



# Funktionelle Analyse der Gliazellwanderung im *Drosophila* Embryo

Dissertation  
Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)  
im Fachbereich Biologie

Eingereicht an der Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz  
von Diplombiologe  
Christian von Hilchen

geboren am 29.11.1980  
in Mainz

Mainz, Januar 2010

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Datum der mündlichen Prüfung: 30. März 2010

## **Inhaltsverzeichnis:**

Abbildungsverzeichnis: .....	V
Tabellenverzeichnis: .....	VII
Abkürzungsverzeichnis: .....	VIII
<b>1 Einleitung: .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die embryonale Neurogenese von <i>Drosophila</i> .....	2
1.2 Funktion von Gliazellen .....	7
1.3 Klassifizierung der Gliazellen in <i>Drosophila</i> .....	9
1.4 Migration der Peripheren Gliazellen .....	11
1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit .....	15
<b>2 Material und Methoden: .....</b>	<b>17</b>
2.1 Fliegenzucht .....	17
2.2 Eiablagen .....	17
2.3 Larvenhaltung .....	18
2.4 Fliegenstämme .....	19
2.5 Genetische Kreuzungen .....	20
2.5.1 Balancieren letaler Mutationen .....	21
2.5.2 Mutagenese-Screen und Komplementationskreuzungen .....	22
2.6 Enhancer-Trap-Stämme und das Gal4/UAS-System .....	23
2.6.1 Genetische „Rescue-Experimente“ unter Einsatz des Gal4/UAS- Systems .....	25
2.7 Immunohistochemie .....	26
2.7.1 Verwendete Antikörper .....	26
2.7.2 Chemische Dechorionisierung der Embryonen .....	26
2.7.3 Fixierung und Devitellinisierung der Embryonen .....	27
2.7.4 Präparation und Fixierung von L3-Wanderlarven .....	27
2.7.5 Inkubation des primären Antikörpers .....	28
2.7.6 Inkubation des sekundären Antikörpers .....	28
2.7.7 Fluoreszenzfärbungen .....	29
2.7.8 Sichtbare Färbung mit Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpern .....	29
2.7.9 Sichtbare Färbungen durch alkalische Phosphatase .....	30
2.7.10 Phalloidin-Färbungen von Embryonen .....	31
2.7.11 BrdU-Färbungen in L3-Wanderlarven .....	32

2.8	<i>In-situ</i> -Hybridisierungen (ISH) .....	33
2.8.1	Verwendete mRNA-Sonden .....	33
2.8.2	Hybridisierung.....	34
2.8.3	Signaldetektion .....	34
2.9	Filet-Präparation von Embryonen .....	35
2.10	Dokumentation der Färbungen .....	36
2.11	<i>In vivo</i> 4D-Aufnahmen.....	36
2.11.1	Vorbereitung der Embryonen für <i>in vivo</i> 4D-Aufnahmen .....	36
2.11.2	Verwendeter Versuchsaufbau für 4D-Aufnahmen .....	39
2.11.3	Präparation und Antikörperfärbungen von Embryonen im Anschluss an 4D-Aufnahmen.....	40
2.11.4	Auswertung und Bearbeitung der 4D-Aufnahmen .....	40
2.11.5	<i>In vivo</i> Ablation via UV- und Argon-Ionen-Laserbestrahlung .....	41
2.12	Single-Embryo-PCR und Sequenzierung der kodierenden Region des SCAR Gens in Mz97 und SCAR <sup>169</sup> .....	42
2.12.1	Isolierung der DNA aus Embryonen .....	42
2.12.2	Single-Embryo-PCR und Sequenzierung .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse:</b> .....	<b>43</b>

**Teil A: Wildtypische Charakterisierung der Peripheren Gliazellen im  
Embryo und am Ende der Larvalentwicklung**

3.1	Charakterisierung der ePGs auf Einzelzellebene und detaillierte Beschreibung ihrer wildtypischen Migration im Verlauf der Embryogenese.....	44
3.1.1	Prinzipielle Anordnung der ePGs am Ende der Embryogenese.....	44
3.1.2	Einführung einer einheitlichen Nomenklatur für alle ePGs .....	47
3.1.3	Einzelzellidentität der ePGs.....	48
3.1.4	Abstammung der einzelnen ePGs .....	56
3.1.5	Stereotype Positionierung der ePGs .....	59
3.1.6	<i>In vivo</i> Analyse der ePG Migration .....	61
3.2	Untersuchung der Zell-Zell-Interaktionen im Verlauf der Migration durch Ablationsexperimente .....	72
3.2.1	<i>In vivo</i> Ablation durch Laserbestrahlung .....	72

3.2.2	<i>In vivo</i> Ablation durch Expression proapoptotischer Gene .....	75
3.3	Periphere Glia (PGs) im späten Larvenstadium von <i>Drosophila</i> .....	79
3.3.1	Muster der PGs am Ende der Larvalentwicklung .....	79
3.3.2	Entstehung der zusätzlichen PGs während der Larvalentwicklung ....	82

**Teil B: Mutantanalyse zur Identifizierung von Migrationsfaktoren**

3.4	In <i>castor</i> - und <i>salm</i> -Mutanten weisen ePGs Migrationsdefekte auf .....	85
3.5	Analyse von EMS-Mutanten .....	90
3.5.1	Die Cluster in der <i>SCAR</i> <sup>169</sup> -Mutante bestehen aus über-dimensionierten Zellkernen von ePGs .....	91
3.6	Die Migration distinkter Gliazellen im <i>Drosophila</i> Embryo wird durch Netrine in Interaktion mit den Rezeptoren Uncoordinated5 und Frazzled geleitet ....	97
3.6.1	Netrine leiten die Migration von Gliazellen via Frazzled oder Uncoordinated5 .....	99
3.6.2	Der Cluster-Phänotyp betrifft spezifisch die LGs .....	103
3.6.3	Die Wegweisung des LGB erfolgt zellautonom mittels Fra .....	108
3.6.4	Die LG Wanderung wird nicht durch von der ventralen ML segregiertes Netrin geleitet.....	111
3.6.5	In <i>Unc5</i> <sup>8</sup> -Mutanten weisen bestimmte ePGs (ePG6 und ePG8) einen Wanderungsdefekt auf.....	114
3.6.6	Die Navigation der ePG6 und ePG8 mittels Unc5 verläuft zellautonom.....	117
3.6.7	Von Zellen der ventralen ML segregiertes NetB dirigiert die Migration der ePG6 und ePG8 .....	119
<b>4</b>	<b>Diskussion:</b> .....	<b>123</b>
4.1	ePGs besitzen individuelle Identitäten und ein prädeterminiertes Wanderungsverhalten.....	123
4.2	Distinkte ePGs nutzen identische wegweisende Mechanismen wie Neurone.....	126
4.3	Wird die Wanderung der ePGs durch Pionier-Gliazellen geleitet? .....	127
4.4	Funktion der (e)PGs im Larvenstadium .....	129
4.5	Die wildtypische Wanderung der LGs wird durch den Net-Fra-Signalweg geleitet.....	130

4.6	Für die Generierung des vollständigen LGB-Zellklons ist keine Interaktion mit longitudinalen Axonen erforderlich.....	132
4.7	Selektivität des Netrin-vermittelten Signalweges.....	135
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick: .....</b>	<b>138</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis:.....</b>	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>Anhang: .....</b>	<b>152</b>
7.1	Informationen zu den mitgelieferten Filmen.....	152
7.2	Liste der verwendeten Defizienzen-Stämme und Verlauf der Kartierung der EMS-Stämmen 223 und 1541 .....	156
7.3	Sequenzierung der kodierende Region des <i>SCAR</i> Gens.....	158
7.4	Verwendete Puffer und Lösungen .....	159
7.5	Verwendete Software .....	160

## Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1-1: Neurogenese von <i>Drosophila</i> .....	4
Abb. 1-2: Segregationswellen und NB-Karte .....	5
Abb. 1-3: Spezifizierung von Neuronen bzw. Gliazellen .....	7
Abb. 1-4: Übersicht des Netrin-vermittelten Signalweges .....	8
Abb. 1-5: Klassifizierung der Gliazellen .....	11
Abb. 1-6: Schematische Darstellung der frühen ePG Wanderung .....	13
Abb. 1-7: Schematische Darstellung des PNS am Ende der Embryogenese .....	14
Abb. 2-1: Ektopische Genexpression in <i>Drosophila</i> durch das Gal4/UAS-System .....	25
Abb. 2-2: Schritte zur Vorbereitung der Embryonen für 4D-Aufnahmen .....	38
Abb. 2-3: Verwendeter Versuchsaufbau für die 4D-Aufnahmen .....	39
Abb. 3-1: Anordnung der ePGs entlang der peripheren Nerven am Ende der Embryogenese .....	46
Abb. 3-2: Die einzelnen ePGs besitzen individuelle Zellidentitäten .....	50
Abb. 3-3: Identifizierung der ePGs auf Einzelzellebene mittels molekularer Marker .....	55
Abb. 3-4: Klonale Herkunft der einzelnen ePGs .....	58
Abb. 3-5: Illustration der Migration der ePGs <i>in vivo</i> und in fixierten Filetpräparaten .....	66
Abb. 3-6: Analyse der Zelldimensionen einzelner ePGs .....	69
Abb. 3-7: <i>In vivo</i> Ablation der ePG9 .....	74
Abb. 3-8: <i>In vivo</i> Ablation von Gliazellen durch Gal4/UAS induzierte Expression des proapoptotischen Gens <i>hid</i> .....	77
Abb.3-9: Anordnung der PGs entlang der abdominalen Nerven in L3- Wanderlarven .....	80
Abb. 3-10: Während der Larvalentwicklung sind sämtliche PGs mitotisch aktiv .....	83
Abb. 3-11: In <i>cas<sup>1C2</sup></i> -Mutanten fehlen die ePG6 und ePG8 in der Peripherie .....	87
Abb. 3-12: <i>salm<sup>445</sup></i> -Mutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp .....	89
Abb. 3-13: Phänotyp homozygoter <i>SCAR<sup>169</sup></i> -Embryonen .....	92
Abb. 3-14: In <i>SCAR<sup>169</sup></i> -Mutanten weisen ePGs übergroße Zellkerne auf .....	93
Abb. 3-15: Die ePGs in <i>SCAR<sup>169</sup></i> -Mutanten zeigen keine mitotische Aktivität .....	95
Abb. 3-16: Vergleich neuraler Zellklone von Mz97 und <i>SCAR<sup>169</sup></i> .....	96

Abb. 3-17: <i>NetAB</i> <sup>Δ</sup> -, <i>Unc5</i> <sup>8</sup> - und <i>fra</i> <sup>3</sup> / <i>fra</i> <sup>4</sup> -Mutanten zeigen unterschiedliche gliale Phänotypen .....	102
Abb.3-18: In <i>NetAB</i> <sup>Δ</sup> -Mutanten sind die LGs mispositioniert.....	105
Abb. 3-19: Nicht immer ist der vollständige LGB-Zellklon ektopisch positioniert .....	107
Abb. 3-20: Fra leitet die Wanderung der LGs zellautonom .....	109
Abb. 3-21: In <i>sim</i> <sup>2</sup> -Mutanten sind die LGs nicht ektopisch in der Peripherie lokalisiert .....	112
Abb. 3-22: Netrin wird in zahlreichen medial zum LGB liegenden Zellen exprimiert.....	113
Abb. 3-23: Alle vom ZNS auswandernden ePGs exprimieren zeitweise <i>Unc5</i> , in <i>Unc5</i> <sup>8</sup> -Mutanten ist jedoch lediglich die Migration distinkter ePGs beeinträchtigt.....	116
Abb. 3-24: „Rescue-Experimente“ belegen die zellautonome Funktion von <i>Unc5</i> für die Migration in der ePG6 und ePG8 .....	118
Abb. 3-25: Von ML-Zellen segregiertes NetB leitet die Wanderung der ePGs .....	120
Abb. 3-26: Modell der Netrin-vermittelten Wegleitung der LGs und ePGs.....	121
Abb. 4-1: Der Verlust der LGs resultiert in axonalen Defekten der Konnektive .....	134



## **Tabellenverzeichnis:**

Tab. 2-1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme .....	19
Tab. 2-2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper .....	26
Tab. 2-3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten mRNA-Sonden .....	33
Tab. 3-1: Neue konsistente Nomenklatur aller embryonalen PGs .....	48
Tab. 3-2: Liste aller analysierten Marker zur Identifizierung der einzelnen ePGs .....	54
Tab. 3-3: Statistische Auswertung der Positionierung der individuellen ePGs .....	60
Tab. 3-4: Getestete Markerlinien in L3-Wanderlarven .....	81
Tab. 3-5: Hinsichtlich eines ePG-Phänotyps analysierte Mutanten .....	97
Tab. 3-6: Liste der durchgeführten „Rescue-Experimente“ in <i>frazzled</i> - und <i>Netrin</i> - Mutanten mit dem Ziel, eine Mispositionierung der LGs zu verhindern ...	110
Tab. 7-1: Liste der Defizienz-Stämme, die für Komplementationskreuzungen mit EMS223 verwendet wurden .....	157
Tab. 7-2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software .....	160

**Abkürzungsverzeichnis:**

A1-A8	abdominale Segmente A1-A8
Abb.	Abbildung
aCC	„anterior corner cell“
aK	anteriore Kommissur
A/P	anterior-posterior
AP-Färbung	alkalische Phosphatase-Färbung
Arp2/3	„Actin related protein 2/3“
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
C1-C3	gnathale Segmente 1-3
ca.	circa
CBG	„Cell Body Glia“ (Zellkörperglia)
CG	„Channel Glia“ (Kanal Glia)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dbd	dorsales bipolardendritisches Neuron
dch	dorsales Chordotonalorgan
dest.	destilliert
DIG	Digoxygenin-markiert
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanideperchlorat
dIPG	dorsolaterale Periphere Glia
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DLN	Dorsaler Longitudinaler Nerv
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
EMS	Ethylmethansulfonat
ePG1-12	embryonale Periphere Glia 1-12
et al.	und weitere
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
Fra	Frazzled
Gal	Galaktosidase
GFP	Grünfluoreszierendes-Protein

GMZ	Ganglienmutterzelle
h	Stunde
HRP	„Horse Redish Peroxidase“ (Merrettichperoxidase)
HS	Hemisegment
ISH	<i>in-situ</i> -Hybridisierung
ISN	Intersegmentalnerv
Kon	Konnektiv
Ich	laterales Chordotonalorgan
LG	Longitudinale Glia
LGB	Longitudinaler Glioblast
mg	Milligramm
MG	„Midline Glia“ (Mittellinienglia)
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	Molar
M-ISNG	Mediale Intersegmentale Nervenwurzel Glia
ML	Mittellinie
mPG	mediale Periphäre Glia
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NB	Neuroblast
NE	Neuroektodermzelle, neuroektodermale Zelle
nGFP	nukleares Grünfluoreszierendes-Protein
NS	Nervensystem
NRG	„Nerve Root Glia“ (Nervenwurzel Glia)
Oe	Oenozyten
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PG	„Peripheral Glia“ (Periphäre Glia)
pK	posteriore Kommissur
pNR	procephale neurogene Region
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
S1-S5	Segregationswelle 1-5
sec	Sekunde
SN(c)	Segmentalnerv (c)
SOP	„Sensory Organ Precursor cell“ (sensorische Vorläuferzelle)
SPG	„Subperineurial Glia“ (Subperineuriale Gliazellen)
St.	Stadium
Std.	Stunde
T1-T3	thorakale Segmente 1-3
Tab.	Tabelle
TN	Transversalnerv
UAS	„Upstream Activating Sequenz“
üN	über Nacht
Unc5	Uncoordinated5
v und v`	ventrales und ventrales´ Cluster sensorischer Neurone
vNR	ventrale neurogene Region
vPG	ventrale Periphere Glia
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## **1 Einleitung:**

Im Verlauf der Evolution der Eumetazoa entwickelte sich das Nervensystem (NS) zu dem komplexesten Organsystem, bestehend aus einer enormen Anzahl von Zellen (das menschliche Gehirn besteht aus etwa  $10^{10}$ - $10^{12}$  Zellen), die ein hoch organisiertes Netzwerk formen. In höheren Organismen unterscheidet man prinzipiell zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und dem peripheren Nervensystem (PNS). Das ZNS setzt sich aus Gehirn und dorsal gelegenem Rückenmark (Chordatiere) bzw. ventral gelegenem Bauchmark (Protostomia) zusammen. Die außerhalb des Gehirns und Rücken- bzw. Bauchmarks vorliegenden Anteile des NS bilden in ihrer Gesamtheit das PNS. Demzufolge basiert die Aufteilung in ZNS und PNS im Grunde auf einer rein topografischen Abgrenzung, denn funktionell kooperieren beide Systeme weitestgehend miteinander. So integriert das ZNS als neurales Kontrollzentrum den Informationseingang der afferenten (d.h. vom PNS ins ZNS projizierenden) Neurone und koordiniert entsprechend die Aktivität von Effektoren (Muskeln, Drüsen, Pigmentzellen) über efferente (d.h. vom ZNS ins PNS projizierende) Nervenfasern.

Neben reizleitenden Neuronen, die lange Zeit im Mittelpunkt der neurobiologischen Forschung standen, ist noch ein weiterer Zelltyp am Aufbau des NS beteiligt. Hierbei handelt es sich um die sogenannten Gliazellen, die sowohl für die Entwicklung als auch für die Funktionalität des NS von entscheidender Bedeutung sind. Dies spiegelt sich unter anderem darin wider, dass sich ihr Anteil mit zunehmender Komplexität des NS erhöht. Während Gliazellen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (im Folgenden als *Drosophila* bezeichnet) lediglich 10% der Zellen des NS ausmachen, kommen sie im Menschen bereits zehnmal häufiger vor als Neurone (Kandel et al. 2000). Somit ist es für das Verständnis des NS unerlässlich, neben der Rolle der Neurone auch die mannigfachen Funktionen der Gliazellen zu analysieren.

Über die Entwicklung und Funktion des NS im Allgemeinen wurde vieles anhand des Modellorganismus *Drosophila* erforscht und aufgeklärt. Grundsätzlich bewährt hat sich die Verwendung von Modellorganismen in der Biologie, da sich herausstellte, dass sowohl grundlegende Mechanismen der Entwicklung als auch die Funktionen vieler Gene evolutionär konserviert sind (siehe Übersichtsartikel Arendt und Nubler-Jung, 1999). *Drosophila* wird seit mehr als 100 Jahren als Versuchstier verwendet. Daher existiert bereits eine präzise Beschreibung der Morphologie und Entwicklung

und es sind zahlreiche wirkungsvolle experimentelle, genetische, zell- und molekularbiologische Methoden etabliert. Weitere Vorteile bieten die kurze Generationszeit und das vollständig sequenzierte (Adams et al., 2000), lediglich aus vier Chromosomenpaaren bestehende Genom der Fruchtfliege.

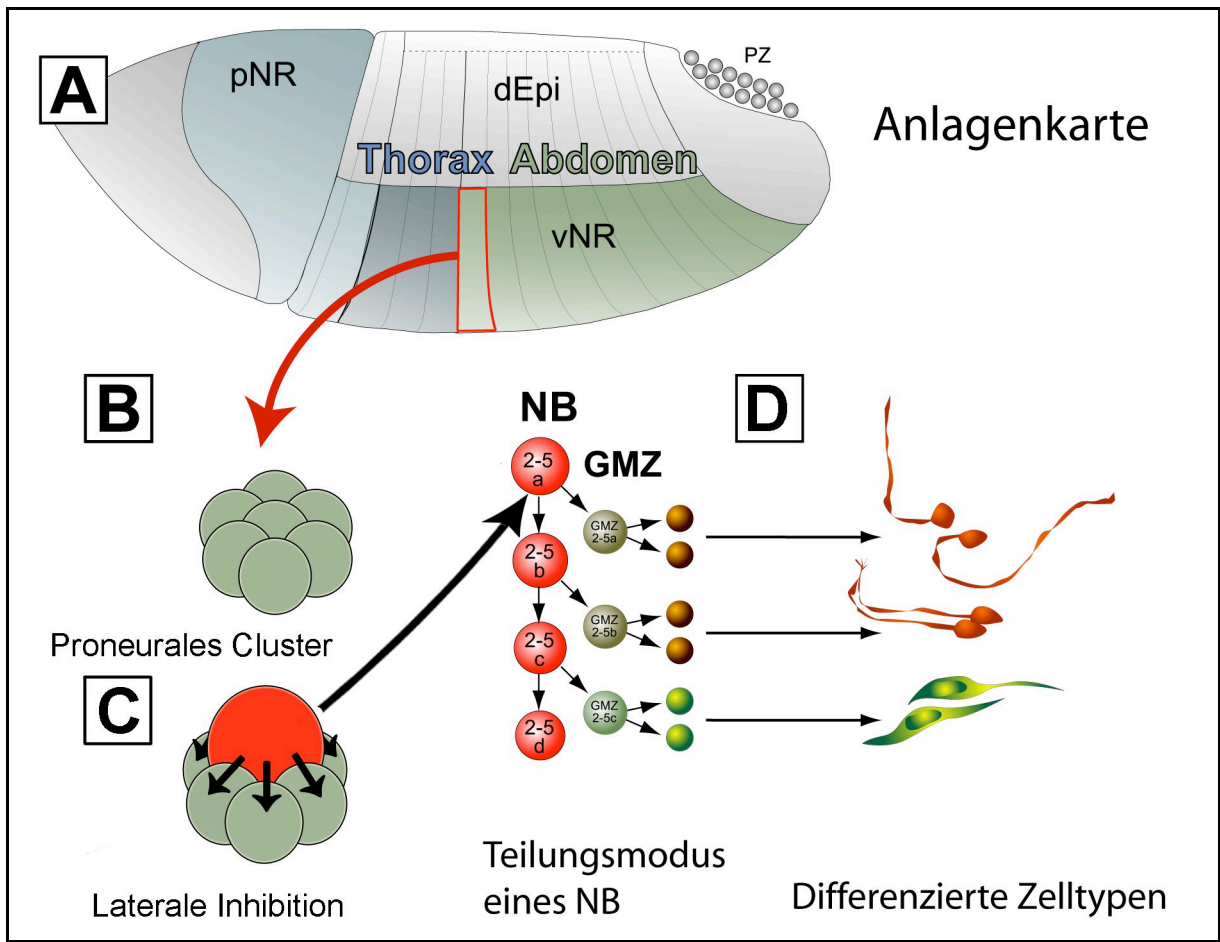
Speziell für die Untersuchung der Gliogenese und die Funktionsanalyse der Gliazellen wird *Drosophila* nun seit mehr als drei Jahrzehnten eingesetzt. Seither konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die an der Determinierung und Spezifizierung der Gliazellen beteiligt sind. Bislang ist aber nur wenig über Faktoren und Mechanismen bekannt, durch welche die zum Teil über weite Strecken verlaufende Migration von Gliazellen kontrolliert wird. Einen Beitrag zu dieser Fragestellung liefern die Ergebnisse dieser Arbeit.

### 1.1 Die embryonale Neurogenese von *Drosophila*

Die Bereiche aus denen sich das ZNS von *Drosophila* entwickelt, können bereits im frühen Gastrula-Stadium anhand einer Anlagenkarte aufgezeigt werden (Abb. 1-1 A). Das Gehirn geht aus der procephalen neurogenen Region (pNR) und das ventral verlaufende Bauchmark aus der ventralen neurogenen Region (vNR) des Neuroektoderms hervor (zusammengefasst in Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Da die Entwicklung des Gehirns für diese Arbeit nicht relevant ist, wird im Folgenden lediglich die Neurogenese des Bauchmarks beschrieben.

An der Bildung des Bauchmarks sind neben Zellen des Neuroektoderms auch Zellen der ventralen Mittellinie (ML) beteiligt, die mesektodermalen Ursprungs sind (zusammengefasst in Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Letztgenannte werden bereits vor der Gastrulation durch die Expression des Schaltermens *single-minded* (*sim*) determiniert (Nambu et al., 1991). Die aus den einzelnen Mittellinienvorläuferzellen hervorgehenden Zellstammbäume sind vollständig beschrieben (Bossing und Technau, 1994). An dieser Stelle sei lediglich erwähnt, dass sich unter ihnen auch eine bis zwei gliale Vorläuferzellen finden, die letztendlich drei bis vier Gliazellen pro Segment hervorbringen (Klämbt et al., 1991; Wheeler et al., 2006). Ansonsten wird im weiteren Verlauf dieses Abschnitts aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht mehr auf die mesektodermalen Abkömmlinge der Mittellinienzellen eingegangen.

Die anfangs noch äquivalenten Zellen der vNR des Neuroektoderms können sowohl neurale als auch epidermale Zellen generieren. Die Entscheidung über das jeweilige Entwicklungsschicksal wird durch die Expression von Genen beeinflusst, die als proneurale (Romani et al., 1987; Campuzano und Modolell, 1992) bzw. neurogene Gene (Bourouis et al., 1989; Lehmann et al., 1981) bezeichnet werden. Der erste Schritt hin zur neuronalen Entwicklung erfolgt über die Expression der proneuralen Gene des *achaete-scute*-Komplexes in Gruppen von 6-8 Neuroektodermzellen, den sogenannten proneuralen Clustern (Abb. 1-1 B). Die spezifische Aktivität der proneuralen Gene wird ihrerseits durch die kombinatorische Expression verschiedener früher Musterbildungsgene reguliert. Innerhalb der proneuralen Cluster wird anschließend durch Zell-Zell-Interaktionen eine Zelle zur neuronalen Vorläuferzelle, dem Neuroblasten (NB), determiniert, wohingegen die restlichen Zellen des Clusters das Schicksal von Epidermoblasten erlangen (Abb. 1-1 C). Für diesen als „Laterale Inhibition“ bezeichneten Prozess sind die neurogenen Genprodukte von *Notch* und *Delta* erforderlich (siehe Übersichtsartikel Artavanis-Tsakonas et al., 1991). Zunächst exprimieren sämtliche Zellen eines proneuralen Clusters *Notch* und *Delta* gleichermaßen. *Notch* kodiert für einen Transmembranrezeptor und *Delta* für ein Transmembranprotein, welches als spezifischer Ligand für den Notch-Rezeptor fungiert. Durch die Aktivierung des Notch-Rezeptors mittels Delta wird in der entsprechenden Zelle die Expression der proneuralen Gene reprimiert. Somit hindert letztendlich eine der Zellen des proneuralen Clusters, die Delta im Vergleich zu den übrigen Zellen geringfügig stärker exprimiert, alle anderen daran, sich zu neuronalen Zellen zu entwickeln und bildet den einzigen NB. Wie genau es zu der Dominanz in der Bildung von Delta in einer der Zellen kommt, ist bislang nicht geklärt.



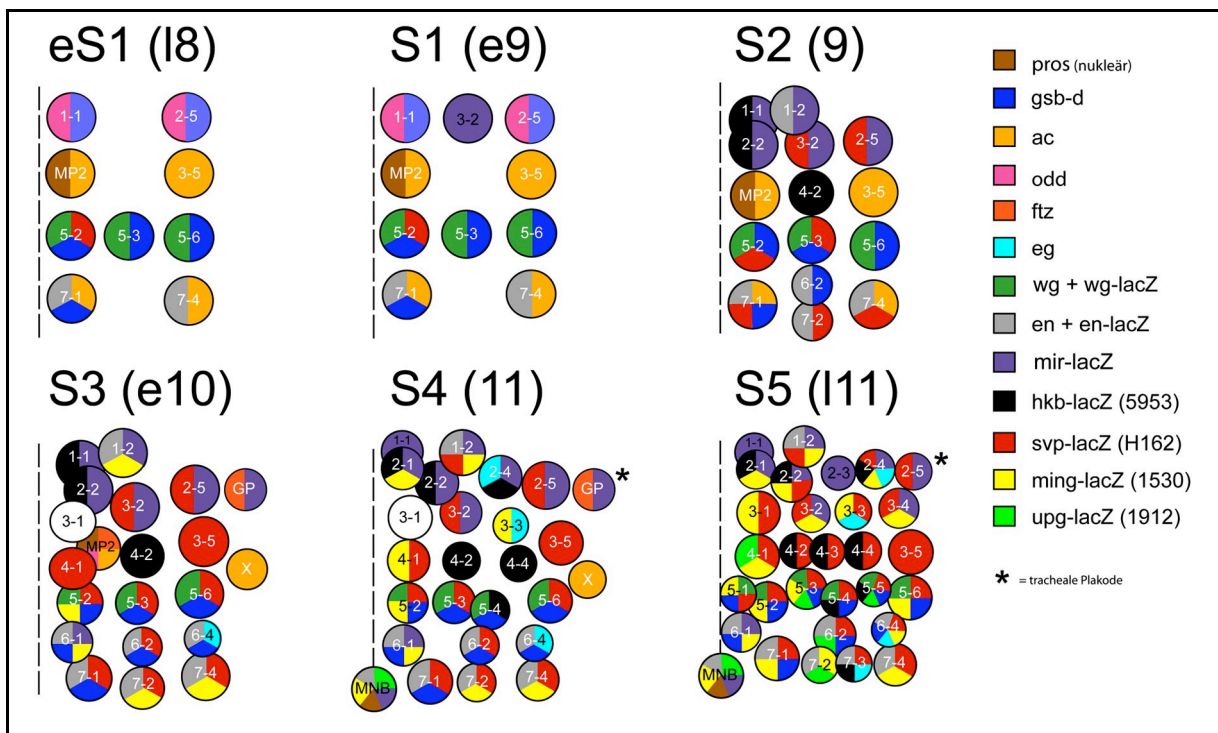
**Abb. 1-1: Neurogenese von *Drosophila***

(A) Laterale Ansicht der Anlagenkarte eines *Drosophila* Embryos im Gastrula-Stadium. Im Verlauf der Entwicklung geht aus der procephalen neurogenen Region (pNR) das Gehirn und aus der ventralen neurogenen Region (vNR) das Bauchmark hervor. Anterior ist links. (B) Durch die Expression proneuraler Gene wird einer Gruppe von Zellen die Kompetenz vermittelt, sich zu neuronalen Vorläuferzellen zu entwickeln. (C) Durch den Prozess der „Lateralen Inhibition“ wird allerdings nur eine Zelle des proneuralen Clusters zum Neuroblasten (NB) determiniert und delaminiert ins Innere des Embryos. Die Spezifizierung der einzelnen NBs erfolgt über differentiell exprimierte Musterbildungsgene entlang der anterior-posterioren (A/P) und dorsoventralen (D/V) Körperachse. (D) Jeder NB generiert im Folgenden einen charakteristischen Zellstammbaum, indem er sich im Stammzellmodus teilt. Die dabei generierten Gangliengliedermutterzellen (GMZ) bringen in der Regel nach einer weiteren Teilung zwei postmitotische Zellen hervor, die sich zu Neuronen (dargestellt in rot) und/oder Gliazellen (dargestellt in grün) differenzieren. dEPI = dorsale Epidermis, PZ = Polzellen. Erläuterungen siehe Text. (Mit freundlicher Genehmigung von C. Berger; modifiziert durch J. Dietrich)

Morphologisch setzt sich das Bauchmark von *Drosophila* aus vierzehn Segmenten zusammen, die jeweils aus bilateral symmetrischen Ganglien geformt werden. Gemäß der Körperregion unterscheidet man von anterior nach posterior zwischen drei gnathalen (C1-C3), drei thorakalen (T1-T3) und acht abdominalen (A1-A8) Segmenten. Die neuronalen Anteile der jeweiligen Segmente werden auch als Neuromere bezeichnet. Gebildet wird jedes Hemineuromer (durch die ML getrennte spiegelbildliche Hälfte eines Neuromers) von ca. 30 NBs, die etwa ab dem Stadium 8 (St.8) in fünf aufeinander folgenden Segregationswellen (S1-S5) aus dem



Neuroektoderm ins Innere des Embryos delaminieren (Abb. 1-2). Die einzelnen NBs zeichnen sich durch eine spezifische Genexpression aus und können zudem anhand ihres charakteristischen Delaminationszeitpunktes und ihrer Position innerhalb des Hemineuromers identifiziert werden (Abb. 1-2). Im weiteren Verlauf der Embryogenese teilen sich die NBs entsprechend des Stammzellenmodus (Abb. 1-1 D). Demzufolge erneuert sich der NB in einer ersten inäqualen Teilung selbst und generiert eine kleinere Ganglienmutterzelle (GMZ). Die GMZ teilt sich anschließend ein weiteres Mal und bringt in der Regel zwei postmitotische Zellen hervor, die sich zu Neuronen und/oder Gliazellen differenzieren. Auf diese Weise produziert jeder NB einen charakteristischen, invarianten Zellstammbaum (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Die Nachkommen eines NB werden auch als dessen Zellklon bezeichnet.

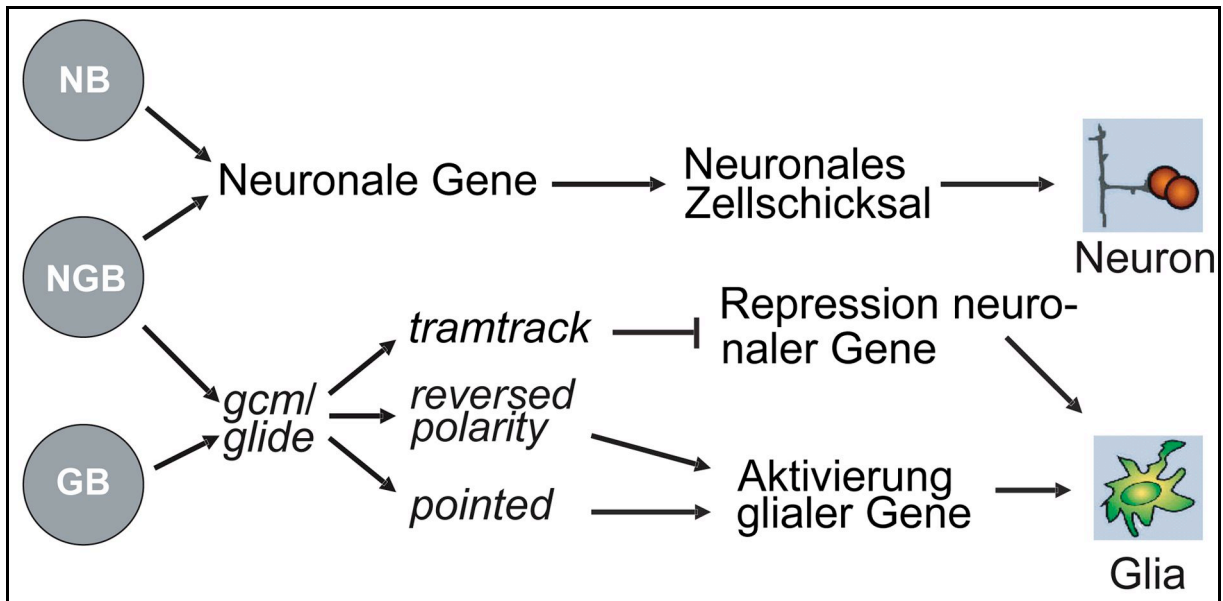


**Abb. 1-2: Segregationswellen und NB-Karte**

Die einzelnen NBs können anhand ihres Delaminationszeitpunktes (S1-S5), ihrer Position innerhalb des Hemineuromers und an der kombinatorischen Expression spezifischer Markergene identifiziert werden. Der Farbcode der jeweiligen Marker ist auf der rechten Seite verzeichnet. Die Benennung der NBs erfolgt anhand ihrer Lage innerhalb eines kartesischen Koordinatensystems, in welchem die erste Zahl die Position entlang der A/P- und die zweite Zahl entlang der D/V-Achse beschreibt. Dargestellt ist jeweils ein Hemineuromer. Anterior ist oben und gestrichelte Linien deuten die ML an. (Abb. nach Doe, 1992; Broadus und Doe, 1995)

Bislang wurde für die Beschreibung der neuralen Stammzellen von *Drosophila* aus Gründen der besseren Verständlichkeit stets der Begriff NB verwendet. Genau genommen wird aber, basierend auf dem jeweils generierten Zellklon, zwischen drei Typen von neuralen Vorläuferzellen unterschieden: NBs generieren Zellklone, die sich ausschließlich aus Neuronen zusammensetzen; Vorläuferzellen, die sowohl Neurone als auch Gliazellen hervorbringen, werden Neuroglioblasten (NGBs) genannt und wenn eine neurale Stammzelle ausnahmslos Gliazellen generiert, wird sie als Glioblast (GB) bezeichnet. Des Weiteren wird zwischen den neuralen Vorläuferzellen differenziert, aus denen sich die in der Peripherie gelegenen sensorischen Organe entwickeln. Sie werden als „sensory organ precursor cells“ (SOPs) bezeichnet und können sowohl Neurone als auch Gliazellen hervorbringen (zusammengefasst in Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Die Gliogenese in *Drosophila* wird durch die Expression des binären Schaltergens *glial cell missing/glial cells deficient* (*gcm/glide*; im Folgenden wird lediglich die Bezeichnung *gcm* verwendet) induziert (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996). *gcm* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in sämtlichen Gliazellen, mit Ausnahme der Mittellinienglia exprimiert wird. Die Gesamtheit der *gcm*-positiven Gliazellen wird als laterale Glia bezeichnet. Anhand von Mutantanalysen und Überexpressionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Gcm erforderlich und ausreichend ist, um ein gliales Entwicklungsschicksal zu initiieren (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996). Durch Gcm werden weitere zum Teil bekannte Gene aktiviert, darunter *reversed polarity* (*repo*) (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995) und *pointed* (*pnt*) (Klaes et al., 1994), die andere gliale Differenzierungsgene regulieren, oder *tramtrack* (*ttk*) (Giesen et al., 1997), welches an der Repression neuronaler Gene beteiligt ist (Abb.1-3). Der Transkriptionsfaktor Repo wird ebenso wie Gcm in allen lateralen Gliazellen gebildet. In dieser Arbeit fungieren Antikörperfärbungen gegen Repo als wichtigstes Hilfsmittel zur Visualisierung der Gliazellen.



**Abb. 1-3: Spezifizierung von Neuronen bzw. Gliazellen**

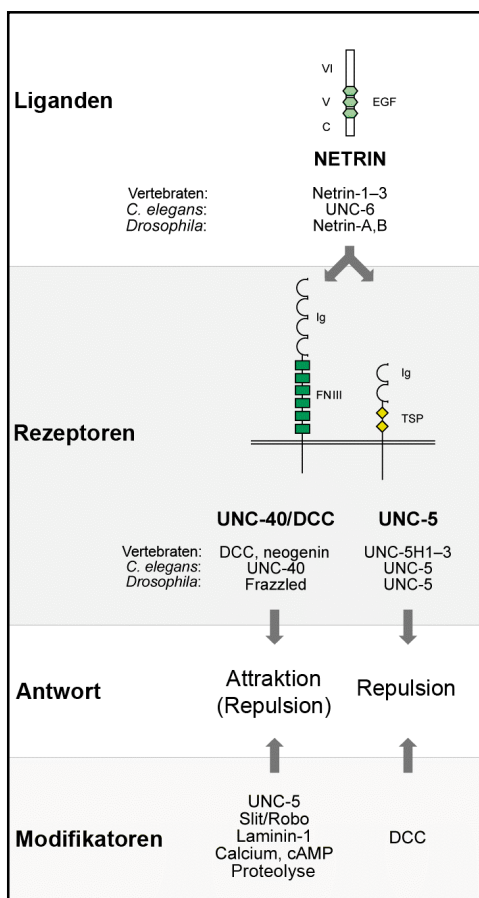
Durch die Expression des Schaltergens *glial cells missing/glial cells deficient (gcm1/glide)* wird der gliale Entwicklungsweg eingeschlagen. (Abb. übernommen aus Diplomarbeit von Hilchen, 2005)

## 1.2 Funktion von Gliazellen

Die Bezeichnung Gliazellen wurde durch ihren Entdecker Rudolf Virchow in der Mitte des 19. Jahrhunderts geprägt und resultiert aus der anfangs verkannten Bedeutung dieses Zelltyps. Der Begriff „Glia“ (aus dem griechischen für Leim) wurde derzeit verwendet, da man annahm, dass diese Zellen lediglich als Bindegewebe um die Neurone vorliegen, um diese mechanisch zusammenzuhalten. Mittlerweile sind hingegen vielfältige Funktionen der Gliazellen bekannt, die sowohl ihre Bedeutung für die Entwicklung, als auch für die Erhaltung und Plastizität des NS unterstreichen. Einige der wichtigsten Funktionen werden im Folgenden kurz erläutert.

Während der Neurogenese dienen Gliazellen häufig als Substrat für die Migration von Axonen. Ein prominentes Beispiel hierfür liefern die Radialgliazellen der Vertebraten, die den Kortex von der Ventrikularzone bis hin zur Oberfläche durchspannen und entlang derer sich Neurone zu ihrem Zielort bewegen. Dabei wird die Interaktion mit spezifischen Neuronen durch die Bildung distinkter Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. Liter1, Neuroligin und LIG-1 gewährleistet, deren Homologe auch in *Drosophila* entsprechende Aufgaben erfüllen (Moos et al., 1988; Bieber et al., 1989; Auld et al., 1995; Suzuki et al., 1996; Raghavan und White, 1997; Gilbert et al., 2001). Neben dieser kontaktvermittelten Wegleitung kann die Wanderung von Axonen (und anderen Zellen) auch durch von Gliazellen segregierte

diffusible Faktoren gesteuert werden. Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit seien an dieser Stelle speziell die Mittellinienglia von *Drosophila* erwähnt. Sie sezernieren sowohl chemoattraktiv als auch chemorepulsiv wirkende Moleküle und sind dadurch maßgeblich am Aufbau des typischen Strickleiternnervensystems beteiligt, indem sie die kommissuralen Axone über die ML hinweg leiten und die Axone der Konnektive daran hindern die ML zu überqueren (siehe Übersichtsartikel Jacobs, 2000). Zu diesen segregierten Faktoren zählen unter anderem die hoch konservierten Netrine, die vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bis hin zu Vertebraten vorkommen (Abb. 1-4).



**Abb. 1-4: Übersicht des Netrin-vermittelten Signalweges**  
 Durch die Bindung an Rezeptoren können Netrine sowohl Repulsion (mittels des Rezeptors Unc5) als auch Attraktion (mittels des Rezeptors Fra/DCC) vermitteln. Durch zusätzliche Modifikatoren kann eine Aktivierung des Rezeptors Fra/DCC auch in einer repulsiven Signalantwort resultieren. FNIII = Fibronectin Type III Domäne, Ig = Immunoglobulin Domäne, TSP = Thrombospondin Domäne. Erläuterungen siehe Text. (Abb. übernommen und modifiziert aus Yu und Bargmann, 2001)

In *Drosophila* existieren zwei Netrine, Netrin-A (NetA) und Netrin-B (NetB), die bei der Wegleitung von Neuronen redundante Funktionen übernehmen (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996). Zuerst entdeckt wurde Netrin in Vertebraten, wo es von der „floor plate“ sezerniert als chemoattraktive Substanz für kontralateral projizierende Neurone fungiert (Tessier-Lavigne et al., 1988; Placzek et al., 1990). In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass Netrine Liganden darstellen, deren attraktive bzw. repulsive Wirkung von der Bindung an spezifische Rezeptoren

abhängt. Gegenwärtig sind zwei Netrin-Rezeptoren bekannt: der Repulsion vermittelnde Rezeptor Uncoordinated5 (Unc5, Leung-Hagesteijn et al., 1992; Leonardo et al., 1997; Keleman und Dickson, 2001) und der prinzipiell Attraktion vermittelnde Rezeptor Frazzled (Fra, in *Drosophila*) bzw. Deleted in Colorectal Cancer (DCC, in Vertebraten / Unc-40 in *C. elegans*) (Chan et al., 1996; Keino-Masu et al., 1996; Kolodziej et al., 1996) (Abb. 1-4).

Eine weitere wichtige Funktion von Gliazellen in Insekten ist die Bildung der glialen Blut-Hirn-Schranke (Auld et al., 1995; Carlson et al., 2000; Bainton et al., 2005; Schwabe et al., 2005; Banerjee et al., 2006). Diese physiologische Barriere spielt eine wichtige Rolle für die Homöostase des NS, unter anderem indem sie Neurone von der umliegenden Kalium reichen Hämolymphe isoliert und dadurch die Voraussetzung für die Erregbarkeit von Axonen schafft. Analog dazu wird in Vertebraten die Reizleitung von Axonen durch myelinisierende Oligodendrozyten im ZNS und Schwannsche Zellen im PNS erhöht. Die ebenfalls in Vertebraten mit geschlossenem Blutkreislaufsystem existierende Blut-Hirn-Schranke wird hingegen von den die Blutkapillaren auskleidenden Endothelzellen gebildet.

Des Weiteren sorgen Gliazellen durch Nährstoffversorgung für die Erhaltung von Nervenzellen (Birling und Price, 1995) und sind sowohl an der Wiederaufnahme von Transmittermolekülen als auch an deren Metabolismus beteiligt (Treherne und Schofield, 1981). Ferner spielen sie eine Rolle bei der Modulation synaptischer Aktivität (Pfrieger und Barres, 1997; Robitaille, 1998) und neuere Studien belegen, dass neben den Mikroglia der Vertebraten auch bestimmte Glia-Typen in *Drosophila* phagozytotisch aktiv sind (Kurant et al., 2008).

### 1.3 Klassifizierung der Gliazellen in *Drosophila*

Im Unterschied zur funktionellen Gliederung der Gliazellen in Vertebraten basiert die von Ito und Kollegen im Jahre 1995 eingeführte Klassifizierung und Nomenklatur der Gliazellen für *Drosophila* vorwiegend auf der Morphologie und Position einzelner Zellen. Die *repo*-exprimierenden lateralen Gliazellen des Bauchmarks werden in sechs Subgruppen unterteilt (Abb. 1-5). Diese Klassifizierung konnte insbesondere durch die Arbeit von Beckervordersandforth und Kollegen (2008) auch auf molekularer Ebene bestätigt werden. Als weitere Gruppe kommen die von

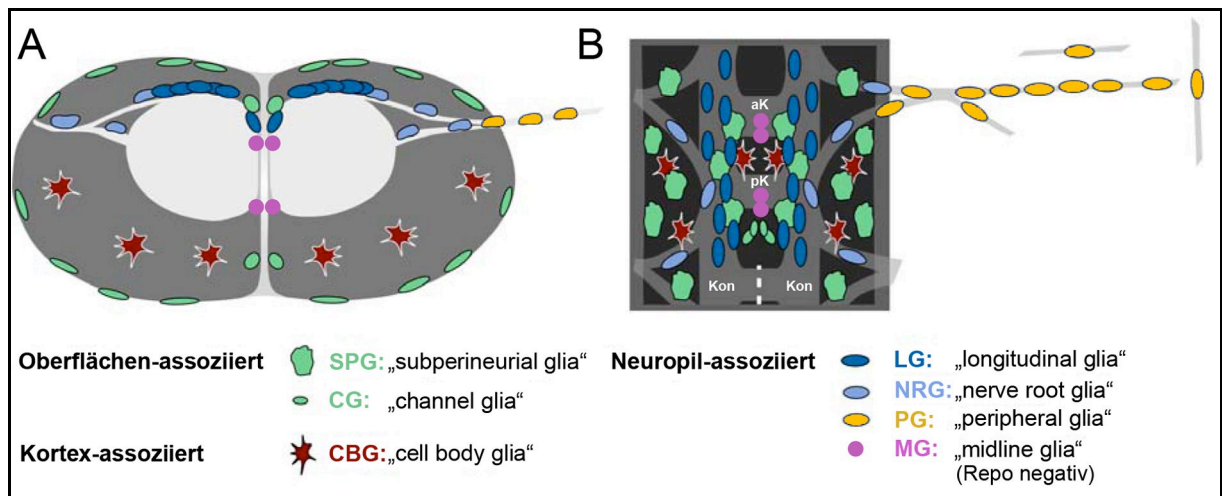
mesektodermalen Vorläuferzellen abstammenden Repo-negativen Mittellinienglia hinzu (Abb. 1-5). Die deutsche Benennung der einzelnen Subgruppen in dieser Arbeit erfolgt in Anlehnung an die Originalnomenklatur (Ito et al., 1995), welche in der schematischen Darstellung der Abb. 1-5 vermerkt ist. Einzelne Subgruppen werden entsprechend ihrer Lage im Bauchmark in drei Kategorien eingeteilt.

I. Oberflächen-assoziierte Gliazellen: Diese Kategorie umfasst alle Gliazellen, die an der Oberfläche des Bauchmarks lokalisiert sind. Sie beinhaltet zwei Subgruppen, die „subperineurial glia“ (SPG, Subperineuriale Glia) und die „channel glia“ (CG, Kanal Glia). Die SPGs umhüllen das Bauchmark und sowohl ihre Zellkörper als auch die Zellkerne erscheinen rund und flach. CGs kleiden die Dorsoventralkanäle aus und besitzen schmale, längliche Zellkerne.

II. Kortex-assoziierte Gliazellen: Zu dieser Kategorie zählt lediglich eine Subgruppe, die „cell body glia“ (CBG, Zellkörper Glia). Sie umgeben die im Kortex lokalisierten Zellkörper der Neurone und erinnern aufgrund ihrer zahlreichen Membranausläufer morphologisch an Astrozyten der Vertebraten.

III. Neuropil-assoziierte Glia: In diese Kategorie fallen alle Gliazellen, die mit axonalen Strukturen assoziiert sind und diese umhüllen. Insgesamt gehören dieser Kategorie vier Subgruppen an. Die „longitudinal glia“ (LG, Longitudinale Glia) sind dorsal der longitudinalen Trakte (Konnektive) lokalisiert, welche sie im Verlauf der Embryogenese umschließen. Ihre Zellkerne sind ellipsenförmig. Pro HS existieren neun LGs, die alle von einem einzigen Glioblasten, dem sogenannten Longitudinalen Glioblasten (LGB) abstammen (Jacobs et al., 1989; Beckervordersandforth et al., 2008). Die zweite Subgruppe bilden die „nerve root glia“ (NRG, Nervenwurzel Glia), welche entlang der Nervenwurzeln liegen und ebenfalls ellipsenförmige Zellkerne besitzen. Als dritte Subgruppe, die wie die beiden zuvor genannten innerhalb des Bauchmarks vorliegen, sind die „midline glia“ (MG, Mittellinienglia) zu nennen. Ihre Zellkörper sind relativ groß und ihre Membranausläufer bedecken den medialen Teil der Kommissuren. Die vierte Subgruppe der Neuropil-assoziierten Gliazellen bilden die „peripheral glia“ (PG, Periphere Glia). Sie entstehen zwar überwiegend innerhalb des Bauchmarks, verlassen es aber im Verlauf der Embryogenese, indem sie entlang der peripheren Nerven nach dorsal migrieren. Im Anschluss an ihre Wanderungsphase umhüllen die PGs die peripheren Nerven (Sepp et al., 2000; Edenfeld et al., 2006). Da die embryonale Migration der PGs im Fokus dieser Arbeit

steht, wird im folgenden Abschnitt der grundsätzliche Ablauf ihrer Wanderung und die daran beteiligten Mechanismen kurz erläutert.



**Abb. 1-5: Klassifizierung der Gliazellen**

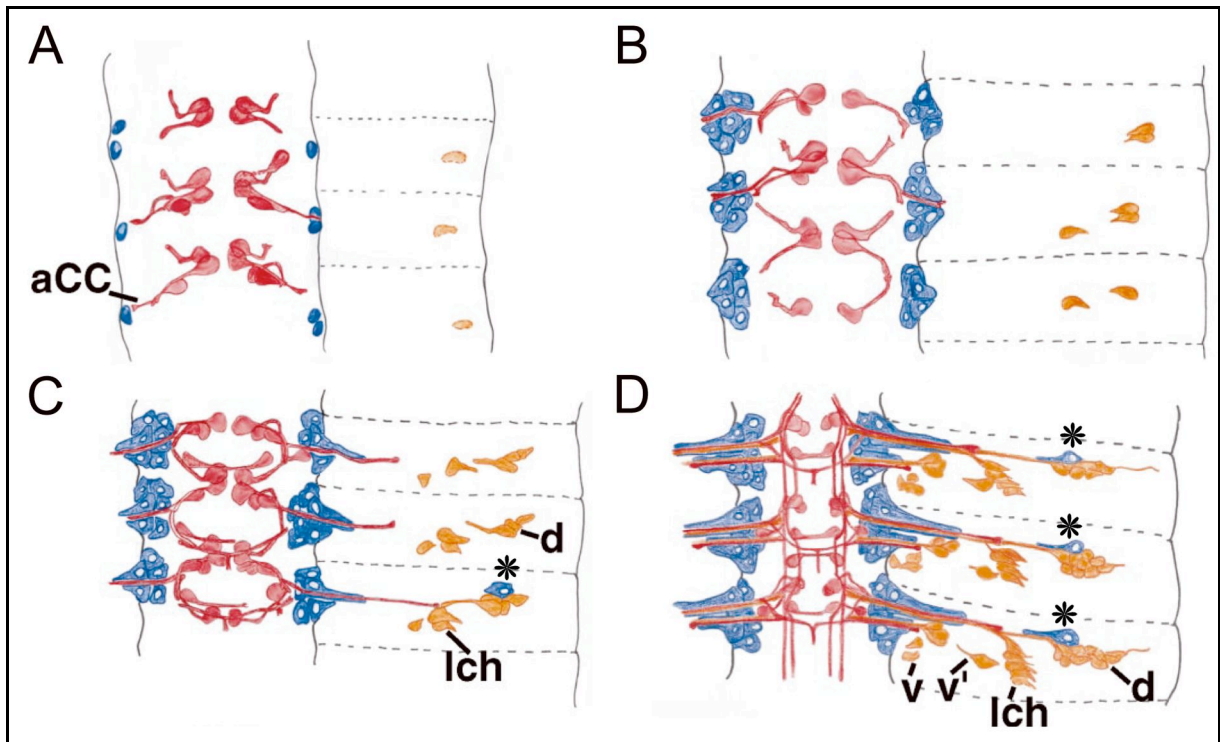
Schematische Darstellung der Gliazellen im Bauchmark und entlang der peripheren Nerven. In (A) ist ein Querschnitt und in (B) eine Aufsicht von dorsal zu sehen. Die Klassifizierung erfolgt nach Ito et al. (1995) anhand der Morphologie und Position einzelner Zellen. Die gestrichelte Linie deutet die ML an. aK = anteriore Kommissur, Kon = Konnektiv, pK = posteriore Kommissur. (Abb. übernommen und modifiziert aus Beckervordersandforth et al., 2008)

## 1.4 Migration der Peripheren Gliazellen

Die embryonalen PGs (im Folgenden als ePGs bezeichnet) werden sowohl von NBs des sich entwickelnden ZNS (Schmidt et al., 1997) als auch von in der Peripherie lokalisierten SOPs (Bodmer et al., 1989; Fredieu und Mahowald, 1989; Nelson und Laughon, 1993) generiert. Für die im Bauchmark entstehenden ePGs konnte bereits gezeigt werden, dass sie vom NB1-3, NB2-5 und NB5-6 abstammen und bisher wurde ihre Gesamtzahl zwischen sechs und neun variierend angegeben (Schmidt et al., 1997). Im Verlauf der Embryogenese wandern sie offenbar perlschnurartig entlang der peripheren Nerven aus, bis sie mit den zytoplasmatischen Ausläufern einer im PNS gebildeten ePG zusammentreffen (Sepp et al., 2000). Anschließend umhüllen die ePGs die peripheren Nerven um die gliale Blut-Hirn-Schranke zu etablieren (Sepp et al., 2000). Der generelle Ablauf der vom ZNS auswandernden ePGs wurde insbesondere durch Arbeiten aus dem Labor von V. Auld (Sepp et al., 2000; Sepp et al., 2001; Sepp und Auld, 2003a) bereits beschrieben und wird nachfolgend kurz zusammengefasst.

Im späten St.12 können die ersten ePGs nahe ihrem Entstehungsort an der lateralen Kante des Bauchmarks detektiert werden (Abb. 1-6 A). Bis zum St.13 kommen weitere ePGs hinzu, und letztendlich arrangieren sich sechs bis acht ePGs kegelförmig an der ZNS/PNS Transitionszone eines jeden Hemisegments (HS) (Abb.1-6 B). Während dieser Phase der Neurogenese scheinen sie als Wegweiserzellen für das aus dem Bauchmark projizierende Pionierneuron aCC des Intersegmentalnervs (ISN) zu fungieren. Denn in jedem HS wandert dieses zunächst auf die ePGs zu und verlässt das Bauchmark etwa im St.13 durch einen von den ePGs geformten Kanal (Abb. 1-6 A-B). Dieser dient nicht nur Motorneuronen sondern auch den später ins ZNS projizierenden sensorischen Neuronen als Leitstruktur (Sepp et al., 2001). Nachdem sich das Pionierneuron aCC in die Peripherie erstreckt, beginnen die ePGs ihrerseits entlang der Axone nach dorsal in die Peripherie zu wandern. Dabei verbleiben sie stets hinter dem Wachstumskegel des Pionierneurons aCC (Abb. 1-6 C-D), welches etwa ab dem späten St.13 mit den in Richtung des Bauchmarks projizierenden sensorischen Axonen faszikuliert (Abb. 1-6 C). Während ihrer Wanderung in die Peripherie nutzen jetzt die ePGs die axonalen Trakte der peripheren Nerven als Leitschienen und verbleiben fortwährend mit ihnen verbunden. Dabei scheint eine bevorzugte Adhäsion mit sensorischen Axonen zu bestehen (Sepp et al., 2000). Während die meisten ePGs entlang des ISN nach dorsal migrieren, kann stets eine ePG pro HS beobachtet werden, die mit dem Segmentalnerv (SN) assoziiert ist (Sepp et al., 2000; Sepp et al., 2001). Diese Zelle erreicht etwa im St.15 ihre endgültige embryonale Position. Dort angekommen entsendet sie zytoplasmatische Ausläufer entlang der beiden Nervenzweige des SN (SNa und SNc) und umhüllt diese bis zum Ende der Embryogenese nahezu vollständig (Abb. 1-7). Für die übrigen entlang des ISN nach dorsal ziehenden ePGs wird beschrieben, dass sie als perlschnurartig aneinandergereihte Zellkette mit fixer Reihenfolge auswandern, bis sie etwa im St.16 mit einer in der Peripherie generierten ePG zusammentreffen (Sepp et al., 2000) (Abb. 1-7).



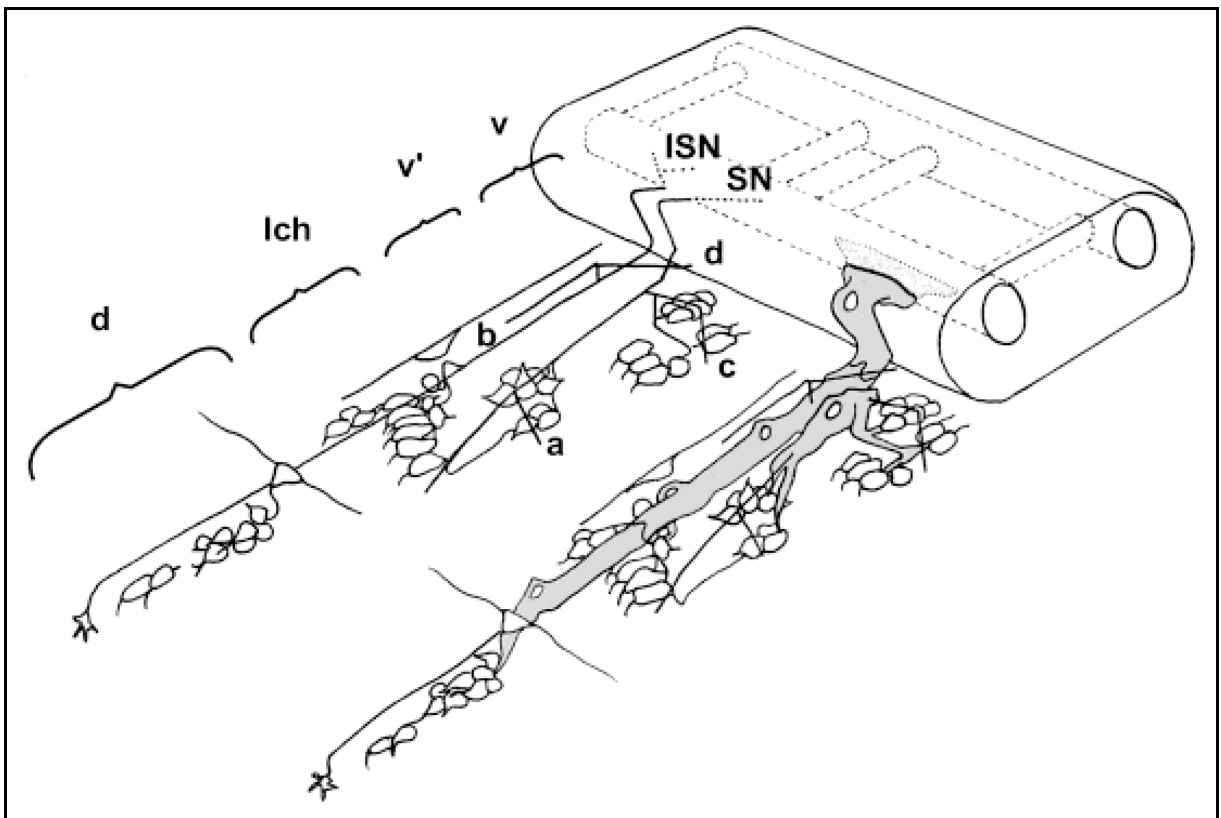


**Abb. 1-6: Schematische Darstellung der frühen ePG Wanderung**

Abgebildet sind jeweils drei Segmente des Bauchmarks und die rechte Körperhälfte von Embryonen der Entwicklungsstadien 12 (A), frühes St.13 (B), spätes St.13 (C) und St.14 (D). Die ePGs sind in blau, Motorneurone in rot und im PNS gebildete sensorische Neurone in orange dargestellt. In (C) und (D) ist die in der Peripherie gebildete ePG durch Sternchen markiert. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. aCC = Pionierneurone des ISN, d = dorsales Chordotonalorgan, lch = laterales Chordotonalorgan, v und v' = ventrales und ventrales' Chordotonalorgan. Zur Erläuterung siehe Text. (Abb. übernommen und modifiziert aus Sepp et al., 2001)

Die ePGs von *Drosophila* fungieren nun seit mehr als zehn Jahren als Modellsystem zur Analyse der Gliamigration, unter anderem aufgrund ihrer exponierten Lage im PNS und ihrer Eigenschaft, zum Teil enorme Wegstrecken zurückzulegen. Dennoch ist über die am Migrationsprozess beteiligten Gene und molekularen Mechanismen gegenwärtig nur wenig bekannt. Beispielsweise ist völlig unklar, durch welches Signal die Wanderung der ePGs initiiert und durch welche Faktoren ihre gerichtete Migration in die Peripherie bewirkt wird. Nachgewiesen werden konnten, dass für die wildtypische Wanderung der ePGs zahlreiche Neuron-Glia-Interaktionen eine Rolle spielen, die unter anderem die korrekte Differenzierung der ePGs (Sepp und Auld, 2003b; Edenfeld et al., 2006) und das Ende ihrer Wanderung kontrollieren (Pielage et al., 2004). Die grundsätzliche Erfordernis der peripheren Nerven für die ePG Migration wird durch die Arbeit von Sepp und Kollegen (2003) demonstriert, indem sie zeigen, dass eine frühe neuronale Ablation dazu führt, dass weniger ePGs in die Peripherie auswandern. Die Mobilität der ePGs erfordert ferner dynamische Umstrukturierungen des kortikalen Zytoskeletts, da sich ePGs wie auch andere

migrierende Zellen (z.B. Makrophagen, Fibroblasten,...) bewegen, indem sie feine Zellausläufer in Form von Filopodien und Lamellipodien entsenden, die sich entlang der Axone ausstrecken und den Zellkörper hinter sich herziehen. In diesem Zusammenhang konnte eine Beteiligung der beiden monomeren Rho-GTPasen RhoA und Rac1 an der ePG Migration nachgewiesen werden (Sepp und Auld, 2003a). RhoA und Rac1 kontrollieren zusammen mit einer dritten GTPase, Cdc42, als Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes (Machesky et al., 1994; Machesky und Gould, 1999) die Polymerisierung von Aktinfilamenten, durch deren Verlängerung auch Membranausläufer generiert werden (Nobes und Hall, 1995). Neben den Rho-GTPasen spielt außerdem die Aktivität des Rezeptors Notch eine entscheidende Rolle bei der wildtypische Ausbildung von Zellfortsätzen (Edenfeld et al., 2007).



