programmierter Zelltod in den geschlechtsspezifischen Neuroblasten des Weibchens	63
3.2.5	Duale Rolle von <i>doublesex</i> bei der Spezifizierung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten.....	65
3.2.6	Zusammenfassung.....	67
3.3	<i>Abdominal-B</i> und <i>caudal</i> verhindern die Bildung spezifischer Neuroblasten in der terminalen Abdominalregion	68
3.3.1	<i>Abdominal-B</i> unterdrückt die Bildung spezifischer Neuroblasten in Parasegment 15.....	68
3.3.2	Der Zellstammbaum des ektopischen Neuroblasten 7-3 in Parasegment 15 von <i>Abdominal-B</i> -Mutanten exprimiert keine Gene des <i>Bithorax-Komplex</i>	72
3.3.3	Die regulatorische Isoform von <i>Abdominal-B</i> ist für die Inhibition der Neuroblast 7-3-Bildung in Parasegment 15 verantwortlich	74
3.3.4	Nur die ektopische Expression von <i>Abdominal-B.m</i> kann die Bildung des Neuroblasten 7-3 in anterioren Parasegmenten unterdrücken.....	77
3.3.5	Auch <i>caudal</i> reprimiert die Bildung von Neuroblast 7-3 in Parasegment 15	80
3.3.6	<i>caudal</i> und <i>Abdominal-B.r</i> agieren zwar unabhängig, müssen aber co-exprimiert werden, um die Bildung des Neuroblasten 7-3 zu unterdrücken.....	81
3.3.7	Zusammenfassung.....	87

4	Diskussion	89
4.1	Eine Neuroblastenkarte für die terminalen abdominalen Neuromere.....	89
4.2	Der embryonale Ursprung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten und der <i>doublesex</i>-Gal4-exprimierenden Mittellinienzellen.....	91
4.3	Die duale Rolle von <i>doublesex</i> bei der Kontrolle des Schicksals von geschlechtsspezifischen Neuroblasten	93
4.4	<i>Abdominal-B</i> und <i>caudal</i> vermitteln die terminal abdominale Segmentidentität auf unterschiedlichen Entwicklungsebenen des ventralen Nervensystems.....	95
4.5	<i>Abdominal-B.r</i> vermittelt nur gemeinsam mit <i>caudal</i> terminales abdominales Schicksal im ventralen Nervensystem	98
5	Zusammenfassung.....	101
6	Literaturverzeichnis.....	103
7	Anhang	117
7.1	Abbildungsverzeichnis	117
7.2	Tabellenverzeichnis.....	119
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	119
7.3.1	Allgemeine Abkürzungen.....	119
7.3.2	Genabkürzungen.....	122
7.4	Curriculum Vitae	123
7.5	Eidesstattliche Erklärung	125
7.6	Danksagung.....	126

1 Einleitung

Das menschliche Nervensystem stellt das wohl komplexeste Organsystem dar, das die Evolution hervorgebracht hat. Seine Funktion setzt die Produktion einer charakteristischen Anzahl neuraler Zelltypen voraus, die in einer definierten räumlichen Anordnung zueinander lokalisiert werden müssen, um miteinander interagieren zu können.

Viele Fragestellungen zur Entwicklung des Nervensystems lassen sich an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (im Folgenden nur noch als *Drosophila* bezeichnet) untersuchen, da die Neurogenese dieses Modellorganismus auf der molekularen und genetischen Ebene große Übereinstimmungen mit der von Vertebraten besitzt (Zusammenfassungen bei Arendt und Nübler-Jung, 1999; Doe et al., 1998; Thor, 1995). Aufgrund der kostengünstigen und einfachen Haltung, der kurzen Generationszeit und der großen Anzahl an Nachkommen wurde *Drosophila* bereits vor über 100 Jahren als Versuchstier eingeführt. Im Laufe der Jahrzehnte konnte neben einer präzisen Beschreibung seiner Morphogenese auch eine Vielzahl von genetischen und molekularbiologischen Methoden an *Drosophila* etabliert und zur Aufklärung von Entwicklungsmechanismen erfolgreich eingesetzt werden.

1.1 Die embryonale Neurogenese von *Drosophila*

Das Zentralnervensystem (ZNS) von *Drosophila* setzt sich aus dem Gehirn und dem ventralen Nervensystem (vNS), welches dem Rückenmark der Vertebraten entspricht, zusammen. Das Gehirn geht aus der bereits frühembryonal angelegten, procephalen neurogenen Region (pNR), das vNS (auch Bauchmark genannt) aus der ventralen neurogenen Region (vNR), hervor (Abb. 1-2A). Die vNR setzt sich aus dem Mesektoderm, welches die unpaarige Mittellinie (ML) bildet, und dem beidseitig des Mesektoderms angelegten Neuroektoderm (NE) zusammen (zusammengefasst in Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

In der vNR werden unter der Kontrolle von Paarregel- und dorso-ventralen (D/V)-Musterbildungsgenen definierte Domänen, sog. „proneurale Cluster“ gebildet, die proneurale Gene des *Achaete-Scute-Komplex (AS-C)* exprimieren (zusammengefasst in Skeath und Carroll, 1994). Die Zellen eines proneuralen Clusters stellen eine Äquivalenzgruppe dar, in der jede Zelle die Fähigkeit besitzt zu einer neuralen Stammzelle zu werden. Diese Kompetenz wird jedoch dadurch beschränkt, dass die prospektive neurale Stammzelle damit beginnt, eine höhere Dosis des neurogenen Liganden Delta zu exprimieren. Delta aktiviert den Notch-Rezeptor benachbarter Zellen des gleichen Clusters (zusammengefasst in Artavanis-Tsakonas et al., 1991). Letztendlich resultiert die Aktivierung des Rezeptors in der Repression proneuraler Gene und unterdrückt

dadurch die Kompetenz dieser Zellen sich ebenfalls zu neuronalen Stammzellen zu differenzieren, einen Vorgang den man als „laterale Inhibition“ bezeichnet (Abb. 1-2B). Stattdessen nehmen sie ein epidermales Schicksal an (zusammengefasst in Skeath und Carroll, 1994). Die neuronalen Stammzellen, die in *Drosophila* als Neuroblasten (NBs) bezeichnet werden, vergrößern sich und segregieren aus den proneuralen Clustern des NE ins Innere des Embryos.

Entlang der anterior/posterioren Körperachse (A/P-Achse) setzt sich das vNS aus drei verschiedenen, segmental aufgebauten Körperabschnitten, auch Tagmata genannt, zusammen. Von anterior nach posterior unterscheidet man drei Segmente im Gnathalbereich (C1-C3), drei thorakale Segmente (T1-T3) und mindestens acht Abdominalsegmente (A1-A8). In jedem thorakalen und anterior abdominalen Hemisegment (HS, Hälfte eines Segments, welches von der anderen spiegelbildlichen Hälfte durch die ML getrennt ist) wird eine invariante Anzahl von etwa 30 NBs gebildet (Doe, 1992). Jeder dieser NBs besitzt eine charakteristische subektodermale Position innerhalb eines HS, welches aufgrund der Expression von A/P- und D/V-Musterbildungsgenen wie ein Kartesisches Koordinatensystem aufgebaut ist (zusammengefasst in Skeath, 1999). Die Bezeichnung der NBs leitet sich deshalb von ihrer Lage entlang der A/P- (erste Zahl) und der D/V-Achse (zweite Zahl) ab (z.B. NB7-3). Außerdem delaminiert jeder NB zu einem definierten Zeitpunkt ins Innere des Embryos, wobei zwischen fünf Segregationswellen (S1-S5) unterschieden wird, die vom späten Stadium 8 (St8 late, St8l) bis St11l sukzessiv aufeinander folgen. Ferner exprimiert jeder NB eine für ihn typische Kombination an molekularen Markern. Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich alle NBs des Thorax und anterioren Abdomens eindeutig identifizieren (Abb. 1-1) (Broadus et al., 1995; Doe, 1992).

Auch die NBs des Gehirns und des Gnathalbereichs können aufgrund dieser Eigenschaften und unter Verwendung weiterer molekularer Marker individuell identifiziert werden (Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003a; Urbach und Technau, 2003b; R. Urbach, unveröffentlicht).

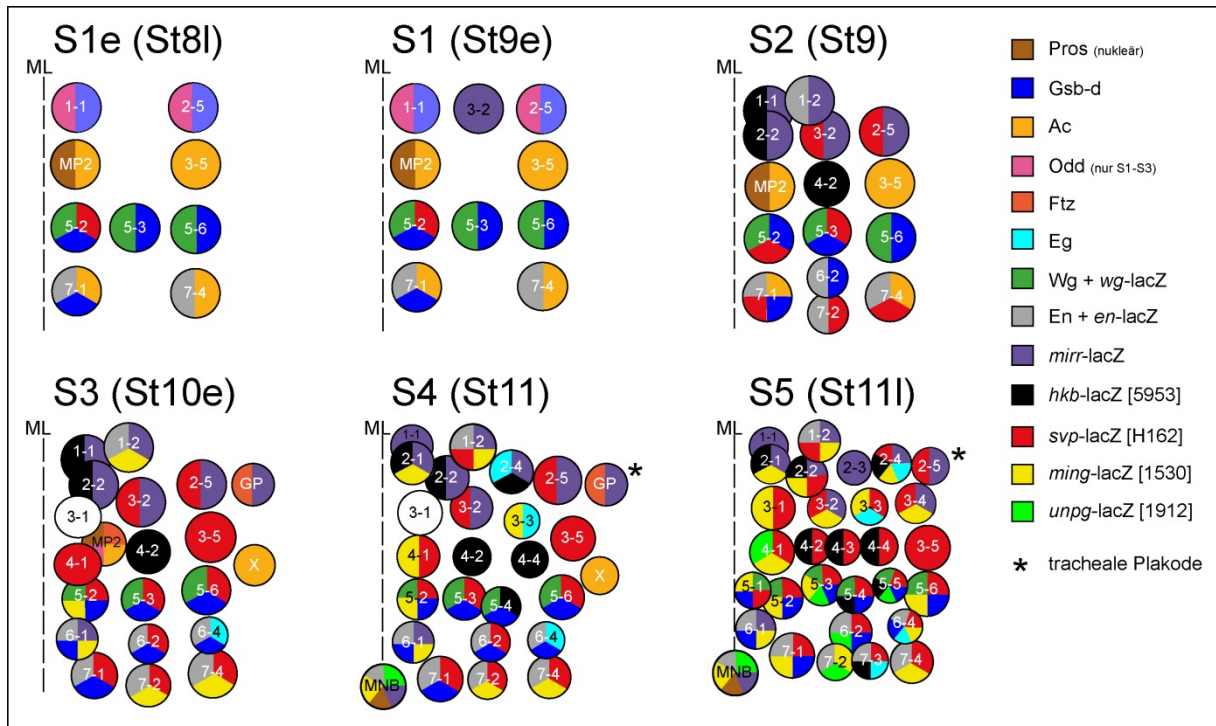


Abb. 1-1: Neuroblastenkarte für den Thorax und das anteriore Abdomen

Gezeigt ist die NB-Karte eines HS gemäß (Broadus et al., 1995; Doe, 1992); anterior ist oben; ML = Mittellinie. Der Stern markiert die Position der trachealen Plakode, welche die Segmentsgrenze widerspiegelt. NBs können aufgrund ihres charakteristischen Delaminationszeitpunkts (S1-S5), ihrer typischen Position innerhalb eines HS und der Expression einer bestimmten Kombination von molekularen Markern (Legende rechts) voneinander unterschieden werden.

Die NBs formen die segmental angeordneten, bilateral symmetrischen Ganglien des ZNS, die als Neuomere bezeichnet werden. Dazu teilen sie sich asymmetrisch (zusammengefasst in Fuerstenberg et al., 1998) und bringen, unter Selbstregeneration, eine Reihe kleinerer Ganglienmutterzellen (GMZs) hervor. Diese GMZs zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich nur noch einmal teilen und zwei postmitotische Tochterzellen hervorbringen, die sowohl neuronales als auch gliales Schicksal besitzen können und sich anschließend differenzieren (Abb. 1-2C) (Hartenstein et al., 1987; zusammengefasst in Skeath und Thor, 2003). So generiert jeder NB eine weitgehend invariante Anzahl an Nachkommenzellen, die auch als dessen Zellstammbaum oder Zellklon bezeichnet werden (Abb. 1-2D). Die Zellstammbäume aller thorakal und anterior abdominal vorhandenen NBs konnten anhand von klonalen DiI-Markierungsexperimenten aufgeklärt werden (Abb. 1-2E) (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997).

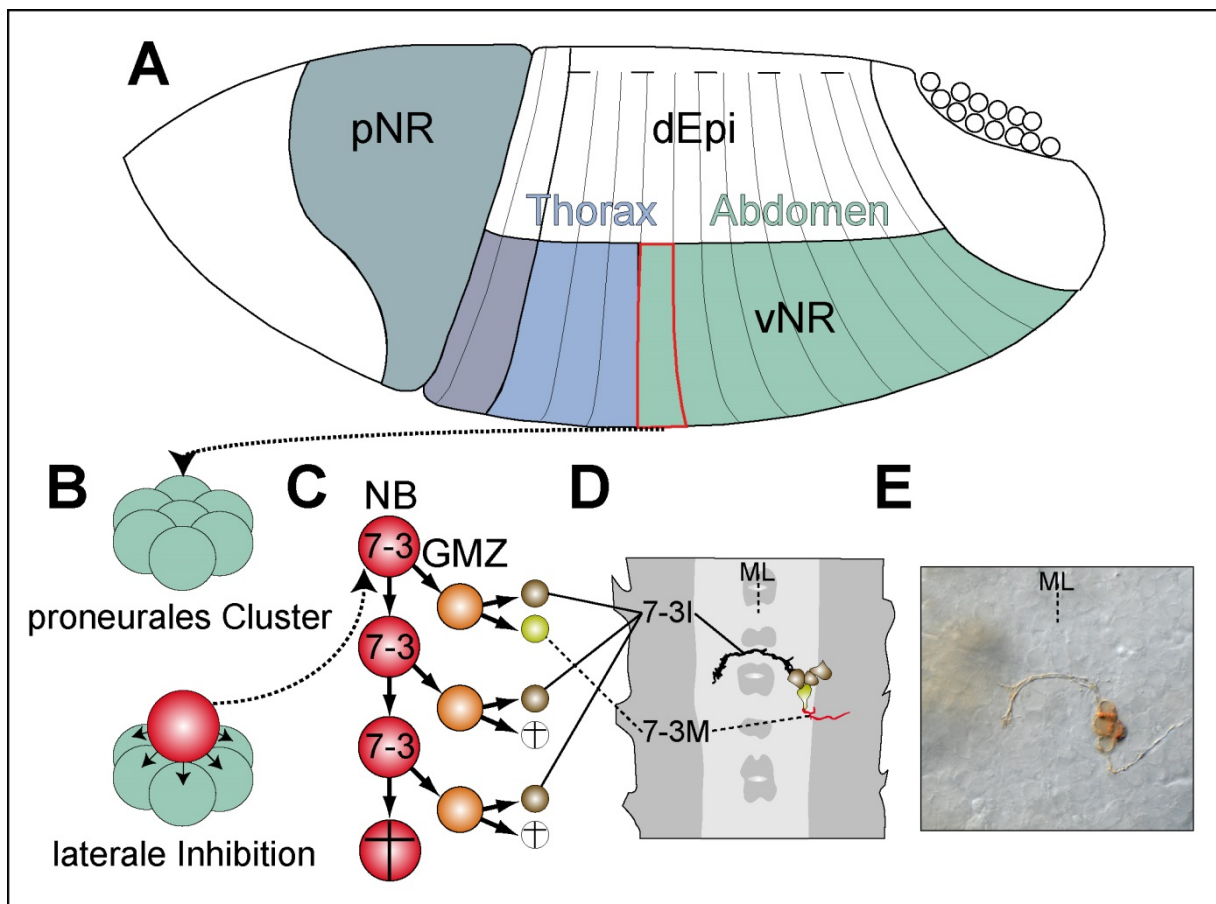


Abb. 1-2: Die Entstehung des embryonalen Nervensystems von *Drosophila*

(A) Anlagenskizze eines *Drosophila* Embryos während des Gastrula-Stadiums; anterior ist links; dEpi = dorsale Epidermis. Aus der pNR geht das Gehirn hervor, aus der vNR das Bauchmark. Die vNR gliedert sich in drei verschiedene Tagmata auf: den Gnathalbereich (violett), den Thorax (blau) und das Abdomen (grün). (Abbildung gemäß Technau und Campos-Ortega, 1985, modifiziert) (B) Im NE jedes HS werden proneurale Cluster gebildet. Nur eine der Zellen jedes Clusters wird jedoch zum NB und hält durch laterale Inhibition die anderen Zellen davon ab, sich ebenfalls zu NBs zu differenzieren. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Jan Dietrich) (C) Der NB delaminiert ins Innere des Embryos und teilt sich im Stammzellmodus. Im Fall des NB7-3 bringt der Vorläufer insgesamt drei Interneurone (7-3I) und ein Motorneuron (7-3M) hervor (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). Der NB7-3 selbst wird spätembryonal durch Apoptose entfernt und zwei seiner Tochterzellen erleiden das gleiche Schicksal (Karcavich und Doe, 2005; Novotny et al., 2002). (D) Illustration des vollständig differenzierten NB7-3-Zellstammbaums im St16. Die Interneurone projizieren nach kontralateral, das Motorneuron projiziert aus dem Nervensystem heraus. ML = Mittellinie. (Abbildung aus Bossing et al., 1996) (E) Originalpräparat des NB7-3-Zellstammbaums nach DiI-Markierung. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Christof Rickert)

Seriell homologe NBs delaminieren nahezu zeitgleich an analogen Positionen unterschiedlicher Segmente, werden deshalb vergleichbar spezifiziert (zusammengefasst in Bhat, 1999; Skeath, 1999), exprimieren die gleichen molekularen Marker und generieren ähnliche Zellstammbäume (zusammengefasst in Technau et al., 2006). So gehen die seriellen Homologen des NB7-3 im Thorax und anterioren Abdomen immer aus der letzten Reihe (entlang der A/P-Achse) und intermediärer Position (entlang der D/V-Achse) des NE hervor, delaminieren in S5, exprimieren die gleichen molekularen Marker und generieren drei Interneurone und ein Motorneuron (Abb. 1-2D, E) (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999).

Allerdings weisen einige seriell homologe NBs Unterschiede in ihren Zellstambäumen in Adaption an verschiedene Tagmata auf, die sowohl die Zellanzahl, die Zellidentität (Abb. 1-3A), als auch den Zelltyp (Neurone oder Gliazellen, Abb. 1-3B) betreffen können (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997; Udolph et al., 1993; zusammengefasst in Technau et al., 2006).

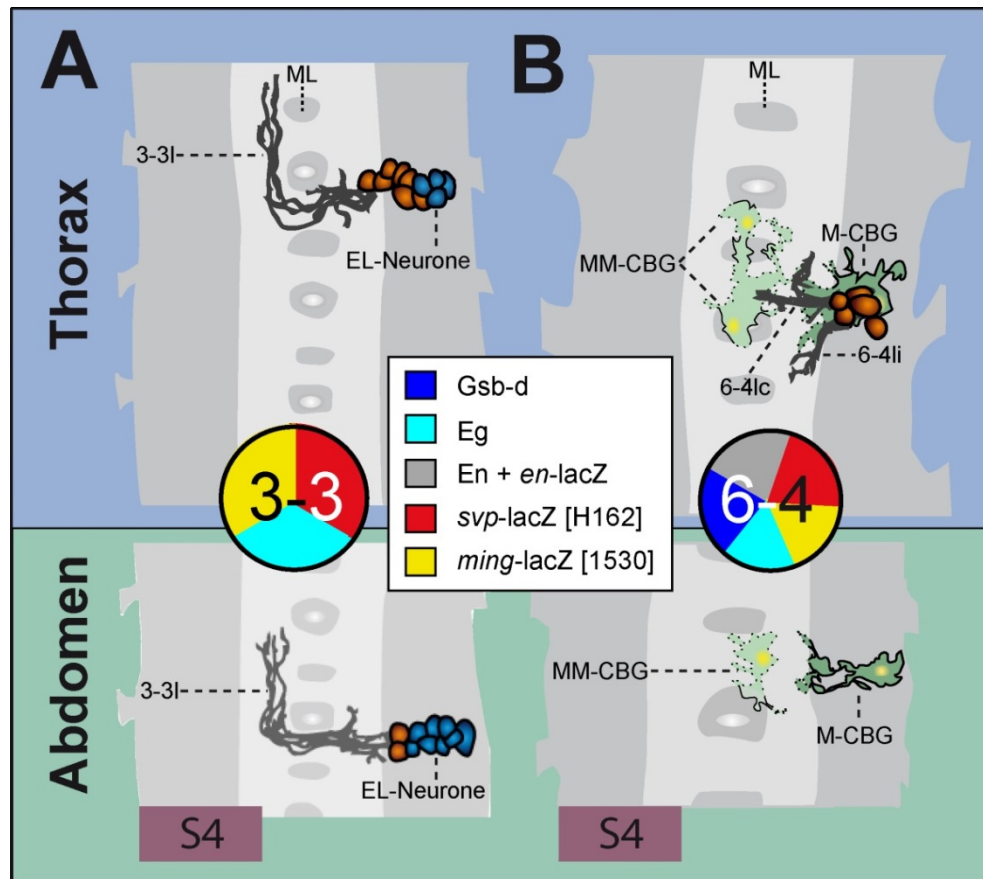


Abb. 1-3: Tagmaspezifische Abweichungen in den Zellstambäumen seriell homologer Neuroblasten

Dargestellt sind Illustrationen der thorakalen und anterior abdominalen Zellstambäume von NB3-3 (A) und NB6-4 (B) im St16. Ebenfalls gezeigt ist der Delaminationszeitpunkt (S4) ihrer Vorläufer, sowie die molekularen Marker, die sie exprimieren; anterior ist oben; ML = Mittellinie. (A) Der NB3-3-Zellstammbaum besteht im Thorax (blau hinterlegt) aus ca. fünf EL-Neuronen und etwa sieben weiteren Interneuronen (= 3-3I), die eine gemeinsame kontralaterale Projektion aufweisen. Im Abdomen (grün hinterlegt) hingegen steigt die Anzahl der EL-Neurone auf ca. neun Zellen, während sich die Gesamtgröße des Klon nicht verändert (Schmidt et al., 1997). (B) Der NB6-4-Zellstammbaum besteht im Thorax aus vier bis sechs Interneuronen, die ipsilateral (6-4Ii) und kontralateral (6-4Ic) projizieren. Zusätzlich besteht der thorakale Klon noch aus zwei Medial Most Cell Body Glia (= MM-CBG) und einer Medial Cell Body Glia (= M-CBG). Im Abdomen fehlt jedoch der neuronale Subklon und der NB6-4-Zellstammbaum besteht nur aus einer MM-CBG und einer M-CBG (Schmidt et al., 1997). (Abbildung aus Schmidt et al., 1997, modifiziert)

Es gibt zwei Regionen des embryonalen vNS, die im Vergleich zum Grundzustand T2 (Lewis, 1978) eine stark reduzierte Anzahl an NBs aufweisen: der Gnathalbereich (R. Urbach, unveröffentlicht) und die terminalen abdominalen Segmente.

Die metameren Einheiten der terminalen Abdominalregion werden zwar frühembryonal angelegt, jedoch kommt es durch morphogenetische Bewegungen, Kondensation und Fusion von

Segmentanlagen, die auch das vNS betreffen, sehr bald zu einer aperiodischen und abgeleiteten Form dieser Region im Vergleich mit dem repetitiven Charakter der Segmente des anterioren Abdomens (Kuhn et al., 1992). Infolgedessen stellt sich diese Region postembryonal als Einheit dar, die ursprünglich aus den vier Segmentanlagen A8 bis A11 und einem nicht segmentalen Telson hervorgeht (Jürgens, 1987). Bislang konnten aufgrund von morphologischen Kriterien nur sehr wenige embryonale NBs in den terminalen Neuomeren nachgewiesen werden, wobei die am weitesten posterior gelegenen A9 zugewiesen wurden (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984). Gerade diese NBs könnten jedoch insofern interessant sein, als dass sie wahrscheinlich die Zellen generieren, die später neuronale Schaltkreise aufbauen, welche die Reproduktionsorgane und geschlechtsspezifische sensorische Einflüsse kontrollieren (z.B. Häsemeyer et al., 2009; Monastirioti, 2003; Rezaval et al., 2012). Zu diesen Vorläuferzellen könnten auch die zuvor beschriebenen „geschlechtsspezifischen NBs“ gehören (Taylor und Truman, 1992), die wahrscheinlich ebenfalls in dieser Region gebildet werden.

1.2 Geschlechtsspezifische Neuroblasten

Nachdem sie ihren embryonalen Zellstammbaum generiert haben, werden die meisten abdominalen NBs durch programmierten Zelltod (PCD) entfernt (Peterson et al., 2002; White et al., 1994). Die noch vorhandenen werden zu postembryonalen NBs (Prokop und Technau, 1991), treten mit dem Beginn der Larvalentwicklung aber zunächst in eine charakteristische Ruhephase ein, während der sie kein Proliferationsverhalten aufweisen. Anschließend vergrößern sie sich, treten wieder in den Zellzyklus ein und werden mitotisch aktiv (Truman und Bate, 1988).

Die insgesamt zwölf postembryonalen NBs der terminalen Abdominalregion inkorporieren erstmals zu Beginn des L2-Larvenstadiums (L2 early, L2e) den Proliferationsmarker 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU), teilen sich aber erst in der Mitte des L2-Larvenstadiums (L2 mid; L2m). In der L3m-Larve kommt es zu einem bemerkenswerten Geschlechtsdimorphismus: In weiblichen Larven stellen alle zwölf terminalen abdominalen NBs ihre Proliferation ein, während im Männchen vier NBs bis in die frühe Puppe hinein BrdU einbauen (Taylor und Truman, 1992). Diese vier NBs werden als „geschlechtsspezifische NBs“ bezeichnet. Da die von diesen NBs hervorgebrachten männchenspezifischen Tochterzellen bis in die Imago persistieren, könnten sie für die Innervation der männlichen Reproduktionsorgane verantwortlich sein (Taylor und Truman, 1992).

Die postembryonale Proliferation dieser NBs wird durch den Transkriptionsfaktor Doublesex (Dsx) reguliert (Taylor und Truman, 1992), der am Ende der Kaskade der Geschlechtsdetermination in *Drosophila* steht (Zusammenfassungen in Schütt und Nöthiger,

2000; Steinmann-Zwicky et al., 1990) und viele Aspekte der Sexualdifferenzierung kontrolliert (zusammengefasst in Christiansen et al., 2002). An der Spitze dieser Kaskade steht das Schaltergen *Sex lethal* (*Sxl*) (Bopp et al., 1991), dessen Expression vom Verhältnis der X-Chromosomen (bilden Numeratorproteine) zum Autosomensatz (bilden Denominatorproteine) abhängig ist. Nur in den Weibchen (Verhältnis 1,0), nicht aber in den Männchen (Verhältnis 0,5), kommt es zu einer Aktivierung von *Sxl*. Anschließend kontrolliert der Spleißfaktor *Sxl* seine eigene Expression autoregulatorisch (Keyes et al., 1992). Weiterhin kontrolliert *Sxl* die Expression von Transformer (*Tra*) (Sosnowski et al., 1989), das zusammen mit dem konstitutiv exprimierten Transformer2 (*Tra2*) für das weibchenspezifische Spleißen der *dsx* prä-mRNA verantwortlich ist, die letztendlich in *Dsx[F]* (weibliche Isoform von *Dsx*) Protein resultiert (Abb. 1-4A). Im Männchen kommt es durch die Abwesenheit von *Tra* zu einem alternativen, männchenspezifischen Spleißen der *dsx* prä-mRNA und damit zur Bildung von *Dsx[M]* (männchenspezifische Isoform von *Dsx*) (Abb. 1-4B) (Hoshijima et al., 1991). *Dsx[F]* und *Dsx[M]* regulieren viele Aspekte der Geschlechtsdifferenzierung innerhalb und außerhalb des ZNS, indem sie in opponierender Weise die Expression von Realisatorgenen kontrollieren (z.B. Burtis et al., 1991; Chatterjee et al., 2011; Coschigano und Wensink, 1993; Luo et al., 2011; Williams et al., 2008).

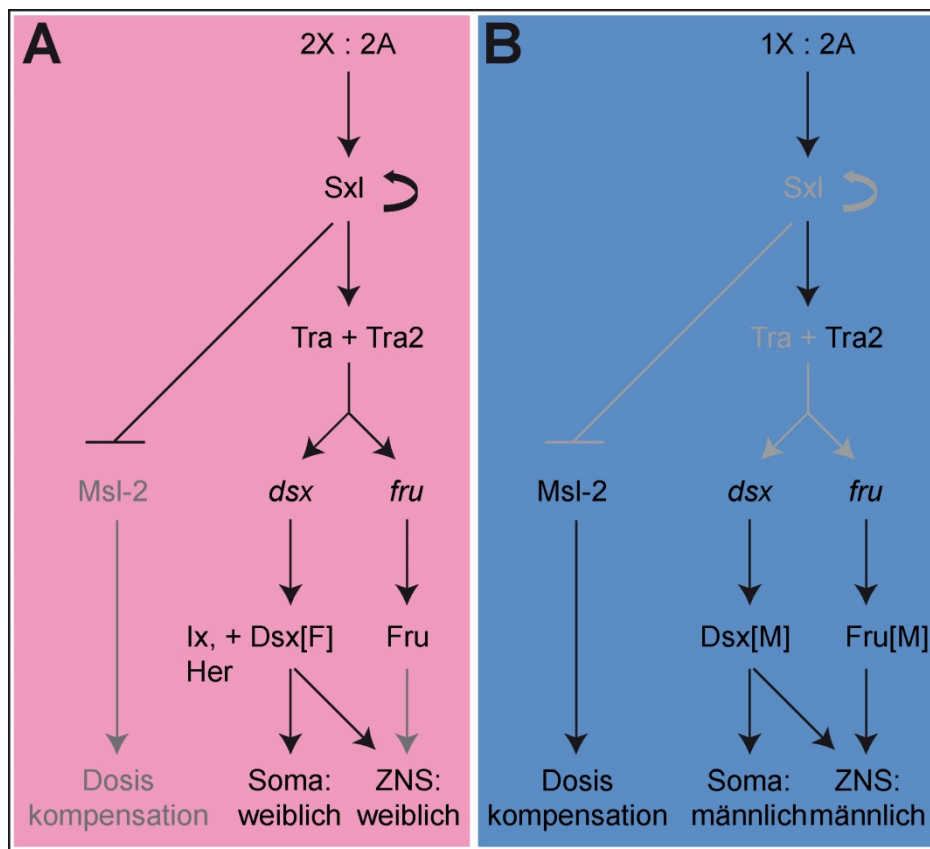


Abb. 1-4: Hierarchie der Geschlechtsdetermination

Pfeile mit Spitze deuten auf eine Aktivierung, ohne Pfeilspitze auf eine Repression hin. Schwarz bedeutet aktiv; grau bedeutet inaktiv bzw. nicht funktional. (A) In Weibchen ist das Verhältnis von X-Chromosomen zum Autosomensatz

1,0 und es kommt dadurch zur Aktivierung von *Sxl*. *Sxl* kontrolliert sowohl seine eigene Expression als auch die von *tra*, verhindert aber die Translation von *male-specific lethal 2 (msl-2)* und damit die Dosiskompensation. *Tra* reguliert gemeinsam mit *Tra2* das weibchenspezifische Spleißen der *dsx*- und *fruitless (fru)* prä-mRNA. Die weibchenspezifische *fru*-mRNA wird jedoch nicht geschlechtsspezifisch translatiert. *Dsx[F]* interagiert mit Intersex (*Ix*) und Hermaphrodite (*Her*), und kontrolliert alle Aspekte der Sexualdifferenzierung. **(B)** Im Männchen ist das Verhältnis der X-Chromosomen zum Autosomensatz 0,5 und durch differenzielles Spleißen kommt es zum Abbruch der *Sxl*-Translation und nicht zur Bildung eines funktionsfähigen Proteins. Die Abwesenheit von *Sxl* resultiert in der Expression von *Msl-2*, welches durch die Hyperaktivierung des X-Chromosoms zur Dosiskompensation führt. Außerdem resultiert das Fehlen von *Sxl* in einem alternativen Spleißen von *tra*, welches durch den Einbau von Stop-Kodons nicht translatiert wird. Durch das Fehlen von *Tra* kommt es zu einem männchenspezifischen Spleißen von *dsx* und *fru*. *Fru[M]* kontrolliert ausschließlich die sexuelle Differenzierung des ZNS, während *Dsx[M]* sowohl die sexuelle Differenzierung des ZNS als auch anderer Gewebe kontrolliert. (Abbildung aus Christiansen et al., 2002, modifiziert)

Dsx[M] wird für die verlängerte postembryonale Proliferation der geschlechtsspezifischen NBs im Männchen benötigt und dementsprechend kommt es in weiblichen *tra*- und *tra2*-Mutanten, in denen *Dsx[M]* anstelle von *Dsx[F]* gebildet wird, zu einer Transformation der geschlechtsspezifischen NBs in männliches Schicksal (Taylor und Truman, 1992). In *dsx*-Funktionsverlustmutationen kommt es weder in den Männchen, noch in den Weibchen zu einer postembryonalen Proliferation der geschlechtsspezifischen NBs. Dies zeigt, dass auch die anfängliche geschlechtsunabhängige Proliferation der geschlechtsspezifischen NBs von *dsx* abhängig ist (Taylor und Truman, 1992). Insofern stellen die geschlechtsspezifischen NBs eine interessante NB-Population dar, an der sich nicht nur der Einfluss von A/P- und D/V-Musterbildungsgenen, sondern auch der geschlechtsdifferenzierender Gene untersuchen lässt.

1.3 *Hox*- und *ParaHox*-Gene vermitteln Segmentidentität

Die Bildung und Differenzierung von NBs muss entlang der A/P-Körperachse moduliert werden, um die von ihnen gebildeten neuronalen Netzwerke den Anforderungen an bestimmte Körperbereiche anzupassen. Für die Reduktion an NBs in den terminalen abdominalen Segmenten könnten die *Hox*-Gene verantwortlich sein, die solche segmentspezifischen Unterschiede vermitteln und für Transkriptionsfaktoren kodieren, welche durch eine aus 60 Aminosäuren bestehende Homeodomäne an die DNA binden. Mutationen oder ektopische Expression dieser Gene resultieren in homeotischen Transformationen, wodurch ein Segment die Identität eines anderen annehmen kann (z.B. zusammengefasst in McGinnis und Krumlauf, 1992). *Hox*-Gene konnten in allen bisher untersuchten Bilateria und Cnidaria nachgewiesen werden und ihre Struktur, Funktion und Expressionsdomänen sind hoch konserviert (zusammengefasst in Lemons und McGinnis, 2006). Sie vermitteln morphologische Identität, indem sie Zielgene regulieren, die bei der Zelldetermination, der Zelladhäsion, dem Zellzyklus, dem PCD und der Zellmigration eine Rolle spielen (zusammengefasst in Pearson et al., 2005). Während der Neurogenese von *Drosophila* wirken *Hox*-Gene zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten auf der Ebene des NE, der NBs, sowie deren Tochterzellen und kontrollieren Zellspezifizierung, Proliferation und

Apoptose in segmentabhängiger Weise (Zusammenfassungen in Reichert und Bello, 2010; Rogulja-Ortmann und Technau, 2008).

Die Expressionsdomänen der *Hox*-Gene stimmen jedoch nicht mit den Segmentgrenzen, sondern mit Parasegmentsgrenzen überein. Ein Parasegment (PS) repräsentiert die fundamentale genetische Einheit, die aus dem posterioren Kompartiment eines Segments und dem anterioren Kompartiment des nächsten Segments besteht (Abb. 1-5A) (zusammengefasst in Deutsch, 2004; Martinez-Arias und Lawrence, 1985).

Während die *Hox*-Gene, die im *Antennapedia-Komplex* (*ANT-C*) (Kaufman et al., 1980) zusammengefasst sind, die Differenzierung des Kopfes, der gnathalen und anterior thorakalen PSs kontrollieren, formen die *Hox*-Gene des *Bithorax-Komplex* (*BX-C*) (Lewis, 1978) die posterior thorakalen und alle abdominalen PSs (zusammengefasst in Peifer et al., 1987). Der *BX-C* besteht aus *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) und *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Abb. 1-5B) (Casanova et al., 1987; Sanchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985). Die Anordnung dieser Gene auf dem Chromosom ist analog zur Abfolge ihrer Expressionsdomänen entlang der A/P-Achse (Abb. 1-5C) (zusammengefasst in Duncan, 1987; Lewis, 1978), wobei *Abd-B* am weitesten posterior exprimiert wird (Harding et al., 1985).

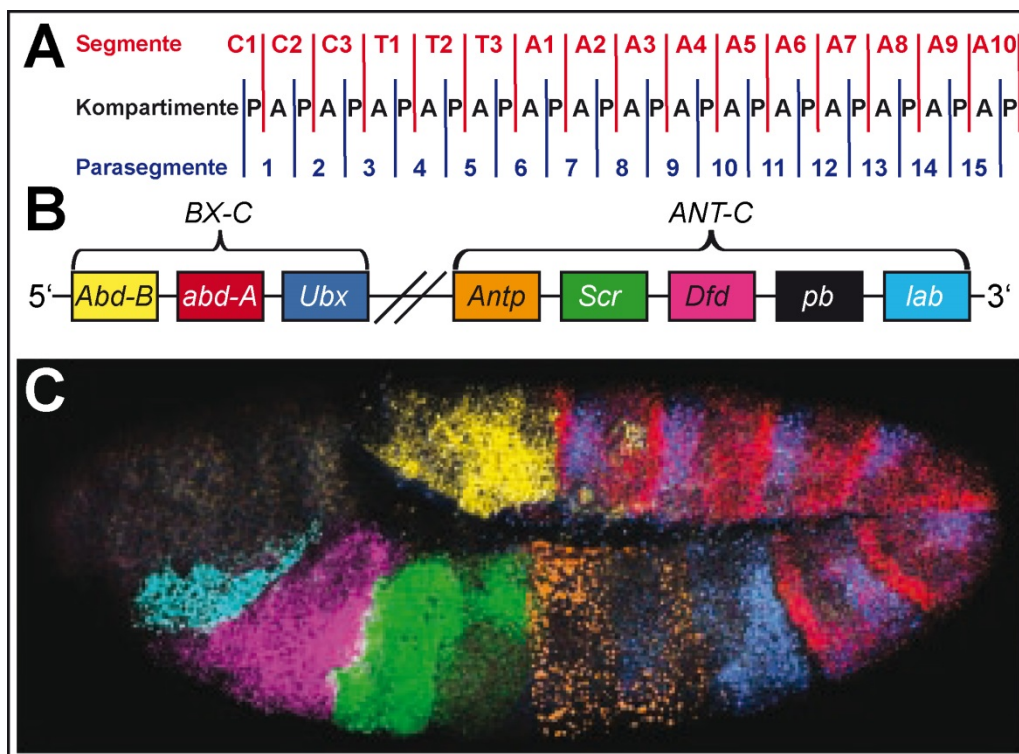


Abb. 1-5: Die *Hox*-Gene des *Antennapedia*- und *Bithorax*-Komplex

(A) Das vNS besteht aus drei Gnathalsegmenten (C1-C3), drei Thorakalsegmenten (T1-T3) und einer bislang unbekannt Anzahl an Abdominalsegmenten. Jedes Segment (in rot) ist aus einem etwas größeren anterioren Kompartiment (A) und einem kleineren posterioren Kompartiment (P) aufgebaut (in schwarz). Im Vergleich mit den Segmentsgrenzen erscheinen die PS-Grenzen (in blau) versetzt. (Abbildung aus Martinez-Arias und Lawrence, 1985)
 (B) Die Gene des *ANT-C* und *BX-C* liegen in zwei voneinander getrennten (durch zwei Striche dargestellt) Clustern auf Chromosom 3R. Der *ANT-C* besteht aus *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) und *Antennapedia* (*Antp*). (C) Die Abfolge der Gene auf dem Chromosom entspricht der Abfolge ihrer

Funktions- und Expressionsdomänen entlang der A/P-Achse (zusammengefasst in McGinnis und Krumlauf, 1992), die hier anhand einer Multiplex Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) eines St111 Embryos dargestellt sind; laterale Ansicht; anterior ist links. *pb* ist das einzige *Hox*-Gen dieser Cluster, dessen funktionelle- und Expressions-Domäne nicht mit seiner Position auf dem Chromosom übereinstimmt (Pultz et al., 1988) und bei dieser FISH nicht berücksichtigt wurde. (Abbildung aus Kosman et al., 2004)

Abd-B besteht aus zwei unterschiedlichen genetischen Elementen, die in verschiedenen Domänen aktiv sind: Die morphogenetische (m)-Subfunktion wird benötigt, um die morphologische Diversität der PSs 10-13 aufzubauen, während das regulatorische (r)-Element die Identität von PS14-15 vermittelt (Casanova et al., 1986).

caudal (cad) besitzt ebenfalls eine Homeodomäne und spezifiziert die Segmentidentität des letzten Abdominalsegments. Sein Funktionsverlust resultiert in einer Transformation in das nächste anteriore Segment und die Überexpression induziert ektopische Analstrukturen in anterioren Segmenten (Moreno und Morata, 1999). Insofern erfüllt es wichtige Kriterien der anerkannten *Hox*-Gene. Allerdings gehört *cad* nicht zum *BX-C*, sondern ist auf Chromosom 2L lokalisiert und gehört zur Gruppe der dispergierten *ParaHox*-Gene, welche paraloge Gene des *ANT-C* und *BX-C* darstellen.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Identität der vorhandenen NBs und deren Zellstammbäume im Thorax und anterioren Abdomen wurden intensiv untersucht und charakterisiert (Bossing et al., 1996; Broadus et al., 1995; Doe, 1992; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Dementgegen sind die neuralen Vorläufer in den terminalen abdominalen Neuromeren bislang weitgehend unbeschrieben.

So lag das erste Ziel dieser Arbeit darin, das Muster der vorhandenen NBs aufzuklären, um zu erfahren wie viele NBs in diesen Segmenten angelegt werden und um die Anzahl der terminal abdominal gebildeten Neuromere zu bestimmen. Dabei sollten auch mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Anlage dieser NBs berücksichtigt werden. Weiterhin sollte die Identität der anwesenden NBs aufgeklärt werden, um eine detaillierte NB-Karte für die terminale Abdominalregion zu erstellen. Die Identität der neuralen Vorläufer lässt sich durch die direkte Vergleichbarkeit mit seriell homologen NBs in anterior abdominalen Segmenten des gleichen Präparats untersuchen. Zu diesem Zweck wurde eine ganze Reihe an bislang beschriebenen molekularen Markern für NBs und deren Tochterzellen kombiniert. Durch die Expression einer bestimmten Kombination von molekularen Markern, dem Zeitpunkt der Delamination, der Position innerhalb eines HS und der Anwesenheit charakteristischer Tochterzellen, lässt sich die Existenz oder Abwesenheit spezifischer NBs dieser Region aufklären.

Von großem Interesse waren außerdem die embryonale und postembryonale Identifizierung der geschlechtsspezifischen NBs, die aus dieser Region hervorgehen, sowie die Charakterisierung

ihrer postembryonal gebildeten Tochterzellen. Auf Basis einer detaillierten Beschreibung dieser Zellen sollte eine Untersuchung sexualdifferenzierender Mechanismen auf NB-Ebene vorgenommen werden. Der Fokus wurde darauf gelegt, wie *dsx* die Bildung eines geschlechtsspezifischen postembryonalen Zellstammbaums reguliert.

Neben geschlechtsspezifischen Determinanten sollten auch Faktoren der A/P-Musterbildung identifiziert werden, welche die abgeleitete Morphologie der terminalen abdominalen Neuromere kontrollieren. Naheliegende Kandidaten sind die *Hox*-Gene, die in dieser Region exprimiert werden und für die Identität der terminalen abdominalen Neuromere verantwortlich sind. Das Hauptaugenmerk lag auf den Mechanismen, die zu einer NB-Reduktion in diesem Bereich führen. Ferner sollte untersucht werden, in wie weit solche Faktoren das Schicksal seriell homologer NBs beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Es wurden ausschließlich Chemikalien in Analysequalität verwendet, die von Roth, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen wurden. Abweichungen hiervon werden gesondert erwähnt.

AB-Komplex

300µl PBT

4µl Lösung A (Vectastain ABC Kit, Vector)

4µl Lösung B (Vectastain ABC Kit, Vector)

1h vor Verwendung auf Schüttler (100rpm, RT) inkubieren

A. dest._{DEPC}

1l A. dest.

1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)

über Nacht inkubieren und am nächsten Tag autoklavieren

Agarosegel (1,6%)

0,8g Agarose + 50ml TAE-Puffer aufkochen und in Gelapparatur füllen

während des Abkühlens 20µl Ethidiumbromid (1mg/ml) zufügen

Alkalische Phosphatase (AP)-Detektionspuffer

2ml 5M NaCl

5ml 1M MgCl₂

10ml 1M Tris-HCl (pH9,5)

0,1ml Tween 20

mit A. dest. auf 100ml auffüllen

AP-Färbelösung

1ml AP-Detektionspuffer

3µl 5% Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in 70% N,N-Dimethylformamid (DMF)

1,5µl 5% 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) in 100% DMF

Apfelsaftagar

28-32g Agar-Agar in 1l Apfelsaft aufkochen und in Kulturgefäße gießen

Lagerung bei 4°C

Chlorbleichlauge (7,5%)

15% Natriumhypochloritlösung mit Leitungswasser 1:1 verdünnt

DAB-Lösung

1 Tablette 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (10mg)

35ml PBT

aliquotieren und bei -20°C lagern

Fixativ für Embryonen

450µl PBS

500µl Heptan

50µl Formaldehyd (37%)

Futterbrei

230g Agar-Agar

700g Hefeflocken

250g Sojamehl

1500g Maismehl

2200g Malzextrakt

1100g Zuckerrübensaft

70g Nipagin

130ml Propionsäure

alle Zutaten werden in insgesamt 42l Wasser gelöst und aufgekocht

Glyzerol (70%)

70ml 100% Glyzerol

30ml PBS

HRP-Färbelösung

600µl PBT

400µl DAB-Lösung

2µl H₂O₂ (30%)

Hybridisierungslösung

12,5ml 20x Saline Sodium Citrat (SSC)-Puffer
12,5ml A. dest._{DEPC}
25ml Formamid
50µl Tween 20

LB_{Kanamycin}-Platten

15g Bacto-Agar pro Liter LB-Medium zugeben und autoklavieren
nach dem Abkühlen auf etwa 60°C noch 50mg Kanamycin zugeben und in sterile Petrischalen gießen
Lagerung bei 4°C

LB-Medium

10g Trypton
5g Hefeextrakt
10g NaCl
in 1l A. dest. lösen
pH7 mit 10M NaOH einstellen
autoklavieren und bei 4°C lagern
für LB_{Kanamycin} noch 50µg Kanamycin je ml LB-Medium zugeben

Natriumphosphatpuffer (0,1M)

500ml 0,1M Na₂HPO₄
mit 0,1M NaH₂PO₄ auffüllen bis pH7,4

Paraformaldehyd (PFA, 8%)

1,6g PFA in 20ml A. dest. lösen
140µl 1M NaOH zugeben
im Wasserbad auf 37°C erhitzen und durch Schütteln lösen
aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

PBL

1,8g Lysin-HCl
0,1M Na₂HPO₄ zugeben bis pH7,4
mit 0,1M Natriumphosphatpuffer auf 100ml auffüllen
bei 4°C etwa 3 Monate haltbar

20x PBS (Phosphate Buffered Saline, pH7,4)

500ml A. dest. (autoklaviert)

75,97g NaCl

4,14g Na₂HPO₄

9,94g NaH₂PO₄

pH7,4 mit HCl einstellen

in der gesamten Arbeit wird 1x PBS als PBS bezeichnet

PBT

300ml PBS

900µl Triton X-100

PBTween_{DEPC}

2,5ml 20x PBS

47,5ml A. dest._{DEPC}

50µl Tween 20

PLP-Fixativ

3Vol. PBL

1Vol. PFA (8%)

vor Nutzung auf 37°C erwärmen

SOC-Medium

20g Trypton

5g Hefeextrakt

0,5g NaCl

10ml 250mM KCl

pH7 mit 5M NaOH einstellen

mit A. dest. auf 990ml auffüllen

10ml steriles 1M MgCl₂ zugeben

20ml steril filtrierte 20%ige Glukoselösung zugeben

Lagerung bei 4°C

50x TAE-Puffer

242g Tris-HCl

57,1ml Eisessig

100ml 0,5M EDTA

pH8 mit HCl einstellen

mit A. dest. auf 1l auffüllen

Weitere verwendete Chemikalien, die bisher noch nicht in anderen Lösungen erwähnt wurden: Ethanol (100% und vergällt), Kohlendioxid, Lithiumchlorid, Methanol, Natriumazid.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie, 18x18mm- und 22x22mm-Deckgläser, DNA-Größenmarker Hyper ladder IV (Bioline), Etiketten, Feuerzeug, Gaze, Glaskapillaren, Knete, Kulturgefäße, 6x Ladepuffer (Thermo Scientific), Nagellack, Nitrilhandschuhe, Objektträger, Parafilm, Pasteurpipetten, Petrischalen, Polyethylenschlauch, gestopfte und ungestopfte Pipettenspitzen, Präpariernadeln, 1,5ml- und 2ml-Reaktionsgefäße, 15ml- und 50ml-Reaktionsgefäße, Schaumstoffstopfen, Tesafilm, Trockenhefe, weiße Wägeschälchen, Zahnstocher.

2.1.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Binokular	M8	Wild
Durchlichtmikroskop	Axioplan	Zeiss
Eismaschine	AF100	Scotsman
Feinwaage	AM50	Mettler
Fluoreszenzbinokular	MZFLIII	Leica
Fluoreszenzmikroskop	BX50WI	Olympus
Gelkamera	E-BOX VX2	Peqlab
Gelkammer	HE99X	Hoefer
Gelkammer	HE33	Hoefer
Heizblock	TB 1	Biometra
Inkubator	Fricocell	MMM Medcenter
Inkubator	WTB Binder	Labotec
Kamera	AxioCam MRm	Zeiss
Kamera	ProgRes 3012	Kontron
Lampe	KL1500 LCD	Schott
Laserscanningmikroskop	DMRE TCS SP2	Leica
Laserscanningmikroskop	DM TCS SP5	Leica
Magnetrührer	MR3001	Heidolph
Netzteil (Gelelektrophorese)	GPS 200/400	Pharmacia
PCR-Maschine	TGradient	Biometra
PCR-Maschine	TPersonal	Biometra
pH-Meter	CG840	Schott

Pipettensatz	Research	Eppendorf
Schüttler	VF2	Janke & Kunkel
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph
Schüttler	TPM-2	Sarstedt
Schüttler	Certomat SII	Braun
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
UV-Tisch	N90 M	MS Laborsysteme
Vertikalpuller	P-30	Sutter
Waage	PM 4600	Mettler
Wasserbad	1003	GFL
Zentrifuge	5417R	Eppendorf

Tab. 2-1: Verwendete Geräte

2.1.4 Software

Programm	Hersteller
Acrobat 9 Pro	Adobe
Amira 5.3.3	Visage Imaging
Axiovision 4.1.1	Zeiss
Chromas Lite 2.01.	Technelysium
EndNote X2	Thomson
FileMaker Pro 7	FileMaker
Flash Player 11	Adobe
Illustrator CS4	Adobe
Internet Explorer	Microsoft
LAS AF	Leica
Leica Confocal Software	Leica
Office 2010	Microsoft
Photoshop CS4	Adobe
Quick Time Player	Apple
Shock Wave Player	Adobe
Vector NTI 10	Invitrogen

Tab. 2-2: Verwendete Software

2.2 Fliegenarbeit

2.2.1 Fliegenhaltung

Drosophila wird auf Futterbrei kultiviert, der sich in mit Schaumstoffstopfen verschlossenen Kulturgefäßen befindet. Die Generationszeit der Fliegen beträgt bei 25°C etwa zwei Wochen, kann aber je nach Genotyp leicht variieren. Sobald die Tochtergeneration vollständig geschlüpft ist, sollten die Fliegen auf neue Kulturgefäße umgesetzt werden, um einen möglichen Befall mit Schimmel, Bakterien und Milben zu vermeiden und so eine konstante Populationsdichte aufrecht zu erhalten. Eine Verbreiterung von Fliegenstämmen kann erreicht werden, indem man die Fliegen schon nach wenigen Tagen auf neue Kulturgefäße transferiert und auch die Larven der alten Gefäße bis zur Imago entwickeln lässt. Fliegenstämme, die gerade nicht bearbeitet werden,

können bei 18°C kultiviert werden, wodurch sich deren Generationszeit verlängert und ein Umsetzen erst nach etwa vier bis sechs Wochen erforderlich ist.