**Abb. 1-7: Schematische Darstellung des PNS am Ende der Embryogenese**

Zu sehen ist das PNS zweier abdominalen HS. Im linken HS sind nur die neuronalen Komponenten (Zellkörper der Chordotonalorgane sowie sensorische und motorische Trakte) in der Peripherie abgebildet. Sowohl vom Hauptfaszikel des ISN, als auch vom SN gehen verschiedene Nervenzweige (ISNb und ISNd bzw. SNa und SNc) ab. Im rechten HS ist die Umhüllung des ISN und SN durch die ePGs illustriert. Der ISN wird von mehreren hauptsächlich aus dem ZNS stammenden ePGs umschlossen, die Nervenzweige des SNa und SNc werden von lediglich einer ePG umhüllt. Anterior ist links. Die Abkürzungen für die verschiedenen Chordotonalorgane und ePGs entsprechen Abb. 1-6. Für weitere Details siehe Text. (Abb. übernommen und modifiziert aus Sepp et al., 2000).

Über das spätere Schicksal der embryonal gebildeten PGs und deren (mögliche) weitere Migration während der drei Larvenstadien im Anschluss an die Embryogenese ist nahezu nichts bekannt. Während der Larvalentwicklung kommt es zunehmend zur vollständigen Umhüllung der peripheren Nerven (Auld et al., 1995; Sepp et al., 2000). Insbesondere durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die peripheren Nerven bereits am Ende der Embryogenese von distinkten Gruppen von Gliazellen umgeben werden, die sich im Verlauf der Larvalentwicklung weiter differenzieren und die Axone in mehreren Schichten umhüllen (Auld et al., 1995; Banerjee et al., 2006; Edenfeld et al., 2006; Stork et al., 2008).

### 1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Dem vorherigen Abschnitt ist zu entnehmen, dass der allgemeine Ablauf der ePG Wanderung bereits in vorausgegangenen Arbeiten beschrieben wurde. Dennoch bestanden zu Beginn meiner Dissertation zahlreiche Unklarheiten, beispielsweise im Hinblick auf die Fragestellung, ob sämtliche ePGs individuelle Identitäten besitzen und ob deren Wanderungsverhalten bereits vorherbestimmt ist. Für diese Theorie sprechen vorausgegangene Publikationen, in denen berichtet wird, dass die ePGs am Ende der Migration offenbar relativ stereotype Positionen einnehmen (siehe Übersichtsartikel Silies et al., 2007). Eindeutig bewiesen wurde dies aber noch nicht. Das hängt vor allem damit zusammen, dass speziell die am ISN auswandernden ePGs ohne den Einsatz molekularer Marker nicht hinreichend voneinander unterschieden werden können. Mittels derartiger Markierungen konnte bislang nur die Wanderung weniger ePGs untersucht werden. Aus diesem Grund war es zunächst Ziel meiner Arbeit weitere molekulare Marker zu finden, mit deren Hilfe sämtliche ePGs identifiziert werden können, um deren Wanderung auf Einzelzellebene zu analysieren. Dazu sollte zusätzlich zu fixierten Präparaten auch erstmalig die Wanderung aller ePGs anhand von *in vivo* 4D-Aufnahmen dokumentiert werden, um beispielsweise die Dynamik ihrer Wanderung zu erfassen, oder um zu kontrollieren, inwieweit sich (Gruppen von) ePGs in ihrem Wanderungsverhalten voneinander unterscheiden.

Neben der detaillierten wildtypischen Beschreibung der Migration aller ePGs auf Einzelzellebene war es außerdem Ziel dieser Arbeit mehr über die Gene bzw. Mechanismen herauszufinden, die an der Wanderung der ePGs beteiligt sind. Eine schnelle und effektive Methode um zu überprüfen, ob ein (potentielles) Gen für die Migration der ePGs erforderlich ist, bietet in *Drosophila* die Mutantanalyse. Dies ist unter anderem dadurch begründet, dass für die meisten Gene bereits mutante Fliegenstämme existieren, die sowohl über kommerzielle Stammsammlungen (z.B. Bloomington- und Kyoto-Stammsammlung), als auch von anderen Arbeitsgruppen bezogen werden können. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutantanalysen lieferte die detaillierte Beschreibung der wildtypischen ePG Migration auf Einzelzellebene die Basis, um selbst subtile Phänotypen zu detektieren.

## **2 Material und Methoden:**

### **2.1 Fliegenzucht**

Die Haltung von Fliegenstämmen, die im Rahmen aktueller Experimente verwendet werden, erfolgt bei 25°C in ovalen Kulturgefäßen aus Kunststoff, die mit luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen sind. Als Nahrung dient ein spezieller Nährbrei, der den Grund der Röhrchen bedeckt. Dieser setzt sich aus Soja, Mais, Malzextrakt, Hefe und Sirup zusammen, wird durch Agar eingedickt und zur Konservierung mit Nipagin und Propionsäure versetzt. Bei 25°C Umgebungstemperatur beträgt die Generationszeit durchschnittlich knapp zwei Wochen, kann aber in Abhängigkeit vom Genotyp leicht variieren. Nach Ablauf dieser Zeit (wenn ausreichend viele Fliegen der Folgegeneration geschlüpft sind) werden die Fliegen in frische Kulturgefäße umgeschüttelt. Das Umsetzen der Fliegen sollte nicht unnötig herausgezögert werden, um einen übermäßigen Befall des Nährbodens durch Pilze, Bakterien und Milben zu vermeiden.

Stammsammlungen werden bei einer Umgebungstemperatur von 18°C gehalten. Aufgrund der geringeren Temperatur verlangsamt sich der Generationszyklus, so dass die Fliegen lediglich alle vier bis fünf Wochen umgesetzt werden müssen.

### **2.2 Eiablagen**

Für die Eiablagen werden Petrischalen verwendet, deren Grund mit Apfelagar bedeckt ist. Zur Herstellung des Apfelagars werden 28g Agar (Firma Roth) mit einem Liter handelsüblichen Apfelsaft vermischt und in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Der Apfelagar besitzt danach eine flüssige Konsistenz und kann problemlos in Petrischalen gegossen werden. Beim Erkalten härtet der Agarboden aus, und nach etwa einer Stunde ist es bereits möglich, diese für Eiablagen zu verwenden. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank (bei 4°C) können fertige Agarplatten mindestens eine Woche gelagert werden.

Fliegen, die für Eiablagen verwendet werden sollen, werden bereits einige Tage zuvor mit Trockenhefe angefütert, wodurch die Effizienz der Ablagen erhöht wird. Angefüterte Fliegen werden in spezielle Ablageröhrchen überführt, die an einem

Ende offen und am anderen mit einem feinmaschigen Drahtnetz verschlossen sind. Das offene Ende wird auf eine mit Trockenhefe bestreute Apfelagarplatte gestellt. Durch das Drahtnetz am anderen Ende ist eine ausreichende Belüftung der Fliegen gewährleistet. Mit einem Gummiband erfolgt die Fixierung der gesamten Konstruktion. Die Ablagen werden im Inkubator bei 25°C gehalten und je nach Verwendungszweck umgesetzt. Bei längeren Intervallen, wie z.B. einer über Nacht (üN)-Ablage, ist der Entwicklungsstand der Embryonen sehr variabel. Verkürzt man die Intervalle (1-2Std.), kann man grundsätzlich davon ausgehen, dass sich die Embryonen einer Ablage nicht wesentlich in ihrem Entwicklungszustand unterscheiden.

In dieser Arbeit wurden für Fluoreszenz und sichtbare Antikörperfärbungen, sowie für *in-situ* Hybridisierungen in der Regel üN-Ablagen verwendet. Hingegen wurden wann immer bestimmte Embryonalstadien für Experimente benötigt wurden Stundenablagen durchgeführt.

### 2.3 Larvenhaltung

Um die Entwicklung der Larven zeitlich zu koordinieren werden frisch geschlüpfte L1-Larven in ein spezielles trockenes Instantmedium (Carolina Biological Supplies) überführt, welches durch Zugabe von Wasser aufquillt. Dabei ist es wichtig, dass das Medium stets eine dickflüssige, feuchte Konsistenz besitzt. Als Nahrungsergänzung wird dem Medium Trockenhefe zugegeben. Bei einer Umgebungstemperatur von 25°C erreichen die Larven nach etwa vier Tagen das L3-Wanderlarvenstadium. Dieses Stadium (St) zeichnet sich dadurch aus, dass die entsprechenden Larven an der Gefäßwand empor kriechen, um sich anschließend zu verpuppen. Die L3-Wanderlarven können dann mit einer Pinzette abgesammelt und anschließend präpariert werden (siehe 2.7.4).

2.4 Fliegenstämme

Tab. 2-1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme

Bezeichnung:	Genotyp:	Herkunft / Referenz:
<b>Wildtyp-Stamm</b>		
OregonR	Wildtyp	Stammsammlung Institut für Genetik
<b>Mutante-Stämme</b>		
<i>Cas</i> <sup>1C2</sup>	<i>w, cas</i> <sup>1C2</sup> / TM3 Sb <sup>1</sup>	Mellerick et al., 1992
<i>Comm</i> <sup>5</sup>	<i>comm</i> <sup>5</sup> / TM3	Tear et al., 1996
<i>Dscam</i> <sup>DF(2R)6055</sup>	<i>Dscam</i> <sup>DF(2R)6055</sup> / CyO	Schmucker, D.
<i>Ena</i> <sup>23</sup>	<i>ena</i> <sup>23</sup> / CyO	Bloomington (BL-8571)
<i>Fas2</i> <sup>6b112</sup>	<i>Fas2</i> <sup>6b112</sup> / FM6	Sanchez-Sorriano, N.
<i>Fra</i> <sup>3</sup>	<i>w*, fra</i> <sup>3</sup> / CyO	Bloomington (BL-8813)
<i>Fra</i> <sup>4</sup>	<i>fra</i> <sup>4</sup> / CyO	Bloomington (BL-8743)
<i>Gcm</i> <sup>N7-4</sup>	<i>gcm</i> <sup>N7-4</sup> / CyO	Bloomington (BL-107588)
<i>Hem</i> <sup>J4-48</sup>	<i>Hem</i> <sup>J4-48</sup> / TM6B	Bloomington (BL-8753)
<i>NetAB</i> <sup>Δ</sup>	<i>NetAB</i> <sup>Δ</sup> / FM6	Brankatschk und Dickson, 2006
<i>NetA</i> <sup>Δ</sup>	<i>NetA</i> <sup>Δ</sup>	Brankatschk und Dickson, 2006
<i>NetB</i> <sup>Δ</sup>	<i>NetB</i> <sup>Δ</sup>	Brankatschk und Dickson, 2006
<i>Robo</i> <sup>1</sup>	<i>w*, robo</i> <sup>1</sup> / CyO	Bloomington (BL-8755)
<i>Robo</i> <sup>2</sup>	<i>w*, robo2</i> / SM6B	Bloomington (BL-8756)
<i>Robo</i> <sup>2,3</sup>	<i>w, robo</i> <sup>2,3</sup> / CyO	Dickson, B.
<i>Salm</i> <sup>445</sup>	<i>salm</i> <sup>445</sup> / CyO	Jürgens, 1988
<i>Sema-1a</i> <sup>k13702</sup>	<i>w<sup>67c23</sup>, Sema-1a</i> <sup>k13702</sup> / CyO	Bloomington (BL-11097)
<i>Sema-2a</i> <sup>03021</sup>	<i>Sema-2a</i> <sup>03021</sup> / CyO	Bloomington (BL-11257)
<i>Sim</i> <sup>2</sup>	<i>sim</i> <sup>2</sup> / TM3	Bloomington (BL-2055)
<i>Sli</i> <sup>2</sup>	<i>Sli</i> <sup>2</sup> / CyO	Bloomington (BL-3266)
<i>Unc5</i> <sup>8</sup>	<i>Unc5</i> <sup>8</sup> / CyO	Labrador et al., 2005
<b>LacZ-Stämme</b>		
3-101	<i>pumillio-lacZ</i>	Klämbt, C.
3-66	<i>odd paired-lacZ</i>	Klämbt, C.
H15	<i>spinstler-lacZ</i> / CyO	Klämbt, C.
J29	<i>gliotactin-lacZ</i>	Klämbt, C.
<i>Mirr-lacZ</i>	<i>Mirr-lacZ</i>	Broadus et al., 1995; McNeill et al., 1997
rl50	CG1631-lacZ	Klämbt, C.
<i>Salm-lacZ</i>	<i>Salm-lacZ</i>	Bloomington
<i>Svp-lacZ</i>	<i>Svp-lacZ</i>	Mlodzik et al., 1990
<i>Wg-lacZ</i>	<i>Wg-lacZ</i>	Broadus et al., 1995
Y15	Y15	Klämbt, C.
<b>GFP Exon-Trap-Stamm</b>		
Fas2::GFP Exon-Trap	Fas2::GFP	Siegrist, S.

<b>Gal4-Linien</b>		
<i>Cas</i> -Gal4	<i>cas</i> -Gal4	Hitier et al., 2001
<i>Elav</i> -Gal4	<i>elav</i> <sup>C155</sup> -Gal4	Bloomington (BL-458)
<i>Gcm</i> -Gal4, nGFP	<i>gcm</i> -Gal4, UAS-stinger-GFP / CyO	Giangrande, A.
Mz97-Gal4, nGFP	Mz97, UAS-stinger-GFP (Mz97 trägt eine p{GawB} P-Element Insertion im 1.Intron des Gens SP2673)	AG Technau (Ito et al., 1995)
Mz507-Gal4	Mz507-Gal4	AG Technau
Mz605-Gal4	Mz605-Gal4	AG Technau
Mz1580-Gal4	Mz1580-Gal4	AG Technau
<i>Pros</i> -Gal4	<i>pros</i> <sup>C21</sup> -Gal4	Matsuzaki, F.
<i>Repo</i> -Gal4	<i>repo</i> -Gal4 / TM3	Sepp et al., 2001
<i>Sca</i> -Gal4	<i>sca</i> -Gal4	Klaes et al., 1994
<i>Sim</i> -Gal4	<i>sim</i> -Gal4	Klämbt, C.
<i>Twist</i> -Gal4	<i>w</i> <sup>*</sup> , <i>twi</i> -Gal4	Bloomington (BL-2517)
<b>UAS-Linien</b>		
UAS-Aktin::GFP	<i>w</i> <sup>1</sup> , UAS-Aktin::GFP.JMR1	Bloomington (BL-3499)
UAS-mCD8::GFP	<i>w</i> <sup>*</sup> , UAS-mCD8::GFP.L	Bloomington (BL-5130)
UAS- <i>fra</i>	UAS- <i>fra</i>	Kolodziej et al., 1996
UAS-gap::GFP	<i>w</i> <sup>*</sup> , UAS-gap::GFP.AC1	Bloomington (BL-4522)
UAS-HA- <i>Unc5</i>	UAS-HA- <i>Unc5</i>	Keleman und Dickson, 2001
UAS- <i>hid</i>	UAS- <i>hid</i> / CyO	Stellar, H.
UAS- <i>NetA</i>	UAS- <i>NetA</i>	Mitchell et al., 1996
UAS- <i>NetB</i>	UAS- <i>NetB</i>	Mitchell et al., 1996
UAS-nGFP	UAS-stinger-GFP	Barolo et al., 2000
UAS-nlacZ	<i>w</i> <sup>1118</sup> , UAS-lacZ.NZ	Bloomington (BL-3955)
<b>Balancer-Stämme</b>		
<i>w</i> ; <i>Pm</i> / CyO		Vef, O.
+;; TM6b, <i>Tb</i> , <i>Ant-Hu</i> , <i>e</i> / TM3 <i>ftz-lacZ</i>		Vef, O.
FM6 <i>grh-lacZ</i> / <i>kus</i> ; <i>nocScO</i> / CyO <i>wg-lacZ</i>		Vef, O.
FM7a;; UAS- <i>bifid</i> / TM3 <i>ftz-lacZ</i> , <i>Sb</i> , <i>e</i>		Vef, O.
<i>w</i> ; <i>Pm</i> / CyO <i>twi</i> -Gal4, UAS-GFP; <i>CxD</i> / TM3 <i>twi</i> -Gal4, UAS-GFP		Vef, O.
<i>yw</i> , <i>N1</i> / FM7c, <i>twi</i> -Gal4, UAS- <i>eGFP</i>		Bloomington (BL-6873)
<i>yw</i> ; <i>D</i> / TM3 <i>Kr</i> -Gal4, UAS-GFP		Bloomington (BL-5195)

## 2.5 Genetische Kreuzungen

Im Rahmen meiner Arbeit war es mehrfach erforderlich Fliegenstämme zu generieren, in denen unterschiedliche Allele miteinander kombiniert vorliegen. Um Allele verschiedener Fliegenstämme miteinander in einem Stamm zu vereinen, ist die Kenntnis und der Einsatz dominanter genetischer Marker erforderlich (Ryder et



al., 2004), um die Vererbung einzelner Allele während der Kreuzungsgenerationen verfolgen zu können. Liegen die zu kombinierenden Allele auf demselben Chromosom, müssen sie mittels Rekombination vereinigt werden. Bei jeder angesetzten Kreuzung ist es entscheidend jungfräuliche Weibchen zu verwenden, die noch nicht von den im selben Zuchtgefäß schlüpfenden Männchen begattet wurden. Dazu werden die Fliegen mit CO<sub>2</sub> betäubt und frisch geschlüpfte Weibchen alle 4Std. (bei einer Umgebungstemperatur von 25°C) in einem frischen Röhrchen gesammelt und somit von den männlichen Fliegen separiert. Innerhalb der 4Std. Intervallen ist eine Befruchtung der Weibchen durch Männchen ausgeschlossen, da sich *Drosophila* erst erfolgreich paaren kann, nachdem ihre Kutikula vollständig ausgehärtet ist. Erst mit ihrer Aushärtung sind die Begattungsorgane funktionstüchtig, ein Prozess, der bei 25°C mindestens 5Std. beansprucht. Gesammelten Jungfrauen bekannten Genotyps können anschließend mit Männchen bekannten Genotyps verkreuzt werden. Nach weiteren zwei Wochen können die Fliegen der Folgegeneration (F1) erneut mit CO<sub>2</sub> betäubt, mittels sichtbarer Marker genotypisiert und falls erforderlich weiter verkreuzt werden.

### 2.5.1 Balancieren letaler Mutationen

Um letale Mutationen innerhalb eines Fliegenstammes zu erhalten, werden sie durch sogenannte Balancerchromosomen stabilisiert. Dadurch wird verhindert, dass die Mutation im Laufe der Generationen durch negative Selektion verloren geht. Balancerchromosomen tragen zum einen verschiedene Aberrationen, die Rekombinationen verhindern und zum anderen rezessive Letalfaktoren, wodurch garantiert wird, dass ausschließlich heterozygote Individuen überleben können. Des Weiteren können Balancerchromosomen eingesetzt werden, die zusätzliche Markergene z.B. lacZ („Bluebalancer“) oder GFP („Greenbalancer“) aufweisen. Im Falle eines verwendeten „Bluebalancers“ kann dieser dann mittels einer Antikörperfärbung gegen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) sichtbar gemacht werden. „Greenbalancer“ können allein anhand der GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Aufgrund derartiger Balancer ist möglich, eindeutig zwischen hetero- und homozygoten Individuen zu unterscheiden.

## **2.5.2 Mutagenese-Screen und Komplementationskreuzungen**

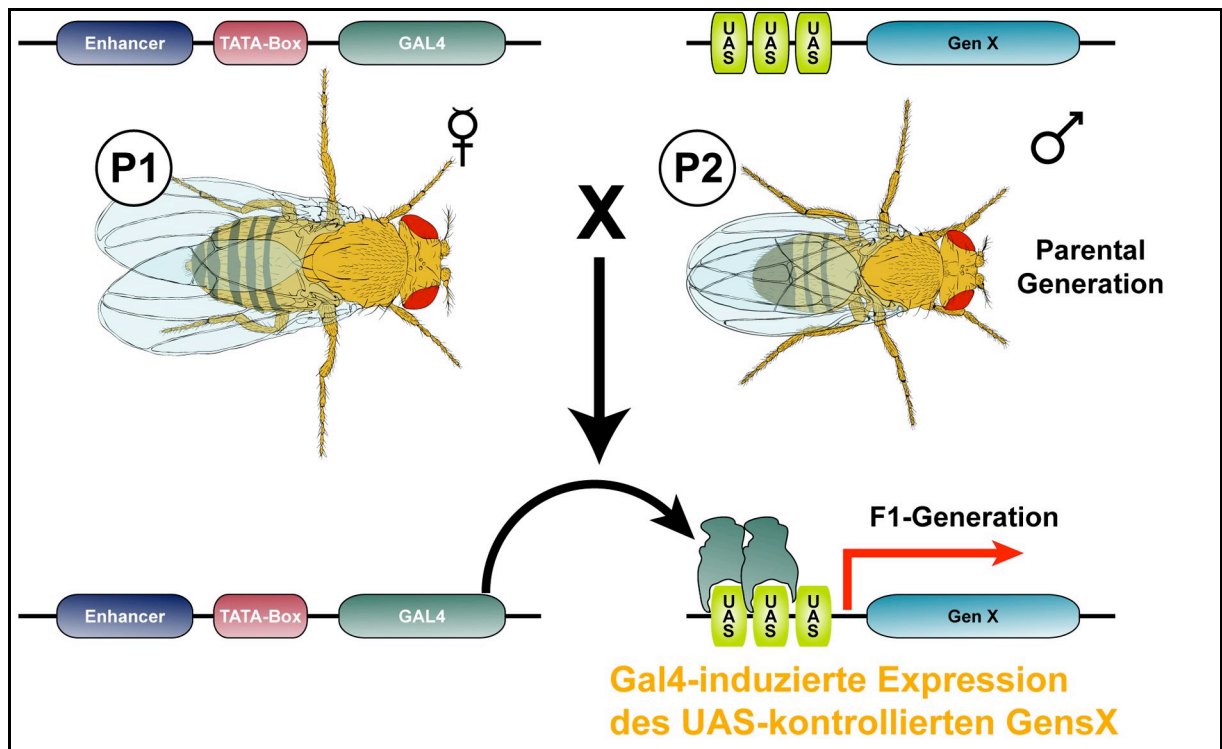
Mit dem Ziel, neue Faktoren zu identifizieren die für die korrekte Migration der ePGs erforderlich sind, wurde bereits vor Beginn meiner Dissertation ein Mutagenese-Screen, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. C. Klämbt (Institut für Neurobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster), durchgeführt. Dazu wurden verschiedene genetische Werkzeuge kombiniert, um die Analyse zu vereinfachen und die Effektivität zu steigern (Vef et al., 2006). Als Ausgangsstamm für die Mutagenese fungierte die Gal4-Linie Mz97 (Ito et al., 1995) kombiniert mit UAS-stinger::GFP (Mz97, nGFP). Als Mutagen wurde Ethylmethansulfonat (EMS) an die Fliegen verfüttert, eine Substanz, die mit einer hohen Frequenz zufällige Punktmutationen im Genom hervorruft. In unserer Arbeitsgruppe konzentriert sich die Untersuchung auf EMS induzierte Mutationen auf dem 2. Chromosom, die jeweils homozygot letal sind. Mittels Komplementationskreuzungen ist es möglich, die Stelle(n) im Genom zu identifizieren, die von einer Mutation betroffen ist (sind) Für diese Kreuzungen steht ein Defizienzen-Kit vom Bloomington Stockcenter zur Verfügung, das nahezu das gesamte 2. Chromosom abdeckt. Die Fliegenstämme des Defizienzen-Kits weisen jeweils unterschiedlich große, homozygot letale Defizienzen in verschiedenen, zum Teil überlappenden Bereichen auf, welche mittels Balancerchromosomen stabilisiert sind. Kreuzt man nun Jungfrauen eines EMS-Stammes mit unbekanntem Mutationsort, die ebenfalls ein Balancerchromosom tragen, mit den Männchen eines Fliegenstammes des Defizienzen-Kits, kann dies entweder zur Komplementation oder zur Nicht-Komplementation führen. Im Falle einer Komplementation schlüpfen in der Folgegeneration (F1) unter anderem Fliegen, die den dominanten, sichtbaren Marker der Balancerchromosomen (z.B. CyO) nicht zeigen. Bei diesen muss es sich folglich um transhomozygote Fliegen handeln, die kein Balancerchromosom in ihrem Genom tragen. Da sie dennoch lebensfähig sind, muss sich der Bereich der Defizienz vom Locus der Mutation des EMS-Stammes unterscheiden, da sowohl die Defizienz als auch die EMS-Mutation im homozygoten Zustand Letalität zu Folge hat. Kommt es hingegen zur Nicht-Komplementation, schlüpfen nur heterozygote Tiere, die entsprechend den dominanten Marker der Balancerchromosomen aufweisen. Die transhomozygoten Fliegen, bei denen die EMS-Mutation im Bereich der Defizienz liegt, schlüpfen nicht, da sich die beiden homologen Chromosomen an der Stelle der EMS-Mutation nicht

komplementieren können. Für die Kreuzungen werden anfangs Stämme des Defizienzen-Kits verwendet, die relativ große Deletionen tragen. Bei erfolgter Nicht-Komplementation wird dieser Bereich dann kontinuierlich durch Verwendung von Fliegenstämmen, die kleinere Deletionen in diesem Gebiet besitzen, eingeschränkt. Wenn der Bereich schließlich nur noch wenige Gene beinhaltet, können Kreuzungen mit Nullallelen (sofern erhältlich) der entsprechenden Gene durchgeführt werden. Kreuzungen, die Nicht-Komplementation ergeben, werden auch hinsichtlich des Phänotyps untersucht. Dies ist notwendig, da durch das Mutagen EMS mehrere Mutationen im Genom erzeugt worden sein können und somit überprüft werden muss, ob der durch Komplementationskreuzungen identifizierte Bereich auch die Mutation beinhaltet, die für den glialen Phänotyp der homozygoten EMS-Mutante verantwortlich ist.

### 2.6 Enhancer-Trap-Stämme und das Gal4/UAS-System

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Vielzahl verschiedener Enhancer-Trap-Stämmen verwendet. Dabei handelt es sich um transgene Fliegenstämmen, in deren Genom durch zufällige Insertion ein P-Element Vektor (ein speziell modifiziertes transposables Element) eingebracht wurde, der ein Reporter gen trägt. Als Reporter gen fungiert häufig das klonierte *lacZ*-Gen von *Escherichia coli*, welches für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) kodiert und mittels histochemischer Reaktionen (Antikörper gegen  $\beta$ -Gal) nachgewiesen werden kann. Ein weiterer häufig verwendeter Reporter ist das klonierte Gen des „Grünfluoreszierenden Proteins“ (GFP) aus der Hydromeduse *Aequoria victoria*, welches durch gezielte Bestrahlung (Anregungsmaxima liegen bei etwa 395nm und 475nm) Licht im grünen Spektrum emittiert (Emissionsmaximum liegt bei 509nm). Gerät ein P-Element Vektor aufgrund seiner zufälligen Insertion in das Genom in den Einflussbereich eines Enhancers, so kommt es zur Expression des Reporter gens (ohne die Wirkung eines Enhancers ist dies nicht der Fall, da der Vektor lediglich einen passiven Promotor in Form einer TATA-Box aufweist). Dadurch wird das jeweilige Reporter gen im gleichen räumlichen und zeitlichen Muster exprimiert, wie das durch den entsprechenden Enhancer aktivierte native Gen (daher der Name „Enhancer-Trap“).

Eine Weiterentwicklung der „Enhancer-Trap“ Methode stellt das von Brand und Perrimon (1993) entwickelte Gal4/UAS-System dar, welches eine gewebs- bzw. zellspezifische ektopische Genexpression von faktisch jedem klonierten Gen in *Drosophila* ermöglicht. Dazu wird zum einen die so genannte Treiberlinie benötigt, in welcher ein P-Element Vektor eingebracht wurde, der anstelle eines Reporter gens Gal4 exprimiert. Gerät nun dieses veränderte P-Element unter den Einfluss eines endogenen Enhancers, wird folglich Gal4 im spezifischen Expressionsmuster dieses Enhancers gebildet. Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor aus *Saccaromyces cerevisiae*, der normalerweise an eine als „upstream activating sequence“ (UAS) bezeichnete regulatorische Region im Hefegenom bindet und dadurch die Genexpression des nachgeschalteten Gens induziert. Im *Drosophila* Genom kann Gal4 hingegen keine Zielgene aktivieren. Wird aber eine Gal4-Treiberlinie mit einem transgenen Fliegenstamm verkreuzt, in dessen Genom eine UAS-Sequenz mit einem darauf folgenden klonierten Gen X eingebracht wurde (Responderlinie), kommt es in der Folgegeneration (F1) in allen Zellen die Gal4 bilden auch zur Expression des Gens X (Abb. 2-1). Mittlerweile existieren tausende verschiedener Gal4-Linien mit unterschiedlichsten Expressionsmustern, die für die ektopische Genexpression in *Drosophila* eingesetzt werden können. Zudem sind mannigfache UAS-Konstrukte verfügbar, die eine gezielte Expression von Markergenen (z.B. UAS-lacZ und -GFP) oder Entwicklungsgenen (auch im mutanten Hintergrund, siehe dazu nächsten Abschnitt genetische „Rescue-Experimente“) ermöglichen.



**Abb. 2-1: Ektopische Genexpression in *Drosophila* durch das Gal4/UAS-System**

In der Treiberlinie (Gal4-Linie) steht die Expression des Transkriptionsfaktors Gal4 unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers, der ein spezifisches Expressionsmuster aufweist. Wird dieser Fliegenstamm (P1) mit einer Responderlinie (P2) verkreuzt, die ein UAS-Konstrukt mit einem darauffolgenden Gen X trägt, wird dieses Gen X in der F1-Generation ektopisch in allen Zellen exprimiert, in denen Gal4 gebildet wird. Für Details siehe Text. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Dr. C. Berger)

### 2.6.1 Genetische „Rescue-Experimente“ unter Einsatz des Gal4/UAS-Systems

Im vorausgegangenen Abschnitt wurde erläutert, dass es mittels spezifischer Gal4-Linien unter anderem möglich ist, entwicklungsrelevante Gene ektopisch zu exprimieren. Davon wird im Rahmen von sogenannten (genetischen) „Rescue-Experimenten“ gebrauch gemacht. Hierzu wird in einer bekannten Mutante X das betroffene Gen (via UAS-X) unter Einsatz einer spezifischen Gal4-Linie wieder funktionell in bestimmten Zellen exprimiert. Resultiert daraus eine Reduzierung oder gar vollständige Unterbindung eines ansonsten in der Mutante X auftretenden Phänotyps, spricht man davon, dass der Phänotyp aufgrund der ektopischen Expression „gerettet“ wurde. Anhand der verwendeten Treiberlinie kann durch derartige „Rescue-Experimente“ ermittelt werden, in welchen Zellen das Genprodukt X normalerweise benötigt wird (um eine Ausprägung des entsprechenden Phänotyps zu verhindern).

## 2.7 Immunohistochemie

### 2.7.1 Verwendete Antikörper

Tab. 2-2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-β-Galaktosidase	Hühnchen	1:1000	Abcam
anti-BP102	Maus	1:20	DSHB
anti-BrdU	Maus	1:100	BD Biosciences
anti-Castor	Kaninchen	1:500	Odenwald, W.
anti-Eg	Kaninchen	1:5000	Dittrich et al., 1997
anti-En	Kaninchen	1:800	Santa Cruz Biotechnology
anti-Fas2 (1D4)	Maus	1:5	DSHB
anti-Fra	Kaninchen	1:500	Kolodziej et al. 1996
anti-Futsch (22C10)	Maus	1:10	DSHB
anti-GFP (B34)	Maus	1:1000	GeneTex
anti-HA	Ratte	1:50	Roche Diagnostic GmbH
anti-Hb	Meerschweinchen	1:1000	Urban, J.
anti-Htl	Kaninchen	1:1000	Saigo, K.
anti-Lbe	Maus	1:2	Jagla et al., 1997
anti-Mirr	Kaninchen	1:1000	McNeill et al., 1997
anti-Msh	Kaninchen	1:50	Doe, C.
anti-Naz	Meerschweinchen	1:500	Altenhein, B.
anti-Pdm1	Kaninchen	1:500	Yeo et al., 1995
anti-PH3	Kaninchen	1:500	Stollewerk, A.
anti-Pros	Maus	1:5	DSHB
anti-Repo (4α3)	Kaninchen	1:500	Halter et al., 1995
anti-Repo (8D12)	Maus	1:5	DSHB
anti-Repo	Ratte	1:2000	Yuasa Yoshihiro
anti-α-Tubulin (AA4.3)	Maus	1:5	DSHB
anti-Vnd	Kaninchen	1:1000	McDonald et al., 1998

### 2.7.2 Chemische Dechorionisierung der Embryonen

Zur chemischen Beseitigung der äußersten Eihülle, dem Chorion (Dechorionisierung), überschichtet man die Embryonen von Eiablagen für 2-3min mit 6%iger Chlorbleichlauge. Anschließend werden sie in eine modifizierte 50ml Röhre (Firma SARSTEDT) eingespült, welche an einem Ende mit einem Gazenetzen verschlossen ist. Durch Nachspülen mit reichlich Leitungswasser wird die

Chlorbleichlauge sukzessiv beseitigt. Danach können die im Gazenetzen hängenden Embryonen mit einem stumpfen Skalpell abgeschabt und ins Fixativ überführt werden.

### **2.7.3 Fixierung und Devitellinisierung der Embryonen**

Chemisch dechorionisierte Embryonen werden in ein Fixativ überführt, welches sich aus zwei Phasen zusammensetzt. Die untere Phase enthält 430µl PEMS-Puffer und 70µl 37%iges Formaldehyd (6%iges Fixativ), die obere 500µl Heptan. Während einer Zeitspanne von ca. 21-23min auf einem Schüttler bei ca. 900U/min erfolgt die Fixierung, während der das im Fixativ enthaltene Formaldehyd Quervernetzungen zwischen Proteinen induziert. Im Anschluss an die Fixierung erfolgt die Devitellinisierung, d.h. die Beseitigung der unter dem Chorion liegenden zweiten Eihülle, der Vitellinmembran. Dazu wird zunächst die untere Phase abgezogen und durch Methanol ersetzt. Danach werden die Embryonen für 1min intensiv geschüttelt. Dadurch entstehende Scherkräfte an der Phasengrenze führen dazu, dass die Vitellinmembran der Embryonen aufreißt und abgestreift wird. Vollständig devitellinisierte Embryonen erscheinen weißer und sinken zu Boden. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Anschließend wird der komplette Überstand abgezogen und dreimal mit Methanol gespült, um möglichst das gesamte Heptan heraus zu waschen. Zuletzt erfolgt ein zehnminütiger Waschschrift in Methanol. Die fertig fixierten und devitellinisierten Embryonen können entweder direkt für Antikörperfärbungen genutzt oder in Methanol bei -20°C eingefroren werden. Stämme, bei denen endogenes GFP detektiert werden soll, müssen hingegen in Ethanol eingefroren werden, da Methanol das GFP schädigt.

### **2.7.4 Präparation und Fixierung von L3-Wanderlarven**

Für die Präparation von L3-Wanderlarven werden diese zunächst auf Sylgard 186-beschichteten Petrischalen mittels feiner Präpariernadeln anterior und posterior festgesteckt und mit einem Tropfen 1xPBS überschichtet. Dann werden sie entlang der dorsalen Mittellinie (ML) mit einer feinen Schere aufgeschnitten und beidseitig des Schnittes die Körperwände durch den Einsatz weitere Nadeln flach aufgespannt.

Dabei geschieht es häufig, dass insbesondere die nach dorsal projizierenden ersten abdominalen Nerven reißen. Nahezu immer unbeschädigt ist hingegen der letzte abdominale Nerv A8, welcher die Larve longitudinal durchzieht, und dessen Verlauf gut verfolgt werden kann. Aus diesem Grund wurden für quantitative Analysen stets die PGs entlang dieses Nervs ausgezählt. Nachdem die Larve flach aufgespannt ist, wird vorsichtig der Darm mit einer Pinzette entfernt. Auf diese Weise werden mehrere L3-Larven innerhalb einer Petrischale präpariert. Anschließend wird das PBT abgezogen und durch das Fixativ (37%iges Formaldehyd in 1xPBS im Verhältnis 1:9) ersetzt. Die Fixierung erfolgt für 45min unter dem Abzug. Danach wird mehrmals mit 0,3%igem PBT gespült und für mindestens 1Std. mit PBT gewaschen. Als nächstes werden die Tracheen und eventuell noch vorhandene Reste des Fettkörpers mit einer Pinzette entfernt. Als letztes werden die Nadeln herausgezogen und die fixierten Larven in Reaktionsgefäße mit 0,3%igen PBT überführt, in dem abschließend die Antikörperfärbung durchgeführt wird.

### **2.7.5 Inkubation des primären Antikörpers**

Vor der Inkubation mit primären Antikörpern erfolgen drei Spülschritte mit PBT (für Embryonen wird 0,1%iges, für L3-Larven hingegen 0,3%iges PBT verwendet). Dadurch wird zum einen eventuell noch vorhandenes Methanol bzw. Ethanol ausgewaschen, zum anderen werden durch das im PBT enthaltene Triton X-100 die Zellmembranen perforiert, so dass Antikörper in das Gewebe eindringen können. Es folgen zwei zehnmündige Waschrötte (auf dem Schüttler bei etwa 100U/min) mit PBT. Anschließend wird das PBT abgezogen und der primäre Antikörper (verdünnt in PBT) zugegeben. Erfahrungsgemäß erfolgt eine spezifischere Bindung des primären Antikörpers bei einer Inkubation üN bei 4°C auf einem Schüttler.

### **2.7.6 Inkubation des sekundären Antikörpers**

Nachdem der primäre Antikörper abgezogen wurde, wird erneut vier- bis fünfmal mit PBT gespült und darauf folgend viermal für 10min mit PBT gewaschen (weiterhin wird für Embryonen 0,1%iges und für L3-Larven 0,3%iges PBT verwendet). Als nächstes wird der ebenfalls in PBT verdünnte sekundäre Antikörper aufgetragen. Im



Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper verwendet (siehe Abschnitt 2.7.7.), als auch sichtbare Färbungen durchgeführt, bei denen Biotin- (siehe Abschnitt 2.7.8) und/oder AP (alkalische Phosphatase; siehe Abschnitt 2.7.9) -gekoppelte sekundäre Antikörper eingesetzt wurden. Aufgrund der höheren Spezifität der sekundären Antikörper im Vergleich zu den primären Antikörpern, reicht bei den sekundären Antikörpern eine zweistündige Inkubationsdauer bei Raumtemperatur (RT) aus.

### **2.7.7 Fluoreszenzfärbungen**

Bei Fluoreszenzfärbungen müssen die Proben ab Zugabe der fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper im Dunkeln gehalten werden, damit die Fluoreszenzfarbstoffe nicht vorzeitig ausbleichen. Prinzipiell wurden Alexa488, FITC, Cyanin3 und Cyanin5 konjugierte sekundäre Antikörper, jeweils verdünnt in PBT (1:125) eingesetzt. Nach Entfernen der sekundären Antikörper folgen zunächst vier Spül- und dann vier Waschschriffe mit PBT (weiterhin wird für Embryonen 0,1%iges und für L3-Larven 0,3%iges PBT verwendet). Anschließend wird das PBT durch zweimaliges Spülen mit 1xPBS beseitigt. Im letzten Schritt wird das PBS vollständig abgezogen und die Embryonen in 70%igen Glycerol eingebettet. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop oder dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM). Dazu werden die Präparate in „Mounting-Medium“ (Vectashield) überführt und mit einem Deckgläschen bedeckt, welches seinerseits durch Nagellack fixiert wird. Im Falle von präparierten L3-Larven werden die Deckgläschen mit „Wachsfüßchen“ als Abstandhalter versehen, um die Larven nicht zu zerquetschen.

### **2.7.8 Sichtbare Färbung mit Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpern**

Nach der Inkubation mit biotinylierten sekundären Antikörpern wird viermal mit 0,1%igen PBT gespült und viermal für 10min auf einem Schüttler mit PBT gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wird der zuvor angesetzte Avidin-Streptavidin-Merrettichperoxidasekomplex (AB-Komplex, Vectastain Elite ABC, Vector Labs) zugegeben und für 1Std. bei RT inkubiert. Durch

den AB-Komplex werden mehrere Merrettichperoxidase-Moleküle spezifisch an den biotinylierten sekundären Antikörper gebunden, wodurch die nachfolgende Merrettichperoxidase-vermittelte Farbreaktion gesteigert wird. Nach Entfernung des ungebundenen AB-Komplexes durch mehrmaliges Spülen und Waschen mit PBT wird die Farbnachweisreaktion durch Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) und  $H_2O_2$  eingeleitet. DAB wird dabei von der Merrettichperoxidase oxidiert wobei  $H_2O_2$  als Oxidationsmittel fungiert. Aufgrund daraus resultierender Doppelbindungen innerhalb des DAB-Moleküls erscheint ein bräunlicher Niederschlag. Da es sich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, hängt die Intensität der Färbung von der Dauer der Reaktion ab. Aus diesem Grund wird die Färbereaktion unter dem Binokular beobachtet und bei ausreichender Stärke durch Waschen mit PBT abgestoppt. Zuletzt werden die Embryonen mit PBS gewaschen und dann in 70%iges Glycerol überführt. Die gefärbten Embryonen sind nahezu unbegrenzt konservierbar und können lichtmikroskopisch analysiert werden.

### **2.7.9 Sichtbare Färbungen durch alkalische Phosphatase**

Eine zweite Möglichkeit für sichtbare Färbungen ist die Verwendung eines sekundären Antikörpers, an den alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Da die AP am effektivsten im alkalischen Milieu arbeitet erfolgt zunächst ein fünfminütiger Waschriff mit einem AP-Detektionspuffer, der einen pH-Wert von 9,5 aufweist. Auch die anschließende Farbreaktion findet in alkalischem Milieu statt. Dazu wird eine Färbelösung bestehend aus 1ml AP-Detektionspuffer, 3 $\mu$ l Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 1,5 $\mu$ l 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) zu den Embryonen gegeben. AP katalysiert die Umsetzung von BCIP zu einem Indigo-Farbstoff. Die Intensität der Färbung wird unter dem Binokular beobachtet und durch Zugabe von PBT abgestoppt. Nach dreimaligen Spülen mit PBT werden die Embryonen für 10min mit Methanol gewaschen um die AP-Reaktion vollends zu beenden. Anschließend werden die Embryonen zweimal mit PBT, dann einmal mit PBS gespült und in 70%iges Glycerol überführt. Genauso wie für die im Voraus beschriebene Merrettichperoxidase-vermittelte Färbung bleibt auch die AP-induzierte Färbung über Jahre erhalten.

### **2.7.10 Phalloidin-Färbungen von Embryonen**

Bei Phalloidin handelt es sich um ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) welches spezifisch an F-Aktin bindet. Durch die Verwendung von Fluoreszenzkonjugiertem- (Alexa488) Phalloidin ist es daher möglich, das Zytoskelett von Zellen zu visualisieren. Da die Bindungsstellen des Phalloidins durch Methanol irreversibel zerstört werden, können Embryonen für die Phalloidin-färbung nicht wie im Abschnitt 2.7.3 beschrieben fixiert und devittelinisiert werden. Aus diesem Grund wurden Filetpräparate von unfixierten Embryonen angefertigt. Dazu werden die Embryonen zunächst mit einem Skalpell von den Apfelagarplatten auf ein mit doppelseitigem Klebeband beschichtetes Deckgläschen überführt und mit Hilfe einer Präpariernadel mechanisch dechorionisiert. Als nächstes werden die dechorionisierten Embryonen mit der ventralen Seite auf einem mit Heptankleber beschichteten Objektträger fixiert und von einem Rähmchen aus Buchbindefolie umgeben. Damit die Embryonen nicht austrocknen, werden sie mit einem großen Tropfen 1xPBS überschichtet, wobei der Rahmen das Auslaufen der Flüssigkeit verhindert. Anschließend werden mit einer ausgezogenen Glaskapillare Filetpräparate der Embryonen hergestellt. Hierzu werden sie zunächst mit der Kapillare von posterior angestochen, aus der Vitellinmembran gehoben und erneut mit der ventralen Seite auf dem Heptankleber fixiert. Dann wird die Dorsalseite vorsichtig geöffnet, die beiden Körperwände des Embryos flach auf dem Objektträger abgelegt und der Darm herauspräpariert. Nachdem etwa zehn Embryonen auf diese Weise präpariert wurden, erfolgt die Fixierung. Dazu wird das PBS möglichst vollständig abgezogen und durch methanolfreies 4%iges Formaldehyd (Ultrapure, Polysciences, Inc.) ersetzt. Die Fixierungsdauer beträgt 50min bei RT. Alle nachfolgenden Spül- und Waschrinne, sowie die Inkubation der Antikörper erfolgen auf dem mit Heptan beschichteten Objektträger. Zunächst wird das Fixativ durch mehrmaliges Spülen mit 0,1%igem PBT beseitigt und nach vier weiteren 10-minütigen Waschrinne mit PBT erfolgt die Inkubation mit Alexa488-konjugierten Phalloidin und gegebenenfalls weiterer primärer Antikörper üN bei 4°C. Danach werden ungebundenes Phalloidin und primärer Antikörper durch mehrmaliges Spülen und Waschen mit PBT entfernt. Falls zusätzlich zu Phalloidin noch ein weiterer primärer Antikörper eingesetzt wird, muss anschließend noch der sekundäre fluoreszenzgekoppelte Antikörper zugegeben werden. Nach erneutem ausgiebigen

Spülen und Waschen mit PBT wird zweimal mit 1xPBS gespült. Zuletzt wird das Rähmchen um die Embryonen mit einer Pinzette entfernt und die Filetpräparate nach Zugabe von 70%igem Glycerol mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zur Fixierung des Deckgläschens wird erneut Nagellack verwendet.

### 2.7.11 BrdU-Färbungen in L3-Wanderlarven

Durch Verfütterung von Bromdesoxyuridin (BrdU)-haltigem Nährbrei wird im Rahmen dieser Arbeit das Proliferationsverhalten der PGs im Verlauf der Larvalentwicklung untersucht. BrdU ist ein Basenanalogen von Thymidin und wird im Zuge der DNA-Replikation (S-Phase des Zellzyklus) in die DNA inkorporiert. BrdU kann durch spezifische Antikörper detektiert werden, wodurch sich nach Verfütterung von BrdU ereignete DNA-Replikationen nachweisen lassen. Für die Herstellung des BrdU-haltigen Futterbreis wird zunächst eine Stammlösung angesetzt, indem 10mg BrdU in 600µl Wasser und 400µl Ethanol gelöst werden. 100µl dieser BrdU-Stammlösung werden zusammen mit 1ml Wasser in speziell vorbereitete Ablageröhrchen gegeben. Die Ablageröhrchen bestehen aus einem etwa 5cm hohen Abschnittes eines 15ml Röhrchens (Firma SARSTEDT), welches an der Unterseite durch Parafilm verschlossen ist. Durch Zugabe von Instantmedium (siehe Abschnitt 2.3) und Hefe wird die Flüssigkeit in dem Ablagegefäß eingedickt und das Röhrchen oben mit einem luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen. Um die DNA-Replikationen während der gesamten Larvalentwicklung zu detektieren, wurden Stundenablagen von Embryonen mechanisch dechorionisiert und 20-40 Tiere kurz vor dem Schlüpfen aus der Vittelinmembran auf die vorbereiteten Ablageröhrchen gegeben. Danach wurden sie während ihrer gesamten Larvalentwicklung, bis zum Erreichen des L3-Wanderlarvenstadiums (nach ca. 96Std.) auf dem BrdU-haltigem Futterbrei belassen und anschließend präpariert (siehe Abschnitt 2.7.4). Um die Proliferation der PGs während der drei Larvenstadien von *Drosophila* getrennt zu untersuchen, wurden Larven zeitlich begrenzt auf BrdU-haltigem Nährboden gehalten. Dies erfolgte in drei parallelen Ansätzen. Im ersten Ansatz wurden Larven lediglich während der ersten 24Std. (entspricht etwa dem L1-Larvenstadium), im zweiten Ansatz von 24-48Std. nach dem Schlüpfen der Embryonen (entspricht in etwa dem L2-Larvenstadium) und im dritten Ansatz von 48-96Std. nach dem Schlüpfen der Embryonen auf BrdU-haltigem Brei gehalten. Die Larven aller drei

Ansätze wurden später mit dem Erreichen des L3-Wanderlarvenstadiums präpariert. Für die Fixierung wird Carnoy's Fixativ verwendet, welches sich aus sechs Volumenteilen Ethanol, drei Volumenteilen Chloroform und einem Volumenteil konzentrierter Essigsäure zusammensetzt. Die Fixationsdauer beträgt 15-17min. Danach werden die Larven in ein Eppendorf Gefäß überführt und schrittweise rehydriert, indem zunächst für 10min. mit 40% Ethanol gewaschen und dann zwei- bis dreimal mit 0,3%igem PBT gespült wird. Um eine Bindung des Antikörpers an BrdU zu ermöglichen, wird die DNA anschließend durch eine 10-minütige Inkubation mit 2N HCl denaturiert. Darauf folgend wird sorgfältig (mindestens 5x) mit 0,3%igem PBT gespült und die Larven für eine weitere Std. in PBT belassen. Dann wird üN bei 4°C mit primärem Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Inkubation mit sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpern (siehe Abschnitt 2.7.6 und 2.7.7).

## 2.8 *In-situ*-Hybridisierungen (ISH)

### 2.8.1 Verwendete mRNA-Sonden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten und in der Tab. 2-3 aufgelisteten DIG-markierten Sonden zum spezifischen Nachweis von mRNA wurden mir freundlicherweise von Mitarbeitern bzw. Diplomanden unseres Institutes zur Verfügung gestellt.

**Tab. 2-3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten mRNA-Sonden**

Sonde gegen	Bezugsquelle
CG9336	Dr. B. Altenhein
<i>NetA</i>	Dr. A. Stollewerk
<i>NetB</i>	J. Dietrich
<i>Fra</i>	Dr. B. Altenhein
<i>Unc5</i>	Dr. B. Altenhein

### **2.8.2 Hybridisierung**

Um einen Verdau der RNA-Sonden zu verhindern, müssen sämtlich Arbeitsschritte unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden. Dazu werden unter anderem alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angesetzt. Zunächst werden die Embryonen chemisch dechorionisiert (siehe Abb. 2.7.2) und entsprechend der im Abschnitt 2.7.3 beschriebenen Prozedur fixiert und devittelinisiert. Anschließend folgen mehrere Waschrritte mit 0,1%PBT. Im Falle einer Fluoreszenz-ISH (FISH) werden die Embryonen noch einem Reduktionsschritt unterzogen, indem sie für 10min in Natriumborhydrid (0,001g/ml PBS) inkubiert werden, welches die im Zuge der Fixierung gebildeten Mehrfachbindungen reduziert und somit eine zu starke Autofluoreszenz verhindert. Darauf folgend werden die Embryonen erneut gründlich mit PBT gewaschen. Danach wird PBT schrittweise durch Hybridisierungspuffer ersetzt und für mindestens 1Std. bei 55°C prähybridisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird der Hybridisierungslösung noch einzelsträngige Heringssperma-DNA zugegeben (5µl/500µl Hybridisierungslösung). Im Anschluss an die Prähybridisierung werden die zu verwendenden Sonden zunächst für 10min bei 95°C denaturiert und nach einer kurzen Abkühlphase auf die Embryonen gegeben. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgt üN auf einem Thermoschüttler bei 55°C. Am nächsten Tag wird die Sonde abgezogen. Die Embryonen werden dann für jeweils eine halbe Std. bei 65°C auf einem Thermoschüttler schrittweise in Hybridisierungspuffer, Hybridisierungspuffer/PBT (1:1) und PBT gewaschen. Nach einigen weiteren Waschrritten in PBT bei RT wird entweder ein AP- (sichtbare ISH) oder POD-gekoppelter (bei FISH) anti-DIG-Antikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei 4°C üN.

### **2.8.3 Signaldetektion**

Nach Inkubation mit primärem anti-DIG-Antikörper werden die Embryonen gründlich mit PBT gewaschen und es folgt die Farbreaktion. Im Falle von sichtbaren ISH unter Einsatz eines AP-gekoppelten anti-Dig-Antikörpers siehe Abschnitt 2.7.6 und 2.7.9. Für FISH unter Verwendung von POD-gekoppelten anti-DIG-Antikörpern werden die Embryonen zunächst 2x für jeweils 5min mit TNT-Puffer gewaschen und dann für

10min in Färbelösung (Cy3/Reaktionslösung 1:50; gemäß der Anleitung des verwendeten Perkin Elmer FISH Kits) inkubiert. Anschließend werden die Embryonen erneut mit TNT-Puffer gewaschen und das FISH-Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. In dieser Arbeit wurden die (F)ISH meist mit Antikörperfärbungen gegen Repo kombiniert. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgt entsprechend dem Abschnitt 2.7.5. Für sichtbare ISH wird darauf folgend biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet (siehe Abschnitt 2.7.6 und 2.7.8) und für FISH ein fluoreszenzgekoppelter sekundärer Antikörper (siehe Abschnitt 2.7.6 und 2.7.7).

## 2.9 Filet-Präparation von Embryonen

Die Filet-Präparation ermöglicht eine Aufsicht auf das flache, freigelegte Nervensystem (ZNS und PNS) von *Drosophila* Embryonen. Im Zuge dieser Arbeit wurden Embryonen der St. 9-16 (entsprechend Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) präpariert. Dazu werden sie zunächst in 70%igen Glycerol auf einen Objektträger überführt und die gewünschten St. herausortiert. Bei Embryonen der Entwicklungsstadien 9-12 wird der nach dorsal reichende verlängerte Keimstreifen mit einer feinen Präpariernadel umgeklappt und anschließend der komplette Embryo um die eigene Achse gedreht, so dass die Aufsicht von ventral erfolgt. Embryonen der Entwicklungsstadien 13-16 werden so positioniert, dass sie mit der Ventralseite auf dem Objektträger aufliegen. Mit einer Präpariernadel wird das anteriore und posteriore Ende abgetrennt und (soweit der Dorsalschluss bereits stattgefunden hat (ab St.15) der Embryo entlang der dorsalen ML geöffnet. Eine Körperwand des Embryos wird vorsichtig heruntergeklappt und auf dem Objektträger abgelegt. Darauffolgend wird der Darm von der Mitte aus über die andere, noch nicht flach aufliegende, Seite des Embryos abgerollt. Dabei ist es insbesondere im St.16 wichtig, die Darmschlingen die das ZNS umgeben vorsichtig zu kappen, da sonst beim Abrollvorgang das Nervensystem mitgezogen wird. Nun liegt auch die zweite Körperwand flach auf dem Objektträger auf. Fertige Präparate werden in einem Tropfen Glycerol (bei sichtbaren Färbungen) bzw. Quenching-Medium (Vectashiled<sup>®</sup>) (bei fluoreszenzgefärbten Embryonen) mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zur Fixierung werden die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack befestigt.

### 2.10 Dokumentation der Färbungen

Für die Dokumentation sichtbarer Färbungen wurde ein aufrechtes Mikroskop Axioskop2 der Firma Zeiss in Kombination mit der CCD-Kamera ProgRes 3012 der Firma Kontron Elektronik verwendet. Dieses Mikroskop ist mit folgenden Plan-Neofluar Objektiven ausgestattet: 10x, 20x, 40x, 63x und 100x (bei den letzten beiden handelt es sich um Immersionsölobjektive)

Fluoreszenzfärbungen bzw. endogenes GFP wurden mit dem aufrechten Fluoreszenzmikroskop BX50 WI der Firma Olympus registriert und mittels der CCD-Kamera AxioCam MRm von Zeiss digitalisiert. Dieses Mikroskop ist mit 10x, 20x, 50x und 63x (Wasserobjektiv) Objektiven ausgestattet.

Konfokale Aufnahmen (Filet-Präparate und 4D-Aufnahmen) erfolgten mit dem aufrechten Laserscanning-Mikroskop DMRE von Leica in Kombination mit eine „True Confocal Scanner“ des Typs TCS SPII, ebenfalls von Leica. Objektive des Mikroskops: HC PL FLUOTAR 10x, HC PLAN APO 20x, HCX PL APO 40x und 63x (Immersionsölobjektive).

Verwendetes Stereomikroskop: Leica MZ 7<sub>5</sub>

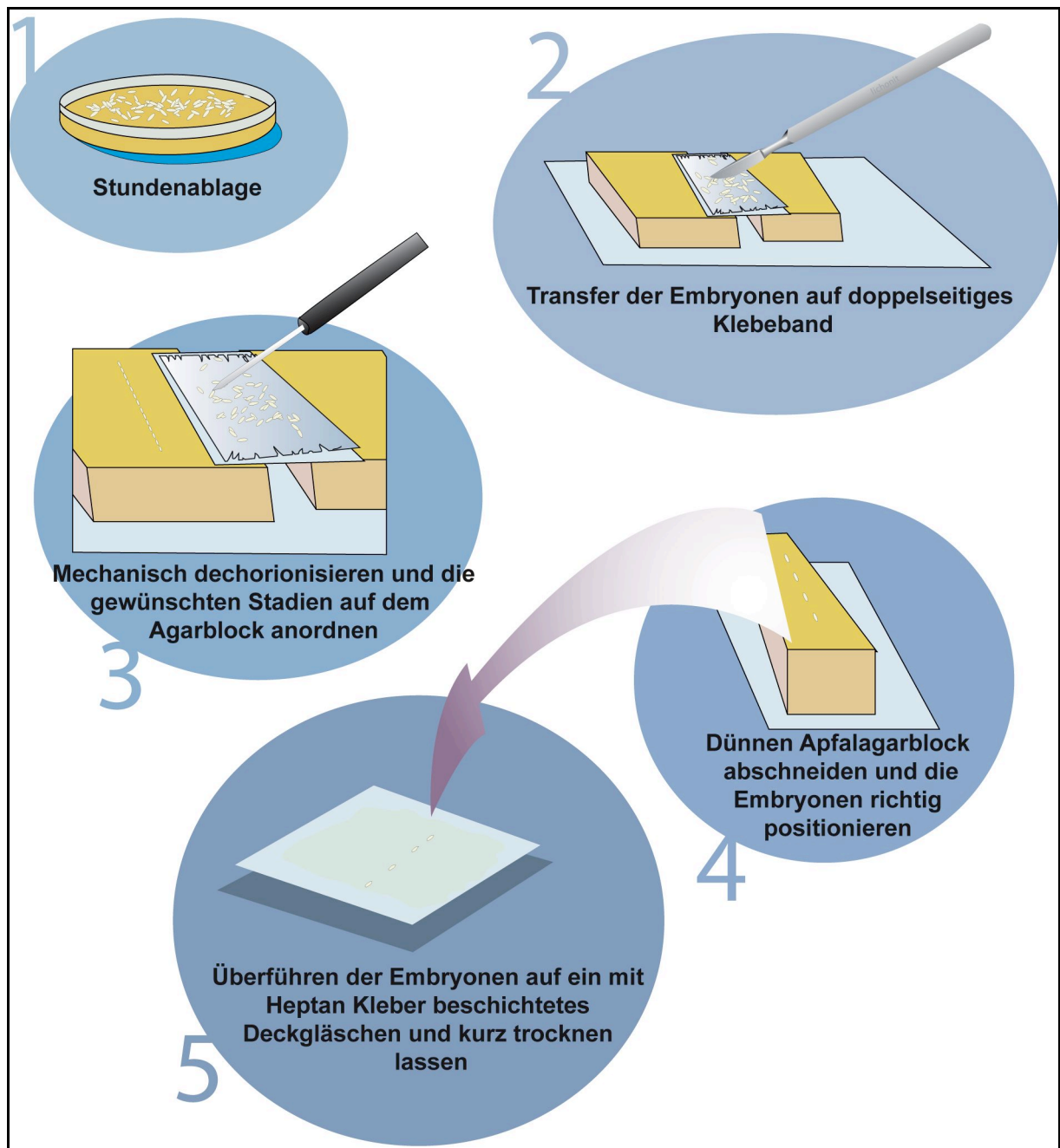
### 2.11 *In vivo* 4D-Aufnahmen

#### 2.11.1 Vorbereitung der Embryonen für *in vivo* 4D-Aufnahmen

Für 4D-Aufnahmen werden Stundenablagen vom Vortag verwendet. Die Haltung der Embryonen erfolgt bis zur Aufnahme bei 18°C, wodurch das GFP-Signal (im Vergleich zur Haltung bei 25°C) minimal verstärkt werden kann. Zunächst werden die Embryonen mit einem Skalpell von der Ablageplatte auf ein mit doppelseitigem Klebeband beschichtetes Deckglaschen überführt und mit Hilfe einer Präpariernadel mechanisch dechorionisiert. Die von der Chorionhülle befreiten Embryonen werden auf einem Apfelagarblock aufgereiht und nach Stadien sortiert, da auch bei



Stundenablagen leichte Variationen auftreten. Bei einigen Aufnahmen mussten zudem unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Embryonen ausselektiert werden, die ein GFP-markiertes Balancerchromosomen tragen. Embryonen des richtigen Entwicklungsstadiums (in der Regel frühes St.13) und Genotyps werden anschließend auf einem neuen, etwa 2cm breiten Apfelagarstreifen so positioniert, dass die ventrolaterale Seite nach oben zeigt. Als nächstes wird ein mit Heptan-Kleber beschichtetes 22mm Deckgläschen mit der Klebeseite auf die Embryonen abgelegt. Bedingt durch den weichen Untergrund ist ein Zerquetschen der Embryonen ausgeschlossen. Beim Abheben des Deckgläschens bleiben die Embryonen am Heptan-Kleber haften. Die bisherigen Einzelschritte zur Vorbereitung der Embryonen für die 4D-Aufnahmen sind in der Abb. 2-2 bildlich zusammengefasst.



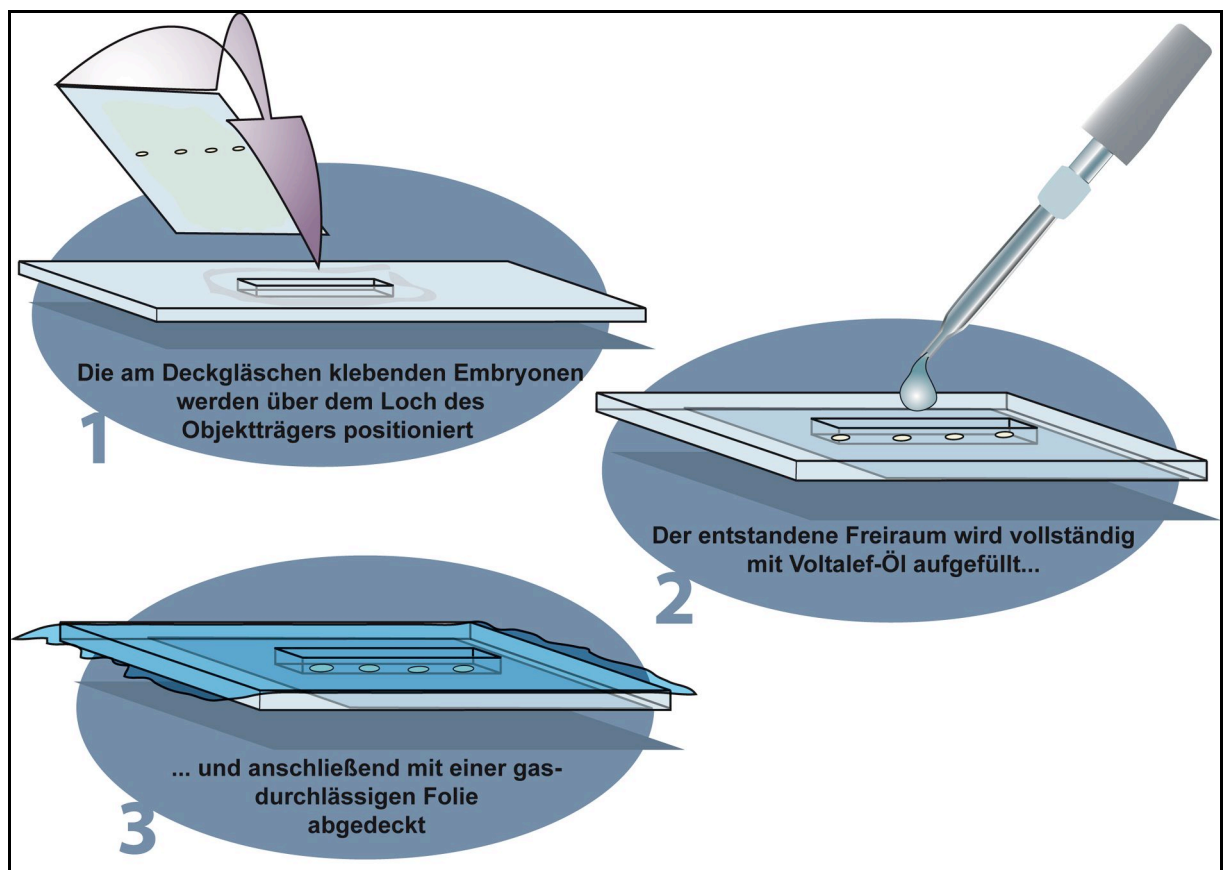
**Abb. 2-2: Schritte zur Vorbereitung der Embryonen für 4D-Aufnahmen**

Erläuterungen siehe Text. (Abb. aus Diplomarbeit von Hilchen, 2005)

Es zeigte sich, dass es hilfreich ist, die am Deckgläschen fixierten Embryonen zunächst kurz zu trocknen um sie dann vorsichtig mit einer Präpariernadel etwas zu plätten. Daraus folgt bei einer idealen Positionierung innerhalb eines weiten Bereiches (der Kontaktfläche mit dem Deckgläschen), eine nahezu lineare Auswanderungstrecke der ePGs, die ansonsten den morphologischen Gegebenheiten folgend, leicht bogenförmig verläuft.

### 2.11.2 Verwendeter Versuchsaufbau für 4D-Aufnahmen

Bereits während meiner Diplomarbeit habe ich einen geeigneten Versuchsaufbau für die 4D-Aufnahmen etabliert (Abb. 2-3). Für die entsprechende Versuchsanordnung wird ein speziell angefertigter Objektträger aus Plexiglas verwendet, der in seiner Mitte ein Loch (Maße: 4mm x 10mm) aufweist. Über dieses Loch wird das Deckgläschen mit den daran haftenden Embryonen (siehe Abschnitt 2.11.1) abgelegt, und die Kontaktfläche zwischen Objektträger und Deckgläschen mit handelsüblicher Vaseline abgedichtet (Abb. 2-3 1). Anschließend wird der Objektträger umgedreht. Der Hohlraum mit den darin befindlichen Embryonen wird vollständig mit Voltalef-Öl gefüllt (Abb. 2-3 2) und mit einer gas- aber nicht flüssigkeitsdurchlässigen Folie (Biofoil 25 von Heraeus) abgedeckt (Abb. 2-3 3). Zur Abdichtung zwischen Folie und Objektträger wird erneut Vaseline verwendet.



**Abb. 2-3: Verwendeter Versuchsaufbau für die 4D-Aufnahmen**  
Erläuterungen siehe Text. (Abb. aus Diplomarbeit von Hilchen, 2005)

Die Aufnahme der Wanderung der ePGs erfolgt von der Seite, auf der sich das Deckgläschen befindet. Da die Embryonen mit ihrer ventrolateralen Seite an dem Deckgläschen kleben, kann die Migration der aus dem ZNS abstammenden ePGs ideal beobachtet werden. Um die Wanderung der dorsal entstehenden ePG10 und ePG11 aufzuzeichnen, wurden die Embryonen etwas lateraler positioniert.

### **2.11.3 Präparation und Antikörperfärbungen von Embryonen im Anschluss an 4D-Aufnahmen**

Aufgenommene Embryonen können im Anschluss an 4D-Aufnahme präpariert und mittels Antikörperfärbungen gefärbt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies zum einen durchgeführt, um die GFP-positiven ePGs in homozygoten Mz97-Embryonen anhand von Antikörperfärbungen gegen Repo eindeutig von anderen GFP-exprimierenden Zellen zu unterscheiden. Zum anderen wurden die Effekte der *in vivo* Ablationen von ePGs auf die peripheren Nerven anhand von durchgeführten Fas2-Färbungen analysiert. Um einen Embryo nach erfolgter *in vivo* Aufnahme färben zu können, muss er zunächst wieder aus der im vorausgegangenen Abschnitt beschriebenen Versuchsanordnung freigelegt werden. Dazu wird die Folie entfernt, das Deckgläschen mit den daran haftenden Embryonen vom Objektträger gelöst und so abgelegt, dass die Embryonen nach oben orientiert sind. Anschließend wird das Voltalef-Öl (sowie alle nicht aufgenommenen Embryonen) mit einem Skalpell so gut wie möglich weggekratzt. Daraufhin wird noch verbliebenes Voltalef-Öl mit Taschentüchern weggewischt und der Embryo mit Heptan überschichtet. Das Heptan beseitigt letzte Ölreste und löst den Embryo vom Deckgläschen. So bald es möglich ist den Embryo mit einer Präpariernadel aufzunehmen, wird dieser auf ein neues, mit Heptan beschichtetes Deckgläschen übertragen. Danach wird der bereits dechorionisierte Embryo entsprechend der in Abschnitt 2.7.10 beschriebenen Methode präpariert und gefärbt. Für das Fixativ muss nicht zwangsläufig methanolfreies 4%iges Formaldehyd verwendet werden.

### **2.11.4 Auswertung und Bearbeitung der 4D-Aufnahmen**

Für die Auswertung der 4D-Aufnahmen wurde die Simi-BioCell<sup>®</sup> Software (Version 3.3.133, SIMI reality motion systems GmbH, Unterschleißheim, Deutschland)

verwendet, mit der es möglich ist individuelle Zellen (oder Zellkerne) im gesamten Verlauf der Aufnahme zu markieren (Schnabel et al., 1997). Zuvor müssen die LSM Dateien allerdings umbenannt werden, was unter der Verwendung der Software Joe (Version 3.1a) erfolgte. Zur Erstellung der Filme, in denen alle aufgenommenen ePGs zusammen dargestellt werden (die normalerweise in unterschiedlichen konfokalen z-Ebenen der LSM Aufnahmen liegen), werden zunächst die konfokalen Ebenen in denen sich die einzelnen ePGs zum Zeitpunkt einer z-Stapelaufnahme befinden mittels Adobe<sup>®</sup> Photoshop CS2 (Version 9.0, Adobe System Inc.) zusammengelagert. Anschließend werden diese Bilder mit der Software Quick Time Player Pro (Version 7.0.4, Apple Computer Inc.) zu einem Film zusammengefügt und gegebenenfalls noch Symbole mittels der Software Macromedia<sup>®</sup> Director<sup>®</sup> 8.5 Shockwave<sup>®</sup> Studio (Version 8.5, Macromedia Inc.) eingefügt.

### **2.11.5 *In vivo* Ablation via UV- und Argon-Ionen-Laserbestrahlung**

Für die *in vivo* Ablation werden Embryonen entsprechend dem Abschnitt 2.11.1 vorbereitet und es wurde der in Abschnitt 2.11.2 beschriebene Versuchsaufbau verwendet. Sämtliche Ablationen erfolgten an einem inversen LSM (Leica TCS SP5), welches im Gegensatz zum LSM der AG Technau zusätzlich mit einem UV-Laser ausgerüstet ist. Sobald die ePG9 anhand eines GFP-Signals im Verlauf von 4D-Aufnahmen detektiert werden konnte, wurde so weit wie möglich auf ihren Zellkern herangezoomt. Dann wurde die z-Ebene gewählt, die in etwa in der Mitte des Zellkerns liegt und dieser für etwa 15-20min gleichzeitig mit dem Argon-Ionen- und UV-Laser bestrahlt (Laserintensität jeweils 100%, Frequenz 1400Hz). Anschließend wurde die 4D-Aufnahme fortgesetzt und bei einem gegebenenfalls wiederaufkommenden GFP-Signal der Vorgang der Bestrahlung wiederholt. Etwa im St.16 wurden die *in vivo* Aufnahmen abgebrochen und die aufgenommenen Embryonen präpariert und gegen Repo und Fas2 gefärbt (siehe Abschnitt 2.11.3).

## 2.12 Single-Embryo-PCR und Sequenzierung der kodierenden Region des SCAR Gens in Mz97 und SCAR<sup>169</sup>

### 2.12.1 Isolierung der DNA aus Embryonen

Zur Isolierung der DNA aus Embryonen werden diese zunächst mechanisch dechorionisiert (siehe Abschnitt 2.11.1). Da nachfolgend die kodierende Region des SCAR Gens von einzelnen Embryonen mittels PCR amplifiziert (Single-Embryo-PCR) und sequenziert werden soll, werden die Embryonen bereits nach der Dechorionisierung vereinzelt und möglichst ohne Verunreinigungen in 1,5ml Eppendorf Caps überführt. In die einzelnen Behältnisse wird als nächstes 10µl Squishing-Puffer (enthält u.a. Proteinase K) gegeben, der darin lokalisierte Embryonen mittels einer Mikropistille homogenisiert und das Zelllysate dann für 1<sup>1/2</sup> Std. bei 37°C im Inkubator belassen. Während dieser Zeit werden Proteine durch die Proteinase K abgebaut. Zuletzt erfolgt die Inaktivierung der Proteinase K, indem die Proben für 1-2min in einen Heizblock (95°C) überführt werden. Die isolierte DNA dient anschließend als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

### 2.12.2 Single-Embryo-PCR und Sequenzierung

Nach Isolierung der DNA aus Einzelembryonen erfolgt die PCR mit zuvor unter Verwendung der Freeware Oligo Calculator (Version 3.23) ermittelten und bei der Firma Operon geordneten Primerpaaren (siehe Anhang, Abschnitt 7.3). Nach Überprüfung der Größe der jeweils amplifizierten DNA-Abschnitte durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die Proben mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR-Purification Kit der Firma QIAGEN aufgereinigt. Die Sequenzierungen der PCR-Produkte wurden von der Firma GENterprise GENOMICS in Mainz durchgeführt.

### 3 Ergebnisse:

#### Teil A:

#### Wildtypische Charakterisierung der Peripheren Gliazellen im Embryo und am Ende der Larvalentwicklung

Die Darstellung der Ergebnisse ist in zwei Teile (A und B) gegliedert, wobei der erste Teil in drei Kapitel weiter unterteilt ist. Kapitel 3.1 umfasst die Identifizierung der embryonalen Peripheren Gliazellen (ePGs) der abdominalen Hemisegmente (HS) A1-A8 auf Einzelzellebene und die detaillierte Beschreibung ihrer wildtypischen Migration im Verlauf der Embryogenese. Dieses Kapitel beinhaltet auch Daten, die bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit erhoben wurden. Dabei handelt es sich um die Charakterisierung der Gal4-Linie Mz97 sowie die Etablierung des Setups für die *in vivo* 4D-Aufnahmen und erster Auswertungen von 4D-Aufnahmen homozygoter Mz97-Embryonen. Durch weitere Experimente im Rahmen meiner Dissertation wurde unter Verwendung der pan-glialen Treiberlinie *repo-Gal4* die Migration aller ePGs dokumentiert und analysiert. Dabei zeigte sich ein relativ stereotypes Muster der Wanderung von ePGs. Außerdem konnten mittels molekularer Marker nahezu alle ePGs auf Einzelzellebene identifiziert und ihr klonaler Ursprung unter Zuhilfenahme der Dil-Technik erschlossen werden. Zusammenfassend resultieren die Ergebnisse in einer detaillierten Beschreibung der Identität, Herkunft und Migration der ePGs, welche in der Zeitschrift „Mechanisms of Development“ (125), 2008 publiziert wurden.

Im zweiten Kapitel (3.2) werden die Ergebnisse verschiedener Ablationsexperimente vorgestellt. Mit dem Ziel, Zellinteraktionen zwischen ePGs bzw. ePGs und den peripheren Nerven aufzudecken, wurden distinkte ePGs *in vivo* zum einen mittels Laserbestrahlung und zum anderen durch ektopische Expression des proapoptischen Gens *head involution defective (hid)* eliminiert und die Auswirkungen auf die verbleibenden ePGs bzw. peripheren Nerven ausgewertet.

Das dritte und letzte Kapitel des ersten Teils (3.3) befasst sich mit der Identifikation und Anordnung der Peripheren Gliazellen (PGs) im späten Larvenstadium (L3-Wanderlarvenstadium).

### 3.1 Charakterisierung der ePGs auf Einzelzellebene und detaillierte Beschreibung ihrer wildtypischen Migration im Verlauf der Embryogenese

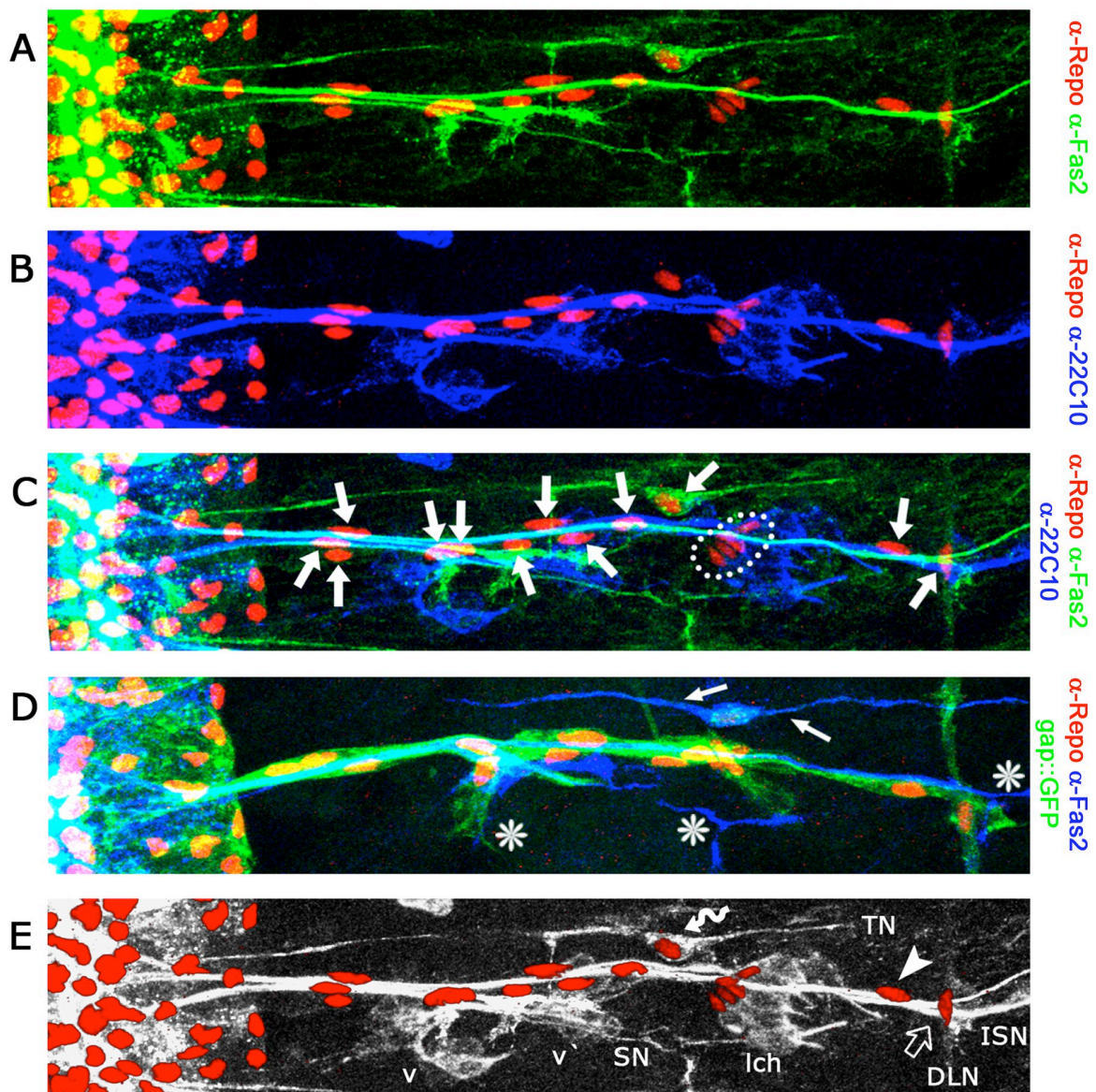
#### 3.1.1 Prinzipielle Anordnung der ePGs am Ende der Embryogenese

Während der aktiven Migrationsphase ändert sich die Lage einzelner ePGs fortwährend. Dagegen stellte sich im Laufe meiner Arbeit heraus, dass die Positionierung distinkter ePGs am Ende der Migration (spätes St.16) lediglich geringen Variationen unterliegt. Daher soll zunächst die grundsätzliche Anordnung der ePGs im späten Embryonalstadium 16 beschrieben werden. Am Ende der Migration (wie auch während der gesamten Migrationsphase) sind die ePGs mit sensorischen und motorischen Neuronen assoziiert, die überwiegend in drei peripheren Nerven faszikuliert vorliegen (Ghysen et al., 1986; Bodmer und Jan, 1987; Gorczyca et al., 1994): dem anterior liegenden Transversalnerv (TN), dem Intersegmentalnerv (ISN; wird auch als anteriores Faszikel bezeichnet) und dem Segmentalnerv (SN; wird auch als posteriores Faszikel bezeichnet). Ein vierter Nerv wird lediglich von einem einzelnen Neuron, dem dorsalen bipolardendritischen Neuron (dbd), gebildet. Dabei handelt es sich um den Dorsalen Longitudinalen Nerv (DLN), der dorsal entlang der anterior-posterioren (A/P) Körperachse des Embryos verläuft. Mit Ausnahme des TN und DLN setzen sich die peripheren Nerven sowohl aus Motorneuronen, die das Zelladhäsionsmolekül Fasziklin2 (Fas2, Abb. 3-1 A, C-E) exprimieren, als auch aus sensorischen Neuronen zusammen, die ihrerseits mit einem spezifischen Antikörper gegen das Protein Futsch (22C10, Abb. 3-1 B-C und E) detektiert werden können. Zur Visualisierung der ePGs wird ein gegen den gliaspezifischen Transkriptionsfaktor Reversed polarity (Repo; Halter et al., 1995) gerichteter Antikörper verwendet (Abb. 3-1 A-E). Repo markiert die Zellkerne sämtlicher lateraler Gliazellen, zu denen auch die ePGs zählen. Prinzipiell können in abdominalen HS 12 Gliazellen in der Peripherie ausgemacht und als ePGs klassifiziert werden. Diese ordnen sich am Ende der Embryogenese an charakteristischen Positionen entlang der peripheren Nerven an. In der Transitionszone nahe des Bauchmarks, einer Region die auch als Exitbereich bezeichnet wird, befinden sich drei ePGs die zuvor bereits als Exitglia bezeichnet wurden (Klämbt und Goodman, 1991; Halter et al., 1995; Schmidt et al., 1997). Zwei



dieser Zellen sind mit dem ISN und die dritte mit dem SN assoziiert. Gelegentlich können eine oder zwei dieser ePGs auch im späten St.16 noch innerhalb des Bauchmarks vorliegen. Weiter distal in der Peripherie ist eine ePG zu sehen, die meistens deutlich mit dem SN assoziiert ist und fünf weitere ePGs, die sich entlang des ISN anordnen und sich dabei bis hin zum lateralen Chordotonalorgan (Ich) oder sogar darüber hinaus erstrecken. Die ebenfalls Repo-positiven fünf Ligamentzellen des Ich (Carlson et al., 1997) werden als Stützzellen dieses Sinnesorgans ohne jeglichen Kontakt zu den peripheren Nerven nicht mit zu den ePGs gezählt. Distal des Ich sind noch zwei weitere ePGs lokalisiert: eine liegt am ISN und die zweite, dorsalste ePG, ist mit dem DLN assoziiert. Am TN kann eine weitere ePG detektiert werden.

Da mittels einer Antikörperfärbung gegen Repo nur die Zellkerne der ePGs detektiert werden können, kann keinerlei Aussage über die zelluläre Ausdehnung einzelner ePGs getroffen werden. Um die Zellumrisse der einzelnen ePGs zu visualisieren, habe ich *repo-Gal4* verwendet, um eine membrangebundene Form von GFP (UAS-*gap::GFP*) in allen lateralen Gliazellen zu exprimieren (Abb. 3-1 D). Zellkörper von ePGs die separiert am SN, TN und DLN vorliegen und als jeweils einzige Gliazellen diese Nervenstränge umhüllen, können dadurch gut erfasst werden. Allerdings ist es nicht möglich, zwischen den Zellumrissen jener ePGs zu unterscheiden, die sich entlang des ISN anordnen. Dazu liegen diese Zellen zu dicht beieinander und sind zu intensiv über zytoplasmatische Ausläufer miteinander verbunden. Gut zu erkennen ist, dass die peripheren Nerven am Ende der Embryogenese nahezu vollständig von den ePGs umhüllt sind. Lediglich die distalen Bereiche des SN und ISN sind noch nicht vollständig von den Ausläufern der ePGs bedeckt (Abb. 3-1 D, Sternchen). Dies ist vermutlich dadurch begründet, dass in diesem Bereich bereits vorhandene Umhüllungen durch Gliazellen die Etablierung und Konsolidierung von neuromuskulären Synapsen behindern könnten (Sepp et al., 2000). Ferner reichen auch die zytoplasmatischen Ausläufer der einzigen mit dem TN assoziierten ePG nicht aus, um diesen Nerv vollständig zu umhüllen (Abb. 3-1 D, dünne Pfeile).



### Abb. 3-1: Anordnung der ePGs entlang der peripheren Nerven am Ende der Embryogenese

Dargestellt sind Ausschnitte von Filetpräparaten, die jeweils das wildtypische PNS eines abdominalen HS im späten St.16 zeigen. Um sowohl die Fas2-positiven motorischen, als auch die 22C10-positiven sensorischen Neurone nebeneinander darzustellen, wurde ein Fas2-Exon-Trap Stamm verwendet (A-C und E). Zur Visualisierung der Zellumrisse wurde *repo*-Gal4 mit UAS-gap::GFP (grün) kombiniert (D). Die Zellkerne der ePGs sind jeweils durch spezifische Antikörperfärbungen gegen Repo (rot) markiert. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts.

(A-C) Die Zellkerne der insgesamt 12 ePGs (rot) positionieren sich entlang der peripheren Nerven. Dabei sind sie sowohl mit motorischen (grün, A und C) als auch mit sensorischen (blau, B und C) Neuronen assoziiert. In (C) sind die ePGs zusätzlich durch Pfeile markiert. Die ebenfalls Repo-positiven Ligamentzellen des lch (innerhalb des gepunkteten Kreises) werden nicht mit zu den ePGs gezählt. (D) Durch die Expression einer membrangebundenen Form von GFP in allen Gliazellen (*repo*>gap::GFP) können die Zellumrisse (grün) der ePGs visualisiert werden. Deutlich ist zu beobachten, dass die ePGs die Motoneurone (blau) am Ende der Embryogenese nahezu vollständig umhüllen. Nur die distalen Bereiche des ISN und SN sind nicht von Ausläufern der ePGs bedeckt (Sternchen). Die kaum erkennbaren zytoplasmatischen Ausläufer (dünne Pfeile) der mit dem TN assoziierten ePG umhüllen nur einen geringen Anteil dieses Nervs. (E) Im Wesentlichen setzt sich das PNS neben den ePGs (rot) aus vier Nervenstrahlen (TN, ISN, SN und DLN) und mehreren Clustern sensorischer Neurone (v, v' und lch) zusammen. DLN = Dorsaler Longitudinaler Nerv, ISN = Intersegmentalnerv, lch = laterales Chordotonalorgan, SN = Segmentalnerv, TN = Transversalnerv, v und v' = ventrales und ventrales' Cluster sensorischer Neurone. Drei von SOPs abstammende ePGs sind individuell markiert (geschwungener Pfeil, Pfeilspitze und unausgefüllter Pfeil). (Abb. übernommen und modifiziert aus von Hilchen et al., 2008)

### **3.1.2 Einführung einer einheitlichen Nomenklatur für alle ePGs**

In den nachfolgenden Abschnitten wird demonstriert, dass die einzelnen ePGs individuelle Zellidentitäten besitzen, relativ stereotyp entlang der axonalen Trakte auswandern und am Ende ihrer Migration reproduzierbare Positionen entlang der peripheren Nerven einnehmen. Um die im nächsten Abschnitt folgende Darstellung der Expression von Markergenen individueller ePGs, sowie die anschließende Beschreibung ihrer Herkunft und Migration zu vereinfachen, soll bereits im Voraus die im Rahmen dieser Arbeit etablierte, vollständige Nomenklatur aller ePGs vorgestellt werden (aus von Hilchen et al., 2008).

Zunächst wurde der Versuch unternommen, diese erstmalig eingeführte Nomenklatur aller ePGs mit bereits vorhandenen Benennungen einzelner PGs in Einklang zu bringen. Bereits Fredieu und Mahowald (1989) beschrieben unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers sechs PGs. Drei dieser Zellen wurden später als Exitglia bezeichnet (EGA, EGM1 und EGM2) und die verbleibenden von proximal nach distal als PG1-3 benannt (Klämbt und Goodman, 1991). Diese Benennung wurde von Nelson und Laughon (1993) geringfügig modifiziert. Zwei der PGs, die PG1 und PG3, wurden später in ventrale (vPG) und dorsolaterale (dIPG) PG umbenannt (Sepp et al., 2000). Von Edenfeld und Kollegen (2007) wurden drei PGs als ventrale-, mediale- und dorsale-Intersegmentalnerv PG (vIPG, mIPG und dIPG) bezeichnet, wobei es sich bei der vIPG um eine der von Klämbt und Goodman (1991) als Exitglia charakterisierten PGs handelt. In einer Arbeit von Bodmer und Kollegen (1998) über Zellstammbäume von SOPs wurden zwei weitere PGs identifiziert und benannt. Dabei handelt es sich zum einen um die mit dem TN assoziierte PG, welche seinerzeit aufgrund ihrer an ein Neuron erinnernden Morphologie als laterales bipolar dendritisches Neuron (lbd) bezeichnet wurde. Zum anderen wurde die zu jener Zeit als „unterstützende Glia des dorsalen bipolar dendritischen Neurons“ (dbd Glia) bezeichnete dorsalste PG beschrieben, die das Neuron umhüllt, welches den DLN formt. Eine dritte von einem SOP in der Peripherie abstammende PG wird erstmals von Klämbt und Goodman (1991) beschrieben. Diese Zelle wird später von anderen als P3 (Nelson und Laughon, 1993), dorsolaterale PG (dIPG, Sepp et al., 2000) und dorsale-intersegmentale PG (dIPG, Edenfeld et al., 2007) bezeichnet. Demzufolge zeigt sich, dass bereits bestehende Nomenklaturen inkonsistent und unvollständig sind (zusammengefasst in Tab. 3-1).

Aus diesem Grund haben wir eine neue konsistente Terminologie für alle Repopositiven embryonalen PGs (ePGs) der abdominalen HS eingeführt und sie entsprechend ihrer typischen Position entlang der peripheren Nerven als ePG1-ePG12 benannt (siehe dazu Abb. 3-2 A und C). In den folgenden Abschnitten wird verdeutlicht werden, dass für die Identifizierung einer distinkten ePG unterschiedliche Kriterien herangezogen werden können. Dabei handelt es sich um (a) die Position des Zellkerns am Ende der Migration, (b) die Assoziation mit einem bestimmten peripheren Nerv, (c) die Expression einer einzigartigen Kombination von molekularen Markern, (d) die klonale Herkunft und (e) den Verlauf ihrer Migration.

**Tab. 3-1: Neue konsistente Nomenklatur aller embryonalen PGs**

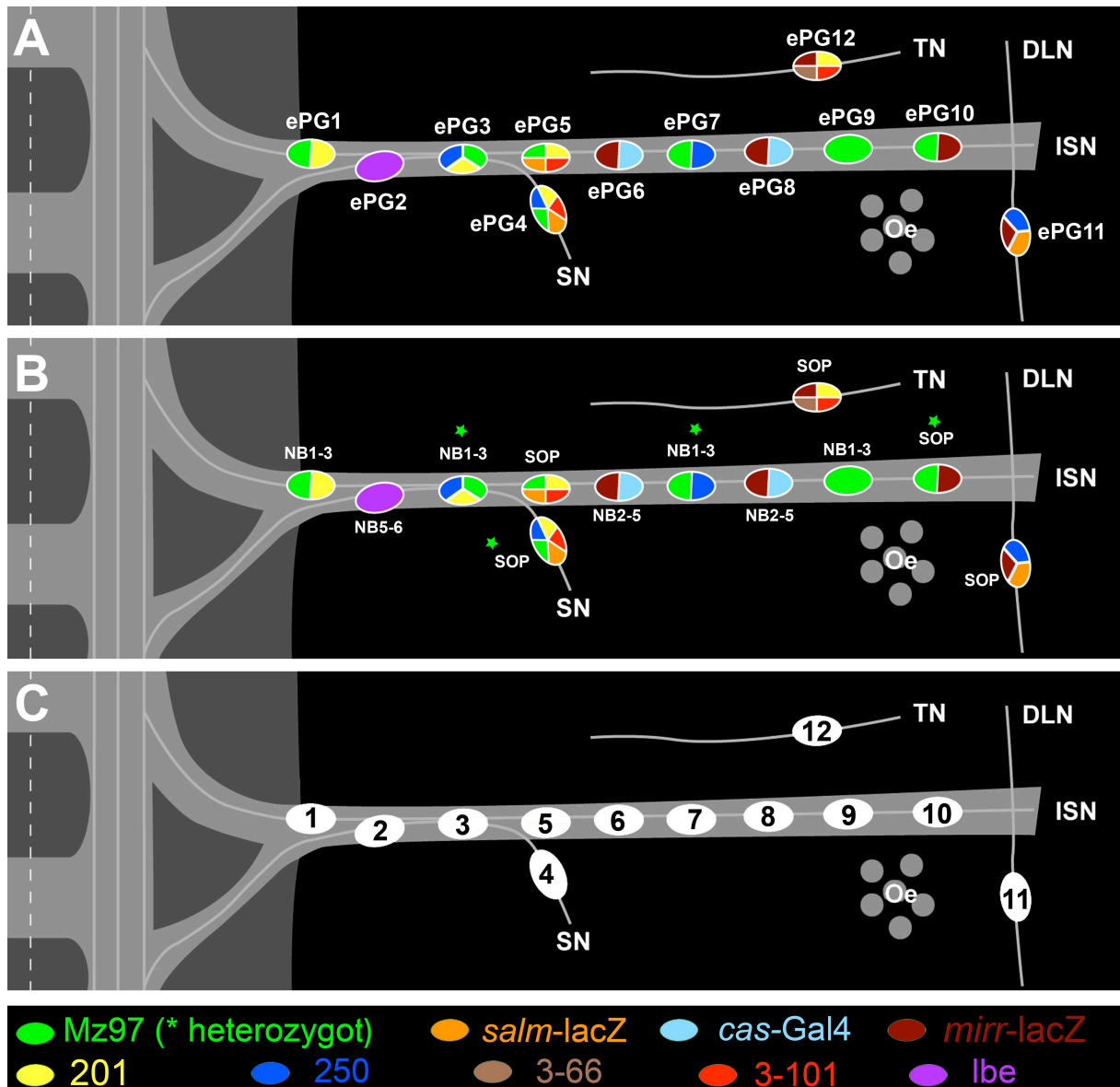
Von Hilchen et al., 2008	Bodmer et al., 1989	Fredieu und Mahowald, 1989	Klämbt und Goodman, 1991	Nelson und Laughon, 1993	Sepp et al., 2000	Edenfeld et al., 2007		
ePG1		6 Periphere Glia	EGA, EGM1, EGM2	EA, M1, M2				
ePG2								
ePG3							vIPG	
ePG4				PG1	P1	vPG	vPG	
ePG5				PG2	P2			
ePG6								mIPG
ePG7								
ePG8								
ePG9								
ePG10				PG3	P3	dIPG	dIPG	
ePG11	dbd Glia							
ePG12	ldb							

In der linken Spalte ist die neu eingeführte Nomenklatur aller ePGs zu sehen und im Vergleich die stets unvollständigen und größtenteils unterschiedlichen Benennungen aus vorausgegangenen Arbeiten. Für weitere Details siehe Text. (Tab. aus von Hilchen et al., 2008)

### 3.1.3 Einzelzellidentität der ePGs

Zu Beginn meiner Dissertation stellte sich insbesondere die Frage, ob die einzelnen ePGs individuelle Identitäten besitzen und inwieweit eine mögliche Identität bereits ihr Schicksal, genauer genommen den Verlauf ihrer Migration und ihre Positionierung am Ende der Wanderung, bestimmt. Eine Antwort auf diese Fragen liefern die nachfolgenden Ergebnisse. Bislang konnten lediglich drei der 12 ePGs hinsichtlich ihrer Identität, Position und Herkunft eindeutig beschrieben werden. Dabei handelt es sich um die distalste mit dem ISN assoziierte ePG (ePG10, Pfeilspitze in Abb. 3-1 E

und Abb. 3-2), die den DLN umhüllende ePG (ePG11, unausgefüllter Pfeil in Abb. 3-1 E und Abb. 3-2) und die ePG am TN (ePG12, geschwungener Pfeil in Abb. 3-1 E und Abb. 3-2). All diese ePGs stammen von SOPs ab (Bodmer et al., 1989; Fredieu und Mahowald, 1989) und entstehen etwa im frühen St.13 an invarianten Positionen innerhalb des PNS. Am Ende der Embryogenese sind sie stets an charakteristischen Positionen lokalisiert und mit distinkten peripheren Nerven assoziiert (Abb. 3-1 E). Diese reproduzierbare Positionierung der drei SOP-Abkömmlinge (ePG10-ePG12) am Ende der Embryogenese verdeutlicht, dass deren Lage bereits durch ihre Identität vermittelt wird. Ob dies auch für die übrigen ePGs zutrifft von denen man bisher annahm, dass sie alle von NBs des ZNS abstammen, konnte bisher nicht eindeutig belegt werden. Der Grund dafür ist, dass nicht eindeutig zwischen einzelnen vom ZNS abstammenden ePGs unterschieden werden konnte und lediglich Subgruppen dieser ePGs auf Einzelzellebene analysiert wurden (Fredieu und Mahowald, 1989; Klämbt und Goodman, 1991; Nelson und Laughon, 1993; Edenfeld et al., 2007). Im Folgenden werde ich demonstrieren, dass sämtliche ePGs anhand einer individuellen Expression von Markergenen identifiziert werden können, und dass sich ihre Individualität auch in einer charakteristischen Positionierung am Ende der Embryogenese widerspiegelt (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.5). Als molekulare Marker wurden spezifische Antikörper, transgene Fliegenstämme (Enhancer-Trap-Stämme) und RNA-Proben verwendet (Tab. 3-2). Die meisten der Marker sind in den jeweils markierten ePGs bereits von einem frühen Entwicklungsstadium an detektierbar (siehe „Beginn“ in Tab. 3-2). Daher ist auszuschließen, dass die individuelle Kombinatorik der Markergene eine Folge der Positionierung einzelner ePGs am Ende der Embryogenese darstellt. Eine schematische Zusammenfassung der molekularen Marker, die für die eindeutige Identifizierung aller ePGs herangezogen werden können, ist in Abb. 3-2 A und B zu sehen. Die Expressionsmuster der entsprechenden Marker im späten St.16 sind in Abb. 3-3 dargestellt. Die in dieser Bildtafel eingeführte Symbolik zur Markierung individueller ePGs wird, soweit nicht anders vermerkt und abgesehen vom letzten Kapitel (3.6), im gesamten Verlauf meiner Arbeit beibehalten.



**Abb. 3-2: Die einzelnen ePGs besitzen individuelle Zellidentitäten**

Dargestellt sind schematische Repräsentationen eines abdominalen HS am Ende der Embryogenese (spätes St.16). Anterior ist oben und dorsal rechts.

(A, B) Mit Ausnahme der beiden sowohl *cas-Gal4*- als auch *mirr-lacZ*-positiven ePGs können alle ePGs individuell anhand ihrer einzigartigen Kombinatorik von Markergenen identifiziert werden. Hier sind lediglich die molekularen Marker durch einen Farbcode dargestellt, die erforderlich sind, um eindeutig zwischen den einzelnen ePGs unterscheiden zu können. Die Legende des Farbcodes ist unterhalb der schematischen Darstellungen zu sehen. Weitere molekulare Marker können Tab. 3-2 entnommen werden. Da sich die Expression in homo- und heterozygoten Mz97-Embryonen unterscheidet, sind in (B) die in heterozygoten Mz97-positiven ePGs durch grüne Sterne markiert. Basierend auf der Identifizierbarkeit der ePGs ist in (A) die neu eingeführte Benennung der einzelnen ePGs (ePG1 bis ePG12) aufgeführt. Die klonale Abstammung der jeweiligen Zellen vom NB oder SOP ist in (B) verzeichnet.

(C) Die individuellen ePGs belegen am Ende der Embryogenese charakteristische Positionen entlang der peripheren Nerven und ihre Anordnung untereinander weist lediglich geringe Variationen auf (siehe Tab. 3-3). Für die Nomenklatur wurden die möglichen Positionen der Gliazellen entlang des SN und ISN von proximal nach distal durchnummeriert und die einzelnen ePGs entsprechend ihrer charakteristischen Position als ePG1 bis ePG10 benannt. Des Weiteren wird die Position am DLN als 11 und die am TN als 12 definiert und die beiden ePGs, die jeweils als einzige mit dem DLN bzw. TN assoziiert sind, entsprechenden als ePG11 und ePG12 bezeichnet. DLN = Dorsaler Longitudinaler Nerv, ISN = Intersegmentalnerv, NB = Neuroblast, Oe = Oenozyten, SN = Segmentalnerv, SOP = „sensory organ precursor cell“, TN = Transversalnerv. (Abb. aus von Hilchen et al., 2008)

Bereits während meiner Diplomarbeit fiel bei der Charakterisierung homozygoter Embryonen der Gal4-Linie Mz97 (Ito et al., 1995) auf, dass grundsätzlich sieben ePGs Mz97-positiv sind und sich diese Zellen in der Regel reproduzierbar entlang der peripheren Nerven anordnen. Da diese Gal4-Linie bereits mit einem nuklearen GFP (UAS-nGFP) rekombiniert wurde (Mz97, nGFP), können die Mz97-positiven Zellen direkt anhand ihrer GFP Fluoreszenz detektiert werden. Im Folgenden ist, wann immer von Mz97 gesprochen und nichts Gegensätzliches erwähnt wird, die homozygote mit nGFP rekombinierte Linie gemeint. Das reproduzierbare Muster der Mz97-positiven Zellen deutete bereits darauf hin, dass bestimmte ePGs mittels molekularer Marker markiert werden können, die zudem charakteristische Positionen im PNS einnehmen. In Kombination mit Antikörperfärbungen gegen Repo habe ich die Mz97-positiven ePGs auf Einzelzellebene bestimmt (Abb. 3-3 A-A''). Dabei handelt es sich um zwei mit dem ISN assoziierte ePGs nahe der Transitionszone (ePG1 und ePG3, Sternchen), der mit dem SN assoziierten ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze) und vier weitere ePGs die sich entlang des ISN arrangieren, die ePG5 (Pfeil), ePG7 (gebogener Pfeil), ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil) und die vom SOP abstammende ePG10 (Pfeilspitze). Neben diesem Grundmuster von Mz97-positiven ePGs zeigt die ePG12 am TN in 25% und die ePG11 am DLN in 6% der analysierten HS (n>80) ebenfalls ein GFP-Signal (nicht gezeigt). Zusätzlich zu den vorausgehend beschriebenen Gliazellen sind die aus sechs bis acht Zellen bestehenden Zellcluster der Oenozyten (Oe) und weitere mesodermale Zellen in der Peripherie Mz97-positiv. In heterozygoten Mz97-Embryonen ist die Anzahl der markierten ePGs im Vergleich zum homozygoten Zustand reduziert (Abb. 3-3 B). Weiterhin Mz97-positiv sind die ePG3 (Sternchen), die mit dem SN assoziierte ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze), die ePG7 (gebogener Pfeil) und die ePG10 (Pfeilspitze) sowie das Zellcluster der Oe. In etwa 20% der HS (n>80) zeigt auch die ePG5 ein GFP-Signal (nicht gezeigt). Die reduzierte Anzahl Mz97-positiver Zellen in der heterozygoten Situation ist vermutlich dadurch zu erklären, dass in diesen Embryonen nur eine Kopie des Gal4 Elements ( $p\{Gal4\}$ ) vorliegt.

Nachdem Mz97 als erste Markerlinie charakterisiert war, wurde nach weiteren Markern gesucht, welche die drei vom ZNS auswandernden, Mz97-negativen ePGs (ePG2, ePG6 und ePG8) kennzeichnen, um zunächst Marker für alle vom ZNS abstammenden ePGs zur Hand zu haben. Die drei von SOPs abstammenden ePGs (ePG10-12) können wie vorausgehend erwähnt aufgrund ihrer charakteristischen

Positionen am Ende der Embryogenese (auch ohne Marker) stets eindeutig erkannt werden. Die im Exitbereich lokalisierte Mz97-negative ePG2 kann mittels einer Antikörperfärbung gegen den Transkriptionsfaktor Ladybird early (Lbe) identifiziert werden (Abb. 3-3 C, unausgefüllter dünner Pfeil). Dieser Marker habe ich getestet, da aus den Klondaten von Schmidt und Kollegen (1997) hervorgeht, dass eine der im Exitbereich lokalisierten ePGs vom NB5-6 abstammt und bereits gezeigt werden konnte, dass sämtlichen Gliazellen dieses Zellklons Lbe exprimieren (De Graeve et al., 2004). Da die ePG2 schon ab St.12 anhand der Expression von Lbe identifiziert werden konnte, stellte sich heraus, dass sie in der frühen Phase ihrer Wanderung offensichtlich entlang des SN nach distal migriert (Abb. 3-5). Die beiden noch verbleibenden, vom ZNS abstammenden, Mz97-negativen ePGs (ePG6 und ePG8), können mittels der *cas*-Gal4-Linie markiert werden (*cas*>*n*lacZ, Abb. 3-3 D, dünne Pfeile). Eine Antikörperfärbung gegen Castor offenbarte hingegen in keiner der ePGs ein erkennbares Signal (nicht gezeigt). Nachdem molekulare Marker für alle vom ZNS auswandernden ePGs identifiziert waren, kristallisierte sich ein Grundmuster heraus, in welchem insgesamt 12 ePGs an lediglich geringfügig variierenden Positionen innerhalb des PNS vorliegen. Dass individuelle ePGs tatsächlich distinkte Positionen entlang der peripheren Nerven einnehmen (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.5), offenbarte sich im weiteren Verlauf meiner Dissertation, nachdem in Kooperation mit R. Beckervordersandforth zusätzliche molekulare Marker identifiziert und charakterisiert wurden, deren (kombinatorischer) Einsatz es letztendlich ermöglichte, zwischen sämtlichen ePGs zu unterscheiden. Eine Ausnahme bilden die ePG6 und ePG8, die bislang identische Markergene exprimieren (Abb. 3-2) und folglich nicht voneinander unterschieden werden können. Neben der vorher beschriebenen *cas*-Gal4-Linie können diese beiden ePGs noch mittels der Enhancer-Trap-Linie *mirr*-lacZ markiert werden (Abb. 3-3 E, dünne Pfeile). Wie bereits zuvor für die Identifikation der Lbe- bzw. *cas*-Gal4-positiven ePGs, wurde auch für die Analyse der positiven ePGs in weiteren Markerlinien neben der Repo-Färbung das reproduzierbare GFP -Muster von Mz97 genutzt. Für jede der nachfolgend beschriebenen lacZ-Linien wurden mindestens fünf verschiedene Embryonen betrachtet und wenigstens 20 HS ausgewertet.

In der lacZ-Linie 3-101 (Abb. 3-3 F) sind in über 90% der ausgewerteten HS (n = 36) drei ePGs  $\beta$ -Gal-positiv: die ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze), die ePG5 (Pfeil) und die ePG12 (geschwungener Pfeil). In etwa 20% der HS lässt darüber hinaus noch die

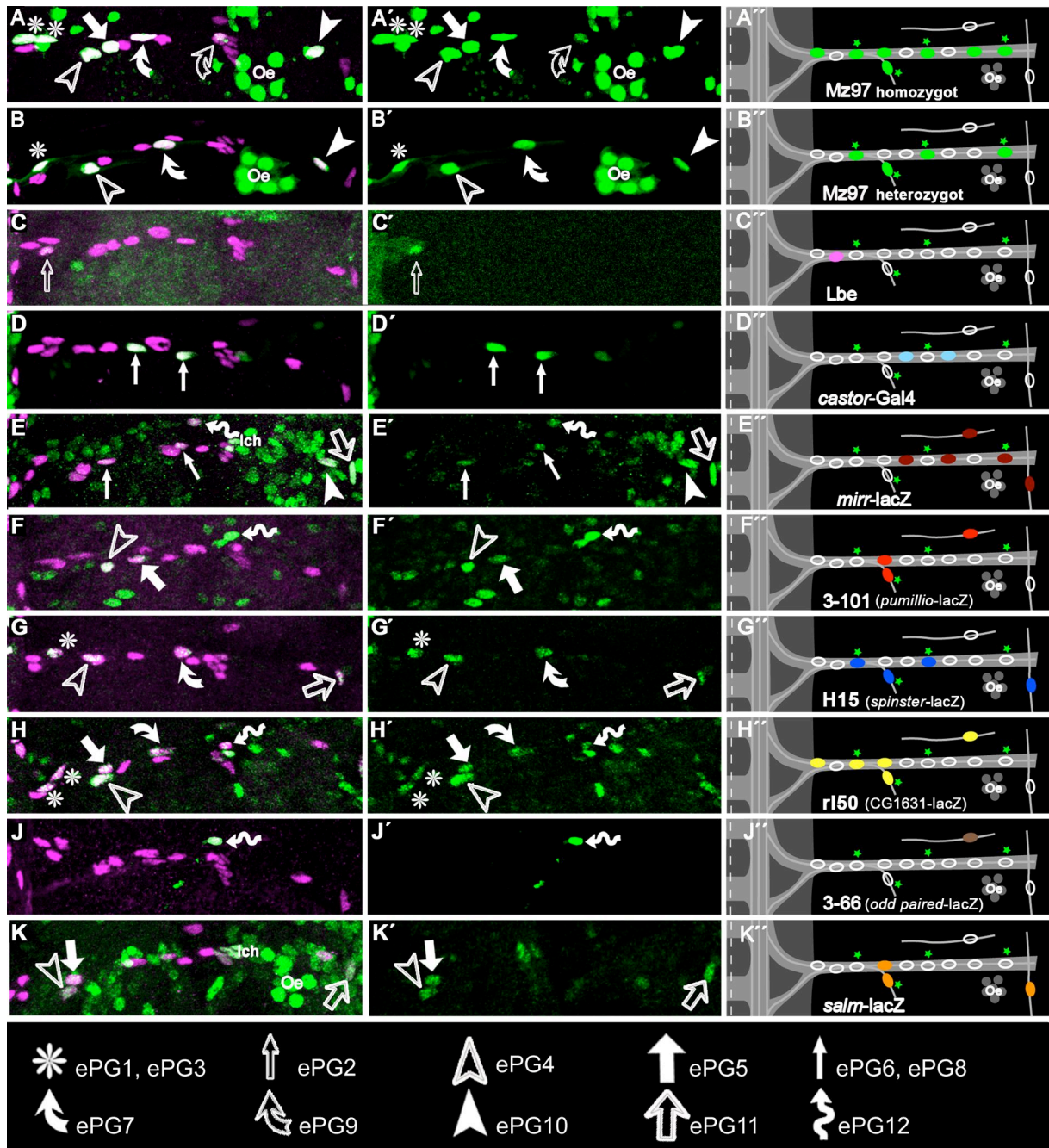


ePG7 eine  $\beta$ -Gal-Expression erkennen (nicht gezeigt). Die Enhancer-Trap-Linie H15-lacZ (Abb. 3-3 G) zeigt eine  $\beta$ -Gal-Expression in drei der Mz97-positiven PGs: in der ePG3 (Sternchen), der ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze) und der ePG7 (gebogener Pfeil). Darüber hinaus demonstriert auch die ePG11 (unausgefüllter Pfeil) eine  $\beta$ -Gal-Expression. Diese Muster der Reporter-Expression kann in H15 in etwa 90% der HS (n = 24) detektiert werden, mit Ausnahme der ePG7 (gebogener Pfeil), die lediglich in ca. 60% der HS markiert ist. Die Enhancer-Trap-Linie rl50-lacZ (Abb. 3-3 H) kann genutzt werden, um die ePG1 und ePG3 (Sternchen) zu markieren, von denen lediglich eine (ePG3) zusätzlich ein GFP-Signal im heterozygoten Mz97-Hintergrund erkennen lässt. Ferner sind die ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze), die ePG5 (Pfeil) und die ePG12 (geschwungener Pfeil)  $\beta$ -Gal-positiv. In etwa 25% der ausgewerteten HS (n = 30) zeigen darüber hinaus sowohl die ePG7 (gebogener Pfeil) als auch die ePG11 (unausgefüllter Pfeil) ein  $\beta$ -Gal-Signal (nicht gezeigt). Die mit dem TN assoziierte ePG12 kann exklusiv mittels der lacZ-Linie 3-66 markiert werden (Abb. 3-3 J, geschwungener Pfeil). Eine Enhancer-Trap Insertion nahe dem Genlocus von *spalt major* (*salm*) kann genutzt werden, um drei ePGs zu identifizieren (Abb. 3-3 K): die mit dem SN assoziierte ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze), die ePG5 am ISN (Pfeil) und die ePG11 (unausgefüllter Pfeil) am DLN. Ebenfalls  $\beta$ -Gal-positiv sind zwei Ligamentzellen des Ich und die Oe.

Tab. 3-2: Liste aller analysierten Marker zur Identifizierung der einzelnen ePGs

Marker	ePG												Beginn	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Mz97 homozygot	X		X	X	X		X		X	X			St.13	Abb. 3-3 A
Mz97 heterozygot			X	X			X			X			St.15	Abb. 3-3 B
<i>cas</i> -Gal4						X		X					St.12	Abb. 3-3 D
<i>mirr</i> -lacZ						X		X		X	X	X	St.14	Abb. 3-3 E
3-101-lacZ				X	X							X	St.12	Abb. 3-3 F
H15-lacZ			X	X			X				X		St.12	Abb. 3-3 G
r150-lacZ	X		X	X	X							X	St.12	Abb. 3-3 H
3-66-lacZ												X	St.14	Abb. 3-3 J
<i>salm</i> -lacZ				X	X							X	St.12	Abb. 3-3 K
<i>svp</i> -lacZ		X	X	X		X	X	X		X			St.13	Nicht gezeigt
<i>wg</i> -lacZ		X		X	X					X	X		St.13	Nicht gezeigt
Y15-lacZ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	St.11	Nicht gezeigt
J29-lacZ				X	X		X			X			St.13	Nicht gezeigt
$\alpha$ -Lbe Antikörper		X											St.12	Abb. 3-3 C
$\alpha$ -Pdm Antikörper												X	St.12	Nicht gezeigt
$\alpha$ -Hb Antikörper												X	St.12	Nicht gezeigt
CG9336 ISH	X	X	X	X	X		X		X	X	X		St.13	Abb. 3-11

In der Tabelle sind alle molekularen Marker vermerkt, die zur Identifizierung der einzelnen ePGs herangezogen werden können. Der Zeitpunkt der einsetzenden Detektierbarkeit des jeweiligen Markers ist in der Spalte „Beginn“ notiert. Für Details zur Benennung der einzelnen ePGs siehe Abschnitt 3.1.2 und Abb. 3-2. (Tab. übernommen und modifiziert aus von Hilchen et al., 2008)



**Abb. 3-3: Identifizierung der ePGs auf Einzelzellebene mittels molekularer Marker**

Gezeigt sind Filetpräparate von jeweils einem abdominalen HS eines Embryos im späten St.16. Anterior ist oben und dorsal rechts. Folgende Enhancer-Trap Insertionen ( $\beta$ -Gal, grün) und Markergen-Expressionen (grün) wurden in Kombination mit Antikörperfärbungen gegen Repo (magenta) analysiert: (A) Mz97 homozygot (rekombiniert mit nGFP) (B) Mz97 heterozygot (rekombiniert mit nGFP) (C) Lbe (D) *cas>n lacZ*,  $\alpha$ - $\beta$ -Gal (E) *mirr-lacZ*,  $\alpha$ - $\beta$ -Gal; (F) 3-101-*lacZ*,  $\alpha$ - $\beta$ -Gal (G) H15-*lacZ*,  $\alpha$ - $\beta$ -Gal; (H) r150-*lacZ*,  $\alpha$ - $\beta$ -Gal; (J) 3-66-*lacZ*,  $\alpha$ - $\beta$ -Gal; (K) *salm-lacZ*,  $\alpha$ - $\beta$ -Gal. (A-K) Maximale Projektionen der Repo-Färbung zusammen mit entsprechender Markerfärbung. (A'-K') Illustration der Markerexpression alleine (um die positiven ePGs deutlicher darzulegen, sind in (C'), (E') und (K') ausgewählte Ebenen und keine maximalen Projektionen zu sehen). (A''-K'') Schematische Darstellungen der jeweiligen Expressionsmuster. In A''-K'' sind die im heterozygoten Mz97-Hintergrund detektierbaren nGFP-positiven ePGs durch grüne Sterne vermerkt. Die individuellen ePGs sind jeweils mit einem bestimmten Symbol markiert. Die Legende der verwendeten Symbole ist unterhalb der Abb. zu sehen. Oe = Oenocyten, Ich = laterales Chordotonalorgan. (Abb. übernommen und modifiziert aus von Hilchen et al., 2008)

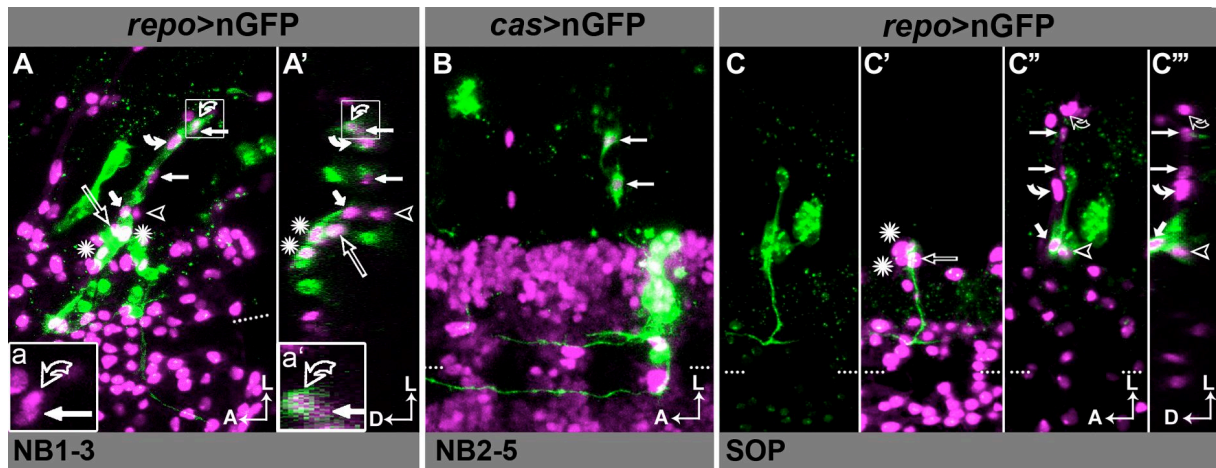
### 3.1.4 Abstammung der einzelnen ePGs

Nachdem die ePGs auf Einzelzellebene identifiziert werden konnten und sich herausstellte, dass die individuellen ePGs gegen Ende der Embryogenese reproduzierbare Positionen entlang der peripheren Nerven einnehmen, sollte als nächstes der klonale Ursprung der einzelnen Zellen geklärt werden. Die Herkunft von drei distinkten ePGs wurde bereits beschrieben. Dabei handelt es sich um die mit dem ISN assoziierte ePG10, die den DLN umhüllende ePG11, sowie die am TN liegende ePG12. Sie alle stammen von SOPs ab und entstehen etwa im St.13 in der Peripherie (Bodmer et al., 1989; Fredieu und Mahowald, 1989; Nelson und Laughon, 1993). Von den verbleibenden ePGs (ePG1-ePG9) nahm man an, dass sie alle von NBs des ZNS abstammen. Bereits Schmidt und Kollegen (1997) demonstrierten, dass der NB1-3, NB2-5 und der NB5-6 ePGs generieren und ihrer Gesamtzahl wurde zwischen sechs und neun variierend angegeben. Mit dem Ziel zu ermitteln, von welchem dieser drei NBs die individuellen ePGs abstammen, wurden in Kooperation mit C. Rickert Dil-Markierungen (alle von C. Rickert durchgeführt) in Mz97-Embryonen, sowie in Embryonen, die aus Kreuzungen von *repo*-Gal4 und *cas*-Gal4 mit UAS-nGFP hervorgehen, durchgeführt (Abb. 3-4). Durch Kombination der Dil-Markierung mit den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Markerlinien Mz97 und *cas*-Gal4 war es möglich, distinkte ePGs zusätzlich zu ihrer Position am Ende der Embryogenese anhand des GFP-Signals zu identifizieren. Einzelne neurale Vorläuferzellen in der lateralen Region des ventralen Neuroektoderms in St.7 Embryonen wurden mit Dil markiert. Wenn aus der Dil-markierten neuronalen Vorläuferzelle im weiteren Verlauf der Embryogenese ein NB hervorgeht, wird der Dil-Farbstoff (eine lipophile Substanz, die sich in die Zellmembran einlagert) im Zuge der Zellteilungen auch an alle seine Tochterzellen weitergegeben. Infolgedessen kann am Ende der Embryogenese der gesamte Zellklon des markierten NB detektiert werden. Da jeder NB einen charakteristischen Zellklon hervorbringt, kann aufgrund der Morphologie des visualisierten Zellstammbaums darauf geschlossen werden, welcher NB mittels Dil gefärbt wurde. Gelegentlich ging aus durchgeführten Dil-Markierungen einer der drei NBs (NB1-3, NB2-5 und NB5-6) hervor, die ePGs generieren. Die Zellklone dieser NB wurden dann, zusammen mit dem GFP Muster von Markerlinien (Mz97 bzw. *cas*>nGFP) oder im *repo*>nGFP-Hintergrund, in St.17 Embryonen dokumentiert und ausgewertet.