2.2.2 Eiablagen

Um an Embryonen zu gelangen, werden die Fliegen bei 25°C auf Kulturgefäße mit Apfelsaftagar gesetzt, die zusätzlich mit Trockenhefe bestreut werden. Dies soll die Eiablagebereitschaft der Weibchen stimulieren. Benötigt man viele Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums, lässt man nur kurze Zeit vergehen und transferiert die Fliegen dann auf neue Gefäße; benötigt man eine heterogene Mischung, belässt man sie für längere Zeit oder auch über Nacht auf den Gefäßen. Je nach gewünschtem Entwicklungsstadium lässt man die Embryonen anschließend für eine bestimmte Zeit entwickeln, ehe sie fixiert werden (Kapitel 2.4.1.1).

2.2.3 Gewinnung von Larven

Zur Gewinnung von Larven bestimmter Entwicklungsstadien werden die Fliegen auf Futterbrei mit Trockenhefe kultiviert. Bei 25°C wird das L1-Larvenstadium bereits nach ca. 24h, L2 nach 48h und L3 72h nach der Eiablage erreicht. Etwa fünf Tage nach der Eiablage verlassen die Larven den Futterbrei und klettern am Rand der Kulturgefäße hinauf, ein Entwicklungsstadium, das man als Wanderlarve (L3late, L3l) bezeichnet. Anschließend beginnt die Puppenruhe. Bereits in der L2l-Larve ist es aufgrund der morphologischen Unterschiede der Gonaden möglich das Geschlecht der Larven zu unterscheiden.

2.2.4 Genetische Kreuzungen

Für die Kombination bestimmter Allele ist die Herstellung von neuen Fliegenstämmen erforderlich. Hierfür benötigt man jungfräuliche Weibchen eines Stammes, die noch nicht von den Männchen desselben Stammes befruchtet wurden. Dazu entfernt man alle bislang geschlüpften Fliegen eines Zuchtgefäßes und separiert die frisch geschlüpften Weibchen nach 4h unter CO₂-Betäubung von den Männchen. Die gesammelten Weibchen sind sicher jungfräulich, da die Aushärtung der Kutikula und damit die Funktionsfähigkeit des Geschlechtsapparates der Weibchen bei 25°C etwa 5h beansprucht. Eine Alternative stellt die Verwendung dominanter temperatursensitiver Mutationen (zusammengefasst in Suzuki, 1970) auf dem Y-Chromosom dar (z.B. *DTS-4*). Diese werden durch die Aufzucht unter restriktiven Bedingungen (29°) induziert und führen zu präadulter Letalität in den Männchen, so dass alle überlebenden weiblichen Nachkommen sichere Jungfrauen darstellen. Diese können anschließend gezielt mit den Männchen eines anderen Stammes verkreuzt werden.

2.2.5 Balancerchromosomen

Viele mutante Fliegenstämme sind homozygot nicht adult lebensfähig oder steril. Im heterozygoten Zustand jedoch können Mutationen leicht durch Rekombination verloren gehen, selbst wenn das mutierte Chromosom mit genetischen Markern versehen ist. Aus diesem Grund nutzt man sog. „Balancerchromosomen“, die längere Inversionen beinhalten, welche den Großteil des Chromosoms abdecken und Rekombinationen in diesem Bereich unterdrücken (zusammengefasst in Lindsley und Zimm, 1992). Zusätzlich tragen sie rezessive Letalallele, so dass die Balancerchromosomen selbst nicht homozygot lebensfähig sind. Außerdem besitzen sie dominante Marker, die sich in der Larve oder Imago leicht identifizieren lassen. Aber auch embryonal können Balancerchromosomen nachgewiesen werden: Hierfür nutzt man Reportergene auf dem Balancerchromosom, die früh in der Embryogenese exprimiert werden und die über eine Farbreaktion bzw. Antikörperfärbung nachgewiesen werden können oder eine Eigenfluoreszenz besitzen. Durch den Einsatz von Balancern ist es somit möglich zwischen homo- und heterozygoten Individuen zu differenzieren.

2.2.6 Das Gal4/UAS-System

Neben der Analyse von Mutationen, besteht in *Drosophila* die Möglichkeit Gene ektopisch zu exprimieren. Dazu wird mittlerweile vorwiegend das sog. „Gal4/UAS-System“ (Brand und Perrimon, 1993) eingesetzt. Hierbei wird der transkriptionelle Aktivator Gal4, welcher ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt, unter die Kontrolle eines Treibergens gebracht. Jedes Mal wenn der Enhancer des Treibergens transkriptionell aktiv wird, wird gleichzeitig auch Gal4 exprimiert. Gal4 bindet spezifisch an sog. „UAS-Sequenzen“ („upstream activating sequences“) und führt zur Expression eines Zielgens, das hinter die UAS-Sequenz kloniert wurde. Der Gal4-Treiber und die UAS-Sequenz sind in unterschiedlichen Fliegenstämmen vorhanden, die zunächst miteinander verkreuzt werden müssen, um die ektopische Expression des Zielgens in der Folgegeneration zu induzieren (Abb. 2-1). Diese Separation bietet den großen Vorteil, dass unterschiedliche Treiberlinien mit verschiedenen UAS-Stämmen kombiniert werden können. Mittlerweile ist eine Unmenge an Gal4- und UAS-Linien öffentlich zugänglich (z.B. Bloomington Stock Center, Kyoto Stock Center, etc.), so dass sich die Expression vieler Gene in zeitlich definiertem, zell- oder gewebespezifischem Kontext genau analysieren lässt.

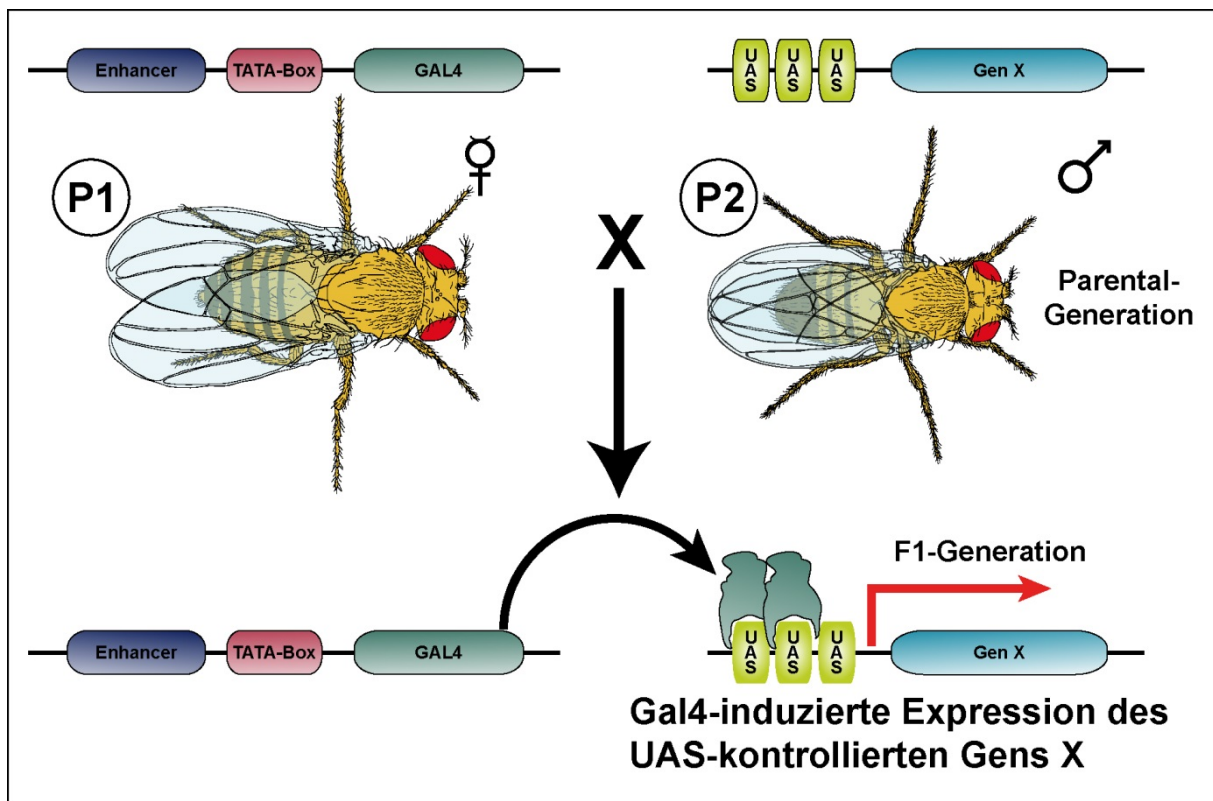


Abb. 2-1: Das Gal4/UAS-System

Im Parentalstamm 1 (P1) steht Gal4 (dunkelgrün) unter der Kontrolle eines Enhancers (blau). Diese Fliegen werden mit P2 verkreuzt, der ein Zielgen X (türkis) unter UAS-Kontrolle (hellgrün) besitzt. In der Filialgeneration 1 (F1) kommt es dann durch die Aktivität des Enhancers zur Bildung von Gal4, welches an UAS-Sequenzen bindet und somit zu einer zeitlich und räumlich definierten Expression des Zielgens X führt. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Christian Berger)

2.2.7 RNA-Interferenz

Die Mutantanalyse wird oftmals dadurch beschränkt, dass viele Gene pleiotrope Funktionen in unterschiedlichen Geweben besitzen oder ihr „Knockdown“ schon sehr früh in der Entwicklung zu Letalität führt. Die RNA-Interferenz (RNAi) bietet durch den Einsatz von doppelsträngigen RNAs die Möglichkeit sequenzspezifische mRNAs zu degradieren (zusammengefasst in Siomi und Siomi, 2009). Durch die Kombination mit dem Gal4/UAS-System besteht in *Drosophila* die Möglichkeit nahezu jedes proteinkodierende Gen in zeitlich und räumlich definiertem Rahmen spezifisch auszuschalten. Dazu wurden transgene Linien geschaffen, die doppelsträngige hairpin RNAs unter UAS-Kontrolle exprimieren und zu einem spezifischem Knockdown von Ziel-mRNAs in Gal4-abhängiger Weise führen (Dietzl et al., 2007; Ni et al., 2008). Da das Gal4/UAS-System temperatursensitiv ist, wurden in dieser Arbeit alle RNAi Experimente bei 29°C durchgeführt, um eine möglichst starke Expression der doppelsträngigen hairpin RNAs zu erzielen, die in einem effizienten Knockdown von Zielgenen resultiert.

2.2.8 G-Trace

G-Trace (Gal4-technique for real-time and clonal expression) ermöglicht eine klonale Analyse von Reporter-gen-exprimierenden Zellen (Evans et al., 2009). Neben dem Gal4/UAS-System beruht G-Trace v.a. darauf, dass eine Flipase homologe Rekombination an FRT-Stellen (flipase recombination target) katalysiert, ein System, das aus *Saccharomyces cerevisiae* ins *Drosophila* Genom eingebracht wurde (Golic und Lindquist, 1989). Durch die Verwendung eines beliebigen Gal4-Treibers kommt es unter UAS-Kontrolle zur Expression des RFP-Reportergens (rote „Realtime-Expression“). Gleichzeitig wird in denselben Zellen aber auch eine Flipase aktiviert, die ebenfalls unter UAS-Kontrolle steht. Die Flipase katalysiert die Exzision einer Stop-Kassette, die zwischen zwei FRTs liegt und die Expression eines GFP-Reporters verhindert. So kommt der GFP-Reporter mit etwas Verzögerung unter die Kontrolle eines ubiquitären Promotors und die Zellen exprimieren dann sowohl RFP als auch GFP. Kommt es anschließend zu einem Abschalten des Gal4-treibenden Enhancers wird zwar die RFP-Expression herunter reguliert, aber durch den ubiquitären Promotor wird eine unabhängige, dauerhafte Expression von GFP in den Zellen aufrecht erhalten (grüne „Lineage-Expression“) (Abb. 2-2). Wird die Exzision der Stop-Kassette in einer Stammzelle katalysiert, werden auch alle von ihr gebildeten Tochterzellen durch GFP markiert, selbst wenn sie selbst niemals den Gal4-Treiber exprimiert haben (klonale Abhängigkeit).

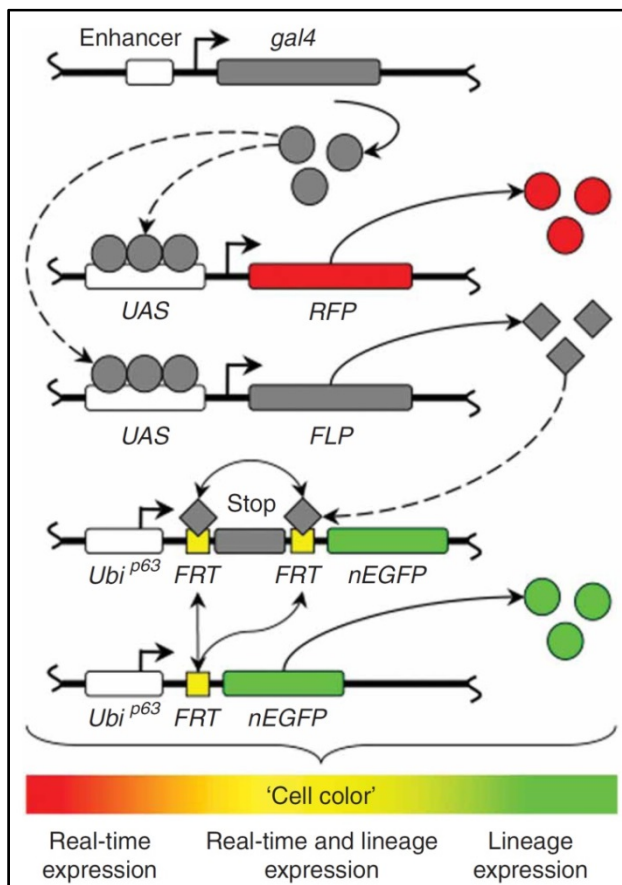


Abb. 2-2: Das G-Trace-System

Gal4 wird in Enhancer-abhängiger Weise exprimiert und führt durch seine Bindung an UAS-Sequenzen zu einer Expression von RFP (rot). Gleichzeitig bindet Gal4 aber auch an UAS-Sequenzen, die zur Expression einer Flipase (FLP) führen. Diese Flipase katalysiert die Exzision einer Stop-Kassette, die zwischen zwei FRTs liegt, so dass der Ubiquitin-p63 Promotor die Expression eines nukleären Enhanced GFP (nEGFP)-Reporters (grün) treibt. (Abbildung aus Evans et al., 2009)

2.2.9 Flybow

Das Flybow-System gestattet die Auftrennung komplexer Gal4-Muster durch die Expression unterschiedlicher fluoreszenter Reporter gene im gleichen Präparat (Hadjieconomou et al., 2011). Ermöglicht wird dies durch eine modifizierte Flipase (*hs-mFlp5*), die unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors steht und sich durch die Induktion von Wärme in bestimmten Zellen per Zufall aktivieren lässt. Sie kann sowohl reversible Inversionen, wenn die modifizierten FRTs (*mFRT71*) in entgegengesetzter Orientierung auf dem Chromosom lokalisiert sind, als auch irreversible Exzisionen, wenn die modifizierten FRTs in gleicher Orientierung sind, katalysieren. Dadurch kommt es zu einer zufälligen Substitution des Reporters *CD8::EGFP* durch *PM::mCitrine*, *CD8::mCherry* oder *CD8::Cerulean-V5*, der nach Beendigung des Hitzeschocks auch stabil exprimiert wird. Erfolgt dieser Austausch in einer Stammzelle, so exprimieren auch alle von dieser Stammzelle, in klonaler Abhängigkeit gebildeten Tochterzellen denselben Reporter. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich *Flybow1.1* verwendet (Abb. 2-3), welches mit *hs-mFlp5*, *doublesex*-Gal4 Fliegen verkreuzt wurde. Nach der Eiablage (3h) wurden die Embryonen für 6h bei 25°C gehalten und befanden sich dann etwa im St11-12. Es folgte ein erster zweistündiger Hitzeschock im 37°C Wasserbad. Nach weiteren 13h bei 25°C (St17) erfolgte ein zweiter zweistündiger Hitzeschock. Schlüpfende Larven wurden auf Kulturgefäße mit Formular 4-24 Fertigmedium (Carolina Biological Supply Company) überführt und als L31-Larven präpariert (Kapitel 2.4.1.2).

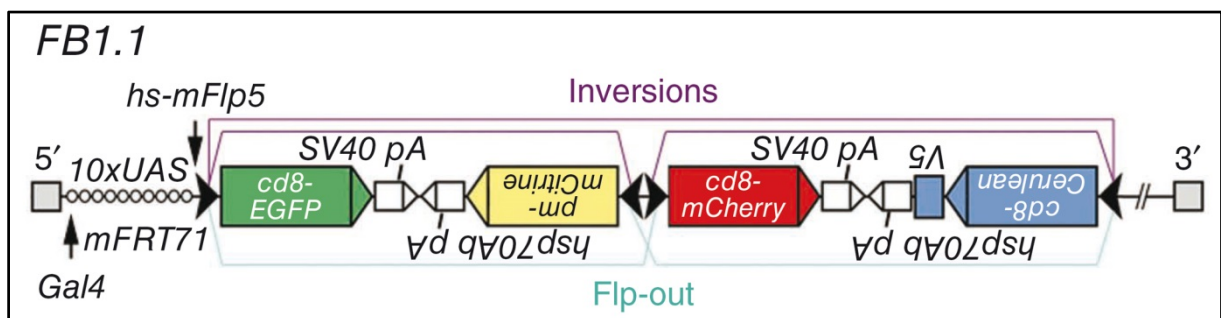


Abb. 2-3: Das Flybow-System

Das unter der Kontrolle eines beliebigen Enhancers stehende Gal4 bindet an zehn UAS-Sequenzen und führt zur Expression von *CD8::EGFP* (Grundzustand). Kommt es durch die Induktion von Wärme zur Aktivierung von *hs-mFlp5*, katalysiert diese sowohl Inversionen (entgegengesetzte Orientierung) als auch Exzisionen (gleiche Orientierung) an *mFRT71* (Pfeilspitzen), die zu einem Austausch des Reporters führen können. Alle fluoreszenten Proteine besitzen SV40 und ein eigenes Polyadenylierungssignal (pA). (Abbildung aus Hadjieconomou et al., 2011)

2.2.10 Verwendete Fliegenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft/Referenz
Oregon-R	Wildtyp	Bloomington (BL-5)
<i>hs-mFlp5</i>	<i>hs-mFlp5</i> /Gla, Bc; TM2/TM6b	Dafni Hadjieconomou (Hadjieconomou et al., 2011)
lacZ-Stämme		
<i>gooseberry distal-lacZ</i>	<i>gsb-d-lacZ</i> [01155]/CyO	Marta Moris-Sanz
<i>engrailed-lacZ</i>	<i>en-lacZ</i> /CyO	Alfonso Martinez-Arias (Hama et al., 1990)
<i>huckebein-lacZ</i>	<i>hkb-lacZ</i> [5953]	Chris Doe (Doe, 1992)
<i>ming-lacZ</i>	<i>ming-lacZ</i> [1530]/TM3	Chris Doe (Doe, 1992)
<i>mirror-lacZ</i>	<i>mirr-lacZ</i> /TM3	Chris Doe (Broadus et al., 1995)
<i>seven up-lacZ</i>	<i>syp-lacZ</i> [H162]/TM3	Chris Doe (Doe, 1992)
<i>wingless-lacZ</i>	<i>wg-lacZ</i>	Chris Doe (Broadus et al., 1995)
<i>unplugged-lacZ</i>	<i>unpg-lacZ</i> [1912]/CyO	Jonathan Benito-Sipos (Doe, 1992)
mutante Stämme		
<i>Abdominal-B^{D18}</i>	<i>Abd-B^{D18}</i> /TM6, <i>Dfd-lacZ</i>	Ernesto Sánchez-Herrero (Hopmann et al., 1995)
<i>Abdominal-B^{M1}</i>	<i>mm</i> , <i>Abd-B^{M1}</i> /TM6b	Ernesto Sánchez-Herrero (Sanchez-Herrero et al., 1985)
<i>Abdominal-B^{M3}</i>	<i>mm</i> , <i>Abd-B^{M3}</i> /TM3, <i>hb-lacZ</i>	Ernesto Sánchez-Herrero (Sanchez-Herrero et al., 1985)
<i>Abdominal-B^{M5}</i>	<i>mm</i> , <i>Abd-B^{M5}</i> /TM6b, <i>iab2-lacZ</i>	Ernesto Sánchez-Herrero (Sanchez-Herrero et al., 1985)
<i>Abdominal-B^{Uabl}</i>	<i>FRT82B</i> , <i>Ubx^{bx3}</i> , <i>Abd-B^{Uabl}</i> /TM3	Ernesto Sánchez-Herrero (Karch et al., 1985)
<i>caudal²</i>	<i>pr¹</i> , <i>cad²</i> , <i>FRT40A</i> /CyO	Bloomington (BL-7091) (Macdonald und Struhl, 1986)
<i>Ultrabithorax^{MX12}</i> , <i>abdominal-A^{M1}</i> , <i>Abdominal-B^{M8}</i>	<i>Ubx^{MX12}</i> , <i>abd-A^{M1}</i> , <i>Abd-B^{M8}</i> /TM6b, <i>iab2-lacZ</i>	James Castelli-Gair Hombría (Casanova et al., 1987)
Defizienzen		
<i>Df(3L)H99</i>	<i>Df(3L)H99</i> /TM6b, <i>iab2-lacZ</i>	Ana Rogulja-Ortmann (White et al., 1994)
<i>Df(3R)C4</i>	<i>Df(3R)C4</i> /Dp(3:3)P5	François Karch (Karch et al., 1985)
Gal4-Linien		
<i>CQ2-Gal4</i>	<i>CQ2-Gal4</i>	Matthias Landgraf (Landgraf et al., 2003a)
<i>doublesex-Gal4</i>	<i>dsx-Gal4</i> /TM6b	Carmen Robinett (Robinett et al., 2010)
<i>eagle-Gal4</i>	<i>eg-Gal4</i> [Mz360]	(Ito et al., 1995)
<i>eagle-Gal4</i> , UAS- <i>nGFP</i>	<i>eg-Gal4</i> , UAS- <i>nGFP</i> /TM3	Olaf Vef
<i>embryonic lethal abnormal vision-Gal4</i>	<i>elav-Gal4</i>	Corey Goodman (Lin und Goodman, 1994)
<i>eve^{RRK}-Gal4</i>	UAS- <i>CD8::GFP</i> ; <i>eve^{RRK}-Gal4</i> /TM6b	Matthias Landgraf (Fujioka et al., 2003)
<i>inscuteable-Gal4</i>	<i>insc-Gal4</i> [Mz1407]	(Ito et al., 1995)

<i>inscuteable</i> -Gal4, UAS- <i>CD8::GFP</i>	<i>insc</i> -Gal4, UAS- <i>CD8::GFP</i> /CyO	Christian Berger
<i>ladybird early [K]</i> -Gal4	<i>lbe[K]</i> -Gal4, UAS- <i>mycEGFP</i> /CyO, <i>Dfd</i> -YFP; <i>lbe[K]</i> -Gal4, UAS- <i>mycEGFP</i> /TM6b, <i>Dfd</i> -YFP	Stefan Thor (Baumgardt et al., 2009)
<i>Mz97</i> -Gal4	<i>Mz97</i> -Gal4	(Ito et al., 1995)
<i>Pox neuro</i> -Gal4	<i>Poxn</i> -Gal4, UAS- <i>GFP</i> /TM6b	Markus Noll (Boll und Noll, 2002)
<i>scabrous</i> -Gal4	<i>sca</i> -Gal4	Uwe Hinz (Klaes et al., 1994)
UAS-Linien		
UAS- <i>Abdominal-B.m</i>	UAS- <i>Abd-B.m1.1</i>	James Castelli-Gair Hombria (Castelli-Gair et al., 1994)
UAS- <i>Abdominal-B.r</i>	UAS- <i>Abd-B.r</i> /FM7, <i>ftz-lacZ</i>	James Castelli-Gair Hombria (Rivas et al., 2013)
UAS- <i>Abdominal-B-RNAi</i>	UAS- <i>Abd-B-RNAi</i>	Bloomington (BL-26746) (Ni et al., 2009)
UAS- <i>caudal</i>	UAS- <i>cad</i>	Ulrich Schäfer (Moreno und Morata, 1999)
UAS- <i>caudal</i>	UAS- <i>cad</i>	Mi-Ae Yoo (Hwang et al., 2002)
UAS- <i>CD8::GFP</i>	UAS- <i>CD8::GFP</i> /Y, <i>DTS4</i>	Olaf Vef
UAS- <i>doublesex-RNAi</i>	UAS- <i>dsx-RNAi</i>	Vienna Drosophila <i>RNAi</i> Center (#110306)
UAS- <i>doublesex[F]</i>	UAS- <i>dsx[F]</i>	Michelle Arbeitman (Lee et al., 2002)
UAS- <i>doublesex[M]</i>	UAS- <i>dsx[M]</i> /CyO, GFP	Michelle Arbeitman (Lee et al., 2002)
UAS- <i>Flybow 1.1</i>	UAS- <i>Flybow 1.1</i> /Gla, Bc	Dafni Hadjieconomou (Hadjieconomou et al., 2011)
UAS- <i>G-Trace</i>	UAS- <i>nRFP</i> , UAS- <i>Flp</i> , UAS> <i>Stop</i> > <i>nEGFP</i>	Bloomington (BL-28281) (Evans et al., 2009)
UAS- <i>nGFP</i>	UAS- <i>nGFP</i> /Y, <i>DTS4</i>	Olaf Vef
UAS- <i>P35</i>	UAS- <i>P35</i> [<i>BH2</i>]	Bloomington (BL-5073) (Hay et al., 1994)
UAS- <i>P35</i> , UAS- <i>nGFP</i>	UAS- <i>P35</i> , UAS- <i>nGFP</i> /CyO, <i>ftz-lacZ</i>	Ana Rogulja-Ortmann
UAS- <i>transformer-RNAi</i>	UAS- <i>tra-RNAi</i>	Bloomington (BL-28512) (Ni et al., 2009)
UAS- <i>transformer2-RNAi</i>	UAS- <i>tra2-RNAi</i>	Bloomington (BL-28018) (Ni et al., 2009)
Balancer-Stämme		
CyO, <i>ftz-lacZ</i> /Pm		Olaf Vef
CyO, <i>twi-lacZ</i> /Pm; TM6b, <i>iab2-lacZ</i> /CxD		Olaf Vef
CyO, <i>wg-lacZ</i> / <i>noc</i> [<i>Sco</i>]		Olaf Vef
FM7, <i>ftz-lacZ</i> / <i>N</i> , <i>Bx</i>		Olaf Vef
TM3, <i>Dfd</i> -YFP/CxD		Olaf Vef
TM6b, <i>iab2-lacZ</i> /TM3, <i>Kr</i> -GFP		Olaf Vef

Tab. 2-3: Verwendete Fliegenstämme

2.3 Molekularbiologische Methoden


2.3.1 Herstellung von RNA-Sonden

Da RNA-Sonden relativ instabil und sehr anfällig für allgegenwärtige Ribonukleasen (RNAsen) sind, sollten bei deren Herstellung Nitril-Handschuhe getragen werden, alle eingesetzten Lösungen, falls möglich, autoklaviert werden und gestopfte Pipettenspitzen verwendet werden. Zudem werden alle wässrigen Lösungen mit DEPC angesetzt, welches zur Inaktivierung von RNAsen führt. Es wurden RNA-Sonden für *Abdominal-B.m* (*Abd-B.m*) und *Abdominal-B.r* (*Abd-B.r*) hergestellt. *Abd-B.m* (616bp) ist gegen die N-terminale proteinkodierende Sequenz (CDS) des A-Transkripts gerichtet, *Abd-B.r* (220bp) hybridisiert mit zwei Exons, die in allen r-spezifischen Transkripten vorhanden sind (Abb. 3-26A).

2.3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung definierter Sequenzbereiche, die zwischen zwei Primern lokalisiert sind. Die Sonden wurden durch PCR aus den complementary DNAs (cDNAs) pAB713 (*Abd-B.m*) und pAB728 (*Abd-B.r*) (Kuziora und McGinnis, 1988) (zur Verfügung gestellt von Jesús Romero Pozuelo) nach folgendem Protokoll amplifiziert:

0,3µl cDNA (100ng/µl) im Bluescribe Vektor
 5µl 10x PCR-Puffer inkl. KCl (Thermo Scientific)
 1µl dNTPs (10mM) (Thermo Scientific)
 1µl Forward-Primer (Biomers) (20µM in EB-Puffer, Qiagen)
 1µl Reverse-Primer (Biomers) (20µM in EB-Puffer, Qiagen)
 3µl MgCl₂ (25mM) (Thermo Scientific)
 1,25µl Taq-Polymerase (1U/µl) (Thermo Scientific)
 37,45µl A. dest.

99°C		Deckel vorheizen	
94°C	15min	Denaturierung	
94°C	30sec	Denaturierung	 (40x)
51°C	30sec	Annealing	
72°C	70sec	Elongation	
72°C	10min	finale Elongation	
4°C		Ende	

Folgende Primer kommen dabei zum Einsatz:

Name	Sequenz
<i>Abd-B.m</i> Upstream	CAACAGCAGCAGCAGCAGCAG
<i>Abd-B.m</i> Downstream	CACTGGAGGGAGAAACACTCGC
<i>Abd-B.r</i> Upstream	GACCAAAGCACTACCCAAATAACTG
<i>Abd-B.r</i> Downstream	CTGTGGGATGGGAACTGACGC

Tab. 2-4: Verwendete Primer

Die Amplifizierung wird mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Je nach Hintergrund an unspezifischem PCR-Produkt werden die Amplifikate entweder einer PCR-Aufreinigung (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) oder einer Gelextraktion (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) unterzogen.

2.3.1.2 Klonierung

Anschließend werden die Amplifikate in pDrive (QIAGEN PCR Cloning Kit, Qiagen) eingebracht und in XL1-Blue (Stratagene) transformiert. Nach der Transformation werden die Bakterien zunächst in 250µl sterilem SOC-Medium inkubiert (1h, 220rpm, 37°C) und dann auf einer LB_{Kanamycin}-Platte ausplattiert, die über Nacht bei 37°C inkubiert wird. Am darauf folgenden Nachmittag wird eine Bakterienkolonie dazu verwendet, um mit Hilfe eines Zahnstochers eine Flüssigkultur von 3ml LB_{Kanamycin}-Medium anzupflanzen (16h, 220rpm, 37°C). Am nächsten Morgen erfolgt die Aufreinigung des Plasmids (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen), welches anschließend unter Verwendung eines T7-Primers sequenziert wird (StarSEQ). Nachdem die Integration der cDNA durch Sequenzierung bestätigt wurde, erfolgt eine Restriktion mit Sall (Thermo Scientific). Nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym wird der restringierte Vektor mit 1/10Vol. 2M NaCl_{DEPC} und 2,5Vol. 100% Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wird die Fällung 1h zentrifugiert (14000rpm, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 70% Ethanol_{DEPC} gewaschen. Es wird erneut zentrifugiert (10min, 14000rpm, 4°C) und auch dieser Überstand verworfen, ehe das Sediment getrocknet wird. Nachdem der restringierte Vektor in 16µl A. dest._{DEPC} gelöst wurde, werden 2µl davon auf einem Agarosegel (1,6%) kontrolliert.

2.3.1.3 *in vitro*-Transkription

Bei vollständigem Verdau werden die restlichen 14µl des linearisierten Vektors für die *in vitro*-Transkription eingesetzt, die unter Verwendung eines T7-Primers mit Hilfe des Digoxygenin (DIG)- bzw. Fluorescein (FITC)-Labeling Mix (Roche) durchgeführt wird. Hierbei wird die RNA-Sonde durch die im Mix enthaltene RNA-Polymerase synthetisiert. Anschließend wird der Vektor, der als Matrize diente, durch 2µl DNaseI (Roche) für 15min bei 37°C verdaut und

danach werden 2µl 0,2M EDTA_{DEPC} zugegeben, um die Reaktion wieder abzustoppen. Es folgt eine Fällung der RNA-Sonde mit 2,5µl 4M LiCl_{DEPC} und 70µl 100% Ethanol über Nacht bei -20°C. Nach Zentrifugation (1h, 14000rpm, 4°C) wird der Überstand verworfen und das Sediment wird mit 70% Ethanol_{DEPC} gewaschen. Anschließend wird erneut zentrifugiert (10min, 14000rpm, 4°C), der Überstand verworfen und nach kurzer Trocknung wird die RNA-Sonde in 50µl A. dest._{DEPC} aufgenommen. Nachdem noch 0,5µl RNase-Inhibitor (Thermo Scientific) zugefügt wurden, wird die Sonde bei -20°C aufbewahrt und kann für eine *in situ*-Hybridisierung (Kapitel 2.4.3) eingesetzt werden.

2.4 Immunohistochemie

2.4.1 Fixierung

2.4.1.1 Fixierung von Embryonen

Zunächst wird die äußere Eihülle der Embryonen, das sog. „Chorion“ chemisch entfernt. Dazu überschichtet man die auf den Kulturgefäßen mit Apfelsaftagar befindlichen Embryonen (Kapitel 2.2.2) für ca. 3min mit 7,5%iger Chlorbleichlauge. Danach werden die Embryonen in ein modifiziertes 50ml Reaktionsgefäß eingespült, welches mit einem Gazenetzen (Maschenweite 150µm) verschlossen ist. Die Embryonen werden mit Leitungswasser gespült und bleiben am Gazenetzen haften, während die Chlorbleichlauge ausgewaschen wird. Danach lassen sich die Embryonen mit einem Skalpell in das vorbereitete 1,5ml Reaktionsgefäß mit Fixativ überführen.

Die Fixierung erfolgt für 23min in einem Gemisch aus PBS, Formaldehyd (bilden zusammen die wässrige untere Phase) und Heptan (organische obere Phase) bei kräftigem Schütteln (900rpm, RT). Heptan wird für die Permeabilisierung der Zellmembran benötigt, Formaldehyd vernetzt die Proteine der Zelle. Die Embryonen sammeln sich an der Phasengrenze, an der die innere Eihülle, die sog. „Vitellinmembran“, durch Scherkräfte abgelöst wird. Nach der Fixierung wird die untere Phase durch Methanol ersetzt und die Embryonen werden für 1min intensiv geschüttelt. Devitellinisierte Embryonen sinken auf den Boden des Reaktionsgefäßes ab. Dieser Vorgang wird nochmals wiederholt und danach wird der komplette Überstand entfernt und durch Methanol ersetzt. Dieser sog. „Spülvorgang“ mit Methanol wird insgesamt viermal durchgeführt, um Reste von Heptan zu beseitigen. Danach wird das Methanol noch zweimal durch vergällten Ethanol ersetzt, welcher auf Dauer schonender für das Gewebe der fixierten Embryonen ist. So lassen sie sich für längere Zeit bei -20°C lagern oder direkt für eine Antikörperfärbung (Kapitel 2.4.2) bzw. *in situ*-Hybridisierung (Kapitel 2.4.3) einsetzen.

2.4.1.2 Fixierung des larvalen Zentralnervensystems

Die Larven definierter Stadien (Kapitel 2.2.3) werden mit einer Federstahlpinzette aus den Kulturgefäßen in schwarze, mit kaltem 0,1M Natriumphosphatpuffer gefüllte Präparationsnapfchen überführt. Durch die Kälte wird der Bewegungsdrang der Larven herabgesetzt und Balancertiere lassen sich anhand ihrer Morphologie (z.B. Tubby) oder aufgrund einer Reportergernefluoreszenz unter dem Fluoreszenzbinokular erkennen und aussortieren. Das larvale ZNS wird mit zwei feinen Pinzetten (Dumont 55) unter dem Binokular präpariert. Dafür werden die Larven zunächst mittig halbiert. Der vordere Teil enthält das ZNS und wird durch die Mundöffnung von innen nach außen gestülpt. Das ZNS befindet sich immer in der Nähe der dunklen Mundwerkzeuge. Fettgewebe und Darmreste werden vorsichtig entfernt, wobei das ZNS an der Kutikula mit den Mundwerkzeugen verbleibt, um es während der vielen Schritte der Antikörperfärbung (Kapitel 2.4.2) nicht zu verlieren. Mit der Pinzette kann die Kutikula gegriffen werden, an der das ZNS anhängt, und in ein vorbereitetes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt werden, welches ebenfalls 0,1M Natriumphosphatpuffer enthält und sich auf Eis befindet. Nach Beenden der Präparation, spätestens nach 30min, wird der Puffer im Reaktionsgefäß durch 400µl PLP-Fixativ ersetzt. Die Fixierung von L3l Zentralnervensystemen wird für 45min, die von L2l- und L3e-Larven für lediglich 30min (100rpm, RT) durchgeführt. Anschließend wird das Fixativ durch mehrmaliges Spülen mit PBT entfernt. Das larvale ZNS sollte möglichst schnell einer Antikörperfärbung unterzogen werden und lässt sich im präparierten Zustand relativ schlecht über einen längeren Zeitraum lagern.

2.4.2 Antikörperfärbung

2.4.2.1 Inkubation von primären Antikörpern

Die fixierten Embryonen bzw. larvalen Zentralnervensysteme werden zunächst zweimal kurz mit PBT gespült. Danach werden sie bei RT für 10min auf dem Schüttler (100rpm) in PBT inkubiert, welches anschließend wieder durch frisches PBT ersetzt wird. Dieser sog. „Waschschritt“ wird insgesamt viermal durchgeführt. Die Inkubation der in PBT verdünnten, primären Antikörper erfolgt in der Regel bei 4°C über Nacht (ca. 80rpm). Um einer Schimmelbildung vorzubeugen werden alle primären Antikörper mit Natriumazid versetzt (finale Konzentration 0,01%) und können nach der Inkubation bei 4°C gelagert und wiederverwendet werden.

2.4.2.2 Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verd.	Herkunft/Referenz
Abdominal-A	Maus	1:200	Ian Duncan (Kellerman et al., 1990)
Abdominal-B	Maus	1:20	DSHB (Celniker et al., 1989)
Beta-Galaktosidase	Huhn	1:1000	Abcam
Castor	Kaninchen	1:500	Ward Odenwald (Kambadur et al., 1998)
Caudal	Kaninchen	1:100	Paul Macdonald (Macdonald und Struhl, 1986)
Caudal	Meerschweinchen	1:400	John Reinitz (Kosman et al., 1998)
Dbx	Meerschweinchen	1:1500	James Skeath (Lacin et al., 2009)
Deadpan	Kaninchen	1:100	Harald Vaessin (Bier et al., 1992)
DIG-AP	Schaf	1:1000	Roche
Doublesex	Ratte	1:100	Michelle Arbeitman (Sanders und Arbeitman, 2008)
Eagle	Kaninchen	1:500	(Dittrich et al., 1997)
Eagle	Maus	1:100	Chris Doe (Karcavich und Doe, 2005)
Embryonic lethal abnormal vision	Ratte	1:2000	DSHB
Empty spiracles	Ratte	1:1000	Uwe Walldorf (Walldorf und Gehring, 1992)
Engrailed	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Even skipped	Kaninchen	1:1000	Manfred Frasch (Frasch et al., 1987)
Even skipped	Meerschweinchen	1:500	John Reinitz (Kosman et al., 1998)
Eyeless	Kaninchen	1:1000	Uwe Walldorf (Kammermeier et al., 2001)
FITC-AP	Schaf	1:1000	Roche
GFP	Kaninchen	1:500	Torrey Pines Biolabs
GFP	Maus	1:250	Roche
Gooseberry distal	Ratte	1:2	Robert Holmgren (Zhang et al., 1994)
Gooseberry proximal	Ratte	1:2	Robert Holmgren (Zhang et al., 1994)
Hunchback	Meerschweinchen	1:1000	Joachim Urban (Mettler et al., 2006)
Invected	Maus	1:2	DSHB (Patel et al., 1989)
Ladybird early	Maus	1:2	Krzysztof Jagla (Jagla et al., 1997)
mCherry	Kaninchen	1:500	Bio Vision
Miranda	Kaninchen	1:100	Jürgen Knoblich (Betschinger et al., 2006)
Muscle segment homeobox	Kaninchen	1:500	Matthew Scott
Nazgul	Kaninchen	1:400	Benjamin Altenhein (von Hilchen et al., 2010)
Orthodenticle	Meerschweinchen	1:500	Tiffany Cook (Xie et al., 2007)
P35	Maus	1:100	Bruce Hay (Yoo et al., 2002)
Reversed polarity	Meerschweinchen	1:10000	Benjamin Altenhein
RFP	Kaninchen	1:500	MBL
Runt	Meerschweinchen	1:500	John Reinitz (Kosman et al., 1998)
Sex lethal	Maus	1:10	DSHB (Bopp et al., 1991)
Ultrabithorax	Maus	1:20	DSHB (White und Wilcox, 1984)
Ventral nervous system defective	Kaninchen	1:2000	Fernando Jimenez (McDonald et al., 1998)
Wrapper	Maus	1:20	DSHB (Noordermeer et al., 1998)

Tab. 2-5: Verwendete Primärantikörper

2.4.2.3 Inkubation von sekundären Antikörpern

Nach der Entfernung der primären Antikörper werden die Embryonen bzw. larvalen Zentralnervensysteme zweimal kurz mit PBT gespült und anschließend viermal mit PBT auf dem Schüttler gewaschen (100rpm, RT), um Reste von unspezifisch gebundenem Primärantikörper zu beseitigen. Dann erfolgt die Inkubation der in PBT verdünnten sekundären Antikörper (2h, 100rpm, RT).

2.4.2.3.1 Fluoreszenzfärbungen

Da fluoreszent gekoppelte Sekundärantikörper lichtempfindlich sind, sollten alle verwendeten Reaktionsgefäße mit Aluminiumfolie umwickelt werden. Nach der Inkubation werden die Sekundärantikörper verworfen und nicht gebundene Antikörper werden durch zweimaliges Spülen und viermal zehnmütiges Waschen mit PBT (100rpm, RT) entfernt. Es wird noch zweimal kurz mit PBS gespült und danach werden die Embryonen bzw. larvalen Zentralnervensysteme in Mounting Medium (Vector)/70% Glyzerol (1:1) überführt, wodurch das Ausbleichen der fluoreszent gekoppelten Sekundärantikörper verhindert werden soll. So können die Embryonen bzw. larvalen Zentralnervensysteme bei 4°C im Dunkeln bis zur Dokumentation (Kapitel 2.4.4) gelagert werden.

2.4.2.3.2 Sichtbarer Nachweis durch Alkalische Phosphatase

Die zwei nicht-fluoreszenten Nachweismethoden (Kapitel 2.4.2.3.2 und 2.4.2.3.3) wurden ausschließlich für Antikörperfärbungen an Embryonen genutzt. Nach der Entfernung von unspezifisch gebundenem Sekundärantikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBT, werden die Embryonen für zweimal 5min in AP-Detektionspuffer inkubiert (100rpm, RT). Dann werden sie in ein weißes Wägeschälchen überführt und die Farbreaktion wird durch die Zugabe der AP-Färbelösung induziert. Die am Sekundärantikörper gebundene AP reduziert NBT zu braunem Diformazan und oxidiert BCIP über Indoxyl zu blauem Indigo. Daraus resultiert eine violette Mischfarbe, deren Intensität mit zunehmender Zeitdauer ansteigt. Die Farbreaktion wird unter dem Binokular kontrolliert und nach ausreichender Färbung werden die Embryonen zurück ins Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Spülen mit PBT wird die Reaktion zunächst stark verlangsamt, ehe das Enzym schließlich durch eine fünfminütige Inkubation mit Methanol (100rpm, RT) vollständig inaktiviert wird. Es folgt zweimal kurzes Spülen mit PBT und zweimal mit PBS. Dann werden die Embryonen in 70% Glyzerol überführt und lassen sich so dauerhaft bei RT lagern.

2.4.2.3.3 Sichtbarer Nachweis durch Meerrettichperoxidase

Bei Verwendung von Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpern wird nach der Entfernung von unspezifischem Sekundärantikörper zunächst für 1h ein AB-Komplex, bestehend aus Avidin, Streptavidin und Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP), inkubiert (100rpm, RT). Avidin und Streptavidin besitzen jeweils vier Bindestellen für Biotin und so werden gleich mehrere Moleküle HRP pro Biotin gebunden, was letztendlich zu einer enormen Signalverstärkung führt. Unspezifischer AB-Komplex wird durch zweimaliges Spülen und viermal zehnmütiges Waschen mit PBT (100rpm, RT) entfernt. Danach wird durch die Zugabe der HRP-Färbelösung die Farbreaktion gestartet, die ebenfalls in einem Wägeschälchen unter dem Binokular beobachtet wird. HRP katalysiert die Oxidation von DAB, wobei H₂O₂ als Oxidationsmittel fungiert. Nach ausreichender Braunfärbung werden die Embryonen zurück ins Reaktionsgefäß überführt und die Farbreaktion wird durch dreimaliges Spülen mit PBT abgebrochen. Danach werden die Embryonen noch zweimal mit PBS gespült und dann in 70% Glycerol überführt, wo sie bei RT dauerhaft gelagert werden können.

Werden sowohl AP- als auch Biotin-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, sollte zunächst die AP-Reaktion durchgeführt werden, da der braune Niederschlag der HRP-Reaktion nur noch ein abgeschwächtes AP-Signal zulässt.

2.4.2.4 Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verd.	Herkunft
Huhn – Cy3	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Huhn – Cy5	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Huhn – DyLight488	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Huhn – DyLight549	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Huhn – DyLight649	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Huhn - FITC	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen – Alexa488	Esel	1:500	Life Technologies
Kaninchen – Alexa546	Esel	1:500	Life Technologies
Kaninchen – Alexa568	Ziege	1:500	Life Technologies
Kaninchen – Alexa647	Esel	1:500	Life Technologies
Kaninchen - AP	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen - Biotin	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen – Cy3	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen – Cy5	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen – DyLight488	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen – DyLight549	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen – DyLight649	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Kaninchen - FITC	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Maus – Alexa488	Esel	1:500	Life Technologies
Maus – Alexa568	Ziege	1:500	Life Technologies
Maus – Alexa647	Esel	1:500	Life Technologies
Maus - AP	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories

Maus - Biotin	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories
Maus – Cy3	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Maus – Cy5	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Maus – DyLight488	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Maus – DyLight549	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Maus – DyLight649	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Maus - FITC	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Meerschweinchen – Cy3	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Meerschweinchen – Cy5	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Meerschweinchen – DyLight488	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Meerschweinchen – DyLight549	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Meerschweinchen – DyLight649	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Meerschweinchen - FITC	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Ratte – Alexa633	Ziege	1:500	Life Technologies
Ratte – Cy3	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Ratte – Cy5	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Ratte – DyLight488	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Ratte – DyLight649	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories
Ratte - FITC	Esel	1:250	Jackson Immunoresearch Laboratories

Tab. 2-6: Verwendete Sekundärantikörper

2.4.3 *in situ*-Hybridisierung mit anschließender Antikörperfärbung

Fixierte Embryonen (Kapitel 2.4.1.1) werden fünfmal für 10min mit PBTween_{DEPC} gewaschen (100rpm, RT). Danach werden sie für 5min in PBTween_{DEPC} /Hybridisierungslösung (1:1) und anschließend für 5min in Hybridisierungslösung inkubiert (100rpm, RT). Die Hybridisierungslösung enthält Formamid, das die Stringenz, mit der die Sonde an die RNA bindet, erhöht und so die Hybridisierungstemperatur absenkt. Es folgt mindestens 1h Prähybridisierung (5µl einzelsträngige Heringssperm-DNA (Roche) in 500µl Hybridisierungslösung) bei 55°C (350rpm). Die Heringssperm-DNA bindet an unspezifische Bindestellen und sättigt diese ab, bevor die eigentliche RNA-Sonde an sie bindet, was zu Hintergrundsignal führen würde. Die Sonden werden in Prähybridisierungslösung verdünnt, für 10min bei 95°C aufgekocht und dann auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgt bei 55°C (350rpm) über Nacht.

Name	Konzentration	Markierung	Herkunft/Referenz
<i>Abdominal-B.m</i>	1:5000	FITC	selbst hergestellt (Kapitel 2.3.1)
<i>Abdominal-B.r</i>	1:1000	DIG	selbst hergestellt (Kapitel 2.3.1)
<i>intermediate neuroblasts defective</i>	1:800	DIG	Matthew Scott (Urbach und Technau, 2003b)

Tab. 2-7: Verwendete RNA-Sonden

Am nächsten Tag wird die Sonde entfernt, die bei -20°C gelagert und wiederverwendet werden kann, und es folgt 20min stringentes Waschen in Hybridisierungslösung (300rpm, 65°C). Danach wird einmal für 20min in Hybridisierungslösung/PBTween_{DEPC} (1:1) gewaschen und dann viermal

für 20min in PBTween_{DEPC} (300rpm, 65°C). Es folgt noch einmal Waschen mit PBTween_{DEPC} bei RT (100rpm). Danach wird der primäre Antikörper (anti DIG- oder anti FITC-AP verdünnt in PBTween_{DEPC}) für 1,5h inkubiert (100rpm, RT). Um unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen wird anschließend dreimal mit PBTween_{DEPC} gespült und dreimal mit PBTween_{DEPC} gewaschen (100rpm, RT). Es folgt die AP-Signaldetektion, wie in Kapitel 2.4.2.3.2 beschrieben. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion sind keine RNase-freien Bedingungen mehr nötig und es erfolgt ein H₂O₂-Waschschritt (100µl H₂O₂ (30%) in 900µl PBT, 10min, 100rpm, RT), um freie Peroxidasen zu zerstören, die ansonsten zu Hintergrund in der anschließenden Antikörperfärbung führen würden. Danach wird mehrfach mit PBT gespült und es erfolgt die Inkubation eines primären Antikörpers wie in Kapitel 2.4.2.1 beschrieben. Dann folgt die Inkubation des Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers und dessen Nachweis, wie in Kapitel 2.4.2.3 und 2.4.2.3.3 beschrieben. Nach dem Abbruch der HRP-Farbreaktion werden die Embryonen noch einmal für 5min nachfixiert (100µl Formaldehyd (37%) in 900µl PBT, 100rpm, RT), da die *in situ*-Hybridisierung die Embryonen sehr aufweicht. Die Nachfixierung wird durch dreimaliges Spülen mit PBT und zweimaliges Spülen mit PBS abgebrochen, ehe die Embryonen in 70% Glycerol eingebettet werden.

2.4.4 Präparation und Dokumentation

2.4.4.1 Filetpräparation von Embryonen

Die Embryonen werden nach der *in situ*-Hybridisierung (Kapitel 2.4.3) bzw. Antikörperfärbung (Kapitel 2.4.2) auf einen Objektträger überführt und die gewünschten Stadien (gemäß Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) unter dem Binokular mit einer Präpariernadel herausgesucht. Balancertiere können aufgrund einer Reporterexpression aussortiert werden. Um eine bessere Aufsicht auf das embryonale Nervensystem zu erlangen, werden die Embryonen mit feinen Glaskapillaren des Typs GB100-T8P (Science Products) filetpräpariert. Bei St9-12 Embryonen wird dazu der dorsale Keimstreifen umgeklappt und der Embryo wird mit der Ventralseite nach oben auf dem Objektträger positioniert. St13-17 Embryonen werden mit der Ventralseite nach unten positioniert und anterior geöffnet. Gehirn und Darm werden vollständig entfernt. Präparierte Embryonen werden in einem Tropfen 70% Glycerol/Mounting Medium (1:1) (bei fluoreszent gefärbten Embryonen) bzw. 70% Glycerol (bei nicht-fluoreszent gefärbten Embryonen) mit einem Deckglas abgedeckt, wobei etwas Knete als Abstandhalter fungiert, so dass die Embryonen nicht zerdrückt werden. Der Rand des Deckglases wird mit klarem Nagellack fixiert.

2.4.4.2 Feinpräparation des larvalen Zentralnervensystems

Das larvale Zentralnervensystem wird nach der Antikörperfärbung (Kapitel 2.4.2) auf einem Objektträger unter dem Binokular mit feinen Pinzetten in 70% Glycerol/Mounting Medium (1:1) frei präpariert. Die ihm anhängenden Imaginalscheiben und die verbliebene Kutikula werden vorsichtig entfernt. Anschließend wird das vNS mit der Ventralseite nach oben, auf den Gehirnhemisphären aufliegend, positioniert und mit einem Deckglas abgedeckt (Knete als Abstandshalter), welches mit klarem Nagellack fixiert wird.

2.4.4.3 Dokumentation

Die Präparation von Embryonen und larvalen Zentralnervensystemen erfolgt am Binokular M8 (Wild), ausgestattet mit der Lampe KL1500 LCD (Schott).

Fluoreszent markierte Balancerlarven werden mit dem Fluoreszenzbinokular MZFLIII (Leica) aussortiert.

Die Beurteilung der Qualität von Fluoreszenzfärbungen und das Aussortieren von fluoreszent markierten Balancerembryonen werden am aufrechten Fluoreszenzmikroskop BX50WI (Olympus), welches mit der Kamera AxioCam MRm (Zeiss) ausgestattet ist, durchgeführt. Das Mikroskop verfügt über folgende Objektive: 10x, 20x, 50x und 63x (Wasserobjektiv).

Die eigentliche Dokumentation der Fluoreszenzfärbungen erfolgt mit dem aufrechten Laserscanningmikroskop DMRE TCS SP2 (Leica), ausgestattet mit den Objektiven: 10x, 20x, 40x (Immersionöl) und 63x (Immersionöl) bzw. dem inversen Laserscanningmikroskop DM TCS SP5 (Leica), ausgestattet mit den Objektiven: 10x, 20x, 40x (Immersionöl) und 63x (Glycerol).

Die Dokumentation von nicht-fluoreszenten Färbungen erfolgt am aufrechten Mikroskop Axioplan (Zeiss) mit Kamera ProgRes 3012 (Kontron), ausgestattet mit den Objektiven: 10x, 20x, 40x, 63x (Immersionöl) und 100x (Immersionöl).

Die gewonnenen Fluoreszenzbilder werden mit der Leica Confocal Software und LAS AF bearbeitet. Anschließend werden alle Bilder mit Photoshop CS4 bearbeitet und mit Illustrator CS4 zusammengestellt und beschriftet.

3 Ergebnisse

3.1 Muster und Identität der Neuroblasten in der terminalen Abdominalregion

3.1.1 Gesamtanzahl und Verteilung der vorhandenen Neuroblasten

Um das NB-Muster der terminalen abdominalen Neuromere zu beschreiben, wurde zunächst untersucht wie viele NBs in dieser Region überhaupt angelegt werden. Dazu wurde eine Antikörperfärbung an fixierten Wildtyp (WT) Embryonen durchgeführt. Um potenzielle Unterschiede in der NB-Anzahl zwischen den Geschlechtern zu berücksichtigen, wurde auch die Expression von *Sxl* berücksichtigt, welches nur in den weiblichen Embryonen ubiquitär exprimiert wird (Abb. 1-4) (Bopp et al., 1991). Dadurch lassen sich männliche und weibliche Embryonen noch vor der anschließenden Filetpräparation voneinander separieren (Abb. 3-1A). Die Zuordnung von NBs zu bestimmten Segmenten erfolgte mit Hilfe des Segmentpolaritätsgens *engrailed* (*en*), welches in jedem posterioren Kompartiment eines Segments exprimiert wird (DiNardo et al., 1985). Der letzte vollständige *En*-Streifen im vNS konnte Segment A9 zugeordnet werden, während in A10 nur noch der mediane NB (MNB) *En* exprimiert und als Rudiment eines *En*-Streifens in A10 angesehen werden kann. Die Identifizierung von NBs in den terminalen Neuromeren erfolgte aufgrund ihrer subektodermalen Position und der Expression des universellen NB-Markers *Deadpan* (*Dpn*) (Bier et al., 1992). Das Auszählen von NBs erfolgte im frühen Stadium 12 (St12 early, St12e), da zu diesem Zeitpunkt alle terminalen NBs delaminiert sind und die segmentalen Einheiten noch gut dargestellt werden können. NBs konnten in A8, A9 und A10 identifiziert werden. Sowohl die Größe der Neuromere als auch die Anzahl an NBs nimmt von anterior nach posterior ab (Abb. 3-1B). In A8 konnten $30,44 \pm 0,51$ ($n = 16$), in A9 $20,8 \pm 0,68$ ($n = 15$) und in A10 $11,47 \pm 0,74$ ($n = 15$) *Dpn*-positive Zellen pro Hemineuromer identifiziert werden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen festgestellt werden (Abb. 3-1C).

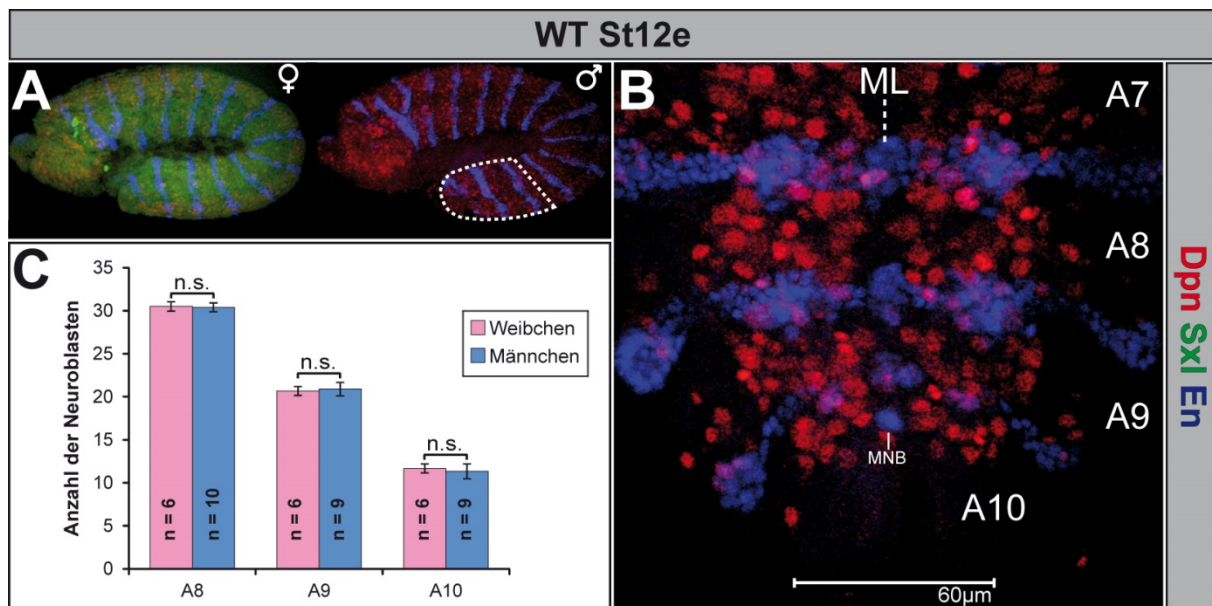


Abb. 3-1: Verteilung und Anzahl an Neuroblasten in terminalen abdominalen Hemisegmenten
(A, B) Whole Mounts (laterale Ansicht, A) und Filetpräparation (horizontale Ansicht, B) von WT Embryonen (St12e) nach Antikörperfärbung gegen Dpn, Sxl und En. **(A)** Weibliche (links) und männliche (rechts) Embryonen lassen sich anhand ihrer Sxl-Expression voneinander unterscheiden. Der hervorgehobene Ausschnitt im Männchen ist in **(B)** nach Filetpräparation in Vergrößerung dargestellt. ML = Mittellinie; die Segmente sind rechts angegeben. Die Größe der Neuomere nimmt von A8-A10 ab. **(C)** Gesamtanzahl der NBs in terminalen abdominalen Hemineuomeren von Männchen und Weibchen. Es wurde ein zweiseitiger t-test durchgeführt. n.s., nicht signifikant ($P > 0.05$). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

3.1.2 Identität der anwesenden Neuroblasten

3.1.2.1 Neuroblastenmarker

Im Gehirn und anterioren Bauchmark konnten alle NBs aufgrund der Expression einer bestimmten Kombination von molekularen Markern, ihrer Position und dem Zeitpunkt ihrer Delamination eindeutig identifiziert werden (Broadus et al., 1995; Doe, 1992; Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003a; Urbach und Technau, 2003b; R. Urbach, unveröffentlicht). Um die Identität der vorhandenen NBs in den terminalen abdominalen Neuomeren aufzuklären, wurde eine ganze Reihe dieser zuvor verwendeten molekularen Marker (Antikörper, *in situ*-Sonden und lacZ-Stämme) an fixierten Embryonen kombiniert. Durch die direkte Vergleichbarkeit mit den seriell homologen NBs in anterior abdominalen Neuomeren des gleichen Präparats ließ sich die Existenz oder Abwesenheit spezifischer NBs aufklären. Untersucht wurden vorwiegend St12e Embryonen; bei Markern die in einer großen Anzahl von NBs exprimiert werden (z.B. *svp-lacZ*), wurden aufgrund der Überschaubarkeit der bereits delaminierten NBs auch frühere Stadien analysiert.

3.1.2.1.1 Segmentpolaritätsgene

Segmentpolaritätsgene wurden in allen untersuchten Präparaten als Marker verwendet, um Segmente zuordnen zu können. Schon ab dem Zeitpunkt der Gastrulation werden sie in definierten Kompartimenten aller Segmente exprimiert und später in den NBs, die aus diesen Domänen hervorgehen (z.B. Bhat, 1996; Skeath et al., 1995). Sie unterliegen der Kontrolle durch die übergeordneten Paarregelgene, regulieren sich aber auch gegenseitig (zusammengefasst in Ingham, 1991).

Neben dem bereits vorgestellten *en* wurde v.a. auch *gooseberry distal* (*gsb-d*) verwendet, welches anterior von *En* exprimiert wird, mit diesem jedoch in seiner posterioren Expressionsdomäne überlappt (Gutjahr et al., 1993). Im Gegensatz zu *En* wird *gsb-d* auch in einem Streifen in A10 exprimiert, sowie in den „Anal Pads“, die sich A11 zuordnen lassen (Baumgartner et al., 1987; Gutjahr et al., 1993). Im vNS wird *gsb-d* in allen NBs der Reihen 5, 6 und NB7-1 exprimiert (Abb. 1-1) (Broadus et al., 1995). Durch die Kombination mit *En* und dem vielfach verwendeten Marker *Eagle* (*Eg*), einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in NB2-4, NB3-3, NB6-4 und NB7-3 (Abb. 1-1) (Broadus et al., 1995), sowie in allen von diesen NBs gebildeten, embryonalen Tochterzellen exprimiert wird (Dittrich et al., 1997; Higashijima et al., 1996), ließen sich alle *Eg*-positiven NBs in A8 eindeutig identifizieren (Abb. 3-2A). Im Gegensatz dazu fehlen NB2-4 und NB7-3 in A9 und A10, während NB3-3 in A9 und NB6-4 in A10 vorhanden ist (Abb. 3-2A, B). Des Weiteren konnten durch die Kombination von *gsb-d-lacZ* und *Eyeless* (*Ey*), einem Transkriptionsfaktor aus der *Pax*-Genfamilie, der im Thorax in sechs verschiedenen NBs pro Hemineuromer (NB3-2, NB4-2, NB4-3, NB4-4, NB5-3 und NB7-3) exprimiert wird (R. Urbach, unveröffentlicht), auch alle *Ey*-positiven NBs in A8 zweifelsfrei identifiziert werden. Bei NB7-3 handelt es sich um den einzigen *Ey*-positiven NB, der in A9 abwesend ist, während in A10 alle *Ey*-positiven NBs, außer NB5-3 (Co-Expression von *gsb-d*), fehlen (Abb. 3-2B; Abb. 3-6D).

mirror (*mirr*)-*lacZ* wird im Thorax und anterioren Abdomen in NBs der Reihen 1 und 2, sowie in NB3-2, NB3-4, NB6-1 und dem MNB exprimiert (Abb. 1-1) (Broadus et al., 1995). Durch die Kombination mit *Eg* und *En* konnte die Anwesenheit von NB3-4 (A8-A10), NB1-2 (A8-A9), NB6-1 und NB2-4 (A8) eindeutig festgestellt werden, während NB2-3 in keinem der terminalen Segmente identifiziert werden konnte. NB2-1 und NB2-2 konnten in A8-A10 zugewiesen werden. Während *mirr-lacZ* nur im MNB von A8, aber nicht im MNB von A9 und A10 exprimiert wird, ist die Expression in NB1-1 (A8-A9) und NB2-5 (A8-A9) nur transient (nicht gezeigt). Außerdem konnte keine *mirr-lacZ*-Expression in NB1-3 (A8-A9), NB3-2 (A8-A9), sowie dem Longitudinalen Glioblasten (LGB) (A8-A10) festgestellt werden, obwohl jene NBs in diesen Segmenten vorhanden sind (Abb. 3-2C). Diese Beobachtung deckt sich mit vorhergehenden

Untersuchungen im Thorax, in der ebenfalls keine *mirr*-Expression in diesen drei NBs festgestellt werden konnte (R. Urbach, unveröffentlicht).

wingless (*wg*)-*lacZ*-Expression ist direkt anterior vom En-Streifen zu finden und ist auf NBs der Reihe 5 beschränkt (Abb. 1-1) (Doe, 1992). Durch die Co-Expression mit dem Paarregelgen *Runt* (*Run*) (Kapitel 3.1.2.1.2) ließen sich NB5-2 und NB5-3 in A9 und A10, sowie NB5-4 in A9 aufgrund seiner Lage eindeutig identifizieren. NB5-1 ist der einzige NB aus Reihe 5, der in A9 nicht existiert (Abb. 3-2D).

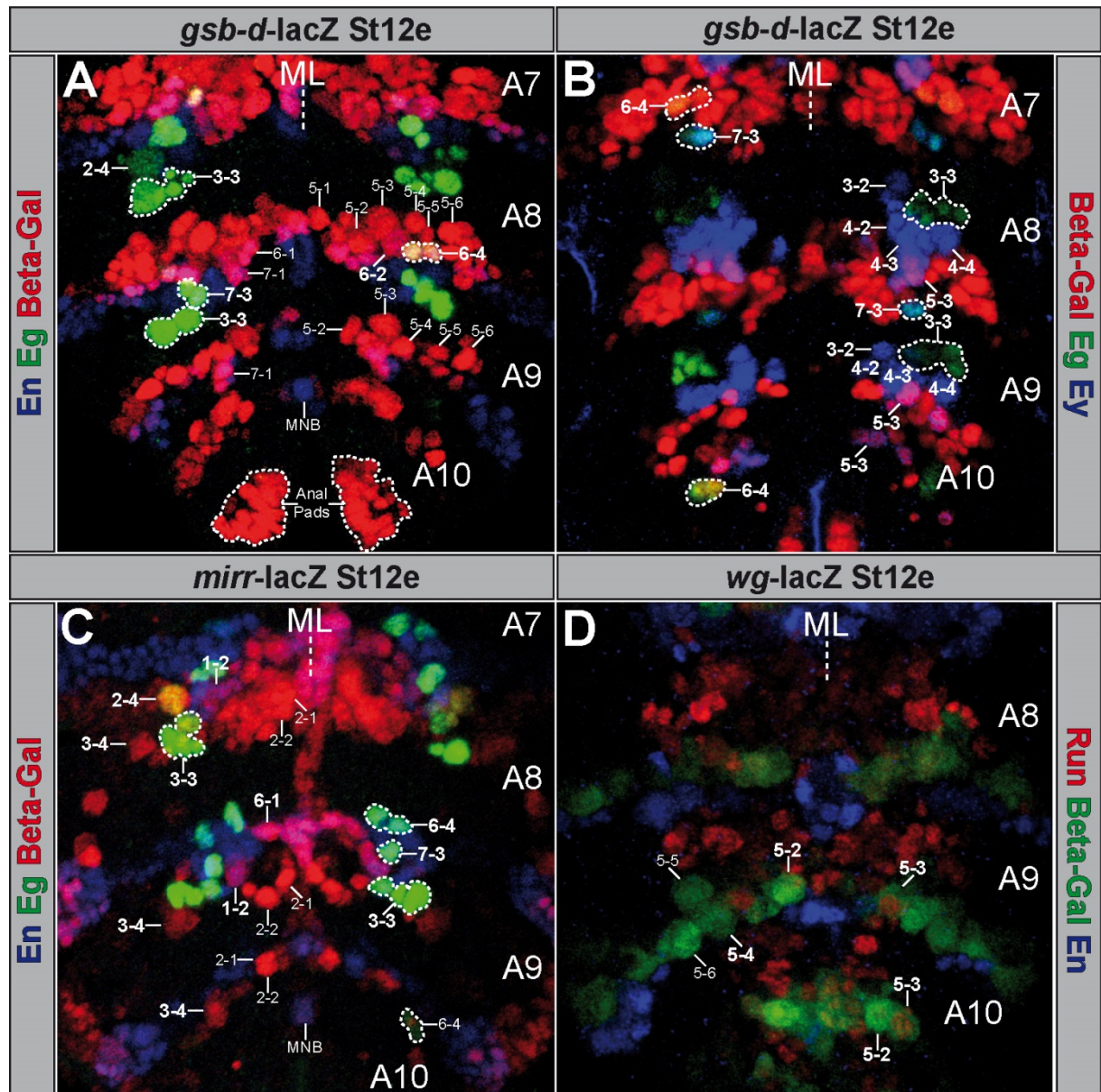


Abb. 3-2: Expression von Segmentpolaritätsgenen in Neuroblasten

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12e Embryonen des angegebenen Genotyps. NBs, die sich aufgrund ihrer Markerfärbung(en) und Position eindeutig identifizieren lassen, sind fett hervorgehoben; identifizierte Tochterzellen sind umrandet und der NB von dem sie abstammen, ist ebenfalls fett angezeigt. Die Segmente sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A) *En*, *Eg* und *gsb-d* wurden immer wieder als segmentale Marker verwendet. (B) *Ey* wird in sechs verschiedenen NBs exprimiert, von denen lediglich NB7-3 in A9 fehlt und nur NB5-3 in A10 vorhanden ist. Man beachte die Existenz von NB6-4 in A10 (Co-Expression *Eg* und *gsb-d-lacZ*). (C) *mirr-lacZ* wird vorwiegend in NBs des anterioren Kompartiments exprimiert. (D) *wg-lacZ* wird in Reihe 5-NBs exprimiert.

3.1.2.1.2 Paarregelgene

Die initiale Expression der Paarregelgene beginnt schon im synzytialen Blastoderm. Sie werden durch die übergeordneten Lückengene kontrolliert und unterteilen durch ihre Streifenexpression den Embryo erstmals in metamere Einheiten (PSs) entlang der A/P-Achse (zusammengefasst in Carroll, 1990). Viele Paarregelgene werden jedoch auch später exprimiert und besitzen weitere Funktionen.

Das Paarregelgen *run* spielt z.B. auch eine wichtige Rolle bei der NB-Spezifizierung und wird in sieben NBs der anterioren Körpersegmente exprimiert (NB2-2, NB2-3, NB3-1, NB3-2, NB3-3, NB5-2 und NB5-3) (Dormand und Brand, 1998). Eine Tripelfärbung mit En und *ming-lacZ* (*castor (cas)-lacZ*), das eine wichtige Rolle bei der temporären Spezifizierung von NBs spielt (Isshiki et al., 2001), erwies sich jedoch als relativ wertlos. Denn die Expression von *ming-lacZ* in den terminalen Neuromeren erschien sehr variabel und viele der zuvor als *ming*-positiv deklarierten NBs des Thorax und anterioren Abdomens (Abb. 1-1) (Doe, 1992) ließen sich nicht zuordnen (Abb. 3-3A) (siehe Kapitel 4.1).

Die meisten NBs exprimieren zumindest transient den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Seven up (*Svp*) (Abb. 1-1) (Doe, 1992), der die Expression temporärer Spezifizierungsgene in NBs kontrolliert (Kanai et al., 2005; Mettler et al., 2006). Deshalb wurde *svp-lacZ* als Marker verwendet, um NBs der unterschiedlichen Delaminationswellen zu untersuchen. Durch die Co-Expression mit Run konnte die Existenz von NB5-2 und NB5-3 in A8 und A9 bestätigt werden. Außerdem konnte das Vorhandensein der großen, lateralen S1-NBs (NB2-5, NB3-5 und NB5-6) in A8 und A9 beobachtet werden. NB7-1 scheint, trotz seiner Anwesenheit in A9, kein *svp-lacZ* zu exprimieren. Auffällig ist auch, dass im Gegensatz zum En-Streifen in A8 überhaupt keine *svp-lacZ*-positiven NBs im En-Streifen von A9 zu finden waren (Abb. 3-3B).

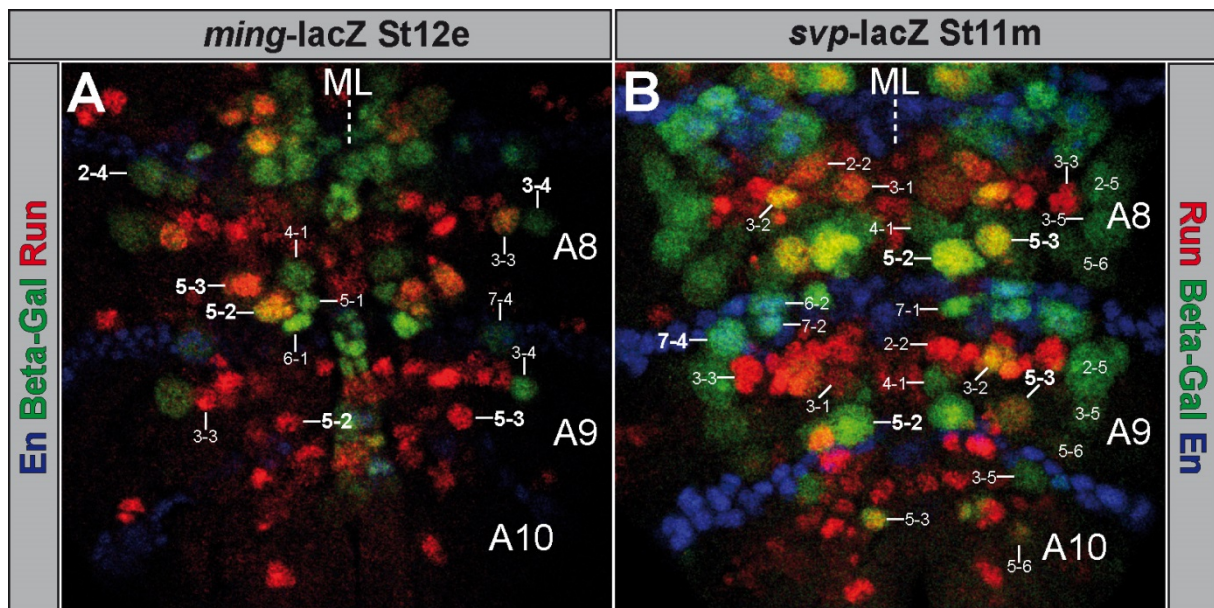


Abb. 3-3: Expression von Paarregelgenen in Neuroblasten

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St11m und St12e Embryonen des angegebenen Genotyps. NBs, die sich aufgrund ihrer Markerfärbung(en), Delaminationszeitpunkts und Position eindeutig identifizieren lassen, sind fett hervorgehoben. Die Segmente sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. **(A)** Run wird in sieben verschiedenen NBs exprimiert. Die Expression von *ming-lacZ* weicht allerdings stark vom Expressionsmuster in anterioren Neuromeren ab. **(B)** *svp-lacZ* wird in fast allen NBs transient exprimiert. Zum dargestellten Zeitpunkt (S3/S4) ist das *svp-lacZ*-Muster jedoch noch übersichtlicher, da einige NBs noch gar nicht delaminiert sind oder *svp-lacZ* noch nicht exprimieren. In A10 sind zu diesem Zeitpunkt nur drei *svp-lacZ*-positive NBs zu finden (NB3-5, NB5-3, NB5-6).

3.1.2.1.3 Lückengene

Lückengene unterteilen den Embryo in breite Domänen und werden selbst von den Maternal-Effekt-Genen kontrolliert (zusammengefasst in Gaul und Jäckle, 1990).

Das Lückengen *empty spiracles (ems)* wird während der embryonalen Neurogenese in NB3-5, NB4-4 und einigen ihrer Tochterzellen, wie auch im NB3-3 exprimiert (Hartmann et al., 2000). Durch die Kombination mit *svp-lacZ* konnten alle drei NBs in A8 und A9 eindeutig identifiziert werden, während NB3-5 (Co-Expression von *svp-lacZ*) der einzige Ems-positive NB in A10 ist (Abb. 3-4A).

Orthodenticle (Otd) wird im Thorax in den vier ventralen NBs NB2-1, NB3-1, NB5-1 und NB6-1 exprimiert (R. Urbach, unveröffentlicht). Alle vier NBs ließen sich in A8 identifizieren. In A9 fehlen die *gsb-d-lacZ*-positiven NB5-1 und NB6-1, wohingegen NB2-1 und NB3-1 noch eindeutig vorhanden sind. In A10 gibt es nur noch einen ventralen Otd-positiven NB (NB2-1) (Abb. 3-4B). Der ebenfalls Otd-positive MNB ist in A8, A9 und A10 vorhanden (nicht gezeigt).

Durch die Expression von *huckebein (hkb)-lacZ* (Abb. 1-1) (Doe, 1992) ließen sich der Run-negative NB2-1 und der Run-positive NB2-2 in A8, A9 (Abb. 3-4C) und A10 (Abb. 3-4D) eindeutig nachweisen. Die Gsb-d-negativen NB4-2, NB4-3 und NB4-4 ließen sich nur in A8 und A9 identifizieren, was sich mit den Untersuchungen der Ey-Expression deckt (Abb. 3-2B; Abb.

3-6D). In A8 und A9 sind die *Gsb-d*-positiven NB5-4 und NB5-5 vorhanden, in A10 nur der NB5-4. NB2-4 ist nur in A8 vertreten (Abb. 3-4D).

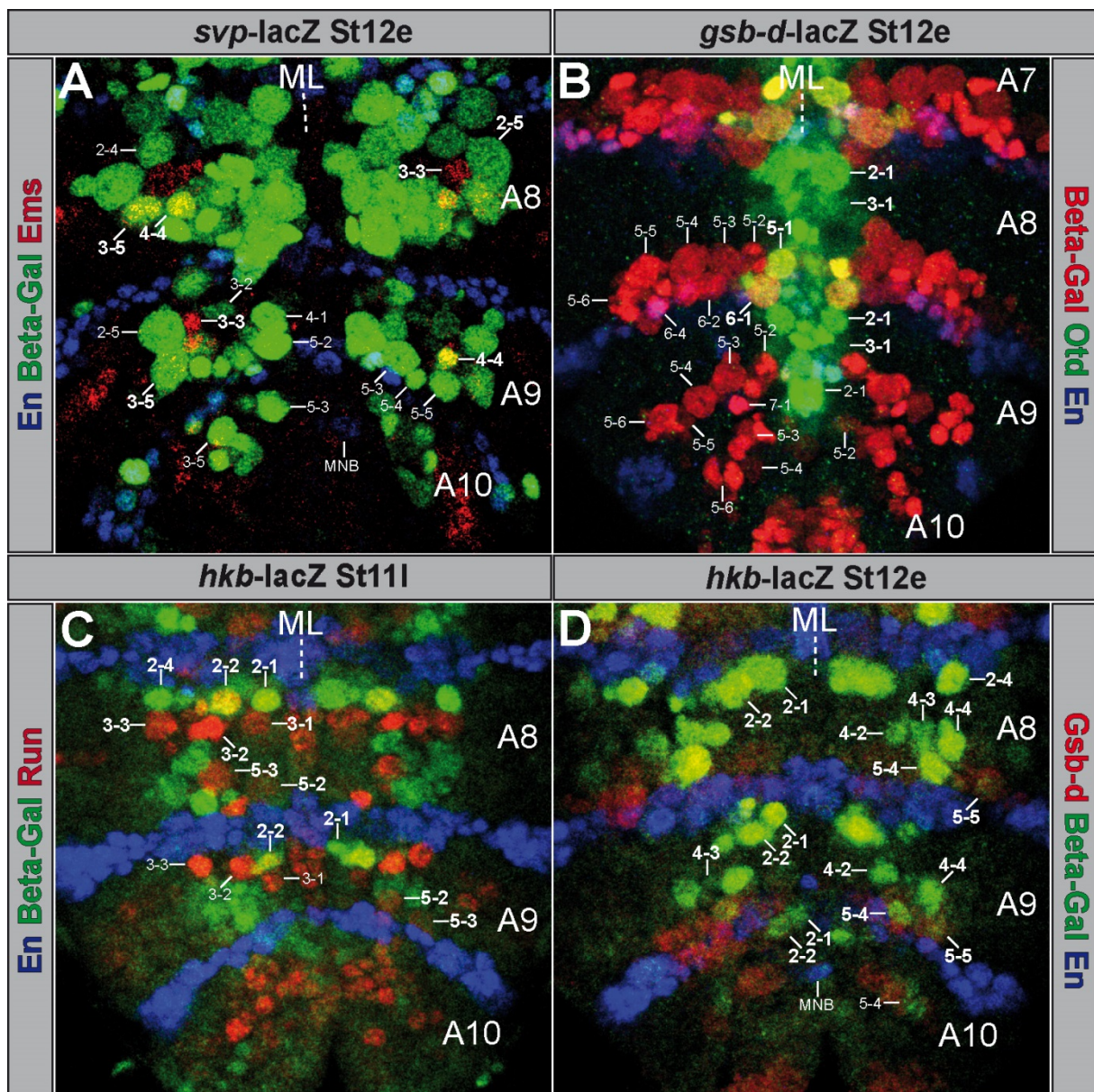


Abb. 3-4: Expression von Lückengenen in Neuroblasten

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St111 und St12e Embryonen des angegebenen Genotyps. NBs, die sich aufgrund ihrer Markerfärbung(en) und Position eindeutig identifizieren lassen, sind fett hervorgehoben. Die Segmente sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. **(A)** *Ems* wird in nur drei NBs exprimiert (NB3-3, NB3-5, NB4-4). **(B)** *Otd* wird in vier ventralen NBs exprimiert (NB2-1, NB3-1, NB5-1, NB6-1). Man beachte auch die *gsb-d-lacZ*-positiven NBs in A10. **(C, D)** *hkb-lacZ* wird in zehn verschiedenen NBs exprimiert (NB1-1, NB2-1, NB2-2, NB2-4, NB4-2, NB4-3, NB4-4, NB5-4, NB5-5 und NB7-3). Während NB1-1 *hkb-lacZ* jedoch schon herunter reguliert hat, ist NB7-3 zu den dargestellten Zeitpunkten noch gar nicht delaminiert. NB2-1, NB2-2 und NB5-4 (*gsb-d-lacZ*-positiv) sind die einzigen *hkb-lacZ*-positiven NBs in A10.

3.1.2.1.4 dorso/ventrale Musterbildungsgene

Die D/V-Gene vermitteln zusammen mit den Segmentpolaritätsgenen positionelle Information innerhalb des NE und unterteilen dieses so wie ein Kartesisches Koordinatensystem (zusammengefasst in Skeath, 1999).

Ventral nervous system defective (Vnd) wird sowohl im ventralen NE exprimiert als auch in den NBs, die aus dieser Region hervorgehen (Chu et al., 1998). Aufgrund ihrer Lage konnten die Vnd-positiven NB2-1, NB3-1, NB4-1, MP2, NB5-1 und NB5-2 in A8 identifiziert werden (Abb. 3-5A). Eine Zuordnung der ventralen NBs in A9 und v.a. A10 fällt deutlich schwerer, da die Anzahl der ventralen NBs hier erheblich reduziert ist (Abb. 3-5B).

intermediate neuroblasts defective (ind) wird in anterioren Segmenten für kurze Zeit in den intermediären NBs NB3-2, NB4-2, NB5-3, NB6-2 und NB7-2 exprimiert (Weiss et al., 1998). Alle diese NBs ließen sich in A8 identifizieren, während in A9 die En-positiven NB6-2 und NB7-2 fehlen. In A10 konnte nur ein einziger *ind*-positiver NB gefunden werden (NB5-3) (Abb. 3-5C).

Die Spezifizierung der dorsalen NBs hängt von *muscle segment homeobox (msh)* ab (Isshiki et al., 1997). In A8 konnten die intensiv Msh-exprimierenden NB2-4, NB4-3 und NB5-4, die eine Co-Expression von *hkb-lacZ* aufweisen, sowie NB6-4 und NB7-4 aufgrund ihrer Co-Expression von En eindeutig identifiziert werden. NB4-3 und NB5-4 sind auch in A9 zu finden, während NB2-4, NB6-4 und NB7-4 in diesem Segment fehlen. In A10 waren drei Msh-positive NBs zu finden: NB3-4, NB5-4 und NB6-4 (Abb. 3-5D).

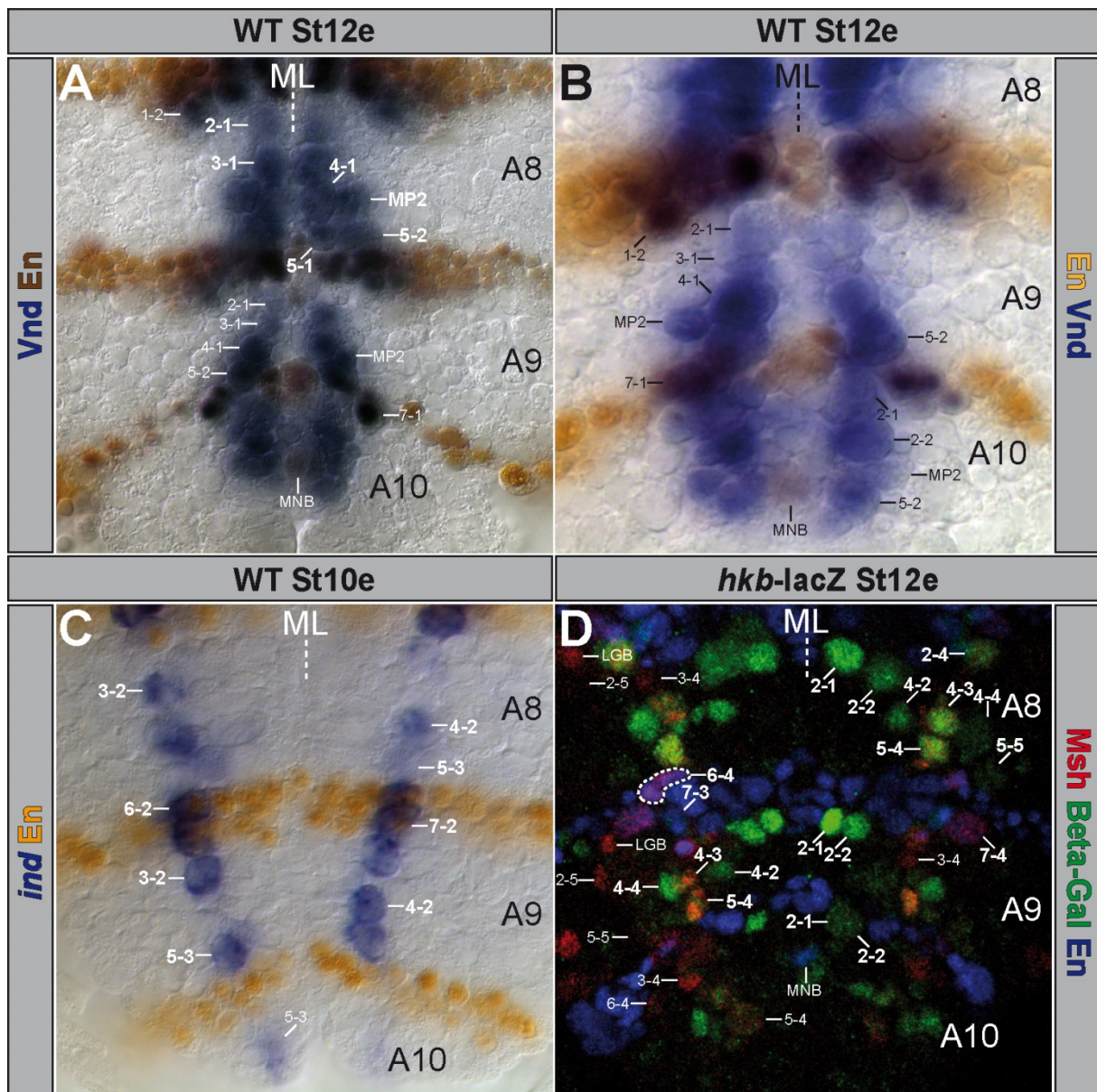


Abb. 3-5: Expression von dorso/ventralen Musterbildungsgenen in Neuroblasten

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (A, B, D) und *in situ*-Hybridisierung (C) (wie angezeigt) von St10e und St12e Embryonen des angegebenen Genotyps. NBs, die sich aufgrund ihrer Markerfärbung(en) und Position eindeutig identifizieren lassen, sind fett hervorgehoben; identifizierte Tochterzellen sind umrandet und der NB von dem sie abstammen, ist ebenfalls fett angezeigt. Die Segmente sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A) Während sich die Vnd-positiven NBs in A8 noch aufgrund ihrer Position relativ leicht zuordnen lassen, (B) fällt eine Identifizierung in A9 und A10 schwerer. (C) *ind* ist ein sehr eindeutiger Marker, der jedoch nur sehr früh exprimiert wird. Der *ind*-positive NB5-3 in A10 steht kurz vor der Delamination. (D) Msh wird in vielen lateralen NBs exprimiert.

3.1.2.1.5 Andere Gene

Im vNS wird Ladybird early (Lbe) in frühen Stadien nur im NB5-6 und einigen seiner Tochterzellen exprimiert (De Graeve et al., 2004). Diese Zellen ließen sich in A8, A9 und A10 nachweisen, wobei deren Anzahl von A8-A10 kontinuierlich abnimmt. Daneben gibt es auch eine deutliche Expression in der Analplatte (Abb. 3-6A) (Jagla et al., 1997). In späteren Stadien wird Lbe auch noch in einem Neuron des NB5-3-Zellstammbaums exprimiert, das sich aufgrund seiner dorso-medialen Position relativ einfach identifizieren lässt (De Graeve et al., 2004). Diese Zelle

konnte in A8 und A9 gefunden werden (nicht gezeigt). Das Vorhandensein des NB5-6-Zellstammbaums in A8-A10 konnte durch die Expression von *lbe(K)*-Gal4 (Baumgardt et al., 2009) bestätigt werden, welches allerdings keine Expression in der Analplatte aufweist (Abb. 3-6B).

Durch die Expression von *unplugged* (*unpg*)-lacZ (Abb. 1-1) (Doe, 1992) konnten NB4-1, NB5-3 und NB5-5 in A8 und A9, sowie der MNB von A8-A10 eindeutig nachgewiesen werden. Der *unpg*-lacZ-positive NB5-3 ist auch noch in A10 vorhanden (Abb. 3-6C).

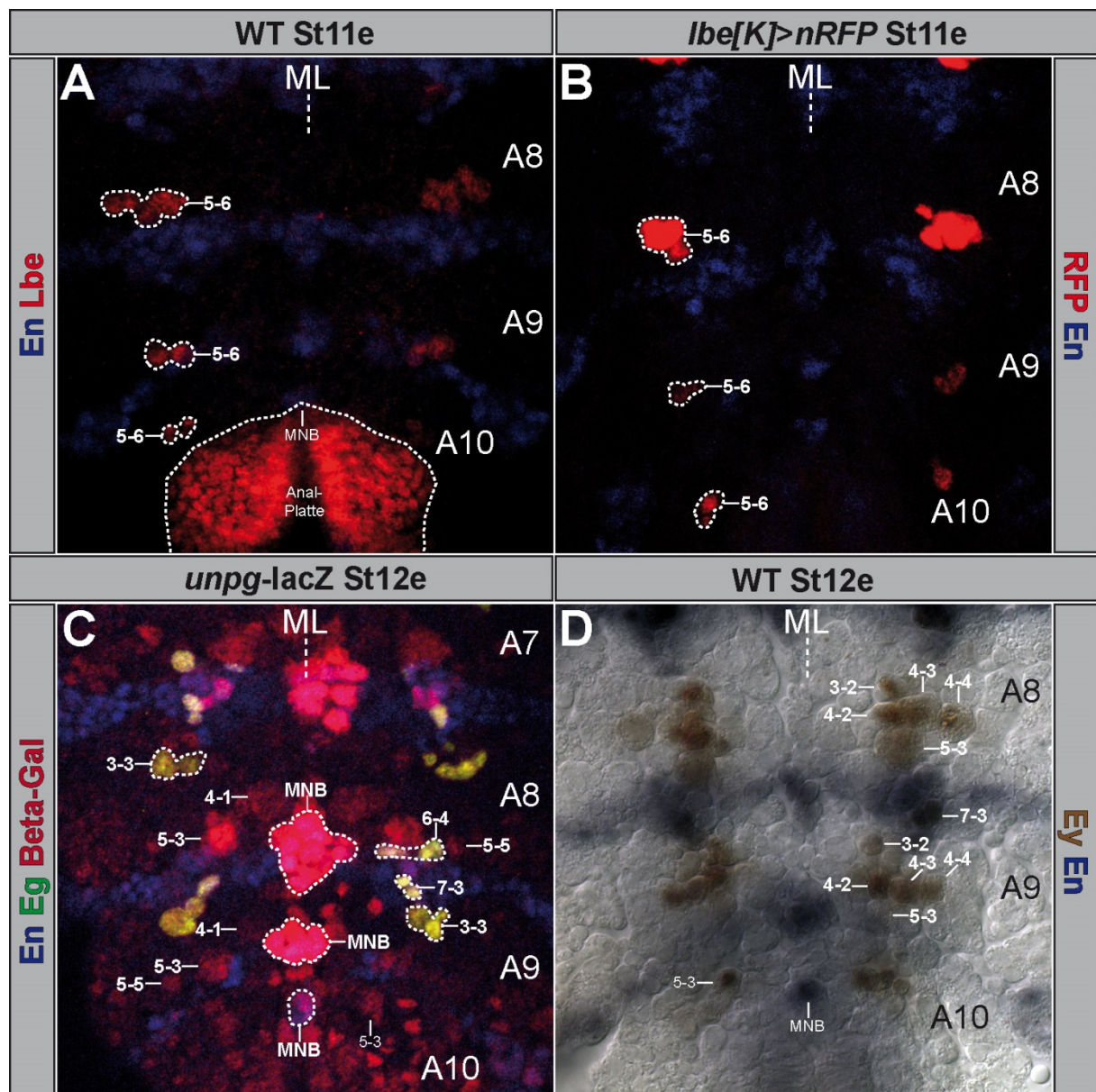


Abb. 3-6: Weitere Marker, die in Neuroblasten exprimiert werden

Filepräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St11e und St12e Embryonen des angegebenen Genotyps. NBs, die sich aufgrund ihrer Markerfärbung(en) und Position eindeutig identifizieren lassen, sind fett hervorgehoben; identifizierte Tochterzellen sind umrandet und der NB von dem sie abstammen, ist ebenfalls fett angezeigt. Die Segmente sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A) *Lbe* wird zu diesem Zeitpunkt nur in Zellen exprimiert, die vom NB5-6 stammen. (B) Auch die *lbe(K)*-Gal4-Linie zeigt eine deutliche Expression in A8, A9 und A10. (C) *unpg*-lacZ wird in anterioren Segmenten in NB4-1, NB5-3, NB5-5, NB6-2, NB7-2 und dem MNB exprimiert. Jedoch ist in diesem Präparat keine Expression in NB6-2 und NB7-2 von A8 zu beobachten. NB4-1, NB5-3 und NB5-5 können jedoch in A8 und A9, der MNB von A8-A10 identifiziert werden. Es gibt nur eine *unpg*-

lacZ-positive Zelle in A10 (NB5-3) **(D)** Die Ey-Expression in diesem Präparat unterstreicht noch einmal die Ergebnisse von Abb. 3-2B. Man beachte auch, dass der Durchmesser der seriell homologen NBs in A9 und A10 im Vergleich zu A8 deutlich reduziert erscheint (siehe Kapitel 4.1).

3.1.2.2 Marker, die in Tochterzellen von Neuroblasten exprimiert werden

Jeder NB des vNS generiert eine weitgehend invariante Anzahl an Tochterzellen (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Einige dieser Tochterzellen können ebenfalls durch molekulare Marker identifiziert werden und die Existenz dieser charakteristischen Zellen lässt auf das Vorhandensein ihrer Vorläufer rückschließen.

3.1.2.2.1 Gliale Marker

Im St10 lässt sich der LGB aufgrund der Expression des pan-glialen Transkriptionsfaktors Reversed polarity (Repo) (Xiong et al., 1994) in A8 und A9 nachweisen. Die frühgeborenen glialen NB7-4-Tochterzellen konnten nur in A8 beobachtet werden, wohingegen sie in A9 und A10 fehlen (Abb. 3-7A). Im St12e wird das Gliamuster unübersichtlicher: Aufgrund ihrer Repo/Eg/En-Expression konnten Gliazellen, die vom NB6-4 stammen, in A8 identifiziert werden. In A10 ist zu diesem Zeitpunkt nur eine Gliazelle nachweisbar, die vom NB6-4, NB5-6 oder LGB stammen könnte (Abb. 3-7B).

Etwas später (St13) konnte in A10 eine Gliazelle nachgewiesen werden, die sich aufgrund ihrer dorsalen Lage und ihrer Nazgul (Naz)-Expression (von Hilchen et al., 2010) eindeutig dem LGB zuordnen lässt (Abb. 3-7C). Dies lässt vermuten, dass der LGB doch in A10 vorhanden ist, auch wenn er selbst früh nicht über Repo-Expression identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 4.1).

Mz97-Gal4 wird in einigen peripheren Gliazellen exprimiert, die vom NB1-3 stammen (von Hilchen et al., 2008). Diese Zellen konnten aufgrund ihrer charakteristischen Position im sog. „Exitbereich“ von A8 und A9 identifiziert werden, wohingegen sie in A10 fehlen (Abb. 3-7D).

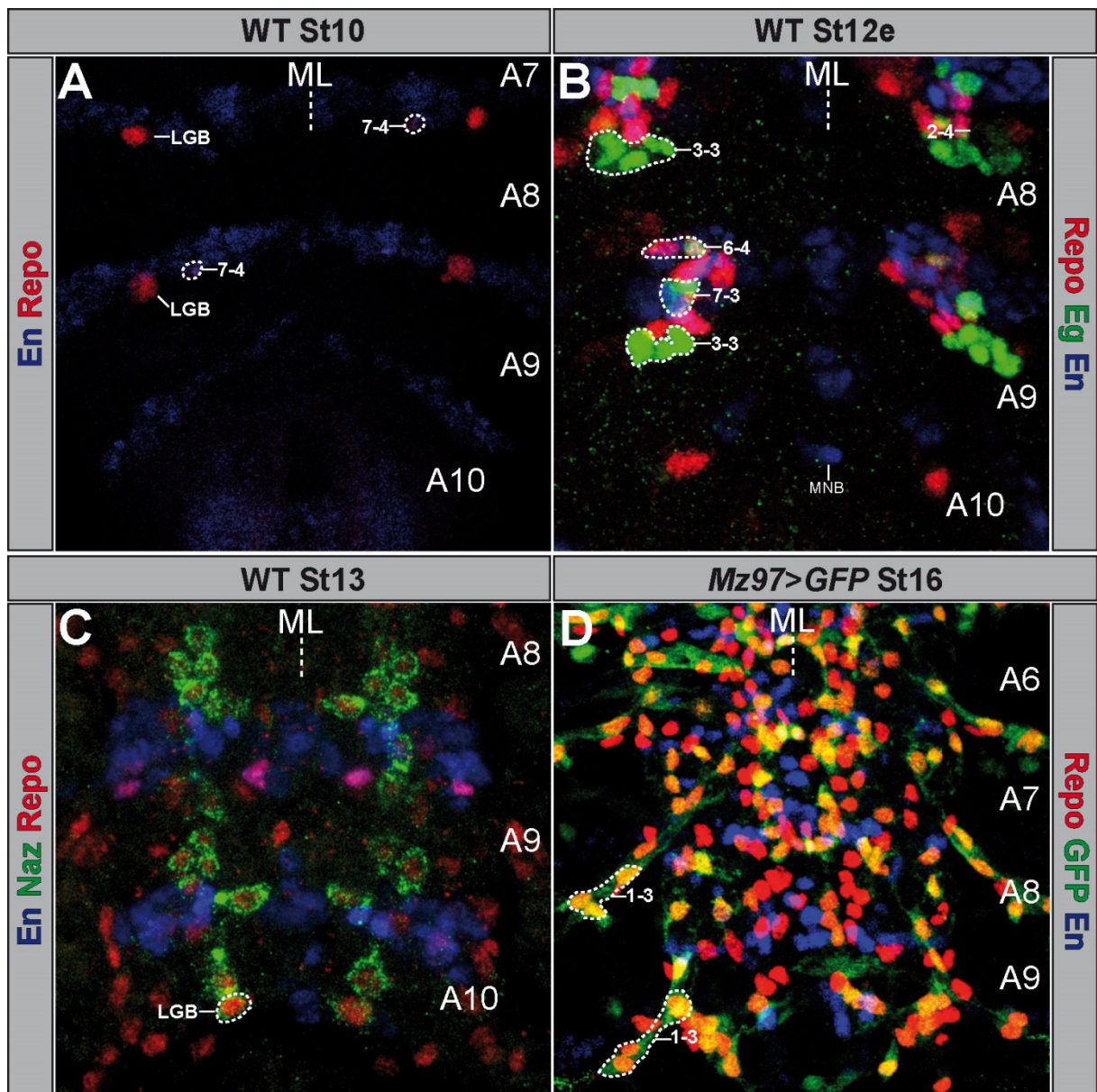


Abb. 3-7: Existenz charakteristischer Gliazellen in den terminalen abdominalen Neuromeren

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St10, St12e, St13 und St16 Embryonen des angegebenen Genotyps. NBs, die sich aufgrund ihrer Markerfärbung(en) und Position eindeutig identifizieren lassen, sind fett hervorgehoben; identifizierte Tochterzellen sind umrandet und der NB von dem sie abstammen ist ebenfalls fett angezeigt. Die Segmente sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. **(A)** Repo wird zu diesem Zeitpunkt nur im LGB und den frühen, glialen Tochterzellen des NB7-4 exprimiert. **(B)** Später wird das Repo-Muster unübersichtlich und es lassen sich nur noch die NB6-4-Gliazellen aufgrund ihrer Repo/Eg/En Co-Expression identifizieren. In A10 ist erst eine Gliazelle pro Hemineuomer vorhanden. **(C)** Abgesetzt von den longitudinalen Gliazellen in A9 ist auch eine dorsale Naz-positive Gliazelle in A10 identifizierbar. **(D)** *Mz97*-Gal4 wird auch in einigen Gliazellen exprimiert, die vom NB1-3 abstammen und aufgrund ihrer Position in A8 und A9 identifiziert werden können.

3.1.2.2.2 Andere Marker

Das Segmentpolaritätsgen *even skipped (eve)* wird in späten Embryonalstadien im ventral gelegenen RP2-Neuron, das von NB4-2 stammt (Bossing et al., 1996), in den NB1-1-Tochterzellen aCC und pCC (Broadus et al., 1995), in den U-Neuronen von NB7-1 (Bossing et al., 1996) und den EL-Neuronen, die vom NB3-3 stammen (Schmidt et al., 1997), exprimiert. Alle diese Tochterzellen ließen sich in A8 und A9 nachweisen, während sie in A10 nicht vorhanden sind (Abb. 3-8A, B). Daneben gibt es noch eine starke Eve-Expression im Hinterdarm (Gorfinkiel et al., 1999).

CQ2-Gal4 wird nur in den U-Neuronen exprimiert (Landgraf et al., 2003a) und bestätigt deren Anwesenheit in A8-A9 und Abwesenheit in A10 (Abb. 3-8C).

eve^{RRK}-Gal4 wird in aCC, pCC und RP2 exprimiert (Landgraf et al., 2003b). Diese Zellen sind in A8 und A9 vorhanden, in A10 fehlen sie (Abb. 3-8D).

In anterioren Segmenten generieren fünf verschiedene NBs Dbx-positive Nachkommen (NB4-2, NB5-2, NB6-1, NB6-2 und NB7-1) (Lacin et al., 2009). Alle diese charakteristischen Tochterzellen ließen sich in A8 identifizieren. In A9 waren nur die Tochterzellen des NB4-2, NB5-2 und NB7-1 zu identifizieren, während die Tochterzellen des NB6-1 und NB6-2 in diesem Segment fehlen (Abb. 3-8E). In A10 konnten keine Dbx-positiven Nachkommenzellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Pox neuro (Poxn)-Gal4 wird im NB2-4-Zellstammbaum exprimiert (Rogulja-Ortmann et al., 2008). Die Tochterzellen konnten nur in A8 identifiziert werden, in A9 und A10 fehlen sie (Abb. 3-8F).