Die Dil-markierten Zellklone des NB1-3 (n = 17) beinhalten sowohl im Mz97- (nicht gezeigt) als auch im *repo>nGFP*-Hintergrund (Abb. 3-4 A) stets vier nGFP-positive ePGs. Zwei dieser Zellen sind im Exitbereich lokalisiert und können anhand ihrer Position und aufgrund der Beobachtung, dass sie im Mz97-Hintergrund auch nGFP exprimieren als ePG1 und ePG3 (Sternchen) identifiziert werden. In der Sagittalansicht (Abb. 3-4 A') können diese beiden Dil-markierten ePGs deutlich von anderen ePGs separiert werden und es ist zu sehen, dass die dritte ePG im Exitbereich (ePG2, unausgefüllter dünner Pfeil) nicht Dil-positiv ist. Des Weiteren sind die am ISN liegenden ePG7 (gebogener Pfeil) und ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil) Dil- und nGFP-positiv und können daher ebenfalls dem Zellklon des NB1-3 zugeordnet werden. Die verbleibenden durch *repo>nGFP* detektierbaren ePGs entlang des SN und ISN, weisen keine Dil-Markierung auf und stammen daher nicht vom NB1-3 ab (Abb. 3-4 A und A'). Somit stellte sich heraus, dass der NB1-3 eine konstante Anzahl von vier ePGs hervorbringt und nicht wie zuvor berichtet zwischen vier und sechs ePGs generiert (Schmidt et al., 1997).

Für den NB2-5 konnte gezeigt werden, dass er stets zwei PGs hervorbringt (Schmidt et al., 1997). Während der Dil-Markierungen in Mz97-Embryonen wurde neunmal die neurale Vorläuferzelle getroffen, aus der anschließend der NB2-5 hervorging (nicht gezeigt). In all diesen Fällen waren die beiden vom NB2-5 generierten ePGs Mz97-negativ. Um zu überprüfen, ob es sich bei ihnen um die beiden *cas-Gal4/mirr-lacZ*-positiven ePG6 und ePG8 (Abb. 3-3 D und E) handelt, wurden daraufhin Dil-Markierungen im *cas>nGFP*-Hintergrund durchgeführt. Dabei zeigten sämtliche Markierungen des NB2-5 (n = 8), dass die beiden von diesem Vorläufer generierten ePGs stets auch ein nGFP-Signal aufweisen und folglich *cas-Gal4* exprimieren (Abb. 3-4 B). Dementsprechend können die ePG6 und ePG8 eindeutig als die beiden Abkömmlinge des NB2-5 identifiziert werden.

Der dritte und letzte NB, für den gezeigt wurde, dass er eine ePG im Exitbereich generiert, ist der NB5-6 (Schmidt et al., 1997). Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, handelt es sich bei dieser Zelle um die Mz97-negative ePG2. Allein die Tatsache, dass die ePG2 *Lbe* exprimiert reicht aus, um sie als Abkömmling des NB5-6 zu identifizieren, da bereits gezeigt wurde, dass *Lbe* als spezifischer Marker für die glialen Nachkommenszellen des NB5-6 verwendet werden kann (De Graeve et al., 2004).



**Abb. 3-4: Klonale Herkunft der einzelnen ePGs**

Zu sehen sind Filepräparate von Dil markierten Embryonen im St.17, in denen zusätzlich zu dem jeweilig markierten Zellklon (grün) alle lateralen Gliazellen (*repo*>nGFP (A und C)) bzw. die *cas*-Gal4-exprimierenden Zellen (*cas*>nGFP (B)) anhand des nGFP-Signals (magenta) visualisiert sind. Die Orientierung entlang der A/P- bzw. medio-lateralen-Achse ist jeweils angegeben. Die gepunktete Linie kennzeichnet die Mittellinie (ML).

(A) Dil-markierter Zellklon vom NB1-3 (grün) im *repo*>nGFP-Hintergrund (magenta) im abdominalen HS A7. Sowohl die ePG1 und ePG3 (Sternchen), als auch die ePG7 (gebogener Pfeil) und ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil) sind Dil-positiv und gehören somit zum Zellklon des NB1-3. Der vergrößerte Ausschnitt (a) zeigt die beiden dicht beieinander liegenden Repo-positiven Zellkerne der ePG8 (dünner Pfeil) und ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil). (A') Sagittalansicht des in (A) gezeigten NB1-3-Zellklons. Im vergrößerten Ausschnitt (a') ist deutlich zu sehen, dass die ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil) Dil-positiv ist, die ePG8 (dünner Pfeil) hingegen nicht.

(B) Dargestellt sind die abdominalen HS A4 und A5 im *cas*>nGFP-Hintergrund (magenta). Im HS A5 ist zusätzlich ein Dil-markierter Zellklon des NB2-5 (grün) zu sehen. In diesem HS können die *cas*-Gal4-exprimierenden ePG6 und ePG8 (dünne Pfeile) klar dem Zellklon des NB2-5 zugeordnet werden. (C) Dil-markierter Zellklon des ventralen SOPs (grün) im *repo*>nGFP-Hintergrund (magenta), der neben sensorischen Neuronen zwei ePGs hervorbringt. (C') Dorsaler Anteil des in (C) vollständig dargestellten Zellklons. Die drei ePGs im Exitbereich (ePG1 und ePG3 (Sternchen) und ePG2 (unausgefüllter dünner Pfeil)) gehören nicht zum Dil-gefärbten SOP-Zellklon. (C'') Ventraler Anteil des in (C) vollständig illustrierten Zellklons. Die ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze) und ePG5 (Pfeil) sind deutlich Dil-positiv und stammen somit von diesem SOP ab. (C''') Sagittalansicht des in (C'') gezeigten SOP-Zellklons. (Abb. aus von Hilchen et al., 2008)

Die zuvor beschriebenen Klondaten enthüllen, dass zwei der ePGs nicht von den NB1-3, NB2-5 und NB5-6 abstammen. Dabei handelt es sich um die am SN liegende ePG4 und die ihr nahe positionierte ePG5. Durch weitere Dil-Markierungen im lateralen Bereich des Neuroektoderms konnte letztendlich fünfmal ein identischer Zellklon markiert werden, der diese beiden noch fehlenden ePGs (ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze) und ePG5 (Pfeil)) beinhaltet (Abb. 3-4 C-C'''). Da der Zellklon neben den ePGs auch sensorische ins ZNS projizierende Neurone (vermutlich des v- und v'-Clusters (siehe dazu Abb. 3-1 E)) beinhaltet, muss es sich bei der Vorläuferzelle um einen SOP handeln. Im Zuge der Migrationsanalyse (Abschnitt 3.1.6) ist zu erkennen, dass die beiden von diesem SOP gebildeten ePGs in der frühen Phase der Wanderung zusammen mit den von NBs generierten ePGs an der lateralen Kante des Bauchmarks lokalisiert sind. Da sie anschließend

gemeinsam nach dorsal in die Peripherie migrieren, wird die Gruppe der ePG1-ePG9 innerhalb meiner Arbeit mehrfach als „vom ZNS abstammend“ bzw. „vom ZNS auswandernd“ bezeichnet.

### **3.1.5 Stereotype Positionierung der ePGs**

In diesem Abschnitt sollen die auftretenden Variationen in der Positionierung der einzelnen ePGs am Ende der Embryogenese erläutert und quantifiziert werden. Um die Lage individueller ePGs zu bestimmen, wurden sie mittels der im Abschnitt 3.1.3 beschriebenen molekularen Marker identifiziert und die Häufigkeit ausgewertet, mit der sie am Ende der Embryogenese an bestimmten Positionen entlang der peripheren Nerven vorliegen. Die möglichen Positionierungen der ePGs sind schematisch in Abb. 3-2 C dargestellt und die Häufigkeit, mit der individuelle ePGs die Positionen 1-12 besetzen, sind in Tab. 3-3 vermerkt. Wann immer Repo-positive Zellkerne von zwei (oder auch mehr) ePGs entlang der peripheren Nerven auf gleicher Höhe lagen, so dass es nicht eindeutig möglich war, ihnen eine der definierten Positionen 1-12 zuzuordnen, wurden die entsprechenden Zellen nicht in die Auswertung einbezogen. Dies betraf vornehmlich die im Exitbereich generell dicht beieinander liegenden ePG1-ePG3. Um eindeutig zwischen ePG1-ePG3 unterscheiden zu können, wurde die Positionierung dieser Zellen in heterozygotem Mz97-Hintergrund (ePG3 = Mz97-positiv), zusammen mit einer Antikörperfärbung gegen Lbe (ePG2 = Lbe-positiv) und Repo (ePG1 ausschließlich Repo-positiv), analysiert (n = 60HS).

Es zeigte sich, dass die individuellen ePGs gegen Ende der Embryogenese stets mit einem bestimmten peripheren Nervenstrang (ISN, SN, TN oder DLN) assoziiert sind und ihre Positionierung entlang des entsprechenden Nerven lediglich geringe Variationen aufweist. In der Regel variiert ihre Lage lediglich um eine Position nach proximal oder distal (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Statistische Auswertung der Positionierung der individuellen ePGs

Zelle	Position											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ePG1	<b>62.5</b>	6.3	31.2									
ePG2	17.7	38.2	44.1									
ePG3	7.1	46.4	46.4									
ePG4				<b>95.9</b>	4.1							
ePG5				4.9	<b>91.5</b>	3.7						
ePG6					4.4	<b>86.8</b>	8.8					
ePG7						7.9	<b>69.7</b>	21.4	1.1			
ePG8							21.3	<b>69.3</b>	9.3			
ePG9							1.5	6.1	<b>92.4</b>			
ePG10										<b>100</b>		
ePG11											<b>100</b>	
ePG12												<b>100</b>

Um individuelle ePGs zu identifizieren, wurden molekulare Marker in Kombination mit Mz97 und Repo-Färbungen verwendet. Für die statistische Auswertung der Positionierung der drei ePGs im Exitbereich (ePG1-ePG3) wurden 60HS ausgewertet, für die dorsaleren ePGs (ePG4-ePG12) mehr als 100 HS. Es ist zu erkennen, dass die Lage einzelner ePGs meist um lediglich eine Position nach proximal bzw. distal variiert. Deutlich dominierende Positionen (>60%) von distinkten ePGs sind hervorgehoben. Grundsätzlich basiert die Nomenklatur der individuellen ePGs auf deren vorherrschende Positionierung am Ende der Embryogenese (für weitere Details zur Benennung siehe Abschnitt 3.1.2. und Abb. 3-2 C). (Tab. aus von Hilchen et al., 2008)

Die Mehrheit der ePGs liegt in über 80% der analysierten HS an der sie kennzeichnenden Position: Die von SOPs abstammenden ePG12 (am TN), ePG11 (am DLN) und ePG10 (die distalste ePG am ISN) sogar in 100% der HS; die mit dem SN assoziierte ePG4 in 96%, die benachbarte ePG5 in 92% und die ePG9 ebenfalls in 92% der analysierten HS. Die Besetzung der Positionen 6-8 weist eine größere Variabilität auf (Tab. 3-3). Grundsätzlich sind in diesem Bereich die ePG6 (an Position 6 in 87% der HS), die ePG7 (an Position 7 in 70% der HS) und die ePG8 (an Position 8 in 69% der HS) lokalisiert. Die erhöhte Variabilität in der Besetzung der Positionen 6-8 durch die ePG6-ePG8 ist durch folgende Beobachtung zu deuten: Während der *in vivo* Analyse der ePG Migration (siehe nächsten Abschnitt und Film 2) zeigte sich, dass die vom ZNS auswandernden ePGs ihre Reihenfolge während der Migrationsphase für gewöhnlich nicht ändern. Davon ausgenommen sind allerdings die ePG6 und ePG8, von denen eine oder sogar beide an der bereits in der Peripherie vorliegenden ePG7 vorbeiziehen können. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Anordnungen der ePG6 bis ePG8 untereinander, führt zur Variabilität, mit der diese drei ePGs die Position 6-8 in der Peripherie besetzen. Noch variabler ist die Besetzung der Positionen 1-3 im Exitbereich durch die ePG1-ePG3. Dies ist offensichtlich darauf zurückzuführen, dass die ePG2 unabhängig von den



beiden mit dem ISN assoziierten ePG1 und ePG3 entlang des SN wandert und dadurch in allen möglichen Anordnungen bezüglich ePG1 und ePG3 vorliegt.

### **3.1.6 *In vivo* Analyse der ePG Migration**

Die Beobachtung, dass die individuellen ePGs am Ende der Embryogenese charakteristische Positionen entlang der peripheren Nerven einnehmen impliziert, dass ihre Migration in gewissem Maße stereotyp verläuft. Daher wurde ihr Wanderungsprozess *in vivo* mittels 4D-Aufnahmen (für Details siehe Material und Methoden) analysiert, mit dem Ziel, den grundsätzlichen Verlauf der Migration jeder einzelnen ePG aufzuklären. Die Auswertung der 4D-Aufnahmen erfolgte unter Verwendung der SIMI-BioCell<sup>®</sup> Software (Schnabel et al., 1997), mit der es möglich ist, die einzelnen aufgenommenen Zellen durchgängig zu markieren. Somit können die individuellen ePGs aufgrund ihrer Lage am Ende der Embryogenese identifiziert und ihre Wanderung dann zurückverfolgt werden. Um anfangs die Migration einer distinkten Gruppe von ePGs zu analysieren, habe ich zunächst 4D-Aufnahmen von Mz97-Embryonen durchgeführt. Wie bereits zuvor beschrieben (Abb. 3-3 A), können in Mz97 sechs ePGs (ePG1, ePG3-ePG5, ePG7 und ePG9) anhand eines nGFP-Signals detektiert werden, die alle im oder nahe des ZNS geboren werden und anschließend nach dorsal wandern. Zusätzlich ist in Mz97-Embryonen die bereits in der Peripherie entstehende ePG10 nGFP-positiv, deren *in vivo* Migration allerdings erst später (unter Verwendung von *repo*>nGFP) beschrieben wird. Um die nGFP-positiven ePGs eindeutig zu identifizieren, wurden die aufgenommenen Embryonen direkt im Anschluss an die 4D-Aufnahmen präpariert, fixiert und gegen Repo gefärbt. Dadurch ist eine Verwechslung mit anderen, in Mz97-Embryonen ebenfalls nGFP-exprimierenden Zellen (mesodermale Zellen, Makrophagen und Oe) ausgeschlossen und die einzelnen nGFP-positiven ePGs können unter Berücksichtigung aller (gegen Repo gefärbten) ePGs identifiziert werden. Insgesamt habe ich elf 4D-Aufnahmen von Mz97 analysiert, wobei in jedem Film mindestens drei HS aufgenommen wurden. Eine repräsentative Aufnahme ist als „Film 1“ auf der beigefügten CD zusehen. Um die tatsächlich in unterschiedlichen konfokalen z-Ebenen vorliegenden ePGs gemeinsam darzustellen, wurden für die Anfertigung aller beigefügten Filme die entsprechenden z-Ebenen zusammengelagert. Zusätzliche Informationen zu den einzelnen Filmen finden sich im Anhang im Abschnitt 7.1. Für die nun folgende

Beschreibung der *in vivo* Migration der ePGs werden auch fixierte Filetpräparate der verschiedenen Stadien herangezogen, in denen neben dem nGFP-Signal von *repo-Gal4* kombiniert mit Mz97 (Mz97, nGFP/UAS-nGFP; *repo-Gal4/+*) auch alle Repo-positiven ePGs und die Fas2-positiven peripheren Nerven anhand von Antikörperfärbungen visualisiert sind (Abb. 3-5).

In den 4D-Aufnahmen von Mz97 hat die erste ePG (ePG9) das ZNS häufig bereits verlassen und liegt im PNS vor, wenn sie im frühen St.14 anhand des nGFP-Signals erkannt werden kann (Abb. 3-5 und Film 1, unausgefüllter gebogener Pfeil). In vielen Fällen konnte beobachtet werden, dass die ePG9 im weiteren Verlauf ihrer Wanderung nicht beständig nach dorsal (weg vom Bauchmark) migriert, sondern sich gelegentlich auch wieder auf das ZNS zubewegen kann. Nichtsdestotrotz erreicht sie am Ende der Embryogenese stets ihre charakteristische Position am ISN in der Nähe der Oe. Die nächste nGFP-positive Zelle, welche der ePG9 in die Peripherie folgt, ist die ePG7 (gebogener Pfeil). Meist kann diese Zelle direkt aufgrund ihres für gewöhnlich größeren Zellkerns identifiziert werden. Sie verlässt das ZNS etwa im St.13 und wandert ebenfalls entlang des ISN nach dorsal. Während ihrer Migration zeigt sie lediglich unbeträchtliche bidirektionale Bewegungen. Im St.13 erscheinen relativ zeitnah zwei weitere ePGs (ePG4 und ePG5) im Exitbereich. Beide Zellen liegen in der Regel dicht beieinander und migrieren entlang des SN nach dorsal in die Peripherie (Film 1, Film 2 und Abb. 3-5). Aus der klonalen Analyse geht hervor, dass es sich bei diesen beiden ePGs um Abkömmlinge eines SOPs handelt, welcher offensichtlich sehr nahe am ventralen Bauchmark entsteht. Die ePG5 demonstriert häufig auffällige dynamische Bewegungen, indem sie wiederholt ein Stück nach dorsal und wieder zurück wandert. Diese Dynamik ist vermutlich der Grund, weshalb sie am Ende der Embryogenese vereinzelt proximaler als die ePG4 lokalisiert ist (Tab. 3-3). Für gewöhnlich ist sie aber am Ende der Migration nah am Abzweigungspunkt des SNc, distal zur ePG4 positioniert (Film 1 und Abb. 3-5, Pfeil). Die ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze) zeigt keine auffällig dynamische Bewegung und migriert vielmehr stetig entlang des SN in die Peripherie. Im späten St.16 kann sie meist deutlich abgesetzt von den mit dem ISN assoziierten ePGs am SN ausgemacht werden, dessen beide Nervenzweige (SNa und SNc) sie umhüllt (Abb. 3-1, 3-5 und Film 5). Des Weiteren sind in Mz97-Embryonen noch die ePG1 und ePG3 im Exitbereich nGFP-positiv. Deren Migration konnte anhand der 4D-Aufnahmen allerdings nicht detailliert analysiert werden. Dies hängt insbesondere

damit zusammen, dass diese beiden Zellen in Mz97 erst anhand des nGFP-Signals detektiert werden können, wenn sie bereits in der Transitionszone vorliegen. Darüber hinaus fällt es generell schwer, die Wanderung der im Exitbereich lokalisierten ePGs in den 4D-Aufnahmen auszuwerten, da dieser Bereich in (für die Aufnahmen verwendetet) intakten Embryonen (im Gegensatz zu Filetpräparaten) stark gestaucht ist und zudem tiefer im Inneren des Embryos liegt. Zusammenfassend konnte mittels der 4D-Aufnahmen von Mz97 ein stereotyper und reproduzierbarer Wanderungsprozess der einzelnen nGFP-positiven ePGs beobachtet werden. Zudem stellte sich heraus, dass sich die Reihenfolge, mit der die ePGs nach dorsal in die Peripherie wandern, grundsätzlich nicht ändert. Dies trifft insbesondere für die entlang des ISN auswandernden ePGs (ePG1, ePG3, ePG7 und ePG9) zu. In keiner der *in vivo* Aufnahmen konnte beobachtet werden, dass sich diese Zellen während ihrer Wanderung überholen und folglich ändert sich ihre Reihenfolge bis zum Ende der Embryogenese nicht. Variieren kann in unterschiedlichen HS aber der zum Teil dynamische Verlauf der Migration einzelner nGFP-positiver ePGs und ihre exakte Lage im späten St.16.

Um die Migration aller ePGs *in vivo* zu untersuchen, wurde als nächstes die pan-gliale Treiberlinie *repo-Gal4* genutzt, um UAS-nGFP in allen ePGs zu exprimieren. Für die 4D-Aufnahmen habe ich Embryonen verwendet, in denen *repo-Gal4* in Kombination mit Mz97 und zwei Kopien von UAS-nGFP vorliegt (Genotyp = Mz97/+, UAS-nGFP/UAS-nGFP; *repo-Gal4/+*). Durch die zwei Kopien von UAS-nGFP konnte das nGFP-Signal intensiviert und somit früh detektiert werden. Darüber hinaus können durch die Kombination mit Mz97 die ebenfalls nGFP-exprimierenden Oe weiterhin als Landmarke verwendet werden.

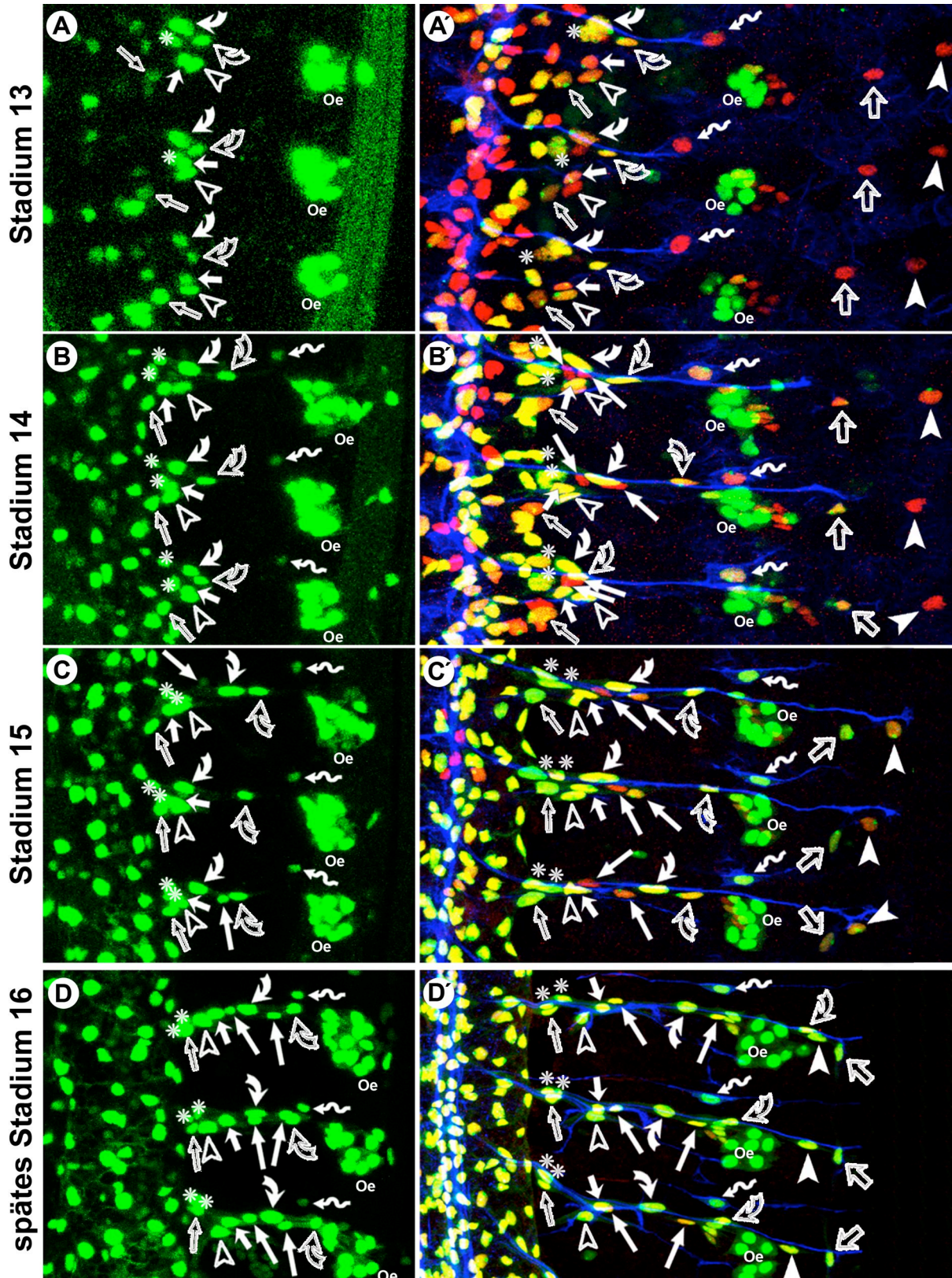
In den 4D-Aufnahmen von *repo-Gal4* kombiniert mit Mz97 können die ePGs bereits ab dem späten St.12 detektiert werden, wenn sie noch im Exitbereich lokalisiert sind (Film 2). Bereits bevor die ePG9 mit ihrer Wanderung ins PNS beginnt, erscheint weiter distal am ISN eine andere nGFP-positive Zelle, bei der es sich um die ePG12 (geschwungener Pfeil) handelt. Diese von einem SOP abstammende ePG wandert zunächst entlang des ISN bis sie etwa auf Höhe der Ligamentzellen des Ich liegt. Dort verweilt sie kurz und verlässt den ISN anschließend, indem sie nach anterior migriert (Film 2 und Abb. 3-5, geschwungener Pfeil). Am Ende der Embryogenese ist die ePG12 mit dem TN assoziiert. Sie ist die einzige ePG, die an diesem peripheren Nerv liegt und ihn zumindest teilweise umhüllt. Der Verlauf der Wanderung von

ePG4, ePG5, ePG7 und ePG9 wurde bereits anhand der 4D-Aufnahmen von Mz97 beschrieben. Eine Besonderheit offenbarte die *in vivo* Migrationanalyse der beiden von NB2-5 abstammenden ePGs (ePG6 und ePG8, dünne Pfeile). Es zeigte sich, dass diese beiden Zellen für gewöhnlich zeitlich verzögert zur ePG7 und ePG9 ebenfalls entlang des ISN in die Peripherie migrieren. Während dieser Wanderung konnte mehrfach beobachtet werden, dass eine oder sogar beide Abkömmlinge des NB2-5 die bereits in der Peripherie vorliegende ePG7 überholen (Film 2, HS A5 und Film 3). In seltenen Fällen konnte außerdem aufgezeichnet werden, wie sich die ePG6 und ePG8 gegenseitig überholen (Film 3). Da gegenwärtig mittels molekularer Marker nicht zwischen der ePG6 und ePG8 unterschieden werden kann (siehe Abschnitt 3.1.3), ist es durchaus möglich, dass diese beiden Zellen identische Schicksale besitzen und ihre Positionen daher untereinander austauschbar sind. Prinzipiell unterscheidet sich somit die Migration der übrigen entlang des ISN migrierenden ePGs von der Wanderung der ePG6 und ePG8, da sie sich wie vorausgehend erwähnt nicht überholen und ihre Reihenfolge demzufolge im gesamten Verlauf der Migration beibehalten.

Im Vergleich zu den 4D-Aufnahmen von Mz97 können die drei im Exitbereich lokalisierten ePGs (ePG1-ePG3) in 4D-Aufnahmen von *repo-Gal4* kombiniert mit Mz97 wesentlich früher beobachtet werden. Dass die detaillierte Analyse ihrer Migration aufgrund des gestauchten Exitbereiches schwerer fällt, wurde bereits vorausgehend erwähnt. Dennoch kann in 4D-Aufnahmen von *repo-Gal4* beobachtet werden, wie sie sich geringfügig nach distal bewegen. Dabei wandern zwei von ihnen (die beiden vom NB1-3 abstammenden ePG1 und ePG3, Sternchen) entlang des ISN und die ePG2 (unausgefüllter dünner Pfeil) entlang des SN (Film 2 und Abb. 3-5). In seltenen Fällen kann beobachtet werden, wie die ePG3 entlang des ISN etwas weiter in die Peripherie und anschließend wieder zügig zurück zu ihrer gewohnten Position nahe dem Bauchmark migriert. Dabei kann sie kurzzeitig distaler positioniert sein, als die beiden am SN auswandernden ePG4 und ePG5 (Film 3).

Indem der Embryo für die 4D-Aufnahmen etwas lateraler positioniert wurde, konnte auch die Wanderung der von einem SOP abstammenden ePG10 (Pfeilspitze) *in vivo* dokumentiert und analysiert werden (siehe dazu Abb. 3-5). Diese Zelle entsteht etwa im St.13 dorsal der ebenfalls in der Peripherie geborenen ePG11 (unausgefüllter Pfeil). Im Verlauf der Embryogenese migriert die ePG10 nach ventral in Richtung der Oe und passiert dabei etwa im späten St.15 die ePG11, die sich ihrerseits nicht

merklich bewegt. Im St.16 erreicht die ePG10 ihre charakteristische Position in der Nähe der Oe. In keiner der *in vivo* Aufnahmen konnte beobachtet werden, dass diese Zelle die vom ZNS am weitesten nach dorsal auswandernde ePG9 passiert.



**Abb. 3-5 (vorherige Seite): Illustration der Migration der ePGs *in vivo* und in fixierten Filetpräparaten**

Die linke Spalte (A-D) zeigt Momentaufnahmen der *in vivo* 4D-Aufnahmen von Embryonen des Genotyps Mz97/+, UAS-nGFP/UAS-nGFP; *repo*-Gal4/+ zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Embryonalentwicklung. In der rechten Spalte (A`-D`) sind fixierte Filetpräparate der entsprechenden Stadien von Embryonen desselben Genotyps dargestellt, in denen die ePGs zusätzlich zur nGFP-Expression (grün) anhand der Repo-Antikörperfärbung (rot) detektiert werden können. Darüber hinaus sind die peripheren Nerven mittels einer Antikörperfärbung gegen Fas2 (blau) visualisiert, wodurch zu sehen ist, mit welchem Nervenstrang die einzelnen ePGs im Verlauf ihrer Migration assoziiert sind. Die individuellen ePGs sind entsprechend der in Abb. 3-3 eingeführten Symbolik markiert. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. Oe = Oozyten. Für weitere Details siehe Text und Film 2. (Abb aus von Hilchen et al., 2008)

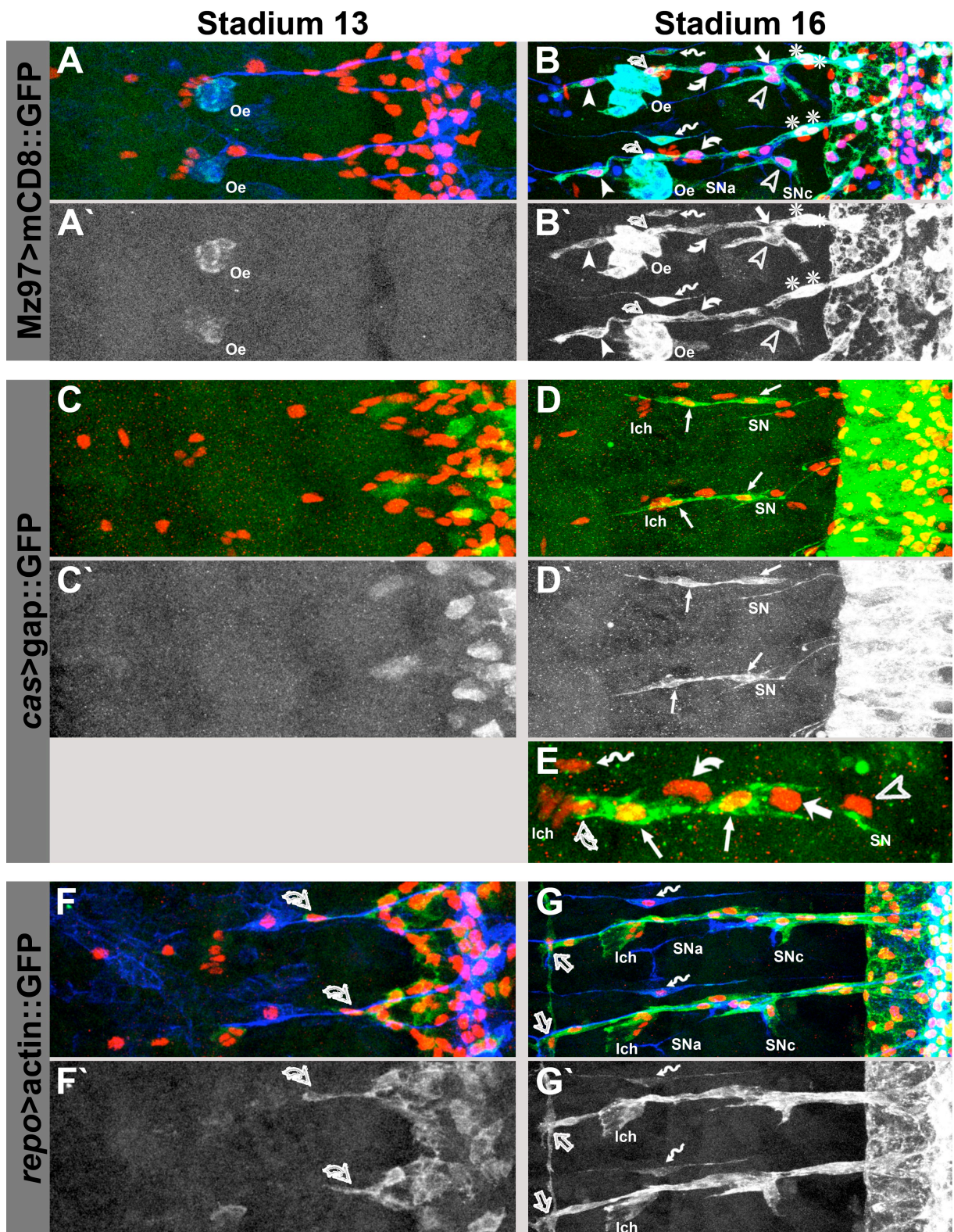
Die bislang beschriebene *in vivo* Migrationsanalyse bezieht sich genau genommen auf die Wanderung der Zellkerne der ePGs. Grundsätzlich spiegelt diese aber die Bewegung der gesamten Zelle wider. ePGs entsenden im Zuge ihrer Migration zwar zunächst Zellmembranausläufer in Form von Filopodien und Lamellipodien, diesen folgt aber im direkten Anschluss der Zellkörper und somit auch der Zellkern (Sepp et al., 2000; Edenfeld et al., 2006; Edenfeld et al., 2007). Dennoch habe ich mit dem Ziel, die Migration der gesamten Zelle *in vivo* zu beobachten, 4D-Aufnahmen erprobt, in denen mittels Mz97, *cas*-Gal4 oder *repo*-Gal4 GFP-markierte Transmembranproteine (UAS-mCD8::GFP, UAS-gap::GFP) bzw. GFP-getaggetes Aktin (UAS-Aktin::GFP) in den ePGs exprimiert wird. Bei den durchgeführten 4D-Aufnahmen unter Verwendung von Mz97 und *cas*-Gal4 war es allerdings nicht möglich, der Wanderung GFP-markierter ePGs zu folgen, da in beiden Fällen ein detektierbares GFP-Signal erst sehr spät in den einzelnen ePGs zu erkennen war. In 4D-Aufnahmen von Mz97 kombiniert mit UAS-mCD8::GFP (Mz97>mCD8::GFP) erscheinen die Oe zwar bereits ab St.13 GFP-positiv (Abb. 3-6 A und A`, Film 4), ein erkennbares GFP-Signal ist in den ePGs aber erst etwa ab St.14/15 detektierbar (Film 4). Somit werden die ePGs im Vergleich zu 4D-Aufnahmen von Mz97 kombiniert mit UAS-nGFP noch später visualisiert. Dies liegt vermutlich daran, dass nGFP im Zellkern konzentriert vorliegt und dadurch früher detektiert werden kann, als über die gesamte Zelle verteiltes mCD8::GFP, Aktin::GFP bzw. gap::GFP. Trotz der Beobachtung, dass die Migration der Mz97-positiven ePGs durch die verwendeten Zellmarker nicht klar analysiert werden kann, ist gegen Ende der Aufnahmen deutlich die Dynamik der Membranausläufer einzelner ePGs (und auch der Oe) zu sehen (Film 4). Die Dimensionen der einzelnen Mz97-positiven ePGs am Ende der Embryogenese können klarer in fixierten Filetpräparaten erfasst werden (Abb. 3-6 B und B`). Die Zellkörper der beiden nah am Bauchmark liegenden Mz97-positiven ePG1 und ePG3 (Abb. 3-6 B und B`, Sternchen) können nicht voneinander

unterschieden werden. Dennoch ist zu sehen, dass diese beiden Zellen bereits die peripheren Nerven im Exitbereich nahezu vollständig bedecken. Separiert am SN liegt die ePG4 (Abb. 3-6 B und B', unausgefüllte Pfeilspitze), deren Zellausläufer sowohl den SNa als auch den SNc umhüllen, wodurch diese Zelle eine gekrümmte Morphologie aufweist. Die meist am Abzweigungspunkt des SNc lokalisierte ePG5 (Abb. 3-6 B und B', Pfeil) demonstriert im Gegensatz zu den anderen spindelförmigen ePGs eher eine kompakte, keilförmige Zellmorphologie. In dem posterioren der beiden in Abbildung 3-6 B und B' dargestellten HS zeigt die ePG5 kein mCD8::GFP-Signal, so dass bei dem Vergleich mit dem darüber liegenden HS klar zu erkennen ist, dass diese Zelle speziell den Bereich des Aufzweigungspunktes des ISN und SN besetzt. Weiter distal entlang des ISN können die spindelförmigen Zellkörper der Mz97-positiven ePG7 (Abb. 3-6 B und B', gebogener Pfeil), ePG9 (Abb. 3-6 B und B', unausgefüllter gebogener Pfeil) und ePG10 (Abb. 3-6 B und B', Pfeilspitze) ausgemacht werden. Da diese Zellen miteinander in Kontakt stehen, können strikte Zellgrenzen nicht bestimmt werden. Insgesamt bedecken ePG7, ePG9 und ePG10 die Fas2-positiven Faszikel des ISN bis etwa in Höhe der dorsalsten, Mz97-negativen, ePG11. Des Weiteren kann beobachtet werden, wie die Zellmembranausläufer der gelegentlich ebenfalls Mz97-positiven ePG12 (Abb. 3-6 B und B', geschwungener Pfeil) weite Bereiche des TN umhüllen.

In 4D-Aufnahmen von *cas-Gal4* kombiniert mit *UAS-gap::GFP* (*cas>gap::GFP*) sind im St.13 zwar bereits einige GFP-positive Zellen im ZNS zu sehen (Abb. 3-6 C und C'), die beiden *cas-Gal4*-positiven ePG6 und ePG8 können hingegen erst deutlich später ausgemacht werden. In den *in vivo* Aufnahmen waren unter Verwendung der verschiedenen UAS-Konstrukte zur Markierung der Zellen (*UAS-mCD8::GFP*, *UAS-Aktin::GFP*, *UAS-gap::GFP*) beide ePGs stets erst detektierbar, wenn sie bereits in der Peripherie vorlagen und auch dann war das GFP-Signal sehr schwach (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu können die Zelldimensionen der beiden *cas-Gal4*-positiven ePG6 und ePG8 in fixierten Filetpräparaten am Ende der Embryogenese, unterstützt durch Antikörperfärbungen gegen GFP, deutlicher identifiziert werden (Abb. 3-6 D und D', dünne Pfeile). Beide Zellen präsentieren eine spindelförmige Morphologie und bedecken einen Abschnitt des ISN, der vom Abzweigungspunkt des SNc bis hin zur Höhe des Ich (zum Teil sogar noch weiter nach distal) reicht (Abb. 3-6 D und E). Dementsprechend umhüllen sie denselben Abschnitt des ISN, der auch von den Zellkörpern der ePG7 und ePG9 umschlossen wird (Vergleiche Abb. 3-6 B

und E). Darüber hinaus kann in den Filetpräparaten häufig beobachtet werden, dass Zellmembranausläufer der ePG6 und ePG8 die Zellkerne anderer ePGs umschließen (Abb.3-6 E). Da ePG6 und ePG8 erst etwas später als die anderen ePGs nach distal migrieren und dabei die bereits in der Peripherie vorliegenden ePGs überholen ist es am wahrscheinlichsten, dass sie über die in der Peripherie vorliegenden ePGs hinweg wandern und diese anschließend umhüllen. Damit würde es sich bei ePG6 und ePG8 vermutlich um die ersten embryonalen ePGs handeln, die im weiteren Verlauf der Larvalentwicklung das Perineurium, also die äußerste gliale Zellschicht um die peripheren Nerven bilden (Stork et al., 2008).





**Abb. 3-6: Analyse der Zelldimensionen einzelner ePGs**

Dargestellt sind Filepräparate von Embryonen, in denen durch Expression von GFP-markierten UAS-Konstrukten mittels spezifischer Gal4-Linien die Zelldimensionen von Subgruppen bzw. allen ePGs visualisiert sind. Die Zellkerne sind durch Antikörperfärbungen gegen Repo (rot) markiert und in (A), (B), (F) und (G) können zudem die peripheren Nerven aufgrund einer Antikörperfärbung gegen Fas2 (blau) detektiert werden. In (A)-(E) wurden zusätzliche Antikörperfärbungen gegen GFP durchgeführt, um das GFP-Signal zu verstärken. Die Markierung individueller ePGs erfolgt entsprechend der in Abb. 3-3 eingeführten Symbolik. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal links.

(A-B') Expression von UAS-mCD8::GFP mittels Mz97. Die Oe zeigen bereits im St.13 (A und A') eine GFP-Expression, nicht aber die ePGs. In (A') ist nur das GFP-Signal dargestellt. (B und B') Im St.16

können die Zelldimensionen der Mz97-positiven ePGs deutlich anhand des GFP-Signals detektiert werden. Das mCD8::GFP-Signal allein ist in (B') zu sehen. (C-E) Durch die *cas-Gal4* getriebene Expression von UAS-gap::GFP können die Zellkörper der ePG6 und ePG8 visualisiert werden. Im St.13 (C und C') exprimieren viele Zellen im ZNS gap::GFP, die ePG6 und ePG8 können aber noch nicht erkannt werden. In (C') ist nur das GFP-Signal zu sehen. (D und D') Im St.16 sind die spindelförmigen Zellkörper der ePG6 und ePG8 (dünne Pfeile) deutlich auszumachen. Außerdem sind Abschnitte des SN GFP-positiv, da auch Motoneurone *cas-Gal4* exprimieren. (D') Gap::GFP-Signal alleine. (E) zeigt eine Detailansicht des Bereiches zwischen dem Abzweigungspunkt des SNc und dem Ich, in welchem die ePG6 und ePG8 im St.16 lokalisiert sind. Häufig kann beobachtet werden, dass Zellmembranausläufer der ePG6 und ePG8 benachbarte ePGs umschließen (hier die ePG5 (Pfeil) und die ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil)). (F-G') Die Zelldimensionen aller ePGs können durch Expression von UAS-Aktin::GFP mittels *repo-Gal4* visualisiert werden. Bereits im St.13 (F und F') können die Zellkörper der noch überwiegend im Exitbereich lokalisierten ePGs detektiert werden. (F') Aktin::GFP-Signal allein. (G und G') Am Ende der Embryogenese ist es mit Ausnahme der separiert am DLN lokalisierten ePG11 (unausgefüllter Pfeil) und der mit dem TN assoziierten ePG12 (geschwungener Pfeil) nicht möglich, zwischen den Zellkörpern einzelner ePGs zu unterscheiden. (G') Aktin::GFP-Signal allein. Ich = laterales Chordotonalorgan, Oe = Oenozyten, SN(a/c) = Segmentalnerv(a/c). Für Details siehe Text sowie Film 4 und 5.

In den 4D-Aufnahmen von *repo-Gal4* kombiniert mit UAS-Aktin::GFP (*repo>Aktin::GFP*) sind die Zellkörper der ePGs im Gegensatz zu den voraus beschriebenen Treiberlinien Mz97 und *cas-Gal4* wesentlich früher detektierbar. Bereits ab dem frühen St.13 können sie anhand des GFP-Signals erkannt werden (Abb. 3-6 F und F', Film 5). Da allerdings durch *repo-Gal4* die Zellkörper aller ePGs visualisiert werden die während der Migrationsphase für gewöhnlich eine lang gestreckte, spindelförmige Morphologie besitzen, dicht beieinander liegen und zum Teil enorm überlappende Zellkontakte aufweisen, ist es dennoch nicht möglich, der Migration einzelner, identifizierbarer ePGs zu folgen (Film 5). In den *in vivo* Aufnahmen ist jedoch zu erkennen, wie einzelne ePGs im Verlauf ihrer Migration ständig zytoplasmatische Zellausläufer aussenden und wieder zurückziehen. Besonders gut kann dies bei der separiert am SN vorliegenden ePG4 beobachtet werden, die progressiv die zwei Nervenzweige (SNa und SNc) des SN umhüllt. Distinkte Zelldimensionen einzelner ePGs können auch in fixierten Präparaten am Ende der Embryogenese nicht ausgemacht werden (Abb. 3-6 G und G'). Ausnahmen bilden lediglich die beiden deutlich separierten ePGs: die am DLN lokalisierte ePG11 (Abb. 3-6 G und G', unausgefüllter Pfeil) und die mit dem TN assoziierte ePG12 (Abb. 3-6 G und G', geschwungener Pfeil).

\*\*\*\*\*

Kompakte Zusammenfassung des ersten Kapitels (3.1):

Am Ende der Embryogenese können in wildtypischen abdominalen HS 12 ePGs detektiert werden, deren Membranausläufer die axonalen Trakte im PNS nahezu vollständig umhüllen. Durch den Einsatz molekularer Marker konnte gezeigt werden, dass die einzelnen ePGs individuelle Identitäten besitzen und charakteristische Positionen entlang der peripheren Nerven einnehmen. Eine Ausnahme bilden gegenwärtig die ePG6 und ePG8, die die gleichen Markergene exprimieren und demnach bislang nicht voneinander unterschieden werden können. Mittels Dil-Markierungen konnte der klonale Ursprung sämtlicher vom ZNS auswandernder ePGs (ePG1-ePG9) entschlüsselt werden. Zuvor ging man davon aus, dass sie alle von NB1-3, NB2-5 und NB5-6 generiert werden. Es zeigte sich aber, dass dies für ePG4 und ePG5 nicht zutrifft, da diese beiden Zellen von einem SOP gebildet werden. In gewissem Maße spiegeln sich die Verwandtschaftsverhältnisse der ePGs auch in ihrer Markerexpression wider: so exprimieren beispielsweise die beiden Abkömmlinge des NB2-5, die ePG6 und ePG8, bislang identische molekulare Marker und die vom NB5-6 generierte ePG2 ist als einzige Lbe-positiv (und exprimiert keine der in anderen ePGs vorkommenden Markergene).

Im Rahmen der *in vivo* Migrationsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Wanderung individueller ePGs zwar dynamisch, aber grundsätzlich stereotyp verläuft, wobei sich die Reihenfolge der entlang eines Faszikels bewegenden ePGs nicht ändert. Eine Ausnahme hierzu bilden die ePG6 und ePG8, da diese beiden Zellen bereits in der Peripherie vorliegende ePGs überholen (können). Dies und die Beobachtung, dass ihre Zellmembranausläufer andere ePGs offensichtlich umschließen suggeriert, dass die ePG6 und ePG8 über bereits in der Peripherie vorliegende ePGs hinwegwandern und diese anschließend umhüllen. Ferner wurde in diesem ersten Kapitel eine neue, einheitliche Nomenklatur aller ePGs vorgestellt, da vorausgegangene Benennungen stets unvollständig und inkonsistent waren.

\*\*\*\*\*

## 3.2 Untersuchung der Zell-Zell-Interaktionen im Verlauf der Migration durch Ablationsexperimente

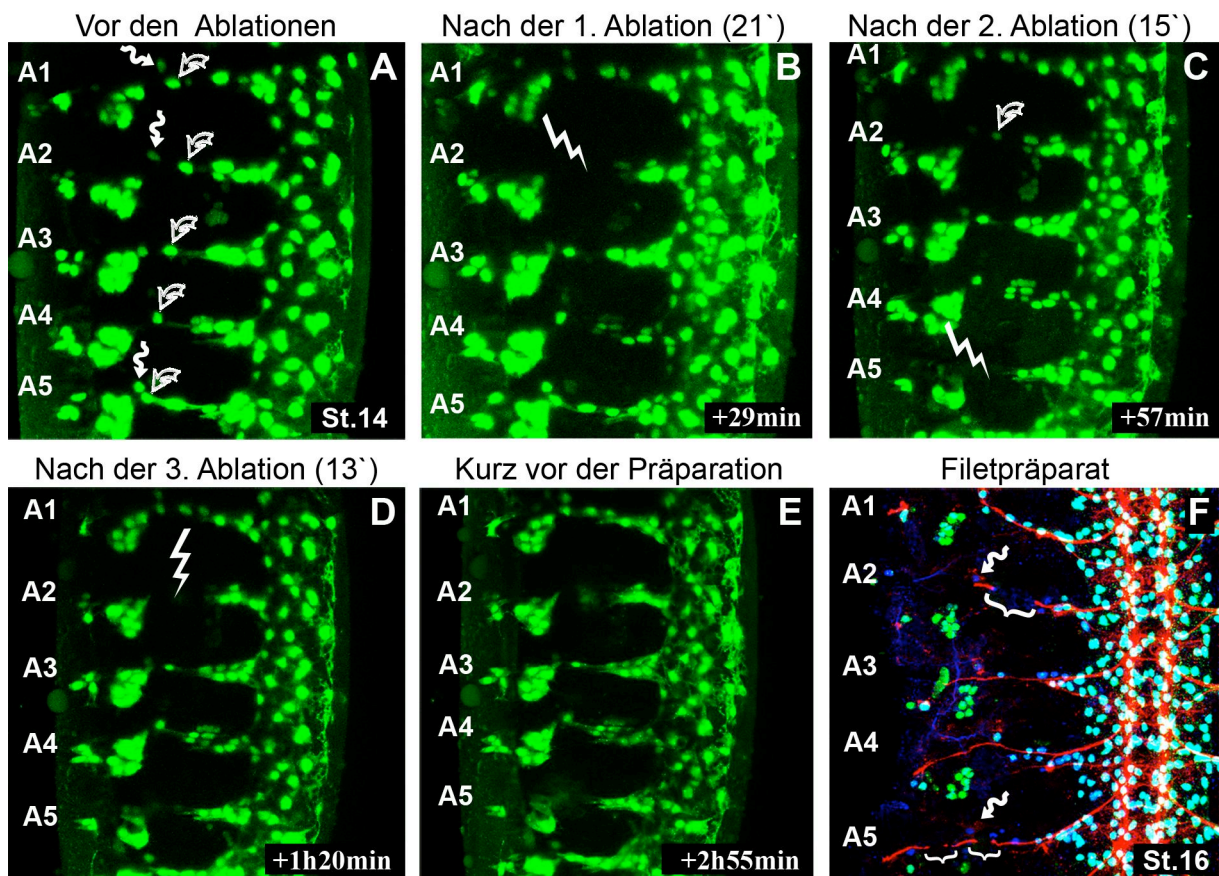
### 3.2.1 *In vivo* Ablation durch Laserbestrahlung

In vorausgegangenen Arbeiten wurde beschrieben, dass die vom ZNS abstammenden ePGs perlschnurartig aneinandergereiht in die Peripherie migrieren, wobei sich ihre Reihenfolge nicht zu ändern scheint (Sepp et al., 2000; Sepp und Auld, 2003a). Die Vorderste der wandernden Gliazellen generiert auffällig viele Zellmembranausläufer und wird als Pionier-Glia bezeichnet (Sepp und Auld, 2003a). Dementsprechend werden auch die im Zuge der Pupalentwicklung entlang der Flügelnerven wandernden Gliazellen in Pionier- und Folge-Glia unterteilt. Auch im Flügel zeichnen sich Pionier-Glia dadurch aus, dass sie an der Spitze der migrierenden Zellkette von Gliazellen positioniert sind und ihre Umgebung durch die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien nach extrinsischen Signalen auskundschaften (Aigouy et al., 2004; Aigouy et al., 2008).

Die im Voraus beschriebene *in vivo* Migrationsanalyse der ePGs (Abschnitt 3.1.6) zeigt, dass die anfangs entlang des ISN nach dorsal wandernden ePGs tatsächlich eine strikte Reihenfolge beibehalten, wobei die ePG9 den Exitbereich stets als erste Zelle verlässt (Abb. 3-6). Somit ist es am wahrscheinlichsten, dass es sich bei dieser Zelle um die Pionier-Glia handelt, welche besonders auf extrinsische (wegweisende) Signale aus ihrer Umgebung reagiert und den nachfolgenden ePGs den Weg vorgibt. Um dies experimentell zu überprüfen, habe ich versucht die ePG9 möglichst früh während der Migrationsphase *in vivo* durch energiereiche Laserbestrahlung zu ablatieren. Wenn es sich bei dieser Zelle tatsächlich um eine Pionier-Glia handelt, deren Funktion nicht einfach von der nachfolgenden ePG übernommen werden kann, dann sollte ihr früher Verlust die Wanderung der nachfolgenden ePGs beeinträchtigen. Um sämtliche ePGs möglichst früh zu detektieren, wurden für die *in vivo* Ablationen Embryonen verwendet, in denen *repo-Gal4* mit *Mz97* kombiniert vorliegt (Abb. 3-7). Anfängliche Versuche, die ePG9 durch eine intensive Bestrahlung mit einem Argon-Ionen-Laser (488nm) zu eliminieren scheiterten, da sich herausstellte, dass die Energie dieses Lasers nicht ausreicht, um die Zelle zu ablatieren. Die GFP-Fluoreszenz der bestrahlten Zelle bleicht zwar innerhalb weniger

Minuten aus, allerdings konnte im weiteren Verlauf der 4D-Aufnahme stets ein wiederaufkommendes GFP-Signal in der entsprechenden Zelle detektiert werden. Folglich exprimiert sie weiterhin nGFP und hat die Bestrahlung überlebt. Daher wurde in nachfolgenden Ablationsexperimenten für die Bestrahlung der zu eliminierenden Zelle der Argon-Ionen-Laser zusammen mit einem (kurzwelligeren (351nm) und somit energiereicheren) UV-Laser eingesetzt. Nach anfänglichen Misserfolgen, bei denen trotz der Kombination der beiden Laser die ePG9 nicht ablatiert werden konnte, sondern lediglich ausbleichte und später wieder anhand ihres nGFP-Signals detektierbar war, wurde die Dauer der Bestrahlung sukzessiv erhöht. Nach einer Bestrahlungsdauer von ca. 15min konnte die ePG9 in den meisten Fällen effektiv eliminiert werden (Abb. 3-7, HS A5). Vereinzelt reichte aber selbst eine 20-minütige Bestrahlung nicht aus, um die Zelle abzutöten (Abb. 3-7 B und C, HS A2). Infolge einer gelungenen Ablation der ePG9 konnte in dem entsprechenden HS deutlich beobachtet werden, dass die nachfolgenden ePGs nicht mehr weit genug nach dorsal in die Peripherie migrieren (Abb. 3-7 A-E, HS A2 und A5). Allerdings stellte sich heraus, dass die beeinträchtigte Migration der ePGs in den entsprechenden HS nicht zwangsläufig auf den Verlust der ePG9 zurückgeführt werden kann. Denn in fixierten Filetpräparaten der Embryonen die im direkten Anschluss an die *in vivo* Ablation angefertigt wurden, war deutlich zu sehen, dass die Laserbestrahlung auch das umliegende Gewebe schädigt (Abb. 3-7 F). Antikörperfärbungen gegen Fas2 enthüllten deutliche Defekte der Nervenstränge in den bestrahlten Bereichen (Abb. 3-7 F, Klammern). Da die peripheren Nerven als „Leitschiene“ für die Wanderung der ePGs fungieren (Sepp und Auld, 2003b) ist es durchaus möglich, dass die beeinträchtigte Migration der Gliazellen auf die Beschädigung der peripheren Nervenstränge zurückzuführen ist. Um derartige sekundäre Effekte eindeutig auszuschließen, ist es erforderlich, die Versuchsbedingungen für die *in vivo* Ablationen so zu optimieren, dass ausschließlich die ePG9 durch die Laserbestrahlung eliminiert wird. Während dieses Bestrebens erschien eine Publikation aus der Arbeitsgruppe von A. Giangrande, in der von einem entsprechenden Setup zur selektiven *in vivo* Ablation von Einzelzellen berichtet wird (Soustelle et al., 2008). Daher erschien es zweckmäßig, im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von A. Giangrande die Ablation der ePG9 unter Verwendung des beschriebenen Versuchsaufbaus durchzuführen. Bedingt durch die im zweiten Teil meiner Arbeit beschriebene umfangreiche Analyse der

Rolle von Netrin bei der ePG Wanderung ist es mir allerdings (bislang) aus zeitlichen Gründen nicht gelungen, diesem Vorhaben nachzukommen.



**Abb. 3-7: *In vivo* Ablation der ePG9**

Die Bilder (A-E) zeigen Momentaufnahmen der *in vivo* 4D-Aufnahmen eines Embryos des Genotyps *Mz97/+*, *UAS-nGFP/UAS-nGFP*; *repo-Gal4/+* zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Embryonalentwicklung (frühen St.14-16). Durch Laserbestrahlung wurde die ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil) in den HS A2 und A5 ablatiert. Im Anschluss an die 4D-Aufnahme wurde der Embryo fixiert und präpariert. (F) zeigt das entsprechende Filetpräparat, in welchem die ePGs zusätzlich zu nGFP (grün) anhand einer Repo-Färbung (blau) detektiert werden können. Peripheren Nerven sind durch eine Antikörperfärbung gegen Fas2 (rot) visualisiert. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal links.

(A) Zu Beginn der Aufnahme befand sich der Embryo im St.14. Die ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil) ist in jedem der aufgezeichneten HS bereits ein Stück weit in die Peripherie migriert. Im HS A1, A2 und A5 ist in ihrer unmittelbaren Nähe die ePG12 auszumachen (geschwungener Pfeil). (B) Nach der ersten 21-minütigen Ablation (symbolisiert durch den Blitz) der ePG9 im HS A2 kann diese Zelle nicht mehr anhand eines GFP-Signals detektiert werden. Zudem ist auch die ePG12 nicht mehr zu sehen. (C) Mittels einer weiteren 15-minütigen Laserbestrahlung der ePG9, diesmal im HS A5, kann auch diese Zelle nicht länger ausgemacht werden. Hingegen ist im HS A2 deutlich ein wieder einsetzendes GFP-Signal der zuvor bestrahlten ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil) erkennbar. (D) Nach einer zweiten 13-minütigen Bestrahlung der ePG9 im HS A2 ist diese Zelle nicht mehr zu sehen. Die zuvor im HS A5 ablatierte ePG9 kann weiterhin nicht detektiert werden. (E) Gegen Ende der Embryogenese (St.16) kann weder im HS A2 noch im HS A5 ein wiederaufkommendes GFP-Signal der zuvor bestrahlten ePG9 registriert werden. In beiden HS wandern die verbleibenden ePGs nicht weit genug nach dorsal aus. (F) Im fixierten Präparat ist anhand der Repo-Färbung (blau) zu sehen, dass die ePG9 in den HS A2 und A5 tatsächlich eliminiert wurde. Die zum Zeitpunkt der jeweiligen Bestrahlung in der Nähe der ePG9 lokalisierte ePG12 scheint keinen Schaden genommen zu haben, da sie in beiden HS an wildtypischer Position vorliegt (geschwungener Pfeil). Indes zeigt die Antikörperfärbung gegen Fas2 (rot), dass durch die Laserbestrahlung auch die peripheren Nerven geschädigt wurden, die als Folge klare Lücken aufweisen (Klammern).