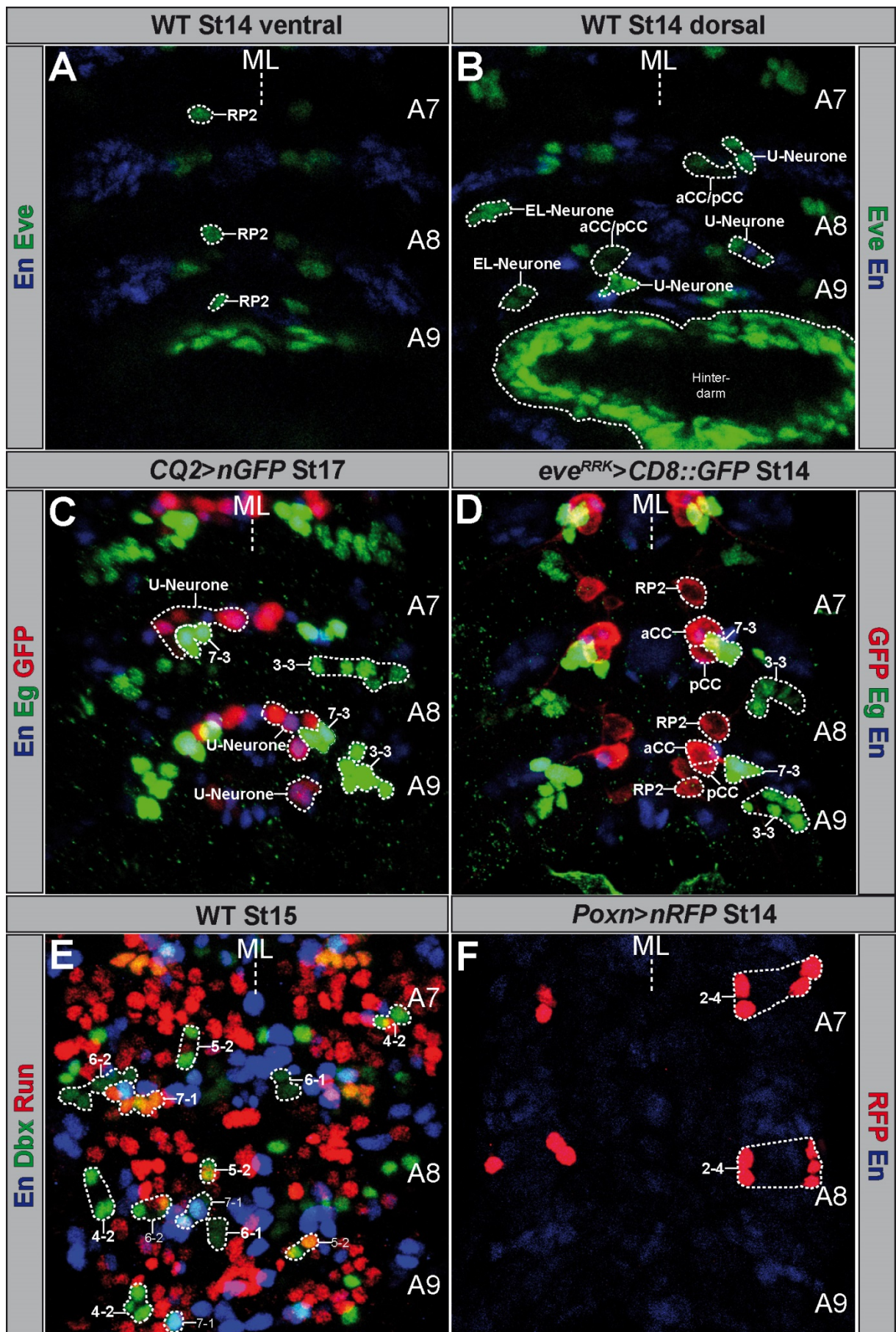


Abb. 3-8: Existenz charakteristischer Nachkommenzellen in den terminalen abdominalen Neuromeren

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St14, St15 und St17 Embryonen des angegebenen Genotyps. Identifizierte Tochterzellen sind umrandet und der NB von dem sie abstammen ist fett angezeigt. Die Segmente sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. **(A, B)** Ventrale (A) und dorsale (B) Expression von Eve. **(C)** *CQ2*-Gal4-Expression bestätigt die Existenz der U-Neurone in A8 und A9. **(D)** *eve^{RRK}*-Gal4 unterstreicht das Vorhandensein von RP2, aCC und pCC in A8 und A9. **(E)** *Dbx* wird in charakteristischen Tochterzellen von fünf verschiedenen NBs exprimiert und diese können aufgrund ihrer typischen Position unterschieden werden. **(F)** *Poxn*-Gal4 wird in Tochterzellen von NB2-4 exprimiert und bestätigt dessen Existenz in A8, sowie die Abwesenheit in A9 und A10.

3.1.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Existenz, Anzahl und Identität der NBs in den terminalen abdominalen Neuromeren A8-A10 untersucht. Durch die Kombination einer Vielzahl von molekularen Markern für NBs, sowie deren Tochterzellen war es möglich eine detaillierte NB-Karte (St12e) für diese Neuromere zu erstellen. Die Expression aller verwendeten NB- und Zellstammbaummarker ist in ihrer Gesamtheit in Abb. 3-9 und aufgetrennt nach D/V-, Lücken-, Paarregel- und Segmentpolaritätsgenen in Abb. 3-10B-D dargestellt.

Es konnten alle zuvor identifizierten NBs des Thorax und anterioren Abdomens, mit Ausnahme des NB2-3, auch in A8 nachgewiesen werden (31 NBs pro Hemineuomer). In A9 fehlen außerdem die zwei S5-NBs NB2-4 und NB5-1, sowie alle En-exprimierenden NBs, mit Ausnahme von NB7-1 (23 NBs pro Hemineuomer). In A10 werden nur wenige NBs gebildet, die sich den Reihen 2, 3, 5 (und NB6-4) zuordnen lassen (11 NBs pro Hemineuomer). NBs der Reihen 1 (mit Ausnahme des LGB), 4 und 7 fehlen. Es konnten keine NBs posterior zu den Gsb-d-exprimierenden in A10 gefunden werden, die damit wohl die terminalsten NBs der Abdominalregion darstellen. In allen untersuchten Neuromeren sind ventrale, intermediäre und dorsale NBs vertreten (Abb. 3-10A) (siehe Kapitel 4.1).

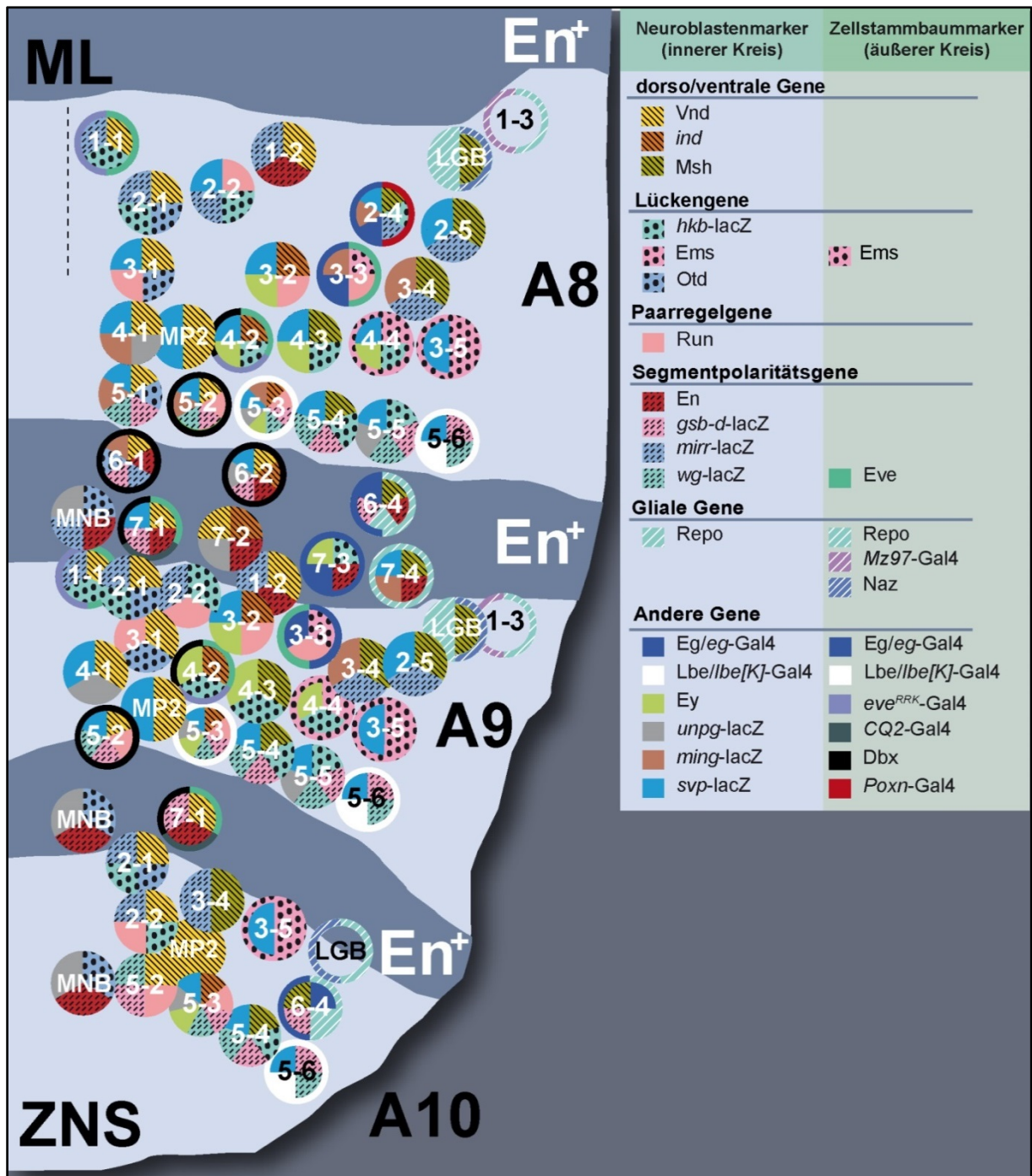


Abb. 3-9: Eine Neuroblastenkarte für die terminale Abdominalregion

Die Abbildung zeigt alle NBs in A8-A10 eines St12e Embryos. Es sind nur die rechten Hemineuromere dargestellt. Die Segmente sind rechts angegeben; ML = Mittellinie. Die En-Streifen (dunkelgrau) spiegeln die posteriore Grenze eines Segments wider. Molekulare Marker, die schon auf NB-Ebene exprimiert werden, sind im inneren Kreis dargestellt; Marker für charakteristische Tochterzellen von spezifischen NBs sind im äußeren Kreis gezeigt (siehe Legende auf der rechten Seite). Die verwendeten Marker für Tochterzellen (z.B. Repo) sind nicht in allen NBs angegeben, die markerexprimierende Tochterzellen hervorbringen, sondern nur in denen, wo sie als nützliche Indikatoren dienen. Die Identität der dargestellten NBs beruht auf der Expression einer Kombination von molekularen Markern, ihrer charakteristischen Position und dem Delaminationszeitpunkt, sowie der Existenz charakteristischer Tochterzellen. (Abbildung mit freundlicher Unterstützung von Christof Rickert)

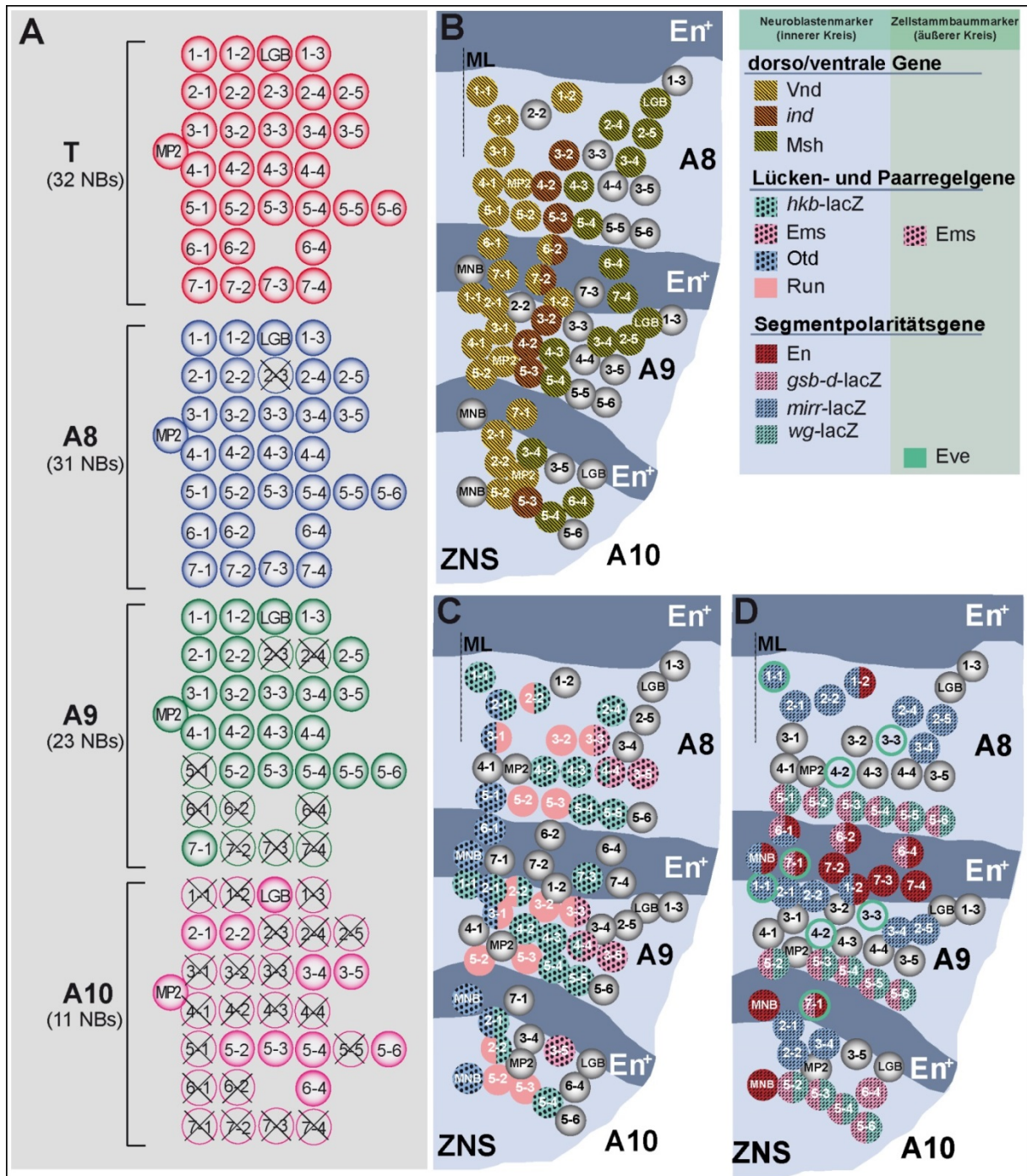


Abb. 3-10: An- und Abwesenheit seriell homologer Neuroblasten und ihre Expression von A/P- und D/V-Mustergenen in den terminalen abdominalen Segmenten

(A) Diese Karte zeigt, welche NBs in den terminalen abdominalen Neuromeren existieren (in Farbe) und welche im Vergleich zum thorakalen Grundzustand (T) (gemäß Doe, 1992) fehlen (farblos und durchgestrichen). Es sind nur die rechten Hemineuromere dargestellt. Die Segmente und die Anzahl ihrer vorhandenen NBs (pro Seite) sind links angegeben. (B-D) Unterteilung der NB-Karte aus Abb. 3-9. Dargestellt sind ausschließlich D/V-Gene (B), Lücken- und Paarregelgene (C), Segmentpolaritätsgene (D). (Abbildung mit freundlicher Unterstützung von Christof Rickert)

3.2 Die Spezifizierung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten durch *doublesex*

3.2.1 Charakterisierung des *doublesex*-Expressionsmusters im embryonalen Bauchmark

3.2.1.1 Die Identität der geschlechtsspezifischen Neuroblasten

Da alle bislang untersuchten larvalen NBs einen embryonalen Ursprung aufweisen (Prokop und Technau, 1991), wurde zunächst versucht die embryonale Identität der bisher nur postembryonal charakterisierten, geschlechtsspezifischen NBs (Kapitel 1.2) (Taylor und Truman, 1992) anhand der erstellten embryonalen NB-Karte der terminalen Abdominalregion (Abb. 3-9) aufzuklären.

Die postembryonale Proliferation der geschlechtsspezifischen NBs ist von der Expression von *dsx* abhängig (Taylor und Truman, 1992). Bis dato konnte jedoch keine *dsx*-Expression im embryonalen ZNS nachgewiesen werden (Lee et al., 2002; Rideout et al., 2007; Rideout et al., 2010; Robinett et al., 2010; Sanders und Arbeitman, 2008). In dieser Arbeit konnte unter Verwendung einer *dsx*-Gal4-Linie (Robinett et al., 2010) zur Expression eines membranständigen *CD8::GFP*-Reportergenkonstrukts jedoch mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFP ab St16 eine schwache Reporter-gen-Expression in der terminalen Abdominalregion des vNS nachgewiesen werden. Allerdings ist die GFP-Expression sehr variabel: Viele Embryonen zeigen überhaupt keine GFP-Expression, manche nur in der ML, andere nur lateral und nur wenige Embryonen zeigen sowohl mediale als auch laterale Reporter-gen-Expression (Abb. 3-11B). Es handelt sich um spezifische *dsx*-Expression, die auch über einen Dsx-Antikörper (Sanders und Arbeitman, 2008) detektiert werden konnte (Abb. 3-11C).

Bei den null bis zwei lateralen Zellen pro Seite handelt es sich wohl um die geschlechtsspezifischen NBs, da diese Zellen neben ihrer *dsx*-Expression auch den Stammzellmarker *Dpn* exprimieren (Abb. 3-11D), aber negativ für postmitotische Marker wie *Embryonic lethal abnormal vision* (*Elav*) (Robinow und White, 1991) (Abb. 3-11E) oder *Repo* (Abb. 3-11F) sind. Sie konnten sowohl in den Weibchen (Abb. 3-11G) als auch in den Männchen (Abb. 3-11H) detektiert werden, liegen direkt nebeneinander und befinden sich anterior vom letzten En-Streifen in A9 (Abb. 3-11A), in einer Domäne sehr starker *Abd-B*-Expression (Abb. 3-11I).

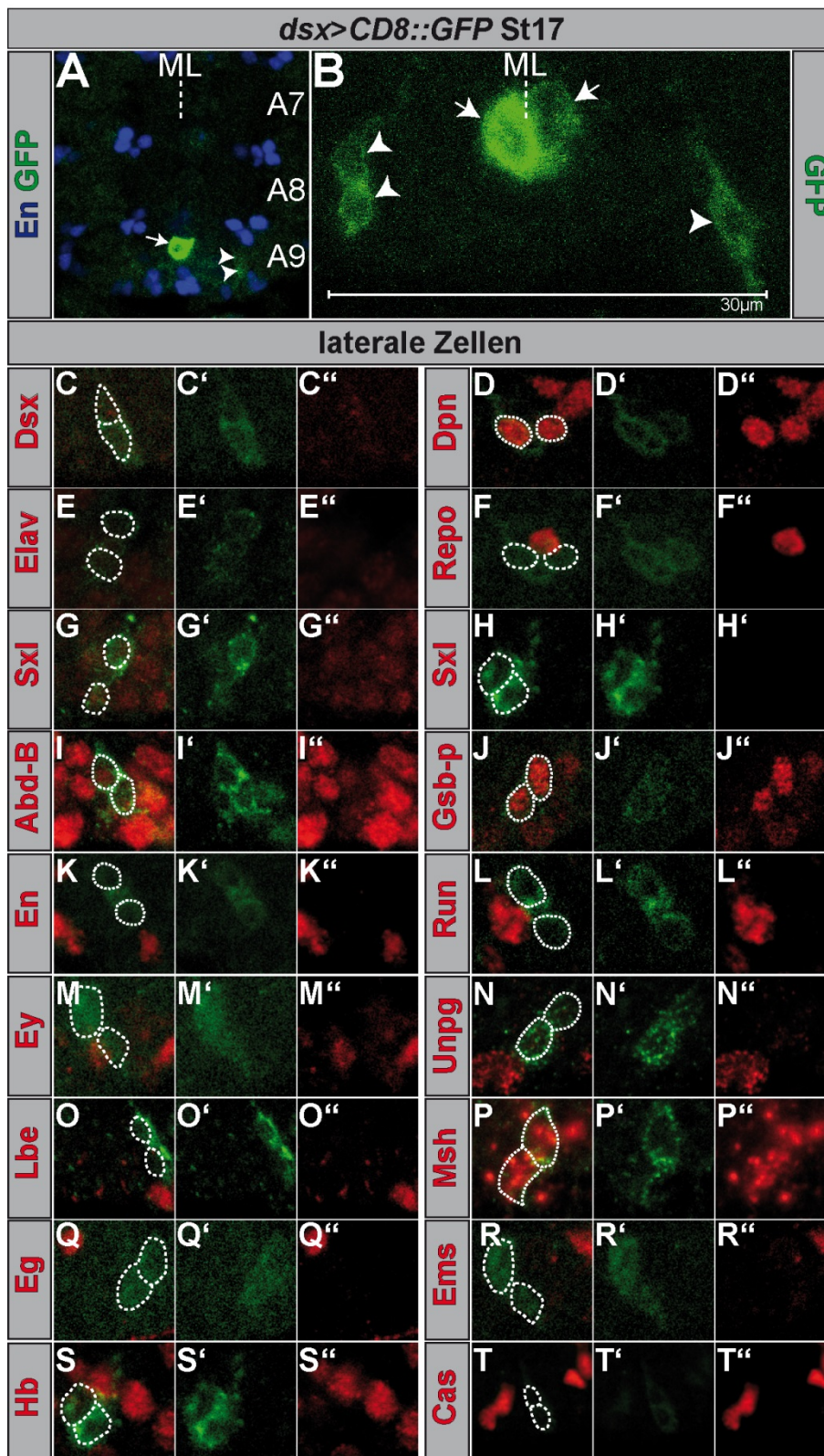


Abb. 3-11: Die embryonale Identität der geschlechtsspezifischen Neuroblasten
(A, B) Lokalisierung der *dsx*-exprimierenden Zellen in einer Übersicht (A) und einer Vergrößerung (B) des posterioren vNS nach Filetpräparation (horizontale Ansicht). Laterale *dsx*-exprimierende Zellen sind durch Pfeilspitzen, die in der ML = Mittellinie sind durch Pfeile markiert; anterior ist oben. **(C-T)** Die lateralen, *dsx*-exprimierenden Zellen eines HS im St17, gefärbt gegen GFP (*dsx>CD8::GFP*; grün) und diverse molekulare Marker (rot). Die erste Reihe zeigt beide Kanäle zusammen und hebt die *dsx*-exprimierenden Zellen hervor; die zweite und dritte Reihe zeigen die Einzelkanäle. Neben den bereits im Text beschriebenen Markern sind beide Zellen außerdem Eg-, Ems-, Hunchback (Hb)- und Cas-negativ.

Da die Zellen erst ab St16 detektiert werden konnten, wurden molekulare Marker verwendet, die zu diesem Zeitpunkt noch im vNS exprimiert werden: Beide Zellen exprimieren Gooseberry proximal (Gsb-p) (Abb. 3-11J), welches von *gsb-d* aktiviert wird (Buenzow und Holmgren, 1995) und nur Zellen markiert, die zuvor bereits *gsb-d* exprimiert haben (Colomb et al., 2008). Da beide

Zellen En-negativ sind (Abb. 3-11K), kann angenommen werden, dass es sich um NBs aus Reihe 5 handelt. Beide Zellen sind sowohl Run- (Marker für NB5-2 und NB5-3, Abb. 3-11L) als auch Ey-negativ (Marker für NB5-3, Abb. 3-11M) und da NB5-1 in A9 und A10 nicht vorhanden ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eher laterale NBs aus Reihe 5 handelt. Die Zellen sind ebenfalls negativ für *unpg-lacZ* (Marker für NB5-5, Abb. 3-11N) und auch für Lbe (Marker für NB5-6, Abb. 3-11O). Die Msh-Expression in beiden Zellen (Abb. 3-11P) macht NB5-4 zum vielversprechenden Kandidaten, einem oder beiden geschlechtsspezifischen NBs zu entsprechen (siehe Kapitel 4.2).

3.2.1.2 Die Identität der *doublesex*-Gal4-exprimierenden Zellen in der Mittellinie

In der ML konnten null bis drei *dsx*-exprimierende Zellen identifiziert werden. Sie liegen ebenfalls anterior vom letzten En-Streifen in A9 (Abb. 3-11A) und sind in beiden Geschlechtern zu finden (Abb. 3-12A, B). Die Zellen exprimieren weder En (Abb. 3-12C) noch Cas (Abb. 3-12D), welche Marker für MNB-Tochterzellen und VUM-Neurone darstellen (Wheeler et al., 2006), oder *unpg-lacZ* (Abb. 3-12E), das im MNB-Zellstammbaum exprimiert wird. Alle Zellen exprimieren Run (Abb. 3-12F), aber kein Hb (Abb. 3-12G). Eine Co-Expression von Wrapper (Abb. 3-12I) entlarvte zumindest ein Teil dieser *dsx*-exprimierenden Zellen eindeutig als ML-Gliazellen (Wheeler et al., 2006). Da aber nicht alle Zellen Wrapper exprimieren (Abb. 3-12J), kann noch von einer zweiten bislang unbekanntem Quelle an *dsx*-exprimierenden Zellen in der ML ausgegangen werden (siehe Kapitel 3.2.2.3 und 4.2).

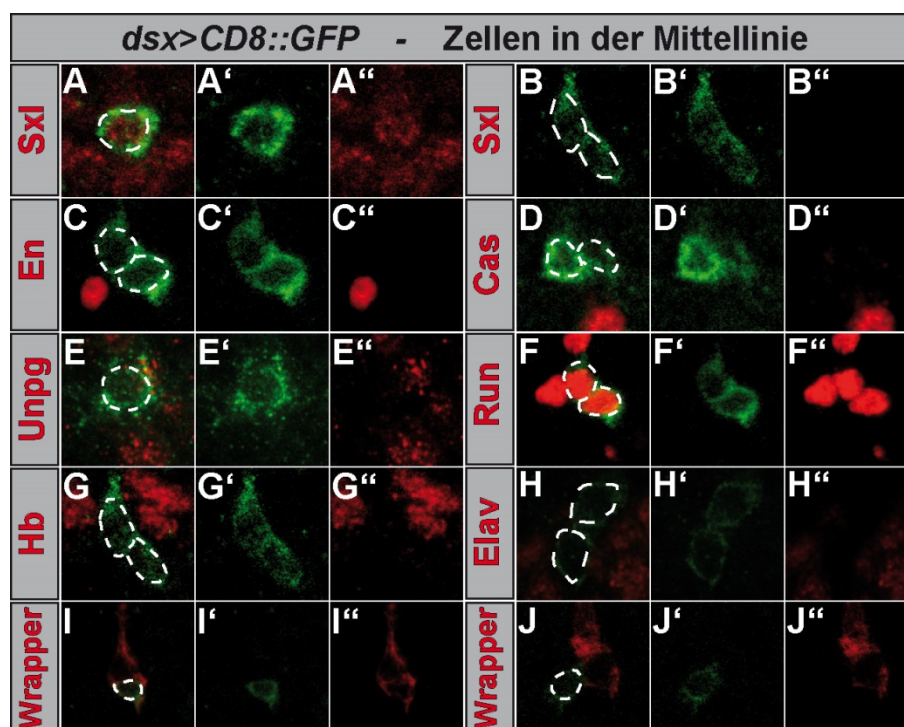


Abb. 3-12: Charakterisierung der *doublesex*-exprimierenden Mittellinienzellen im Embryo

Terminale abdominale ML-Zellen gefärbt gegen GFP (*dsx>CD8::GFP*) und diverse molekulare Marker (rot) im St17. Die erste Reihe zeigt beide Kanäle zusammen und hebt die *dsx*-exprimierenden Zellen hervor, die zweite und dritte Reihe zeigen die Einzelkanäle.

3.2.2 Charakterisierung des *doublesex*-Expressionsmusters in den terminalen abdominalen Ganglien der L3-Wanderlarve und der weißen Puppe

3.2.2.1 Beschreibung der *doublesex*-exprimierenden Zellen

Es wurde bereits gezeigt, dass die geschlechtsspezifischen NBs in männlichen L31-Larven noch proliferieren, wohingegen dieselben Zellen in den Weibchen die Proliferation bereits eingestellt haben (Taylor und Truman, 1992). Damit einhergehend konnten in männlichen L31-Larven vier laterale NBs (zwei pro Seite) in den terminalen Ganglien aufgrund ihrer Dpn-Expression identifiziert werden (Abb. 3-13D). Außerdem konnten durch eine Antikörperfärbung gegen Miranda (Mira) (Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Shen et al., 1997) sowohl die geschlechtsspezifischen NBs als auch deren neugeborene GMZs (bis zu drei) dargestellt werden, die sich aufgrund ihrer Größe leicht unterscheiden lassen (Abb. 3-13B). In den meisten Fällen konnten zwei NBs pro HS gefunden werden. Nur sehr selten überquert ein geschlechtsspezifischer NB die ML, so dass drei NBs in einem HS zu finden waren und nur ein NB im anderen HS vorhanden ist (nicht gezeigt). In den weiblichen L31-Larven war weder eine Dpn-, noch eine Mira-Expression in dieser Region zu finden (Abb. 3-13C, E), was andeutet, dass die geschlechtsspezifischen NBs in den Weibchen zu diesem Zeitpunkt gar nicht mehr vorhanden sind.

Die Gesamtanzahl an *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen im larvalen ZNS wurde bereits zuvor beschrieben (Rideout et al., 2010). In L31-Männchen zeigen alle geschlechtsspezifischen NBs und deren GMZs eine *dsx*-Gal4-Expression. Die angrenzenden Zellcluster zeigen eine eher schwache Expression von *dsx*-Gal4, wohingegen einige anterior-dorsale Zellen dieser Cluster eine sehr starke Expression aufweisen (sieben bis acht Zellen pro HS). Auch in der ML existiert eine starke *dsx*-Gal4-Expression. Zusätzlich konnte auch eine starke *dsx*-Gal4-Expression in einer anterior-lateralen Gruppe von ein bis vier Zellen pro HS beobachtet werden (Abb. 3-13A). In weiblichen L31-Larven stellen sie die einzigen *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen dar (Abb. 3-13C). Alle *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen in männlichen und weiblichen L31-Larven exprimieren auch den Dsx-Antikörper, was impliziert, dass die Reporter-gen-Expression spezifisch ist. Des Weiteren konnten in beiden Geschlechtern weitere Zellen in vorwiegend dorsaler Lage identifiziert werden, die den Antikörper exprimieren, aber noch keine Reporter-gen-Expression aufweisen (Abb. 3-13D, E). Bei der Analyse der *dsx*-Gal4-Expression in der weißen Puppe (WP), einem Entwicklungsstadium, das nur 1h lang andauert und sich direkt an L31 anschließt, konnte gezeigt werden, dass alle Zellen, die in L31 ausschließlich den Antikörper exprimiert haben, auch eine Reporter-gen-Expression aufweisen. Zusätzlich beginnen noch viele weitere Zellen mit der Expression des Dsx-Antikörpers (Abb. 3-13F, G). Diese Resultate belegen eine Verzögerung der Reporter-gen-Expression im Vergleich zum Dsx-Antikörper.

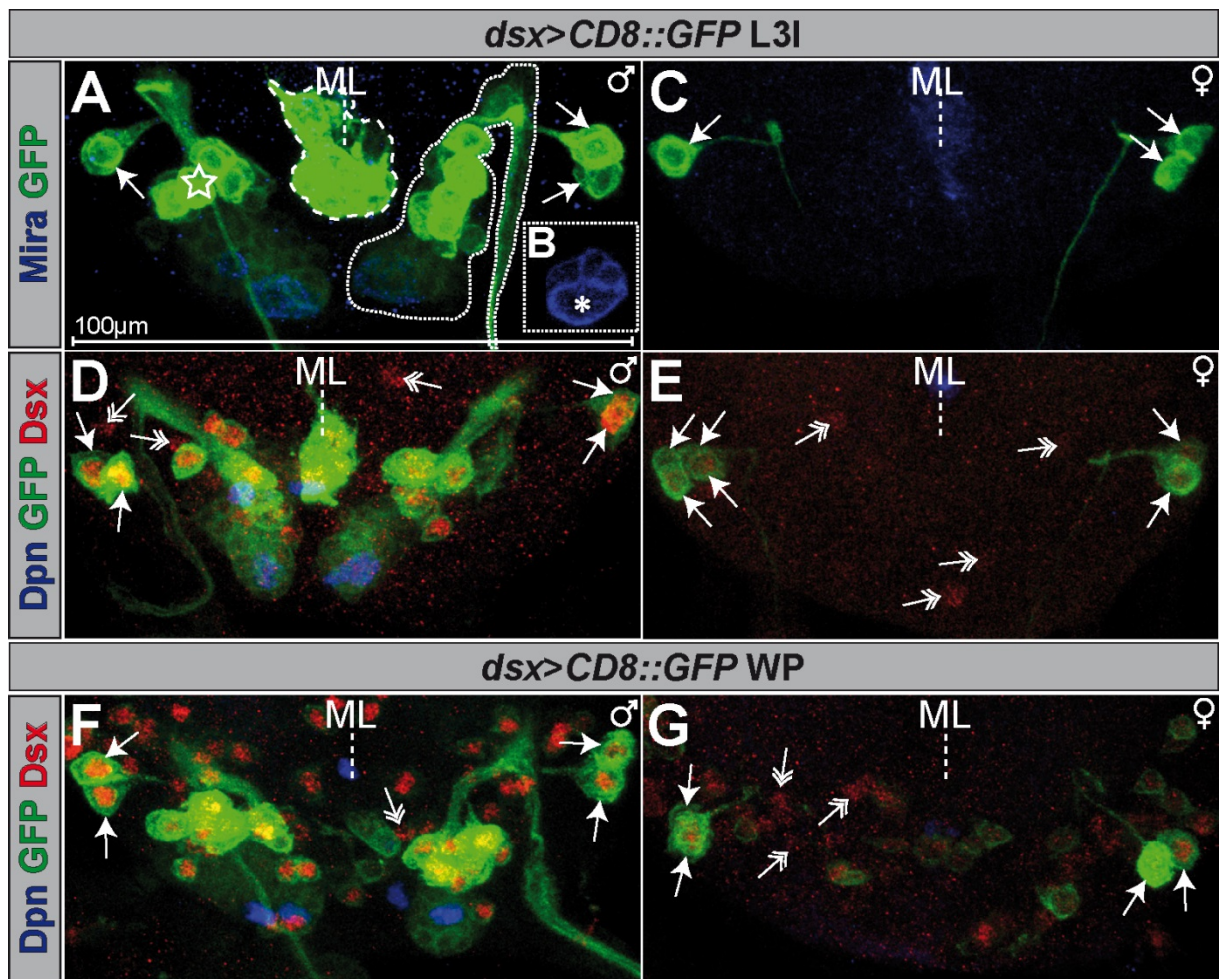


Abb. 3-13: Beschreibung des *doublesex*-Expressionsmusters und der geschlechtsspezifischen Neuroblasten in der L3-Wanderlarve und der Weißen Puppe

Horizontale Ansicht (anterior ist oben) der terminalen Neuromere von *dsx>CD8::GFP* (Maximalprojektion) nach Antikörperfärbung (wie angegeben) während L3l oder WP; ML = Mittellinie. Anterior-laterale „Initiator-Zellen“ (Kapitel 3.2.2.2) sind durch Pfeile markiert. (A) ML-Zellen sind grob umrandet; das rechte laterale Zellcluster, das sich von zwei geschlechtsspezifischen NBs ableitet, ist fein umrandet hervorgehoben. Der weiße Stern markiert die anterior-dorsalen Zellen des linken Zellclusters, die eine sehr starke *dsx*-Gal4-Expression aufweisen. (B) hebt die Mira-Färbung einer Einzelebene hervor, in welcher ein geschlechtsspezifischer NB durch einen Asterisk markiert ist. Bei den drei angrenzenden Zellen handelt es sich um seine zugehörigen GMZs. (D-G) Einige Zellen (markiert durch Pfeile mit zwei Spitzen) werden zwar schon durch den Dsx-Antikörper erkannt, zeigen aber noch keine Reportergen-Expression.

3.2.2.2 Der Ursprung der *doublesex*-Gal4-exprimierenden Zellen

Als nächstes wurde das G-Trace-System (Kapitel 2.2.8) (Evans et al., 2009) verwendet, um die Herkunft der *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen in L3l-Larven aufzuklären. In den Weibchen exprimieren die anterior-lateralen *dsx*-Gal4-positiven Zellen ausschließlich RFP (Realtime-Expression), aber kein GFP (Lineage-Expression) (Abb. 3-14A). Das bedeutet, dass diese Zellen gerade erst mit der *dsx*-Gal4-Expression begonnen haben und die Flipase die Exzision der Stop-Kassette noch nicht durchgeführt hat. Da sie die ersten *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen in weiblichen L3l-Larven sind, wurden sie als „Initiator-Zellen“ deklariert. Mit dem Eintritt der Puppenruhe beginnen viele weitere Zellen mit der *dsx*-Gal4-Expression (ausschließlich RFP-Expression), während die Initiator-Zellen nun zusätzlich eine GFP-Expression aufweisen (Abb.

3-14B). Der dynamische Beginn der *dsx*-Expression während der Transition von L3I zur WP erklärt die hohe Variabilität an *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen in vorhergehenden Untersuchungen (Rideout et al., 2010).

Auch in männlichen L3I-Larven haben die Initiator-Zellen gerade erst mit der Expression von *dsx*-Gal4 begonnen (ausschließlich RFP-Expression). Alle anderen *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen (inklusive der NBs) exprimieren RFP und GFP (Abb. 3-14C). Das bedeutet, dass es neben den Initiator-Zellen keine weiteren Zellen gibt, die *dsx*-Gal4 erst spät anschalten (nur RFP-Expression), und dass es keine Zellen gibt, die *dsx*-Gal4 wieder herunter reguliert haben (nur GFP-Expression). Da die geschlechtsspezifischen NBs schon während der embryonalen Neurogenese *dsx*-Gal4 exprimieren (siehe Kapitel 3.2.1.1), wird bereits zu diesem Entwicklungszeitpunkt die Flipase aktiviert und folglich werden alle von ihnen hervorgebrachten Tochterzellen durch GFP markiert. Sie spiegeln somit die gesamten postembryonalen Zellstammbäume dieser Vorläufer wider. Da die Zellen nur in männlichen L3I-Larven zu finden waren, handelt es sich wohl um männchenspezifische Zellstammbäume. Die Abwesenheit dieser Zellcluster in weiblichen L3I-Larven bedeutet, dass die geschlechtsspezifischen NBs und alle möglicherweise von ihnen postembryonal gebildeten Tochterzellen im Weibchen sterben.

Auch die Zellen in der ML der männlichen L3I-Larven exprimieren RFP und GFP (Abb. 3-14C) und gehen ebenfalls auf einen oder wahrscheinlich mehrere embryonale Vorläufer zurück.

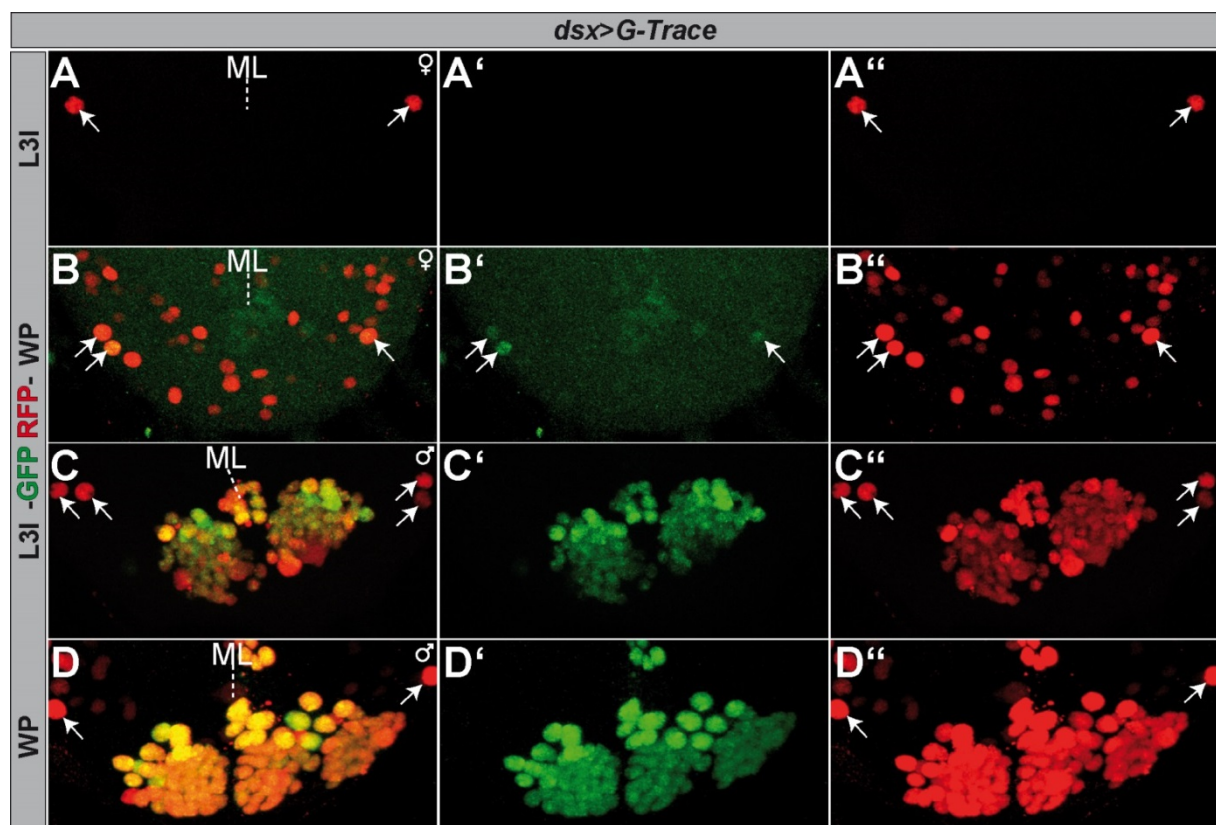


Abb. 3-14: Die Herkunft der *doublesex*-Gal4-exprimierenden Zellen in der L3-Wanderlarve und der weißen Puppe

Horizontale Aufsicht (Maximalprojektion) auf die terminalen Neuromere von *dsx>G-Trace* in L3I (A, C) oder WP (B, D) (anterior ist oben); ML = Mittellinie. Die erste Reihe zeigt beide Kanäle zusammen, die zweite und dritte Reihe zeigen die Einzelkanäle. Initiator-Zellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Wie beim Weibchen beginnen auch in der WP des Männchens viele weitere Zellen mit der *dsx*-Gal4-Expression (Abb. 3-14D). Sie stammen nicht von den geschlechtsspezifischen NBs, da sie ausschließlich RFP exprimieren.

3.2.2.3 Darstellung der männchenspezifischen Zellstammbäume durch Flybow-Analyse

Für eine detaillierte Beschreibung der männchenspezifischen Zellstammbäume wurde eine Flybow-Analyse (Kapitel 2.2.9) (Hadjieconomou et al., 2011) durchgeführt. Durch die embryonale Induktion des Hitzeschocks in *dsx*-Gal4-exprimierenden NBs, ließen sich die einzelnen postembryonalen Zellstammbäume dieser Vorläufer getrennt voneinander darstellen. Die Beschreibung erfolgte in der L3I-Larve, da in der WP schwierig zu unterscheiden ist, welche Zellen zu den männchenspezifischen Zellstammbäumen gehören und welche Zellen *dsx*-Gal4 hoch regulieren, sich aber nicht von den geschlechtsspezifischen NBs ableiten.

In jedem lateralen HS war immer ein größeres, meist ventral gelegenes ($49,6 \pm 2,46$, $n = 10$), und ein kleineres, meist dorsal gelegenes, Cluster ($45,34 \pm 4,46$, $n = 6$) zu finden (Abb. 3-15A). Beide Zellstammbäume projizieren ins Neuropil, von wo ihre Axone aus dem vNS heraus projizieren (Abb. 3-15C).

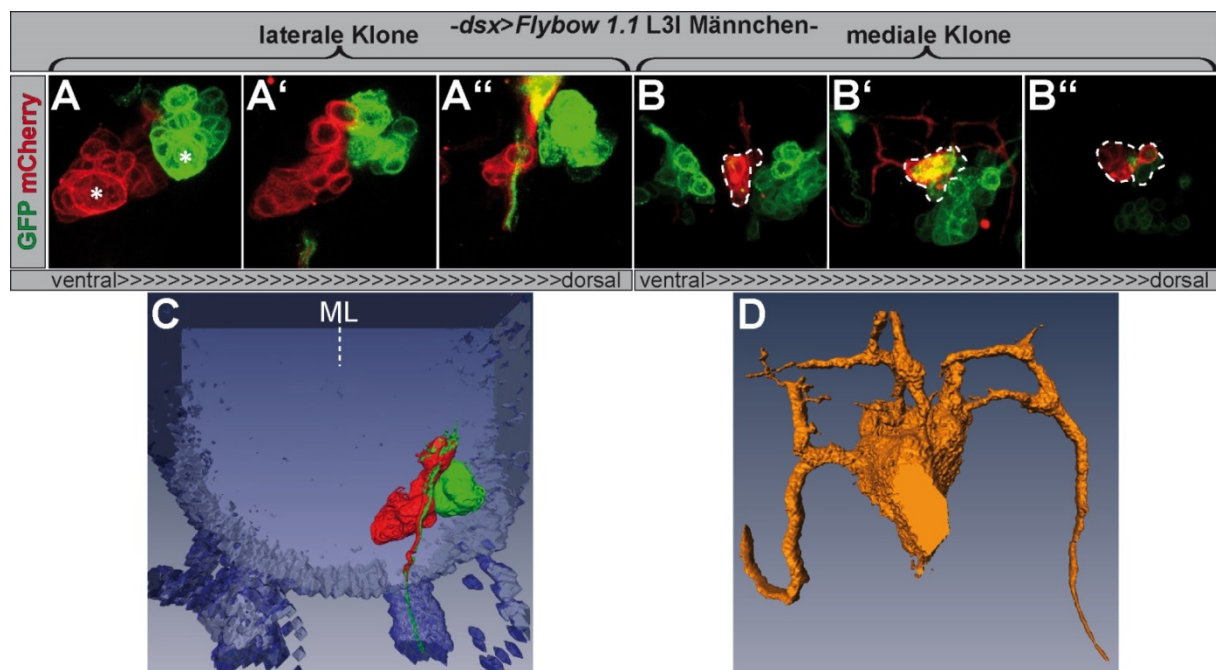


Abb. 3-15: Charakterisierung der männchenspezifischen Zellstammbäume in der L3-Wanderlarve durch Flybow-Analyse

(A, B) Mehrere zusammengefasste Abschnitte (von ventral nach dorsal) von *dsx>Flybow1.1* in der L3I-Larve nach Antikörperfärbung gegen GFP und mCherry (anterior ist oben). (A) zeigt zwei laterale Klone (der rote besteht aus 42 Zellen, der grüne aus insgesamt 51 Zellen), die sich von den beiden geschlechtsspezifischen NBs (durch einen Asterisk

markiert) eines HS ableiten und in (C) in dorsaler Ansicht im 3D-Modell dargestellt sind; ML = Mittellinie. **(B)** zeigt zwei Klone in der ML (durch gestrichelte Linie von den Tochterzellen der lateralen NBs abgegrenzt): ein grüner (8 Zellen) und ein roter (14 Zellen), der in unterschiedliche Richtungen projiziert und in (D) in ventraler Ansicht im 3D-Modell dargestellt ist. (3D-Modelle mit freundlicher Unterstützung von Christof Rickert)

In der ML konnte ein kleinerer ventraler Klon ($6 \pm 2,21$, $n = 10$) und ein größerer, dorsal gelegener Klon ($10,1 \pm 2,56$, $n = 10$) identifiziert werden (Abb. 3-15B), der in verschiedene Richtungen projiziert (Abb. 3-15D). Das bestätigt die Vermutung, dass es zwei verschiedene Quellen an *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen in der ML gibt (siehe Kapitel 3.2.1.2).

3.2.2.4 Molekulare Marker für die männchenspezifischen Zellstammbäume

Für die weiterführende, detaillierte Beschreibung wurde nach molekularen Markern gesucht, die in L31-Larven in den geschlechtsspezifischen NBs und ihren Tochterzellen exprimiert werden. Obwohl es nicht gelang eine Eg-Antikörperfärbung in L31-Larven zu etablieren, konnte mit *eg*-Gal4 eine Reporter-Gen-Expression in mehreren abdominalen ML-Clustern von Männchen und Weibchen induziert werden. Zusätzlich exprimieren Weibchen *eg*-Gal4 in bis zu drei lateralen Zellen pro Hemineuromer (Abb. 3-16A). Neben diesen Zellen konnte im Männchen auch eine *eg*-Gal4-Expression in den meisten Zellen der lateralen männchenspezifischen Zellstammbäume detektiert werden. Hierbei ist *eg*-Gal4 jedoch auf die intermediären Zellen beschränkt und niemals in den proximalen Zellen um den NB oder den distal gelegenen, stark *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen zu finden (Abb. 3-16B). Die Expression in den männchenspezifischen Zellstammbäumen scheint postembryonal aufzukommen, da keine Eg-Expression in den spät embryonalen geschlechtsspezifischen NBs festgestellt werden konnte (siehe Abb. 3-11Q). Die G-Trace Analyse in L31-Larven zeigte, dass *eg*-Gal4 in den geschlechtsspezifischen NBs, ihren GMZs und angrenzenden Zellen herunter reguliert wird, welche den jüngsten Anteil der Zellstammbäume repräsentieren (Abb. 3-16D).

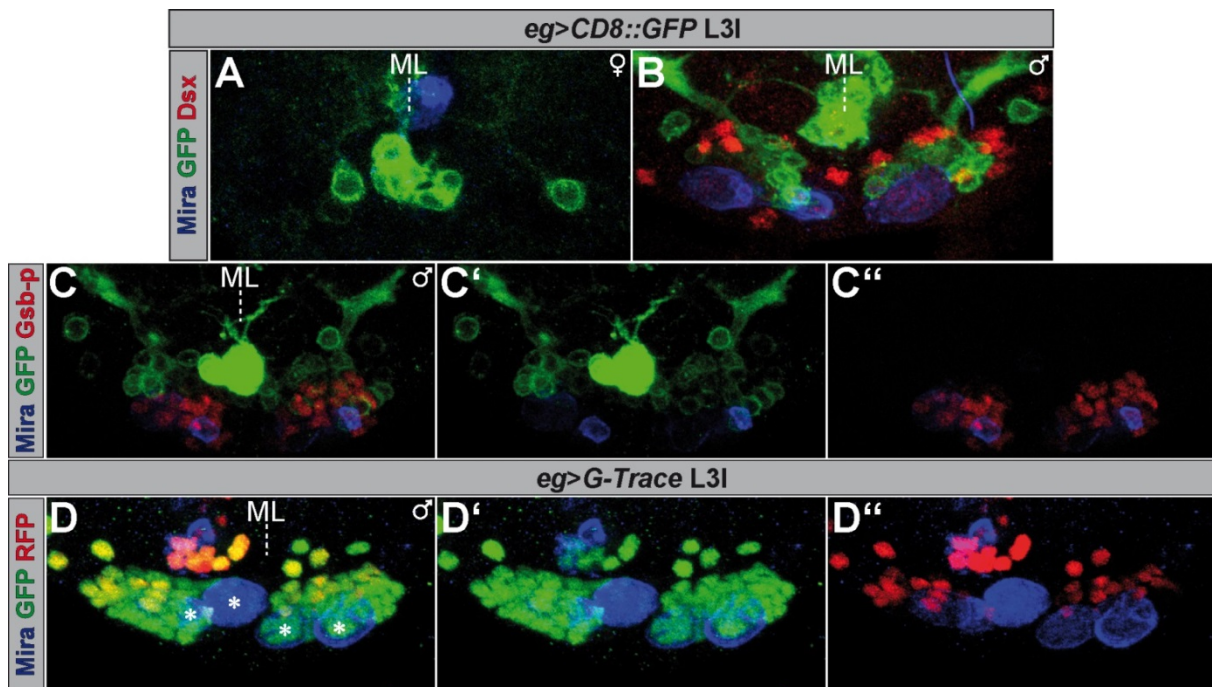


Abb. 3-16: *eagle*-Gal4-Expression im terminalen abdominalen Bereich der L3-Wanderlarve

Horizontale Ansicht (anterior ist oben) der terminalen Neuromere (Maximalprojektion) in L3I-Larven nach Antikörperfärbung (wie angegeben); ML = Mittellinie. **(D)** Geschlechtsspezifische NBs sind durch Asteriske markiert. Sie zeigen zwar eine GFP-Färbung (Lineage-Expression), aber keine RFP-Färbung (Realtime-Expression), was bedeutet, dass sie die *eg*-Gal4-Expression herunter reguliert haben. (C', D') ohne den roten Kanal; (C'', D'') ohne den grünen Kanal.

Gsb-p weist, im Gegensatz zu Eg, sowohl eine embryonale (siehe Abb. 3-11J) als auch spätlarvale Expression in den geschlechtsspezifischen NBs auf. In L3I-Larven wird Gsb-p in den geschlechtsspezifischen NBs, ihren GMZs und 10-14 Zellen pro Zellstammbaum exprimiert, die sich in direkter Nähe zum NB befinden (Abb. 3-17A). Die dorsal gelegenen, stark *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen zeigen niemals eine Gsb-p-Expression (Abb. 3-17B). Nur in sehr wenigen Zellen konnte eine Co-Expression von Gsb-p und *eg*-Gal4 festgestellt werden (Abb. 3-16C). Somit wird Gsb-p im NB, seinen GMZs und spätgeborenen Zellen der männchenspezifischen Zellstammbäume exprimiert, *eg*-Gal4 in den intermediären Zellen und die starke *dsx*-Gal4-Expression ist auf die frühgeborenen Zellen beschränkt. In weiblichen L3I-Larven konnte überhaupt keine Gsb-p-Expression detektiert werden (nicht gezeigt).

Alle *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen im Männchen weisen vom Embryo (Abb. 3-11I) bis zur L3I-Larve (Abb. 3-17C) eine Co-Expression des *Hox*-Gens *Abd-B* auf.

Die Gesamtheit der verwendeten Marker für die lateralen männchenspezifischen Zellstammbäume ist in Abb. 3-17D dargestellt.

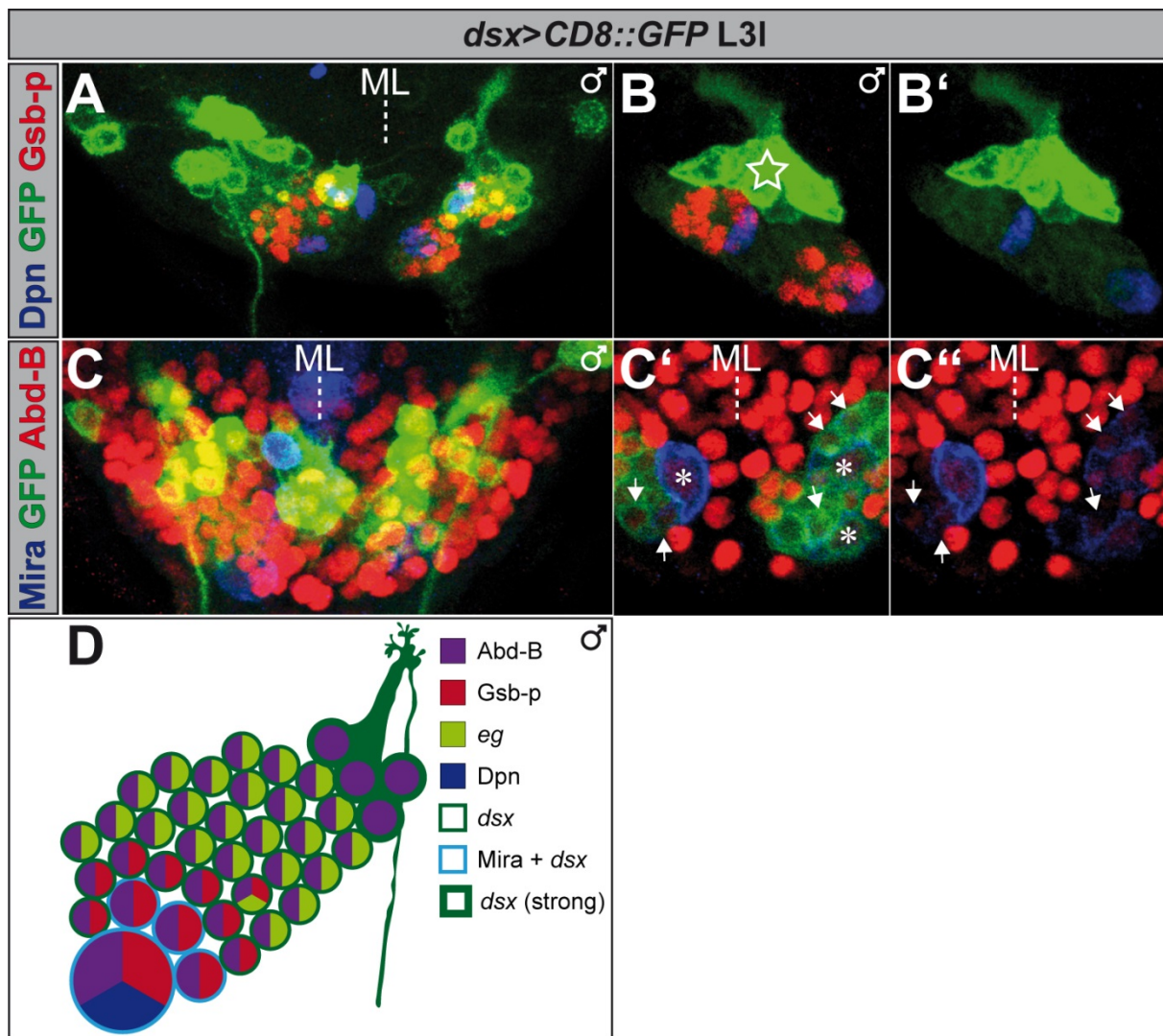


Abb. 3-17: Molekulare Marker für die lateralen männchenspezifischen Zellcluster in der L3-Wanderlarve
 (A-C) Horizontale Ansicht (anterior ist oben) der *dsx*-Gal4-exprimierenden ML-Zellen in L31-Larven nach Antikörperfärbung (wie angegeben). ML = Mittellinie. (A) Maximalprojektion von *dsx>CD8::GFP* gefärbt gegen GFP, Gsb-p und Dpn. (B) Die anterior-dorsal gelegenen, stark *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen (weißer Stern) zeigen keine Gsb-p-Expression. (B') ohne den roten Kanal. (C) Maximalprojektion von *dsx>CD8::GFP* gefärbt gegen GFP, Abd-B und Mira. (C') Dieser Ausschnitt zeigt eine vergrößerte Einzelebene aus (C) und markiert sowohl die geschlechtsspezifischen NBs (Asteriske) als auch deren GMZs (Pfeile). (C'') ohne den grünen Kanal. (D) fasst alle Marker für die lateralen männchenspezifischen Zellstammbäume in L31 zusammen.

In der ML co-exprimieren alle *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen, wie auch im Embryo, Run (Abb. 3-12F; Abb. 3-18A). Außerdem exprimieren zumindest noch einige von ihnen Wrapper (Abb. 3-18B). Das erhärtet die Vermutung, dass es sich zumindest bei einem Teil der *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen in der ML der Männchen um ML-Gliazellen handelt (siehe Kapitel 3.2.1.2 und 4.2).

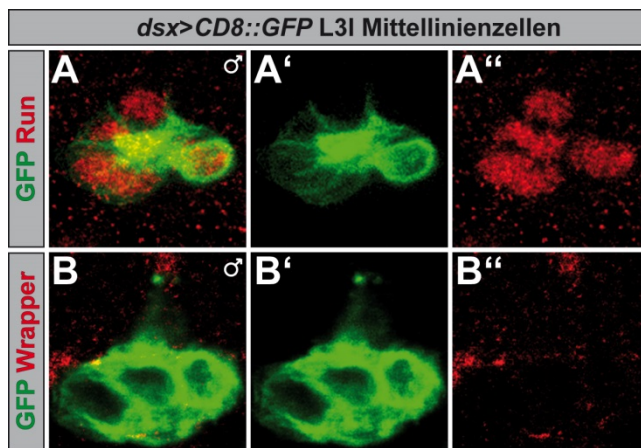


Abb. 3-18: Molekulare Marker, die in den *doublesex*-Gal4-positiven Mittellinienzellen der männlichen L3-Wanderlarve exprimiert werden Horizontale Ansicht (anterior ist oben) der *dsx*-Gal4-exprimierenden ML-Zellen in L31-Larven nach Antikörperfärbung (wie angegeben). Die erste Reihe zeigt beide Kanäle zusammen, die zweite und dritte Reihe jeweils die Einzelkanäle.

3.2.3 Geschlechtsspezifische Neuroblasten und ihre Zellstammbäume in der späten L2- und der frühen L3-Larve

Als nächstes wurde versucht, die Lücke zwischen den männchenspezifischen Zellstammbäumen in L31-Larven und den *dsx*-Gal4-exprimierenden NBs im Embryo zu schließen. In L3e-Larven haben die geschlechtsspezifischen NBs im Männchen bereits mit der Proliferation begonnen und es konnten sowohl laterale, als auch ein mediales Cluster von *dsx*-Gal4-exprimierenden Zellen identifiziert werden (Abb. 3-19A). Sie zeigen dieselbe räumliche Aufteilung wie in L31-Larven, doch die Zellzahl ist noch deutlich geringer (vgl. Abb. 3-13A). In weiblichen L3e-Larven konnte keine *dsx*-Gal4-Expression beobachtet werden (nicht gezeigt), was andeutet, dass die geschlechtsspezifischen NBs in Weibchen gar keine postembryonalen Zellstammbäume hervorbringen. Diese Hypothese steht jedoch im Gegensatz zu einer vorherigen Untersuchung, die gezeigt hat, dass die geschlechtsspezifischen NBs in Weibchen bis zur L3m-Larve proliferieren (Taylor und Truman, 1992).

Obwohl *Gsb-p* in L31-Larven nur in den männchenspezifischen Zellstammbäumen exprimiert wird (Abb. 3-17A), konnte es in L21-Larven überraschenderweise in beiden Geschlechtern detektiert werden. Hinter einer Gruppe von *Gsb-p*-exprimierenden Zellen befindet sich auf jeder Seite ein abgegrenztes Cluster von terminalen abdominalen NBs, die den Stammzellmarker *Dpn* exprimieren. In den L21-Weibchen konnten sechs bis sieben NBs pro Hemineuromer in dieser definierten Region identifiziert werden. Zwei von ihnen exprimieren *Gsb-p*, vier bis fünf nicht (Abb. 3-19B). Im Gegensatz dazu sind in männlichen L21-Larven acht bis neun NBs in dieser Region zu finden. Zwei NBs weisen eine *Gsb-p*-Expression auf und zwei weitere zeigen sowohl eine *Gsb-p*- als auch eine *dsx*-Gal4-Expression, was sie als die geschlechtsspezifischen NBs ausweist. Die vier bis fünf weiteren NBs zeigen keine Expression dieser Marker (Abb. 3-19C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die geschlechtsspezifischen NBs in Weibchen schon in L21-Larven nicht mehr vorhanden sind und überhaupt keine postembryonalen Tochterzellen generieren.

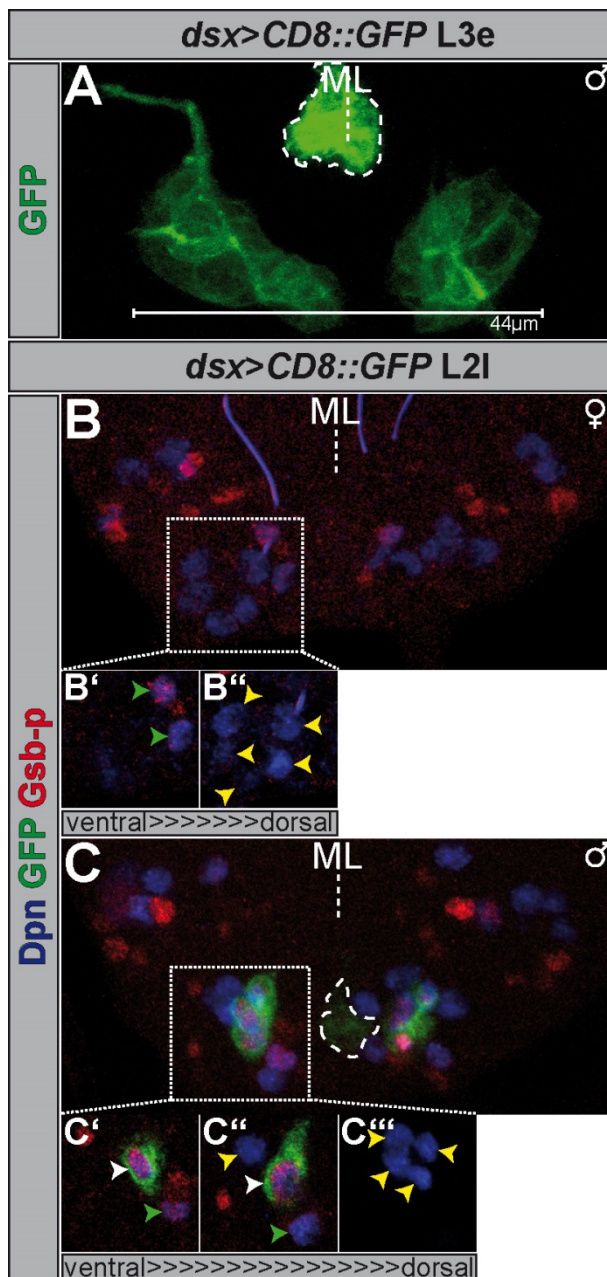


Abb. 3-19: *doublesex*-Gal4-Expression im ventralen Nervensystem von späten L2- und frühen L3-Larven

Horizontale Ansicht (anterior ist oben) der terminalen abdominalen Neuromere (*dsx >CD8::GFP*) in L2I- und L3e-Larven nach Antikörperfärbung (wie angegeben); ML = Mittellinie. Die *dsx*-Gal4-exprimierenden ML-Zellen sind von einer gestrichelten Linie umgeben. (A) *dsx >CD8::GFP* in männlichen L3e-Larven. (B-C) *dsx >CD8::GFP* in weiblichen (B) und männlichen (C) L2I-Larven. Die Region der terminalen abdominalen NBs ist durch ein weißes Quadrat hervorgehoben, von dem diverse Fokusebenen gezeigt sind (B', B''; C'-C'''). Zellen, die sowohl *dsx*-Gal4 als auch Gsb-p exprimieren, sind mit weißen Pfeilen markiert, NBs, die nur Gsb-p exprimieren sind mit grünen Pfeilen markiert und NBs, die keine dieser Faktoren exprimieren, sind mit gelben Pfeilen markiert.

3.2.4 Programmierter Zelltod in den geschlechtsspezifischen Neuroblasten des Weibchens

Da die geschlechtsspezifischen NBs in L2I-Weibchen nicht zu finden waren, wurde untersucht, ob diese Zellen durch PCD entfernt werden. Hierfür wurde *dsx*-Gal4 genutzt, um den Apoptose-Inhibitor P35 (Hay et al., 1994) in den geschlechtsspezifischen NBs ektopisch zu exprimieren. In den meisten Fällen ($n = 7$) konnten in weiblichen L3-Larven alle vier lateralen männchenspezifischen *dsx*-Gal4-Cluster gerettet werden. Hierbei konnten auch immer zwei assoziierte Mira-positive, geschlechtsspezifische NBs pro Seite gefunden werden (Abb. 3-20A), die in weiblichen WT L3I-Larven niemals zu beobachten waren (0 NBs, $n = 10$, Abb. 3-20D). In einigen Fällen ($n = 3$) fehlte ein lateraler NB und sein Zellstammbaum (Abb. 3-20B), was einer partiellen Rettung der geschlechtsspezifischen NBs entspricht und nur in einem Fall fehlten zwei

laterale NBs und ihre Zellstambäume (nicht gezeigt). Der Mittelwert der geretteten geschlechtsspezifischen NBs in L3-Weibchen ($3,55 \pm 0,69$ NBs, $n = 11$) unterscheidet sich nicht signifikant von WT Männchen (4 ± 0 NBs, $n = 10$, Abb. 3-20D). Die ML-Zellen konnten in allen Fällen gerettet werden.

Die postembryonalen männchenspezifischen Zellcluster werden also in den Weibchen niemals gebildet, weil ihre Vorläufer zwischen St17 und L21 den PCD induzieren. Wenn die Apoptose unterbunden wird, überleben die geschlechtsspezifischen NBs auch in den Weibchen und generieren die männchenspezifischen Cluster und Projektionen (Abb. 3-20C) (siehe Kapitel 4.3).

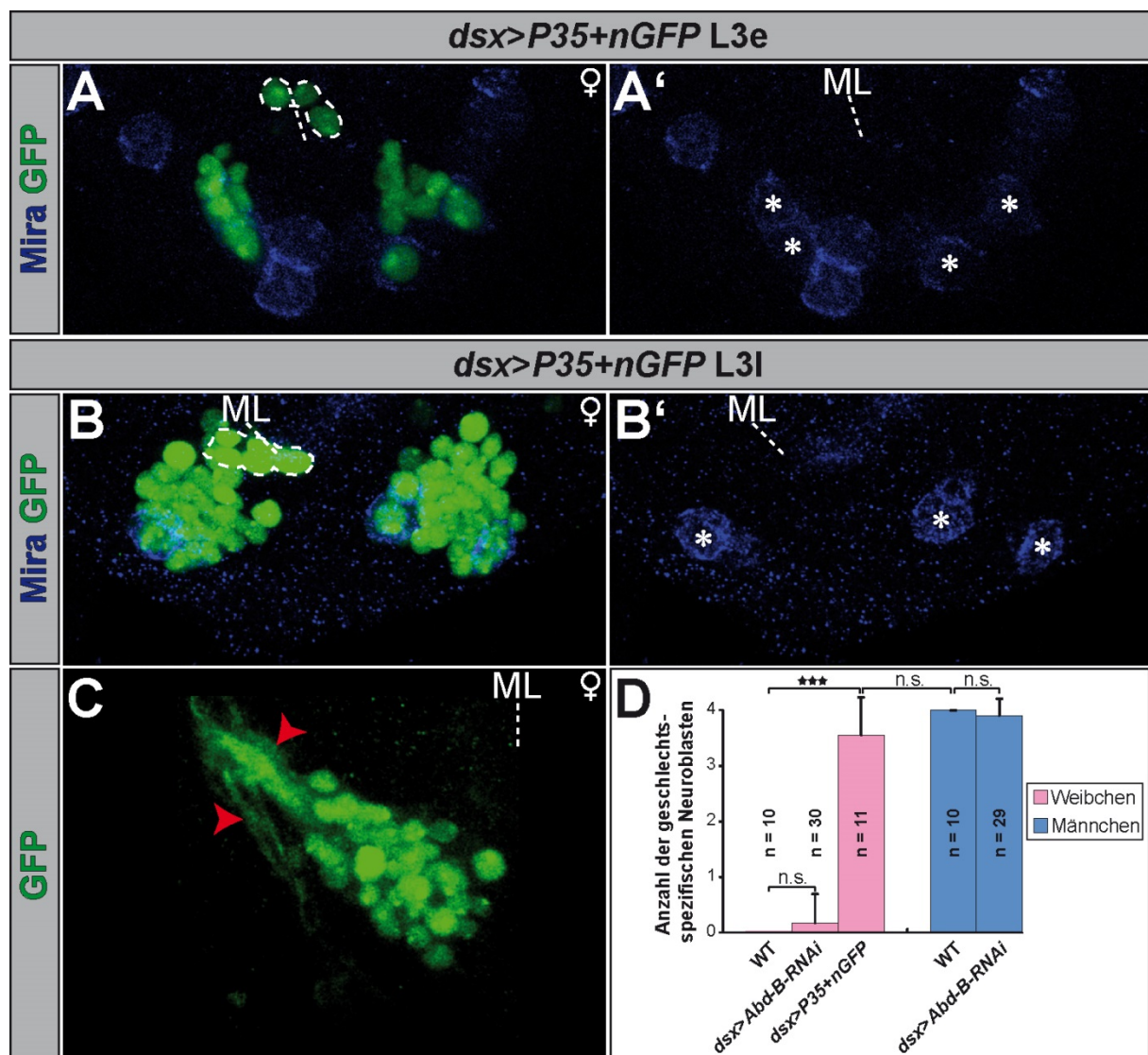


Abb. 3-20: Die geschlechtsspezifischen Neuroblasten in Weibchen werden durch Apoptose entfernt

(A-C) Horizontale Ansicht (anterior ist oben) der terminalen abdominalen Neuromere (*dsx*>*P35+nGFP*) in L3e- (A) und L31-Larven (B, C) nach Antikörperfärbung (wie angegeben). ML = Mittellinie. Die *dsx*-Gal4-exprimierenden ML-Zellen sind von einer gestrichelten Linie umgeben. (A', B') zeigen nur die Mira-Expression, wobei die geschlechtsspezifischen NBs jeweils mit einem Asterisk markiert sind. (C) zeigt einen männchenspezifischen Zellstambaum (Maximalprojektion). Rote Pfeilspitzen deuten auf die männchentypische Projektion. (D) Anzahl der geschlechtsspezifischen NBs in L3-Larven verschiedener Genotypen (wie angegeben). Es wurde ein zweiseitiger t-test durchgeführt. n.s., nicht signifikant ($P > 0.05$); *** $P < 0.001$. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Da die geschlechtsspezifischen NBs sowohl embryonal als auch postembryonal eine starke Abd-B-Expression aufweisen, wurde auch untersucht, in wie weit der PCD unter der Kontrolle dieses *Hox*-Gens steht. Dafür wurde *Abd-B-RNAi* mit Hilfe von *dsx*-Gal4 in den geschlechtsspezifischen NBs getrieben. Jedoch konnten sowohl in männlichen als auch in weiblichen L31-Larven nur schwache Effekte beobachtet werden: In zwei L31-Weibchen konnten zwei und in einem Fall konnte ein geschlechtsspezifischer NB gerettet werden. In allen anderen Fällen konnte keine Abweichung vom WT festgestellt werden ($0,16 \pm 0,53$ NBs, $n = 30$, Abb. 3-20D). In L31-Männchen fehlte in drei Fällen ein geschlechtsspezifischer NB, während in allen anderen Fällen vier geschlechtsspezifische NBs vorhanden waren ($3,89 \pm 0,30$ NBs, $n = 29$, Abb. 3-20D). Diese schwachen Effekte könnten entweder auf die geringe Effizienz von embryonalem RNAi zurückgehen oder damit zusammenhängen, dass möglicherweise noch weitere Faktoren parallel zu *Abd-B* das Überleben der geschlechtsspezifischen NBs kontrollieren.

3.2.5 Duale Rolle von *doublesex* bei der Spezifizierung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten

Es wurde bereits gezeigt, dass *dsx* die postembryonale Proliferation der geschlechtsspezifischen NBs kontrolliert (Taylor und Truman, 1992). In *tra*- und *tra2*-Mutanten, in denen das weibchenspezifische Spleißen der *dsx* prä-mRNA verhindert ist und stattdessen Dsx[M] gebildet wird (Hoshijima et al., 1991), proliferieren die geschlechtsspezifischen NBs in weiblichen L31-Larven wie in WT Männchen (Kapitel 1.2) (Taylor und Truman, 1992). Bei der Rekapitulation dieses Experiments wurde *inscuteable* (*insc*)-Gal4, das in allen NBs exprimiert wird, verwendet, um *tra*- bzw. *tra2-RNAi* ektopisch zu exprimieren. Die Identifizierung der geschlechtsspezifischen NBs erfolgte in L31-Larven aufgrund ihrer Lage, ihrer Größe und der Expression von Mira. Mit *tra-RNAi* konnte in vier Fällen ein NB in weiblichen L31-Larven gerettet werden ($0,4 \pm 0,52$ NBs, $n = 10$, Abb. 3-21), mit *tra2-RNAi* nur in einem einzigen Fall ($0,13 \pm 0,35$ NBs, $n = 8$, Abb. 3-21). Wurde hingegen der *dsx*-Treiber genutzt, um die Konstrukte ektopisch in den geschlechtsspezifischen NBs zu exprimieren, konnten mit *tra-RNAi* ein bis vier ($2,25 \pm 0,88$ NBs, $n = 8$, Abb. 3-21) und mit *tra2-RNAi* ein bis zwei geschlechtsspezifische NBs ($0,5 \pm 0,7$ NBs, $n = 10$, Abb. 3-21) in den Weibchen gerettet werden. Ob der Knockdown von *tra* allerdings tatsächlich einen stärkeren Effekt auf den geschlechtsspezifischen Spleißvorgang besitzt als der Verlust von *tra2*, bleibt jedoch fraglich, da die RNAi-Konstrukte möglicherweise eine unterschiedliche Effizienz aufweisen und in einer vorherigen Mutantenanalyse keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (Taylor und Truman, 1992). Die Rettung der geschlechtsspezifischen NBs beim Knockdown von *tra* bzw. *tra2* könnte unterschiedliche Gründe haben: Es könnte am Verlust von *dsx[F]* liegen, welches möglicherweise für die Induktion des PCD in den geschlechtsspezifischen NBs verantwortlich ist. Möglich ist aber auch, dass die

Anwesenheit von *dsx[M]* in den Weibchen ausreicht, um die geschlechtsspezifischen NBs vor Apoptose zu bewahren (oder beides).

Um zwischen diesen Möglichkeiten zu differenzieren, wurden *dsx[F]* oder *dsx[M]* ektopisch exprimiert. Bei der ektopischen Expression von *dsx[F]* durch *insc*-Gal4 in L31-Männchen konnte in zwei Fällen ein geschlechtsspezifischer NB entfernt werden ($3,85 \pm 0,38$ NBs, $n = 13$, Abb. 3-21). Umgekehrt konnte bei der ektopischen Expression von *dsx[M]* in Weibchen in drei Fällen ein geschlechtsspezifischer NB gerettet werden ($0,5 \pm 0,55$ NBs, $n = 6$, Abb. 3-21). Die relativ schwachen Phänotypen konnten durch den Einsatz von *dsx*-Gal4 anstelle des *insc*-Treibers deutlich verstärkt werden, so dass in männlichen L31-Larven bei der ektopischen Expression von *dsx[F]* in den meisten Fällen alle vier geschlechtsspezifischen NBs sterben ($0,85 \pm 1,41$ NBs, $n = 26$, Abb. 3-21). Dieses Resultat belegt eindrucksvoll die Induktion der Apoptose durch *dsx[F]*. In einem Kontrollexperiment derselben Überexpression in Weibchen konnte kein Unterschied zum WT festgestellt werden (0 NBs, $n = 22$, Abb. 3-21). Die ektopische Expression von *dsx[M]* in den Weibchen unterscheidet sich nicht signifikant von den WT Männchen ($3,43 \pm 0,79$ NBs, $n = 7$, Abb. 3-21), was die rettende Wirkung von *dsx[M]* unterstreicht. *dsx>dsx[M]* in Männchen führte in den meisten Fällen nicht zu einer Abweichung vom WT, jedoch konnten in vier Individuen fünf anstatt vier geschlechtsspezifische NBs detektiert werden ($4,23 \pm 0,43$ NBs, $n = 18$, Abb. 3-21). Die Gründe für die stärkeren Effekte des *dsx*-Gal-Treibers im Vergleich zu *insc*-Gal4 könnten zum einen darin liegen, dass *dsx*-Gal4 stärker als *insc*-Gal4 in den geschlechtsspezifischen NBs exprimiert wird und zum anderen daran, dass *dsx*-Gal4 eine Mutante darstellt, in der die Dosis an nativem *dsx* Genprodukt reduziert ist (Robinett et al., 2010) (siehe Kapitel 4.3).

Zuletzt wurde *dsx*-Gal4 genutzt, um *dsx* mit *dsx-RNAi* in den geschlechtsspezifischen NBs auszuschalten. In den Männchen konnte eine signifikante Reduktion der geschlechtsspezifischen NBs festgestellt werden ($2,17 \pm 1,42$ NBs, $n = 17$, Abb. 3-21), während Weibchen keine Abweichung vom WT zeigen (0 NBs, $n = 10$, Abb. 3-21). Diese Beobachtungen decken sich mit einer vorherigen Untersuchung zur Anzahl der geschlechtsspezifischen NBs in *dsx*-Mutanten (Taylor und Truman, 1992).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass *dsx* eine duale Rolle bei der Spezifizierung der geschlechtsspezifischen NBs einnimmt: Während *dsx[F]* den PCD induzieren kann, wird *dsx[M]* für die Rettung der geschlechtsspezifischen NBs benötigt (siehe Kapitel 4.3).

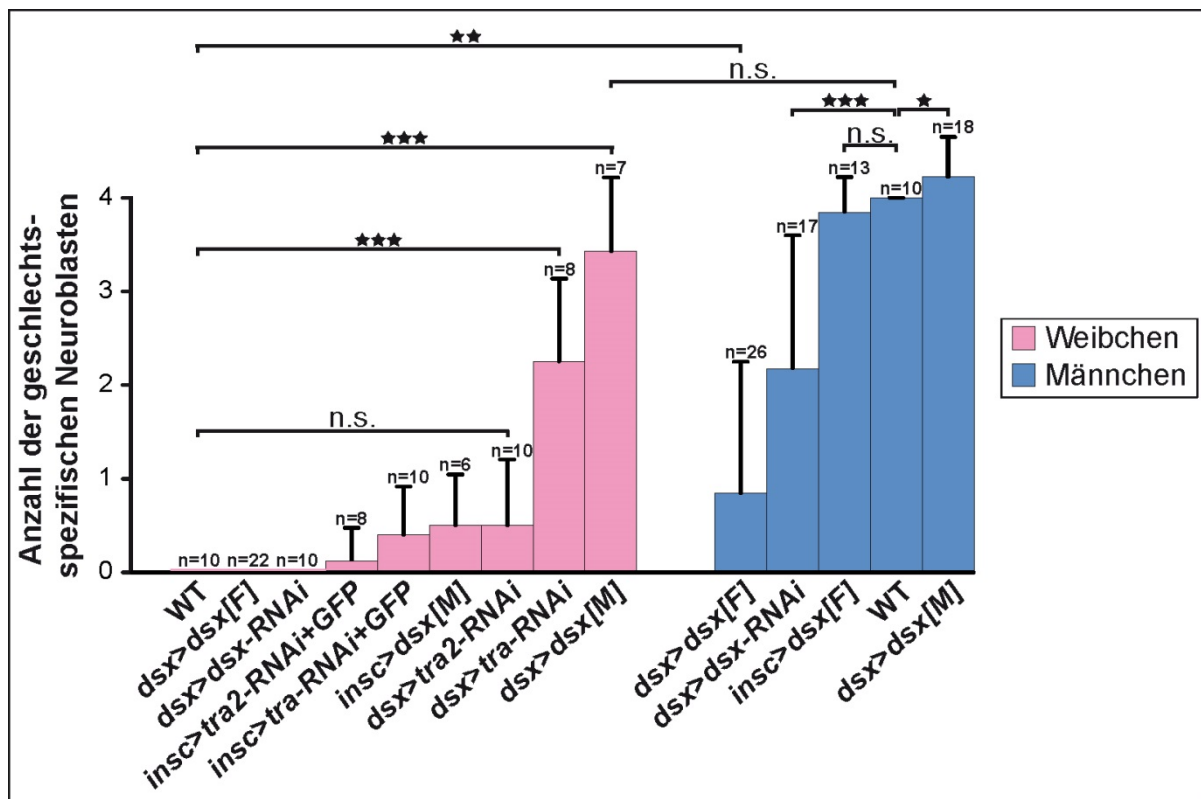


Abb. 3-21: Die Rolle von *doublesex* bei der Spezifizierung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten

Statistik der geschlechtsspezifischen NBs in L31-Larven von verschiedenen Genotypen (wie angegeben). Es wurde ein zweiseitiger t-test durchgeführt. n.s., nicht signifikant ($P > 0.05$); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

3.2.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die embryonale Herkunft der geschlechtsspezifischen NBs gezeigt und Hinweise für deren Identität geliefert. Es folgte eine detaillierte Charakterisierung der geschlechtsspezifischen NBs und der von ihnen hervorgebrachten männchenspezifischen Zellstambäume in der Larve. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die geschlechtsspezifischen NBs in Weibchen zwischen St17 und L21 absterben. Für die Induktion der Apoptose in den geschlechtsspezifischen NBs ist *dsx[F]* verantwortlich. Im Gegensatz dazu führt die Expression von *dsx[M]* zu einer Rettung der geschlechtsspezifischen NBs.

3.3 *Abdominal-B* und *caudal* verhindern die Bildung spezifischer Neuroblasten in der terminalen Abdominalregion

Gemäß der erstellten NB-Karte ist die Anzahl der NBs in den terminalen abdominalen Neuromeren im Vergleich mit thorakalen und anterioren abdominalen Neuromeren um 28% in A9 bzw. 66% in A10 verringert (Abb. 3-10A). Aber welche Faktoren spielen bei der Reduktion der NBs in diesen HSs eine Rolle und wie sind deren Wirkungsmechanismen?

3.3.1 *Abdominal-B* unterdrückt die Bildung spezifischer Neuroblasten in Parasegment 15

Naheliegende Kandidaten für die Reduktion an NBs in diesem Bereich sind die für Vermittlung von Segmentidentität verantwortlichen *Hox*-Gene (Kapitel 1.3), die jedoch nicht innerhalb von Segmentgrenzen exprimiert werden, sondern PS-Grenzen respektieren. Ein PS besteht aus dem posterioren, En-positiven Kompartiment eines Segments und dem anterioren, En-negativen Kompartiment des nachfolgenden Segments (Martinez-Arias und Lawrence, 1985). So besteht beispielsweise PS14 aus dem posterioren Kompartiment von A8 und dem anterioren Kompartiment von A9 (siehe Abb. 1-5A; Abb. 3-23A). Dementsprechend wurde die Anzahl an NBs anhand von Dpn-Färbungen im St12e noch einmal in Bezug auf PSs ausgezählt. Im WT wurden pro Hemi-PS $31,13 \pm 0,35$ ($n = 8$) Dpn-positive Zellen in PS13, $25,88 \pm 1,13$ ($n = 8$) in PS14 und $11,88 \pm 0,64$ ($n = 8$) in PS15 gefunden (Abb. 3-22; Abb. 3-23A).

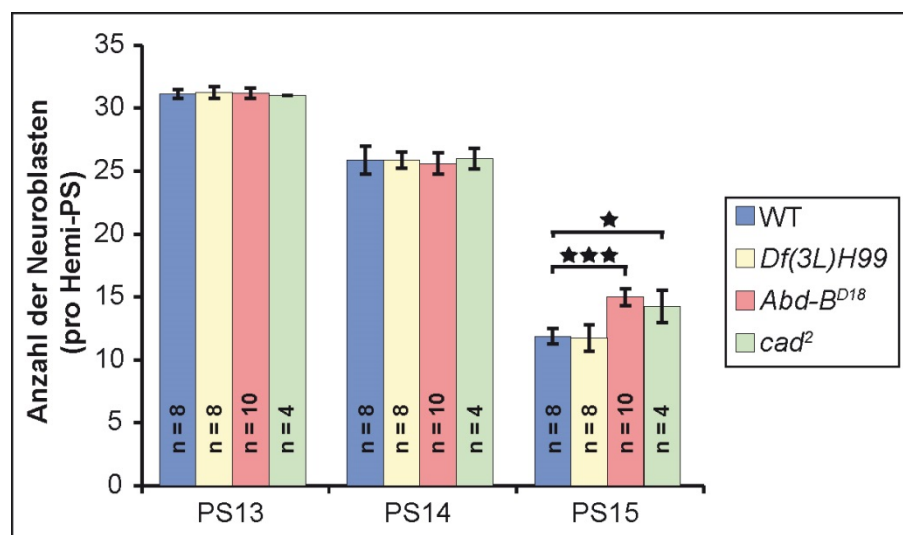


Abb. 3-22: Anzahl an Neuroblasten in den terminalen abdominalen Hemiparasegmenten unterschiedlicher Mutanten

Gesamtanzahl der NBs (pro Seite) in PS13-15 von St12e Embryonen verschiedener Genotypen (wie angegeben). Alle Genotypen desselben PS wurden durch einen zweiseitigen t-test mit dem WT verglichen. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; alle anderen weichen nicht signifikant vom WT ab ($P > 0.05$) und sind deshalb ohne Stern. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Abd-B ist das *Hox*-Gen des *BX-C* mit der posteriorsten Expressionsdomäne (Harding et al., 1985) und deshalb wurde zunächst seine Rolle bei der Morphogenese der terminalen abdominalen

Neuromere untersucht. *Abd-B^{D18}* ist eine kleine, durch Röntgenbestrahlung erzeugte Defizienz, in der die komplette *Abd-B* CDS entfernt wurde (Hopmann et al., 1995). In *Abd-B^{D18}*-Embryonen erschien die Anzahl der Dpn-positiven Zellen in PS15 ($15 \pm 0,67$, $n = 10$) im Vergleich zum WT um etwa drei bis vier Zellen pro Seite erhöht. PS13-14 zeigten keine signifikanten Abweichungen vom WT (Abb. 3-22; Abb. 3-23B). Somit spielt *Abd-B* wohl eine Rolle bei der Reduktion der NBs in PS15. In *Df(3L)H99*-Embryonen, in denen die Apoptose im vNS unterdrückt wird (White et al., 1994), konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Dpn-positiven Zellen der terminalen abdominalen Neuromere im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abb. 3-22; Abb. 3-23C). Das deutet darauf hin, dass *Abd-B* die Anzahl der NBs in PS15 nicht durch PCD reduziert, sondern deren Bildung unterdrückt.

Um NBs zu identifizieren, die von dieser Inhibition betroffen sind, wurden Antikörperfärbungen gegen den molekularen Marker Eg, der in NB2-4, NB3-3, NB6-4, NB7-3 und deren Tochterzellen exprimiert wird (Dittrich et al., 1997; Higashijima et al., 1996), durchgeführt. Im WT wird NB6-4 in PS14 und PS15 gebildet, reguliert die Eg-Expression jedoch sehr schnell herunter. NB3-3 und NB7-3 werden nicht in PS15, NB2-4 nicht in PS14 und PS15, gebildet (Abb. 3-9; Abb. 3-23D). Demnach handelt es sich bei diesen drei NBs um Kandidaten, deren Bildung möglicherweise durch *Abd-B* unterdrückt wird. Im St13 sind NB2-4, NB3-3 und NB6-4 in *Abd-B^{D18}*- sowie in *Df(3L)H99*-Embryonen in denselben PSs vertreten wie auch im WT (Abb. 3-23D-F). Dies deutet darauf hin, dass *Abd-B* die Bildung dieser NBs in den terminalen PSs nicht beeinflusst.

Dennoch weisen die Zellstambäume dieser NBs einige Unterschiede zum WT auf: In *Abd-B^{D18}*-Mutanten zeigt der NB6-4-Zellstammbaum in PS14 (100%, $n = 28$ Hemi-PSs) und gelegentlich auch in PS13 (14%, $n = 28$) eine homeotische Transformation in thorakales Schicksal und besteht dementsprechend aus einem neuronalen und einem glialen Anteil (Abb. 3-23E) (siehe auch Berger et al., 2005), wohingegen der abdominale NB6-4-Zellstammbaum im WT normalerweise nur aus Gliazellen besteht (Abb. 1-3B) (Schmidt et al., 1997).

Im St16 des WT besteht das NB3-3-Cluster in PS14 aus nur sechs Zellen (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu besteht das NB3-3-Cluster in PS14 von *Abd-B^{D18}*-Mutanten zu diesem Zeitpunkt aus zwölf Zellen, von denen die Mehrzahl Eve-negativ ist (Abb. 3-24E). Auch das entspricht einer homeotischen Transformation in thorakales Schicksal (Abb. 1-3A) (Schmidt et al., 1997). Da die Größe des NB3-3-Zellstammbaums auch in *Df(3L)H99*-Embryonen vergrößert ist (zehn Zellen), kann angenommen werden, dass *Abd-B* den PCD in einigen dieser Tochterzellen vermittelt.

Bemerkenswerterweise konnte in *Abd-B^{D18}*-Mutanten ein ektopisches Eg-positives Zellcluster pro Seite in PS15 detektiert werden (100%, $n = 28$ Hemi-PSs, Abb. 3-23E), das niemals im WT (Abb. 3-23D) oder *Df(3L)H99* (Abb. 3-23F) zu finden war. Dieses Zellcluster ist Run-negativ (Abb. 3-24A), aber En-positiv (Abb. 3-24B) und im letzten vollständigen En-Streifen lokalisiert. Da die

Zellen kein Repo exprimieren (Abb. 3-24C), scheinen sie nicht vom NB6-4 zu stammen. Stattdessen konnten sie aufgrund ihrer Ey-Expression (Abb. 3-24D) eindeutig als Tochterzellen von NB7-3 identifiziert werden. Außerdem sind die Zellen in derselben dorsalen Position wie die NB7-3-Tochterzellen in anterioren Neuromeren zu finden und ihr Vorläufer delaminiert im St11-St12e (S5). Das Cluster besteht aus bis zu drei Zellen im St13, fünf Zellen im St14 und aus vier Zellen ab St16. Alle diese Eigenschaften sind kongruent mit dem NB7-3-Zellstammbaum in anterioren Neuromeren (Abb. 1-2D, E) (Bossing et al., 1996; Karcavich und Doe, 2005; Novotny et al., 2002; Schmid et al., 1999). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Eg-positiven Zellen in PS15 einem ektopischen NB7-3-Zellstammbaum entsprechen. Die Abwesenheit dieses Clusters in *Df(3L)H99* (Abb. 3-23F; Abb. 3-34A) weist darauf hin, dass *Abd-B* nicht den PCD induziert, sondern normalerweise die Bildung dieses NB in PS15 unterbindet. Da dieser Phänotyp, wenn auch mit geringerer Expressivität (50%, n = 14 Hemi-PSs), auch in der *Abd-B* heterozygoten Situation zu finden war (Abb. 3-24F; Abb. 3-34A), scheinen die beobachteten Effekte dosisabhängig zu sein.

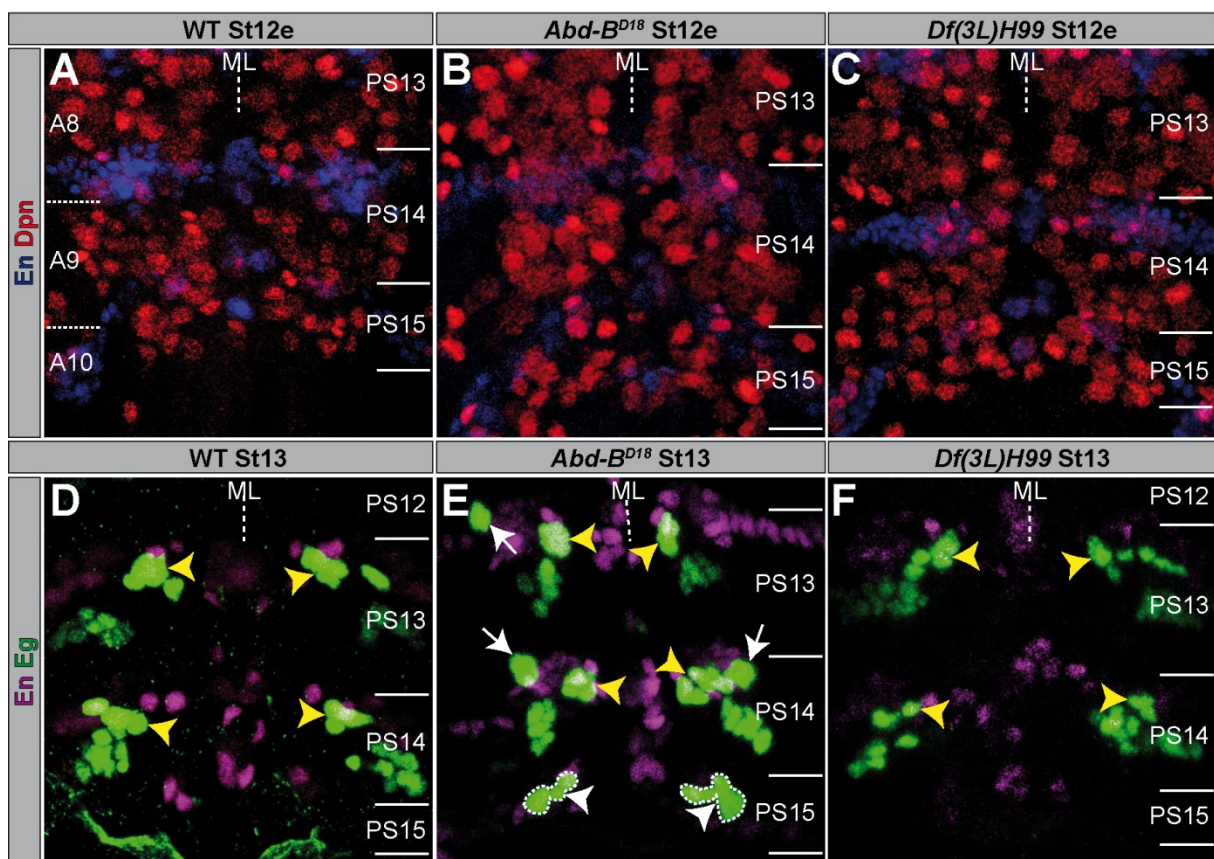


Abb. 3-23: Abweichungen im Deadpan- und Eagle-Expressionsmuster terminaler abdominaler Parasegmente von *Abdominal-B^{D18}*-Mutanten und *Df(3L)H99*-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12e und St13 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; in (A) sind auf der linken Seite zum Vergleich noch einmal die Segmentgrenzen eingezeichnet; ML = Mittellinie. (A-C) Dpn dient als universeller NB-Marker. (D-F) Eg wird in vier NBs und deren Tochterzellen exprimiert: NB2-4- (dorsal) und NB3-3-Klone (ventral) sind En-negativ und in PS13 dieser Maximalprojektionen nicht zu unterscheiden. Die typische mediale Position von NB7-3 (En-positiv) ist durch gelbe Pfeilspitzen markiert. (D, F) Die abdominalen NB6-4-Klone bestehen aus zwei Gliazellen, die Eg bereits

herunter reguliert haben und deshalb hier nicht zu sehen sind. (E) Die Transformation des abdominalen NB6-4 in thorakales Schicksal ist mit dem Erscheinen eines neuronalen Subklons verbunden, der eine konstante Eg-Expression aufweist (weiße Pfeile). Ektopische NB7-3 Zellen in PS15, die weder im WT noch in *Df(3L)H99* zu finden sind, werden durch gestrichelte Linien hervorgehoben und durch weiße Pfeilspitzen markiert.

Schließlich konnten ab St15 auch einige Eg-positive Zellen posterior vom ektopischen NB7-3-Cluster in PS15 von *Abd-B^{D18}*-Mutanten beobachtet werden (Abb. 3-24E). Ihre dorsale Position, sowie die Co-Expression von *Lbe* und *Run* (nicht gezeigt) identifiziert sie als NB5-3-Tochterzellen, deren Vorläufer auch im WT in diesem PS vertreten ist, dort aber keine Tochterzellen mit dieser Markerkombination generiert (Abb. 3-9).

Zuletzt konnten in *Abd-B^{D18}*-Mutanten die charakteristischen Eve-positiven Tochterzellen aCC und pCC von NB1-1 (Broadus et al., 1995), das RP2-Neuron von NB4-2 (Bossing et al., 1996), die Eg-coexprimierenden EL-Neurone von NB3-3 (Abb. 1-3A) (Schmidt et al., 1997) posterior bis PS14 und die U-Neurone von NB7-1 (Bossing et al., 1996) bis PS15 identifiziert werden (Abb. 3-24E), was keine Abweichung vom WT darstellt (Abb. 3-9). Dies unterstreicht, dass *Abd-B* in der Tat nur die Bildung spezifischer NBs unterdrückt, was durch die ektopische Expression von *Abd-B* bestätigt wird (siehe Kapitel 3.3.4).

Im Folgenden wird NB7-3 als Modell verwendet, um die Mechanismen zu untersuchen, welche die Bildung der NBs in der terminalen Abdominalregion unterdrücken.

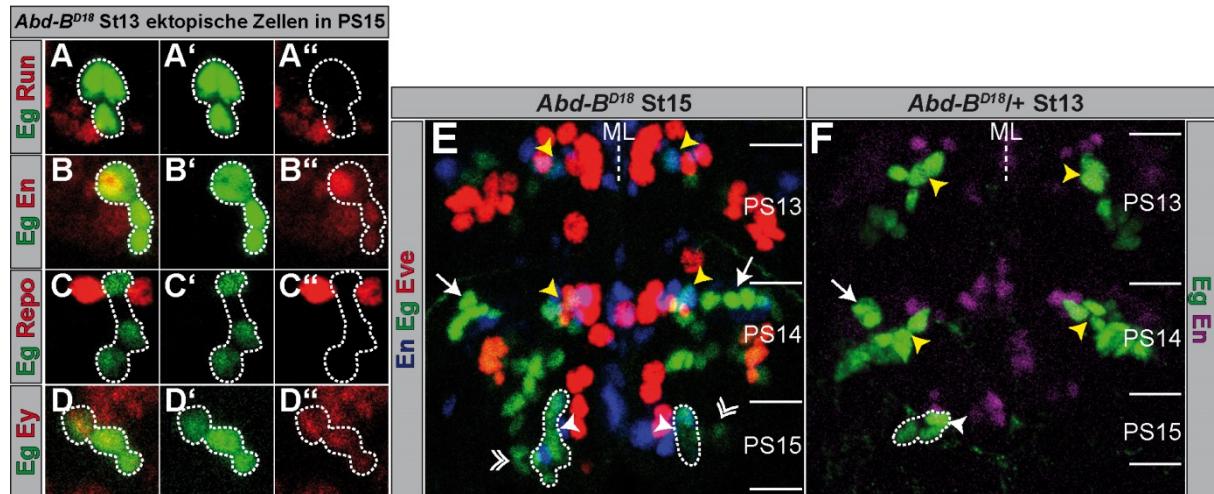


Abb. 3-24: *Abdominal-B* unterdrückt in Parasegment 15 die Bildung von Neuroblast 7-3 in dosisabhängiger Weise

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St13 und St15 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A-D) Die ektopischen NB7-3-Zellen in PS15 von *Abd-B^{D18}*-mutanten Embryonen (durch weiß gestrichelte Linie hervorgehoben) wurden durch Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und diverse molekulare Marker (rot, wie angegeben) identifiziert. (A'-D') Nur der grüne Kanal ist gezeigt. (A''-D'') Nur der rote Kanal ist gezeigt. (E, F) Die typische mediale Position von NB7-3 ist durch gelbe Pfeilspitzen angezeigt. Ektopische NB7-3-Zellen in PS15 sind durch die weiße Umrandung hervorgehoben und von weißen Pfeilspitzen markiert. Neuronale NB6-4-Zellen, die im WT Abdomen nicht existieren, sind durch weiße Pfeile markiert. (E) Ventrale Eg-positive Zellen, die sich von NB5-3 ableiten, sind durch weiße zweispitzige Pfeile markiert. Das NB3-3-Cluster in PS13 besteht fast ausschließlich aus Eve-positiven Zellen, wohingegen das NB3-3-Cluster in PS14 auch viele Eve-negative Zellen enthält. Die Verteilung der Eve-positiven Zellen verhält sich genauso wie im WT (vgl. Abb. 3-8A, B) (F) Der heterozygote Embryo zeigt ektopische neuronale NB6-4-Cluster (PS14) und NB7-3-Zellen (PS15) in nur jeweils einem PS.