### 3.2.2 *In vivo* Ablation durch Expression proapoptotischer Gene

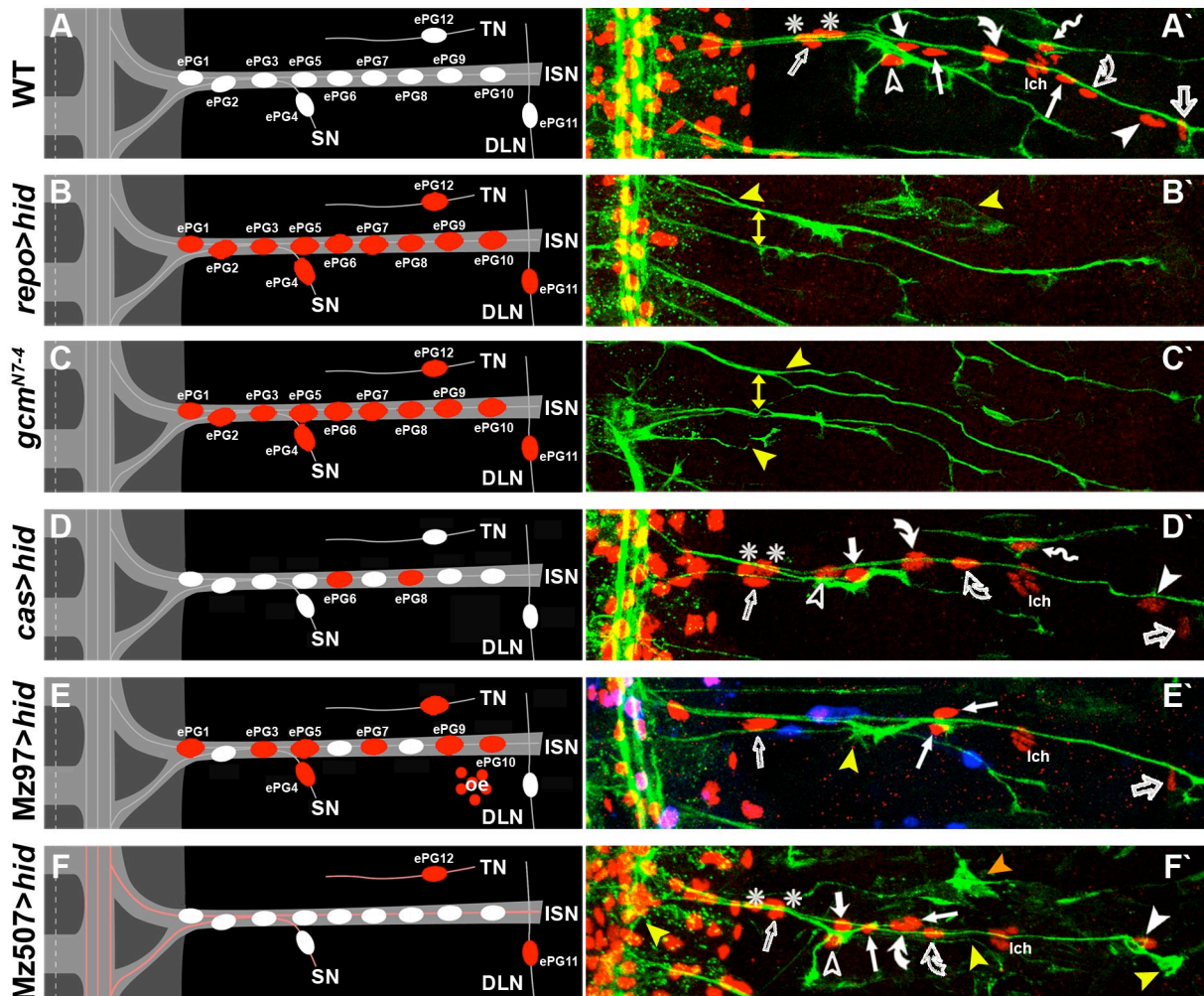
Eine gängige Methode zur Ablation von Zellen in *Drosophila* ist die Expression von proapoptotischen Genen unter Verwendung des Gal4/UAS Systems (Brand und Perrimon, 1993; Hidalgo et al., 1995; Sepp et al., 2001; Sepp und Auld, 2003b). Für die im Folgenden beschriebenen Ablationsexperimente wurde das proapoptotische Gen *head involution defective* (*hid*; via UAS-*hid*) durch verschiedene Gal4-Linien in allen bzw. in distinkten ePGs exprimiert. Die Folgen des jeweils induzierten Verlustes von ePGs auf die verbleibenden Gliazellen und peripheren Nerven am Ende der Embryogenese sind in Abb. 3-8 dargestellt. Durch die pan-gliale Expression von UAS-*hid* mittels *repo*-Gal4 (*repo*>*hid*) werden prinzipiell alle ePGs ablatiert (Abb. 3-8 B und B'). Allerdings sind im St.13/14 noch vereinzelt ePGs in der Peripherie zu sehen (nicht gezeigt). Im ZNS können hingegen selbst am Ende der Embryogenese weiterhin einige Gliazellen beobachtet werden (Abb. 3-8 B'). Trotz des Verlustes aller ePGs können in den entsprechenden HS stets die Faszikel des ISN, SN und TN erkannt werden, die allerdings deutliche Faszikulationsdefekte aufweisen (Abb. 3-8 B', gelbe Pfeilspitzen). Besonders auffällig ist zudem die enorme Distanz zwischen dem ISN und SN (Abb. 3-8 B', Doppelpfeil). Normalerweise liegen diese beiden Nervenstränge im Exitbereich zunächst dicht beieinander und separieren sich erst auf Höhe von ePG4 und ePG5 deutlich voneinander (Abb. 3-8 A'). Für *gcm*-Mutanten wurden bereits axonale Phänotypen beschrieben (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996), die mit den in *repo*>*hid*-Embryonen beobachteten übereinstimmen. So präsentieren *gcm*<sup>N7-4</sup>-Mutanten ebenfalls diverse Faszikulationsdefekte der peripheren Nerven (Abb. 3-8 C', gelbe Pfeilspitzen) und die Faszikel des ISN und SN projizieren deutlich getrennt voneinander in die Peripherie (Abb. 3-8 C', Doppelpfeil). Darüber hinaus sind in *gcm*<sup>N7-4</sup>-Mutanten enorme Schäden der longitudinalen Trakte im ZNS zu beobachten. Die Konnektive sind stark defaszikuliert und weisen mehrfach Brüche auf (Abb. 3-8 C'). Die drastischere Ausprägung axonaler Defekte in *gcm*<sup>N7-4</sup>-Mutanten im Vergleich zu *repo*>*hid*-Embryonen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Gliazellen in *gcm*<sup>N7-4</sup>-Mutanten (mit wenigen Ausnahmen) erst gar nicht generiert werden. Zusammenfassend offenbaren die axonalen Phänotypen von *repo*>*hid*-Embryonen und *gcm*<sup>N7-4</sup>-Mutanten, dass die peripheren Nerven grundsätzlich auch ohne ePGs in der Lage sind in die Peripherie

zu projizieren, allerdings am Ende der Embryogenese deutliche Faszikulationsdefekte aufweisen.

Durch die *cas*-Gal4 getriebene Expression von UAS-*hid* (*cas>hid*) können spezifisch die ePG6 und ePG8 eliminiert werden (Abb. 3-8 D und D'). Gegen Ende der Embryogenese sind diese beiden Tochterzellen des NB2-5 in keinem der abdominalen HS mehr vorhanden (n = 7 Embryonen). Der Verlust der ePG6 und ePG8 hat offensichtlich keinerlei Auswirkung auf die verbleibenden ePGs, da diese jeweils an ihren charakteristischen Positionen vorliegen (Abb. 3-8 D'). Des Weiteren erscheinen auch die Trakte der peripheren Nerven meist wildtypisch.

Im Unterschied zu *cas>hid*-Embryonen, in denen reproduzierbar die ePG6 und ePG8 am Ende der Embryogenese fehlen, sind in Embryonen in denen UAS-*hid* mittels Mz97-Gal4 getrieben wird, im St.16 stets noch Mz97-positive ePGs vorhanden (Abb. 3-8 E', nGFP-positive ePG im Exitbereich). Aufgrund der Heterogenität der ablatierten ePGs fällt es gelegentlich schwer, die noch verbliebenen vom ZNS abstammenden ePGs eindeutig zu identifizieren. Dennoch scheint auch die Ablation von Mz97-positiven ePGs keinen signifikanten Einfluss auf die Positionierung der weiterhin vorhandenen (Mz97-negativen) ePGs auszuüben. So kann im Exitbereich stets eine GFP-negative ePG beobachtet werden, bei der es sich offensichtlich um die ePG2 handelt (Abb. 3-8 E', unausgefüllter dünner Pfeil). Zudem können distal am ISN immer zwei Mz97-negative ePGs detektiert werden, bei denen es sich augenscheinlich um die ePG6 und ePG8 handelt (Abb. 3-8 E', dünne Pfeile) und die Mz97-negative ePG11 kann ebenfalls in der Peripherie erkannt werden (Abb. 3-8 E', unausgefüllter Pfeil). Immer eliminiert sind ePG10 und die normalerweise mit den TN assoziierte ePG12. Trotz des Verlustes der ePG12 kann der TN grundsätzlich ausgemacht werden, allerdings ist das Fas2-positive „Körbchen“, welches die ePG12 für gewöhnlich umgibt, nicht immer zu sehen. Abgesehen von der weiteren Beobachtung, dass sich der Nervenzweig des SNc gelegentlich nicht vollständig ausbildet (Abb. 3-8 E', gelbe Pfeilspitze), zeigen die peripheren Nerven keine signifikanten Defekte.





**Abb. 3-8: *In vivo* Ablation von Gliazellen durch Gal4/UAS induzierte Expression des proapoptotischen Gens *hid***

Links (A-F) sind die ePGs anhand von Schemata rot markiert, welche in der entsprechenden für die Ablation verwendeten Enhancer-Trap-Linie Gal4 exprimieren. In der *gcm<sup>N7-4</sup>*-Mutante (C) bedeutet die Rotfärbung aller ePGs, dass diese erst gar nicht generiert werden. Die rechte Spalte (A'-F') zeigt die jeweiligen Filetpräparate eines abdominalen HS am Ende der Embryogenese (spätes St.16), in welchem die Gliazellen durch Antikörperfärbungen gegen Repo (rot) und die peripheren Nerven durch Fas2-Färbungen (grün) visualisiert sind. In (E') ist zusätzlich das nGFP-Signal (blau) von noch vorhandenen Mz97-positiven Zellen zu sehen. Die individuellen ePGs werden entsprechend der in Abb. 3-3 eingeführten Symbolik markiert. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. (A, A') WT. (B, B') *repo*-Gal4 getriebene Expression von UAS-*hid* in allen lateralen Gliazellen. (C, C') homozygote *gcm<sup>N7-4</sup>*-Mutante. (D, D') *cas*-Gal4 getriebene Expression von UAS-*hid* in der ePG6 und ePG8. (E, E') Mz97-Gal4 getriebene Expression von UAS-*hid* in der Subgruppe der Mz97-positiven ePGs. (F, F') Mz507-Gal4 getriebene Expression von UAS-*hid* in der ePG11 und ePG12. Signifikante axonale Defekte sind durch gelbe Pfeilspitzen vermerkt. Der Doppelpfeil in (B') und (C') markiert den auffälligen Abstand zwischen ISN und SN und die orangefarbene Pfeilspitze in (F') kennzeichnet die veränderte Morphologie des normalerweise die ePG12 umgebenden Fas2-positiven „Körbchens“. DLN = Dorsaler Longitudinaler Nerv, ISN = Intersegmentalnerv, Ich = laterales Chordotonalorgan, Oe = Oenozyten, SN = Segmentalnerv und TN = Transversalnerv. Erläuterungen siehe Text.

Mittels Mz507-Gal4 getriebener Expression von UAS-*hid* werden in jedem HS die ePG11 und ePG12 beseitigt (Abb. 3-8 F und F'). Die vom ZNS auswandernden ePGs können nahezu immer vollzählig in der Peripherie detektiert werden, gelegentlich scheint es aber so, als ob sie nicht weit genug nach dorsal migrieren.

Der TN ist trotz Ablation der ePG12 weiterhin zu sehen, jedoch weist das Fas2-positive „Körbchen“, welches normalerweise die ePG12 umgibt häufig eine veränderte Morphologie auf (Abb. 3-8 orangefarbene Pfeilspitze). Daneben zeigen Mz507>*hid*-Embryonen weitere axonale Phänotypen: so projiziert beispielsweise der ISN nicht weit genug nach dorsal, die Faszikel des SN erscheinen stellenweise dünner und im ZNS sind die longitudinalen Trakte häufig defaszikuliert oder ebenfalls schmaler als es im Wildtyp (WT) der Fall ist (Abb. 3-8, gelbe Pfeilspitzen). Bei Mz507-Gal4 handelt es sich um eine Enhancer-Trap-Linie, in der das P-Element kurz vor dem Transkriptionsstart des Fas2 Gens inseriert ist. Folglich exprimieren in Mz507>*hid*-Embryonen auch viele Fas2-positive Neurone das proapoptotische Gen. Dies ist vermutlich der Grund für die diversen axonalen Defekte.

\*\*\*\*\*

Kompakte Zusammenfassung des zweiten Kapitels (3.2):

Durch die kombinierte Bestrahlung mit einem Argon-Ionen- und UV-Laser ist es prinzipiell möglich, ePGs *in vivo* zu ablatieren. Entsprechend ihrer mutmaßlichen Rolle als Pionier-Glia kann beobachtet werden, dass die vom ZNS auswandernden ePGs infolge einer erfolgreichen Ablation der ePG9 nicht weit genug nach dorsal migrieren. Es stellte sich allerdings heraus, dass dieser Phänotyp nicht zwangsläufig auf den Verlust der ePG9 zurückgeführt werden kann. Denn durch die Laserbestrahlung wurde nicht nur diese Zelle eliminiert, sondern auch das sie umgebende Gewebe geschädigt. So weisen beispielsweise die peripheren Nervenstränge Defekte auf, die ebenfalls als möglich Ursache für die beeinträchtigte Wanderung der ePGs in Frage kommen.

Durch die *repo*-Gal4-vermittelte Ablation aller ePGs (*repo>hid*) und dem Vergleich mit *gcm<sup>N7-4</sup>*-Mutanten zeigte sich, dass die peripheren Nerven grundsätzlich auch in Abwesenheit der ePGs in die Peripherie projizieren. Allerdings weisen die axonalen Trakte als Folge des Verlustes der Gliazellen deutliche Faszikulationsdefekte auf. Die Ablation von Subgruppen der ePGs durch die *cas*-, Mz97- und Mz507-Gal4 getriebene Expression von UAS-*hid* resultiert in keiner signifikant beeinträchtigten Positionierung der jeweils noch verbliebenen ePGs.

\*\*\*\*\*

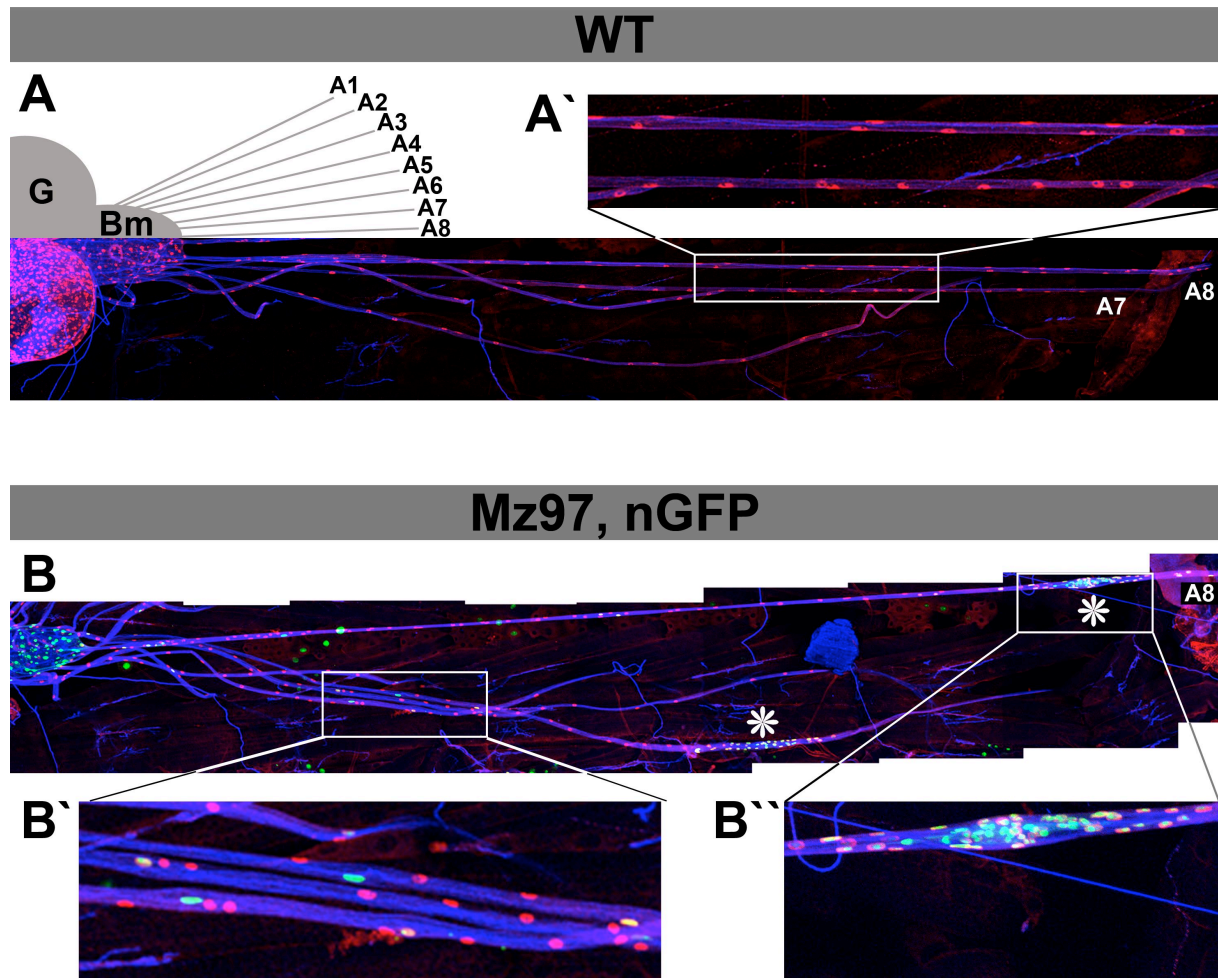
### 3.3 Periphere Glia (PGs) im späten Larvenstadium von *Drosophila*

#### 3.3.1 Muster der PGs am Ende der Larvalentwicklung

Während der Larvalentwicklung verändert sich die Morphologie der peripheren Nerven. Bedingt durch die enorme Größenzunahme im Vergleich zum Embryo projizieren die abdominalen Nerven zunächst in 16 kompakten Faszikeln in die Peripherie, um die jeweiligen Muskelfelder der abdominalen Segmente zu erreichen (Sun et al., 1999; Leiserson et al., 2000) (Abb. 3-9 A). Dort angekommen verzweigen sie sich weiter, um die einzelnen Muskeln zu innervieren. Anhand von frei präparierten peripheren Nerven in L3-Wanderlarven ist zu sehen, dass die Anzahl der Repo-positiven Zellkerne entlang der abdominalen Nerven im Vergleich zum Embryo (teilweise erheblich) gestiegen ist (Abb. 3-9 A). Dabei korreliert ihre Gesamtzahl offensichtlich mit der entsprechenden Länge des jeweiligen Faszikels, entlang dessen sie sich anreihen. So erhöht sich ihre Zahl sukzessiv von weniger als 20 Zellkernen, die mit dem relativ kurzen abdominalen Nerv A1 assoziiert sind, bis hin zu ca. 70 Zellkernen, die sich entlang des am weitesten nach posterior projizierenden abdominalen Nervs A8 anordnen. Folglich ist die Zahl der mit den einzelnen abdominalen Nerven assoziierten PGs in der Larve im Gegensatz zum Embryo nicht konstant.

Um zu überprüfen, ob dennoch einzelne der im Embryonalstadium identifizierten ePGs auch in der Larve weiterhin anhand ihrer Markerexpression erkannt werden können, habe ich das Expressionsmuster mehrerer Markerlinien in L3-Wanderlarven analysiert (Abb. 3-9 B und Tab. 3-4). In homozygoten Mz97-Larven sind grundsätzlich nGFP-positive PGs detektierbar (Abb. 3-9 B-B''). Allerdings ist ihre Anzahl im Unterschied zum Embryonalstadium sehr variabel. So können beispielsweise entlang des abdominalen Nervs A8 zwischen vier und 20 Mz97-positive PGs gezählt werden. Zudem waren in zwei der vier aufgenommenen Mz97-Larven verdickte Bereiche an einigen der peripheren Nerven zu erkennen, in denen auffällig viele Repo-positive Zellkerne vorliegen (Abb. 3-9 B, Sternchen und B''). Im WT konnten derartige Anschwellungen der axonalen Trakte bislang nicht beobachtet werden. Da die Zellkerne in diesen Regionen auch Mz97-positiv sind, können entlang der Nerven mit den entsprechenden Verdickungen sogar noch mehr nGFP-

positive PGs detektiert werden (bis zu 60 Mz97-positive PGs entlang des abdominalen Nervs A8). Somit ist eine Identifikation der vermutlich weiterhin vorhandenen Mz97-positiven ePGs allein aufgrund der Anzahl und Positionierung von Mz97-positiven PGs im L3-Larvenstadium unmöglich.



**Abb.3-9: Anordnung der PGs entlang der abdominalen Nerven in L3-Wanderlarven**

Abgebildet sind präparierte L3-Wanderlarven, in denen die Zellkerne der PGs durch eine Repo- (rot) und die abdominalen peripheren Nerven mittels einer Fas2-Antikörperfärbung (blau) visualisiert sind. In (B-B'') sind zudem Mz97-positive PGs anhand des nGFP-Signals (grün) zu erkennen. Bei den Übersichtsbildern (A) und (B) handelt es sich um Fotomontagen aus mehreren aufeinanderfolgenden konfokalen Aufnahmen. In allen Bildern ist anterior links. G = Gehirn und Bm = Bauchmark.

(A) Im WT entspringen dem bilateralsymmetrischen Bm beidseitig acht periphere Nerven, welche zu den Muskelfeldern der abdominalen HS A1-A8 projizieren und entsprechend als abdominale Nerven A1-A8 bezeichnet werden (anhand der rechten Körperhälfte schematisch dargestellt). Entlang der einzelnen Nerven können, korrelierend mit deren Länge, bis zu 70 Repo-positive Zellkerne gezählt werden. (A') Detailansicht von (A). Allein in diesem Teilabschnitt der beiden abdominalen Nerven A7 und A8 können jeweils zehn Repo-positive Zellkerne registriert werden.

(B) In homozygoten Mz97-Larven zeigt eine variable Anzahl der PGs ein nGFP-Signal. Ferner weist die Hälfte der Larven angeschwollene Bereiche entlang der abdominalen Nerven auf (Sternchen). In diesen Regionen liegen auffällig viele Zellkerne vor, wodurch die Gesamtzahl der PGs entlang der entsprechenden Faszikel zusätzlich erhöht wird. In der hier abgebildeten Larve können beispielsweise mehr als 100 PGs entlang des abdominalen Nervs A8 gezählt werden, von denen etwa die Hälfte Mz97-positiv ist. (B') Detailansicht von (B). (B'') Vergrößerter Ausschnitt des in (B) gekennzeichneten Bereiches einer verdickten Region des Nervs A8. In diesem Teilabschnitt sind knapp 50 Mz97-positive PGs lokalisiert.

Allein aufgrund ihrer im Embryo noch spezifischen Expression von *cas-Gal4* können die beiden Abkömmlinge des NB2-5 (ePG6 und ePG8) im späten Larvenstadium ebenfalls nicht länger identifiziert werden. L3-Wanderlarven, in denen mittels *cas-Gal4* die Zellmarker *UAS-Aktin::GFP* bzw. *-gap::GFP* getrieben wurden, zeigten überhaupt keine GFP-positiven PGs (nicht gezeigt). Hingegen konnte in L3-Larven, in welchen *UAS-nlacZ* durch *cas-Gal4* exprimiert wurde, gelegentlich zumindest eine *nlacZ*-positive PG entlang abdominalen Nerven detektiert werden (Tab. 3-4).

Des Weiteren wurden noch die beiden *lacZ*-Linien *mirr-* und *3-66-lacZ* hinsichtlich einer Expression in PGs im L3-Larvenstadium getestet (Tab.3-4). Dabei konnten in keiner der beiden Linien *LacZ*-positive PGs detektiert werden.

**Tab. 3-4: Getestete Markerlinien in L3-Wanderlarven**

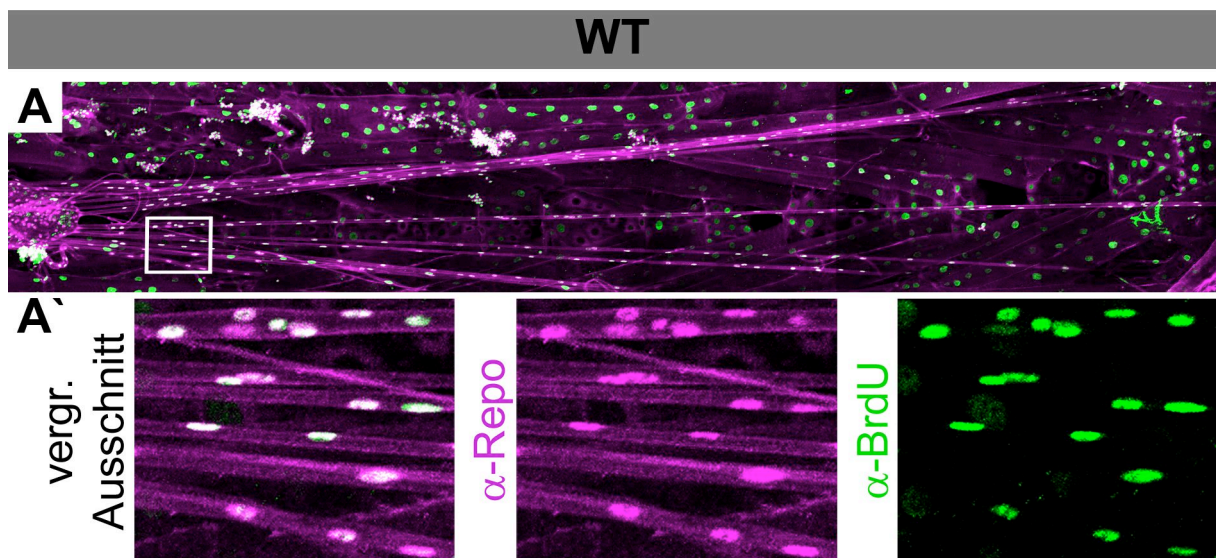
Markerlinie	Markierte ePGs im Embryo	Expressionsmuster in L3-Wanderlarven
Mz97-Gal4 homozygot	ePG1, ePG3, ePG4, ePG5, ePG7, ePG9, ePG10	Variable Anzahl von Mz97-positiven PGs. Entlang des abdominalen Nervs A8 können zwischen 4 und 20 GFP-positive PGs gezählt werden. In gelegentlich auftretenden Verdickungen der peripheren Nerven noch weitaus mehr (>50).
<i>cas-Gal4</i>	ePG6 und ePG8	In <i>cas&gt;nlacZ</i> -Larven kann sporadisch eine <i>cas</i> -positive PG entlang der abdominalen Nerven beobachtet werden.
<i>mirr-lacZ</i>	ePG6, ePG8, ePG10 und ePG11	Keine <i>lacZ</i> -positiven PGs erkennbar.
<i>3-66-lacZ</i>	ePG12	Keine <i>lacZ</i> -positiven PGs erkennbar.

In der Tabelle sind die Markerlinien aufgelistet, deren Expressionsmuster in L3-Wanderlarven analysiert wurden. Keine der getesteten Linien demonstriert im späten Larvenstadium ein mit dem Embryonalstadium vergleichbares Muster an markierten PGs. Für weitere Details siehe Text.

### **3.3.2 Entstehung der zusätzlichen PGs während der Larvalentwicklung**

Da gegen Ende der Larvalentwicklung im Vergleich zum Embryonalstadium deutlich mehr Repo-positive Zellkerne entlang der abdominalen Nerven A1-A8 registriert werden können, stellt sich die Frage woher die zusätzlichen PGs stammen und wann sie generiert werden. Um Antworten darauf zu erhalten, wurden Larven mit Bromdesoxyuridin- (BrdU) haltigem Brei gefüttert, um das Proliferationsverhalten der PGs zu analysieren. Bei BrdU handelt es sich um ein Basenanalogen, welches während der DNA-Replikation (S-Phase des Zellzyklus) anstelle von Thymidin in die DNA inkorporiert wird. In die DNA eingebautes BrdU kann mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Somit ist es möglich, Zellen zu visualisieren, die in Gegenwart von BrdU S-Phasen durchlaufen haben. Zunächst wurde BrdU-haltiges Futtermedium über den gesamten Verlauf der Larvalentwicklung verfüttert und die entsprechend behandelten Tiere im L3-Wanderlarvenstadium fixiert, präpariert und gegen Repo und BrdU gefärbt. In diesen Larven ist klar zu erkennen, dass sämtliche Repo-positiven Zellkerne der PGs BrdU inkorporiert haben (Abb. 3-10). Demzufolge haben alle im L3-Wanderlarvenstadium vorhandenen Repo-positiven Zellkerne der PGs zumindest eine S-Phase durchlaufen. Dieses Ergebnis suggeriert, dass sich die PGs entlang der abdominalen Nerven durch Zellteilungen vervielfältigen, möglicherweise um dadurch die peripheren Nerven trotz der enormen Größenzunahme im Zuge der Larvalentwicklung fortwährend umhüllen zu können. Es kann allerdings allein aufgrund der BrdU-Inkorporation in den PGs nicht zwangsläufig von vollständigen Zellteilungen der PGs ausgegangen werden. Nicht auszuschließen ist, dass sie lediglich Endomitosen durchführen, wie es bereits für die ZNS-Glia beschrieben wurde (Prokop und Technau, 1994). In nachfolgenden Experimenten wurde den Larven systematisch über einen bestimmten Zeitraum BrdU-haltiges Futtermedium dargeboten (für Details siehe Material und Methoden Abschnitt 2.7.11), um zu untersuchen, wann während der Larvalentwicklung die zusätzlichen Repo-positiven Zellkerne entstehen. Durch die zeitlich koordinierte Applikation von BrdU konnte nachgewiesen werden, dass die PGs insbesondere im L2-Larvenstadium (24-48Std. nach Schlüpfen des Embryos) proliferieren. In präparierten, gegen BrdU und Repo gefärbten L3-Larven die während ihres L2-Larvenstadiums auf BrdU-haltigem Nährbrei gehalten wurden, sind mehr als 90% der Repo-positiven Zellkerne auch BrdU-positiv. Hingegen sind in L3-Larven, die im

Verlauf ihres L1-Larvenstadiums (0-24Std. nach Schlüpfen des Embryos) auf BrdU-haltigem Nährmedium aufgezogen wurden nur ca. 25% der Repo-positiven Zellkerne auch BrdU-positiv. Nur etwa 10% der Repo-positiven Zellkerne sind in L3-Larven BrdU-positiv, wenn diese erst während des letzten Larvenstadiums (48-96Std. nach Schlüpfen des Embryos) auf BrdU-haltigem Brei gehalten wurden. Für die Quantifizierung der BrdU-positiven PGs wurden für jeden der drei (zeitlich abgestimmten) Ansätze jeweils die Zellkerne entlang des abdominalen Nervs A8 von zwei Larven ausgezählt.



**Abb. 3-10: Während der Larvalentwicklung sind sämtliche PGs mitotisch aktiv**

Dargestellt ist die Übersicht (A) einer L3-Wanderlarve, welche im Verlauf ihrer gesamten Larvalentwicklung auf BrdU-haltigem Futtermedium gehalten wurde. Anhand der Antikörperfärbung gegen Repo (magenta) und BrdU (grün) ist zu erkennen, dass sämtliche Repo-positiven Zellkerne der PGs BrdU inkorporiert haben. Die Kolokalisation von Repo und BrdU ist deutlicher in dem vergrößerten Ausschnitt (A') des in der Übersicht markierten Bereiches zu sehen. Anterior ist links. Für weitere Details siehe Text.

\*\*\*\*\*

Kompakte Zusammenfassung des dritten Kapitels (3.3):

Im Vergleich zum Embryonalstadium können gegen Ende der Larvalentwicklung deutlich mehr Repo-positive Zellkerne entlang der abdominalen Nerven detektiert werden. Ihre Anzahl variiert zwischen den einzelnen abdominalen peripheren Nerven, wobei die Gesamtzahl offensichtlich mit der Länge des entsprechenden Nervs korreliert. Die Ergebnisse der BrdU-Verfütterung suggerieren, dass sämtliche PGs während der Larvalentwicklung proliferieren, womöglich um dadurch die peripheren Nerven trotz der enormen Größenzunahme im Zuge der Larvalentwicklung, fortwährend umhüllen zu können. Durch zeitlich abgestimmte

BrdU-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Zellkerne der PGs insbesondere im L2-Larvenstadium (24-48Std. nach Schlüpfen des Embryos) S-Phasen durchlaufen.

Die Expressionsanalyse einiger der Markerlinien, mit denen distinkte ePGs im Embryo gekennzeichnet werden können, liefert keine analogen Ergebnisse im späten Larvenstadium. So ist die Anzahl der Mz97-positiven PGs in L3-Larven sehr variabel und *cas-Gal4* markiert lediglich sporadisch eine PG entlang abdominalen Nerven. Die beiden embryonalen Markerlinien *mirr-* und *3-66-lacZ* lassen in der Larve überhaupt keine  $\beta$ Gal-positiven PGs (mehr) erkennen.

\*\*\*\*\*



---

## Teil B:

# Mutantenanalyse zur Identifizierung von Migrationsfaktoren

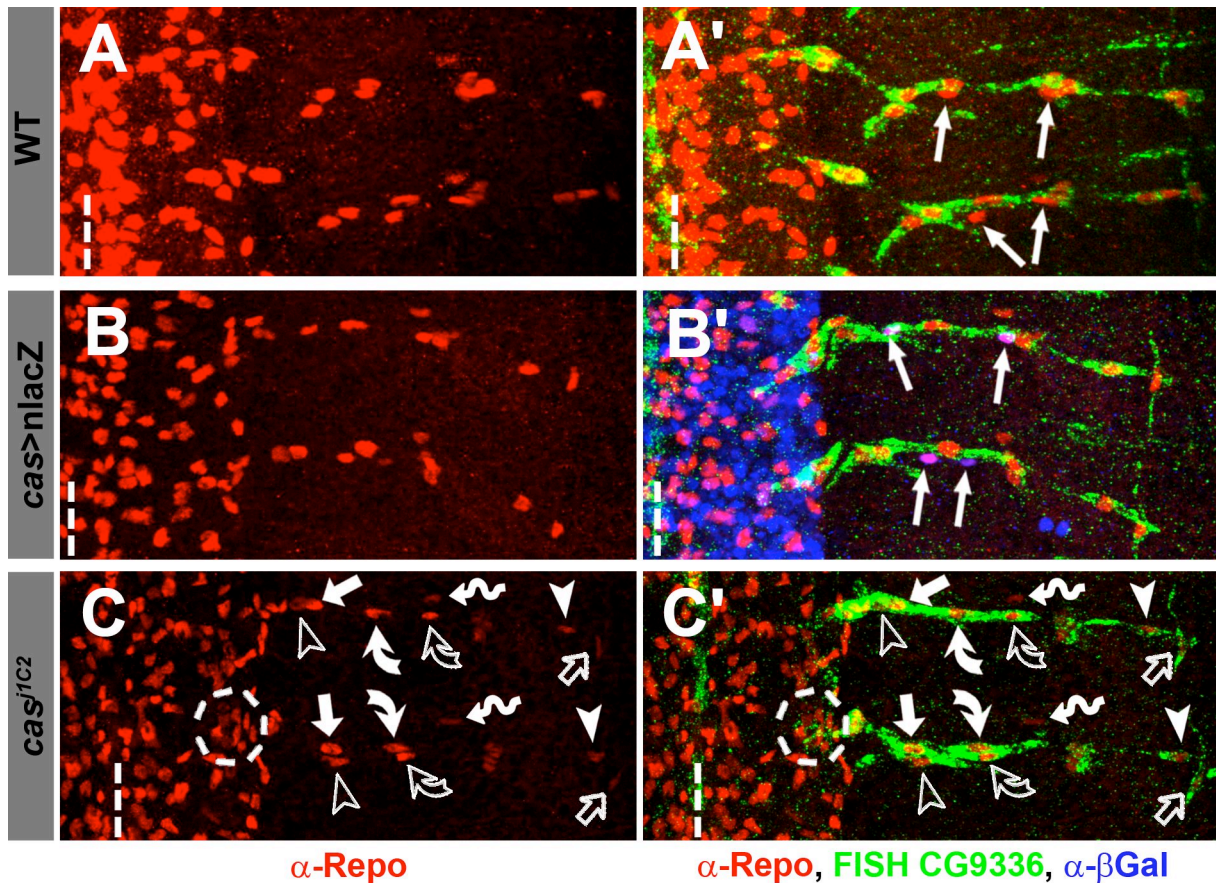
Nachdem ich im ersten Teil meiner Arbeit zeigen konnte, dass die Wanderung der ePGs im Embryo einem stereotypen Muster folgt, soll im zweiten Teil der Frage nachgegangen werden, wie diese Zellen während ihrer Migrationsphase navigieren bzw. welche extrinsischen und intrinsischen Faktoren ihre Wanderung steuern. Mit dem Ziel, entsprechende Faktoren zu identifizieren, wurden verschiedene Mutanten hinsichtlich einer affektierten Positionierung der ePGs am Ende der Embryogenese analysiert. Dabei konnten aufgrund der detaillierten Kenntnisse über den wildtypischen Migrationsprozess und die Anordnung der ePGs sowie der Möglichkeit ePGs anhand der molekularen Marker auch im mutanten Hintergrund zu identifizieren, selbst subtile Phänotypen erfasst werden.

Im Folgenden werden zunächst die Phänotypen zweier Mutanten analysiert, bei denen es sich um Funktionsverlustmutanten von zuvor beschriebenen Markergenen zur Identifizierung individueller ePGs handelt (Kapitel 3.4). Anschließend werde ich die im Zuge meiner Dissertation erzielten Ergebnisse bezüglich der EMS-Mutante 169 vorstellen, mit der ich mich bereits während meiner Diplomarbeit beschäftigte (Kapitel 3.5). Im letzten Kapitel (Kapitel 3.6) wird eine neuartige Funktion der als axonale Wegweiser-moleküle bekannten Netrine präsentiert, die in Interaktion mit den Rezeptoren Frazzled (Fra) und Uncoordinated5 (Unc5) sowohl die Wanderung distinkter ePGs als auch der Longitudinalen Glia (LGs) kontrollieren.

### 3.4 In *castor*- und *salm*-Mutanten weisen ePGs Migrationsdefekte auf

Für die wildtypische Migration von Gruppen bzw. einzelnen ePGs ist es zunächst erforderlich, dass sie korrekt spezifiziert werden, damit sie unter anderem adäquat auf extrinsische Signale (z.B. diverse Wegweiser-moleküle) während ihrer Migrationsphase reagieren können. Potentielle Faktoren zur Spezifizierung der ePGs stellen die im Voraus beschriebenen Markergene dar (Tab. 3-2), die zur Identifikation der einzelnen Zellen herangezogen werden können. Zum einen werden diese

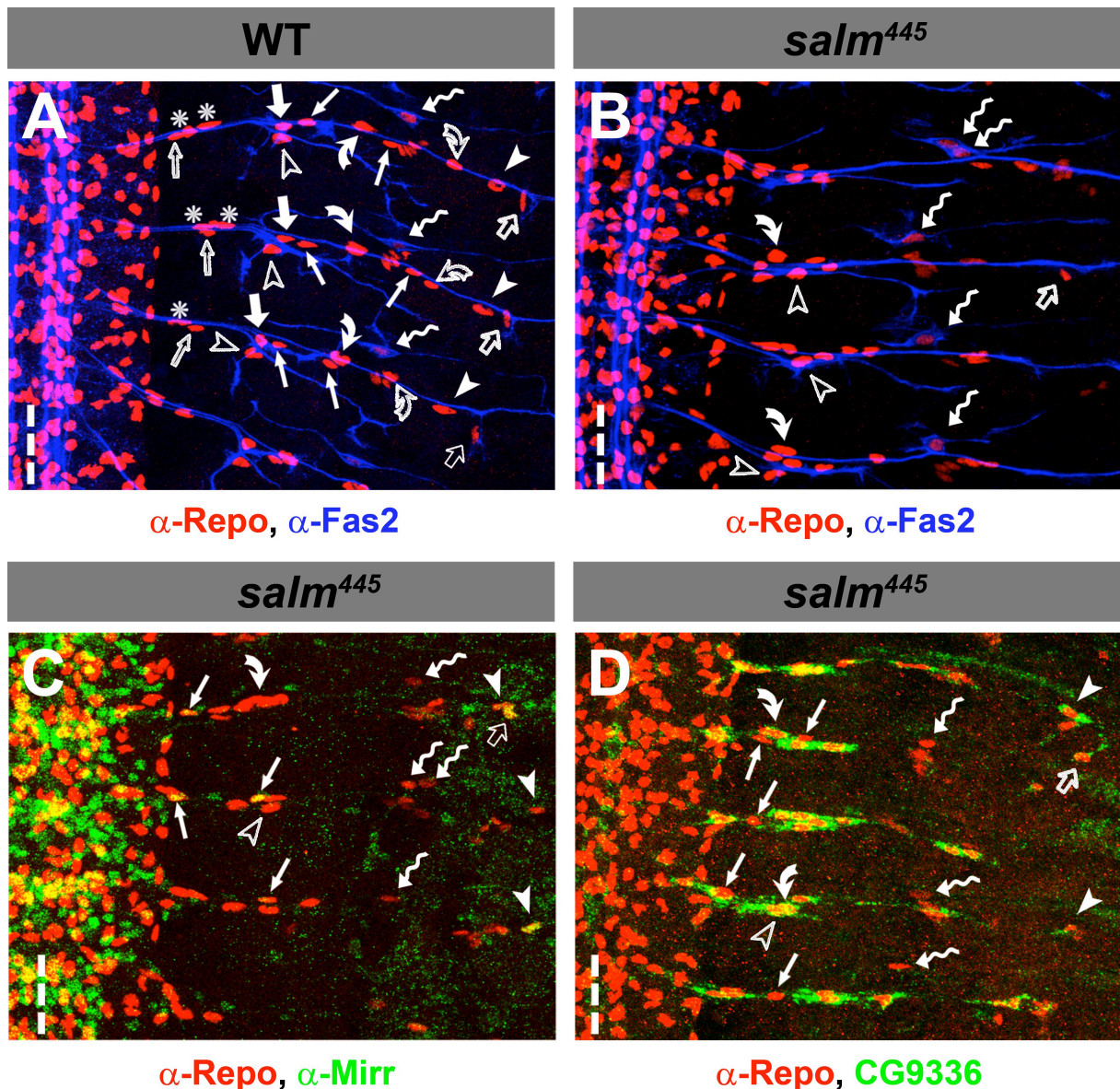
spezifisch in Subgruppen von ePGs exprimiert und zum anderen kodieren sie für Transkriptionsfaktoren mit zum Teil bereits bekannter Funktion bei der Spezifizierung von Zellen. Als ein Beispiel seien hier Hunchback (Hb), Castor (Cas) und das Pou domain protein (Pdm) genannt, die als temporäre Spezifizierungsfaktoren von NBs in der frühen Embryonalentwicklung fungieren (siehe Übersichtsartikel Brody und Odenwald 2002). Während meiner Dissertation konnte ich anhand der Funktionsverlustmutanten *cas<sup>j1C2</sup>* (Mellerick et al., 1992) und *salm<sup>445</sup>* (Jürgens, 1988) für zwei der Markergene nachweisen, dass sie offensichtlich für die korrekte Spezifizierung und somit für die wildtypische Wanderung von ePGs erforderlich sind. *cas<sup>j1C2</sup>*-Mutanten demonstrieren einen zellspezifischen Phänotyp der sich dahingehend äußert, dass in jedem abdominalen HS stets zwei ePGs zu wenig am distalen Abschnitt des ISN vorliegen (n = 76HS, Abb. 3-11). Da *cas*-Gal4 als spezifischer molekularer Marker zur Markierung der beiden vom NB2-5 abstammenden ePG6 und ePG8 verwendet werden kann, ist es denkbar, dass diese beiden Zellen in der Peripherie von *cas<sup>j1C2</sup>*-Mutanten fehlen. Um dies experimentell zu bestätigen, wurden Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) gegen das Gen CG9336 (Altenhein et al., 2006) durchgeführt. Bei CG9336 handelt es sich um einen molekularen Marker, der in allen vom ZNS auswandernden ePGs mit Ausnahme der beiden *cas*-Gal4-positiven ePG6 und ePG8 exprimiert wird (Tab. 3-2 und Abb. 3-11 A-B'). Anhand von Färbungen gegen CG9336 in *cas<sup>j1C2</sup>*-Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass exklusiv beide Abkömmlinge des NB2-5 in der Peripherie fehlen, wohingegen alle anderen CG9336-exprimierenden ePGs an ihrer wildtypischen Position entlang des SN und ISN vorhanden sind (Abb. 3-11 C und C'). Darüber hinaus konnten in *cas<sup>j1C2</sup>*-Mutanten häufig ektopische Gliazellen im Bauchmark ausgemacht werden, die annähernd in dem Bereich liegen, in welchem die ePG6 und ePG8 entstehen (Kreise in Abb. 3-11 C und C'). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass diese beiden ePGs zwar weiterhin generiert werden, aber aufgrund des Verlustes von *cas* nicht mehr in der Lage sind, ihrem wildtypischen Schicksal entsprechend in die Peripherie zu migrieren.



**Abb. 3-11: In  $cas^{j1C2}$ -Mutanten fehlen die ePG6 und ePG8 in der Peripherie**  
 Gezeigt sind jeweils zwei abdominale HS (Filetpräparate) von St.16 Embryonen. Gliazellen sind durch Repo-Antikörperfärbungen (rot) visualisiert und CG9336-positive ePGs können durch CG9336-FISH (grün) detektiert werden. (B') zeigt zusätzlich die  $\beta$ -Gal-Expression (blau) der  $cas$ -Gal4-positiven Zellen. Die Markierung individueller ePGs erfolgt entsprechend der in Abb. 3-3 eingeführten Symbolik. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. Die ML wird durch eine gestrichelte Linie angedeutet.  
 (A, A') Im WT exprimieren alle vom ZNS abstammenden ePGs das Markergen CG9336, abgesehen von zwei Zellen (dünne Pfeile). (B, B') Mittels einer im  $cas>nIacZ$ -Hintergrund durchgeführten FISH gegen CG9336 ist zu erkennen, dass es sich bei den beiden CG9336-negativen ePGs um die  $cas$ -Gal4-exprimierenden (und folglich  $\beta$ -Gal-positiven) ePG6 und ePG8 (dünne Pfeile) handelt. (C, C') In  $cas^{j1C2}$ -Mutanten fehlen die beiden CG9336-negativen ePG6 und ePG8 im PNS. Alle anderen ePGs sind wildtypisch positioniert. Die im Exitbereich lokalisierten ePGs sind nicht durch Symbole markiert, weisen aber ebenfalls keine Auffälligkeiten auf. Nahe der Kante des Bauchmarks können häufig ektopische Gliazellen registriert werden (Kreise). Erläuterungen siehe Text. (Abb. aus von Hilchen et al., 2008)

Im Unterschied zur vorher beschriebenen  $cas^{j1C2}$ -Mutante, in der spezifisch die beiden Abkömmlinge des NB2-5 betroffen sind, weisen  $salm^{445}$ -Mutanten einen pleiotropen und variablen glialen Phänotyp auf. Darüber hinaus sind diverse neuronale Defekte sowohl im ZNS als auch PNS zu beobachten und auch andere Gewebe, wie z.B. die Tracheen, entwickeln sich nicht wildtypisch (Rusten et al., 2001; Cantera et al., 2002). Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den nachfolgend beschriebenen glialen Phänotypen (zumindest teilweise) um sekundäre Effekte handelt.

Grundsätzlich fällt bei Betrachtung der ePGs in *salm*<sup>445</sup>-Mutanten auf, dass die vom ZNS auswandernden ePGs nicht weit genug nach dorsal migrieren und am Ende der Embryogenese überwiegend im oder nahe des Exitbereichs lokalisiert sind (Abb. 3-12 B-D). In etwa der Hälfte der analysierten HS (n = 36) fehlen zudem eine bis drei ePGs in der Peripherie, die vermutlich überhaupt nicht nach dorsal gewandert und weiterhin im Bauchmark lokalisiert sind. Zumindest für die ePG2 trifft dies zu, denn sie kann auch in *salm*<sup>445</sup>-Mutanten mittels einer Antikörperfärbung gegen Lbe identifiziert werden und liegt häufig auch im St.16 noch im ZNS vor (nicht gezeigt). Bereits ohne Markerfärbung ist zu erkennen, dass die ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze) in *salm*<sup>445</sup>-Mutanten nur gelegentlich an ihrer charakteristischen Position am SN lokalisiert ist (Abb. 3-12 B-D). Die ePG7 (gebogener Pfeil) kann in vielen HS anhand ihres großen Zellkerns erkannt werden. In den entsprechenden HS verbleibt sie im Vergleich zum WT stets zu nah am Bauchmark. Die dorsal in der Peripherie entstehenden ePG10 (Pfeilspitze) und ePG11 (unausgefüllter Pfeil) sind nicht in jedem HS vorhanden. Häufig scheint die normalerweise in Richtung des Bauchmarks migrierende ePG10 auch am Ende der Embryogenese noch weit dorsal zu liegen. Der Zellkern der ePG11 ist nicht wie im WT lotrecht zum ISN orientiert. Die ebenfalls von einem SOP in der Peripherie abstammende ePG12 (geschwungener Pfeil) kann in nahezu jedem HS an ihrer wildtypischen Position am TN detektiert werden. In knapp 30% der HS können allerdings zwei mit dem TN assoziierte ePGs beobachtet werden, die beide das für die ePG12 typische Fas2-positive „Körbchen“ aufweisen (Abb. 3-12 B und C). Zur weiteren Analyse des glialen Phänotyps wurden Markerfärbungen gegen Mirror (Mirr) und CG9336 in *salm*<sup>445</sup>-Mutanten durchgeführt. Die Mirr-positiven ePG6 und ePG8 können in den meisten HS zwischen jenen ePGs identifiziert werden, die vom ZNS aus nicht weit genug nach dorsal migrieren (Abb. 3-12 C, dünne Pfeile). Gelegentlich kann nur eine und in seltenen Fällen überhaupt keine Mirr-positive ePG in der Peripherie von *salm*<sup>445</sup>-Mutanten detektiert werden. Anhand der FISH gegen das Markergen CG9336 kann gezeigt werden, dass der ISN als Folge der unvollständigen Migration der vom ZNS auswandernden ePGs nur unvollständig von ePGs bedeckt wird (Abb. 3-12 D). Die beiden Abkömmlinge des NB2-5 können in dieser Färbung dadurch erkannt werden, dass sie CG9336-negativ sind (Abb. 3-12, dünne Pfeile).



**Abb. 3-12: *salm*<sup>445</sup>-Mutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp**

Dargestellt sind abdominale HS von Filetpräparaten des Embryonalstadiums 16 vom WT (A) und *salm*<sup>445</sup>-Mutanten (B-C), in denen die Gliazellen durch Antikörperfärbungen gegen Repo (rot) visualisiert sind. Die individuellen ePGs werden entsprechend der in Abb. 3-3 eingeführten Symbolik markiert. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. Die ML wird durch eine gestrichelte Linie angezeigt.

(A) Im WT sind neben Gliazellen auch die peripheren Nerven anhand einer Antikörperfärbung gegen Fas2 (blau) zu sehen. (B) Homozygote *salm*<sup>445</sup>-Mutanten demonstrieren einen variablen Phänotyp, der sowohl Defekte der peripheren Nerven (gefärbt durch Fas2 (blau)) als auch der ePGs beinhaltet. (C) Mittels Markerfärbungen gegen Mirr (grün) können die ePG6 und ePG8 (dünne Pfeile) in homozygoten *salm*<sup>445</sup>-Mutanten detektiert werden. Wie auch die übrigen vom ZNS abstammenden ePGs, migrieren diese beiden Zellen nicht weit genug nach dorsal aus. (D) Anhand der FISH gegen CG9336 (grün) kann beobachtet werden, dass bedingt durch die unvollständige Auswanderung der ePGs insbesondere der ISN nicht vollständig umhüllt wird. Für weitere Details siehe Text. (Abb aus von Hilchen et al., 2008)

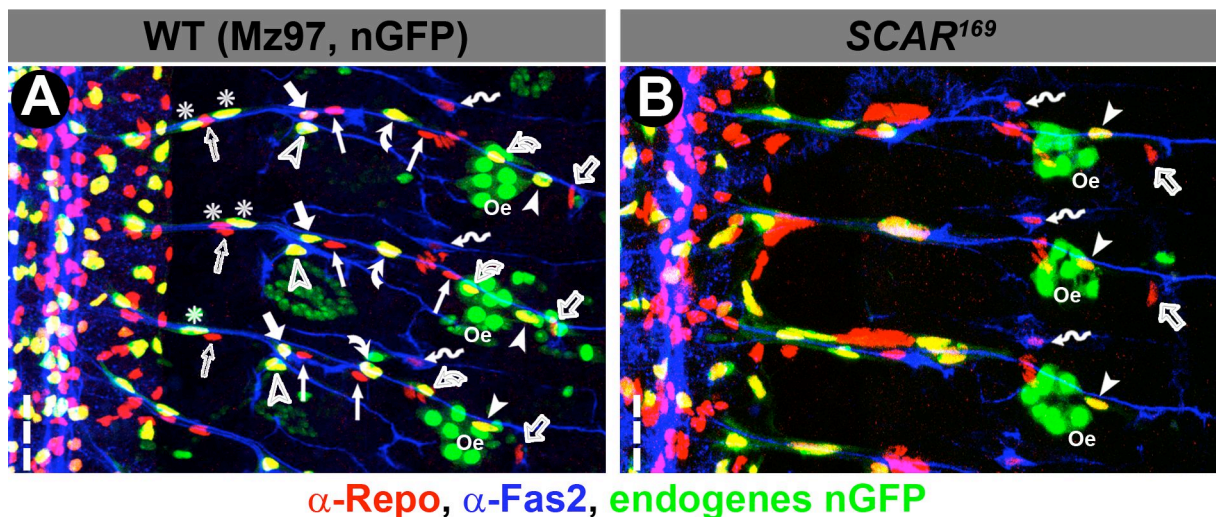
### 3.5 Analyse von EMS-Mutanten

Während meiner Dissertation habe ich die aus dem Mutagenese-Screen (siehe Abschnitt 2.5.2) hervorgehenden EMS-Linien 169, 223 und 1521 weiter bearbeitet, deren phänotypische Charakterisierung ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt habe (Diplomarbeit von Hilchen, 2005). Generell zeichnen sich alle drei Stämme dadurch aus, dass in der Mehrzahl der HS mehr oder weniger dichte Cluster von ePGs vorliegen. Bezüglich der EMS-Linien 223 und 1541 ist die für den glialen Phänotyp verantwortliche Mutation noch unbekannt. Allerdings konnte ich den Mutationsloкус durch fortgesetzte Komplementationskreuzungen (siehe Abschnitt 2.5.2) auf den relativ kurzen Chromosomenabschnitt 42B3-42C1 begrenzen und darüber hinaus nachweisen, dass sich die beiden EMS-Stämme 223 und 1541 nicht-komplementieren. Transheterozygote (EMS223/EMS1541) Embryonen zeigen zudem ebenfalls Cluster von ePGs im PNS (nicht gezeigt). Demnach tragen beide EMS-Stämme eine Mutation im selben Genloкус, die jeweils einen identischen Phänotyp hervorruft (es handelt sich also um zwei verschiedene mutierte Allele eines Gens). Der Verlauf zur Eingrenzung des Mutationsloкус in EMS223 und EMS1541 und ferner die Liste aller weiteren für Komplementationskreuzungen verwendeten Defizienzen-Stämme ist im Anhang dokumentiert (siehe Abschnitt 7.2).

Für die EMS-Linie 169 konnte der vermeintliche Mutationsloкус mittels Komplementationskreuzungen bereits kartiert werden. Da es sich bei dem betroffenen Lokus offensichtlich um das SCAR-Gen handelt, wird der Stamm als SCAR<sup>169</sup> bezeichnet. Als Aktivator des Arp2/3-Komplexes spielt SCAR eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung des Zytoskeletts (Miki et al., 1998; Eden et al., 2002; Hudson und Cooley, 2002; Miller, 2002) und ferner konnte für *Drosophila* bereits gezeigt werden, dass in SCAR-Mutanten Neurone und Gliazellen, die Eikammer, Sinnesborsten und das adulte Komplexauge morphologische Aberrationen aufweisen (Hummel et al., 2000; Zallen et al., 2002; Schenck et al., 2003; Bogdan et al., 2004). Im Fokus der nachfolgend beschriebenen Analyse von SCAR<sup>169</sup> steht insbesondere die Frage nach der Ursache für die auftretenden Zellcluster der ePGs.

### 3.5.1 Die Cluster in der *SCAR*<sup>169</sup>-Mutante bestehen aus überdimensionierten Zellkernen von ePGs

Homozygote *SCAR*<sup>169</sup>-Embryonen zeigen einen glialen Phänotyp, der sich dadurch auszeichnet, dass in der Peripherie eine variable Anzahl von mehr oder weniger großen Zellclustern von ePGs vorliegt (Abb. 3-13 B). Dabei fällt auf, dass insbesondere die vom ZNS abstammenden ePGs betroffen sind, denn im Bereich zwischen Bauchmark und den Oe können nur in wenigen HS Einzelzellen beobachtet werden. Die drei von SOPs in der Peripherie generierten ePGs (ePG10-ePG12) präsentieren hingegen keine vergleichbare Anomalie und liegen prinzipiell an ihren charakteristischen Positionen vor. Lediglich die ePG11 (unausgefüllter Pfeil) fehlt in wenigen Ausnahmefällen (Abb. 3-13, posteriores HS). Aufgrund der Zellansammlungen können die vom ZNS nach dorsal wandernden ePGs nicht auf Einzelzellebene identifiziert werden. Ferner ist keine genaue Angabe über die Zellzahl möglich, aus der sich einzelne Cluster zusammensetzen. Dennoch sind in einigen HS eindeutig zu wenige ePGs in der Peripherie vorhanden (Abb. 3-13 B, mittleres HS). Auch wenn in einigen HS womöglich alle ePGs innerhalb der Zellcluster existieren, wandern sie nicht weit genug nach dorsal aus, so dass am distalen Abschnitt des ISN (nahe der Oe) keine oder zu wenige ePGs vorhanden sind. HS in denen ausschließlich Mz97-positive ePGs in der Peripherie lokalisiert sind belegen ebenfalls, dass die ePGs nicht korrekt nach dorsal migrieren. In den entsprechenden HS fehlen offensichtlich die beiden Mz97-negativen ePG6 und ePG8, die normalerweise entlang des distalen Bereiches des ISN vorliegen (Abb. 3-13 B, mittleres HS und Abb. 3-14 B, anteriores und mittleres HS).



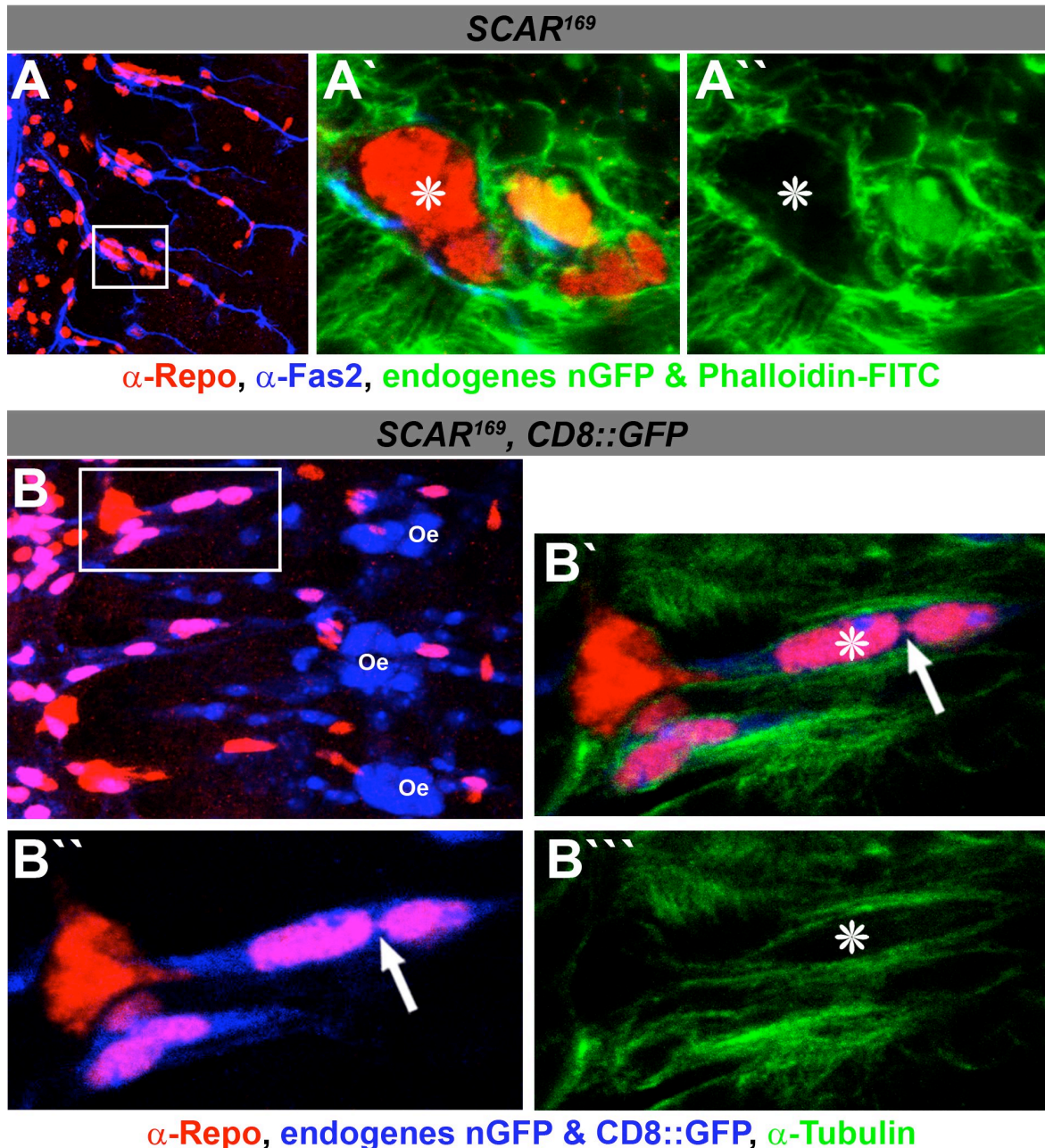
### Abb. 3-13: Phänotyp homozygoter *SCAR<sup>169</sup>*-Embryonen

Zu sehen sind Filetpräparate von WT- (A) und *SCAR<sup>169</sup>*-Embryonen (B) des Embryonalstadiums 16. Es sind jeweils drei abdominale HS abgebildet, in denen die Gliazellen anhand von Repo-Antikörperfärbungen (rot) und die peripheren Nerven durch Fas2-Färbungen (blau) visualisiert sind. Zudem kann die endogene Expression von nGFP (grün) der Mz97-positiven Zellen detektiert werden. Die Markierung individueller ePGs erfolgt entsprechend der in Abb. 3-3 eingeführten Symbolik. In beiden Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. Die ML wird durch eine gestrichelte Linie angezeigt. (A) Als WT-Vergleich ist das Muster der ePGs in Mz97-Embryonen dargestellt, da dieser Stamm als Ausgangslinie für die EMS-Mutagenese fungierte (siehe Abschnitt 2.5.2). (B) In homozygoten *SCAR<sup>169</sup>*-Embryonen sind insbesondere die vom ZNS auswandernden ePGs affiziert und liegen in Form von dichten Zellclustern in der Peripherie vor. Die im PNS entstehenden ePG10 (Pfeilspitze), ePG11 (unausgefüllter Pfeil) und ePG12 (geschwungener Pfeil) sind hingegen meist wildtypisch positioniert. Mz97-positive ePGs können auch in *SCAR<sup>169</sup>*-Mutanten anhand der nGFP-Expression detektiert werden. Oe = Oenocyten. Für weitere Details siehe Text.