3.3.2 Der Zellstammbaum des ektopischen Neuroblasten 7-3 in Parasegment 15 von *Abdominal-B*-Mutanten exprimiert keine Gene des *Bithorax-Komplex*

Die Interaktion von *Hox*-Genen des *BX-C* ist von der sog. „posterioren Dominanz“ geprägt. Demnach reprimieren *Hox*-Gene, welche in posterioren PSs exprimiert werden, die Expression der anterioren *Hox*-Gene (Zusammenfassungen bei Duboule und Morata, 1994; Morata, 1993). Dementsprechend reicht die *Abd-A*-Expressionsdomäne in einem St14 WT Embryo von PS7-aPS13 (siehe auch Abb. 3-25A), während sie in *Abd-B*-Funktionsverlustmutationen bis mindestens PS14 expandiert (Karch et al., 1990; Kellerman et al., 1990; Macias et al., 1990). Um herauszufinden, ob die ektopischen Eg-positiven Zellen in *Abd-B*-Mutanten aufgrund der Expansion anderer *Hox*-Gene aus dem *BX-C* erscheinen, wurde deren Expression im vNS untersucht. In *Abd-B^{M1}*, einem Ethylmethansulfonat (EMS)-induzierten Funktionsverlustallel (Sanchez-Herrero et al., 1985), und *Df(3R)C4*, einer chromosomalen Deletion von *Abd-B*, die durch Röntgenstrahlung erzeugt wurde (Karch et al., 1985), konnte die antizipierte Expansion von *Abd-A* im vNS beobachtet werden. Dennoch konnte nie eine *Abd-A*-Expression im ektopischen NB7-3-Zellstammbaum von PS15 oder in den transformierten NB3-3- und NB6-4-Zellstammbäumen von PS14 detektiert werden (Abb. 3-25C, D). Hingegen konnte in *Abd-B^{D18}* überhaupt keine offensichtliche Expansion von *Abd-A* im vNS beobachtet werden (Abb. 3-25B). Erst seit Kurzem ist bekannt, dass im vNS eigentlich nicht *Abd-B* für die Repression von *Abd-A* verantwortlich ist, sondern die *iab-8 ncRNA* (Gummalla et al., 2012). Diese ist zwar auch in *Abd-B^{M1}* und *Df(3R)C4* betroffen, aber nicht in *Abd-B^{D18}*, was die fehlende Expansion von *Abd-A* im vNS dieser Mutante erklärt. Dennoch zeigen alle drei Mutanten denselben Eg-Phänotyp (Abb. 3-34A).

Aber unterliegen die ektopisch gebildeten Zellen überhaupt einem Einfluss durch den *BX-C*? *Ubx*, das anteriorste *Hox*-Gen des *BX-C*, wird im vNS des WT von PS5-PS13 exprimiert (White und Wilcox, 1984). In *Abd-B^{D18}*-Mutanten konnte keine offensichtliche Expansion von *Ubx* nach posterior festgestellt werden (Abb. 3-25G), was sich mit einer vorhergehenden Untersuchung deckt (Struhl und White, 1985). Des Weiteren zeigte eine Tripelmutante, in der alle Gene des *BX-C* betroffen sind, denselben Eg-Phänotyp wie die *Abd-B*-Einzelmutanten (Abb. 3-25E, F; Abb. 3-34A). Dies belegt, dass *Abd-B* das einzige Gen des *BX-C* ist, welches für den beschriebenen Eg-Phänotyp verantwortlich ist.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass in *Abd-B*-Mutanten weder der ektopische NB7-3-Zellstammbaum von PS15, noch die transformierten NB6-4- und NB3-3-Cluster von PS14, Gene des *BX-C* exprimieren. Infolge dessen weisen sie ein thorakales Schicksal auf und nehmen den Grundzustand T2 (pPS4 + aPS4) an, der keinen *BX-C* Einfluss benötigt (Lewis, 1978).

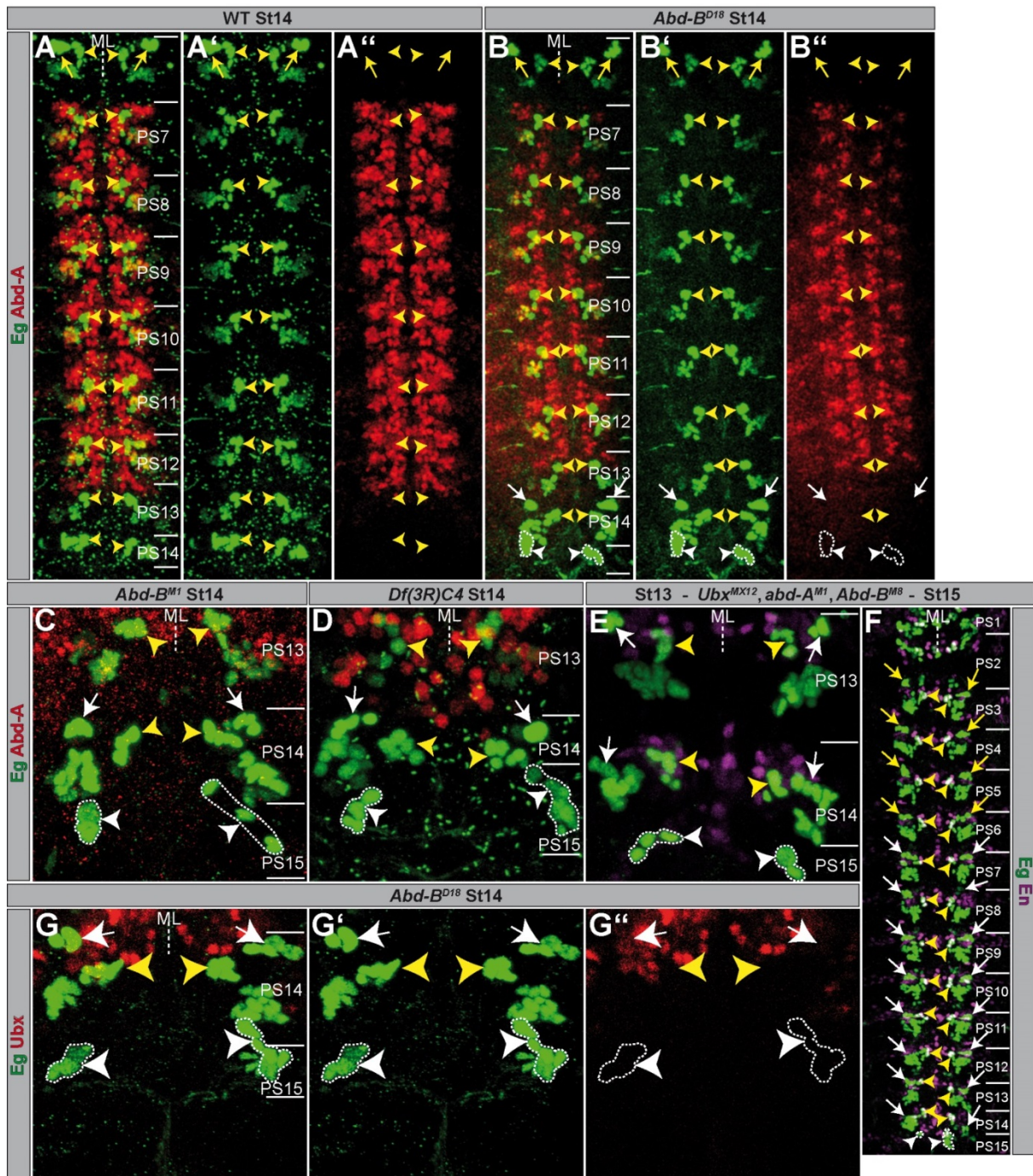


Abb. 3-25: Ektopische Zellcluster in *Abdominal-B*-Mutanten exprimieren keine Gene des *Bithorax-Komplex*

Filetpräparationen (Maximalprojektion, horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St13, St14 und St15 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A-G) Die typische mediale Position des NB7-3-Clusters ist durch gelbe Pfeilspitzen gekennzeichnet. Wildtypische NB6-4-Neurone sind durch gelbe Pfeile markiert. Ektopische NB6-4-Neurone im Abdomen sind durch weiße Pfeile angezeigt. Ektopische NB7-3-Cluster in PS15 sind weiß umrandet und durch weiße Pfeilspitzen markiert. (A'', B'', G'') zeigen nur die Eg-Expression. (A'', B'', G'') zeigen nur die *Hox*-Gen-Expression. (A, B) Es ist keine offensichtliche Expansion von Abd-A in *Abd-B^{D18}*-Mutanten zu beobachten. Die ektopischen Eg-positiven Zellen exprimieren kein Abd-A. (C, D) Abd-A ist in *Abd-B^{M1}* und *Df(3R)C4* zwar nach posterior expandiert, wird aber weder im neuronalen NB6-4-Subklon von PS14, noch im ektopischen NB7-3-Zellcluster von PS15 exprimiert. (E) *BX-C*-Tripelmutanten zeigen in den terminalen abdominalen PSs denselben Eg-Phänotyp wie die *Abd-B*-Einzelmutanten. (F) NB6-4 wird in allen abdominalen Segmenten der *BX-C*-Tripelmutante in thorakales Schicksal transformiert, was mit dem Erscheinen eines neuronalen Subklons verbunden ist. (G) Im neuronalen NB6-4-Subklon von PS14 und im ektopischen NB7-3-Zellcluster von PS15 ist keine Ubx-Expression vorhanden.

3.3.3 Die regulatorische Isoform von *Abdominal-B* ist für die Inhibition der Neuroblast 7-3-Bildung in Parasegment 15 verantwortlich

Das *Abd-B*-Gen besteht aus mindestens vier überlappenden Transkriptionseinheiten (Abb. 3-26A): A-Transkripte (Nomenklatur gemäß Zavortink und Sakonju, 1989) werden in PS10-13 exprimiert und besitzen m-Funktion. B- und C-Transkripte werden in PS14-15 exprimiert, γ -Transkripte nur in PS15 und jedes dieser Transkripte könnte zur r-Funktion beitragen (Kapitel 1.3) (Boulet et al., 1991; DeLorenzi et al., 1988; Kuziora und McGinnis, 1988; Sanchez-Herrero und Crosby, 1988; Zavortink und Sakonju, 1989). Um die Lokalisierung der genetischen Elemente im vNS durch *in situ*-Hybridisierung zu rekapitulieren, wurde eine spezifische Sonde für das A-Transkript (*Abd-B.m*) und eine zweite, die gegen alle Transkripte mit r-Funktion gerichtet ist (*Abd-B.r*), hergestellt (Kapitel 2.3.1; Abb. 3-26A). Die Färbungen bestätigen, dass *Abd-B.m* in PS13 und anterior dazu exprimiert wird (Abb. 3-26B), wohingegen *Abd-B.r*-Transkripte ausschließlich in PS14-15 zu finden waren (Abb. 3-26C). Es gab keinerlei Überlagerung von *Abd-B.m*- und *Abd-B.r*-Transkripten.

Eine cDNA Sequenzanalyse hatte bereits zuvor gezeigt, dass zwei Proteinisoformen existieren: *Abd-B.m*, welches auf das A-Transkript zurückgeht, und *Abd-B.r*, welches durch B-, C- und γ -Transkripte gebildet wird. *Abd-B.m* ist die größere Isoform (55kDa) und besitzt denselben C-Terminus wie *Abd-B.r* (30kDa), der die Homeodomäne beinhaltet. Zusätzlich besitzt *Abd-B.m* einen glutaminreichen N-Terminus, der aus 223 zusätzlichen Aminosäuren besteht, die in *Abd-B.r* fehlen (Celniker et al., 1989; DeLorenzi et al., 1988; Zavortink und Sakonju, 1989).

Nachdem die exakten Expressionsdomänen von *Abd-B.m* und *Abd-B.r* im vNS lokalisiert waren, wurde ein Antikörper verwendet, der beide Proteinisoformen erkennt, um *Abd-B*-Proteinexpression in definierten, Eg-positiven Zellen des embryonalen vNS zu untersuchen. Da die Expression der *Abd-B*-Transkripte nicht überlappt, kann davon ausgegangen werden, dass mit diesem Antikörper die Expression von *Abd-B.m* und *Abd-B.r* in den betreffenden PSs des WT unterschieden werden kann. Schon im St11m konnte eine starke Expression von *Abd-B.r* in PS14, inklusive NB3-3, und im aPS15 detektiert werden. Die Expression von *Abd-B.m* in PS13 ist vergleichsweise schwach und auf den posterioren, dorso-lateralen Teil dieses PS beschränkt (siehe auch DeLorenzi und Bienz, 1990). Weder NB2-4 noch NB3-3 in PS13 weisen eine *Abd-B.m*-Expression auf (Abb. 3-26D). Bereits direkt nach ihrer Delamination zeigen NB6-4 und NB7-3 in PS14 eine starke Expression von *Abd-B.r*. Im Gegensatz dazu exprimieren NB6-4 und NB7-3 in PS13 weder vor noch direkt nach ihrer Delamination *Abd-B.m*. Die schwache *Abd-B.m*-Expression ist immer noch auf den posterioren, dorso-lateralen Teil dieses PS beschränkt (Abb. 3-26E) und wird dort vor St12m weder verstärkt noch expandiert (DeLorenzi und Bienz, 1990).

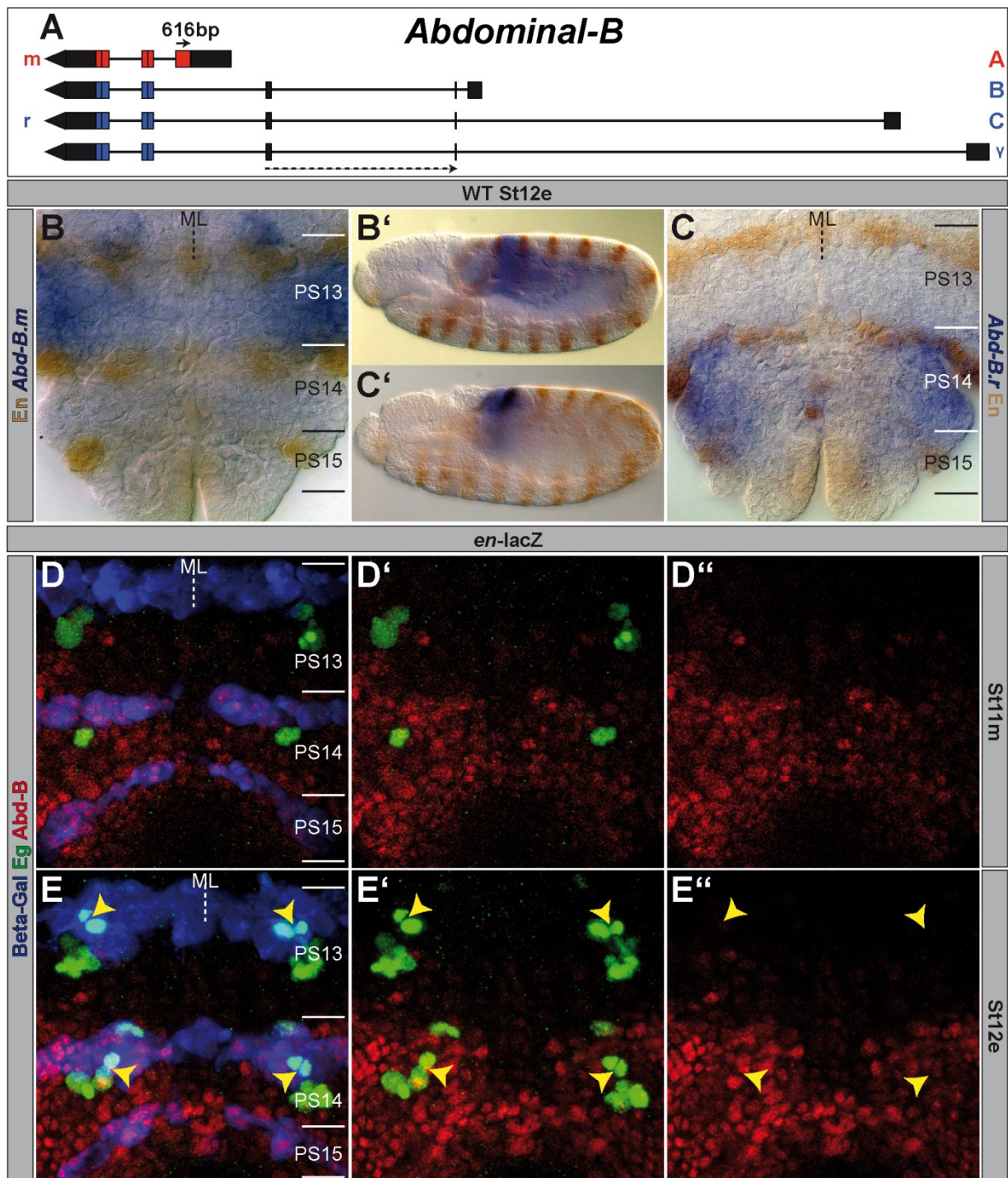


Abb. 3-26: Die Expression verschiedener *Abdominal-B*-Elemente im Wildtyp

(A) zeigt das maßstabsgetreue *Abd-B*-Gen gemäß FlyBase (McQuilton et al., 2012). Die Linien markieren Intronsequenzen; die Rechtecke zeigen Exons (schwarze untranslatierte Bereiche (UTRs) und farbige CDSs). Die Lage der Exonsonden ist durch Pfeile dargestellt (durchgezogener Pfeil = *Abd-B.m* (616bp); gestrichelter Pfeil = *Abd-B.r* (220bp), zieht sich über zwei Exons), (B-E) PSs und ihre Grenzen sind auf der rechten Seite dargestellt; ML = Mittellinie. (B, C) *in situ*-Hybridisierung von *Abd-B.m* (B) oder *Abd-B.r* (C) im St12e eines WT Embryos (Filetpräparation). (B', C') Dieselbe Färbung im Whole Mount. (D, E) Filetpräparation (horizontale Ansicht) von St11m und St12e *en-lacZ*-Embryonen, die eine Antikörperfärbung gegen Abd-B (beide Isoformen), Eg und Beta-Galaktosidase (Beta-Gal) zeigen. (E) NB7-3 von PS13 und PS14, die gerade ihre erste Teilung vollzogen haben, sind durch gelbe Pfeilspitzen markiert. Im En-Streifen von PS15, in dem die Bildung von NB7-3 unterdrückt wird, ist eine starke *Abd-B.r*-Expression vorhanden. (D', E') zeigen nur die Abd-B- und Eg-Färbung; (D'', E'') zeigen nur die Abd-B-Expression.

Als nächstes wurden *Abd-B*-Mutanten analysiert, in denen nur eine Isoform betroffen ist, während die andere noch intakt ist. So besitzen *Abd-B^{M3}* und *Abd-B^{M5}* keine m-Funktion mehr, aber eine intakte r-Funktion (m^-r^+) (Casanova et al., 1986). In beiden Mutanten konnten keine Unterschiede bezüglich des Eg-Expressionsmusters im Vergleich mit dem WT beobachtet werden (vgl. Abb. 3-23D; Abb. 3-27A, B; Abb. 3-34A). Das wurde auch so erwartet, da *Abd-B.m* nicht posterior von PS13 exprimiert wird, die beobachteten Effekte im Eg-Expressionsmuster von *Abd-B*-Nullmutanten jedoch auf PS14-15 beschränkt sind. Folglich konnte in *Abd-B^{Uabl}*, einer spezifischen Mutante für die r-Isoform (m^+r^-) (Casanova et al., 1986), mit Ausnahme der seltenen neuronalen NB6-4-Subklone in PS13, derselbe Eg-Phänotyp wie in den *Abd-B*-Funktionsverlustmutanten beobachtet werden: vergrößerte NB3-3-Cluster und ektopische neuronale NB6-4-Subklone in PS14, sowie ektopische NB7-3-Zellstambäume in PS15 (Abb. 3-27C; Abb. 3-34A), die eine Co-Expression von Eg, En und Ey aufweisen (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse beweisen, dass die r-Isoform für den beobachteten Eg-Phänotyp verantwortlich ist.

Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass *Abd-B.r*, im Einklang mit dem Phänomen der posterioren Dominanz, die *Abd-B.m*-Isoform reprimiert (Casanova et al., 1986). Tatsächlich konnte eine *Abd-B.m*-Expression in PS14-15 von *Abd-B^{Uabl}* beobachtet werden. Jedoch kommt diese Expression sehr spät auf (St11m) und ist genauso wie in PS13 zunächst auf den dorso-lateralen Teil dieses PS beschränkt. Weder der neuronale NB6-4-Subklon in PS14, noch der ektopische NB7-3 in PS15 zeigen eine frühe Expression von *Abd-B.m* (Abb. 3-27D). Eine flächendeckende Expression von *Abd-B.m* in PS14-15 von *Abd-B^{Uabl}*-Mutanten war nicht vor St12m zu beobachten (Abb. 3-27E). Die Expressionsstärke ist jedoch deutlich geringer als die *Abd-B.r*-Expression in PS14-15 des WT (siehe auch Boulet et al., 1991; Sanchez-Herrero, 1991). Demnach wird *Abd-B.m* wohl zu spät exprimiert um den Eg-Phänotyp in *Abd-B^{Uabl}* zu retten, der auf dem Verlust von *Abd-B.r* beruht.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass *Abd-B.r* für die Suppression von NB7-3 in PS15, für die Spezifizierung des NB6-4 in PS14 und für das Schicksal des NB3-3 in PS14 verantwortlich ist.

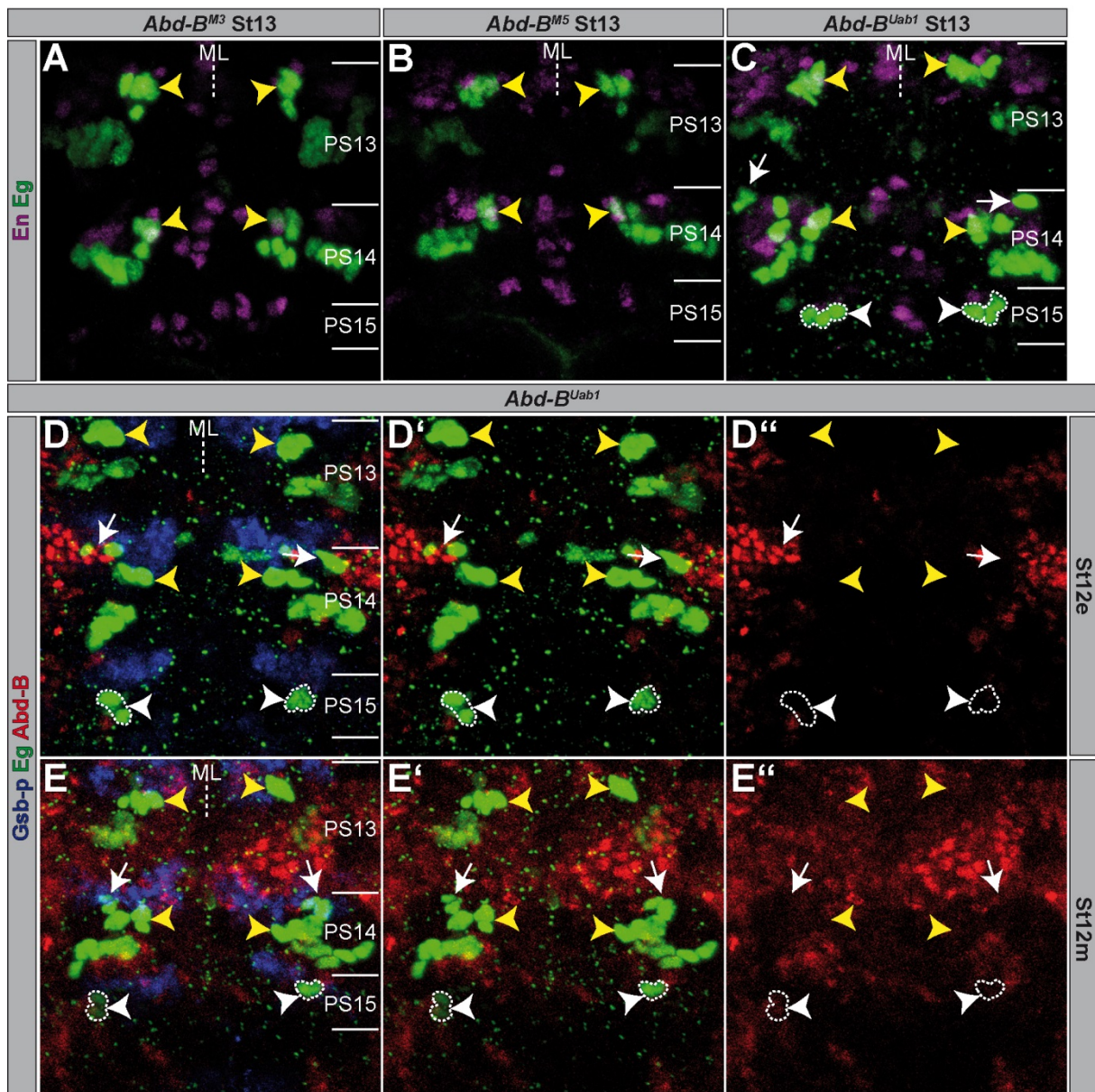


Abb. 3-27: Der Verlust von *Abdominal-B.r* ist für den Eagle-Phänotyp verantwortlich

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12e, St12m und St13 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. Wildtypische NB7-3-Klone sind durch gelbe Pfeilspitzen markiert. (C-E) Ektopische neuronale NB6-4-Subklone in PS14 sind durch weiße Pfeile markiert. (D, E) *Gsb-p* dient in diesem Fall als alternativer Segmentmarker. (D', E') zeigen nur die *Abd-B.m*- und *Eg*-Expression; (D'', E'') zeigen nur die *Abd-B.m*-Expression.

3.3.4 Nur die ektopische Expression von *Abdominal-B.m* kann die Bildung des Neuroblasten 7-3 in anterioren Parasegmenten unterdrücken

Da *Abd-B.r* die Bildung des NB7-3 in PS15 verhindert, wurde als nächstes versucht die Bildung von NB7-3 in anterioren PSs durch die ektopische Expression von *Abd-B.r* zu inhibieren. Als Treiberlinie fungierte *scabrous (sca)*-Gal4, der ab St8 eine starke ektopische Expression im NE und den daraus delaminierenden NBs ermöglicht. Erstaunlicherweise konnte durch die ektopische *Abd-B.r*-Expression weder die Bildung des NB7-3 (0%, n = 110 thorakale und abdominale Hemi-PSs, Abb. 3-34B) noch irgendeines anderen *Eg*-positiven NB verhindert werden (Abb. 3-28A).

Um herauszufinden, ob die Gesamtanzahl an NBs in dieser Situation verringert ist, wurden die Dpn-positiven Zellen in PS4-7 (pT1-aA2) ausgezählt. Es konnte aber nur eine leichte Verringerung an NBs pro Hemi-PS ($30,67 \pm 0,49$, $n = 12$, Abb. 3-28H; Abb. 3-33H) im Vergleich mit dem WT ($31,25 \pm 0,46$, $n = 8$, Abb. 3-28G; Abb. 3-33H) festgestellt werden. Des Weiteren konnte in einigen Fällen eine homeotische Transformation des thorakalen NB6-4 in abdominales Schicksal beobachtet werden. Diese ist mit dem Verlust des neuronalen NB6-4-Subklons assoziiert (13%, $n = 36$ thorakale Hemi-PSs). Erstaunlicherweise konnte diese Transformationsrate durch die von *sca*-Gal4 getriebene ektopische Expression von *Abd-B.m* deutlich erhöht werden (81%, $n = 48$ thorakale Hemi-PSs). Zudem konnte in dieser Situation die Gesamtanzahl an NBs signifikant reduziert werden ($26,65 \pm 0,81$, $n = 20$, Abb. 3-28I; Abb. 3-33H). Das betrifft auch die Inhibition des NB7-3 im Thorax und Abdomen (50%, $n = 176$ thorakale und abdominale Hemi-PSs, Abb. 3-28B; Abb. 3-34B). Bei der ektopischen Expression von *Abd-B.m* zusammen mit *P35* blieben die NB7-3-Zellcluster im Thorax und Abdomen verschwunden (42%, Abb. 3-28C; Abb. 3-34B). Dies unterstreicht nochmals, dass *Abd-B* die NB7-3-Cluster nicht durch Apoptose eliminiert, sondern deren Bildung inhibiert. Unter Verwendung von *elav*-Gal4, der die ektopische Expression von *Abd-B.m* in neuronalem Gewebe erst ab St121 treibt (Lin und Goodman, 1994), kam es nicht zu einer Abwesenheit von NB7-3-Clustern in thorakalen und abdominalen Hemi-PSs (0%, $n = 152$, Abb. 3-28E; Abb. 3-34B). Das zeigt, dass bereits im NE eine starke ektopische Expression von *Abd-B.m* benötigt wird, um die Bildung von NB7-3 in thorakalen und abdominalen PSs zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu führt eine späte Expression von *Abd-B.m*, wie im PS13 des WT (Abb. 3-26E), nicht zu einer Repression des NB7-3.

Anschließend wurde versucht den Eg-Phänotyp in *Abd-B^{D18}*-Mutanten durch die ektopische Expression von *Abd-B.m* unter Verwendung von *sca*-Gal4 zu retten. In den meisten Fällen war es möglich, die Bildung des neuronalen NB6-4-Subklons in PS14 (73%, $n = 11$ Hemi-PSs) und den ektopischen NB7-3-Zellstammbaum in PS15 (82%, $n = 11$ Hemi-PSs) zu unterdrücken (Abb. 3-28D; Abb. 3-34A). Dies korrelierte allerdings sehr stark mit der Suppression von weiteren NB7-3-Clustern in anterioren PSs. Bei ausreichend früher Expression kann *Abd-B.m* somit die Funktion von *Abd-B.r* in Bezug auf Inhibition des neuronalen NB6-4-Subklons und der Bildung von NB7-3 vollständig ersetzen. Im WT jedoch kann *Abd-B.m* diese Funktion nicht übernehmen, da seine Expression zu spät beginnt.

Um andere NBs zu identifizieren, die von der Suppression durch ektopisches *Abd-B.m* betroffen sind, wurden weitere molekulare Marker für charakteristische Tochterzellen von NBs untersucht. Die Eve-Expression zeigte, dass das RP2-Neuron von NB4-2 (Bossing et al., 1996), aCC und pCC von NB1-1 (Broadus et al., 1995), die U-Motorneurone von NB7-1 (Bossing et al., 1996), sowie die Eg-coexprimierenden EL-Neurone von NB3-3 (Schmidt et al., 1997) in allen PSs

vorhanden waren (Abb. 3-28F). Auch die Lbe-positiven Tochterzellen des NB5-6 (De Graeve et al., 2004) waren in allen beobachteten PSs vertreten (nicht gezeigt). Dies bestätigt, dass ektopisches *Abd-B.m* die Bildung spezifischer NBs unterdrückt (siehe Kapitel 3.3.1).

Doch warum besitzt ektopisches *Abd-B.m*, im Gegensatz zu *Abd-B.r*, die Fähigkeit die Bildung von NBs zu unterdrücken, obwohl eigentlich ein gegenteiliger Effekt vermutet wurde? Beim Vergleich der *Ubx*-Expression in den beiden ektopischen Situationen fiel auf, dass *Abd-B.m* *Ubx* sehr effizient reprimiert (Abb. 3-28K) (siehe auch Castelli-Gair et al., 1994), während *Abd-B.r* dies nicht vermag (Abb. 3-28J). Möglicherweise führt die ektopische Expression von *Abd-B.r* nicht zu einer homeotischen Transformation, weil es die Expression anderer *Hox*-Gene nicht inhibieren kann (siehe Kapitel 4.5).

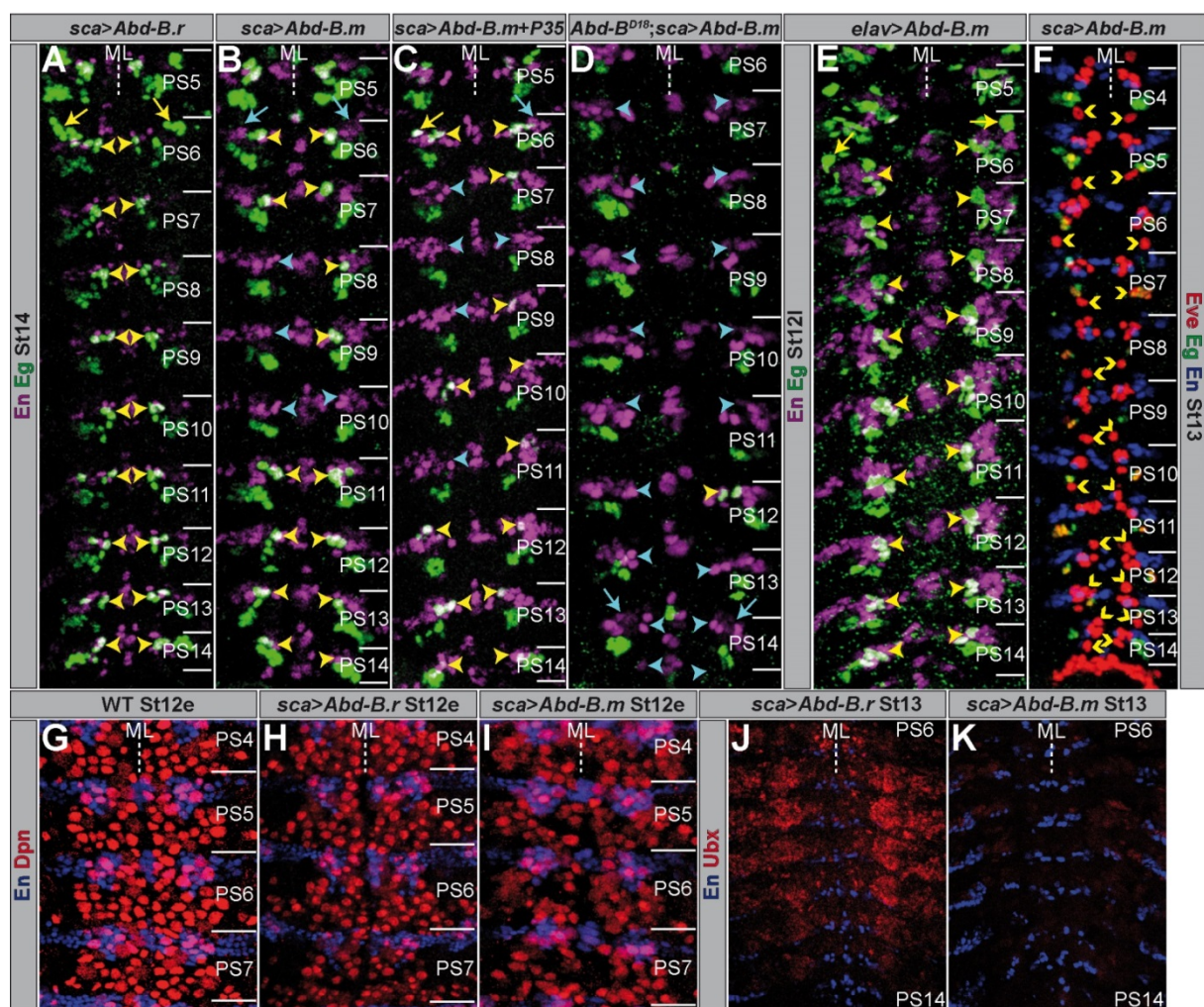


Abb. 3-28: Nur ektopisches *Abdominal-B.m*, aber nicht *Abdominal-B.r*, kann die Bildung des Neuroblasten 7-3 in anterioren Parasegmenten unterdrücken

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12e, St12l, St13 und St14 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A-E) Wildtypische NB7-3-Zellen sind durch gelbe Pfeilspitzen markiert. Positionen, an denen das NB7-3-Cluster entfernt wurde, sind durch türkise Pfeilspitzen hervorgehoben. Der neuronale NB6-4-Subklon im Thorax ist durch gelbe Pfeile markiert. Positionen, an denen der neuronale NB6-4-Subklon entfernt wurde, sind durch türkise Pfeile hervorgehoben. (F) Das RP2-Neuron ist durch gelbe Pfeilspitzen markiert und in allen PSs vorhanden. Die ebenfalls Eve-positiven aCC und pCC, sowie die U-Motorneurone nehmen eine mediale Position ein, sind aber in dieser Maximalprojektion nicht zu unterscheiden. Die EL-Neurone co-exprimieren Eve und Eg und liegen ganz lateral. (G-I) Leichte (H) und starke (I) Reduktion von NBs

durch die ektopische Expression unterschiedlicher *Abd-B*-Konstrukte im Vergleich zum WT (G). (J, K) Ektopische Expression von *Abd-B.m* (K) führt im Gegensatz zu *Abd-B.r* (J) zu einer deutlichen Reduktion von Ubx im vNS. WT Expression von Ubx in Abb. 3-32B.

3.3.5 Auch *caudal* reprimiert die Bildung von Neuroblast 7-3 in Parasegment 15

Das *ParaHox*-Gen *cad* vermittelt die Segmentidentität des letzten Abdominalsegments (Kapitel 1.3) (Moreno und Morata, 1999). *cad* wird sowohl maternal als auch zygotisch exprimiert, wobei dieselbe CDS verwendet wird (Mlodzik et al., 1985; Mlodzik und Gehring, 1987). Im St12m konnte eine zygotische Expression von Cad im NE von PS15 beobachtet werden (Abb. 3-29A) (siehe auch Macdonald und Struhl, 1986). Cad und *Abd-B.r* werden in diesem PS zum größten Teil co-exprimiert (siehe auch Sanchez-Herrero und Crosby, 1988), wobei Cad auch noch posterior dazu exprimiert wird. Die anteriore Grenze der Cad-Expression wird durch den En-Streifen in PS15 gebildet und es gibt keine große Überlagerung der Cad- und En-Expression (Kuhn et al., 1995). Im vNS konnte eine Cad/*Abd-B.r* Co-Expression in den NBs beobachtet werden, die sich PS15 zuordnen lassen, wobei keine NBs existieren, die ausschließlich Cad exprimieren (Abb. 3-29B).

Da Cad neben *Abd-B.r* auch in den NBs von PS15 exprimiert wird, sollte herausgefunden werden, ob *cad* auch die Bildung von NBs in diesem PS reprimiert. In zygotischen EMS-induzierten *cad* Nullmutanten (*cad*²), konnte im Vergleich zum WT ($11,88 \pm 0,64$, n = 8, Abb. 3-23A) ein signifikanter Anstieg von NBs ($14,25 \pm 1,26$, n = 4, Abb. 3-22; Abb. 3-29C) in PS15 (pro Seite) beobachtet werden. Genauso wie die *Abd-B*^{D18}-Mutanten, zeigen auch die *cad*²-Mutanten ektopische Zellcluster in PS15, die sowohl Eg als auch En exprimieren (Abb. 3-29D). Durch die Kombination von *cad*² mit *eg-Gal4*, *UAS-nGFP* konnte gezeigt werden, dass sich diese ektopischen Zellcluster in späten Embryonalstadien als NB7-3-Zellstammbäume differenzieren, die ihre typischen kontralateralen Projektionen ausbilden (Abb. 1-2D, E; Abb. 3-29E; Abb. 3-34A) (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999). Im Gegensatz zu *Abd-B*^{D18} weisen *cad*²-Mutanten jedoch keine ektopischen neuronalen NB6-4-Cluster oder einen vergrößerten NB3-3-Zellstammbaum in PS14 auf. Das konnte insofern erwartet werden, als dass Cad gar nicht in PS14 exprimiert wird. Die ektopische Bildung des NB7-3-Clusters in PS15 von *cad*²-Mutanten scheint rezessiv zu sein, da sie nur im homozygoten Zustand zu beobachten ist, während die Eg-Expression in Heterozygoten (nicht gezeigt) nicht vom WT zu unterscheiden ist (Abb. 3-34A). Diese Daten zeigen, dass auch *cad* eine Rolle bei der Inhibition von NBs in PS15 spielt.

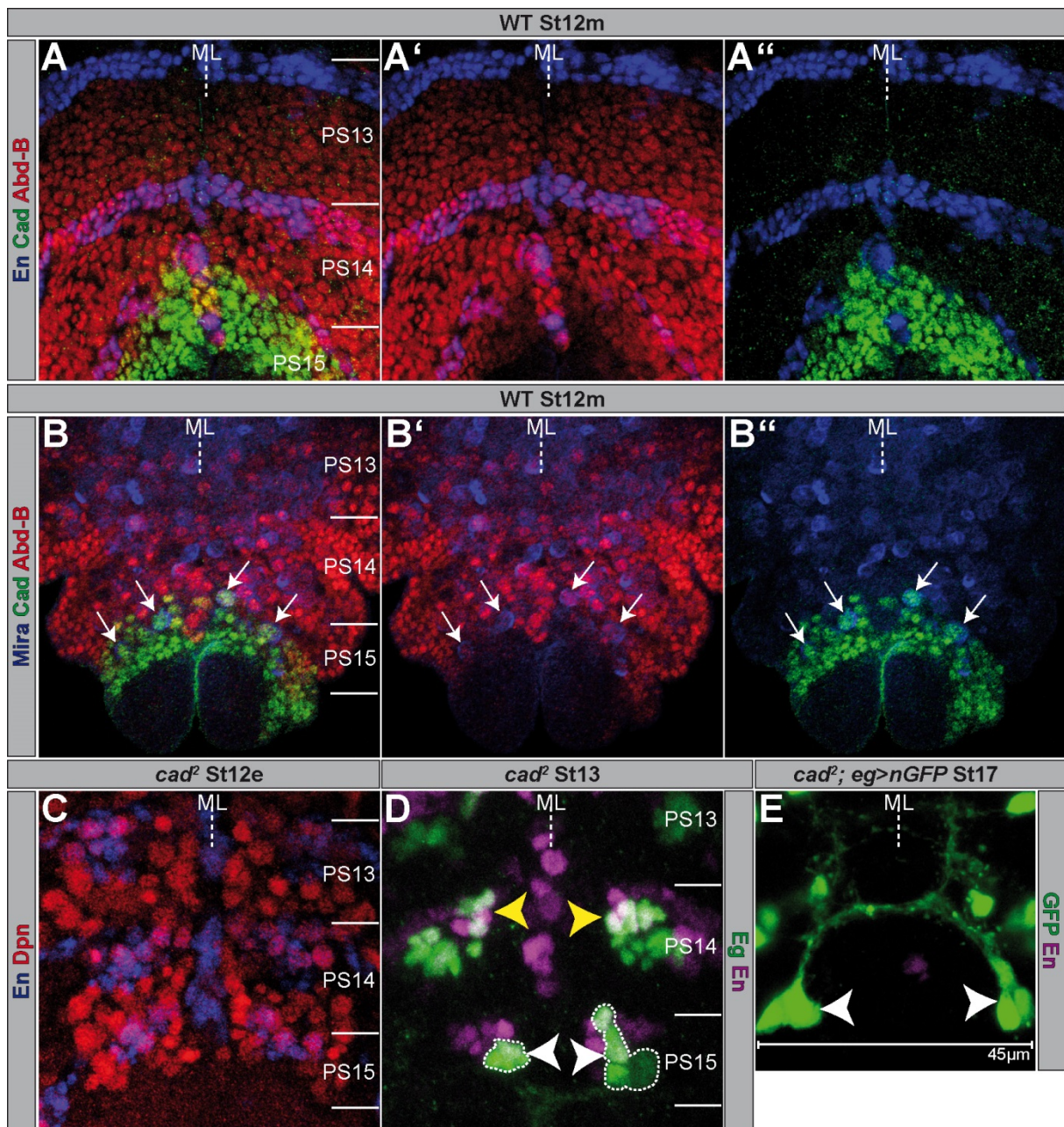


Abb. 3-29: *caudal*-Mutanten zeigen einen ektopischen Neuroblast 7-3-Zellstammbaum in Parasegment 15

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12e, St12m, St13 und St17 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A, B) zeigen die Expressionsdomänen von Abd-B und Cad im NE (A) und im vNS (B). Dort können NBs aufgrund ihrer Größe und der Expression von Mira identifiziert werden. Weiße Pfeile markieren NBs, die eine Abd-B/Cad Co-Expression aufweisen. (A', B') zeigen nur den roten und blauen Kanal zusammen. (A'', B'') zeigen nur den grünen und den blauen Kanal zusammen. (C) Das NB-Muster in einer *cad*²-Mutante. (D) Wildtypische NB7-3-Zellstammbäume sind durch gelbe Pfeilspitzen markiert, ektopische sind weiß umrandet und durch weiße Pfeilspitzen hervorgehoben. (E) Vergrößerung eines komplett differenzierten NB7-3-Zellstammbaums, der die für ihn charakteristischen Projektionen ausgebildet hat.

3.3.6 *caudal* und *Abdominal-B.r* agieren zwar unabhängig, müssen aber co-exprimiert werden, um die Bildung des Neuroblasten 7-3 zu unterdrücken

Da nicht nur *Abd-B.r* sondern auch *cad* die Bildung des NB7-3 in PS15 verhindert, wurde versucht deren funktionale Beziehung aufzuklären. Sowohl in *Abd-B*^{D18} als auch in *Abd-B*^{Uabl} (nicht gezeigt) wird Cad im ektopisch gebildeten NB7-3 exprimiert (Abb. 3-30A). Umgekehrt

wird auch im NB7-3-Cluster von PS15 der *cad*²-Mutanten noch *Abd-B* exprimiert (Abb. 3-30B), auch wenn diese Expression etwas verzögert scheint. Es handelt sich eindeutig um *Abd-B.r*-Expression, da die Expressionsdomäne von *Abd-B.m* in *cad*²-Mutanten unverändert bleibt (Abb. 3-30C).

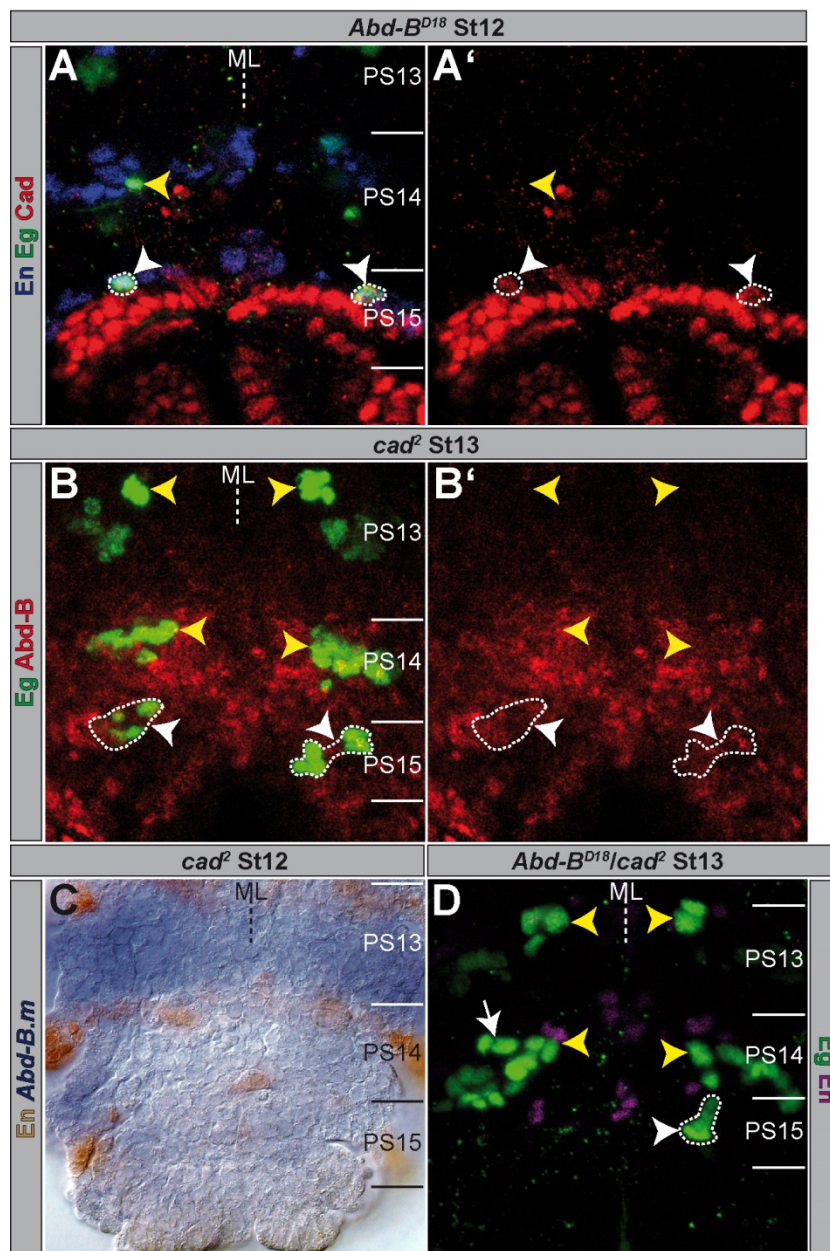


Abb. 3-30: Untersuchung der Interaktion von *Abdominal-B* und *caudal* durch Mutantanalyse

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12 und St13 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. Wildtypische NB7-3-Cluster sind durch gelbe Pfeilspitzen markiert. Ektopische NB7-3-Zellen in PS15 sind weiß umrandet und durch weiße Pfeilspitzen hervorgehoben. Ektopische neuronale NB6-4-Cluster sind durch weiße Pfeile angezeigt. (A) Einzelebene; (B) mehrere Ebenen; (A', B') nur der rote Kanal ist gezeigt. (C) Eine *Abd-B.m*-Expression ist in *cad*²-Mutanten, wie auch im WT, nicht posterior von PS13 zu finden. (D) In der transheterozygoten Situation finden sich ektopisch gebildete Zellen in nur jeweils einem Hemi-PS.

Des Weiteren konnte unter Verwendung eines *sca*-Gal4 Treibers weder die ektopische Expression von *Abd-B.r*, noch die von *Abd-B.m* eine *Cad*-Expression in anterioren Segmenten des vNS induzieren oder die posterior vorhandene *Cad*-Expression reprimieren (Abb. 3-31A, B). Auch die ektopische Expression von *cad* verändert weder die *Abd-B*-Expressionsdomäne noch deren Intensität (Abb. 3-31C). Diese Untersuchungen zeigen zum einen, dass *Abd-B* und *cad* sich im vNS nicht gegenseitig regulieren, und zum anderen, dass sie unabhängig voneinander

interagieren, um die Bildung des NB7-3 zu unterdrücken. Leider konnte trotz mehrerer Versuche kein homozygoter *Abd-B^{D18};cad²*-mutanter Fliegenstamm etabliert werden. In *Abd-B^{D18}/cad²* Transheterozygoten wurde derselbe Eg-Phänotyp wie in der *Abd-B^{D18}* heterozygoten Situation beobachtet (Abb. 3-30D; Abb. 3-34A; vgl. Abb. 3-24F).

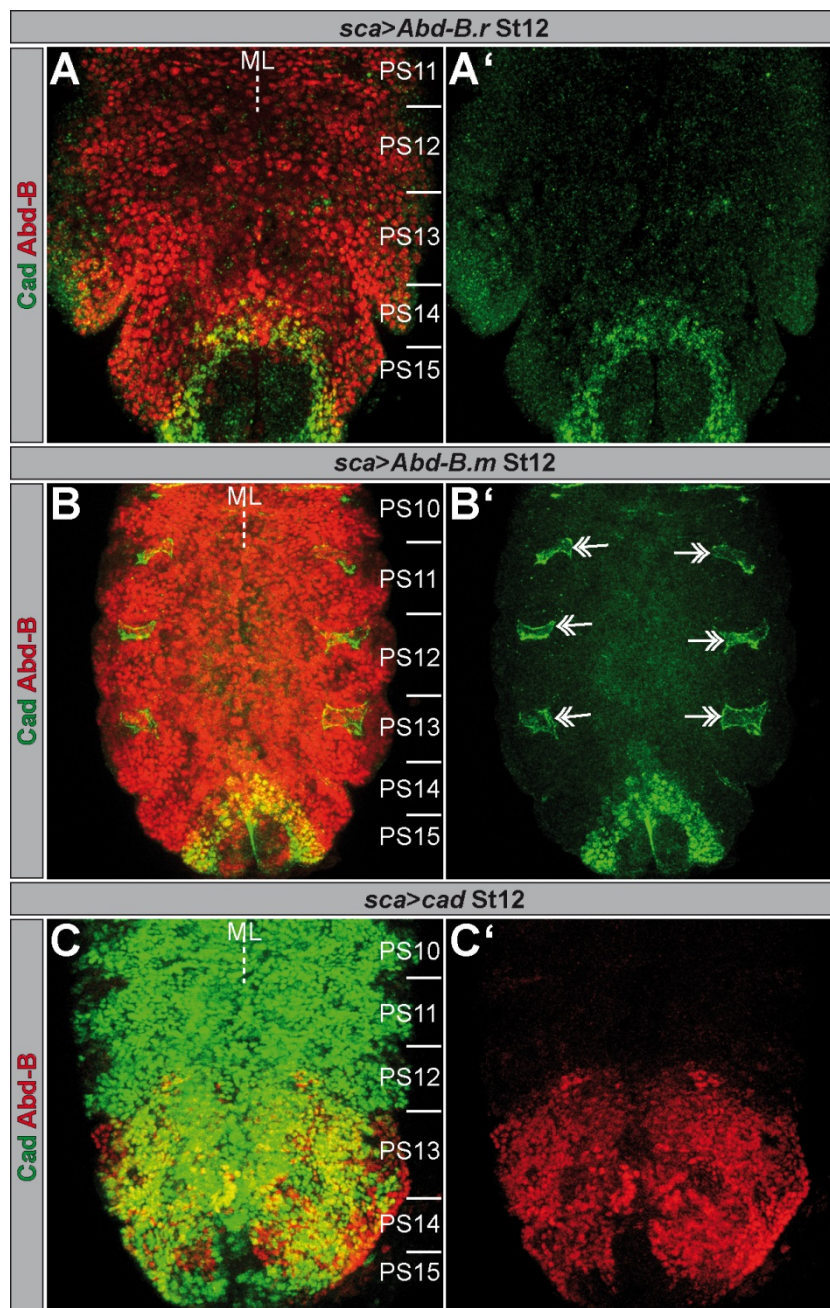


Abb. 3-31: *Abdominal-B* und *caudal* weisen keine gegenseitige Regulation im ventralen Nervensystem auf (Maximalprojektionen, horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (B') Die Pfeile mit der Doppelspitze markieren unspezifische Hintergrundfärbung, die gelegentlich auch im WT zu beobachten ist (siehe auch Macdonald und Struhl, 1986). (A-C) *Abd-B* und *cad* aktivieren oder reprimieren sich nicht gegenseitig.

Obwohl ektopisch exprimiertes *cad* kein *Abd-B* im vNS reprimieren kann, ist es in der Lage *Abd-A* und *Ubx* sehr effizient zu unterdrücken (Abb. 3-32A-C). Insofern erfüllt es, zumindest eingeschränkt, das Kriterium der posterioren Dominanz.

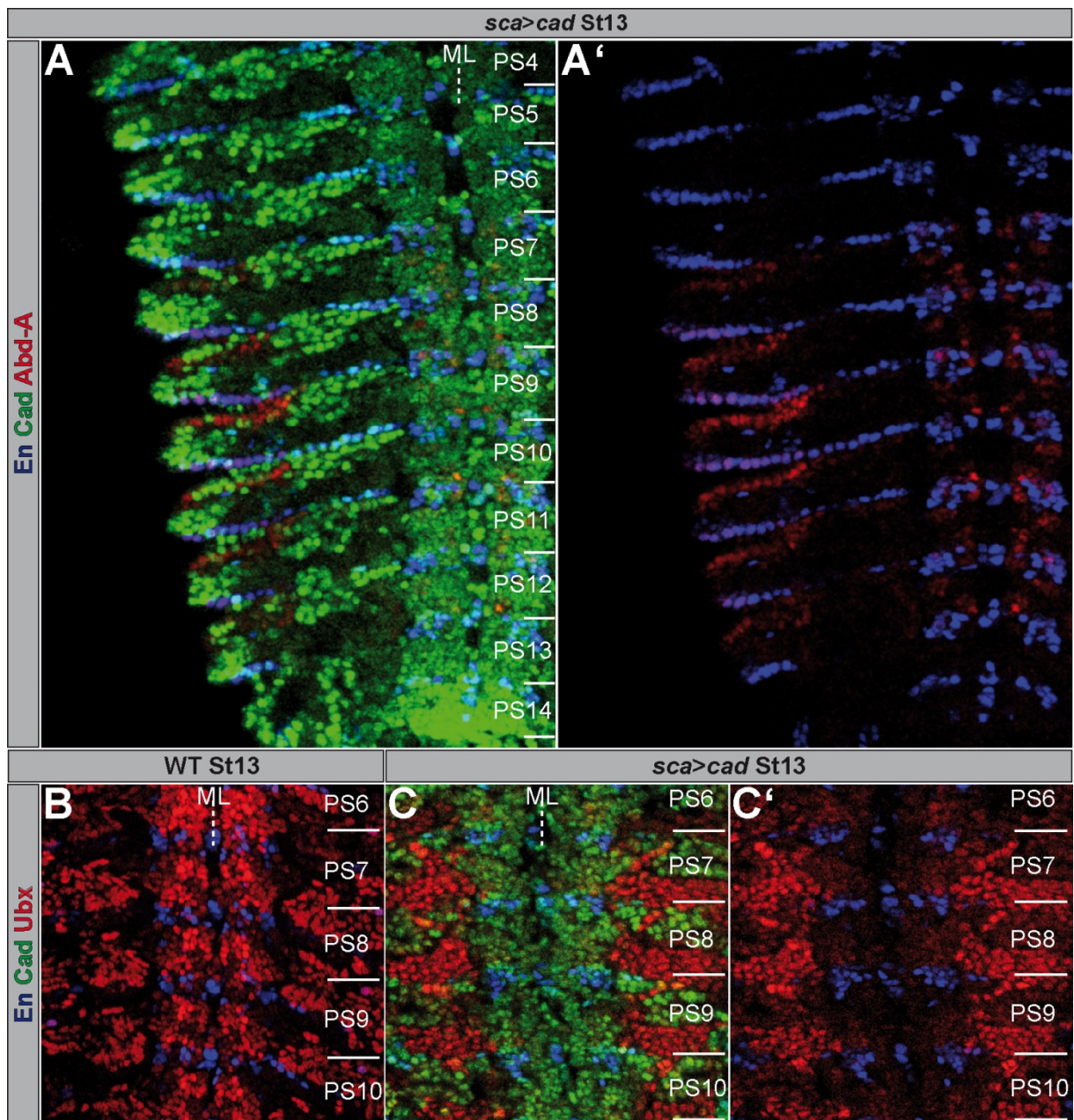


Abb. 3-32: Ektopisch exprimiertes *caudal* kann Abdominal-A und Ultrabithorax inhibieren

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St13 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. **(A, C)** Ektopische *cad*-Expression führt im vNS zu einer effizienten Repression von Abd-A (A) und Ubx (C). **(A', C')** zeigen nur den roten und den blauen Kanal. **(B)** Im WT zeigt das vNS eine starke Expression von Ubx. WT Kontrolle von Abd-A in Abb. 3-25A.

Außerdem konnte durch die ektopische Expression von *cad* in einigen Fällen die Bildung des NB7-3 in anterioren PSs unterdrückt werden (17%, n = 126 thorakale und abdominale Hemi-PSs, Abb. 3-33D; Abb. 3-34B). In Übereinstimmung mit diesem milden Effekt konnte die Bildung des ektopischen NB7-3-Zellstammbaums in *Abd-B^{D18}*-Mutanten auch nur in einem Fall durch die ektopische Expression von *cad* inhibiert werden (8%, n = 13 Hemi-PSs, Abb. 3-33G; Abb. 3-34A). Des Weiteren konnte durch ektopische *cad*-Expression der thorakale NB6-4-Zellstammbaum in abdominales Schicksal transformiert werden (50%, n = 30 thorakale Hemi-PSs), was mit dem Verlust des neuronalen Subklons verbunden ist (Abb. 3-33D) und das

ektopisch gebildete neuronale NB6-4-Cluster in PS14 von *Abd-B^{D18}*-Mutanten unterdrückt werden (Abb. 3-33G). Wie *Abd-B.m* verfügt auch *cad* über das Potenzial neben NB7-3 auch die Bildung anderer NBs in anterioren Hemi-PSs zu unterdrücken ($27,92 \pm 0,64$, $n = 13$, Abb. 3-33A, H). Diese Fähigkeit wird durch die gleichzeitige ektopische Expression von *Abd-B.m* stark erhöht ($24,8 \pm 0,95$, $n = 20$, Abb. 3-33B, H). Das wird auch durch Suppression der Bildung aller NB7-3-Cluster in den untersuchten PSs widerspiegelt (100%, $n = 80$ abdominale und thorakale Hemi-PSs, Abb. 3-33E; Abb. 3-34B). Bei der ektopischen Expression von *cad* zusammen mit *Abd-B.r*, was der nativen Situation in PS15 entspricht, kann die Bildung des NB7-3 mit beinahe der gleichen Effizienz unterdrückt werden (91%, $n = 96$ Hemi-PSs, Abb. 3-33F; Abb. 3-34B). Das betrifft auch die Bildung anderer NBs in anterioren Hemi-PSs ($25,43 \pm 1,50$, $n = 14$, Abb. 3-33C, H) und unterscheidet sich signifikant von der sehr ineffizienten Misexpression von *Abd-B.r* alleine ($30,67 \pm 0,49$, $n = 12$, Abb. 3-28H; Abb. 3-33H).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *Abd-B* und *cad* unabhängig voneinander agieren. Allerdings wird die Co-Expression der beiden benötigt, um ihr gesamtes Potenzial in Bezug auf die Unterdrückung der NB-Bildung abzurufen (siehe Kapitel 4.5).

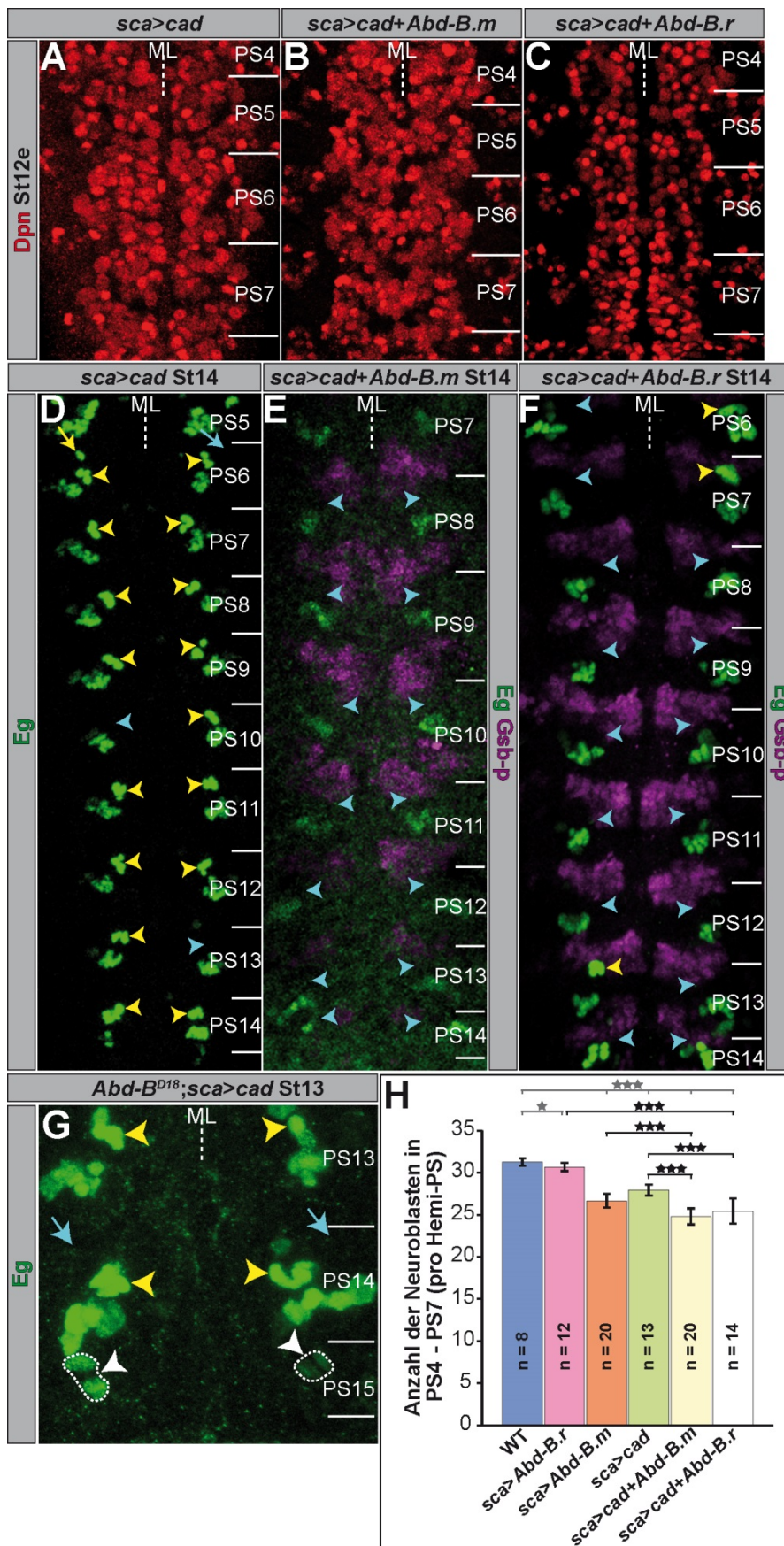


Abb. 3-33: *Abdominal-B.r* benötigt *caudal*, um terminales Schicksal zu vermitteln

Filetpräparationen (horizontale Ansicht) nach Antikörperfärbung (wie angezeigt) von St12e, St13 und St14 Embryonen. Die PSs und ihre Grenzen sind rechts dargestellt; ML = Mittellinie. (A-C) Durch Doppelüberexpression von *cad* und *Abd-B* lässt sich die Anzahl an NBs in anterioren PSs reduzieren (D-G) Wildtypische NB7-3-Cluster sind durch gelbe Pfeilspitzen markiert. Positionen, an denen das NB7-3-Cluster fehlt, sind durch türkise Pfeilspitzen hervorgehoben. Neuronale NB6-4-Subklone im Thorax werden durch gelbe Pfeile markiert. Positionen, an denen diese neuronalen NB6-4-Zellen fehlen, sind durch türkise Pfeile markiert. (G) Ektopische NB7-3-Cluster in PS15 sind weiß umrandet und werden durch weiße Pfeilspitzen angezeigt. (H) Gesamtanzahl der NBs (pro Seite) in PS4-7 von St12e Embryonen verschiedener Überexpressionen (wie angegeben). Alle Genotypen wurden mittels zweiseitigem t-Test mit dem WT verglichen (graue Sterne) und die ektopische Expression einzelner Konstrukte wurde mit den entsprechenden Co-Expressionen verglichen (schwarze Sterne): *P<0.05; ***P<0.001. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

3.3.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden Faktoren und deren Mechanismen identifiziert, die zum abgeleiteten Aufbau der terminalen abdominalen Neuromere führen. So wirkt *Abd-B.r* auf drei verschiedenen Ebenen: Es vermittelt das abdominale Schicksal des NB6-4, der unter seinem Einfluss ausschließlich Gliazellen produziert, und es induziert den PCD einiger Tochterzellen innerhalb des NB3-3-Zellstammbaums. Außerdem verhindert es die Bildung einer spezifischen Subpopulation von NBs. In *Abd-B*-Funktionsverlustmutanten, die keine Expression von *BX-C*-Genen in PS14-15 zeigen, nehmen NB3-3 und NB6-4 (produziert Gliazellen und Neurone) in PS14 thorakales Schicksal an und in PS15 werden zusätzliche NBs gebildet, zu denen auch der NB7-3 gehört, der hier als Modell-NB verwendet wurde. Durch ektope Expression von *Abd-B.m* ist es möglich den Phänotyp zu retten, der auf dem Funktionsverlust von *Abd-B.r* beruht. Dies demonstriert, dass beide Isoformen im Prinzip das gleiche Potenzial besitzen. Allerdings benötigt *Abd-B.r* die Co-Expression des *ParaHox*-Gens *cad*, um die Bildung spezifischer NBs in PS15 zu unterdrücken. Die Kombination von *Abd-B* und *cad* genügt auch, um die posteriore Identität in anterioren PSs ektope zu induzieren. *Abd-B* und *cad* agieren parallel zueinander, um die Bildung spezifischer NBs zu verhindern und bestimmte Zellstammbäume zu modifizieren, was zu der abgeleiteten Form und Zusammensetzung der terminalen abdominalen Neuromere beiträgt.

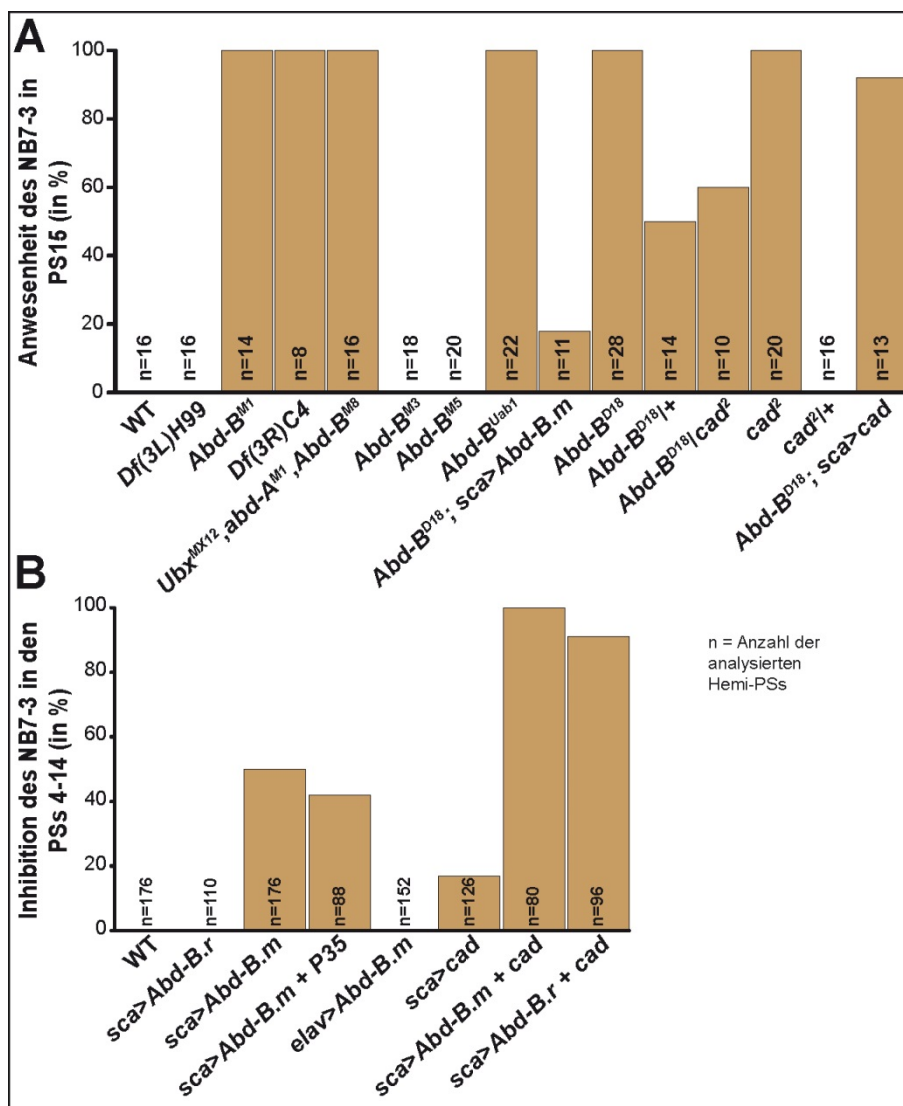


Abb. 3-34: Frequenz der Neuroblast 7-3-Bildung

Die Diagramme zeigen die relative Anzahl der NB7-3-Bildung in PS15 verschiedener mutanter Hintergründe (A) bzw. die relative Anzahl der NB7-3-Inhibition in den PSs 4-14 durch die ektopische Expression unterschiedlicher Konstrukte (wie angezeigt).

4 Diskussion

4.1 Eine Neuroblastenkarte für die terminalen abdominalen Neuomere

Basierend auf der Ablation durch UV-Bestrahlung während des Blastodermstadiums und Mutantenanalyse der Epidermis konnten zuvor vier Segmentanlagen (A8-A11) und ein nicht-segmentales Telson in der terminalen Abdominalregion identifiziert werden (Jürgens, 1987). Allerdings können auch im vNS die metameren Einheiten nur bis zum Stadium der maximalen Keimstreifverlängerung (St111-12e) unterschieden werden. Anschließend kommt es durch morphogenetische Bewegungen, Kondensation und Fusion von Segmentanlagen zu einer sehr aperiodischen und abgeleiteten Form dieser Region im Vergleich mit den repetitiven anterioren Neuomeren des Abdomens (Kuhn et al., 1992). Dies erschwert eine spätembryonale Zuweisung von NBs zu ihren Ursprungsneuomeren (Kapitel 4.2).

Durch die umfassende Analyse von molekularen Markern konnte im Rahmen dieser Arbeit eine detaillierte Karte für die vorhandenen NBs dieser Region erstellt werden (Abb. 3-9). Die Karte bezieht sich auf St12e, da zu diesem Zeitpunkt bereits alle terminalen abdominalen NBs delaminiert sind und die segmentalen Einheiten noch gut voneinander differenziert werden können. Die Identifizierung der vorhandenen NBs basiert auf der seriellen Homologie zu NBs in anterioren Neuomeren. Diese delaminieren etwas früher (Doe, 1992), exprimieren eine weitgehend identische Kombination von molekularen Markern und nehmen vergleichbare Positionen in den Neuomeren ein (zusammengefasst in Technau et al., 2006). Des Weiteren bringen sie häufig die gleichen charakteristischen Tochterzellen hervor, die sich ebenfalls durch molekulare Marker identifizieren lassen (Kapitel 3.1.2.2). Jedoch weisen einige seriell homologe NBs segmentspezifische Unterschiede in ihren Zellstambäumen auf (Abb. 1-3), die auf eine modifizierte Spezifizierung ihrer Vorläufer, PCD und unterschiedliches Proliferationsverhalten zurückgehen (zusammengefasst in Rogulja-Ortmann und Technau, 2008). Dementsprechend konnten auch Unterschiede in der Expression molekularer Marker zwischen seriell homologen NBs dieser Region festgestellt werden. Solche Markergene stellen potenzielle Kandidaten für die Kontrolle segmentspezifischer Unterschiede zwischen seriell homologen Zellstambäumen dar. Gerade Faktoren, welche die zeitliche Spezifizierung von NBs kontrollieren (*ming*, *svp*), weisen in den terminalen abdominalen Neuomeren ein sehr abgeleitetes Muster auf. So zeigt NB3-4 in A8 und A9 beispielsweise eine Expression von *ming* (*cas*)-lacZ, während er in A10 keine Expression dieses Markers aufweist (Abb. 3-9). Es ist vorstellbar, dass gewisse Zeitfenster der Zellstammbaumbildung in solchen Vorläufern ausgelassen werden, indem definierte temporäre Spezifizierungsgene nicht exprimiert werden. Möglicherweise werden deshalb bestimmte Tochterzellen von NBs in den terminalen Neuomeren nicht gebildet. Damit einhergehend wurde

beobachtet, dass der Durchmesser vieler NBs in A9 und v.a. A10 oftmals auffällig reduziert ist (z.B. Abb. 3-6D), was auf eine geringere Anzahl an Mitosen dieser Vorläufer im Vergleich zu ihren seriellen Homologen in anterioren Segmenten hindeutet. Dies würde dazu führen, dass NBs dieser Region stark abgeleitete Zellstammbäume hervorbringen, die in Zukunft durch klonale Analysen (z.B. DiI-Markierung) untersucht werden könnten. Insbesondere *Abd-B.r* und *cad*, die für die Identität von A9 und A10 verantwortlich sind und möglicherweise auch die Expression temporärer Spezifizierungsgene kontrollieren, sind an der Morphogenese abgeleiteter Zellstammbäume dieser Region beteiligt (Kapitel 4.4).

Es konnten NBs in A8, A9 und A10 identifiziert werden (Abb. 3-9). A8 scheint in Bezug auf seine Größe, die Anzahl (31) und das Muster der vorhandenen NBs mit den anterioren Hemineuromeren des Abdomens vergleichbar zu sein. NB2-3 ist der einzige NB, der in diesem Segment fehlt. Sein Zellstammbaum konnte zuvor aber auch nur im Thorax identifiziert werden (Schmid et al., 1999). Möglicherweise fehlt dieser NB im gesamten Abdomen.

Im Gegensatz dazu ist die Größe des Neuromers A9 deutlich reduziert (Abb. 3-1B). Aufgrund von morphologischen Kriterien konnten zuvor drei bis vier laterale NBs pro Seite in diesem Neuomer gefunden werden (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984). Durch den Einsatz von molekularen Markern war es nun möglich 23 NBs pro Hemineuomer in A9 zu identifizieren, die sowohl laterale, intermediäre, als auch ventrale Positionen einnehmen. Während die NBs der Reihen 1-5 fast vollständig vorhanden sind (bis auf NB2-3, NB2-4 und NB5-1), betrifft die Reduktion der NBs vorwiegend das posteriore, En-positive Kompartiment dieses Segments. Der letzte En-Streifen, der schon zu PS15 gehört, markiert eine Grenze für die Abwesenheit vieler NBs (Abb. 3-9).

Dementsprechend konnten in A10 nur noch 11 NBs pro Hemineuomer identifiziert werden. Deren Existenz wurde bislang noch nicht beschrieben, obwohl bereits Neurone identifiziert werden konnten, die sich dem *gsb-d*-Streifen in A10 zuordnen ließen (Gutjahr et al., 1993). Vergleichbar mit A9 fehlen fast alle NBs des posterioren Kompartiments (Abb. 3-9). Allerdings konnte, im Gegensatz zu A9, in A10 der NB6-4 identifiziert werden, der mit Ausnahme von En, die Kombination von Markern exprimiert, die in den anterioren Segmenten des Abdomens typisch für ihn ist (Eg, Repo, *gsb-d*, Msh). Dieser NB stellt den einzigen neuralen Vorläufer dar, der in A9 nicht gebildet wird, aber in A10, trotz der Abwesenheit des En-Streifens, vorhanden ist. Das ist insofern erstaunlich, als dass die Bildung des NB6-4 in thorakalen und anterioren abdominalen Neuromeren von der En-Expression abhängig ist (Deshpande et al., 2001). Auch seine Position direkt posterior vom En-Streifen in A9 ist eher untypisch, da es sich beim NB6-4 ja eigentlich um einen NB des posterioren Kompartiments handelt. Allerdings fällt eine Zuweisung von NBs aufgrund ihrer Lage in A10 oftmals schwer, da sie wegen der Kompaktheit dieses Segments häufig abweichende Positionen einnehmen.

Der LGB in A10 konnte nicht über eine frühe Repo-Expression identifiziert werden (Abb. 3-7A). Die Naz-positiven Gliazellen in dorsaler Lage liefern jedoch einen deutlichen Hinweis darauf, dass dieser Vorläufer auch in A10 vorhanden ist (Abb. 3-7C). Außerdem konnte mittlerweile eine *Hand*-positive D-Zelle in A10 identifiziert werden. Die klonale Analyse mittels DiI-Markierung konnte zeigen, dass diese Zelle in anterioren Neuromeren vom LGB stammt (C. Rickert, unveröffentlicht). Dies liefert einen weiteren deutlichen Hinweis darauf, dass der LGB tatsächlich auch in A10 noch gebildet wird.

Bemerkenswerterweise exprimiert etwa die Hälfte der A10 NBs *gsb-d*, aber kein *En*, was nahelegt, dass ein Großteil der A10 NBs aus Reihe 5 stammt. Gemeinsam mit dem MNB spiegeln diese NBs die caudalsten Vorläuferzellen des vNS wider. Der MNB selbst ist der einzige NB, der eine *En*-Expression in A10 zeigt. Demnach ist er der einzige NB, der sich dem posterioren Kompartiment von A10 zuordnen lässt und deshalb schon zu PS16 gehört (Abb. 3-9).

Die Reduktion von NBs in A9 (um 28%) und A10 (um 66%) betrifft vorwiegend die A/P-Achse (Abb. 3-10A): Während NBs des posterioren Kompartiments (Reihen 6 und 7) fast vollständig fehlen, sind sowohl laterale, intermediäre, als auch ventrale Vertreter zu finden. Dies wird auch durch die exprimierten molekularen Marker widerspiegelt: Die D/V-Gene *vnd*, *ind* und *msh* werden noch in allen terminalen Segmenten exprimiert (Abb. 3-5), wohingegen z.B. das Segmentpolaritätsgen *en* in A10 nur noch rudimentär exprimiert wird (Abb. 3-1B).

Bemerkenswert ist auch, dass keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtanzahl der NBs aller untersuchter Segmente zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt wurden (Abb. 3-1C). Demnach werden wohl alle NBs in beiden Geschlechtern angelegt und die geschlechtsspezifische Differenzierung erfolgt erst später (Kapitel 4.3).

4.2 Der embryonale Ursprung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten und der *doublesex-Gal4*-exprimierenden Mittellinienzellen

Durch den Einsatz von *dsx-Gal4* und diversen molekularen Markern war es möglich die geschlechtsspezifischen NBs bereits spätembryonal zu identifizieren (Kapitel 3.2.1.1). Sie werden in Männchen und Weibchen gleichermaßen angelegt. Die Expression der molekularen Marker (*dsx*, *Dpn*, *Gsb-p* und *Msh*) liefert deutliche Hinweise darauf, dass NB5-4 zumindest einem dieser beiden NBs entspricht. Da beide geschlechtsspezifischen NBs dieselbe Kombination an molekularen Markern aufweisen, sehr nahe zusammen liegen (Abb. 3-11) und ähnliche postembryonale Zellstambäume (Abb. 3-15A, C) generieren, wäre es möglich, dass sie aus einer symmetrischen Teilung von NB5-4 hervorgehen.

Im St16 sind beide anterior vom letzten *En*-Streifen in A9 zu finden. Allerdings ist es zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich den segmentalen Ursprung der geschlechtsspezifischen NBs zu

ermitteln, da A9 und A10 bereits vollständig fusioniert sind. Da NB5-4 in beiden Segmenten angelegt wird (Abb. 3-9), wäre es auch durchaus vorstellbar, dass es sich um serielle Homologe von NB5-4 aus A9 und A10 handelt. So wird *gsb-d*, der Aktivator von *gsb-p*, in den Segmenten A9-A11 exprimiert (Baumgartner et al., 1987). Bei der Etablierung der terminalen Gsb-d-Streifen ist auffällig, dass zunächst der Streifen in A9 mit der Expression startet und darauffolgend die „Anal Pads“ (A11) ihre Expression induzieren. Schließlich beginnt die Expression im Streifen von A10 als dünne Zellreihe, die zunächst noch mit dem Gsb-d-Streifen in A9 überlappt, sich von diesem aber während des Stadiums der maximalen Keimstreifverlängerung separiert (Gutjahr et al., 1993). Die räumliche Annäherung der Gsb-d-Streifen von A9 und A10 könnte der Ursprung für die Nähe der beiden NBs in späteren Stadien sein. Möglicherweise nähern sich die NBs aber auch erst später aneinander an. Während der Keimstreifretraktion wandern Zellen aus dem posterioren Kompartiment von A8 und A9 nach dorsal, so dass A10 dem kondensierenden vNS zu einer ventralen Position folgt (Kuhn et al., 1992). Auch diese, durch morphogenetische Migration verursachte Annäherung könnte der Grund dafür sein, dass die NBs so nahe zusammenliegen, obwohl sie möglicherweise aus unterschiedlichen Segmenten stammen. Solch eine Annäherung von seriell homologen Zellen von A9 und A10 konnte auch für die vom LGB stammende *Hand*-positive D-Zelle und für die vom NB5-6 hervorgebrachten *Lbe*-positiven Tochterzellen beobachtet werden, deren Zellcluster bis zum St121 nicht mehr voneinander zu unterscheiden sind (persönliche Mitteilung C. Rickert).

Zuletzt kann aber auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich bei der zweiten Zelle um einen anderen Vorläufer als NB5-4 handelt.

Bislang ist nichts darüber bekannt, ob die geschlechtsspezifischen NBs auch einen embryonalen Zellstammbaum hervorbringen, der potenziell geschlechtsunabhängig wäre und kein *dsx-Gal4* exprimiert.

ML-Gliazellen konnten als eine Quelle von *dsx-Gal4*-exprimierenden Zellen in der ML identifiziert werden (Kapitel 3.2.1.2). Der Ursprung der anderen *dsx-Gal4*-exprimierenden Zellen konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Das larvale Projektionsmuster (Abb. 3-15D) weist auf einen neuronalen Vorläufer hin. Da die *dsx-Gal4*-exprimierende Zelle im Embryo En- und Cas-negativ ist, stammt sie wahrscheinlich nicht vom MNB oder VUM-Vorläufer. Die Run-Expression deutet auf MP1 hin, jedoch spricht die fehlende Hb-Expression dagegen (Wheeler et al., 2006).

4.3 Die duale Rolle von *doublesex* bei der Kontrolle des Schicksals von geschlechtsspezifischen Neuroblasten

Obwohl das Geschlecht des Embryos schon vor der Zellularisierung durch das Schaltergen *Sxl* determiniert ist (Bopp et al., 1991), erfolgt die sexuelle Differenzierung des ZNS durch *dsx* erst später (Abb. 1-4). In beiden Geschlechtern konnte erst ab St16 eine *dsx*-Expression in den geschlechtsspezifischen NBs detektiert werden (Abb. 3-11). Durch den Einbau von BrdU konnte zuvor bereits gezeigt werden, dass die postembryonale Proliferation dieser NBs in der L2e-Larve beginnt. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in diesen NBs werden erst ab L3m auffällig: Während die weiblichen die Proliferation zu diesem Zeitpunkt einstellen, teilen sich die männlichen noch bis zu zwölf Stunden nach Beginn der Puppenruhe (Taylor und Truman, 1992). Im Einklang damit konnten durch die G-Trace Analyse die prominenten Zellstammbäume der geschlechtsspezifischen NBs in L31-Männchen dargestellt werden (Abb. 3-14C). Jedoch konnten in den Weibchen weder die geschlechtsspezifischen NBs noch deren Tochterzellen postembryonal nachgewiesen werden (Abb. 3-14A). Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte darin liegen, dass die geschlechtsspezifischen NBs zuvor nicht direkt über molekulare Marker angesprochen wurden, sondern nur das Proliferationsverhalten aller terminalen abdominalen NBs in der Larve nachgewiesen wurde (Taylor und Truman, 1992). In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass sich schon die Anzahl der vorhandenen postembryonalen NBs der terminalen Region zwischen den Geschlechtern unterscheidet (Abb. 3-19B, C).

Zudem deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass *dsx[F]* den PCD der geschlechtsspezifischen NBs zwischen St17 und L2l induziert. Bei einer ektopischen Expression von *P35* überleben die geschlechtsspezifischen NBs im Weibchen und generieren männchenspezifische Zellstammbäume in L3 (Abb. 3-20). Hingegen führt die ektopische Expression von *dsx[F]* in den Männchen zu einem Absterben dieser Zellen. Umgekehrt führt die ektopische Expression von *dsx[M]* in den Weibchen zu einer Rettung der geschlechtsspezifischen NBs (Abb. 3-21). In beiden Situationen sind sowohl die endogene als auch die ektopische *dsx*-Isoform in den geschlechtsspezifischen NBs vorhanden. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Dsx als Homodimer an die DNA bindet (An und Wensink, 1995a; An und Wensink, 1995b; Erdman et al., 1996). Bei der ektopischen Expression werden nun aber sowohl Homo- als auch Heterodimere gebildet und Dsx[F]-Homodimere konkurrieren mit den Dsx[M]-Homodimeren um die gleichen DNA-Bindestellen. Dementsprechend hängt die Expressivität der gezeigten Transformation von der Dosis der ektopisch exprimierten Isoform ab (siehe auch Sanders und Arbeitman, 2008). Das korreliert mit der Stärke der verwendeten Gal4-Linie (schwächerer *insc*- oder stärkerer *dsx*-Gal4-Treiber). Hinzu kommt, dass *dsx*-Gal4 eine Mutation darstellt (Robinett et al., 2010), in der die Dosis an endogenem *dsx* im Verhältnis zu ektopischem Genprodukt weiter verringert wird. Zusammenfassend belegen die durchgeführten Experimente

eine duale Rolle von *dsx* bei der Vermittlung (*dsx[F]*) und Unterdrückung (*dsx[M]*) des PCD (Kapitel 3.2.5).

Wieso die geschlechtsspezifischen NBs in den Weibchen überhaupt angelegt werden, bleibt fraglich. Möglicherweise bringen sie tatsächlich einen geschlechtsunabhängigen, *dsx*-negativen Zellstammbaum im Embryo hervor, bevor durch *dsx[F]*-Induktion der PCD vermittelt wird. Beim Knockdown von *dsx* durch RNAi, von dem beide Isoformen betroffen sind, konnten keine überlebenden NBs in L31-Weibchen gefunden werden, wohingegen es in Männchen zu einer Reduktion der geschlechtsspezifischen NBs kommt (Abb. 3-21). Diese Ergebnisse stimmen mit einer zuvor durchgeführten *dsx*-Mutantenanalyse überein, in der keine postembryonale Proliferation der geschlechtsspezifischen NBs nachgewiesen werden konnte (Taylor und Truman, 1992). Weshalb die geschlechtsspezifischen NBs in den Weibchen dann überhaupt *dsx[F]* exprimieren, obwohl sie offensichtlich auch unabhängig von dessen Expression absterben, bleibt ebenso fraglich. Möglicherweise muss sichergestellt werden, dass die NBs bis zu einem definierten Zeitpunkt entfernt werden oder es käme beim nicht durch Apoptose vermittelten Zelltod zu Problemen mit dem Abtransport der Zellreste.

Das *dsx[F]* eine Rolle bei der Vermittlung von Apoptose übernimmt, konnte bereits zuvor in den embryonalen Gonadenvorläufern (DeFalco et al., 2003), den P1-Interneuronen des adulten Gehirns (Kimura et al., 2008) und den pupalen TN1-Clustern des thorakalen vNS (Sanders und Arbeitman, 2008) gezeigt werden. Zusätzlich konnte ein Screen nach der perfekten Konsensus Dsx[F]-Bindestelle einen Locus in der Nähe des proapoptotischen Gens *reaper* identifizieren, welches möglicherweise ein Zielgen von Dsx[F] darstellt (Luo et al., 2011).

Die postembryonal gebildeten männchenspezifischen Zellstammbäume scheinen eine wichtige Funktion in männlichen Fliegen zu besitzen, da sie bis in die Imago persistieren (Taylor und Truman, 1992). Damit diese Zellstammbäume gebildet werden können, ist es notwendig, dass ihre Vorläufer überleben und *dsx[M]* scheint der Faktor zu sein, der dafür maßgeblich verantwortlich ist. Die rettende Wirkung von *dsx[M]* wird auch durch jenes Kontrolleexperiment widerspiegelt, in dem *dsx[M]* ektopisch in Männchen exprimiert wird. In diesen Männchen überlebt in L31-Larven sogar manchmal ein fünfter NB in den terminalen abdominalen Ganglien, über dessen Identität und Herkunft allerdings nichts bekannt ist (Abb. 3-21). Es konnte gezeigt werden, dass *dsx[M]* nicht wie zuvor beschrieben die Proliferation der geschlechtsspezifischen NBs (Taylor und Truman, 1992) oder deren Differenzierung kontrolliert, sondern für ihre Rettung vor dem PCD verantwortlich ist. Dementsprechend wird bei der ektopischen Expression von *P35* in Weibchen, in Abwesenheit von *dsx[M]*, ein vollständig männchenspezifischer Zellstammbaum generiert, der die für ihn typischen Projektionen ausbildet (Abb. 3-20C). Die geschlechtsspezifischen NBs werden in beiden Geschlechtern angelegt und verfügen über das gleiche intrinsische Programm zur Bildung eines männchenspezifischen Zellstammbaums. Dessen

An- bzw. Abwesenheit unterliegt der Kontrolle durch *dsx*, welches auf Stammzellebene entscheidet, ob die geschlechtsspezifischen Vorläufer überleben oder nicht.

Zusätzlich zu den männchenspezifischen Zellstammbäumen in den terminalen Ganglien gibt es in Bezug auf Zellanzahl, neurale Schaltkreise und Verhalten noch viele weitere geschlechtsspezifische Unterschiede im ZNS von Weibchen und Männchen (z.B. Billeter et al., 2006; Kimura et al., 2008; Kohatsu et al., 2011; Rideout et al., 2007; Rideout et al., 2010; Sanders und Arbeitman, 2008; Technau, 1984; von Philipsborn et al., 2011). Die *Dsx* Transkriptionsfaktoren spielen zu verschiedenen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Geweben eine Schlüsselrolle bei der Etablierung von Sexualdimorphismen und agieren sowohl in Stammzellen als auch deren Tochterzellen. Damit einhergehend wurde eine geschlechtsabhängige dynamische Expression von *dsx* während der postembryonalen Neurogenese beschrieben (Lee et al., 2002; Rideout et al., 2010; Robinett et al., 2010; Sanders und Arbeitman, 2008; diese Arbeit).

Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass *dsx* gemeinsam mit dem *Hox*-Gen *Abd-B* die Expression des gemeinsamen Zielgens *bric-à-brac* in geschlechtsabhängiger Weise kontrolliert, welches die Pigmentierung des Abdomens im Weibchen reprimiert (Williams et al., 2008). Zusätzlich formt *Abd-B* die Morphologie des Abdomens in geschlechtsabhängiger Weise, indem es die *dsx*-Expression während der Pupalentwicklung stimuliert (Wang und Yoder, 2012). Die Daten in dieser Arbeit liefern Hinweise darauf, dass *Abd-B* auch eine Rolle für das Überleben der geschlechtsspezifischen NBs spielen könnte (Abb. 3-20D), jedoch bedarf dies weiterer Untersuchungen. Auch die Rolle des Segmentpolaritätsgens *gsb-p* und des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Eg* in den geschlechtsspezifischen NBs bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4 *Abdominal-B* und *caudal* vermitteln die terminal abdominale Segmentidentität auf unterschiedlichen Entwicklungsebenen des ventralen Nervensystems

Während der Entwicklung des vNS von *Drosophila* vermitteln die *Hox*-Gene des *BX-C* im NE, den NBs und deren Tochterzellen Segmentidentität entlang der A/P-Achse (Kapitel 1.3) (zusammengefasst in Rogulja-Ortmann und Technau, 2008). Sie kontrollieren bereits im NE das intrinsische Potenzial seriell homologer NBs, tagmaspezifisch unterschiedliche Zellstammbäume hervorzubringen (Prokop und Technau, 1994). So spezifiziert *Abd-B* den abdominalen NB6-4, indem es *Cyclin E* (*CycE*) reprimiert, was in dessen symmetrischer Teilung resultiert, aus der nur Gliazellen hervorgehen (Abb. 1-3B). In Abwesenheit von *Abd-B* kommt es in PS14 zu einer asymmetrischen Teilung des NB6-4. Dessen Zellstammbaum weist dann, wie im Thorax, neben Gliazellen auch noch einen neuronalen Subklon auf (Abb. 3-23E) und reflektiert den

Grundzustand, der keinen *Hox*-Einfluss benötigt (Berger et al., 2005; diese Arbeit). Im PS13 erscheint dieser Phänotyp weniger penetrant, da in diesem PS noch Anteile von *abd-A* exprimiert werden, die ebenfalls zu einer Suppression von *CycE* führen (Berger et al., 2005). Dadurch wird die asymmetrische Teilung unterdrückt. Demgemäß führt die ektopische Expression von *Abd-B.m* zu einer Transformation des thorakalen NB6-4 in abdominales Schicksal, was mit dem Verlust seines neuronalen Subklons verbunden ist (Abb. 3-28B). Der NB6-4 wird auch in PS15 gebildet (Abb. 3-9) und besteht dort wohl nur aus einem glialen Anteil, der den molekularen Marker *Eg* sehr schnell herunter reguliert. Wahrscheinlich verhindert die Aktivität von *cad* in *Abd-B*-Funktionsverlustmutationen die Bildung eines neuronalen Subklons in PS15. Jedenfalls hat die ektopische Expression von *cad* gezeigt, dass es durchaus das Potenzial besitzt, das thorakale Schicksal des NB6-4-Zellstammbaums ebenfalls zu unterdrücken (Abb. 3-33D). Allerdings war es bislang nicht möglich eine *Abd-B;cad* Doppelmutante zu etablieren, was die Untersuchung dieser Fragestellung ermöglichen würde.

Die frühe Funktion der *Hox*-Gene auf NE- und NB-Ebene umfasst auch die Determination einer bestimmten segmentspezifischen NB-Population, die am Ende der Embryogenese überleben, zu postembryonalen NBs werden und nach einer kurzen Ruhephase die Proliferation in der Larve wieder aufnehmen (Prokop et al., 1998; Tsuji et al., 2008). In späteren Stadien konnte gezeigt werden, dass *Hox*-Gene die Spezifizierung bestimmter Zelltypen durch segmentspezifische Genregulation und Integration von temporären Signalen auf Ebene der NBs und deren Tochterzellen kontrollieren (Estacio-Gomez et al., 2013; Karlsson et al., 2010).

Ein weiterer Mechanismus, durch den *Hox*-Gene das segmentale Muster des ZNS beeinflussen, ist die Kontrolle des PCD. Auf der Ebene der differenzierten Tochterzellen ist die Kontrolle der Apoptose eine spätembryonale Funktion der *Hox*-Gene, wobei sie den PCD zellspezifisch induzieren oder auch reprimieren können (Miguel-Aliaga und Thor, 2004; Rogulja-Ortmann et al., 2008; Suska et al., 2011). Auch Anteile des Zellstammbaums von NB3-3 in PS14 scheinen der durch *Abd-B*-induzierten Apoptose zu unterliegen (Abb. 3-24E). Möglicherweise werden spezifisch die Tochterzellen eliminiert, die keine *Eve*-Expression aufweisen, doch dies bedarf noch einer genaueren Analyse.

Auf der Ebene der postembryonalen NBs regulieren *Hox*-Gene deren Proliferationsende in L3, indem sie auch hier den PCD vermitteln (Bello et al., 2003). Des Weiteren wurde der PCD bereits in gnathalen und terminalen abdominalen Segmentsgrenzen des Ektoderms nachgewiesen (Lohmann et al., 2002; Nassif et al., 1998). Die Induktion der Apoptose erfolgt in diesen Fällen durch die *Hox*-Gene *Dfd* und *Abd-B*, die eine ganze Reihe proapoptotischer Gene aktivieren (Hueber et al., 2007; Lohmann et al., 2002; Zhai et al., 2009). Auch die geschlechtsspezifischen NBs in der terminalen Abdominalregion des Weibchens unterliegen im späten Embryo/der frühen

Larve dem PCD (Kapitel 3.2.4). Insofern erschien es wahrscheinlich, dass auch die Reduktion der NBs in PS14-15 auf PCD zurückgeht.

Jedoch konnte in den terminalen Neuromeren von *Df(3L)H99*-Embryonen des St12e kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der NBs im Vergleich mit dem WT festgestellt werden (Abb. 3-22), so dass der PCD wohl nicht für die verringerte Anzahl an NBs in der frühen Neurogenese dieser PSs verantwortlich ist. Stattdessen zeigen Anlagenkarten während des Blastodermstadiums, dass die terminalen segmentalen Anlagen signifikant reduziert sind (Hartenstein et al., 1985; Jürgens, 1987; Technau und Campos-Ortega, 1985). Die Spezifizierung dieser Anlagen unterliegt auch *Abd-B* und *cad*, die für die Identität der terminalen abdominalen PSs mitverantwortlich sind (Moreno und Morata, 1999; Sanchez-Herrero et al., 1985). So umfasst eine Funktion dieser Gene die Unterdrückung ventraler Strukturen in diesem Bereich (Kuhn et al., 1995). Würde dies auch das NE betreffen, so würde dies dessen rudimentären Zustand erklären, der für die reduzierte Anzahl von NBs verantwortlich sein könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Abd-B* und *cad* in PS15 die Bildung von etwa drei bis vier NBs pro Hemi-PS unterdrücken (Abb. 3-22), wobei bereits eine frühe Expression dieser Gene im NE notwendig ist. Das könnte darauf zurückgehen, dass beide Gene die Größe des NE in dieser Region verringern. In diesem Fall würden sie nur die Bildung des Anteils an NE verhindern, aus dem diese NBs hervorgehen. Da der NB7-3 beispielsweise in anterioren Neuromeren aus einer En-positiven, intermediären D/V-Position hervorgeht, würde man vermuten, dass *Abd-B* und *cad* die Bildung genau dieses Bereichs im NE verhindern. Eine mögliche Alternative wäre, dass diese neuroektodermale Domäne zwar geformt wird, *Abd-B* und *cad* aber die Bildung, der aus dieser Region hervorgehenden NBs unterdrückt. Dies könnte durch die Regulation der Gene geschehen, welche die proneuralen Cluster des NE definieren, aus denen die NBs hervorgehen (Kapitel 1.1) (zusammengefasst in Skeath und Carroll, 1994). So konnte ein Screen nach *Hox*-Zielgenen zeigen, dass eine ektopische Expression von *Abd-B* zu einer Herunterregulation von *lethal of scute* (*l(1)sc*) führt, welches eines der vier Mitglieder des *AS-C* darstellt (Martin-Bermudo et al., 1991). Im WT wird *L(1)sc* in dem proneuralen Cluster exprimiert, aus dem der NB7-3 hervorgeht, sowie für eine kurze Zeit auch im NB7-3 selbst (S. R. Myneni, unveröffentlicht).

Die ektopische Co-Expression von *cad* und *Abd-B.r* reduziert die Anzahl an NBs in anterioren Hemi-PSs von ~31 auf ~25 (Abb. 3-33H). Diese Anzahl unterscheidet sich allerdings signifikant von der Anzahl an NBs, die in PS15 beobachtet wurden (~12). Möglicherweise wird die Suppression von NBs in anterioren PSs durch dort exprimierte Faktoren beschränkt. Wahrscheinlicher erscheint aber, dass weitere, bislang nicht identifizierte, posteriore Musterbildungsgene an der Suppression weiterer NBs in PS15 beteiligt sind. So sind noch zwei weitere Gene für die Kontrolle terminal abdominalen Segmentidentität verantwortlich: *fork head*, das den terminalen Charakter posterior von PS15, und demnach wohl außerhalb des vNS,

determiniert (Jürgens und Weigel, 1988), sowie *spalt* (*sal*), dass in PS14-15 exprimiert und für deren Identität benötigt wird (Jürgens, 1988; Kühnlein et al., 1994). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass *tailless* die Transkription von *sal* aktiviert und *cad* zusätzlich dessen basale Expression steigert. So ist *cad* notwendig, aber nicht ausreichend für die posteriore *sal*-Expression (Kühnlein et al., 1997) und würde demnach oberhalb von *sal* agieren.

4.5 *Abdominal-B.r* vermittelt nur gemeinsam mit *caudal* terminales abdominales Schicksal im ventralen Nervensystem

Abd-B.m wird in PS13 und anterior dazu, *Abd-B.r* in PS14-15 exprimiert, wo es mit der Expression von *Cad* überlappt (Abb. 3-26B, C; Abb. 3-29A). *Abd-B.r* scheint notwendig, aber nicht ausreichend zu sein, um terminales Schicksal im vNS zu vermitteln. So konnte bei der ektopischen Expression von *Abd-B.r*, in Bezug auf die Gesamtanzahl an NBs, der Inhibition der NB7-3-Bildung oder der Spezifizierung des NB6-4, keine offensichtliche Transformation eines anterioren PS in posteriores Schicksal erzielt werden (Abb. 3-28A, H). Das widerspricht vorhergehenden Untersuchungen, die durch die Misexpression von *Abd-B.r* ektopische Filzkörper in anterioren Segmenten induzieren konnten, eine ektodermale Struktur, die charakteristisch für PS13 ist (Kuziora, 1993; Lamka et al., 1992). Außerdem konnte keine offensichtliche *Ubx*-Repression erzielt werden (Abb. 3-28J), obwohl zuvor beschrieben wurde, dass ektopische *Abd-B.r*-Expression zu einem Herunterregulieren von *Ubx*-Transkripten führt (Kuziora, 1993). Wie zuvor bereits gezeigt, kann *Abd-B.r* nicht auf seine regulatorische Funktion als Repressor von *Abd-B.m* beschränkt werden, da es auch eine morphogenetische Rolle bei der Aktivierung von Genexpression ausübt (Ali und Bienz, 1991; Thali et al., 1988). Jedoch konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass ektopisches *Abd-B.r* nur eine schwache morphogenetische Kapazität in anterioren PSs besitzt, da es die Co-Faktoren anteriorer *Hox*-Gene, wie *homothorax* oder *extradenticle*, die mit *Abd-B* konkurrieren und seiner Funktion entgegenwirken, nur sehr ineffizient herunter reguliert (Rivas et al., 2013). Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen diese Ergebnisse und deuten an, dass *Abd-B.r* die Co-Expression von *cad* benötigt, um seine vollständige morphogenetische Kapazität in Bezug auf die Vermittlung des terminalen Schicksals zu entfalten (Abb. 3-33C, F). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass *Abd-B* und *cad* für die Unterdrückung ventraler Strukturen in den terminalen PSs benötigt werden (Kuhn et al., 1995). Dementsprechend zeigt die alleinige ektopische Expression von *Abd-B.r* oder *cad* nur geringe Effekte auf anteriore PSs (Abb. 3-28A, H; Abb. 3-33A, D) (Mlodzik et al., 1990; Rivas et al., 2013). Bei der gemeinsamen ektopischen Expression im vNS scheinen sie sich zu komplementieren: *cad* kann die anterior exprimierten *Hox*-Gene (*Ubx*, *abd-A*) herunter regulieren (Abb. 3-32), was wahrscheinlich eine Voraussetzung dafür ist, dass *Abd-B.r* die Bildung von NBs

unterdrücken kann. Im Gegensatz dazu vereint *Abd-B.m* beide Funktionen (Abb. 3-28B, I, K). Warum es allerdings die Fähigkeit besitzt die NB-Bildung zu unterdrücken, obwohl es diese Funktion niemals in seiner nativen Expressionsdomäne ausübt, bleibt rätselhaft.