Prinzipiell stellt sich die Frage nach der Ursache für die Zellcluster in der Peripherie von *SCAR<sup>169</sup>*-Embryonen. Mittels Antikörperfärbung gegen Repo können nur die Zellkerne der ePGs visualisiert werden. Daher habe ich zunächst überprüft, ob sich größere Repo-positive Cluster aus Zellkernen dicht beieinander liegender ePGs zusammensetzen oder ob ein vergrößerter bzw. mehrere Zellkerne innerhalb einer Zelle vorliegen. Um die Zellkörper der ePGs in *SCAR<sup>169</sup>*-Mutanten darzustellen, wurden Fluoreszenzfärbungen gegen Komponenten des Zytoskeletts durchgeführt: zum einen Phalloidin-Färbungen zur Detektion von F-Aktin (siehe Abschnitt 2.7.10) und zum anderen Antikörperfärbungen gegen Tubulin (Abb. 3-14). Anhand dieser Färbungen wurde ersichtlich, dass die zuvor als Zellcluster von ePGs bezeichneten Strukturen in der Peripherie von *SCAR<sup>169</sup>*-Mutanten meist aus lediglich einem enorm vergrößerten Repo-positiven Zellkern bestehen, der innerhalb einer Zelle lokalisiert ist (Abb. 3-14 A' und A'', Sternchen bzw. B' und B'', Sternchen). In den meisten Fällen liegen diese ausgedehnten Kerne als kompaktes Gebilde vor. Nur gelegentlich scheinen voneinander getrennte Zellkerne in einer Zelle zu existieren, die aber bei genauerer Betrachtung doch in einem kleinen Bereich miteinander verbunden sind



(Abb. 3-14 B' und B'', dünner Pfeil). Diese Zellkernmorphologie korreliert offensichtlich mit einer aktiven Migration der entsprechenden Zelle, denn in 4D-Aufnahmen von *SCAR<sup>169</sup>*-Embryonen kann dergleichen insbesondere bei sich bewegendem ePGs registriert werden (Film 6, dünner Pfeil).



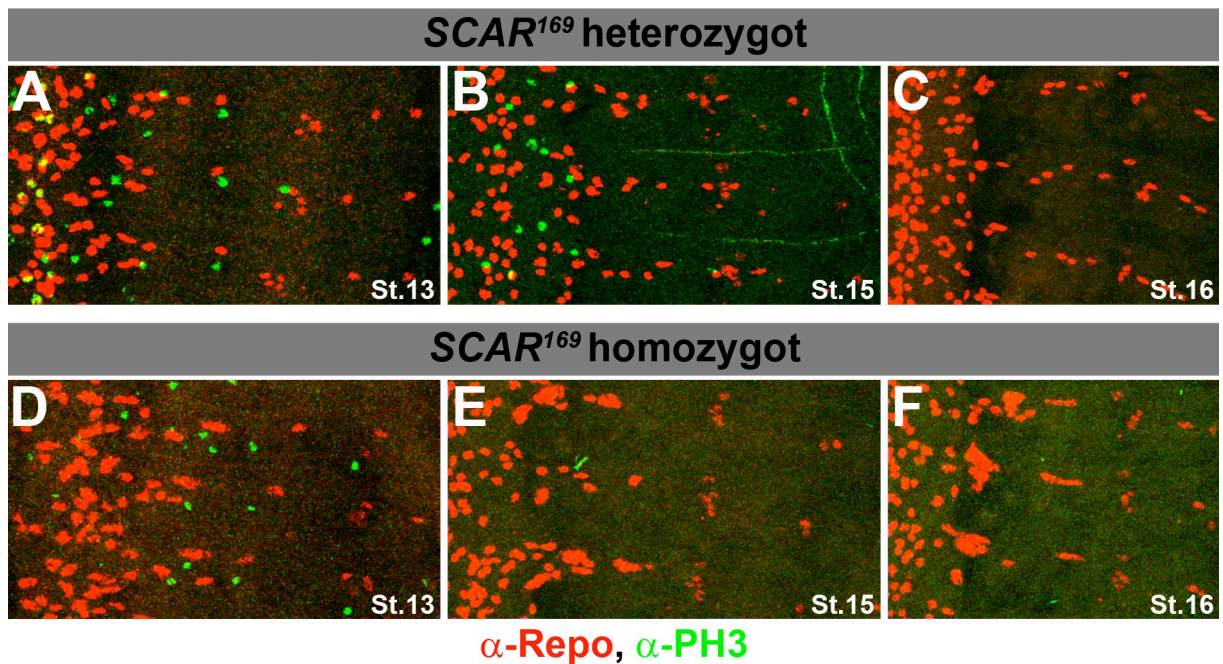
**Abb. 3-14: In *SCAR<sup>169</sup>*-Mutanten weisen ePGs übergroße Zellkerne auf**

Abgebildet sind Filetpräparate von *SCAR<sup>169</sup>*-Mutanten des Embryonalstadiums 16, in denen die Zelldimensionen zum einen mit Phalloidin-Färbungen (A-A'', grün) und zum anderen durch Antikörperfärbungen gegen Tubulin (B-B'', grün) visualisiert sind. Die Zellkerne der ePGs können anhand von Repo-Färbungen (rot) detektiert werden. Zur deutlicheren Illustration der Cluster von ePGs in der Peripherie sind in (A) und (B) zunächst Maximalprojektionen dreier abdominalen HS ohne die entsprechende Phalloidin- bzw. Tubulin-Färbung dargestellt. (A', A'') zeigen eine vergrößerte Darstellung des in (A) und (B) markierten Bereiches. Mz97-positive ePGs können anhand der nGFP-Expression (grün in A'-A'', bzw. blau in B'-B'') erkannt werden. In (A-A') sind zusätzlich die durch Fas2 gefärbten (blau) peripheren Nerven zu sehen. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. Oe = Oenocyten. Erläuterungen siehe Text.

Für die Entstehung der überdimensionierten Zellkerne der ePGs in *SCAR*<sup>169</sup>-Mutanten kommen drei mögliche Ursachen in Frage:

1. Sie sind das Ergebnis von Fusionierungen einzelner ePGs im Verlauf der Embryogenese.
2. Sie entstehen durch Endoreplikation der ePGs.
3. Sie resultieren aus affektierter, möglicherweise unvollständiger Zellteilung der Vorläuferzellen von ePGs.

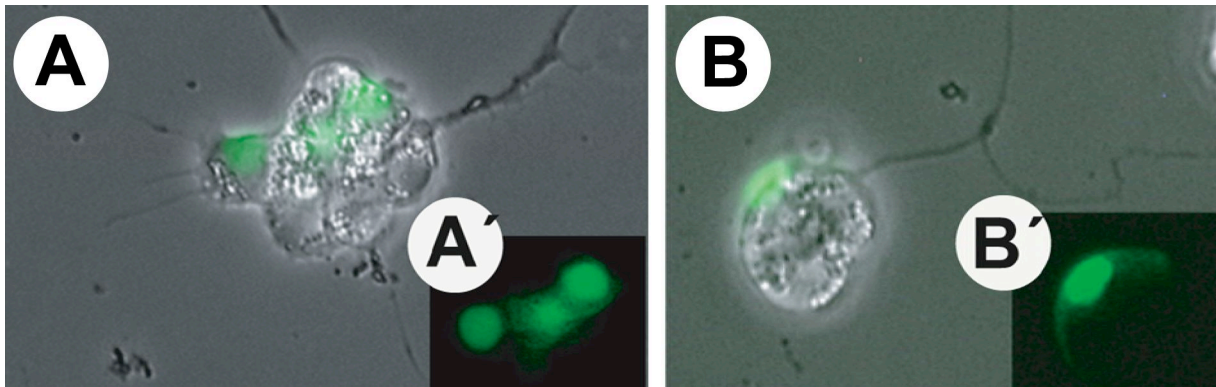
Eine Fusionierung einzelner ePGs während der Embryonalentwicklung ist auszuschließen, da derartiges in keiner der angefertigten *in vivo* Aufnahmen von homozygoten *SCAR*<sup>169</sup>-Embryonen (n = 4) aufgezeichnet werden konnte. Gegen diese Theorie spricht ferner, dass in der Peripherie von *SCAR*<sup>169</sup>-Mutanten zu keiner Zeit ein sich aus Mz97-positiven und –negativen ePGs zusammengesetztes Cluster beobachtet werden konnte (Abb. 3-14, B`-B``). Um die Möglichkeit von Endoreplikationen zu überprüfen, habe ich das Proliferationsverhalten der ePGs in homozygoten *SCAR*<sup>169</sup>-Mutanten analysiert. Dazu wurden Färbungen mit einem Phospho-Histon3- (PH3) Antikörper durchgeführt, der spezifisch mitotisch aktive Zellen markiert, deren Chromosomen sich in der Pro- bis Anaphase befinden (Su et al., 1998). Bei einem Vergleich der Gesamtzahl der PH3-positiven Zellen zwischen heterozygoten (wildtypischen) und homozygoten *SCAR*<sup>169</sup>-Embryonen ist in den St.13-16 kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 3-15). In homozygoten *SCAR*<sup>169</sup>-Mutanten konnte (wie auch im WT) in keiner der ePGs eine PH3-Färbung detektiert werden. Demzufolge kann die Theorie der Endoreplikationen zumindest für die Entwicklungsstadien 13-16 widerlegt werden.



**Abb. 3-15: Die ePGs in SCAR<sup>169</sup>-Mutanten zeigen keine mitotische Aktivität**

Dargestellt sind Filetpräparate der St.13, 15 und 16 von heterozygoten (A-C) bzw. homozygoten (D-F) SCAR<sup>169</sup>-Embryonen. Gliazellen sind durch Repo-Antikörperfärbungen (rot) visualisiert und mitotisch aktive Zellen können anhand einer PH3-Färbung (grün) detektiert werden. Bei dem Vergleich der (wildtypischen) heterozygoten mit mutanten homozygoten SCAR<sup>169</sup>-Embryonen konnte keine signifikante Zunahme der mitotischen Aktivität registriert werden. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal rechts. Erläuterungen siehe Text.

Aufgrund der bereits beschriebenen Resultate erscheint es am wahrscheinlichsten, dass frühe Teilungsdefekte (eventuell unvollständige Teilungen) die überdimensionierten Zellkerne in SCAR<sup>169</sup>-Embryonen verursachen. Unterstützt wird diese Theorie durch Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten, die bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit von K. Lür durchgeführt wurden. Anhand isolierter neuraler Zellklone von SCAR<sup>169</sup>- und Mz97-Embryonen konnte damals gezeigt werden, dass SCAR<sup>169</sup>-Zellklone kompakter als wildtypische Mz97-Zellklone vorliegen und Gliazellen in SCAR<sup>169</sup>-Mutanten nicht wie üblich von ihrem Zellklon wegwandern können, sondern stets direkt an diesem verbleiben (Abb. 3-16). Diese und insbesondere die weitere Beobachtung, dass innerhalb der kompakten Zellklone von SCAR<sup>169</sup> keine deutlichen Zellgrenzen erkannt werden können (Abb. 3-16), weisen auf früh während der Embryonalentwicklung eintretende Teilungsdefekte hin.



**Abb. 3-16: Vergleich neuraler Zellklone von Mz97 und SCAR<sup>169</sup>**

(A) neuraler Zellklon von Mz97. (B) Neuraler Zellklon von SCAR<sup>169</sup>. (A') bzw. (B') Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des in (A) bzw. (B') dargestellten Zellklons. Erläuterungen siehe Text. (Mit freundlicher Unterstützung von K. Lüer. Abb. übernommen aus Diplomarbeit von Hilchen, 2005)

Des Weiteren habe ich auf Genebene überprüft, ob der Stamm SCAR<sup>169</sup> tatsächlich eine Mutation im SCAR Locus aufweist. Dazu habe ich die kodierende Region des SCAR Gens im Stamm Mz97 sequenziert, der als Ausgangsstamm der EMS-Mutagenese fungierte, und mit der entsprechenden Sequenz im Stamm SCAR<sup>169</sup> verglichen. Dabei konnte allerdings kein Unterschied ermittelt werden. Folglich ist die Mutation in SCAR<sup>169</sup> nicht in der kodierenden Region des SCAR Gens lokalisiert und womöglich in der regulatorischen Region dieses Gens zu suchen. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare sowie ihre Bindungsstellen im Genom sind im Anhang vermerkt (siehe Abschnitt 7.3).

### 3.6 Die Migration distinkter Gliazellen im *Drosophila* Embryo wird durch Netrine in Interaktion mit den Rezeptoren Uncoordinated5 und Frazzled geleitet

Einige der grundlegenden Vorgänge während der aktiven Migrationsphase von ePGs sind augenscheinlich identisch mit der axonalen Wanderung von Neuronen. So generieren beispielsweise wandernde ePGs analog zu dem an der Spitze eines auswachsenden Axons befindlichen Wachstumskegels Membranausläufer, die ihre Umgebung nach wegweisenden Signalmolekülen auskundschaften. Bislang konnten allerdings keine spezifischen Wegweiser-moleküle identifiziert werden, die die Wanderung der ePGs kontrollieren (siehe Übersichtsartikel Silles et al., 2007). Demgegenüber sind zahlreiche neuronale Wegweiser-moleküle bekannt und auch ihre Wirkungsweisen bei der Navigation von Axonen wurden bereits mehrheitlich aufgeklärt (zusammengefasst in Dickson, 2002; Grunwald und Klein, 2002; Huber et al., 2003; Chilton, 2006). Um zu überprüfen, ob einige dieser beschriebenen neuronalen Signalmoleküle womöglich auch die Wanderung von ePGs steuern, habe ich diverse Mutanten, denen entsprechende Faktoren fehlen, hinsichtlich eines Phänotyps der ePGs analysiert (Tab. 3-5). Im Zuge dieses „Miniscreens“ konnten bei mehreren Mutanten Defekte in der Anordnung der ePGs am Ende der Embryogenese detektiert werden. Letztendlich habe ich mich im Rahmen meiner Dissertation aufgrund des auffälligen Phänotyps der *NetrinAB<sup>Δ</sup>*-Mutante darauf konzentriert, die Rolle der Netrine bei der Wanderung von Gliazellen aufzuklären.

**Tab. 3-5: Hinsichtlich eines ePG-Phänotyps analysierte Mutanten**

<b>Mutante (Allel)</b>	<b>Proteinklasse</b>	<b>Phänotyp der ePGs</b>
Commissureless ( <i>comm<sup>5</sup></i> )	Membran-Protein	Variabler Phänotyp. In den meisten Embryonen wandern die ePGs nicht weit genug nach dorsal aus. Zudem können einzelne ePGs in der Peripherie fehlen. In seltenen Fällen liegen zu viele ePGs im PNS vor.
Down syndrome cell adhesion molecule ( <i>Dscam<sup>6055</sup></i> )	Transmembran-Protein (Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie)	Deutlicher Phänotyp mit stets zu wenigen ePGs in der Peripherie. Allerdings zeigen auch die peripheren Nerven dramatische Defekte.
Drop/Muscle segment homeobox	Transkriptionsfaktor	In der Peripherie sind stets zu wenig ePGs vorhanden. Häufig

<i>(msh<sup>Δ68</sup>)</i>		fehlen die ePG6 und ePG8, aber auch andere ePGs.
Enabled ( <i>ena<sup>23</sup></i> )	Zytoskelettales Adapter-Protein	Variabler Phänotyp. Häufig wandern die ePGs nicht weit genug aus und es können HS beobachtet werden, in denen zu wenige oder zu viele ePGs in der Peripherie vorliegen.
Fasciclin 2 ( <i>Fas2<sup>eb112</sup></i> )	Transmembran-Protein (Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie)	Kein signifikanter Phänotyp; gelegentlich ist lediglich ein leichtes zurückhängen einzelner ePGs zu beobachten.
Hem-Protein ( <i>Hem<sup>J4-48</sup></i> )	Transmembran-Protein	Geringfügig affektierte Positionierung der ePGs. Gelegentlich sind mit dem TN zwei ePGs assoziiert.
Netrin ( <i>NetAB<sup>Δ</sup></i> )	Segregierter Ligand	Weniger ePGs in der Peripherie. Zudem liegen ektopisch positionierte Zellcluster von LGs im PNS vor (siehe Abb. 3.17).
Roundabout ( <i>robo<sup>1</sup></i> )	Rezeptor	Kein signifikanter Phänotyp erkennbar.
Roundabout ( <i>robo<sup>2</sup></i> )	Rezeptor	Kein signifikanter Phänotyp; gelegentlich kann ein leichtes Zurückhängen einzelner ePGs beobachtet werden.
Roundabout ( <i>robo<sup>2, 3</sup></i> )	Rezeptor	Die ePGs wandern nicht weit genug nach dorsal aus und häufig fehlen ePGs in der Peripherie.
Semaphorin-1a ( <i>Sema-1a<sup>k13702</sup></i> )	Transmembran-Protein	Kein signifikanter Phänotyp erkennbar.
Semaphorin-2a ( <i>Sema-2a<sup>03021</sup></i> )	Segregierter Ligand	Subtiler Phänotyp. Gelegentlich scheint eine ePG zu fehlen oder zuviel in der Peripherie vorzuliegen.
Single-minded ( <i>sim<sup>2</sup></i> )	Transkriptionsfaktor	Deutlicher axonaler und glialer Phänotyp (siehe Abb. 3-24). Meist liegen zu wenige ePGs im PNS vor. Die von dorsalen SOPs generierten ePG10-ePG12 zeigen keinen signifikanten Phänotyp.
Slit ( <i>slit<sup>2</sup></i> )	Segregierter Ligand	Deutlicher Phänotyp. Die ePGs sind in keinem HS wildtypisch angeordnet und wandern nicht weit genug nach dorsal aus. Häufig ist auch die Anzahl der ePGs im PNS affektiert.

In der Tabelle sind Mutanten aufgelistet, die hinsichtlich eines ePG-Phänotyps analysiert wurden. Von wenigen Ausnahmen abgesehen betreffen die Mutationen Faktoren für die bereits gezeigt wurde, dass sie eine Rolle bei der axonalen Wegfindung spielen.

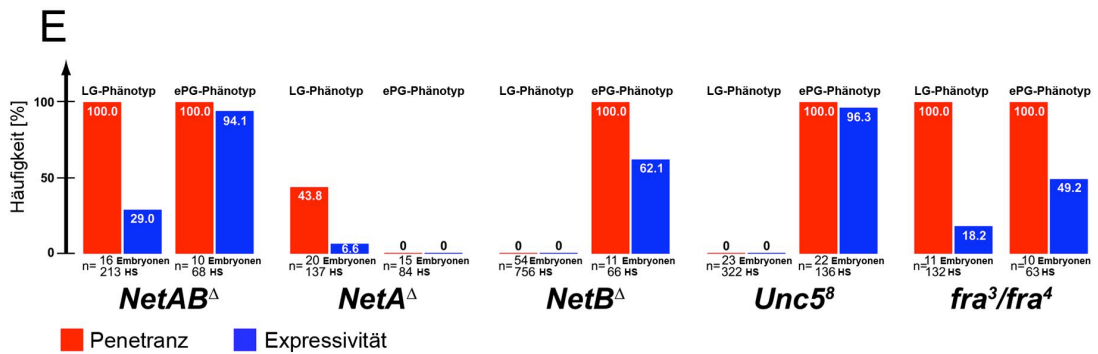
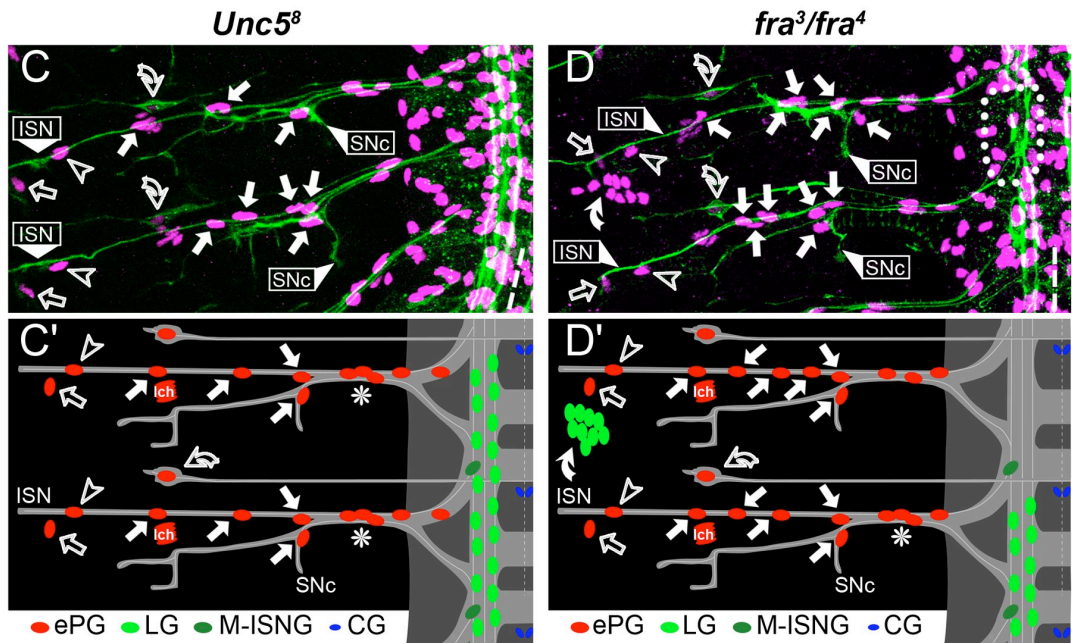
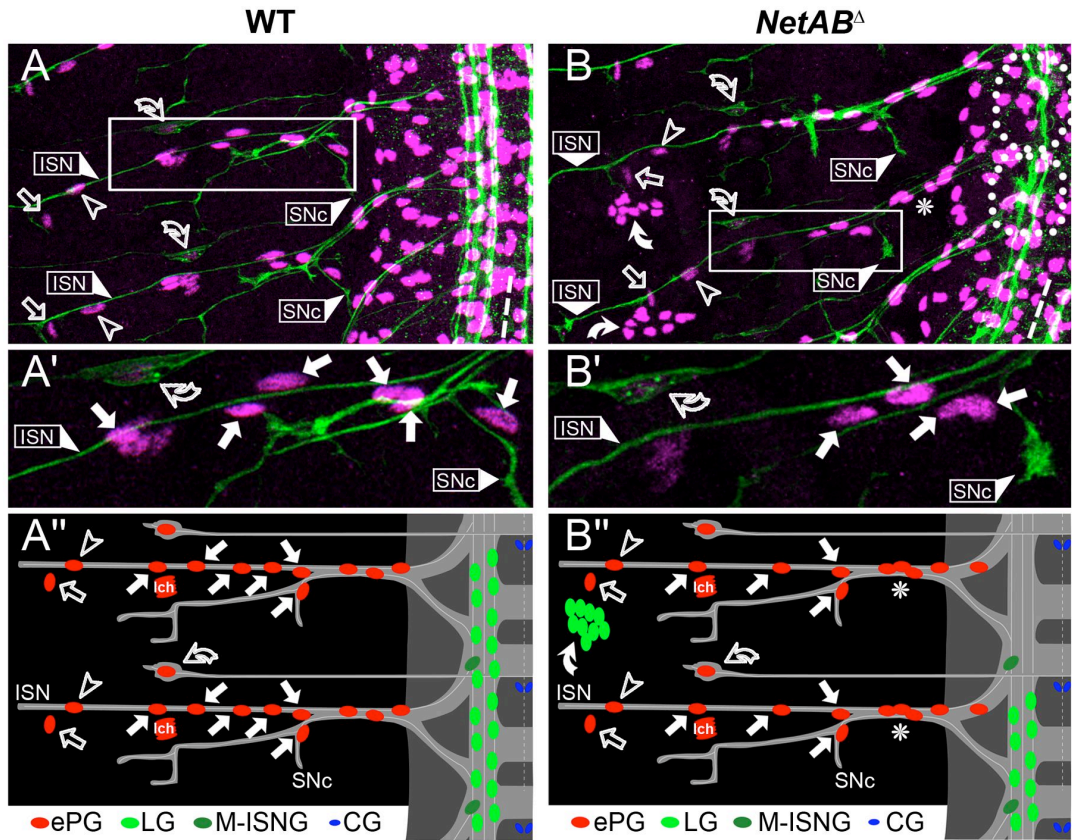
### 3.6.1 Netrine leiten die Migration von Gliazellen via Frazzled oder Uncoordinated5

Um zu überprüfen, ob Netrine die wildtypische Migration der ePGs beeinflussen, habe ich zunächst ihre Anordnung in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Doppelmutanten analysiert, in welcher die beiden für *Drosophila* bekannten Netrine (NetA und NetB) fehlen (Brankatschk und Dickson, 2006). Bei der Untersuchung homozygoter *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten stellte sich heraus, dass gegen Ende der Embryogenese in 94% der abdominalen HS vom ZNS auswandernde ePGs distal des SNc fehlen (nachfolgend wird dieser Phänotyp vereinfacht als „ePG-Phänotyp“ bezeichnet). In wildtypischen Embryonen des Embryonalstadiums 16 können normalerweise sechs vom ZNS abstammende ePGs (ePG4-ePG9) distal des SNc detektiert werden, wohingegen ihre Anzahl in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten durchschnittlich um zwei Zellen reduziert ist (Median: WT = 6 (ePG4-ePG9), n = 100HS, Abb. 3-17 A und A', ausgefüllte Pfeile / Median: *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutante = 4, n = 68HS, Abb. 3-17 B und B', ausgefüllte Pfeile). Der SNc selbst weist keinen signifikanten Defekt in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten auf (siehe auch Keleman und Dickson, 2001). Die Beobachtung, dass in betroffenen HS von *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten gelegentlich mehr als drei ePGs im Exitbereich (proximal des SNc) lokalisiert sind (Abb. 3-17 B, Sternchen) suggeriert, dass distal des SNc fehlende ePGs nicht weit genug nach dorsal migriert sind. Eine prinzipiell verzögerte Auswanderung der vom ZNS abstammenden ePGs in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten kann ausgeschlossen werden, da sie bis zum St.14 noch wildtypisch positioniert sind (nicht gezeigt). Im Unterschied zu den vom ZNS auswandernden ePGs präsentieren die drei von dorsalen SOPs generierten ePGs (ePG10-ePG12) keinen Phänotyp und sind stets wildtypisch positioniert (Abb. 3-17). Im Folgenden werden diese drei Gliazellen durchgängig mit unausgefüllten Symbolen (ePG10 = unausgefüllte Pfeilspitze, ePG11 = unausgefüllter Pfeil, ePG12 = unausgefüllter gebogener Pfeil) markiert, um sie deutlich von den aus dem ZNS abstammenden ePGs abzusetzen.

Da bereits für mehrere Entwicklungsprozesse von *Drosophila* eine redundante Wirkungsweise der beiden Netrine (NetA und NetB) gezeigt werden konnte (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Kolesnikov und Beckendorf, 2005), habe ich als nächstes *NetA*<sup>Δ</sup>- und *NetB*<sup>Δ</sup>-Einzelmutanten hinsichtlich eines ePG-Phänotyps analysiert. Eine analog zu *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten beeinträchtigte Auswanderung der vom ZNS abstammenden ePGs konnte dabei lediglich in *NetB*<sup>Δ</sup>-Mutanten registriert

werden, wohingegen die Anordnung der ePGs in *NetA*<sup>Δ</sup>-Mutanten stets wildtypisch erschien (Abb. 3-17 E). Diese Ergebnisse implizieren eine exklusive Funktion von NetB als wegweisender Faktor für die vom ZNS nach dorsal wandernden ePGs. Dennoch wirkt sich der Verlust beider Netrine synergistisch auf die Migration der Gliazellen aus, denn eine affektierte Auswanderung der ePGs tritt in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Doppelmutanten im Vergleich zu *NetB*<sup>Δ</sup>-Einzelmutanten häufiger auf (Abb. 3-17 E). *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten weisen zusätzlich zu dem vorausgehend beschriebenen Migrationsdefekt der vom ZNS auswandernden ePGs einen weiteren glialen Phänotyp auf. Bereits ab dem frühen St.11 sind in ca. 29% der HS ektopische Repopositive Zellansammlungen in der Peripherie nahe der ePG11 zu erkennen (Abb. 3-17 B, ausgefüllte gebogene Pfeile). Die Anzahl dieser Gliazell-Cluster pro Embryo kann zwischen einem und zehn variieren, wobei ihre Existenz stets mit einer reduzierten Anzahl von Longitudinalen Glia (LG) im ZNS des entsprechenden HS einhergeht (Abb. 3-17 B, gepunktete Kreise). Demzufolge handelt es sich bei den ektopisch positionierten Gliazellen im PNS von *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten augenscheinlich um fehlgeleitete LGs, die normalerweise im ZNS dorsal der longitudinal verlaufenden Konnektive lokalisiert sein müssten (nachfolgend wird dieser Phänotyp vereinfacht als „LG-Phänotyp“ bezeichnet). In Bereichen des Bauchmarks in denen LGs fehlen, können zum Teil schwere Faszikulationsdefekte der longitudinalen Trakte registriert werden. Derartige axonale Defekte wurden bereits zuvor für *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten beschrieben (Harris et al., 1996; Kolodziej et al., 1996; Mitchell et al., 1996), allerdings ohne den Befund, dass in entsprechenden Bereichen die üblicherweise die Konnektive umhüllenden LGs fehlen. Die Analyse der *Netrin*-Einzelmutanten zeigte, dass in *NetA*<sup>Δ</sup>-Mutanten in knapp der Hälfte aller Embryonen (Penetranz = 43,8%) identische ektopische LGs in der Peripherie vorliegen, allerdings meist nur in einem bzw. maximal in drei HS pro Embryo (Expressivität = 7% im Gegensatz zu 29% in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten, Abb. 3-17 E). Zudem sind die ektopischen Cluster in *NetA*<sup>Δ</sup>-Mutanten fast ausschließlich in den posterioren Segmenten A5-A8 lokalisiert, was in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten nicht beobachtet werden konnte. In *NetB*<sup>Δ</sup>-Einzelmutanten konnten hingegen in keinem der analysierten Embryonen mispositionierte LGs registriert werden (Abb. 3-17 E).





**Abb. 3-17 (vorherige Seite): *NetAB*<sup>Δ</sup>-, *Unc5*<sup>8</sup>- und *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten zeigen unterschiedliche gliale Phänotypen**

In (A-D') sind abdominale HS von wildtypischen Embryonen (A-A''), *NetAB*<sup>Δ</sup>- (B-B''), *Unc5*<sup>8</sup>- (C-C'') und *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten (D-D'') im St.16 dargestellt, gefärbt gegen Repo (magenta) und Fas2 (grün). Anterior ist oben und die ML wird durch gestrichelte Linien angedeutet. Die drei von dorsalen SOPs abstammenden ePGs sind durch unausgefüllte Symbole markiert (ePG10 = unausgefüllte Pfeilspitze, ePG11 = unausgefüllter Pfeil und ePG12 unausgefüllter gebogener Pfeil).

(A) Übersicht zweier wildtypischer HS in denen sich jeweils 12 ePGs entlang der peripheren Nerven und knapp 30 Gliazellen im ZNS anordnen. (A') Detailansicht von (A). Normalerweise liegen in jedem HS sechs der vom ZNS auswandernde ePGs (ausgefüllte Pfeile) distal des SNC am ISN und SN vor. (A'') Schematische Darstellung der charakteristischen Positionierung ausgewählter Subgruppen von Gliazellen im WT. (B) In *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten wandern einige der vom ZNS abstammenden ePGs nicht in die Peripherie aus. Dadurch reduziert sich die Anzahl der distal des SNC vorliegenden ePGs im Vergleich zum WT. Im Exitbereich (proximal des SNC) können gelegentlich mehr als drei ePGs registriert werden (Sternchen). In manchen HS können ektopische Cluster von Gliazellen (ausgefüllte gebogene Pfeile) in der Nähe der ePG11 (unausgefüllter Pfeil) beobachtet werden. In entsprechenden HS fehlen die LGs dorsal der longitudinalen Trakte im ZNS (gepunktete Kreise). (B') Detailansicht von (B). In diesem HS sind anstelle von sechs nur vier vom ZNS abstammende ePGs (ausgefüllte Pfeile) distal des SNC vorhanden. (B'') Schematische Darstellung der glialen Phänotypen in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten. (C) In *Unc5*<sup>8</sup>-Mutanten ist die Anzahl der vom ZNS auswandernden ePGs distal des SNC auf durchschnittlich vier Zellen pro HS reduziert (ausgefüllte Pfeile). (C'') Schematische Illustration des ePG-Phänotyps in *Unc5*<sup>8</sup>-Mutanten. (D) *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten demonstrieren ektopische Cluster von Gliazellen im PNS (ausgefüllter gebogener Pfeil) und in den entsprechenden HS fehlen die LGs im Bauchmark (gepunkteter Kreis). In knapp 50% der HS fehlt eine ePG distal des SNC und liegt häufig im Exitbereich vor (nicht gezeigt). (D'') Schematische Darstellung der glialen Phänotypen in *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten. Neben ektopischen Clustern (ausgefüllter gebogener Pfeil) ist hier auch die gelegentlich auftretende unvollständige dorsale Wanderung einer der vom ZNS abstammenden ePGs verzeichnet (Sternchen) (E) Statistische Auswertung des LG- und ePG-Phänotyps in *NetAB*<sup>Δ</sup>-, *NetA*<sup>Δ</sup>-, *NetB*<sup>Δ</sup>-, *Unc5*<sup>8</sup>- und *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten (Penetranz: % betroffener Embryonen; Expressivität: % betroffener HS). Für die Berechnung der Penetranz wurde jeder Embryo als betroffen gewertet, der in mindestens einem HS den LG- bzw. den ePG-Phänotyp zeigte. Für die Berechnung der Expressivität wurden lediglich betroffene Embryonen ausgezählt. CG = Kanal Glia, ePG = embryonale Periphere Glia, ISN = Intersegmentalnerv, Ich = laterales Chordotonalorgan, LG = Longitudinale Glia, M-ISNG = Mediale Intersegmentale Nervenwurzel Glia, SN(c) = Segmentalnerv (c).

Da es sich bei Netrinen um segregierte Faktoren handelt deren Wirkungsweise von der Interaktion mit distinkten Rezeptoren abhängt, habe ich als nächstes Mutanten der beiden bislang identifizierten Netrin-Rezeptoren *Ucoordinated5* (*Unc5*) und *Frazzled* (*Fra*) hinsichtlich glialer Phänotypen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass in *Unc5*<sup>8</sup>-Mutanten in etwa 96% der abdominalen HS derselbe ePG-Phänotyp auftritt, welcher zuvor für *NetAB*<sup>Δ</sup>- bzw. *NetB*<sup>Δ</sup>-Mutanten beschrieben wurde (Abb. 3-17 C, ausgefüllte Pfeile und E). Mispositionierte LGs konnten hingegen in keinem der *Unc5*<sup>8</sup>-mutanten-Embryonen registriert werden. Demgegenüber zeigen *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten in ca. 18% der HS ektopische Cluster von LGs (Abb. 3-17 D, ausgefüllter gebogener Pfeil und 3-17 E). Zudem kann häufig eine beeinträchtigte Migration der vom ZNS auswandernden ePGs beobachtet werden (Abb. 3-17 D' und E). Der Phänotyp der ePGs in *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten unterscheidet sich aber deutlich von jenem in *Unc5*<sup>8</sup>- und *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten, da zum einen weniger HS betroffen sind (Expressivität liegt nur bei 49%, im Gegensatz zu 96% in *Unc5*<sup>8</sup>- und 94% in *NetAB*<sup>Δ</sup>-

Mutanten) und zum anderen der ePG-Phänotyp in *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten schwächer ausfällt. In 80% der betroffenen HS liegt lediglich eine ePG zu wenig distal des SNc vor, wohingegen in *Unc5<sup>8</sup>*- und *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten im Allgemeinen zwei ePGs distal des SNc fehlen.

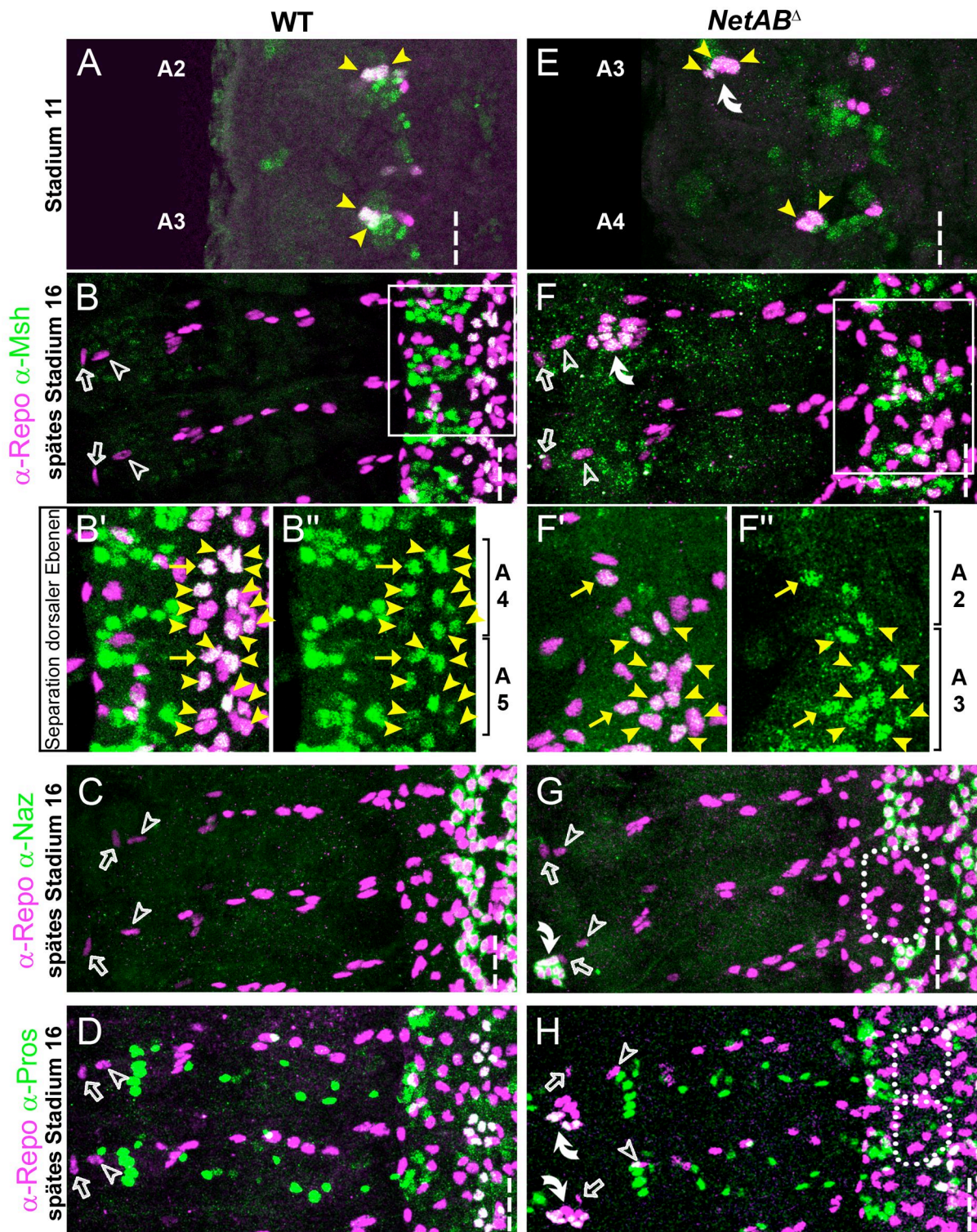
### 3.6.2 Der Cluster-Phänotyp betrifft spezifisch die LGs

Um experimentell zu bestätigen, dass es sich bei den ektopisch positionierten Zellclustern in der Peripherie von *NetAB<sup>Δ</sup>*-, *NetA<sup>Δ</sup>*-, und *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten tatsächlich um LGs handelt, habe ich verschiedene Markerfärbungen durchgeführt. Sämtliche neun LGs eines HS stammen von einer einzigen Vorläuferzelle, dem so genannten Longitudinalen Glioblasten (LGB), ab und können durch Antikörperfärbungen gegen das „Muscle segment homeobox“ (Msh) Protein (Abb. 3-18 A-B``, E-F``) und den „Fibroblast growth factor“ (FGF)-Rezeptor Heartless (Htl) bereits kurz nach ihrer Entstehung markiert werden (Shishido et al., 1997; Hidalgo et al., 2001; Beckervordersandforth et al., 2008). Auf die separate Darstellung der Htl-Färbung wurde verzichtet, da sich die Msh- und Htl-Färbungen im Hinblick auf die LGs lediglich darin unterscheiden, dass unter Verwendung des Msh-Antikörpers eine deutlichere Färbung der LGs erzielt werden konnte. Im WT sind am Ende der Embryogenese (spätes St.16) für gewöhnlich zehn Msh-positive Gliazellen (Median = 10, n = 100HS) in jedem HS dorsal der Konnektive zu erkennen. Bei diesen Zellen handelt es sich um die neun vom LGB generierten LGs (Abb. 3-18 B``-B``, gelbe Pfeilspitzen) und die Mediale Intersegmentale Nervenwurzel Glia (M-ISNG) (Abb. 3-18 B``-B``, gelbe Pfeile). Die M-ISNG wird nicht zu den LGs gezählt, da sie nicht vom LGB sondern vom NB1-3 abstammt (Beckervordersandforth et al., 2008). Markerfärbungen gegen Msh (Abb. 3-18 E-F``) und Htl (nicht gezeigt) in *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten belegen eindeutig, dass es sich bei den ektopisch in der Peripherie liegenden Gliazellen um LGs handelt, welche in den entsprechenden HS im ZNS fehlen (Abb. 3-18 F-F``). Darüber hinaus bestätigt werden konnte dies mittels eines in unserem Labor von Dr. B. Altenhein generierten Antikörpers namens anti-Nazgul ( $\alpha$ -Naz) (unpublizierte Daten).  $\alpha$ -Naz detektiert ein zytoplasmatisches Protein, das exklusiv in den Zellkörper Glia („Cell body glia“, CBG) und in allen LGs exprimiert wird (Abb. 3-18 C). In *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten durchgeführte Antikörperfärbungen gegen Naz verdeutlichen anschaulich, dass es sich bei den ektopisch positionierten

Gliazellen um LGs handelt, die in dem entsprechenden HS im Bauchmark fehlen (Abb. 3-18 G). Demnach stellt sich die Frage, wie es zu der Mispositionierung der LGs kommt. Bereits in einer Publikation aus dem Jahre 1989 von Jacobs und Kollegen wird beschrieben, dass sich der an der lateralen Kante des Neuroektoderms im späten St.10 entstehende LGB zunächst symmetrisch teilt und nach medial wandert. Die Beobachtung, dass mispositionierte LGs schon im St.11 lateraler positioniert sind als die LGs unbetreffener HS (Abb. 3-18 E), deutet auf eine Beeinträchtigung der (initialen) medialen Wanderung des LGB (bzw. der ersten LGs) in *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten hin. Für die Theorie einer eingeschränkten Migration spricht ebenfalls, dass ektopisch positionierten LGs bereits im frühen Entwicklungsstadium in der Nähe der nicht wandernden, dorsal liegenden ePG11 (unausgefüllter Pfeil) vorliegen und sich diese Lage der mispositionierten LG-Cluster relative zur ePG11 auch im St.16 in etwa 90% der betroffenen HS wiederfindet (Abb. 3-17 B und 3-18 F, G und H).

In vorausgegangenen Publikationen wird berichtet, dass das Teilungsmuster und demzufolge die Anzahl der LGs durch Interaktionen mit den longitudinalen Axonen kontrolliert wird (Hidalgo und Griffiths, 2004; Griffiths et al., 2007). Aus diesem Grund habe ich die Anzahl der LGs in *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten analysiert, denn nach der zuvor geschilderten Theorie der eingeschränkten Migration treffen die mispositionierten LGs zu keiner Zeit mit den longitudinalen Trakten des Bauchmarks zusammen. Erstaunlicherweise stellte sich bei der Zählung heraus, dass auch in *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten grundsätzlich zehn Msh-positive Gliazellen (neun LGs und eine M-ISNG; Median = 10, n = 80HS) pro HS verzeichnet werden können und ihre Gesamtzahl somit nicht von der in wildtypischen Embryonen abweicht. Des Weiteren ist zu erkennen, dass in der überwiegenden Mehrzahl betroffener HS (>75%) alle neun LGs in der Peripherie vorliegen und sich die entsprechenden ektopisch positionierten Cluster demnach aus dem vollständigen Zellklon des LGB zusammensetzen. Die zehnte, ebenfalls Msh-positive M-ISNG ist hingegen auch in HS mit mispositionierten LGs stets weiterhin im ZNS lokalisiert (Abb. 3-18 F'-F''). In einigen Embryonen können neben ektopischen Clustern die den gesamten Zellklon des LGB beinhalten, auch Zellansammlungen im PNS beobachtet werden, die sich aus weniger als neun LGs zusammensetzen, wobei die restlichen LGs im Bauchmark detektiert werden können (Abb. 3-19). Gelegentlich konnte beobachtet werden, dass durch den Verlust von LGs entstandene Lücken im ZNS durch LGs benachbarter HS zumindest partiell

kompensiert werden, indem sich diese weiträumiger entlang der axonalen Trakte verteilen.

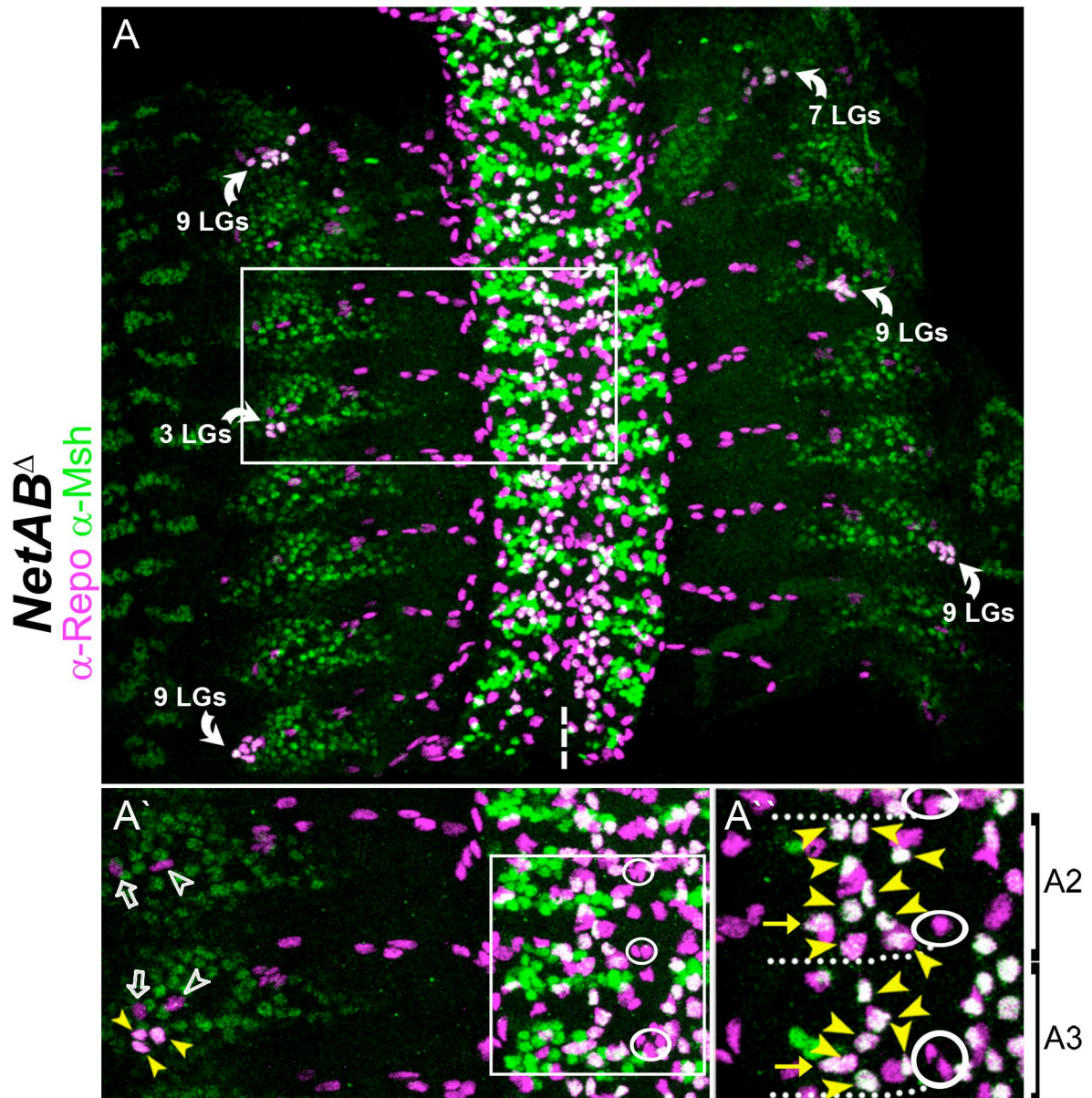


**Abb.3-18: In *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten sind die LGs mispositioniert**

Abgebildet sind Filetpräparate abdominaler HS verschiedener Entwicklungsstadien von wildtypischen (A-D) und *NetAB*<sup>Δ</sup>-mutanten-Embryonen (E-H), gefärbt gegen Repo (magenta) und unterschiedliche LG-spezifische Marker (grün). In (B', B'') und (F', F'') sind Separationen dorsaler Ebenen, in allen anderen Bildern Maximalprojektionen dargestellt. Anterior ist oben und dorsal links. Die ML wird durch gestrichelte Linien angedeutet und die Symbole entsprechend der Abb. 3-17 verwendet.

(A) Im WT hat sich der LGB im St.11 bereits einmal geteilt und ist nach medial gewandert. Schon die ersten beiden Tochterzellen sind deutlich Msh-positiv (LGs; gelbe Pfeilspitzen). (B) Im St.16 markiert Msh zahlreiche Neurone (grün) und pro HS insgesamt zehn Gliazellen im Bauchmark (weiße Kerne). (B'-B'') In einer Separation der dorsalen Ebenen des in (B) gekennzeichneten Bereiches können die in jedem HS vorliegenden Repo- und Msh-positiven neun LGs (gelbe Pfeilspitzen) und die M-ISNG (gelbe Pfeile) klarer visualisiert werden. (C) Der gegen das zytoplasmatische Protein Naz gerichtet Antikörper markiert alle LGs. (D) Im WT exprimieren sechs der neun LGs den Transkriptionsfaktor Pros (weiße Kerne). (E) In *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten können mispositionierte (Msh-positive) LGs bereits im St.11 beobachtet werden. Im HS A4 liegen sie wildtypisch und in A3 ektopisch positioniert vor (ausgefüllter gebogener Pfeil). (F) Im St.16 markiert Msh neben den korrekt im ZNS lokalisierten LGs und M-ISNGs (weiße Kerne) auch die mispositionierten LGs (ausgefüllter gebogener Pfeil). (F'-F'') In einer Separation der dorsalen Ebenen des in (F) markierten Bereiches sind die LGs (gelbe Pfeilspitzen) und M-ISNGs (gelbe Pfeile) im Bauchmark besser sichtbar. In A2 fehlen die LGs, die M-ISNG ist weiterhin vorhanden. In A3 sind alle neun LGs und die M-ISNG zu sehen. (G) Färbungen gegen Naz bestätigen, dass sich die ektopischen Cluster (ausgefüllter gebogener Pfeil) aus LGs zusammensetzen, die in dem entsprechenden HS im ZNS fehlen (gepunkteter Kreis). (H) Eine differentielle *pros*-Expression kann auch in den mispositionierten LGs (ausgefüllter gebogener Pfeile) detektiert werden. Durch abwesende LGs verursachte „Lücken“ im ZNS sind gekennzeichnet (gepunktete Kreise).

Ein weiterer Faktor, welcher mit der Proliferation des LGB in Zusammenhang gebracht wird, ist der Transkriptionsfaktor Prospero (Pros) (Griffiths und Hidalgo, 2004; Griffiths et al., 2007). Im WT wird *pros* am Ende der Embryogenese in einer Subgruppe von sechs LGs exprimiert (dem anterioren und medialen LG Cluster; Doe et al., 1991; Griffiths und Hidalgo, 2004; Beckervordersandforth et al., 2008) (Abb. 3-18 D). In *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten weicht die durchschnittliche Anzahl der *pros*-exprimierenden LGs nicht von wildtypischen Embryonen ab und es können im St.16 in der Mehrzahl der HS ebenfalls sechs Pros-positive LGs erkannt werden (Median: WT = 6, n = 48HS; Median: *NetAB*<sup>Δ</sup> = 6, n = 69HS). Allerdings variiert ihre Anzahl in mutanten Embryonen stärker, da im Vergleich zum WT häufiger HS mit einer verminderten (bis hin zu lediglich einer LG) oder erhöhten (bis hin zu allen LGs) Anzahl von Pros-positiven LGs existieren (Abb. 3-18 H). Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass in den meisten betroffenen HS von *NetAB*<sup>Δ</sup>- und *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten der vollständige Zellklon des LGB mispositioniert ist, lassen die zuvor beschriebenen Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass der Teilungsmodus des LGB und zumindest die differentielle Expression von *pros* nicht von einer Interaktion mit longitudinalen Axonen abhängig ist.



**Abb. 3-19: Nicht immer ist der vollständige LGB-Zellklon ectopisch positioniert**

Zu sehen ist ein *NetAB<sup>Δ</sup>*-mutanter-Embryo im späten St.16, gefärbt gegen Repo (magenta) und Msh (grün). (A) und (A') Maximalprojektionen, (A'') Separation der dorsalen Ebenen. Anterior ist oben. Die ML wird durch gestrichelte Linien angedeutet und die Symbole entsprechend der Abb. 3-18 verwendet.

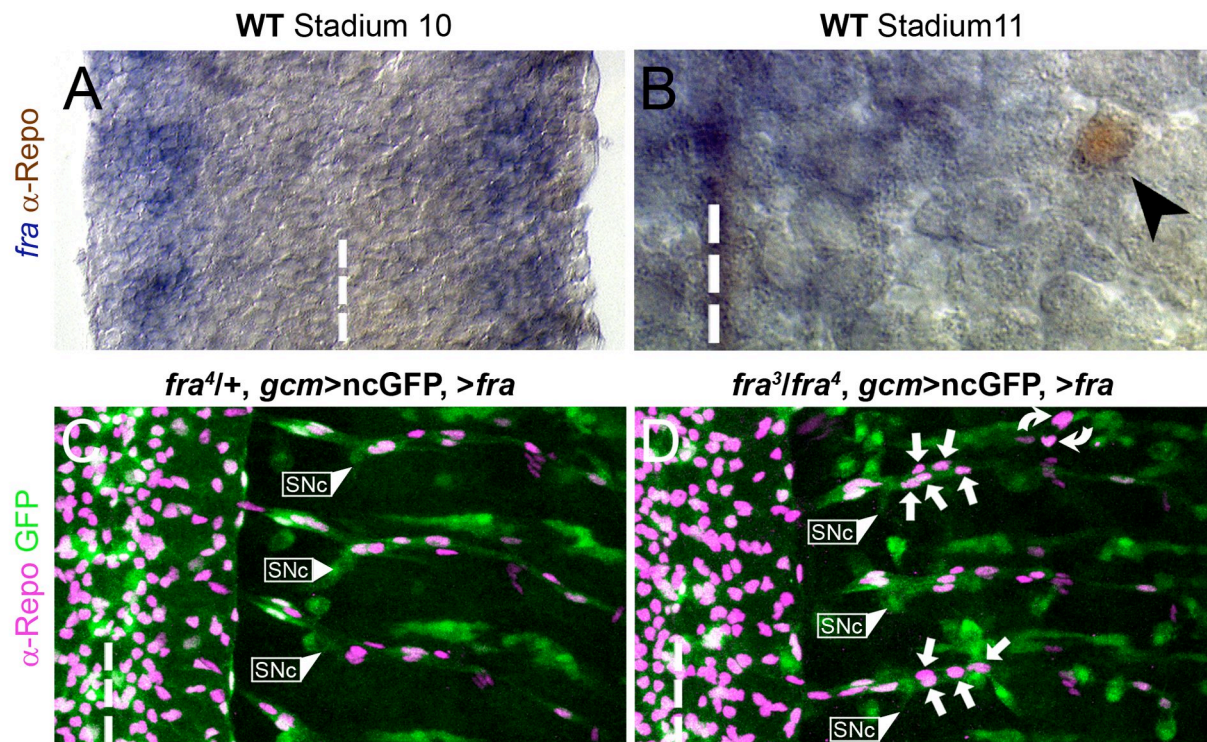
(A) In der Übersicht sind mehrere mispositionierte LG-Cluster in der Peripherie zu sehen, die sich meist aus neun LGs und somit dem vollständigen LGB-Zellklon zusammensetzen. (A') Detailsicht von (A). Im posterioren HS (A3) liegen nur drei mispositionierte LGs (gelbe Pfeilspitzen) nahe der ePG11 (unausgefüllter Pfeil) vor. Im ZNS können die Kanal Glia (Kreise) als Landmarken für die Segmentgrenzen herangezogen werden. Anhand des vergrößerten Ausschnittes (A'') ist zu erkennen, dass im Bauchmark des betroffenen HS A3 insgesamt sieben weitere Msh-positive Gliazellen existieren, bei denen es sich um die verbleibenden sechs LGs (gelbe Pfeilspitzen) und die M-ISNG (gelber Pfeil) handelt. Im HS A2 liegen alle neun LGs (gelbe Pfeilspitzen) und die M-ISNG (gelber Pfeil) im ZNS. Die gepunkteten Linien deuten die Segmentgrenzen an.

### 3.6.3 Die Wegweisung des LGB erfolgt zellautonom mittels Fra

Die Beobachtung, dass der LG-Phänotyp in *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*- und *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten schon im St.11 auftritt (kurz nachdem die LGs normalerweise nach medial gewandert sind), deutet auf eine Netrin-Fra Interaktion während der frühen Phase der LG Wanderung hin. Es stellt sich die Frage, ob der Rezeptor Fra die LGs zellautonom leitet. Als Voraussetzung dafür müsste er zumindest in der frühen Phase der Migration im LGB bzw. den ersten Nachkommenzellen nachweisbar sein. Mittels Antikörperfärbungen konnte Fra in Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen von Kolodziej und Kollegen (1996) in keiner der Repo-positiven Gliazellen, und somit auch nicht im LGB nachgewiesen werden. Im St.10 lassen jedoch Antikörperfärbungen und *in-situ*-Hybridisierungen (ISH) gegen *fra* eine deutliche Expression des Rezeptors in der lateralen Region des Neuroektoderms erkennen (Abb. 3-20 A). Anhand durchgeführter ISH gegen *fra* in Kombination mit Antikörperfärbungen gegen Repo konnte in einigen Embryonen des frühen Entwicklungsstadiums 11 ebenfalls eine schwache *fra*-Expression im LGB registriert werden (Abb. 3-20 B). Demnach wird *fra* zunächst in der Region des Neuroektoderms exprimiert, aus welcher der LGB hervorgeht, die Expression dann aber offensichtlich bereits kurz vor oder direkt nach der Delamination des LGB in dieser Zelle wieder eingestellt.

Wenn eine entsprechend frühe Expression von *fra* ausreicht, um die initiale Wanderung der LGs nach medial zu leiten, dann sollte es im Rahmen eines „Rescue-Experiments“ (siehe 2.6.1) möglich sein, den LG-Phänotyp in *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten durch eine frühe gliaspezifische Expression von UAS-*fra* zu „retten“. Tatsächlich stellte sich heraus, dass in etwa der Hälfte der *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-mutanten-Embryonen, in denen UAS-*fra* via *gcm*-Gal4 getrieben wurde, keine ektopischen LG-Cluster mehr vorkommen (Abb. 3-20 D, Tab. 3-6). Allerdings zeigten einige der „geretteten“ Embryonen vereinzelte mispositionierte LGs in der Peripherie (Abb. 3-20 D, ausgefüllte gebogene Pfeile). Dessen ungeachtet wurden diese Embryonen im Hinblick auf den LG-Phänotyp als „gerettet“ bewertet (Tab. 3-6), da sie nicht länger die für *frazzled*- bzw. *Netrin*-Mutanten charakteristischen LG-Cluster aufwiesen, die aus dem vollständigen Zellklon des LGB bestehen.





**Abb. 3-20: Fra leitet die Wanderung der LGs zellautonom**

Dargestellt sind Filetpräparate verschiedener Entwicklungsstadien. Anterior ist oben und die ML wird durch gestrichelte Linien angedeutet.