Da *Abd-B.m* und das verkürzte *Abd-B.r* Protein den gleichen C-Terminus besitzen, wäre es denkbar, dass dieser die Domäne beherbergt, die es ermöglicht die NB-Bildung zu unterdrücken. Demgemäß wäre der N-Terminus, der nur in *Abd-B.m* vorhanden ist, notwendig, um die Expression anteriorer *Hox*-Gene zu unterdrücken. Folglich würde *Cad* den fehlenden N-Terminus in *Abd-B.r* kompensieren. Auf Proteinebene enthält der N-Terminus von *Abd-B.m* eine große Abfolge an Glutamin, die als M- oder opa-Motiv bezeichnet wird (Wharton et al., 1985). Eine potenziell funktionell redundante Sequenz aus Asparagin konnte auch in *Cad* identifiziert werden (Mlodzik et al., 1985).

In *Drosophila* existieren mindestens vier *Abd-B*-Transkripte und zwei -Proteinisoformen (Abb. 3-26A), deren Expression durch voneinander separierte, parasegmentspezifische, cis-regulatorische Sequenzen sehr komplex reguliert wird (zusammengefasst in Duncan, 1987; Sanchez-Herrero, 1991). Dementgegen existieren 16 verwandte Gene in Vertebraten, die auf vier paraloge Gencluster aufgeteilt sind und alle auf denselben Vorläufer zurückgehen wie *Abd-B* (zusammengefasst in McGinnis und Krumlauf, 1992). Diese entstanden wohl zunächst durch Tandemduplikation, gefolgt von der Duplikation ganzer Gencluster und dem anschließenden Verlust einiger Gene innerhalb dieser Cluster (zusammengefasst in Holland und Garcia-Fernandez, 1996). Dementsprechend wird angenommen, dass die posterioren *Hox*-Gene der Deuterostomia schneller evolvieren als die der Protostomia (Ferrier et al., 2000).

Das *ParaHox*-Gen *cad* und *Abd-B* leiten sich wohl durch Duplikation von einem gemeinsamen Vorfahren aus dem *ProtoHox*-Gencluster ab und stellen demnach evolutionäre Geschwister dar (Brooke et al., 1998; zusammengefasst in Garcia-Fernandez, 2005). Dementsprechend teilt *cad* viele Eigenschaften mit den *Hox*-Genen des *BX-C*: ein *Hox*-typisches Hexapeptid-Motiv der Konsensussequenz IYPWMK N-terminal von der Homeodomäne und ein Intron an derselben Position wie in *Abd-B* (Gehring et al., 1994). Wie für paraloge Gene erwartet, zeigen *Cad* und *Abd-B* überlappende Expressionsdomänen im vNS (Abb. 3-29B). Ektopische Expression von *cad* resultiert in einer effizienten Herunterregulation von *Ubx* und *Abd-A* (Abb. 3-32). Jedoch konnten im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen in Imaginalscheiben (Moreno und Morata, 1999) keine Hinweise darauf gefunden werden, dass eine ektopische Expression von *cad* zu einer Suppression der *Abd-B*-Expression führt (Abb. 3-31C). Dies würde eine Ausnahme von der Regel der posterioren Dominanz darstellen.

In Säugetieren existieren drei *cad* Homologe: *Cdx1*, *Cdx2* und *Cdx4* (Ferrier et al., 2005). In der Maus (*Mus musculus*) zeigen sie eine kollineare und überlappende Expression im caudalen embryonalen Neuralrohr (Beck et al., 1995; Gamer und Wright, 1993; Meyer und Gruss, 1993).

Mutationen resultieren in homeotischen Transformationen nach anterior und offenbaren funktionale Redundanz bei der Kontrolle von posteriorer Identität (Chawengsaksophak et al., 2004; Chawengsaksophak et al., 1997; Subramanian et al., 1995; van den Akker et al., 2002; van Nes et al., 2006), was auf eine konservierte Funktion zwischen *Mus musculus* und *Drosophila* hindeutet. Zusätzlich arretiert das komplexe Zusammenspiel von *Cdx*- und posterioren *Hox*-Genen die Achsenverlängerung in Mäusen (zusammengefasst in Mallo et al., 2010; Young et al., 2009). In dieser Arbeit wurde nun auch erstmals eine gemeinsame Funktion bei der Restriktion der NB-Bildung im terminalen abdominalen vNS von *Drosophila* nachgewiesen, was andeutet, dass dieses Zusammenspiel offenbar hoch konserviert und atavistisch ist.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Mechanismen der Musterbildung in der terminalen Abdominalregion des Zentralnervensystems von *Drosophila melanogaster* untersucht. Dazu wurden zunächst die Anzahl der angelegten Neuomere und das Muster der dort lokalisierten neuronalen Stammzellen (Neuroblasten) analysiert (Kapitel 3.1.1). Dabei zeigte sich, dass sowohl die Größe der Neuomere, als auch die Anzahl an Neuroblasten von anterior nach posterior sukzessiv abnimmt, wobei keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Anzahl der vorhandenen Neuroblasten festgestellt werden konnten. Durch die Kombination einer Vielzahl von molekularen Markern war es anschließend möglich, die Identität aller Neuroblasten in diesem Bereich aufzuklären (Kapitel 3.1.2) und in einer Karte zusammenzutragen (Abb. 3-9). Sie weisen alle eine serielle Homologie zu Neuroblasten in weiter anterior gelegenen Segmenten auf.

Des Weiteren wurde die embryonale Identität der geschlechtsspezifischen NBs untersucht (Kapitel 3.2.1.1) und deren postembryonalen männchenspezifischen Zellstammbäume charakterisiert (Kapitel 3.2.2).

Diese detaillierten Beschreibungen bildeten die Grundlage für die funktionelle Analyse von geschlechts- und segmentspezifischen Faktoren, die zur Musterbildung in dieser Region des Zentralnervensystems beitragen. So konnte gezeigt werden, dass die weibliche Isoform von *doublesex* den programmierten Zelltod der geschlechtsspezifischen Neuroblasten induziert, während die männliche Isoform diesen verhindert (Kapitel 3.2.5). Das *Hox*-Gen *Abdominal-B* zeigt relativ milde Effekte auf das Überleben dieser Neuroblasten (Kapitel 3.2.4), was darauf hindeutet, dass weitere Faktoren benötigt werden, um diesen Prozess in segmentspezifischer Weise zu kontrollieren.

Die Funktion von *Hox*-Genen wurde ferner im Hinblick auf die abgeleitete Morphologie der terminalen Neuomere untersucht (Kapitel 3.3). Es konnte herausgefunden werden, dass die regulatorische Isoform von *Abdominal-B* auf mehreren Ebenen wirkt: Sie beeinflusst die Zusammensetzung bestimmter Zellstammbäume durch Modifikation von Zelldeterminationsprozessen und durch die Kontrolle des programmierten Zelltods. Außerdem unterdrückt sie die Bildung einer spezifischen Subpopulation von Neuroblasten. Allerdings benötigt *Abdominal-B.r* die Co-Expression des *ParaHox*-Gens *caudal*, um sein gesamtes Potenzial bezüglich der Suppression dieser Neuroblasten zu entfalten (Kapitel 3.3.6).

Die vorliegende Arbeit hat somit erste Einblicke in die geschlechtsspezifische und segmentspezifische Spezifizierung der terminalen Abdominalregion des Zentralnervensystems

von *Drosophila* auf Ebene des Neuroektoderms, der daraus hervorgehenden Neuroblasten und deren Tochterzellen gewährt. Die vollständige und detailgetreue Beschreibung des Neuroblasten-Musters und der postembryonalen männchenspezifischen Zellstammbäume hat zudem attraktive Modellsysteme für zukünftige Untersuchungen etabliert, an denen sich weitere Mechanismen der Musterbildung im Zentralnervensystem analysieren lassen.

6 Literaturverzeichnis

Ali, N. und Bienz, M. (1991). Functional dissection of Drosophila Abdominal-B protein. *Mech Dev* **35**, 55-64.

An, W. und Wensink, P. C. (1995a). Integrating sex- and tissue-specific regulation within a single Drosophila enhancer. *Genes Dev* **9**, 256-266.

An, W. und Wensink, P. C. (1995b). Three protein binding sites form an enhancer that regulates sex- and fat body-specific transcription of Drosophila yolk protein genes. *EMBO J* **14**, 1221-1230.

Arendt, D. und Nübler-Jung, K. (1999). Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development* **126**, 2309-2325.

Artavanis-Tsakonas, S., Delidakis, C. und Fehon, R. G. (1991). The Notch locus and the cell biology of neuroblast segregation. *Annual Review Cell Biology* **7**, 427-452.

Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Diaz-Benjumea, F. J. und Thor, S. (2009). Neuronal subtype specification within a lineage by opposing temporal feed-forward loops. *Cell* **139**, 969-982.

Baumgartner, S., Bopp, D., Burri, M. und Noll, M. (1987). Structure of two genes at the gooseberry locus related to the paired gene and their spatial expression during Drosophila embryogenesis. *Genes Dev* **1**, 1247-1267.

Beck, F., Erler, T., Russell, A. und James, R. (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* **204**, 219-227.

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**, 209-219.

Berger, C., Pallavi, S. K., Prasad, M., Shashidhara, L. S. und Technau, G. M. (2005). A critical role for cyclin E in cell fate determination in the central nervous system of Drosophila melanogaster. *Nat Cell Biol* **7**, 56-62.

Betschinger, J., Mechtler, K. und Knoblich, J. A. (2006). Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells. *Cell* **124**, 1241-1253.

Bhat, K. M. (1996). The patched signaling pathway mediates repression of gooseberry allowing neuroblast specification by wingless during Drosophila neurogenesis. *Development* **122**, 2921-2932.

Bhat, K. M. (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during Drosophila neurogenesis. *Bioessays* **21**, 472-485.

Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1992). deadpan, an essential pan-neural gene in Drosophila, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. *Genes Dev* **6**, 2137-2151.

- Billeter, J. C., Vilella, A., Allendorfer, J. B., Dornan, A. J., Richardson, M., Gailey, D. A. und Goodwin, S. F.** (2006). Isoform-specific control of male neuronal differentiation and behavior in *Drosophila* by the fruitless gene. *Curr Biol* **16**, 1063-1076.
- Boll, W. und Noll, M.** (2002). The *Drosophila* Pox neuro gene: control of male courtship behavior and fertility as revealed by a complete dissection of all enhancers. *Development* **129**, 5667-5681.
- Bopp, D., Bell, L. R., Cline, T. W. und Schedl, P.** (1991). Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **5**, 403-415.
- 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.
- Boulet, A. M., Lloyd, A. und Sakonju, S.** (1991). Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the *Drosophila* Abd-B homeotic gene. *Development* **111**, 393-405.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. und Doe, C. Q.** (1995). New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **53**, 393-402.
- Brooke, N. M., Garcia-Fernandez, J. und Holland, P. W.** (1998). The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* **392**, 920-922.
- Buenzow, D. E. und Holmgren, R.** (1995). Expression of the *Drosophila* gooseberry locus defines a subset of neuroblast lineages in the central nervous system. *Dev Biol* **170**, 338-349.
- Burtis, K. C., Coschigano, K. T., Baker, B. S. und Wensink, P. C.** (1991). The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *EMBO J* **10**, 2577-2582.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Carroll, S. B.** (1990). Zebra patterns in fly embryos: activation of stripes or repression of interstripes? *Cell* **60**, 9-16.
- Casanova, J., Sanchez-Herrero, E., Busturia, A. und Morata, G.** (1987). Double and triple mutant combinations of bithorax complex of *Drosophila*. *EMBO J* **6**, 3103-3109.
- Casanova, J., Sanchez-Herrero, E. und Morata, G.** (1986). Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the Abdominal-B gene of *Drosophila*. *Cell* **47**, 627-636.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. und Akam, M.** (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* **120**, 1983-1995.
- Celniker, S. E., Keelan, D. J. und Lewis, E. B.** (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev* **3**, 1424-1436.

- Chatterjee, S. S., Uppendahl, L. D., Chowdhury, M. A., Ip, P. L. und Siegal, M. L.** (2011). The female-specific doublesex isoform regulates pleiotropic transcription factors to pattern genital development in *Drosophila*. *Development* **138**, 1099-1109.
- Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J. und Beck, F.** (2004). Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7641-7645.
- Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F. und Beck, F.** (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* **386**, 84-87.
- Christiansen, A. E., Keisman, E. L., Ahmad, S. M. und Baker, B. S.** (2002). Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern. *Trends Genet* **18**, 510-516.
- Chu, H., Parras, C., White, K. und Jimenez, F.** (1998). Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by vnd in *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* **12**, 3613-3624.
- Colomb, S., Joly, W., Bonneaud, N. und Maschat, F.** (2008). A concerted action of Engrailed and Gooseberry-Neuro in neuroblast 6-4 is triggering the formation of embryonic posterior commissure bundles. *PLoS One* **3**, e2197.
- Coschigano, K. T. und Wensink, P. C.** (1993). Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of *Drosophila*. *Genes Dev* **7**, 42-54.
- De Graeve, F., Jagla, T., Daponte, J. P., Rickert, C., Dastugue, B., Urban, J. und Jagla, K.** (2004). The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells. *Dev Biol* **270**, 122-134.
- DeFalco, T. J., Verney, G., Jenkins, A. B., McCaffery, J. M., Russell, S. und Van Doren, M.** (2003). Sex-specific apoptosis regulates sexual dimorphism in the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev. Cell* **5**, 205-216.
- DeLorenzi, M., Ali, N., Saari, G., Henry, C., Wilcox, M. und Bienz, M.** (1988). Evidence that the Abdominal-B r element function is conferred by a trans-regulatory homeoprotein. *EMBO J* **7**, 3223-3231.
- DeLorenzi, M. und Bienz, M.** (1990). Expression of Abdominal-B homeoproteins in *Drosophila* embryos. *Development* **108**, 323-329.
- Deshpande, N., Dittrich, R., Technau, G. und Urban, J.** (2001). Successive specification of *Drosophila* NB6-4 and NB7-3 depends on interaction of the segment polarity genes wingless, gooseberry and naked cuticle. *Development* **128**, 3253-3261.
- Deutsch, J. S.** (2004). Segments and parasegments in arthropods: a functional perspective. *Bioessays* **26**, 1117-1125.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S. et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-156.
- DiNardo, S., Kuner, J. M., Theis, J. und O' Farrell, P. H.** (1985). Development of embryonic pattern in *Drosophila melanogaster* as revealed by accumulation of the nuclear engrailed protein. *Cell* **43**, 59-69.

- Dittrich, R., Bossing, T., Gould, A. P., Technau, G. M. und Urban, J.** (1997). The differentiation of the serotonergic neurons in the *Drosophila* ventral nerve cord depends on the combined function of the zinc finger proteins *Eagle* and *Huckebein*. *Development* **124**, 2515-2525.
- Doe, C. Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855-863.
- Doe, C. Q., Fuerstenberg, S. und Peng, C. Y.** (1998). Neural stem cells: from fly to vertebrates. *J Neurobiol* **36**, 111-127.
- Dormand, E. L. und Brand, A. H.** (1998). Runt determines cell fates in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **125**, 1659-1667.
- Duboule, D. und Morata, G.** (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* **10**, 358-364.
- Duncan, I.** (1987). The bithorax complex. *Annu Rev Genet* **21**, 285-319.
- Erdman, S. E., Chen, H.-J. und Burtis, K. C.** (1996). Functional and genetic characterization of the oligomerization and DNA binding properties of the *Drosophila* Doublesex proteins. *Genetics* **144**, 1639-1652.
- Estacio-Gomez, A., Moris-Sanz, M., Schafer, A. K., Perea, D., Herrero, P. und Diaz-Benjumea, F. J.** (2013). Bithorax-complex genes sculpt the pattern of leucokinergic neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **140**, 2139-2148.
- Evans, C. J., Olson, J. M., Ngo, K. T., Kim, E., Lee, N. E., Kuoy, E., Patananan, A. N., Sitz, D., Tran, P., Do, M. T. et al.** (2009). G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat Methods* **6**, 603-605.
- Ferrier, D. E., Dewar, K., Cook, A., Chang, J. L., Hill-Force, A. und Amemiya, C.** (2005). The chordate ParaHox cluster. *Curr Biol* **15**, R820-822.
- Ferrier, D. E., Minguillon, C., Holland, P. W. und Garcia-Fernandez, J.** (2000). The amphioxus Hox cluster: deuterostome posterior flexibility and Hox14. *Evol Dev* **2**, 284-293.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H. und Levine, M.** (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *EMBO J* **6**, 749-759.
- Fuerstenberg, S., Broadus, J. und Doe, C. Q.** (1998). Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 379-383.
- Fujioka, M., Lear, B. C., Landgraf, M., Yusibova, G. L., Zhou, J., Riley, K. M., Patel, N. H. und Jaynes, J. B.** (2003). Even-skipped, acting as a repressor, regulates axonal projections in *Drosophila*. *Development* **130**, 5385-5400.
- Gamer, L. W. und Wright, C. V.** (1993). Murine Cdx-4 bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* **43**, 71-81.
- Garcia-Fernandez, J.** (2005). Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity (Edinb)* **94**, 145-152.

- Gaul, U. und Jäckle, H.** (1990). Role of gap genes in early *Drosophila* development. *Adv Genet* **27**, 239-275.
- Gehring, W. J., Affolter, M. und Burglin, T.** (1994). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* **63**, 487-526.
- Golic, K. G. und Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Gorfinkiel, N., Sanchez, L. und Guerrero, I.** (1999). *Drosophila* terminalia as an appendage-like structure. *Mech Dev* **86**, 113-123.
- Gummalla, M., Maeda, R. K., Castro Alvarez, J. J., Gyurkovics, H., Singari, S., Edwards, K. A., Karch, F. und Bender, W.** (2012). *abd-A* regulation by the *iab-8* noncoding RNA. *PLoS Genet* **8**, e1002720.
- Gutjahr, T., Patel, N. H., Li, X., Goodman, C. S. und Noll, M.** (1993). Analysis of the gooseberry locus in *Drosophila* embryos: gooseberry determines the cuticular pattern and activates gooseberry neuro. *Development* **118**, 21-31.
- Hadjieconomou, D., Rotkopf, S., Alexandre, C., Bell, D. M., Dickson, B. J. und Salecker, I.** (2011). Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* **8**, 260-266.
- Häsemeyer, M., Yapici, N., Heberlein, U. und Dickson, B. J.** (2009). Sensory neurons in the *Drosophila* genital tract regulate female reproductive behavior. *Neuron* **61**, 511-518.
- Hama, C., Ali, Z. und Kornberg, T. B.** (1990). Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter. *Genes Dev* **4**, 1079-1093.
- Harding, K., Wedeen, C., McGinnis, W. und Levine, M.** (1985). Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science* **229**, 1236-1242.
- Hartenstein, V. und Campos-Ortega, J. A.** (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* **193**, 308-325.
- Hartenstein, V., Rudloff, E. und Campos-Ortega, J. A.** (1987). The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* **196**, 473-485.
- Hartenstein, V., Technau, G. M. und Campos-Ortega, J. A.** (1985). Fate-mapping in wild-type *Drosophila melanogaster*: III. A fate map of the blastoderm. *Roux's Arch Dev Biol* **194**, 213-216.
- Hartmann, B., Hirth, F., Walldorf, U. und Reichert, H.** (2000). Expression, regulation and function of the homeobox gene empty spiracles in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *Mech Dev* **90**, 143-153.
- Hay, B. A., Wolff, T. und Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-2129.
- Higashijima, S., Shishido, E., Matsuzaki, M. und Saigo, K.** (1996). *eagle*, a member of the steroid receptor gene superfamily, is expressed in a subset of neuroblasts and regulates the fate of their putative progeny in the *Drosophila* CNS. *Development* **122**, 527-536.

- Holland, P. W. und Garcia-Fernandez, J.** (1996). Hox genes and chordate evolution. *Dev Biol* **173**, 382-395.
- Hopmann, R., Duncan, D. und Duncan, I.** (1995). Transvection in the iab-5,6,7 region of the bithorax complex of *Drosophila*: homology independent interactions in trans. *Genetics* **139**, 815-833.
- Hoshijima, K., Inoue, K., Higuchi, I., Sakamoto, H. und Shimura, Y.** (1991). Control of doublesex alternative splicing by transformer and transformer-2 in *Drosophila*. *Science* **252**, 833-836.
- Hueber, S. D., Bezdán, D., Henz, S. R., Blank, M., Wu, H. und Lohmann, I.** (2007). Comparative analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*. *Development* **134**, 381-392.
- Hwang, M. S., Kim, Y. S., Choi, N. H., Park, J. H., Oh, E. J., Kwon, E. J., Yamaguchi, M. und Yoo, M. A.** (2002). The caudal homeodomain protein activates *Drosophila* E2F gene expression. *Nucleic Acids Res* **30**, 5029-5035.
- Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J. B., Nabeshima, Y., Doe, C. Q. und Matsuzaki, F.** (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* **390**, 625-629.
- Ingham, P. W.** (1991). Segment polarity genes and cell patterning within the *Drosophila* body segment. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 261-267.
- 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**, 511-521.
- Isshiki, T., Takeichi, M. und Nose, A.** (1997). The role of the msh homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* **124**, 3099-3109.
- Ito, K., Urban, J. und Technau, G. M.** (1995). Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **204**, 284-307.
- Jagla, K., Jagla, T., Heitzler, P., Dretzen, G., Bellard, F. und Bellard, M.** (1997). ladybird, a tandem of homeobox genes that maintain late wingless expression in terminal and dorsal epidermis of the *Drosophila* embryo. *Development* **124**, 91-100.
- Jürgens, G.** (1987). Segmental organisation of the tail region in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* **196**, 141-157.
- Jürgens, G.** (1988). Head and tail development of the *Drosophila* embryo involves spalt, a novel homeotic gene. *EMBO J* **7**, 189-196.
- Jürgens, G. und Weigel, D.** (1988). Terminal versus Segmental Development in the *Drosophila* Embryo - the Role of the Homeotic Gene Fork Head. *Roux's Archives of Developmental Biology* **197**, 345-354.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. und Odenwald, W. F.** (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev* **12**, 246-260.

- Kammermeier, L., Leemans, R., Hirth, F., Flister, S., Wenger, U., Walldorf, U., Gehring, W. J. und Reichert, H.** (2001). Differential expression and function of the *Drosophila* Pax6 genes *eyeless* and *twin of eyeless* in embryonic central nervous system development. *Mech Dev* **103**, 71-78.
- Kanai, M. I., Okabe, M. und Hiromi, Y.** (2005). seven-up controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell* **8**, 203-213.
- Karcavich, R. und Doe, C. Q.** (2005). *Drosophila* neuroblast 7-3 cell lineage: a model system for studying programmed cell death, Notch/Numb signaling, and sequential specification of ganglion mother cell identity. *J Comp Neurol* **481**, 240-251.
- Karch, F., Bender, W. und Weiffenbach, B.** (1990). *abdA* expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **4**, 1573-1587.
- Karch, F., Weiffenbach, B., Peifer, M., Bender, W., Duncan, I., Celniker, S., Crosby, M. und Lewis, E. B.** (1985). The abdominal region of the bithorax complex. *Cell* **43**, 81-96.
- Karlsson, D., Baumgardt, M. und Thor, S.** (2010). Segment-specific neuronal subtype specification by the integration of anteroposterior and temporal cues. *PLoS Biol* **8**, e1000368.
- Kaufman, T. C., Lewis, R. und Wakimoto, B.** (1980). Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: The Homoeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84A-B. *Genetics* **94**, 115-133.
- Kellerman, K. A., Mattson, D. M. und Duncan, I.** (1990). Mutations affecting the stability of the *fushi tarazu* protein of *Drosophila*. *Genes Dev* **4**, 1936-1950.
- Keyes, L. N., Cline, T. W. und Schedl, P.** (1992). The primary sex determination signal of *Drosophila* acts at the level of transcription. *Cell* **68**, 933-943.
- Kimura, K., Hachiya, T., Koganezawa, M., Tazawa, T. und Yamamoto, D.** (2008). Fruitless and doublesex coordinate to generate male-specific neurons that can initiate courtship. *Neuron* **59**, 759-769.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. und Klämbt, C.** (1994). The *Ets* transcription factors encoded by the *Drosophila* gene *pointed* direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149-160.
- Kohatsu, S., Koganezawa, M. und Yamamoto, D.** (2011). Female contact activates male-specific interneurons that trigger stereotypic courtship behavior in *Drosophila*. *Neuron* **69**, 498-508.
- Kosman, D., Mizutani, C. M., Lemons, D., Cox, W. G., McGinnis, W. und Bier, E.** (2004). Multiplex detection of RNA expression in *Drosophila* embryos. *Science* **305**, 846.
- Kosman, D., Small, S. und Reinitz, J.** (1998). Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins. *Dev Genes Evol* **208**, 290-294.
- Kühnlein, R. P., Bronner, G., Taubert, H. und Schuh, R.** (1997). Regulation of *Drosophila* spalt gene expression. *Mech Dev* **66**, 107-118.

- Kühnlein, R. P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, A., Wagner-Bernholz, J. F., Gehring, W. J., Jäckle, H. und Schuh, R.** (1994). spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *EMBO J* **13**, 168-179.
- Kuhn, D. T., Sawyer, M., Packert, G., Turenchalk, G., Mack, J. A., Sprey, T. E., Gustavson, E. und Kornberg, T. B.** (1992). Development of the *D. melanogaster* caudal segments involves suppression of the ventral regions of A8, A9 and A10. *Development* **116**, 11-20.
- Kuhn, D. T., Turenchalk, G., Mack, J. A., Packert, G. und Kornberg, T. B.** (1995). Analysis of the genes involved in organizing the tail segments of the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mech Dev* **53**, 3-13.
- Kuziora, M. A.** (1993). Abdominal-B protein isoforms exhibit distinct cuticular transformations and regulatory activities when ectopically expressed in *Drosophila* embryos. *Mech Dev* **42**, 125-137.
- Kuziora, M. A. und McGinnis, W.** (1988). Different transcripts of the *Drosophila* Abd-B gene correlate with distinct genetic sub-functions. *EMBO J* **7**, 3233-3244.
- Lacin, H., Zhu, Y., Wilson, B. A. und Skeath, J. B.** (2009). *dbx* mediates neuronal specification and differentiation through cross-repressive, lineage-specific interactions with *eve* and *hb9*. *Development* **136**, 3257-3266.
- Lamka, M. L., Boulet, A. M. und Sakonju, S.** (1992). Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during *Drosophila* embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. *Development* **116**, 841-854.
- 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**, 221-230.
- 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**, 207-225.
- Lee, G., Hall, J. C. und Park, J. H.** (2002). Doublesex gene expression in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* **16**, 229-248.
- Lemons, D. und McGinnis, W.** (2006). Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* **313**, 1918-1922.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Lin, D. M. und Goodman, C. S.** (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**, 507-523.
- Lindsley, D. L. und Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, San Diego, C.A.*
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. und McGinnis, W.** (2002). The *Drosophila* Hox gene *deformed* sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator *reaper*. *Cell* **110**, 457-466.

- Luo, S. D., Shi, G. W. und Baker, B. S.** (2011). Direct targets of the *D. melanogaster* DSXF protein and the evolution of sexual development. *Development* **138**, 2761-2771.
- Macdonald, P. M. und Struhl, G.** (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature* **324**, 537-545.
- Macias, A., Casanova, J. und Morata, G.** (1990). Expression and regulation of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development* **110**, 1197-1207.
- Mallo, M., Wellik, D. M. und Deschamps, J.** (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev Biol* **344**, 7-15.
- Martin-Bermudo, M. D., Martinez, A., Rodriguez, A. und Jimenez, J.** (1991). Distribution and function of the lethal of scute gene product during early neurogenesis in *Drosophila*. *Development* **113**, 445-454.
- Martinez-Arias, A. und Lawrence, P. A.** (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* **313**, 639-642.
- McDonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C. Q. und Mellerick, D. M.** (1998). Dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev* **12**, 3603-3612.
- McGinnis, W. und Krumlauf, R.** (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.
- McQuilton, P., St Pierre, S. E. und Thurmond, J.** (2012). FlyBase 101--the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res* **40**, D706-714.
- Mettler, U., Vogler, G. und Urban, J.** (2006). Timing of identity: spatiotemporal regulation of hunchback in neuroblast lineages of *Drosophila* by Seven-up and Prospero. *Development* **133**, 429-437.
- Meyer, B. I. und Gruss, P.** (1993). Mouse *Cdx-1* expression during gastrulation. *Development* **117**, 191-203.
- Miguel-Aliaga, I. und Thor, S.** (2004). Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Development* **131**, 6093-6105.
- Mlodzik, M., Fjose, A. und Gehring, W. J.** (1985). Isolation of *caudal*, a *Drosophila* homeobox-containing gene with maternal expression, whose transcripts form a concentration gradient at the pre-blastoderm stage. *EMBO J* **4**, 2961-2969.
- Mlodzik, M. und Gehring, W. J.** (1987). Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* **48**, 465-478.
- Mlodzik, M., Gibson, G. und Gehring, W. J.** (1990). Effects of ectopic expression of *caudal* during *Drosophila* development. *Development* **109**, 271-277.
- Monastirioti, M.** (2003). Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **264**, 38-49.
- Morata, G.** (1993). Homeotic genes of *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 606-614.

- Moreno, E. und Morata, G.** (1999). Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior Drosophila segment. *Nature* **400**, 873-877.
- Nassif, C., Daniel, A., Lengyel, J. A. und Hartenstein, V.** (1998). The role of morphogenetic cell death during Drosophila embryonic head development. *Dev Biol* **197**, 170-186.
- Ni, J. Q., Liu, L. P., Binari, R., Hardy, R., Shim, H. S., Cavallaro, A., Booker, M., Pfeiffer, B. D., Markstein, M., Wang, H. et al.** (2009). A Drosophila resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics* **182**, 1089-1100.
- Ni, J. Q., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B., Liu, L. P., Villalta, C., Booker, M., Perkins, L. und Perrimon, N.** (2008). Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in Drosophila melanogaster. *Nat Methods* **5**, 49-51.
- Noordermeer, J. N., Kopczynski, C. C., Fetter, R. D., Bland, K. S., Chen, W. Y. und Goodman, C. S.** (1998). Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in Drosophila. *Neuron* **21**, 991-1001.
- Novotny, T., Eiselt, R. und Urban, J.** (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of NB7-3 in the Drosophila central nervous system. *Development* **129**, 1027-1036.
- Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. und Goodman, C. S.** (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**, 955-968.
- Pearson, J. C., Lemons, D. und McGinnis, W.** (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* **6**, 893-904.
- Peifer, M., Karch, F. und Bender, W.** (1987). The Bithorax Complex - Control of Segmental Identity. *Genes & Development* **1**, 891-898.
- Peterson, C., Carney, G. E., Taylor, B. J. und White, K.** (2002). reaper is required for neuroblast apoptosis during Drosophila development. *Development* **129**, 1467-1476.
- Prokop, A., Bray, S., Harrison, E. und Technau, G. M.** (1998). Homeotic regulation of segment-specific differences in neuroblast numbers and proliferation in the Drosophila central nervous system. *Mech Dev* **74**, 99-110.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of Drosophila melanogaster. *Development* **111**, 79-88.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1994). Early tagma-specific commitment of Drosophila CNS progenitor NB1-1. *Development* **120**, 2567-2578.
- Pultz, M. A., Diederich, R. J., Cribbs, D. L. und Kaufman, T. C.** (1988). The proboscipedia locus of the Antennapedia complex: a molecular and genetic analysis. *Genes Dev* **2**, 901-920.
- Reichert, H. und Bello, B.** (2010). Hox genes and brain development in Drosophila. *Adv Exp Med Biol* **689**, 145-153.
- Rezaval, C., Pavlou, H. J., Dornan, A. J., Chan, Y. B., Kravitz, E. A. und Goodwin, S. F.** (2012). Neural circuitry underlying Drosophila female postmating behavioral responses. *Curr Biol* **22**, 1155-1165.

- Rideout, E. J., Billeter, J.-C. und Goodwin, S. F.** (2007). The sex-determination genes fruitless and doublesex specify a neural substrate required for courtship song. *Current Biology* **17**, 1473-1478.
- Rideout, E. J., Dornan, A. J., Neville, M. C., Eadie, S. und Goodwin, S. F.** (2010). Control of sexual differentiation and behavior by the doublesex gene in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* **13**, 458-466.
- Rivas, M. L., Espinosa-Vazquez, J. M., Sambrani, N., Greig, S., Merabet, S., Graba, Y. und Castelli-Gair Hombria, J.** (2013). Antagonism Versus Cooperativity with TALE Cofactors at the Base of the Functional Diversification of Hox Protein Function. *PLoS Genet* **9**, e1003252.
- Robinett, C. C., Vaughan, A. G., Knapp, J. M. und Baker, B. S.** (2010). Sex and the single cell. II. There is a time and place for sex. *PLoS Biol* **8**, e1000365.
- Robinow, S. und White, K.** (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* **22**, 443-461.
- Rogulja-Ortmann, A., Renner, S. und Technau, G. M.** (2008). Antagonistic roles for Ultrabithorax and Antennapedia in regulating segment-specific apoptosis of differentiated motoneurons in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* **135**, 3435-3445.
- Rogulja-Ortmann, A. und Technau, G. M.** (2008). Multiple roles for Hox genes in segment-specific shaping of CNS lineages. *Fly (Austin)* **2**, 316-319.
- Sanchez-Herrero, E.** (1991). Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development* **111**, 437-449.
- Sanchez-Herrero, E. und Crosby, A.** (1988). The Abdominal-B gene of *Drosophila melanogaster*: overlapping transcripts exhibit two different spatial distributions. *EMBO J* **7**, 2163-2173.
- Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. und Morata, G.** (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* **313**, 108-113.
- Sanders, L. E. und Arbeitman, M. N.** (2008). Doublesex establishes sexual dimorphism in the *Drosophila* central nervous system in an isoform-dependent manner by directing cell number. *Dev Biol* **320**, 378-390.
- Schmid, A., Chiba, A. und Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-4689.
- 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.
- Schütt, C. und Nöthiger, R.** (2000). Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* **127**, 667-677.
- Shen, C. P., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1997). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* **90**, 449-458.
- Siomi, H. und Siomi, M. C.** (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* **457**, 396-404.

- Skeath, J. B.** (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* **21**, 922-931.
- Skeath, J. B. und Carroll, S. B.** (1994). The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J* **8**, 714-721.
- Skeath, J. B. und Thor, S.** (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 8-15.
- Skeath, J. B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S. B. und Doe, C. Q.** (1995). Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by gooseberry-distal. *Nature* **376**, 427-430.
- Sosnowski, B. A., Belote, J. M. und McKeown, M.** (1989). Sex-specific alternative splicing of RNA from the transformer gene results from sequence-dependent splice site blockage. *Cell* **58**, 449-459.
- Steinmann-Zwicky, M., Amrein, H. und Nöthiger, R.** (1990). Genetic control of sex determination in *Drosophila*. *Adv Genet* **27**, 189-237.
- Struhl, G. und White, R. A.** (1985). Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* **43**, 507-519.
- Subramanian, V., Meyer, B. I. und Gruss, P.** (1995). Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* **83**, 641-653.
- Suska, A., Miguel-Aliaga, I. und Thor, S.** (2011). Segment-specific generation of *Drosophila* Capability neuropeptide neurons by multi-faceted Hox cues. *Dev Biol* **353**, 72-80.
- Suzuki, D. T.** (1970). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. *Science* **170**, 695-706.
- Taylor, B. J. und Truman, J. W.** (1992). Commitment of abdominal neuroblasts in *Drosophila* to a male or female fate is dependent on genes of the sex-determining hierarchy. *Development* **114**, 625-642.
- Technau, G. M.** (1984). Fiber number in the mushroom bodies of adult *Drosophila melanogaster* depends on age, sex and experience. *J Neurogenet* **1**, 113-126.
- Technau, G. M., Berger, C. und Urbach, R.** (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn* **235**, 861-869.
- Technau, G. M. und Campos-Ortega, J. A.** (1985). Fate-mapping in wild-type *Drosophila melanogaster*: II. Injections of horseradish peroxidase in cells of the early gastrula stage. *Roux's Arch Dev Biol* **194**, 196-212.
- Thali, M., Müller, M. M., DeLorenzi, M., Matthias, P. und Bienz, M.** (1988). *Drosophila* homoeotic genes encode transcriptional activators similar to mammalian OTF-2. *Nature* **336**, 598-601.
- Thor, S.** (1995). The genetics of brain development: conserved programs in flies and mice. *Neuron* **15**, 975-977.

- Tiong, S., Bone, L. M. und Whittle, J. R.** (1985). Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **200**, 335-342.
- Truman, J. W. und Bate, M.** (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **125**, 145-157.
- Tsuji, T., Hasegawa, E. und Isshiki, T.** (2008). Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors. *Development* **135**, 3859-3869.
- Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. und Technau, G. M.** (1993). A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. *Development* **118**, 765-775.
- Urbach, R., Schnabel, R. und Technau, G. M.** (2003). The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* **130**, 3589-3606.
- Urbach, R. und Technau, G. M.** (2003a). Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**, 3621-3637.
- Urbach, R. und Technau, G. M.** (2003b). Segment polarity and DV patterning gene expression reveals segmental organization of the *Drosophila* brain. *Development* **130**, 3607-3620.
- van den Akker, E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Beck, F., Meyer, B. I. und Deschamps, J.** (2002). Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* **129**, 2181-2193.
- van Nes, J., de Graaff, W., Lebrin, F., Gerhard, M., Beck, F. und Deschamps, J.** (2006). The Cdx4 mutation affects axial development and reveals an essential role of Cdx genes in the ontogenesis of the placental labyrinth in mice. *Development* **133**, 419-428.
- von Hilchen, C. M., Beckervordersandforth, R. M., Rickert, C., Technau, G. M. und Altenhein, B.** (2008). Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **125**, 337-352.
- von Hilchen, C. M., Hein, I., Technau, G. M. und Altenhein, B.** (2010). Netrins guide migration of distinct glial cells in the *Drosophila* embryo. *Development* **137**, 1251-1262.
- von Philipsborn, A. C., Liu, T., Yu, J. Y., Masser, C., Bidaye, S. S. und Dickson, B. J.** (2011). Neuronal control of *Drosophila* courtship song. *Neuron* **69**, 509-522.
- Walldorf, U. und Gehring, W. J.** (1992). Empty spiracles, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO J* **11**, 2247-2259.
- Wang, W. und Yoder, J. H.** (2012). Hox-mediated regulation of doublesex sculpts sex-specific abdomen morphology in *Drosophila*. *Dev. Dynamics* **241**, 1076-1090.
- Weiss, J. B., Von Ohlen, T., Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. und Scott, M. P.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev* **12**, 3591-3602.

- Wharton, K. A., Yedvobnick, B., Finnerty, V. G. und Artavanis-Tsakonas, S.** (1985). opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in *D. melanogaster*. *Cell* **40**, 55-62.
- Wheeler, S. R., Kearney, J. B., Guardiola, A. R. und Crews, S. T.** (2006). Single-cell mapping of neural and glial gene expression in the developing *Drosophila* CNS midline cells. *Dev Biol* **294**, 509-524.
- 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**, 677-683.
- White, R. A. und Wilcox, M.** (1984). Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**, 163-171.
- Williams, T. M., Selegue, J. E., Werner, T., Gompel, N., Kopp, A. und Carroll, S. B.** (2008). The regulation and evolution of a genetic switch controlling sexually dimorphic traits in *Drosophila*. *Cell* **134**, 610-623.
- Xie, B., Charlton-Perkins, M., McDonald, E., Gebelein, B. und Cook, T.** (2007). Senseless functions as a molecular switch for color photoreceptor differentiation in *Drosophila*. *Development* **134**, 4243-4253.
- Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A. und Montell, C.** (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev* **8**, 981-994.
- Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., Feldman, R. M., Clem, R. J., Müller, H. A. und Hay, B. A.** (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol* **4**, 416-424.
- Young, T., Rowland, J. E., van de Ven, C., Bialecka, M., Novoa, A., Carapuco, M., van Nes, J., de Graaff, W., Duluc, I., Freund, J. N. et al.** (2009). Cdx and Hox genes differentially regulate posterior axial growth in mammalian embryos. *Dev Cell* **17**, 516-526.
- Zavortink, M. und Sakonju, S.** (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev* **3**, 1969-1981.
- Zhai, Z., Fuchs, A. L. und Lohmann, I.** (2009). Cellular analysis of newly identified Hox downstream genes in *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* **89**, 273-278.
- Zhang, Y., Ungar, A., Fresquez, C. und Holmgren, R.** (1994). Ectopic expression of either the *Drosophila* gooseberry-distal or proximal gene causes alterations of cell fate in the epidermis and central nervous system. *Development* **120**, 1151-1161.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Neuroblastenkarte für den Thorax und das anteriore Abdomen	3
Abb. 1-2: Die Entstehung des embryonalen Nervensystems von <i>Drosophila</i>	4
Abb. 1-3: Tagmaspezifische Abweichungen in den Zellstammbäumen seriell homologer Neuroblasten	5
Abb. 1-4: Hierarchie der Geschlechtsdetermination	7
Abb. 1-5: Die <i>Hox</i> -Gene des <i>Antennapedia</i> - und <i>Bithorax</i> -Komplex.....	9
Abb. 2-1: Das Gal4/UAS-System.....	20
Abb. 2-2: Das G-Trace-System	21
Abb. 2-3: Das Flybow-System	22
Abb. 3-1: Verteilung und Anzahl an Neuroblasten in terminalen abdominalen Hemisegmenten.....	36
Abb. 3-2: Expression von Segmentpolaritätsgenen in Neuroblasten	38
Abb. 3-3: Expression von Paarregelgenen in Neuroblasten	40
Abb. 3-4: Expression von Lückengenen in Neuroblasten	41
Abb. 3-5: Expression von dorso/ventralen Musterbildungsgenen in Neuroblasten	43
Abb. 3-6: Weitere Marker, die in Neuroblasten exprimiert werden.....	44
Abb. 3-7: Existenz charakteristischer Gliazellen in den terminalen abdominalen Neuromeren.....	46
Abb. 3-8: Existenz charakteristischer Nachkommenzellen in den terminalen abdominalen Neuromeren.....	48
Abb. 3-9: Eine Neuroblastenkarte für die terminale Abdominalregion	50
Abb. 3-10: An- und Abwesenheit seriell homologer Neuroblasten und ihre Expression von A/P- und D/V-Mustergenen in den terminalen abdominalen Segmenten.....	51
Abb. 3-11: Die embryonale Identität der geschlechtsspezifischen Neuroblasten	53
Abb. 3-12: Charakterisierung der <i>doublesex</i> -exprimierenden Mittellinienzellen im Embryo	54
Abb. 3-13: Beschreibung des <i>doublesex</i> -Expressionsmusters und der geschlechtsspezifischen Neuroblasten in der L3-Wanderlarve und der Weißen Puppe	56
Abb. 3-14: Die Herkunft der <i>doublesex</i> -Gal4-exprimierenden Zellen in der L3-Wanderlarve und der weißen Puppe	57
Abb. 3-15: Charakterisierung der männchenspezifischen Zellstammbäume in der L3-Wanderlarve durch Flybow-Analyse.....	58

Abb. 3-16: <i>eagle</i> -Gal4-Expression im terminalen abdominalen Bereich der L3-Wanderlarve	60
Abb. 3-17: Molekulare Marker für die lateralen männchenspezifischen Zellcluster in der L3-Wanderlarve	61
Abb. 3-18: Molekulare Marker, die in den <i>doublesex</i> -Gal4-positiven Mittellinienzellen der männlichen L3-Wanderlarve exprimiert werden	62
Abb. 3-19: <i>doublesex</i> -Gal4-Expression im ventralen Nervensystem von späten L2- und frühen L3-Larven	63
Abb. 3-20: Die geschlechtsspezifischen Neuroblasten in Weibchen werden durch Apoptose entfernt	64
Abb. 3-21: Die Rolle von <i>doublesex</i> bei der Spezifizierung der geschlechtsspezifischen Neuroblasten	67
Abb. 3-22: Anzahl an Neuroblasten in den terminalen abdominalen Hemiparasegmenten unterschiedlicher Mutanten.....	68
Abb. 3-23: Abweichungen im Deadpan- und Eagle-Expressionsmuster terminaler abdominaler Parasegmente von <i>Abdominal-B^{D18}</i> -Mutanten und <i>Df(3L)H99</i> -Embryonen im Vergleich zum Wildtyp.....	70
Abb. 3-24: <i>Abdominal-B</i> unterdrückt in Parasegment 15 die Bildung von Neuroblast 7-3 in dosisabhängiger Weise.....	71
Abb. 3-25: Ektopische Zellcluster in <i>Abdominal-B</i> -Mutanten exprimieren keine Gene des <i>Bithorax-Komplex</i>	73
Abb. 3-26: Die Expression verschiedener <i>Abdominal-B</i> -Elemente im Wildtyp.....	75
Abb. 3-27: Der Verlust von <i>Abdominal-B.r</i> ist für den Eagle-Phänotyp verantwortlich	77
Abb. 3-28: Nur ektopisches <i>Abdominal-B.m</i> , aber nicht <i>Abdominal-B.r</i> , kann die Bildung des Neuroblasten 7-3 in anterioren Parasegmenten unterdrücken.....	79
Abb. 3-29: <i>caudal</i> -Mutanten zeigen einen ektopischen Neuroblast 7-3-Zellstammbaum in Parasegment 15	81
Abb. 3-30: Untersuchung der Interaktion von <i>Abdominal-B</i> und <i>caudal</i> durch Mutantenanalyse	82
Abb. 3-31: <i>Abdominal-B</i> und <i>caudal</i> weisen keine gegenseitige Regulation im ventralen Nervensystem auf.....	83
Abb. 3-32: Ektopisch exprimiertes <i>caudal</i> kann <i>Abdominal-A</i> und <i>Ultrabithorax</i> inhibieren	84
Abb. 3-33: <i>Abdominal-B.r</i> benötigt <i>caudal</i> , um terminales Schicksal zu vermitteln.....	86
Abb. 3-34: Frequenz der Neuroblast 7-3-Bildung.....	88

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Verwendete Geräte	17
Tab. 2-2: Verwendete Software.....	17
Tab. 2-3: Verwendete Fliegenstämme.....	24
Tab. 2-4: Verwendete Primer	26
Tab. 2-5: Verwendete Primärantikörper.....	29
Tab. 2-6: Verwendete Sekundärantikörper.....	32
Tab. 2-7: Verwendete RNA-Sonden	32

7.3 Abkürzungsverzeichnis

7.3.1 Allgemeine Abkürzungen

Dieses Verzeichnis enthält keine

- Abkürzungen aus dem Periodensystem der Elemente
- allgemeinen Abkürzungen, die im Duden zu finden sind
- Abkürzungen für Balancerchromosomen, deren dominante Marker und Reportergene

A1-A11	abdominale Segmente 1-11
<i>Abd-B.m</i>	morphogenetische Isoform von <i>Abdominal-B</i>
<i>Abd-B.r</i>	regulatorische Isoform von <i>Abdominal-B</i>
aCC	„anterior corner cell“
A. dest.	destilliertes Wasser
<i>ANT-C</i>	„ <i>Antennapedia-Complex</i> “
A/P	anterior/posterior
AP	Alkalische Phosphatase
aPS	anteriores Parasegment
<i>AS-C</i>	„ <i>Achaete-Scute-Complex</i> “
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
<i>BX-C</i>	„ <i>Bithorax-Complex</i> “
C1-C3	gnathale Segmente 1-3
CD8::GFP	Fusionsprotein aus dem Oberflächenprotein CD8 und GFP
cDNA(s)	„complementary DNA(s)“
CDS(s)	„coding sequence(s)“ (proteinkodierende Sequenz(en))
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>Df</i>	Defizienz
DIG	Digoxygenin
DNA(s)	Desoxyribonukleinsäure(n)

DNase(n)	Desoxyribonuklease(n)
dNTP(s)	Desoxynukleosidtriphosphat(e)
DSHB	„Developmental Studies Hybridoma Bank“
<i>dsx[F]</i>	weibliche Isoform von <i>doublesex</i>
<i>dsx[M]</i>	männliche Isoform von <i>doublesex</i>
D/V	dorso/ventral
EL	Even skipped-positiv, lateral
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	und weitere
FITC	Fluorescein
FRT(s)	„flipase recombination target(s)“
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMZ(s)	Gangliennutterzelle(n)
G-Trace	„Gal4-technique for real-time and clonal expression“
h	„hour“ (Stunde)
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
HS(s)	Hemisegment(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
L1e	frühes L1-Larvenstadium
L1l	spätes L1-Larvenstadium
L1m	mittleres L1-Larvenstadium
LGB	Longitudinaler Glioblast
M	Molar
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
ML	Mittellinie
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
MNB	medianer Neuroblast
MP1	„midline precursor 1“
mRNA(s)	„messenger RNA(s)“
n	Anzahl
NB(s)	Neuroblast(en)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ncRNA(s)	„noncoding RNA(s)“
NE	Neuroektoderm
n.s.	nicht signifikant
PBS	1x „Phosphate Buffered Saline“
PBT	PBS + Triton X-100
PBTween _{DEPC}	PBS + Tween 20 in A. dest. _{DEPC}
pCC	„posterior corner cell“
PCD	„programmed cell death“ (programmierter Zelltod)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
pNR	procephale neurogene Region
pPS	posteriores Parasegment
PS(s)	Parasegment(e)
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNAi	RNA-Interferenz
RNA(s)	Ribonukleinsäure(n)

RNAse(n)	Ribonuklease(n)
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S1-S5	Segregationswelle 1-5
sec	Sekunde
St	Embryonalstadium
St12e	frühes Embryonalstadium 12
St12l	spätes Embryonalstadium 12
St12m	Mitte des 12. Embryonalstadiums
T1-T3	thorakale Segmente 1-3
UAS	„upstream activating sequences“
UTR(s)	untranslatierte(r) Bereich(e)
vNR	ventrale neurogene Region
vNS	ventrales Nervensystem
Vol.	Volumen
VUM	„ventral unpaired median“
WP	weiße Puppe
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

7.3.2 Genabkürzungen

<i>abd-A</i>	<i>abdominal-A</i>
<i>Abd-B</i>	<i>Abdominal-B</i>
<i>Beta-Gal</i>	<i>Beta-Galaktosidase</i>
<i>cad</i>	<i>caudal</i>
<i>cas</i>	<i>castor</i>
<i>CycE</i>	<i>Cyclin E</i>
<i>Dfd</i>	<i>Deformed</i>
<i>dpn</i>	<i>deadpan</i>
<i>dsx</i>	<i>doublesex</i>
<i>eg</i>	<i>eagle</i>
<i>elav</i>	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
<i>ems</i>	<i>empty spiracles</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>eve</i>	<i>even skipped</i>
<i>ey</i>	<i>eyeless</i>
<i>fru</i>	<i>fruitless</i>
<i>gsb-d</i>	<i>gooseberry distal</i>
<i>gsb-p</i>	<i>gooseberry proximal</i>
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
<i>hkb</i>	<i>huckebein</i>
<i>ind</i>	<i>intermediate neuroblasts defective</i>
<i>insc</i>	<i>inscuteable</i>
<i>lbe</i>	<i>ladybird early</i>
<i>l(1)sc</i>	<i>lethal of scute</i>
<i>mira</i>	<i>miranda</i>
<i>mirr</i>	<i>mirror</i>
<i>msh</i>	<i>muscle segment homeobox</i>
<i>naz</i>	<i>nazgul</i>
<i>otd</i>	<i>orthodenticle</i>
<i>Poxn</i>	<i>Pox neuro</i>
<i>repo</i>	<i>reversed polarity</i>
<i>run</i>	<i>runt</i>
<i>sal</i>	<i>spalt</i>
<i>sca</i>	<i>scabrous</i>
<i>svp</i>	<i>seven up</i>
<i>Sxl</i>	<i>Sex lethal</i>
<i>tra</i>	<i>transformer</i>
<i>tra2</i>	<i>transformer2</i>
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
<i>unpg</i>	<i>unplugged</i>
<i>vnd</i>	<i>ventral nervous system defective</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>

Im gesamten Text werden Genbezeichnungen, Allele und deren RNA kursiv gehalten. Handelt es sich um ein dominant beschriebenes Allel, wird gemäß Flybase (McQuilton et al., 2012) ein großer Anfangsbuchstabe verwendet und bei einem rezessiv beschriebenen Allel wird ein kleiner Anfangsbuchstabe benutzt. Bei der Beschreibung von Proteinen ist der Anfangsbuchstabe grundsätzlich groß und es wird keine kursive Schreibweise verwendet.

7.4 Curriculum Vitae

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Absatz 3d der Promotionsordnung

1. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.
2. Ich habe und hatte die als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
3. Ich hatte weder die als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den

Oliver Birkholz

7.6 Danke