(A) ISH gegen *fra* mRNA (blau) in Kombination mit Antikörperfärbungen gegen Repo (braun) lassen im St.10 eine breite laterale *fra*-Expression erkennen. In diesem St. sind noch keine Repo-positiven Gliazellen zu sehen. (B) Der LGB delaminiert an der lateralen Kante des Neuroektoderms und kann im St.11 anhand der Repo-Färbung detektiert werden (Pfeilspitze). Gelegentlich ist eine *fra*-Expression im LGB detektierbar. (C) Die *gcm*-Gal4 getriebene Expression von UAS-*fra* in heterozygotem *fra*<sup>4/+</sup> -Hintergrund beeinträchtigt die Wanderung der Gliazellen nicht. Sämtliche Gliazellen im ZNS und PNS sind wildtypisch positioniert. (D) In *fra*<sup>3/fra</sup><sup>4</sup>-Mutanten kann die *gcm*-Gal4 induzierte Expression von UAS-*fra* den LG-Phänotyp „retten“ (siehe auch Tab. 3-6). Allerdings liegen in einigen der „geretteten“ Embryonen noch einzelne LGs im PNS vor (ausgefüllte gebogene Pfeile). Der in *fra*<sup>3/fra</sup><sup>4</sup>-Mutanten ebenfalls auftretende ePG-Phänotyp wird hingegen nicht „gerettet“. In dem hier abgebildeten Embryo liegen in zwei HS weiterhin zu wenige ePGs (im anterioren fünf und im posterioren vier anstelle von sechs) distal des SNc vor (ausgefüllte Peile). SNc = Segmentalnerv c

Grundsätzlich bestätigt der (wenn auch nur teilweise) erfolgreiche „Rescue-Versuch“ mittels *gcm*-Gal4 die zellautonome Rolle des Rezeptors Fra für die Migration der LGs. Demgegenüber bezeugt der wirkungslose „Rescue-Versuch“ unter Verwendung von *repo*-Gal4 (Tab. 3-6), einer Treiberlinie die nur geringfügig später als *gcm*-Gal4 in Gliazellen exprimiert wird, ein frühes und eng begrenztes Zeitfenster, in dem die Wegweisung des LGB erfolgt. Dies ist vermutlich auch der Grund, weshalb die meisten der für weitere „Rescue-Experimente“ verwendeten Gal4-Linien, die alle bekanntermaßen in LGs exprimiert werden, ebenfalls nicht in der Lage waren deren Mispositionierung in *fra*<sup>3/fra</sup><sup>4</sup>-Mutanten zu „retten“ (Tab. 3.6). Von den „Rescue-Experimenten“ unter Einsatz von *gcm*-Gal4 abgesehen, konnte lediglich die Gal4-

Linie Mz1580 (die bereits in Zellen des Neuroektoderms aktiv ist) die ektopische Positionierung der LGs in einigen Embryonen (2/15) verhindern (Tab. 3.6).

**Tab. 3-6: Liste der durchgeführten „Rescue-Experimente“ in *frazzled*- und *Netrin*-Mutanten mit dem Ziel, eine Mispositionierung der LGs zu verhindern**

Genotyp	Für das „Rescue-Experiment“ verwendete Gal4-Linie	Penetranz* des LG-Phänotyps	Expressivität** des LG-Phänotyps
<i>fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup></i>	-----	100% (11/11)	18,2% (24/132)
<i>fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>; UAS-<i>fra</i></i>	<i>gcm</i> -Gal4	52,4% (11/21)	10,0% (16/160)
	<i>repo</i> -Gal4	100% (11/11)	23,4% (41/175)
	<i>pros</i> -Gal4	100% (16/16)	15,5% (22/213)
	<i>elav</i> -Gal4	100% (22/22)	18,9% (56/296)
	Mz1580-Gal4	86,7% (13/15)	19,6% (41/209)
	Mz605-Gal4	100% (14/14)	20,0% (40/200)
<i>NetAB<sup>Δ</sup></i>	-----	100% (16/16)	29,0% (61/213)
<i>NetAB<sup>Δ</sup>; UAS-<i>NetA</i></i>	<i>sca</i> -Gal4	11,8% (2/17)	10,0% (3/30)
	<i>twist</i> -Gal4	83,3% (10/12)	16,4% (24/146)
	<i>sim</i> -Gal4	75,0% (9/12)	17,9% (24/134)
<i>NetAB<sup>Δ</sup>; UAS-<i>NetB</i></i>	<i>sca</i> -Gal4	8,3% (1/12)	6,7% (1/15)
	<i>sim</i> -Gal4	72,7% (8/11)	15,6% (19/122)

In der Tabelle sind alle „Rescue-Experimente“ aufgeführt, die in *frazzled*- und *Netrin*-Mutanten durchgeführt wurden. Die jeweils verwendeten Treiberlinien sind in der zweiten Spalte vermerkt.

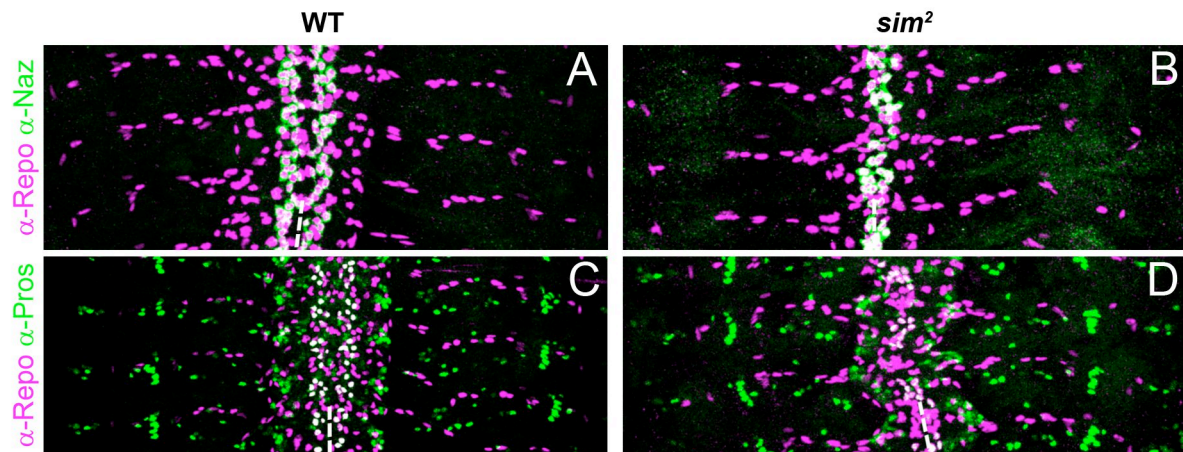
\* Durch die Penetranz wird der prozentuale Anteil der Embryonen beziffert, die im entsprechenden „Rescue-Experiment“ weiterhin ektopische LG Cluster in der Peripherie vorweisen (unabhängig von der Gesamtzahl der LG-Cluster). In Klammern wird die genaue Zahl der betroffenen Embryonen angegeben. Als „gerettet“ wurden alle Embryonen bewertet, die in keinem einzigen HS mehr einen ektopisch positionierten, vollständigen LGB-Zellklon im PNS aufwiesen; auch dann, wenn einzelne mispositionierte LGs in der Peripherie vorlagen (wie im Falle des „Rescue-Experiments“ mittels *gcm*-Gal4. Erklärungen siehe Text).

\*\* Die Expressivität gibt den prozentualen Anteil der HS an, in denen (weiterhin) ektopische LG-Cluster beobachtet werden konnten. In Klammern ist jeweils die genaue Zahl der betroffenen HS der Gesamtzahl an ausgewerteten HS gegenübergestellt.

Im Gegensatz zum LG-Phänotyp konnten die in *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten ebenfalls auftretenden Migrationsdefekte der ePGs nicht durch die pan-gliale Expression von UAS-*fra* behoben werden (Abb. 3-20 D). Demzufolge handelt es sich bei dem ePG-Phänotyp in *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten nicht um einen zellautonomen Effekt, sondern um ein sekundäres Ereignis, möglicherweise hervorgerufen durch fehlgeleitete Axone.

### 3.6.4 Die LG Wanderung wird nicht durch von der ventralen ML segregiertes Netrin geleitet

Eine Aktivierung des Rezeptors Fra durch Netrin induziert im Allgemeinen eine attraktive Signalantwort. Da in *Drosophila* beide Netrine von Zellen der ventralen ML segregiert werden (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996), einer Quelle durch die unter anderem die axonale Wanderung zahlreicher Neuronen kontrolliert wird (siehe Übersichtsartikel Chotard und Salecker, 2004; Parker und Auld, 2004), erschien es zunächst am wahrscheinlichsten, dass von der ML segregiertes Netrin auch die initiale mediale Migration der LGs leitet. Um dies experimentell zu überprüfen, habe ich getestet ob der LG-Phänotyp in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten durch eine Expression von Netrin in den Zellen der ventralen ML „gerettet“ werden kann. Dazu wurde eine *single-minded-* (*sim-*) Gal4- Linie verwendet, die ab frühem St.10 spezifisch in allen Zellen der ventralen ML aktiv ist, um sowohl UAS-*NetA* als auch UAS-*NetB* zu exprimieren. Im Zuge dieser „Rescue-Experimente“ stellte sich heraus, dass die *sim*-Gal4 getriebene Expression beider Netrin lediglich in einem geringen Anteil der Embryonen zur „Rettung“ des LG-Phänotyps führt (Tab. 3-6). Um ferner die Notwendigkeit der von den ventralen ML-Zellen segregierten Netrine für die LG Migration zu klären, wurden homozygote *sim*<sup>2</sup>-Mutanten hinsichtlich mispositionierter LGs analysiert. In *sim*<sup>2</sup>-Mutanten fehlen die ML-Zellen vollständig, da sie erst gar nicht korrekt spezifiziert werden (Klämbt et al., 1991). Obgleich der Verlust der ML-Zellen mit dramatischen axonalen Wegfindungsdefekten und einem Kollaps der longitudinalen Trakte einhergeht, konnten in *sim*<sup>2</sup>-Mutanten keine ektopischen LG-Cluster in der Peripherie registriert werden (Abb. 3-21 B und D). Vielmehr sind die LGs auch weiterhin im Bauchmark dorsal der kollabierten Konnektive lokalisiert und weisen eine unbeeinträchtigte Expression der LG-Marker *Naz* und *Pros* auf (Abb. 3-21 B und D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die initiale Wanderung der LGs offensichtlich nicht durch die von der ventralen ML segregierten Netrine geleitet wird. Gegen eine Beteiligung der ML-Zellen spricht außerdem, dass sie Netrin im WT erst etwa ab dem frühen St.12 exprimieren (Harris et al., 1996; Kolodziej et al., 1996; Mitchell et al., 1996), mispositionierte LGs in *NetAB*<sup>Δ</sup>- und *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten aber bereits ab dem St.11 registriert werden können (Abb. 3-18 E).

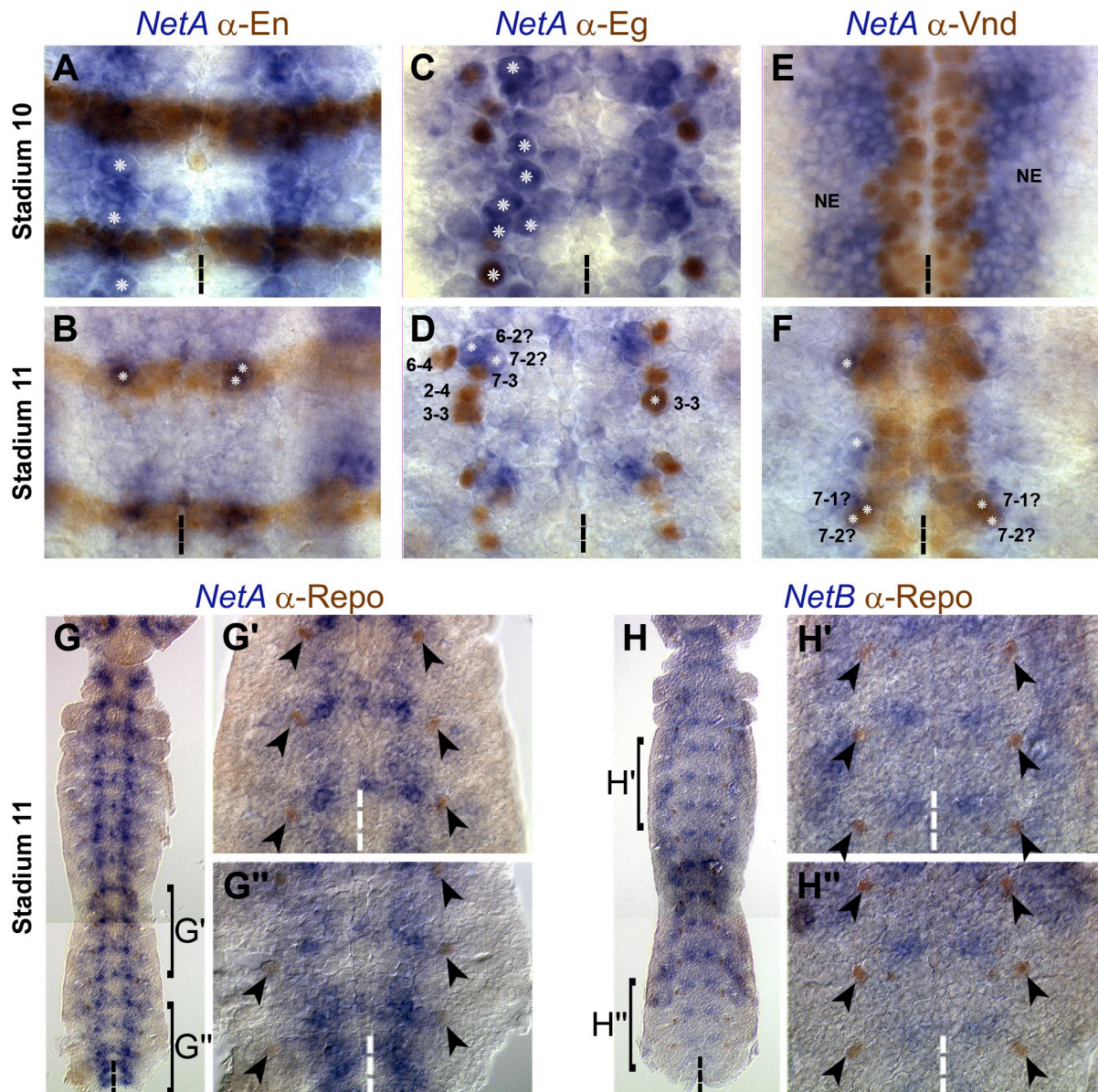


**Abb. 3-21: In  $sim^2$ -Mutanten sind die LGs nicht ektopisch in der Peripherie lokalisiert**

Zu sehen sind Filetpräparate von wildtypischen (A, C) und  $sim^2$ -mutanten-Embryonen (B, D) des Embryonalstadiums 16, gefärbt gegen Repo (magenta) und Naz (A, B; grün) bzw. Pros (C, D; grün). Anterior ist oben. Die ML wird durch gestrichelte Linien angedeutet.

(A) Naz wird in allen LGs exprimiert die sich im WT dorsal entlang der longitudinalen Trakte anordnen. (B) In  $sim^2$ -Mutanten ist anhand der Naz-Färbung zu erkennen, dass die LGs auch weiterhin im Bauchmark dorsal der kollabierten longitudinalen Trakte lokalisiert sind. (C) Pros markiert neben zahlreichen Neuronen sechs LGs pro HS (weiße Kerne). (D) In  $sim^2$ -Mutanten erscheint die differentielle Expression von Pros in den LGs unbeeinträchtigt.

Aufgrund der vorher genannten Befunde wurden ISH gegen *NetA* und *NetB* in wildtypischen Embryonen angefertigt, um zu untersuchen, ob Zellen existieren, die Netrin früher als die ML-Zellen exprimieren und somit als wegweisende Ligandenquelle für den LGB bzw. seine ersten Tochterzellen (LGs) in Frage kommen könnten. Es zeigte sich, dass zwischen St.10-11 zahlreiche neuroektodermale Zellen und NBs des sich entwickelnden Bauchmarks Netrin dynamisch exprimieren (Abb. 3-22). Mittels zusätzlicher Markerfärbungen konnten einige dieser *fra*-positiven NBs genauer identifiziert werden. (Abb. 3-22 A-F). Zum St.11 hin wird das ISH-Signal erkennbar schwächer, es können aber dennoch segmental angeordnete Gruppen von Zellen identifiziert werden, die sowohl *NetA* als auch *NetB* exprimieren und jeweils medial des LGB lokalisiert sind (Ab. 3-22 G-H``). In diesem Entwicklungsstadium zeigen die beiden Netrine zum Teil unterschiedliche Expressionsmuster, die besonders deutlich in den posterioren HS ausfallen, in denen lediglich *NetA* stark exprimiert wird. Diese differentielle Expression ist vermutlich auch der Grund, weshalb die gelegentlich auftretenden ektopische LG-Cluster in *NetA*<sup>Δ</sup>-Einzelmutanten hauptsächlich in posterioren Segmenten zu finden waren, niemals aber in *NetB*<sup>Δ</sup>-Einzelmutanten beobachtet werden konnten.



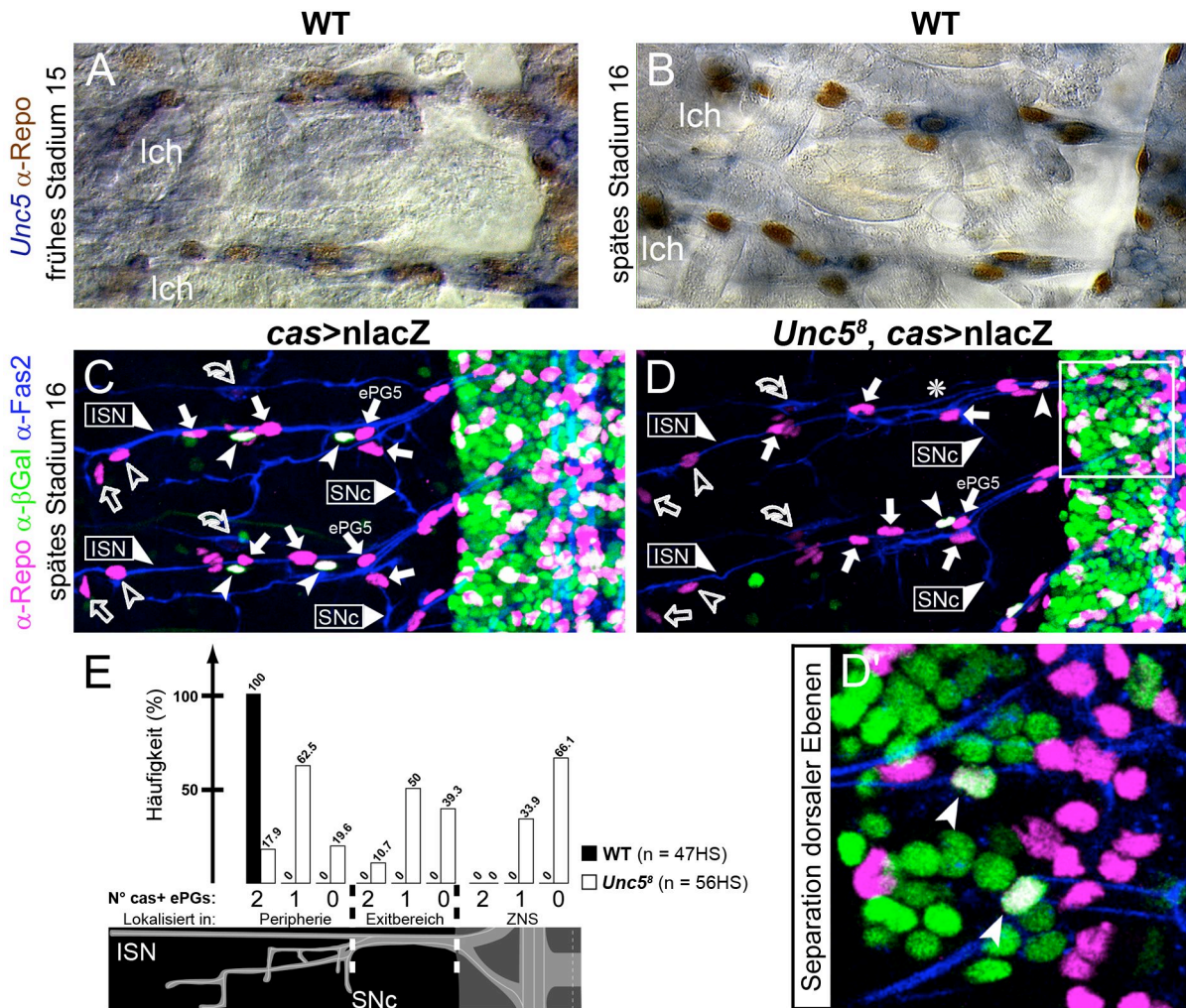
**Abb. 3-22: Netrin wird in zahlreichen medial zum LGB liegenden Zellen exprimiert**  
 (A-H'') Filepräparate wildtypischer Embryonen der St.10 und 11, in denen eine ISH gegen *NetA* (A-G'') bzw. *NetB* (H-H'') durchgeführt wurde. In (A-F) sind zusätzliche Markerfärbungen gegen *Engrailed* (*En*; A, B), *Eagle* (*Eg*; C, D) und *Ventral nervous system defective* (*Vnd*, E, F) zu sehen, die zur Identifikation einiger der *Netrin*-positiven NBs herangezogen wurden. Im St.10 exprimieren sowohl zahlreiche Zellen des Neuroektoderms (NE) als auch NBs (Sternchen) *NetA*. Zum St.11 hin wird die Expression erkennbar schwächer und beschränkt sich auf einzelne NBs. Aufgrund ihrer Lage im En-Streifen (B) und der Tatsache, dass sie nicht den Marker *Eg* exprimieren (D) handelt es sich bei zwei der *Netrin*-positiven NBs vermutlich um NB6-2 und NB7-2. Außerdem exprimiert der *Vnd*-positive NB7-1 (F) und gelegentlich der *Eg*-positive NB3-3 (D) *NetA*. (G-G'') Im St.11 wird *NetA* von neuronalen Zellen im sich entwickelnden Bauchmark exprimiert, die medial zu dem aus dem lateralen NE delaminierenden *Repo*-positiven LGB (ausgefüllte Pfeilspitzen) liegen. (H-H'') *NetB* wird im WT im St.11 ebenfalls in neuronalen Zellgruppen exprimiert, die medial des LGB (ausgefüllte Pfeilspitzen) lokalisiert sind. Die Expression von *NetB* in den posterioren HS fällt deutlich schwächer aus (vergleiche dazu H' und H''). Weitere *NetB*-positive Zellen können lateral des LGB detektiert werden. In allen Bildern ist anterior oben und die ML wird durch gestrichelte Linien angedeutet.

Mit dem Ziel zu überprüfen, ob die Mispositionierung der LGs in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten durch eine frühe Expression von Netrin im ventralen Neuroektoderm und delaminierenden NBs verhindert werden kann, wurden „Rescue-Experimente“ mit *scabrous*- (*sca*-) Gal4 durchgeführt. Diese Treiberlinie exprimiert ab St.8/9 im gesamten ventralen Neuroektoderm und somit vornehmlich in Zellen, die medial des delaminierenden LGB liegen. Tatsächlich resultierte sowohl eine durch *sca*-Gal4 getriebene Expression von UAS-*NetA* als auch von UAS-*NetB* in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten in einer wildtypischen Anordnung der LGs in ungefähr 90% der ausgewerteten Embryonen (Tab. 3.6). Diese Ergebnisse belegen eine redundante Funktion der beiden Netrine für die LG Wanderung. In Kontrollexperimenten konnte in seltenen Fällen (in zwei von elf Embryonen) beobachtet werden, dass auch die ektopische Expression der Netrine mittels *sca*-Gal4 im ansonsten wildtypischen Hintergrund ektopische Cluster induzieren kann. Demnach stellt sich die Frage, weshalb eine *sca*-Gal4 getriebene Expression von Netrin in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten auf der einen Seite in der Lage ist den LG-Phänotyp zu „retten“, und auf der anderen Seite in wildtypischen Embryonen eine Mispositionierung der LGs hervorrufen kann. Womöglich lässt sich diese Problematik dadurch erklären, dass es in Anwesenheit von endogenem Netrin im WT als Folge der ektopischen Expression durch *sca*-Gal4, zu einer „Überflutung“ des Systems kommt, wodurch ein richtungsweisender Gradient des Netrin-Signals aufgehoben wird. Dies würde dafür sprechen, dass Netrin als instruktives (und somit richtungsgebendes) Signal für die LG Migration von der lateralen Kante des Neuroektoderms nach medial wirkt.

### **3.6.5 In *Unc5*<sup>8</sup>-Mutanten weisen bestimmte ePGs (ePG6 und ePG8) einen Wanderungsdefekt auf**

In *Unc5*<sup>8</sup>- (und *NetAB*<sup>Δ</sup>-) Mutanten präsentieren ausschließlich die vom ZNS auswandernden ePGs einen Migrationsdefekt welcher sich dadurch auszeichnet, dass am Ende der Embryogenese in der Regel zwei ePGs distal des SNc fehlen. Demzufolge resultiert der Verlust von *Unc5* nicht in einer generell beeinträchtigten Wanderung aller vom ZNS abstammenden ePGs sondern der Rezeptor scheint vielmehr für die gerichtete Migration einzelner ePGs erforderlich zu sein. Daraus ergibt sich die Frage, um welche ePGs es sich dabei handelt. Um zu prüfen, ob sich

dies womöglich bereits anhand einer differentiellen Expression von *Unc5* in einzelnen ePGs beantwortet lässt, wurden ISH gegen *Unc5* kombiniert mit Antikörperfärbungen gegen Repo in wildtypischen Embryonen durchgeführt. Eine grundsätzlich vorhandene Expression von *Unc5* in den ePGs belegen vorausgegangene Arbeiten (Keleman und Dickson, 2001; Freeman et al., 2003), jedoch wurden derzeit keine Aussagen über die Expression in individuellen ePGs getroffen. Bei Betrachtung der ISH stellte sich heraus, dass während der aktiven Migrationsphase (St.13-16) alle vom ZNS auswandernden ePGs zumindest transient *Unc5* exprimieren (Abb. 3-23 A und B). Demnach ist es nicht möglich, die in ihrer Migration beeinträchtigten ePGs in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten allein aufgrund der wildtypischen Expression des Rezeptors zu identifizieren. Letztendlich konnte aber durch Einsatz der molekularen Marker (Tab. 3-2) nachgewiesen werden, dass es sich bei den distal des SNc fehlenden ePGs in *Unc5<sup>8</sup>*- (und *NetAB<sup>Δ</sup>*-) Mutanten um die beiden Tochterzellen des NB2-5, die ePG6 und ePG8, handelt. Indem *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten mit der *cas*-Gal4 Treiberlinie kombiniert wurden, um selektiv die ePG6 und ePG8 zu markieren, kann anschaulich nachgewiesen werden, dass es diese beiden ePGs sind, die häufig im Exitbereich (proximal des SNc) verharren (Abb. 3-23 D, ausgefüllte Pfeilspitze im anterioren HS) oder sogar gänzlich im Bauchmark verbleiben (Abb. 3-23 D', ausgefüllte Pfeilspitzen). Nur selten kann in *Unc5<sup>8</sup>*-mutanten-Embryonen beobachtet werden, dass die beiden *cas*-positiven ePG6 und ePG8 dem WT entsprechend bis distal des SNc migrieren (Abb.3-23 C; siehe auch Statistik in E). Zusätzlich zur ePG6 und ePG8 fehlt gelegentlich auch die ePG5 an ihrer charakteristischen Position am Abzweigungspunkt des SNc (Abb. 3-23 D, Sternchen). In entsprechenden HS wandert sie offensichtlich ebenfalls nicht weit genug nach dorsal aus, denn durch Kombination von *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten mit der Markerlinie 3-101, welche die ePG4 und ePG5 markiert (Tab. 3-2), konnte diese Zelle in betroffenen HS vereinzelt im Exitbereich detektiert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3-23: Alle vom ZNS auswandernden ePGs exprimieren zeitweise *Unc5*, in *Unc5*<sup>8</sup>-Mutanten ist jedoch lediglich die Migration distinkter ePGs beeinträchtigt**

(A-B) ISH gegen *Unc5* mRNA (blau) zusammen mit Antikörperfärbung gegen Repo (braun) in Filetpräparaten wildtypischer Embryonen unterschiedlicher Stadien. In (C-D') sind Filetpräparate von wildtypischen (C) und *Unc5*<sup>8</sup>-mutanten- (D und D') Embryonen des St.16 abgebildet, die jeweils sowohl die Treiberlinie *cas*-Gal4 als auch UAS-*n lacZ* tragen (*cas*>*n lacZ*) und gegen Repo (magenta), Fas2 (blau) und  $\beta$ -Gal (grün) gefärbt sind. In (D') ist eine Separation der dorsalen z-Ebenen zu sehen, in denen die Nervenwurzeln (d.h. der im ZNS liegende Anteil der peripheren Nerven) verlaufen. Alle anderen Bilder zeigen Maximalprojektionen. Anterior ist oben und dorsal links. Vom ZNS abstammende ePGs die bis distal des SNc gewandert sind, werden durch ausgefüllte Pfeile und die *cas*>*n lacZ* markierten ePG6 und ePG8 durch ausgefüllte Pfeilspitzen gekennzeichnet. Weitere Symbole und Abkürzungen werden entsprechend der Abb. 3-17 verwendet.

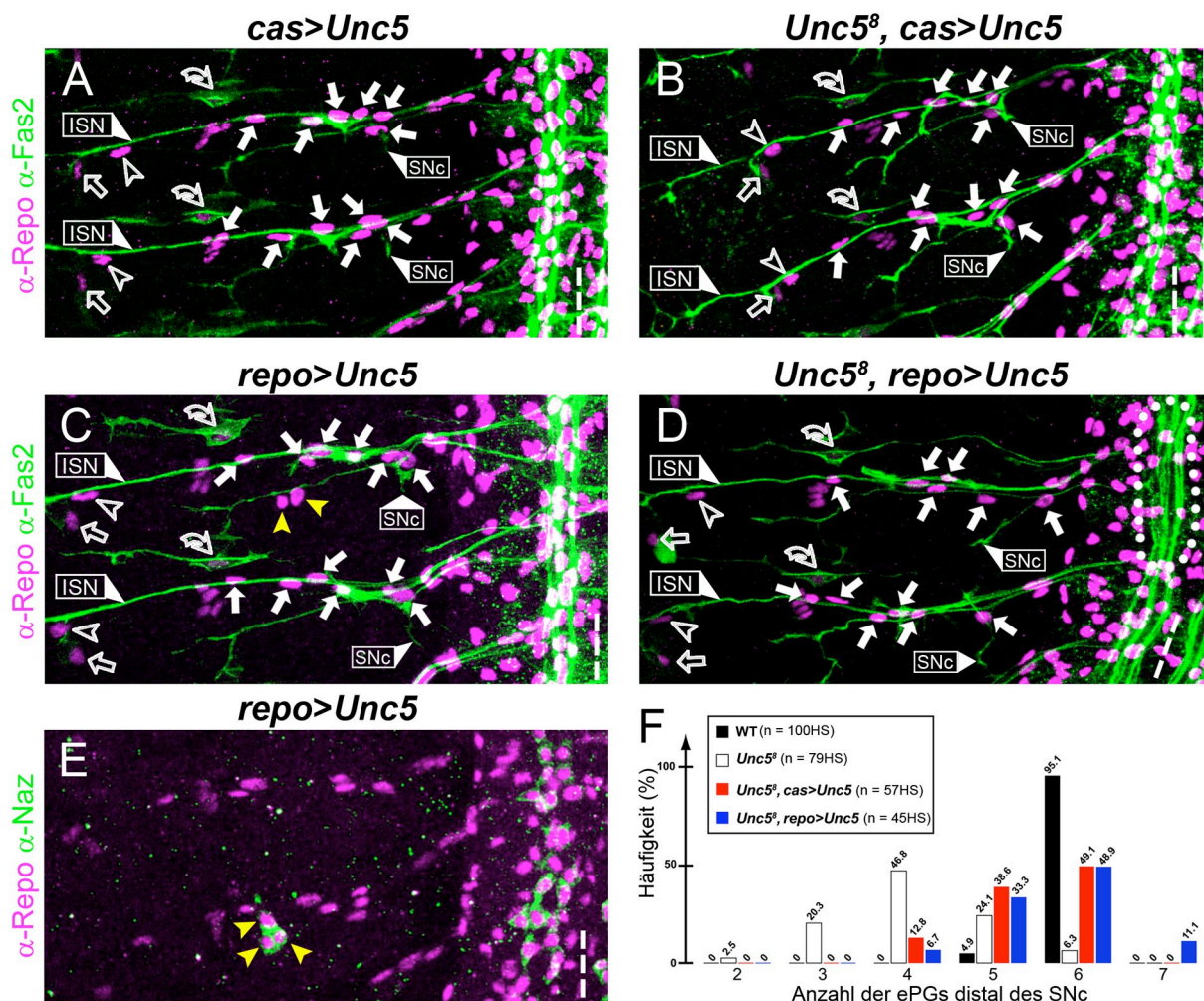
(A) In wildtypischen St.15 Embryonen exprimieren sämtliche vom ZNS auswandernden ePGs *Unc5*. (B) Im späten St.16 zeigen hingegen nur noch vereinzelte ePGs ein ISH-Signal. (C) Im wildtypischen Hintergrund können die ePG6 und ePG8 mittels *cas*>*n lacZ* markiert werden (ausgefüllte Pfeilspitzen). Beide Zellen sind im St.16 stets distal des SNc positioniert. (D) Die Markierung der ePG6 und ePG8 durch *cas*>*n lacZ* (ausgefüllte Pfeilspitzen) in *Unc5*<sup>8</sup>-Mutanten belegt, dass diese beiden Zellen nicht weit genug nach dorsal migrieren. In dem hier abgebildeten Ausschnitt ist lediglich eine *cas*-positive ePG pro HS in der Peripherie zu sehen und im anterioren HS ist diese zudem im Exitbereich lokalisiert. Gelegentlich wandert auch die ePG5 nicht weit genug nach dorsal aus (Sternchen). (D') Detailansicht von (D). In beiden HS kann die zweite *cas*>*n lacZ*-positive ePG die in der Peripherie fehlt, im Bauchmark entlang der Nervenwurzel detektiert werden (ausgefüllte Pfeilspitzen). (E) Statistische Auswertung der Anzahl *cas*>*n lacZ*-positiver ePGs (ePG6 und ePG8) die im WT bzw. *Unc5*<sup>8</sup>- Mutanten in der Peripherie (distal des SNc), dem Exitbereich (proximal vom SNc) oder im ZNS lokalisiert sind. Für jeden Genotyp wurden HS von mindestens neun Embryonen ausgewertet.



### 3.6.6 Die Navigation der ePG6 und ePG8 mittels *Unc5* verläuft zellautonom

Um zu analysieren, ob die beeinträchtigte Wanderung der ePGs in *Unc5<sup>8</sup>*- und *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten auf eine zellautonome Funktion des Rezeptors *Unc5* zurückzuführen ist, wurden zellspezifische „Rescue-Experimente“ durchgeführt. Zunächst wurde die *cas*-Gal4 Linie verwendet, um den Rezeptor im *Unc5<sup>8</sup>*-mutanten-Hintergrund wieder in der ePG6 und ePG8 zu exprimieren (*Unc5<sup>8</sup>, cas>Unc5*). Zuvor wurde anhand von Kontrollexperimenten bestätigt, dass eine Überexpression von *Unc5* durch *cas*-Gal4 die Positionierung der ePGs in einem ansonsten wildtypischen Hintergrund nicht beeinträchtigt (Abb. 3-24 A). Die ektopische Expression von UAS-*Unc5* in der ePG6 und ePG8 mittels *cas*-Gal4 in homozygoten *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten reichte aus, um den ePG-Phänotyp signifikant zu „retten“: Als Folge konnte in ca. 49% der HS wieder die wildtypische Anzahl von sechs ePGs distal des SNc beobachtet werden (im Gegensatz zu lediglich 6% der HS in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten), und immerhin fünf ePGs lagen in ca. 39% der HS distal des SNc vor (im Unterschied zu ca. 24% der HS in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten) (Abb. 3-24 B und F). Da die *cas*-Gal4 Linie neben der ePG6 und ePG8 allerdings auch in zahlreichen Neuronen aktiv ist, steht weiterhin der eindeutige Nachweis aus, dass *Unc5* in den migrierenden ePGs (zellautonom) erforderlich ist. Aus diesem Grund wurden weitere „Rescue-Experimente“ durchgeführt, bei denen der Rezeptor mittels *repo*-Gal4 ausschließlich in Gliazellen exprimiert wurde. In dem dazugehörigen Kontrollexperiment konnte festgestellt werden, dass eine pan-gliale Überexpression von *Unc5* die Migration der ePGs nicht beeinflusst (Abb. 3-24 C). Demgegenüber demonstrieren die LGs als Folge der oben genannten Überexpression einen deutlichen Phänotyp. Wie bereits von Freeman und Kollegen (2003) beschrieben, liegen sie häufig nicht dorsal der Konnektive vor sondern sind innerhalb des Bauchmarks nach lateral verschoben (Abb. 3-24 D, gepunkteter Kreis). Mehrfach konnten sogar zwei, vier oder mehr LGs in der Peripherie beobachtet werden (Penetranz: 76,4% (n = 17 Embryonen); Expressivität: 19,5% (n = 104HS)), die in der Regel mit dem SN assoziiert sind (Abb. 3-24 C, gelbe Pfeilspitzen). Durch Färbungen gegen Naz wurde experimentell bestätigt, dass es sich bei den ektopisch positionierten Gliazellen in der Peripherie um LGs handelt (Abb. 3-24 E, gelbe Pfeilspitzen). Ektopische Expression von UAS-*Unc5* mittels *repo*-Gal4 im *Unc5<sup>8</sup>*-mutanten-Hintergrund (*Unc5<sup>8</sup>, repo>Unc5*)

resultierte in einer deutlichen Reduzierung des ePG-Phänotyps. In nahezu der Hälfte aller analysierten HS (49%) lagen wieder sechs vom ZNS abstammende ePGs distal des SNc vor (im Gegensatz zu lediglich 6% der HS in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten) und zumindest fünf ePGs konnten in ca. 33% der HS distal des SNc registriert werden (im Unterschied zu 24% der HS in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten). In ca. 11% der HS konnten sogar sieben ePGs distal des SNc detektiert werden, da eine der normalerweise im Exitbereich lokalisierten ePGs (ePG1-3) weiter als üblich nach dorsal gewandert ist (siehe hierzu Statistik in Abb. 3-24 F). Letztendlich belegt insbesondere der erfolgreiche „Rescue-Versuch“ unter Verwendung der *repo*-Gal4-Linie eindeutig die zellautonome Funktion von *Unc5* für die ePG Wanderung.



**Abb. 3-24: „Rescue-Experimente“ belegen die zellautonome Funktion von *Unc5* für die Migration in der ePG6 und ePG8**

(A-E) zeigen jeweils zwei abdominale HS (Filetpräparate) von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16, gefärbt gegen Repo (magenta) und Fas2 (A-D, grün) bzw. Naz (E, grün). Anterior ist oben und dorsal links. Die ML wird durch die gestrichelte Linie angedeutet. Symbole und Abkürzungen werden entsprechend der Abb. 3-17 verwendet.

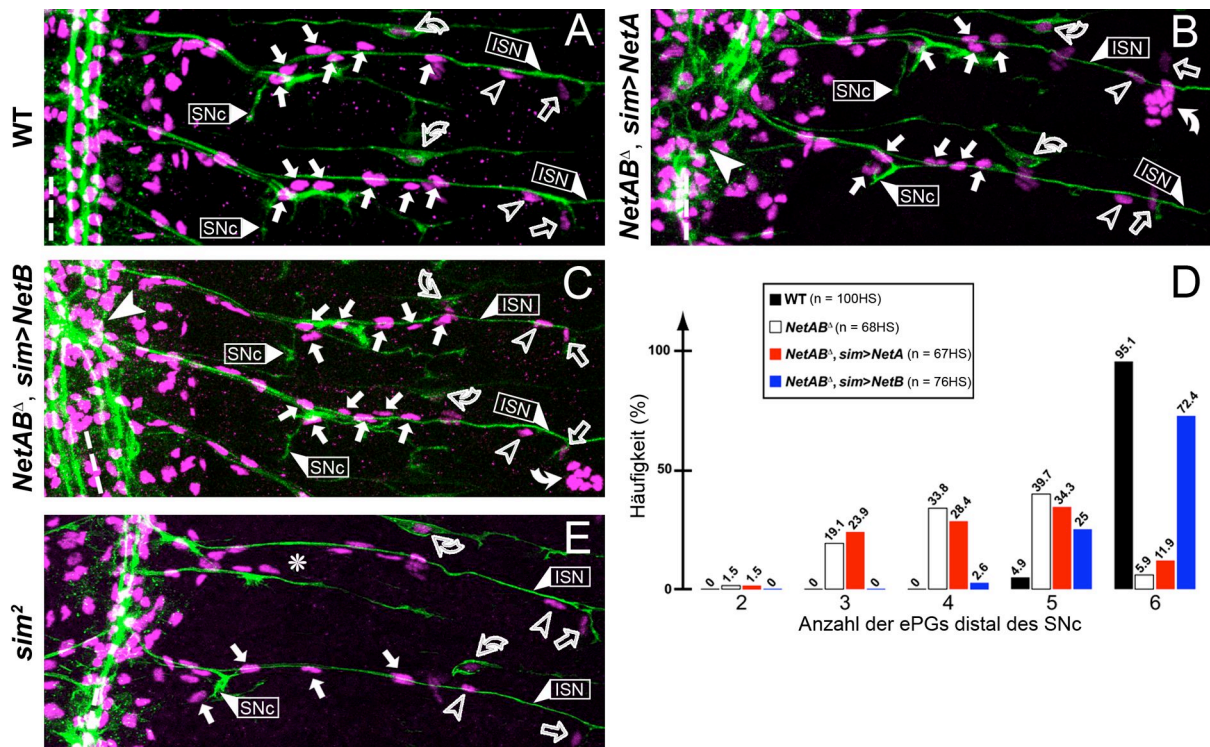
(A) Die Wanderung der ePGs wird durch ektopische Expression von *Unc5* mittels *cas*-Gal4 im ansonsten wildtypischen Hintergrund nicht beeinträchtigt und in jedem HS sind sechs vom ZNS

auswandernde ePGs distal des SNc lokalisiert (ausgefüllte Pfeile). (B) Als Folge der ektopischen Expression von *Unc5* durch *cas-Gal4* in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten migrieren die ePG6 und ePG8 häufig wildtypisch und es können in knapp der Hälfte der HS wieder sechs ePGs distal des SNc detektiert werden (ausgefüllte Pfeile). (C) Die pan-gliale Expression von *Unc5* mittels *repo-Gal4* beeinträchtigt die Anordnung der ePGs nicht, allerdings können häufig ektopisch positionierte LGs in der Peripherie beobachtet werden (gelbe Pfeilspitzen). (D) Durch die pan-gliale Expression von *Unc5* via *repo-Gal4* in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten kann der ePG-Phänotyp in knapp der Hälfte aller Embryonen vollständig „gerettet“ werden. Als Folge der pan-glialen Expression verschiebt sich die Lage der LGs häufig nach lateral (gepunkteter Kreis). (E) Färbungen gegen Naz im *cas>Unc5*-Hintergrund beweisen, dass es sich bei den ektopischen Zellen im PNS um LGs handelt (gelbe Pfeilspitzen). (F) Statistische Auswertung der Anzahl vom ZNS abstammender ePGs die im WT, in *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten und in beiden „Rescue-Experimenten“ bis nach distal des SNc gewandert sind. Für jeden Genotyp wurden HS von mindestens neun Embryonen analysiert.

### 3.6.7 Von Zellen der ventralen ML segregiertes NetB dirigiert die Migration der ePG6 und ePG8

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde demonstriert, dass speziell die ePG6 und ePG8 einen Migrationsdefekt in *Unc5<sup>8</sup>*- (und *NetAB<sup>Δ</sup>*-) Mutanten aufweisen, und dass dieser ePG-Phänotyp auf eine zellautonome Funktion des Rezeptors *Unc5* zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der *Netrin*-Einzelmutanten lassen darüber hinaus darauf schließen, dass exklusiv *NetB* als wegweisender Ligand für die Migration der ePG6 und ePG8 fungiert. Da eine Aktivierung des Rezeptors *Unc5* durch *Netrin* bekanntermaßen Repulsion vermittelt, stellt sich als nächstes die Frage nach der richtungsweisenden *Netrin*quelle. Um zu überprüfen, ob von den ML-Zellen segregiertes *Netrin* die Migration der ePGs lenkt, wurden „Rescue-Experimente“ mit UAS-*NetA* und UAS-*NetB* unter Verwendung der Treiberlinie *sim-Gal4* durchgeführt, welche spezifisch in ML-Zellen aktiviert wird. Überexpression beider *Netrine* mittels *sim-Gal4* im ansonsten wildtypischen Hintergrund hat keinerlei Auswirkung auf die Positionierung der ePGs am Ende der Embryogenese, resultiert aber in deutlichen Defekten der longitudinalen Trakte (nicht gezeigt). Letzteres ist auch in *NetAB<sup>Δ</sup>*-mutantem-Hintergrund als Folge ektopischer Expression von *Netrin* mittels *sim-Gal4* zu erkennen (Abb. 3-25 B und C, ausgefüllte Pfeilspitze; siehe auch Bhat, 2005). Unabhängig davon kann anhand der beiden „Rescue-Experimente“ deutlich festgestellt werden, dass durch *sim-Gal4* getriebene Expression von UAS-*NetB* der ePG-Phänotyp in *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten signifikant reduziert wird (Abb. 3-25 C und D), nicht aber durch UAS-*NetA* (Abb.3-25 B und D). Diese Resultate bestätigen die exklusive Rolle des Liganden *NetB* für die Wegleitung der ePGs. Darüber hinaus bekräftigt auch der in *sim<sup>2</sup>*-Mutanten auftretende ePG-Phänotyp, dass von der

ventralen ML segregiertes NetB für die wildtypische Migration der ePG6 und ePG8 erforderlich ist. Die Analyse wird zwar durch die zum Teil dramatischen Defekte der peripheren Nerven erschwert, dennoch ist in vielen HS klar erkennbar, dass in *sim*<sup>2</sup>-Mutanten distal des Abzweigungspunktes des SNc zu wenige ePGs vorliegen (Abb. 3-25 E).



**Abb. 3-25: Von ML-Zellen segregiertes NetB leitet die Wanderung der ePGs**

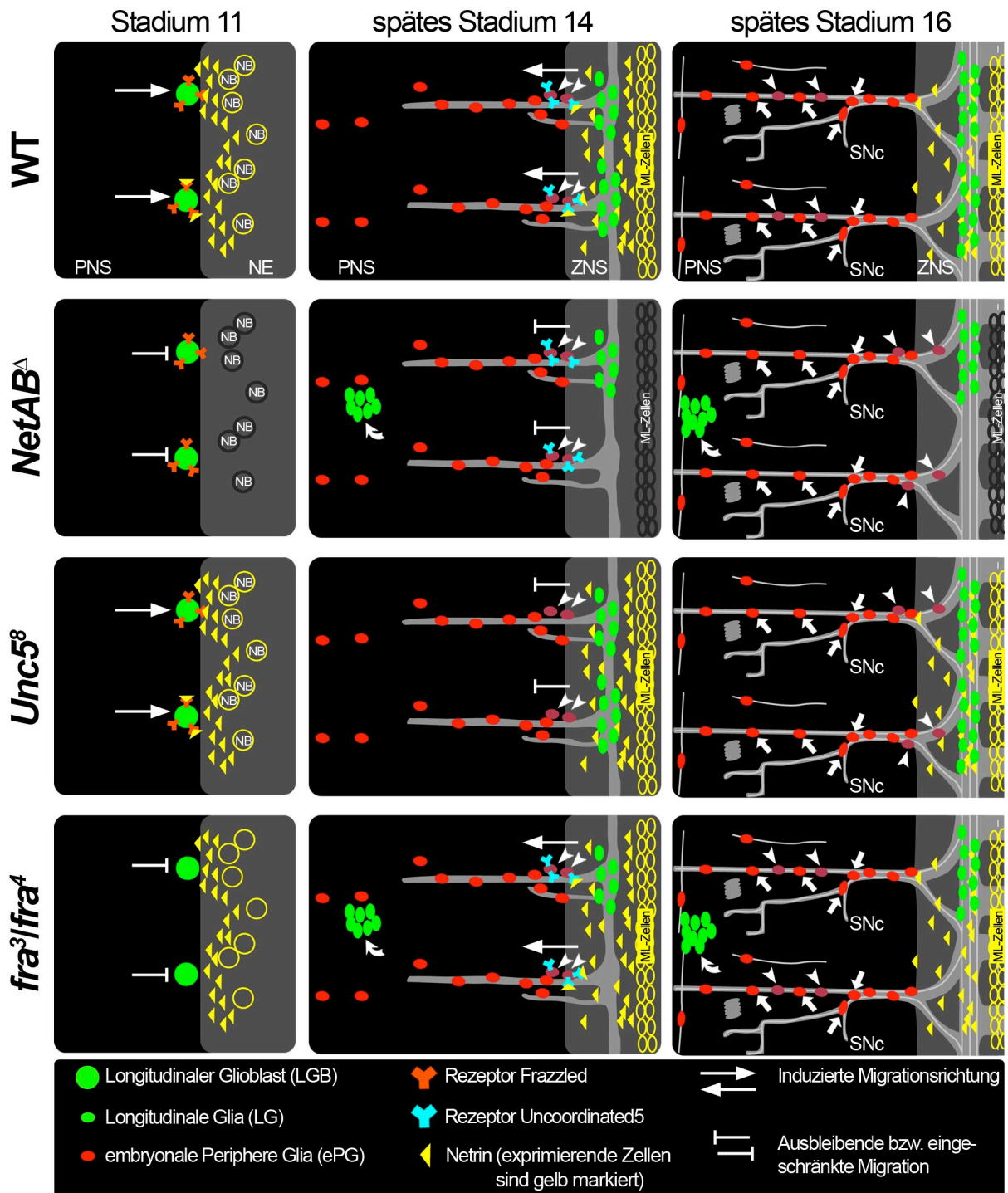
Dargestellt sind Filetpräparate vom WT (A), *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten, in denen zum einen UAS-*NetA* (B) und zum anderen UAS-*NetB* (C) mittels *sim*-Gal4 exprimiert wird und *sim*<sup>2</sup>-Mutanten (E), gefärbt gegen Repo (magenta) und Fas2 (grün). Anterior ist oben und dorsal rechts. Die ML wird durch eine gestrichelte Linie angedeutet. Symbole und Abkürzungen werden entsprechend der Abb. 3-17 verwendet.

(A) Im WT können sechs vom ZNS abstammende ePGs distal des SNc detektiert werden (ausgefüllte Pfeile) und es liegen niemals mispositionierte LGs in der Peripherie vor. (B) Eine durch *sim*-Gal4 getriebene Expression von UAS-*NetA* in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten reicht nicht aus, um die beeinträchtigte Migration der ePGs effektiv zu „retten“. Auch weiterhin sind distal des SNc in nahezu jedem HS zu wenige vom ZNS auswandernde ePGs lokalisiert (ausgefüllte Pfeile). Als Folge der Überexpression von *NetA* kollabieren die longitudinalen Trakte im ZNS (ausgefüllte Pfeilspitze). Die Mehrzahl der Embryonen weist weiterhin ektopische LG-Cluster im PNS auf (ausgefüllter gebogener Pfeil, siehe Tab. 3.6). (C) Die *sim*-Gal4 getriebene Expression von UAS-*NetB* in *NetAB*<sup>Δ</sup>-Mutanten kann den ePG-Phänotyp in den meisten Embryonen vollständig „retten“ (ausgefüllte Pfeile). Im ZNS überkreuzen die longitudinalen Trakte häufig die ML oder kollabieren vollständig (ausgefüllte Pfeilspitze). Mispositionierte LGs sind in etwa 75% der Embryonen vorhanden (ausgefüllter gebogener Pfeil, siehe Tab. 3.6). (D) Statistische Auswertung der „Rescue-Experimente“ im Hinblick auf die Migration der vom ZNS auswandernden ePGs. Für jeden Genotyp wurden HS von mindestens zehn Embryonen analysiert. (E) *sim*<sup>2</sup>-Mutanten fehlt die ventrale ML und die longitudinalen Trakte kollabieren. Die peripheren Nerven zeigen zum Teil enorme Defekte (Sternchen) und in der Peripherie liegen zu wenige ePGs distal des SNc vor (ausgefüllte Pfeile).

\*\*\*\*\*

Kompakte Zusammenfassung des sechsten Kapitels (3.6):

An dieser Stelle wird ein auf den Ergebnissen dieses Kapitels basierendes Modell der Netrin-vermittelten Wegleitung der LGs und ePGs anhand von Abb. 3-26 bildlich zusammengefasst.



**Abb. 3-26: Modell der Netrin-vermittelten Wegleitung der LGs und ePGs**

Im St.11 exprimiert der LGB im WT den Rezeptor Frazzled (Fra) und wird mittels von NBs segregiertem Netrin nach medial geleitet. Diese initiale Migration liefert die Voraussetzung dafür, dass

die Nachkommenzellen des LGB (die LGs) im weiteren Verlauf der Entwicklung dorsal der longitudinalen Trakte lokalisiert sind. Im späten St.14 wird durch von ML-Zellen sezerniertes Netrin die nach dorsal gerichtete Migration der im ZNS entstehenden ePG6 und ePG8 (ausgefüllte Pfeilspitzen) kontrolliert; in diesem Fall durch Aktivierung des Repulsion-vermittelnden Rezeptors Uncoordinated5 (Unc5). Gegen Ende der Embryogenese (spätes St.16) liegen diese beiden Zellen (ausgefüllte Pfeilspitzen) zusammen mit vier weiteren vom ZNS auswandernden ePGs (ausgefüllte Pfeile) distal des SNc vor. In *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten verbleibt der LGB häufig in der Peripherie, da Netrin als attraktiver Ligand für dessen initiale Migration fehlt. In den entsprechenden HS liegen die von dieser Vorläuferzelle gebildeten LGs ektopisch im PNS vor (ausgefüllter gebogener Pfeil), proliferieren aber grundsätzlich wildtypisch. Der gleiche LG-Phänotyp tritt auch in *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten auf, in denen der LGB aufgrund des abwesenden Rezeptors Fra nicht in der Lage ist, die richtungsgebende Netrinquelle zu detektieren. Zusätzlich zu den mispositionierten LGs kann in *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten beobachtet werden, dass die ePG6 und ePG8 nicht korrekt in die Peripherie auswandern, denn auch für deren Navigation ist von den ML-Zellen segregiertes Netrin, und zwar exklusiv NetB, erforderlich. Da NetB die Migration der ePG6 und ePG8 normalerweise steuert indem es durch Aktivierung des Rezeptors Unc5 eine repulsive Signalantwort hervorruft, ist der gleiche ePG-Phänotyp auch in *Unc5<sup>8</sup>*-Rezeptormutanten zu sehen.

\*\*\*\*\*

## 4 Diskussion:

Den Beginn der Gliogenese in *Drosophila* bildet die Determination des glialen Entwicklungsschicksals durch Expression des Schaltermens *gcm*. Gegenwärtig noch größtenteils unbekannt ist allerdings, durch welche Genprodukte die anschließende differentielle Spezifizierung der verschiedenen Subgruppen von Gliazellen kontrolliert wird. Für die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden ePGs beinhaltet eine derartige Spezifizierung unter anderem die Expression von Faktoren, durch die den Zellen (als Voraussetzung für eine korrekte Migration) die Kompetenz vermittelt wird, angemessen auf extrinsische Signale aus der Umgebung zu reagieren. Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Dissertation zeigen, dass die Migration der individuellen ePGs offensichtlich prädeterminiert ist, da sie ein stereotypes Wanderungsverhalten demonstrieren und am Ende der Embryogenese reproduzierbare Positionen entlang der peripheren Nerven einnehmen. Demnach bleibt zu klären, wie die differentielle Spezifizierung der einzelnen ePGs erfolgt und durch welche Mechanismen sie anschließend an ihren vorgesehenen Platz navigieren bzw. geleitet werden. Einen wichtigen Beitrag zur letztgenannten Problematik liefern die Resultate des zweiten Teils dieser Arbeit, die belegen, dass NetB durch Interaktion mit dem Rezeptor Unc5 die korrekte Wegfindung distinkter ePGs leitet. Demzufolge wird die Wanderung verschiedener (Gruppen von) ePGs durch unterschiedliche Signalmoleküle kontrolliert, bei denen es sich mitunter um identische Faktoren handelt, die auch die axonale Wanderung von Neuronen steuern.

### 4.1 ePGs besitzen individuelle Identitäten und ein prädeterminiertes Wanderungsverhalten

In mehreren vorausgegangenen Publikationen wird berichtet, dass die ePGs am Ende ihrer Wanderung relativ stereotype Positionen entlang der peripheren Nerven einnehmen (Sepp et al., 2000; Sepp et al., 2001; Sepp und Auld, 2003b; Pielage et al., 2004 und Übersichtsartikel Silies et al., 2007). Allerdings konnte bislang nicht vollends geklärt werden, ob die einzelnen ePGs individuelle Identitäten besitzen und

inwieweit diese womöglich mit zellspezifischen Positionierungen am Ende der Embryogenese einhergehen. Zurückzuführen ist dies insbesondere darauf, dass die meisten der entlang des ISN auswandernden Gliazellen aufgrund mangelnder Marker bisher nicht eindeutig voneinander unterschieden werden konnten. In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die ePGs in der Tat individuelle Identitäten besitzen und anhand einer spezifischen kombinatorischen Expression von Markergenen identifiziert werden können. Gegenwärtig sind lediglich die beiden vom NB2-5 abstammenden ePG6 und ePG8 nicht voneinander zu unterscheiden, da sie bislang eine identische Markerexpression (*cas-Gal4/mirr-lacZ*) aufweisen. Des Weiteren offenbarte die Migrationsanalyse, dass die individuellen ePGs einen stereotypen Wanderungsverlauf zeigen, stets mit einem bestimmten Nervenstrang assoziiert sind und am Ende der Embryogenese reproduzierbare Positionen einnehmen. Demzufolge ist ihre Migration weitestgehend prädestiniert und es stellt sich die Frage, durch welche Faktoren die individuellen Zellschicksale spezifiziert werden und inwieweit diese mit dem klonalem Ursprung der ePGs korrelieren. Das gliale Selektorgen *gcm* (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Vincent et al., 1996) und dessen direktes Zielgen *repo* (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995) spielen vermutlich keine Rolle für die Spezifizierung individueller Zellschicksale, denn beide Gene werden ubiquitär in sämtlichen ePGs exprimiert. Anders verhält es sich mit den im Ergebnisteil vorgestellten Markergenen, bei denen es sich überwiegend um Transkriptionsfaktoren handelt, die nur in distinkten ePGs gebildet und zudem meist schon exprimiert werden, bevor die entsprechenden ePGs mit ihrer Wanderung beginnen (Tab. 3-2). Für den molekularen Marker *lbe*, der exklusiv die vom NB5-6 abstammende ePG2 markiert (Abb. 3-3), konnten De Graeve und Kollegen (2004) bereits eine spezifizierende Funktion für die entsprechende Zelle nachweisen. In *lbe*-Mutanten fehlt die ePG2 häufig in der Peripherie und es können zusätzliche Gliazellen im Bauchmark beobachtet werden. Demgegenüber generiert der NB5-6 als Folge einer ektopischen *lbe*-Expression zusätzliche ePGs, die ihrem Entwicklungsschicksal entsprechend in den Exitbereich wandern. Da De Graeve und Kollegen spekulieren, dass das Homöoboxgen *lbe* nicht per se eine Generierung von Gliazellen induziert, sondern vielmehr als zellspezifische Determinante für die vom NB5-6 gebildeten Gliazellen fungiert. Ihre Ergebnisse liefern einen ersten Hinweis darauf, dass das Entwicklungsschicksal individueller ePGs mit ihrem klonalen Ursprung korreliert. Bekräftigt wird diese Annahme durch



die von mir nachgewiesene Funktion des molekularen Markers Cas bei der Spezifizierung der vom NB2-5 abstammenden ePG6 und ePG8. In *cas*-Mutanten fehlen diese beiden ePGs in der Peripherie und stattdessen liegen mehr Gliazellen an der lateralen Kante des Bauchmarks vor (Abb. 3-11). Somit werden die ePG6 und ePG8 offenbar auch in Abwesenheit von Cas zwar weiterhin als Gliazellen determiniert (zumindest exprimieren sie den glialen Marker Repo), verlieren aber die Fähigkeit ihrem wildtypischen Schicksal entsprechend in die Peripherie zu migrieren. Demzufolge wäre der Transkriptionsfaktor Cas nicht unbedingt erforderlich um ein gliales Entwicklungsschicksal zu induzieren, sondern fungiert (analog zu Lbe im Zellklon des NB5-6) als zellspezifische Determinante, die den beiden glialen Nachkommenzellen des NB2-5 das Potential zur Migration vermittelt. Aufgrund des nahezu identischen ePG-Phänotyps der *cas*<sup>iC2</sup>- und *Unc5*<sup>8</sup>-Mutanten, die jeweils einen spezifischen Migrationsdefekt der ePG6 und ePG8 aufweisen, ist es durchaus möglich, dass die Expression des Rezeptors Unc5 direkt oder indirekt durch Cas reguliert wird. Ein Beweis dieser Hypothese steht allerdings noch aus, sowie die Analyse weiterer der vorgestellten Markergene hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Spezifizierung distinkter ePGs.

Die (frühe) korrekte Spezifizierung der ePGs bildet die Basis für ihre anschließende Wanderung, denn durch sie wird gewährleistet, dass die individuellen ePGs adäquat auf extrinsische Signale aus ihrer Umgebung reagieren können. In diesem Kontext spielen unter anderem Neuron-Glia-Interaktionen eine Rolle, denn anhand neuronaler Ablationsexperimente konnte bereits demonstriert werden, dass periphere Nerven als Substrat für die korrekte ePG Migration fungieren (Sepp und Auld, 2003b). Dabei scheinen ePGs präferentiell entlang sensorischer Faszikel zu migrieren, was darauf hindeutet, dass diese Neurone womöglich spezifische Zelladhäsionsmoleküle exprimieren die Motorneuronen fehlen (Sepp et al., 2000; Sepp et al., 2001). Eine entsprechende Expression von spezifischen Zelladhäsionsmolekülen auf Seiten der ePGs könnte auch eine Erklärung dafür liefern, weshalb distinkte ePGs stets mit einem bestimmten Nervenstrang assoziiert sind. Bislang konnte allerdings keines dieser präsumptiven Adhäsionsmoleküle identifiziert werden. Im Unterschied zu Neuron-Glia-Interaktionen wird die Notwendigkeit von Glia-Glia-Interaktion im Zuge der ePG Migration durch die Ergebnisse der im Abschnitt 3.2.2 geschilderten Ablationsexperimente in Frage gestellt. In keinem der Experimente konnte als Folge der Eliminierung

unterschiedlicher Gruppen von ePGs eine beeinträchtigte Positionierung der noch verbliebenen Gliazellen am Ende der Embryogenese detektiert werden (siehe Abb.3-8). Indes demonstrieren die mittels Gal4 induzierten Ablationsexperimente der ePGs eindeutig deren Notwendigkeit für die korrekte Faszikulierung der peripheren Nervenstränge (Sepp et al., 2001). Dabei fällt insbesondere auf, dass der ISN und SN als Folge des vollständigen Verlustes der ePGs deutlich separiert voneinander vorliegen (Abb. 3-8 B` und C`). Normalerweise werden diese beiden Nervenstränge durch die im Exitbereich lokalisierten ePGs zunächst zusammengehalten und separieren sich dann stets auf Höhe der ePG5 voneinander (Abb. 3-5 D` und 3-6 B). Demzufolge ist es denkbar, dass die ePG5 für die wildtypische Auftrennung der beiden peripheren Nerven erforderlich ist. Widerlegt bzw. bestätigt werden könnte diese Theorie mittels früher, zellspezifischer Ablation der ePG5.

#### 4.2 Distinkte ePGs nutzen identische wegweisende Mechanismen wie Neurone

Bislang konnte demonstriert werden, dass die wildtypische Migration der ePGs zum einen von Faktoren abhängig ist, die an der Umstrukturierung des Zytoskeletts im Zuge der Zellwanderung beteiligt sind (Sepp und Auld, 2003a; Edenfeld et al., 2007) und außerdem durch mannigfache Neuron-Glia-Interaktionen kontrolliert wird (Sepp et al., 2000; Sepp et al., 2001; Sepp und Auld, 2003b; Pielage et al., 2004; Edenfeld et al., 2006). Ein Hauptziel meiner Untersuchungen bestand darin, weitere bzw. neuartige (molekulare) Mechanismen zu enthüllen, durch welche die Wanderung der ePGs während der Embryonalentwicklung gesteuert wird. Dazu habe ich unter anderem bekannte neuronale Wegweiser-moleküle hinsichtlich ihrer Beteiligung an der ePG Migration untersucht, denn für *Drosophila* konnte bereits gezeigt werden, dass derartige Signalmoleküle ebenfalls die Wanderung von Gliazellen beeinflussen (siehe Übersichtsartikel Cafferty und Auld, 2007). Beispielsweise exprimieren neben Interneuronen auch die Longitudinalen Glia (LGs) den Rezeptor Robo und werden infolgedessen durch den von ML-Zellen segregierten repulsiven Liganden Slit davon abgehalten, zu weit nach medial zu wandern (Kinrade et al., 2001). Des Weiteren konnten Freeman und Kollegen (2003) zeigen, dass einige der im Verlauf der Embryonalentwicklung nach lateral wandernden Gliazellen den Netrin-Rezeptor

Unc5 exprimieren und dass eine pan-gliale ektopische Expression von *Unc5* die wildtypische mediale Wanderung von Gliazellen im Bauchmark unterbindet. Mittels detaillierter Mutantanalysen und zellspezifischer „Rescue-Experimente“ konnte ich belegen, dass auch die wildtypische laterale Wanderung bestimmter ePGs durch eine Netrin-vermittelte Aktivierung des Rezeptors Unc5 kontrolliert wird. Dabei stellte sich heraus, dass speziell die beiden Tochterzellen des NB2-5, die ePG6 und ePG8, durch von der ML segregiertes NetB in die Peripherie geleitet werden, obgleich sämtliche vom ZNS auswandernden ePGs zumindest transient *Unc5* exprimieren. Der Nachweis, dass alle ePGs die *Unc5* exprimieren, den entsprechenden Rezeptor auch bilden und in ihre Zellmembran inkorporieren, steht allerdings noch aus. Womöglich bewirken post-transkriptionelle Regulationsmechanismen, dass die *Unc5* mRNA lediglich in der ePG6 und ePG8 translatiert wird.

Durch die in dieser Arbeit präsentierte Funktion von Netrin wird erstmalig ein Mechanismus vorgestellt, bei dem die Wanderung einer Subgruppe von ePGs durch ein segregiertes Signalmolekül geleitet wird. Prinzipiell stellt sich die Frage nach dem Grund, weshalb speziell die Navigation von ePG6 und ePG8 durch den NetB-Unc5-Signalweg erfolgt? Allgemein akzeptiert ist, dass neuronale Strukturen als Leitschienen für die ePG Wanderung fungieren (siehe Übersichtsartikel Cafferty und Auld, 2007) und auch die von mir durchgeführte Migrationsanalyse verdeutlicht, dass die ePGs in der Regel entlang distinkter peripherer Trakte migrieren. Die ePG6 und ePG8 bilden allerdings eine Ausnahme. Denn in den *in vivo* 4D-Aufnahmen kann deutlich beobachtet werden, dass sie etwas zeitverzögert nach dorsal migrieren und dabei über die bereits in der Peripherie vorliegenden Gliazellen hinweg wandern. Demzufolge sind sie nicht fortwährend mit Axonen assoziiert bzw. treten womöglich erst gar nicht mit ihnen in Kontakt. Daher ist es denkbar, dass Netrin speziell als wegweisender Faktor für die ePG6 und ePG8 fungiert, da diese beiden Zellen nicht durch Neuron-Glia-Interaktion geleitet werden (können).

#### 4.3 Wird die Wanderung der ePGs durch Pionier-Gliazellen geleitet?

Für die Population der entlang der Flügelvenen migrierenden PGs konnte experimentell belegt werden, dass sie durch Pionier-Gliazellen geleitet werden (Aigouy et al., 2004; Aigouy et al., 2008). Ob dergleichen auch für die Migration der

ePGs zutrifft, konnte bislang allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden. Gegenwärtige Spekulationen über derartig spezialisierte ePGs stützen sich insbesondere auf vorausgegangene Publikationen von Sepp und Kollegen, in denen zum einen berichtet wird, dass ePGs in scheinbar fixer Anordnung perlschnurartig aneinandergereiht nach dorsal auswandern (Sepp et al., 2000) und zum anderen gezeigt wird, dass diese Kolonne von ePGs durch Gliazellen angeführt wird, die auffällig viele Membranausläufer generieren und demzufolge als „Leading-Glia“ bezeichnet wurden (Sepp und Auld, 2003a). Indes liefern verschiedene Ergebnisse der vorliegenden Dissertation Anhaltspunkte dafür, dass die Migration der vom ZNS abstammenden ePGs nicht schlicht durch eine (oder mehrere) distal positionierte Pionier-Gliazellen kontrolliert wird. Vielmehr scheint es, als ob die Wanderung distinkter Gruppen von ePGs voneinander unabhängig verläuft und demzufolge durch unterschiedliche Mechanismen gesteuert wird. Für die Wanderung der ePG6 und ePG8, kann dies am deutlichsten belegt werden. Schon die *in vivo* Migrationsanalyse lässt ein von den übrigen ePGs unabhängiges Wanderungsverhalten dieser beiden Zellen erkennen, die keineswegs eine strikte Reihenfolge beibehalten. Zudem zeigen Ablationsexperimente, dass sich die ePG6 und ePG8 trotz des Verlustes anderer ePGs weitestgehend wildtypisch positionieren. Umgekehrt scheint ihre Ablation die Wanderung der verbliebenen ePGs nicht signifikant zu beeinflussen. Diese Beobachtungen, zusammen mit der Gegebenheit, dass speziell die ePG6 und ePG8 durch den Net-Unc5-vermittelten Signalweg geleitet werden, impliziert einen von den übrigen ePGs autarken Wegfindungsprozess dieser beiden Zellen, der offensichtlich keiner weiteren Pionier-Gliazelle bedarf. Dagegen ist es durchaus denkbar, dass die perlschnurartig entlang des ISN migrierenden ePG1,3 und 7, die ihre Reihenfolge im Verlauf der Wanderung nicht verändern, als Gruppe durch die stets an der Spitze dieser Zellkette liegende ePG9 geleitet werden. Ein eindeutiger Beweis dafür konnte allerdings anhand der durchgeführten Ablationsexperimente nicht erbracht werden. Zwar konnte die ePG9 mittels Laserbestrahlung eliminiert und in den entsprechenden Embryonen auch eine beeinträchtigte Migration der nachfolgenden ePGs beobachtet werden, aufgrund der ebenfalls geschädigten Nervenstränge ist es aber möglich, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt. Demgegenüber resultierte aus der UAS-*hid*-vermittelten Ablation der ePG9 mittels der Gal4-Linie Mz97 überhaupt keine signifikante Mispositionierung der noch verbliebenen ePGs. Möglicherweise ist dies

darauf zurückzuführen, dass in dem entsprechenden Versuch die Expression des proapoptotischen Gens durch Mz97-Gal4 zu spät initiiert wird (Mz97 treibt die Expression erst etwa ab St.13), um die Pionierfunktion der ePG9 effektiv zu unterbinden. Bislang ist jedoch keine andere Gal4-Linie bekannt, die bereits früher und im Idealfall zudem spezifisch in der ePG9 exprimiert wird.

Die bereits in der Peripherie entstehende ePG12 erscheint als Pionier-Glia für die vom ZNS auswandernden ePGs nicht geeignet, da sie in der frühen Phase der Migration augenscheinlich nicht im direkten Zellkontakt mit ihnen steht. Womöglich fungiert sie aber als Wegweiserzelle für die korrekte Etablierung des ISN, da dieser in der frühen Phase seiner Entwicklung stets hin zur ePG12 projiziert und etwa im frühen St.13 mit ihr zusammentrifft (Abb. 3-5 A). Eindeutig belegt werden kann dies, sowie auch die mögliche Existenz und Funktion von Pionier-Gliazellen für die ePG Wanderung, erst durch weitere frühe, zellspezifische Ablationsexperimente.

#### 4.4 Funktion der (e)PGs im Larvenstadium

Derzeit noch unbekannt ist das Schicksal individueller embryonaler PGs im Anschluss an die Embryonalentwicklung. Da die ePGs schon im späten Embryonalstadium die gliale Blut-Hirn-Schranke etablierten (Banerjee et al., 2006; Stork et al., 2008) ist anzunehmen, dass sie auch im weiteren Verlauf der Larvalentwicklung erhalten bleiben, um eine permanente Isolierung der peripheren Nervenstränge zu gewährleisten. Zumindest für eine Subgruppe der ePGs, die mittels des Gliotactin-Enhancer-Trap-Stammes J29 markiert wird (Auld et al., 1995), konnte dies bereits demonstriert werden (Sepp et al., 2000). Anhand der durchgeführten Markerfärbungen im späten Larvenstadium konnten bedauerlicherweise keine der embryonal gebildeten ePGs eindeutig identifiziert werden. Die analysierten Marker zeigten entweder ein vom Embryo signifikant abweichendes Expressionsmuster, oder wurden überhaupt nicht mehr in den PGs exprimiert.

Neben dem Verbleib individueller ePGs stellt sich insbesondere die Frage, welche Funktion(en) die von den verschiedenen NBs abstammenden ePGs in der Larve übernehmen. Grundsätzlich werden die peripheren Nerven von zwei distinkten Typen von Gliazellen umhüllt, den Perineurialen- und Subperineurialen-Gliazellen. Die Subperineurial-Glia sind untereinander durch „Septate Junctions“ verbunden und

bilden durch die daraus resultierende parazelluläre Barriere im Wesentlichen die gliale Blut-Hirn-Schranke; die Perineurial-Glia formen die äußere Gliaschicht (auch Perineurium genannt) und segregieren das Neurolemm (Auld et al., 1995; Carlson et al., 2000; Leiserson et al., 2000; Banerjee et al., 2006). Gegenwärtig ist nicht geklärt, aus welchen der ePGs diese beiden Gliaschichten hervorgehen. Widerlegt werden kann offensichtlich der von Edwards und Kollegen (1993) suggerierte mesodermale Ursprung des Perineuriums, denn sowohl die Perineuriale- als auch Subperineuriale-Gliaschicht umhüllt die peripheren Nerven bereits am Ende der Embryogenese (Stork et al., 2008) und die klonale Analyse belegt, dass sämtliche in diesem Stadium detektierbaren ePGs von neuroektodermalen Zellen abstammen (Schmidt et al., 1997, diese Arbeit). Einige meiner Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass der embryonale Ursprung des Perineuriums in den beiden Tochterzellen des NB2-5 liegt. Zum einen ist in den *in vivo* Aufnahmen zu sehen, dass die ePG6 und ePG8 über bereits in der Peripherie vorliegende ePGs hinwegwandern und zum anderen kann häufig beobachtet werden, wie Zellmembranausläufer dieser beiden ePGs andere Gliazellen in der Peripherie umschließen (Abb. 3-6 E). In der Publikation von Stork und Kollegen (2008) wird zusätzlich zu den Perineurial- und Subperineurial-Glia noch zwischen einer dritten, als „Wrapping-Glia“ bezeichneten Gruppe von PGs unterschieden, welche im Verlauf der Larvalentwicklung einzelne Axone umgeben. Diese Gruppe beinhaltet lediglich drei Gliazellen, die mittels *nervana2*-Gal4 markiert werden können (Sun et al., 1999; Stork et al., 2008). Auch deren embryonale Identität ist bislang ungewiss. Prinzipiell Aufschluss sowohl über den Verbleib als auch das Proliferationsverhalten der individuellen ePGs in der Larve könnten zukünftige Experimente liefern, in denen beispielsweise die Zellklone der ePG generierenden NBs in der Larve mittels der MARCM- Technik analysiert werden.

#### 4.5 Die wildtypische Wanderung der LGs wird durch den Net-Fra-Signalweg geleitet

Die Vorläuferzelle der LGs, der LGB, entsteht an der lateralen Kante des Neuroektoderms und wandert zunächst nach medial, wobei er sich bereits teilt und die ersten beiden LGs generiert (Jacobs et al., 1989; Schmidt et al., 1997). Bislang war nicht bekannt, durch welche Faktoren bzw. Mechanismen diese frühe Migration

geleitet wird. Die Ergebnisse der Mutantanalyse demonstrieren, dass Netrine in Interaktion mit dem Rezeptor Fra an der Wegleitung der LGs beteiligt sind. Schon im Ergebnisteil wurde die Vermutung geäußert, dass die Mispositionierung der LGs in betroffenen HS von *Netrin*- und *frazzled*-Mutanten auf eine beeinträchtigte (initiale) mediale Migration zurückzuführen ist. Genau genommen scheint es, als ob der LGB in den entsprechenden HS überhaupt nicht wandert und vielmehr an seinem Entstehungsort verbleibt, sich aber dennoch wildtypisch teilt. Aufgrund der im Verlauf der Embryonalentwicklung auftretenden, zum Teil drastischen morphogenetischen Bewegungen der Gewebe fällt es allerdings schwer eindeutig zu belegen, dass der LGB bzw. dessen Nachkommenzellen tatsächlich keine aktiven Bewegungen vollziehen. Gestützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass mispositionierten LGs in der Regel während der gesamten Embryogenese in der Nähe der ePG11 verbleiben, die ihrerseits nicht signifikant migriert und in deren direkter Nachbarschaft der LGB bereits aus dem lateralen Neuroektoderm delaminiert.

Gegenwärtig erscheint es am wahrscheinlichsten, dass Netrin als instruktives Signal für die mediale Wanderung der LGs fungiert und diese, ähnlich den kommissuralen Axonen (siehe Übersichtsartikel Killeen und Sybingco, 2008), durch ein Konzentrationsgefälle hin zur ventralen ML dirigiert. Dabei basiert die frühe mediale Navigation der LGs, im Unterschied zu den kommissuralen Axonen, offensichtlich nicht auf von ML-Zellen segregiertes Netrin. Vielmehr scheint eine zuvor noch nicht beschriebene, von Neuroektodermzellen und bereits delaminierten NBs bereitgestellte Netrinquelle erforderlich, die schon vor der ML-Expression medial des LGB detektiert werden kann (Abb. 3-22). Bestätigt wird dies durch den Phänotyp der *sim*<sup>2</sup>-Mutanten, die trotz des Verlustes der ventralen ML keine ektopischen LG-Cluster in der Peripherie aufweisen. Zudem zeigen die Ergebnisse der „Rescue-Experimente“, dass eine mittelliniengetriebene Expression von Netrin mittels *sim*-Gal4 lediglich ausreicht um die Mispositionierung der LGs vereinzelt zu „retten“, wohingegen die Verwendung der neuroektodermalen Treiberlinie *sca*-Gal4 den LG-Phänotyp signifikant „rettet“.

Neben dem Liganden Netrin ist auch der korrekte Zeitpunkt der Expression des Rezeptors Fra entscheidend für die wildtypische Wanderung der LGs. Nur die frühe gliaspezifische Expression von UAS-*fra* mittels *gcm*-Gal4 (nicht aber mittels *repo*-Gal4) ist in der Lage, eine Mispositionierung der LGs in *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutanten zu

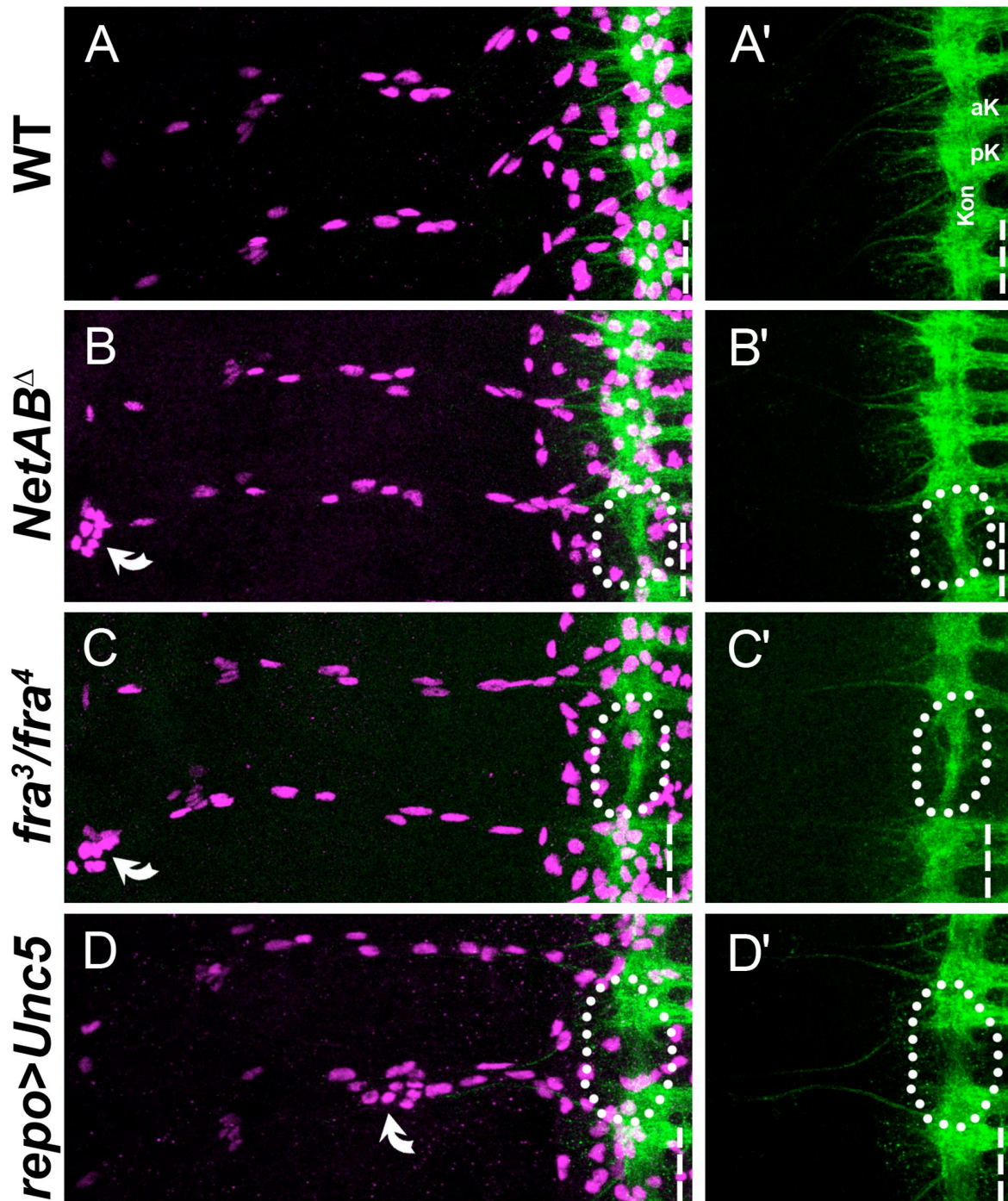
verhindern. Im WT wird die *fra*-Expression augenscheinlich bereits kurz nach der Delamination des LGB wieder herunterreguliert. Anschließend wird eine zu weite mediale Wanderung durch die Expression des Rezeptors Robo verhindert (Kinrade et al., 2001). Dementsprechend wird der LGB bzw. seine Nachkommenzellen wie auch kommissurale und longitudinale Axone durch verschiedene aufeinander abgestimmte Signalwege geleitet. Die Möglichkeit, dass dabei zum Teil redundante Mechanismen involviert sind, könnte die Erklärung dafür liefern, weshalb nicht die LGs sämtlicher HS in *NetAB<sup>Δ</sup>* und *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten gleichermaßen betroffen sind. Eine voneinander unabhängige Beteiligung von Fra und Netrin an der Navigation der LGs kann allerdings ausgeschlossen werden, da in *NetAB<sup>Δ</sup>*-, *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Dreifachmutanten kein synergistischer Effekt (d.h. mehr HS mit ektopisch positionierten LGs) beobachtet werden konnte (nicht gezeigt). Demzufolge agiert Netrin in Interaktion mit dem Rezeptor Fra in derselben Signaltransduktionskaskade für die Wegleitung der LGs.

#### 4.6 Für die Generierung des vollständigen LGB-Zellklons ist keine Interaktion mit longitudinalen Axonen erforderlich

Neben der Wanderung der LGs ist auch deren Teilungsmodus und ihre Interaktion mit Axonen des ZNS im Zuge der Embryonalentwicklung Gegenstand zahlreicher Publikationen (Jacobs und Goodman, 1989; Griffiths und Hidalgo, 2004; Griffiths et al., 2007 und Übersichtsartikel Stacey et al., 2007). Einige Ergebnisse in diesen Arbeiten demonstrieren, dass reziproke Interaktionen zwischen LGs und den longitudinalen Axonen sowohl das Überleben, die exakte Wegfindung und Faszikulierung der longitudinal projizierenden Axone auf der einen Seite, als auch das Proliferationsverhalten der LGs auf der anderen Seite beeinflussen (Hidalgo et al., 1995; Hidalgo und Booth, 2000 und Übersichtsartikel Auld, 1999; Chotard und Salecker, 2004; Parker und Auld, 2004). Mit dem letztgenannten Punkt nicht vollständig kongruent sind allerdings einige Ergebnisse, die anhand von *NetAB<sup>Δ</sup>*- und *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten gewonnen werden konnten. Es zeigte sich, dass die Gesamtzahl der LGs in beiden Mutanten grundsätzlich nicht vom WT abweicht und dass selbst der ektopisch positionierte LGB vornehmlich die wildtypische Anzahl von neun LGs generiert, von denen auch weiterhin durchschnittlich sechs Zellen Prospero



exprimieren. Demzufolge ist für die wildtypische Proliferation der LGs ein direkter Kontakt mit Neuronen nicht zwingend erforderlich, denn mispositionierte LGs sind offensichtlich nicht mit Axonen (weder mit sensorischen noch mit motorischen) assoziiert. Bestätigt werden kann hingegen der vorausgegangene Befund, dass für die korrekte Navigation und Faszikulierung der longitudinalen Axone zumindest einige wildtypisch positionierte LGs notwendig sind (Hidalgo et al., 1995). So erscheinen die longitudinalen Trakte (Konnektive) in HS mit ektopisch in der Peripherie vorliegenden LGs stets schmaler oder weisen gar Brüche auf und zeigen abnormale Projektionen und Faszikulationsdefekte (Abb. 3-17 B, gepunktete Kreise und Abb. 4-1 B-D'). Diese neuronalen Phänotypen wurden bereits zuvor für *NetAB<sup>Δ</sup>*- und *frazzled*-Mutanten beschrieben, allerdings ohne sie mit einem Verlust von Gliazellen in Verbindung zu bringen (Harris et al., 1996; Kolodziej et al., 1996; Mitchell et al., 1996). Dieselben neuronalen Defekte können ebenfalls durch pangliale ektopische Expression von *Unc5* induziert werden, und zwar in HS in denen sich die Lage zahlreicher LGs als Folge der Überexpression von *Unc5* nach lateral verschiebt (Abb. 4-1 D und D'). In seltenen Fällen kann beobachtet werden, dass die longitudinalen Trakte trotz mispositionierter LGs keine signifikanten Schäden aufweisen. In den entsprechenden HS verteilen sich die verbliebenen LGs (gegebenenfalls die der benachbarten HS) weiträumiger, was augenscheinlich ausreicht, um den Mangel an LGs zu kompensieren (nicht gezeigt). Nichtsdestoweniger resultiert aus den voraus genannten Ergebnissen, dass es sich bei den in *NetAB<sup>Δ</sup>*- und *frazzled*-Mutanten auftretenden neuronalen Phänotypen zumindest partiell um sekundäre Effekte handelt, die auf den Verlust der LGs zurückzuführen sind.



**Abb. 4-1: Der Verlust der LGs resultiert in axonalen Defekten der Konnektive**

Dargestellt sind Filetpräparate abdominaler HS von wildtypischen (A, A'), *NetAB*<sup>Δ</sup>- (B, B'), *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>- und *repo>Unc5*-Embryonen des St.16, gefärbt gegen Repo (magenta) und BP102 (grün) um die axonalen Strukturen des ZNS zu visualisieren. In allen Bildern ist anterior oben und dorsal links. Die ML wird durch eine gestrichelte Linie angedeutet.

(A, A') Wildtypische Morphologie der normalerweise von LGs bedeckten longitudinalen Trakte (Konnektive). (B-C') Im Bauchmark von *NetAB*<sup>Δ</sup>- und *fra*<sup>3</sup>/*fra*<sup>4</sup>-Mutante können zum Teil dramatische Defekte der Konnektive (gepunktete Kreise) in HS beobachtet werden, in denen die LGs ektopisch in der Peripherie vorliegen (ausgefüllte gebogene Pfeile). (D, D') Eine ektopische Positionierung der LGs (ausgefüllter gebogener Pfeil) kann auch durch die pan-gliale Expression von *Unc5* induziert werden. Als Folge der Mispositionierung zahlreicher LGs eines HS können ebenfalls Aberrationen der Konnektive beobachtet werden (gepunkteter Kreis). aK = anteriore Kommissur, pK = posteriore Kommissur, Kon = Konnektiv. Erläuterungen siehe Text

## 4.7 Selektivität des Netrin-vermittelten Signalweges

Die Analyse der *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten offenbarte einen Migrationsdefekt zweier distinkter Populationen von Gliazellen, den LGs und ePGs. Allerdings zeigen *Netrin*-Einzelmutanten und auch die beiden Rezeptor-Mutanten unterschiedliche Phänotypen. In *NetB<sup>Δ</sup>*- und *Unc5<sup>8</sup>*-Mutanten kann eine beeinträchtigte Wanderung der ePG6 und ePG8 beobachtet werden, wohingegen *NetA<sup>Δ</sup>* und *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten mispositionierte LGs aufweisen. Dabei ist sowohl das Fehlen ektopischer LGs in *NetB<sup>Δ</sup>*-Mutanten als auch deren Beschränkung auf die posterioren Segmente A5-A8 in *NetA<sup>Δ</sup>*-Mutanten allem Anschein nach auf die frühe differentielle Expression der beiden Liganden zurückzuführen (Abb. 3-22 G-H``). Demnach werden die LGs in *NetB<sup>Δ</sup>*-Mutanten durch weiterhin vorhandenes NetA korrekt nach medial geleitet. Ebenso wird der Verlust von NetA in *NetA<sup>Δ</sup>*-Mutanten durch NetB kompensiert, allerdings ist dies in den posterioren HS nicht gänzlich möglich, da hier NetB deutlich schwächer exprimiert wird (Abb. 3-22 H``). Dass die beiden Netrine grundsätzlich redundante Funktionen im Zuge der LG Wegleitung übernehmen (können), wird anhand der durchgeführten „Rescue-Experimente“ belegt. Denn die Mispositionierung der LGs in *NetAB<sup>Δ</sup>*-Mutanten kann mittels einer *sca*-Gal4 getriebenen Expression von UAS-*NetA* und UAS-*NetB* gleichermaßen „gerettet“ werden. Anders verhält es sich bei der ebenfalls durch Netrin geleiteten Wanderung der ePG6 und ePG8. Obgleich beide Netrine von Zellen der ML segregiert werden, scheint lediglich NetB als repulsives Signal für die Migration dieser beiden ePGs zu fungieren. Entsprechende Hinweise auf eine nicht-redundante Wirkung der Netrine existieren auch für *Unc5*-exprimierende Motorneurone des SN (Mitchell et al., 1996; Winberg et al., 1998). Über die Art und Weise einer möglichen differentiellen Aktivierung des Rezeptors *Unc5* durch die beiden Netrine ist gegenwärtig allerdings nichts bekannt.

Ein weiteres interessantes Ergebnis resultiert aus Beobachtungen der Kontrollversuche, welche für die „Rescue-Experimente“ in *Unc5<sup>8</sup>*- und *fra<sup>3</sup>/fra<sup>4</sup>*-Mutanten durchgeführt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass eine gliaspezifische Expression von UAS-*fra* im ansonsten wildtypischen Hintergrund die Anordnung der Gliazellen weder im ZNS noch im PNS beeinträchtigt. Da der Rezeptor *Unc5* unter diesen Versuchsbedingungen weiterhin nativ exprimiert wird, werden die ePG6 und ePG8 unverändert in die Peripherie geleitet. Im Unterschied dazu bewirkt die pan-

gliale Expression von UAS-*Unc5* eine Verschiebung der LGs, die folglich weiter lateral im Bauchmark zu liegen kommen (siehe dazu auch Freeman und Kollegen 2003). In einigen HS verlassen LGs sogar gänzlich das ZNS und liegen im PNS meist entlang des SN vor (Abb. 3-24 C, E und 4-1 D). Alle anderen Gliazellen, selbst die nächst zur Netrin segregierenden ML lokalisierten, sind hingegen wildtypisch positioniert. Demnach stellt sich die Frage, weshalb bestimmte Gliazellen auf das Signalmolekül Netrin reagieren und andere nicht. Vermutlich ist diese differentielle Kompetenz bestimmter Zellen darauf zurückzuführen, dass neben dem Rezeptor, der lediglich als Empfänger fungiert, weitere „downstream“ Effektormoleküle für die korrekte Transduktion und Integration des Netrin-vermittelten Signals erforderlich sind. Einige dieser Effektormoleküle konnten bereits identifiziert werden, allerdings ist über die Mechanismen der dem Rezeptor nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden meist nur wenig bekannt. Für Vertebraten und Invertebraten konnte gezeigt werden, dass verschiedener Tyrosinkinasen sowohl die Aktivität von *Unc5* als auch des Rezeptors *Fra/DCC* durch Phosphorylierung regulieren (Li et al., 2004; Li et al., 2006; Lucanic et al., 2006). Ferner konnte für *Drosophila* eine Interaktion zwischen dem Rezeptor *Fra* und dem „guanine exchange factor“ (GEF) *Trio* belegt werden, welcher seinerseits durch die „Abelson tyrosin kinase“ (*Abl*) phosphoryliert wird (Forsthoefel et al., 2005). Weitere „downstream“ Faktoren von *Fra*, darunter Rezeptor und Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen, SH3/SH2 Adapterproteine, GTPasen und N-WASP konnten im Rahmen einer *in vitro* Studie an kultivierten kommissuralen Axonen aus Ratten ermittelt werden (Shekarabi et al., 2005). Eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Mutantanalyse der entsprechenden Homologen in *Drosophila*, darunter *Abl*, das SH3/SH2 Adapterprotein *Dreadlock* (*Dock*), *Downstream of receptor kinase*“ (*Drk*), *Myoblast city* (*Mbc*), *Enabled* (*Ena*), *Trio* und die GTPasen *Rac1*, *Rac2* und *Rho* lieferte indes keinen Anhaltspunkt dafür, dass einer dieser Faktoren auch für die *Fra*-vermittelte Wanderung der LGs notwendig ist, da in keinem der analysierten Embryonen ektopische LGs beobachtet werden konnten (pers. Anmerkung von B. Altenhein und J. Dietrich). Noch vor einer möglichen Signalmodifikation durch die dem Rezeptor nach geschaltete(n) Signaltransduktionskaskade(n) ist zudem eine Regulation auf Rezeptorebene denkbar. Posttranskriptionelle Kontrollmechanismen können beispielsweise dafür sorgen, dass ein zunächst gebildeter Rezeptor proteolytisch inaktiviert und womöglich erst gar nicht in die Zellmembran inkorporiert wird.

Zumindest für den Netrinrezeptor DCC in Vertebraten konnte ein entsprechender Metalloprotease-vermittelter proteolytischer Abbau *in vitro* nachgewiesen werden (Galko und Tessier-Lavigne, 2000).

In Vertebraten wurde die Funktion von Netrin (und deren Effektormoleküle) zwar vornehmlich anhand kultivierter Neurone studiert, es existieren aber auch Berichte über Netrin-vermittelte Signalwege, die eine Rolle für die Entwicklung von Gliazellen spielen. Im Hinblick auf die Erkenntnisse dieser Dissertation sei insbesondere ihre Beteiligung an der Migration der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu nennen (Jarjour et al., 2003; Tsai et al., 2003). Interessanterweise fungiert Netrin in Interaktion mit dem Rezeptor Fra in diesem Kontext als repulsives Signal. Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass Netrin im Zuge der frühen Phase der Myelinisierung für die Generierung von Membranausläufern (Rajasekharan et al., 2009) und ferner für die Aufrechterhaltung der paranodalen Verbindungen zwischen Oligodendrozyten und Axonen im voll entwickelten ZNS erforderlich ist (Jarjour et al., 2008). Prinzipiell wird postuliert, dass es sich bei den LGs der Fliege und den Oligodendrozyten in Vertebraten um analoge (oder gar homologe) Zelltypen handelt. Einen weiteren Hinweis dafür liefert die Beobachtung, dass offensichtlich die Vorläuferzellen beider Zelltypen durch Netrin in Interaktion mit dem Rezeptor Fra/DCC geleitet werden. Des Weiteren konnte für Vertebraten gezeigt werden, dass Netrin-1 in Interaktion mit dem Rezeptor Unc5b die Proliferation der Schwannschen Zellen reguliert (Lee et al., 2007). Den analogen Zelltyp in *Drosophila* bilden die PGs. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass durch den NetB-Unc5-Signalweg die Migration distinkter ePGs während der Embryogenese gesteuert wird. Eine Auswirkung auf deren Proliferation konnte im Embryo allerdings nicht beobachtet werden. Da sich die PGs jedoch insbesondere im Verlauf der Larvalentwicklung vervielfachen (siehe dazu Kap. 3.3), sollte durch zukünftigen Experimente überprüft werden, ob Netrin bzw. der Rezeptor Unc5 womöglich im Zuge dieser späten Proliferationsphase eine Rolle spielen.

## **5 Zusammenfassung und Ausblick:**

Einen wichtigen Differenzierungsschritt im Verlauf der Gliogenese von *Drosophila* bildet die korrekte Migration, da grundsätzlich alle embryonal gebildeten Gliazellen mehr oder weniger weite Wegstrecken zurücklegen. Insbesondere die embryonalen Peripheren Glia (ePGs) wandern über teilweise enorme Distanzen entlang der peripheren Nerven, ein Prozess der präzise kontrolliert werden muss, um beispielsweise die vollständige Umhüllung der axonalen Strukturen und somit letzten Endes die Funktionalität des Nervensystems zu garantieren.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, neue Faktoren bzw. Mechanismen aufzudecken, durch welche die Migration der ePGs reguliert wird. Dazu habe ich zunächst den wildtypischen Verlauf ihrer Wanderung detailliert analysiert und konnte erstmalig zeigen, dass in jedem abdominalen Hemisegment eine invariante Anzahl von 12 ePGs von distinkten neuronalen Vorläuferzellen generiert wird, die individuelle Identitäten besitzen und mittels molekularer Marker auf Einzelzellebene identifiziert werden können. Basierend auf der charakteristischen Lage der Zellen erfolgte die Etablierung einer neuen, konsistenten Nomenklatur für sämtliche ePGs. Darüber hinaus offenbarten die *in vivo* Migrationsanalysen, dass die Wanderung individueller ePGs erstaunlich stereotyp verläuft und demzufolge weitestgehend prädeterminiert ist. Die genaue Kenntnis der wildtypischen ePG Migration auf Einzelzellebene diente anschließend als Grundlage für detaillierte Mutantanalysen. Anhand derer konnte ich für den ebenfalls als molekularen Marker verwendeten Transkriptionsfaktor Castor eine Funktion als zellspezifische Determinante für die korrekte Spezifizierung der ePG6 und ePG8 nachweisen, dessen Verlust in einem signifikantem Migrationsdefekt dieser beiden ePGs resultiert. Des Weiteren konnte mit Netrin (NetB) der erste diffusible und richtungsgebende Faktor für die Migration der ePGs enthüllt werden, der in Interaktion mit dem Rezeptor Unc5 speziell die Wanderung der ePG6 und ePG8 leitet. Die von den übrigen Gliazellen unabhängige Navigation der ePG6 und ePG8 belegt, dass zumindest die Migration von Gruppen der ePGs durch unterschiedliche Mechanismen kontrolliert wird, was durch die Resultate der durchgeführten Ablationsexperimente bestätigt wird.

Ferner konnte ich zeigen, dass während der frühen Gliogenese eine zuvor unbekannte, von Neuroblasten bereitgestellte Netrinquelle an der initialen

Wegfindung der Longitudinalen Gliazellen (eine Population Neuropil-assoziiertes Gliazellen im ZNS) beteiligt ist. In diesem Kontext erfolgt die Signaldetektion bereits in deren Vorläuferzelle, dem Longitudinalen Glioblasten, zellautonom über den Rezeptor Fra.

Für künftige Mutantenscreens zur Identifizierung weiterer an der Migration der ePGs beteiligter Faktoren stellt die in dieser Arbeit präsentierte detaillierte Beschreibung eine wichtige Grundlage dar. Speziell in Kombination mit den vorgestellten molekularen Markern liefert sie die Voraussetzung dafür, individuelle ePGs auch im mutanten Hintergrund zu erfassen, wodurch selbst subtile Phänotypen überhaupt erst detektiert und auf Einzelzelebene analysiert werden können. Aufgrund der aufgezeigten voneinander unabhängigen Wegfindung, erscheinen Mutantenscreens ohne derartige Möglichkeiten wenig erfolgversprechend, da Mutationen vermutlich mehrheitlich die Migration einzelner oder weniger ePGs beeinträchtigen. Letzten Endes wird somit die Aussicht verbessert, weitere neuartige Migrationsfaktoren im Modellorganismus *Drosophila* zu entschlüsseln, die gegebenenfalls bis hin zu höheren Organismen konserviert sind und folglich zum Verständnis der Gliazellwanderung in Vertebraten beitragen.

## 6 Literaturverzeichnis:

**Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.

**Aigouy, B., Lepelletier, L. und Giangrande, A.** (2008). Glial chain migration requires pioneer cells. *J Neurosci* **28**, 11635-11641.

**Aigouy, B., Van de Bor, V., Boeglin, M. und Giangrande, A.** (2004). Time-lapse and cell ablation reveal the role of cell interactions in fly glia migration and proliferation. *Development* **131**, 5127-5138.

**Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D. und Technau, G. M.** (2006). Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Biol* **296**, 545-560.

**Arendt, D. und Nubler-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. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 427-452.

**Auld, V.** (1999). Glia as mediators of growth cone guidance: studies from insect nervous systems. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1377-1385.

**Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K. und Goodman, C. S.** (1995). Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*. *Cell* **81**, 757-767.

**Bainton, R. J., Tsai, L. T., Schwabe, T., DeSalvo, M., Gaul, U. und Heberlein, U.** (2005). moody encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*. *Cell* **123**, 145-156.

**Banerjee, S., Pillai, A. M., Paik, R., Li, J. und Bhat, M. A.** (2006). Axonal ensheathment and septate junction formation in the peripheral nervous system of *Drosophila*. *J Neurosci* **26**, 3319-3329.

**Barolo, S., Carver, L. A. und Posakony, J. W.** (2000). GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques* **29**, 726, 728, 730, 732.

**Beckervordersandforth, R. M., Rickert, C., Altenhein, B. und Technau, G. M.** (2008). Subtypes of glial cells in the *Drosophila* embryonic ventral nerve cord as related to lineage and gene expression. *Mech Dev* **125**, 542-557.

**Bhat, K. M.** (2005). Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-Frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics* **170**, 149-159.



- Bieber, A. J., Snow, P. M., Hortsch, M., Patel, N. H., Jacobs, J. R., Traquina, Z. R., Schilling, J. und Goodman, C. S.** (1989). Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* **59**, 447-460.
- Birling, M. C. und Price, J.** (1995). Influence of growth factors on neuronal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 878-884.
- Bodmer, R. und Jan, Y. N.** (1987). Morphological differentiation of the embryonic peripheral neurons in Drosophila. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**, 69-77.
- Bodmer, R., Carretto, R. und Jan, Y. N.** (1989). Neurogenesis of the peripheral nervous system in Drosophila embryos: DNA replication patterns and cell lineages. *Neuron* **3**, 21-32.
- Bogdan, S., Grewe, O., Strunk, M., Mertens, A. und Klämbt, C.** (2004). Sra-1 interacts with Kette and Wasp and is required for neuronal and bristle development in Drosophila. *Development* **131**, 3981-3989.
- Bossing, T. und Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in Drosophila as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* **120**, 1895-1906.
- 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.
- Bourouis, M., Heitzler, P., el Messal, M. und Simpson, P.** (1989). Mutant Drosophila embryos in which all cells adopt a neural fate. *Nature* **341**, 442-444.
- 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.
- Brankatschk, M. und Dickson, B. J.** (2006). Netrins guide Drosophila commissural axons at short range. *Nat Neurosci* **9**, 188-194.
- Broadus, J. und Doe, C. Q.** (1995). Evolution of neuroblast identity: seven-up and prospero expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in Drosophila and Schistocerca. *Development* **121**, 3989-3996.
- 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.
- Brody, T. und Odenwald, W. F.** (2002). Cellular diversity in the developing nervous system: a temporal view from Drosophila. *Development* **129**, 3763-3770
- Cafferty, P. und Auld, V. J.** (2007). No pun intended: future directions in invertebrate glial cell migration studies. *Neuron Glia Biol* **3**, 45-54.

- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V.** (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. 2nd ed. New York, Heidelberg, Berlin, Springer Verlag.
- Campuzano, S. und Modolell, J.** (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* **8**, 202-208.
- Cantera, R., Luer, K., Rusten, T. E., Barrio, R., Kafatos, F. C. und Technau, G. M.** (2002). Mutations in *spalt* cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **129**, 5577-5586.
- Carlson, S. D., Hilgers, S. L. und Juang, J. L.** (1997). First developmental signs of the scolopale (glial) cell and neuron comprising the chordotonal organ in the *Drosophila* embryo. *Glia* **19**, 269-274.
- Carlson, S. D., Juang, J. L., Hilgers, S. L. und Garment, M. B.** (2000). Blood barriers of the insect. *Annu Rev Entomol* **45**, 151-174.
- Chan, S. S., Zheng, H., Su, M. W., Wilk, R., Killeen, M. T., Hedgecock, E. M. und Culotti, J. G.** (1996). UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* **87**, 187-195.
- Chilton, J. K.** (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* **292**, 13-24.
- Chotard, C. und Salecker, I.** (2004). Neurons and glia: team players in axon guidance. *Trends Neurosci* **27**, 655-661.
- 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.
- Dickson, B. J.** (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-1964.
- 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., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M. und Scott, M. P.** (1991). The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* **65**, 451-464.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. und Kirschner, M. W.** (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-793.

**Edenfeld, G., Altenhein, B., Zierau, A., Cleppien, D., Krukkert, K., Technau, G. und Klämbt, C.** (2007). Notch and Numb are required for normal migration of peripheral glia in *Drosophila*. *Dev Biol* **301**, 27-37.

**Edenfeld, G., Volohonsky, G., Krukkert, K., Naffin, E., Lammel, U., Grimm, A., Engelen, D., Reuveny, A., Volk, T. und Klämbt, C.** (2006). The splicing factor crooked neck associates with the RNA-binding protein HOW to control glial cell maturation in *Drosophila*. *Neuron* **52**, 969-980.

**Edwards, J. S., Swales, L. S. und Bate, M.** (1993). The differentiation between neuroglia and connective tissue sheath in insect ganglia revisited: the neural lamella and perineurial sheath cells are absent in a mesodermless mutant in *Drosophila*. *Journal of Comparative Neurology* **333**, 301-308

**Forsthoefel, D. J., Liebl, E. C., Kolodziej, P. A. und Seeger, M. A.** (2005). The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in *Drosophila*. *Development* **132**, 1983-1994.

**Fredieu, J. R. und Mahowald, A. P.** (1989). Glial interactions with neurons during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **106**, 739-748.

**Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E. und Doe, C. Q.** (2003). Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**, 567-580.

**Galko, M. J. und Tessier-Lavigne, M.** (2000). Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* **289**, 1365-1367.

**Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., Aceves, E., Jan, L.-Y. und Jan, Y.-N.** (1986). Sensory neurons and peripheral pathways in *Drosophila* embryos. *Roux's Arch Dev Biol* **195**, 281-289.

**Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. und Klämbt, C.** (1997). Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. *Development* **124**, 2307-2316.

**Gilbert, M., Smith, J., Roskams, A. J. und Auld, V. J.** (2001). Neuroligin 3 is a vertebrate gliotactin expressed in the olfactory ensheathing glia, a growth-promoting class of macroglia. *Glia* **34**, 151-164.

**Gorczyca, M. G., Phillis, R. W. und Budnik, V.** (1994). The role of tinman, a mesodermal cell fate gene, in axon pathfinding during the development of the transverse nerve in *Drosophila*. *Development* **120**, 2143-2152.

**Griffiths, R. C., Benito-Sipos, J., Fenton, J. C., Torroja, L. und Hidalgo, A.** (2007). Two distinct mechanisms segregate Prospero in the longitudinal glia underlying the timing of interactions with axons. *Neuron Glia Biol* **3**, 75-88.

**Griffiths, R. L. und Hidalgo, A.** (2004). Prospero maintains the mitotic potential of glial precursors enabling them to respond to neurons. *Embo J* **23**, 2440-2450.

- Grunwald, I. C. und Klein, R.** (2002). Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 250-259.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. und Technau, G. M.** (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317-332.
- Harris, R., Sabatelli, L. M. und Seeger, M. A.** (1996). Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* **17**, 217-228.
- Hidalgo, A. und Booth, G. E.** (2000). Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **127**, 393-402.
- Hidalgo, A. und Griffiths, R.** (2004). Coupling glial numbers and axonal patterns. *Cell Cycle* **3**, 1118-1120.
- Hidalgo, A., Urban, J. und Brand, A. H.** (1995). Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the *Drosophila* CNS. *Development* **121**, 3703-3712.
- Hidalgo, A., Kinrade, E. F. und Georgiou, M.** (2001). The *Drosophila* neuregulin vein maintains glial survival during axon guidance in the CNS. *Dev Cell* **1**, 679-690.
- Hitier, R., Chaminade, M. und Preat, T.** (2001). The *Drosophila* *castor* gene is involved in postembryonic brain development. *Mech Dev* **103**, 3-11.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. und Hotta, Y.** (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* **82**, 1025-1036.
- Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D. und Cloutier, J. F.** (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* **26**, 509-563.
- Hudson, A. M. und Cooley, L.** (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **156**, 677-687.
- Hummel, T., Leifker, K. und Klämbt, C.** (2000). The *Drosophila* HEM-2/NAP1 homolog *KETTE* controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization. *Genes Dev* **14**, 863-873.
- Ito, K., Urban, J. und Technau, G.** (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.
- Jacobs, J. R.** (2000). The midline glia of *Drosophila*: a molecular genetic model for the developmental functions of glia. *Prog Neurobiol* **62**, 475-508.

- Jacobs, J. R. und Goodman, C. S.** (1989). Embryonic development of axon pathways in the Drosophila CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J Neurosci* **9**, 2402-2411.
- Jacobs, J. R., Hiromi, Y., Patel, N. H. und Goodman, C. S.** (1989). Lineage, migration, and morphogenesis of longitudinal glia in the Drosophila CNS as revealed by a molecular lineage marker. *Neuron* **2**, 1625-1631.
- Jagla, K., Frasch, M., Jagla, T., Dretzen, G., Bellard, F. und Bellard, M.** (1997). ladybird, a new component of the cardiogenic pathway in Drosophila required for diversification of heart precursors. *Development* **124**, 3471-3479.
- Jarjour, A. A., Manitt, C., Moore, S. W., Thompson, K. M., Yuh, S. J. und Kennedy, T. E.** (2003). Netrin-1 is a chemorepellent for oligodendrocyte precursor cells in the embryonic spinal cord. *J Neurosci* **23**, 3735-3744.
- Jarjour, A. A., Bull, S. J., Almasieh, M., Rajasekharan, S., Baker, K. A., Mui, J., Antel, J. P., Di Polo, A. und Kennedy, T. E.** (2008). Maintenance of axo-oligodendroglial paranodal junctions requires DCC and netrin-1. *J Neurosci* **28**, 11003-11014.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. und Goodman, C. S.** (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**, 1013-1023.
- Jürgens, G.** (1988). Head and tail development of the Drosophila embryo involves spalt, a novel homeotic gene. *Embo J* **7**, 189-196.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M.** (2000). Principles of neural science, 4th ed. New York: McGraw-Hill.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S., Culotti, J. G. und Tessier-Lavigne, M.** (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87**, 175-185.
- Keleman, K. und Dickson, B. J.** (2001). Short- and long-range repulsion by the Drosophila Unc5 netrin receptor. *Neuron* **32**, 605-617.
- Killeen, M. T. und Sybingco, S. S.** (2008). Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev Biol* **323**, 143-151.
- Kinrade, E. F., Brates, T., Tear, G. und Hidalgo, A.** (2001). Roundabout signalling, cell contact and trophic support confine longitudinal glia and axons in the Drosophila CNS. *Development* **128**, 207-216.
- 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.
- Klämbt, C. und Goodman, C. S.** (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the Drosophila embryo. *Glia* **4**, 205-213.

- Klämbt, C., Jacobs, J. R. und Goodman, C. S.** (1991). The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* **64**, 801-815.
- Kolesnikov, T. und Beckendorf, S. K.** (2005). NETRIN and SLIT guide salivary gland migration. *Dev Biol* **284**, 102-111.
- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1996). frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87**, 197-204.
- Kurant, E., Axelrod, S., Leaman, D. und Gaul, U.** (2008). Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. *Cell* **133**, 498-509.
- Labrador, J. P., O'Keefe, D., Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Thomas, J. B. und Bashaw, G. J.** (2005). The homeobox transcription factor even-skipped regulates netrin-receptor expression to control dorsal motor-axon projections in *Drosophila*. *Curr Biol* **15**, 1413-1419.
- Lee, H. K., Seo, I. A., Seo, E., Seo, S. Y., Lee, H. J. und Park, H. T.** (2007). Netrin-1 induces proliferation of Schwann cells through Unc5b receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 1057-1062.
- Lehmann, R., Dietrich, U., Jiminez, F. und Campos-Ortega, J. A.** (1981). Mutations of early neurogenesis in *Drosophila*. *Roux's Arch.Dev.Biol.* **190**, 226-229.
- Leiserson, W. M., Harkins, E. W. und Keshishian, H.** (2000). Fray, a *Drosophila* serine/threonine kinase homologous to mammalian PASK, is required for axonal ensheathment. *Neuron* **28**, 793-806.
- Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S. L. und Tessier-Lavigne, M.** (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* **386**, 833-838.
- Leung-Hagesteijn, C., Spence, A. M., Stern, B. D., Zhou, Y., Su, M. W., Hedgecock, E. M. und Culotti, J. G.** (1992). UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* **71**, 289-299.
- Li, W., Aurandt, J., Jurgensen, C., Rao, Y. und Guan, K. L.** (2006). FAK and Src kinases are required for netrin-induced tyrosine phosphorylation of UNC5. *J Cell Sci* **119**, 47-55.
- Li, W., Lee, J., Vikis, H. G., Lee, S. H., Liu, G., Aurandt, J., Shen, T. L., Fearon, E. R., Guan, J. L., Han, M. et al.** (2004). Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci* **7**, 1213-1221.
- Lucanic, M., Kiley, M., Ashcroft, N., L'Etoile, N. und Cheng, H. J.** (2006). The *Caenorhabditis elegans* P21-activated kinases are differentially required for UNC-6/netrin-mediated commissural motor axon guidance. *Development* **133**, 4549-4559.

**Machesky, L. M. und Gould, K. L.** (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 117-121.

**Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. und Pollard, T. D.** (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* **127**, 107-115.

**McDonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C. Q. und Mellerick, D. M.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev* **12**, 3603-3612.

**McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. und Simon, M. A.** (1997). *mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev* **11**, 1073-1082.

**Mellerick, D. M., Kassis, J. A., Zhang, S. D. und Odenwald, W. F.** (1992). *castor* encodes a novel zinc finger protein required for the development of a subset of CNS neurons in *Drosophila*. *Neuron* **9**, 789-803.

**Miki, H., Suetsugu, S. und Takenawa, T.** (1998). *WAVE*, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by *Rac*. *Embo J* **17**, 6932-6941.

**Miller, K. G.** (2002). Extending the Arp2/3 complex and its regulation beyond the leading edge. *J Cell Biol* **156**, 591-593.

**Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. und Dickson, B. J.** (1996). Genetic analysis of *Netrin* genes in *Drosophila*: *Netrins* guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17**, 203-215.

**Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S. und Rubin, G. M.** (1990). The *Drosophila* *seven-up* gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* **60**, 211-224.

**Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K. und Schachner, M.** (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* **334**, 701-703.

**Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. und Crews, S. T.** (1991). The *Drosophila* *single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**, 1157-1167.

**Nelson, H. B. und Laughon, A.** (1993). *Drosophila* glial architecture and development: analysis using a collection of new cell-specific markers. *Roux's Arch Dev Biol* **202**, 341-354.

**Nobes, C. D. und Hall, A.** (1995). *Rho*, *rac*, and *cdc42* GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.

- Parker, R. J. und Auld, V. J.** (2004). Signaling in glial development: differentiation migration and axon guidance. *Biochem Cell Biol* **82**, 694-707.
- Pfrieger, F. W. und Barres, B. A.** (1997). Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* **277**, 1684-1687.
- Pielage, J., Kippert, A., Zhu, M. und Klämbt, C.** (2004). The Drosophila transmembrane protein Fear-of-intimacy controls glial cell migration. *Dev Biol* **275**, 245-257.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T. und Dodd, J.** (1990). Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development* **110**, 19-30.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1994). BrdU incorporation reveals DNA replication in non dividing glial cells in the larval abdominal CNS of Drosophila. *Roux's Arch.Dev.Biol.* **204**, 54-61.
- Raghavan, S. und White, R. A.** (1997). Connectin mediates adhesion in Drosophila. *Neuron* **18**, 873-880.
- Rajasekharan, S., Baker, K. A., Horn, K. E., Jarjour, A. A., Antel, J. P. und Kennedy, T. E.** (2009). Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA. *Development* **136**, 415-426.
- Robitaille, R.** (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **21**, 847-855.
- Romani, S., Campuzano, S. und Modolell, J.** (1987). The achaete-scute complex is expressed in neurogenic regions of Drosophila embryos. *Embo J* **6**, 2085-2092.
- Rusten, T. E., Cantera, R., Urban, J., Technau, G., Kafatos, F. C. und Barrio, R.** (2001). Spalt modifies EGFR-mediated induction of chordotonal precursors in the embryonic PNS of Drosophila promoting the development of oenocytes. *Development* **128**, 711-722.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. et al.** (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in Drosophila melanogaster. *Genetics* **167**, 797-813.
- Schenck, A., Bardoni, B., Langmann, C., Harden, N., Mandel, J. L. und Giangrande, A.** (2003). CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in Drosophila and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* **38**, 887-898.
- 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.



**Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. und Schnabel, H.** (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**, 234-265.

**Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U. und Gaul, U.** (2005). GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila*. *Cell* **123**, 133-144.

**Sepp, K. J. und Auld, V. J.** (2003a). RhoA and Rac1 GTPases mediate the dynamic rearrangement of actin in peripheral glia. *Development* **130**, 1825-1835.

**Sepp, K. J. und Auld, V. J.** (2003b). Reciprocal interactions between neurons and glia are required for *Drosophila* peripheral nervous system development. *J Neurosci* **23**, 8221-8230.

**Sepp, K. J., Schulte, J. und Auld, V. J.** (2000). Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* **30**, 122-133.

**Sepp, K. J., Schulte, J. und Auld, V. J.** (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* **238**, 47-63.

**Shekarabi, M., Moore, S. W., Tritsch, N. X., Morris, S. J., Bouchard, J. F. und Kennedy, T. E.** (2005). Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* **25**, 3132-3141.

**Shishido, E., Ono, N., Kojima, T. und Saigo, K.** (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* **124**, 2119-2128.

**Silies, M., Edenfeld, G., Engelen, D., Stork, T. und Klämbt, C.** (2007). Development of the peripheral glial cells in *Drosophila*. *Neuron Glia Biol* **3**, 35-43.

**Soustelle, L., Aigouy, B., Asensio, M. L. und Giangrande, A.** (2008). UV laser mediated cell selective destruction by confocal microscopy. *Neural Dev* **3**, 11.

**Stacey, S. M., Thomas, G. B., Labbe, A. und Van Meyel, D. J.** (2007). Longitudinal glia in the fly CNS: pushing the envelope on glial diversity and neuron-glia interactions. *Neuron Glia Biol* **3**, 27-33.

**Stork, T., Engelen, D., Krudewig, A., Silies, M., Bainton, R. J. und Klämbt, C.** (2008). Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci* **28**, 587-597.

**Su, T. T., Sprenger, F., DiGregorio, P. J., Campbell, S. D. und O'Farrell, P. H.** (1998). Exit from mitosis in *Drosophila* syncytial embryos requires proteolysis and cyclin degradation, and is associated with localized dephosphorylation. *Genes Dev* **12**, 1495-1503.

- Sun, B., Xu, P. und Salvaterra, P. M.** (1999). Dynamic visualization of nervous system in live *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10438-10443.
- Suzuki, Y., Sato, N., Tohyama, M., Wanaka, A. und Takagi, T.** (1996). cDNA cloning of a novel membrane glycoprotein that is expressed specifically in glial cells in the mouse brain. *LIG-1*, a protein with leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains. *J Biol Chem* **271**, 22522-22527.
- Tear, G., Harris, R., Sutaria, S., Kilomanski, K., Goodman, C. S. und Seeger, M. A.** (1996). commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. *Neuron* **16**, 501-514.
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A. G., Dodd, J. und Jessell, T. M.** (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* **336**, 775-778.
- Treherne, J. E. und Schofield, P. K.** (1981). Mechanisms of ionic homeostasis in the central nervous system of an insect. *J Exp Biol* **95**, 61-73.
- Tsai, H. H., Tessier-Lavigne, M. und Miller, R. H.** (2003). Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Development* **130**, 2095-2105.
- Vef, O., Cleppien, D., Loffler, T., Altenhein, B. und Technau, G. M.** (2006). A new strategy for efficient in vivo screening of mutagenized *Drosophila* embryos. *Dev Genes Evol* **216**, 105-108.
- Vincent, S., Vonesch, J. L. und Giangrande, A.** (1996). *Glide* directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* **122**, 131-139.
- 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.
- 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.
- Winberg, M. L., Mitchell, K. J. und Goodman, C. S.** (1998). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* **93**, 581-591.
- 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.
- Yeo, S. L., Lloyd, A., Kozak, K., Dinh, A., Dick, T., Yang, X., Sakonju, S. und Chia, W.** (1995). On the functional overlap between two *Drosophila* POU homeo domain genes and the cell fate specification of a CNS neural precursor. *Genes Dev* **9**, 1223-1236.

**Yu, T. W. und Bargmann, C. I.** (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1169-1176.

**Zallen, J. A., Cohen, Y., Hudson, A. M., Cooley, L., Wieschaus, E. und Schejter, E. D.** (2002). SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J Cell Biol* **156**, 689-701.

## 7 Anhang:

### 7.1 Informationen zu den mitgelieferten Filmen

#### Film 1: Mz97, nGFP; Segmente A2-A6

In diesem homozygoten Mz97-Embryo wurde die Migration der ePGs über einen Zeitraum von knapp 7Std. aufgenommen. Die Aufnahme zeigt sechs HS (A1-A6), von denen allerdings (bedingt durch die morphologischen Bewegungen des Embryos während seiner Entwicklung) lediglich drei HS (A3-A5) im gesamten Verlauf der Aufnahme beobachtet werden können. Der Film startet etwa im frühen St.13 und endet ca. im frühen St.17. Neben den Oe und einigen mesodermalen Zellen ist die Wanderung der Subgruppe der Mz97-positiven ePGs zu sehen. Für weitere Details siehe Abschnitt 3.1.6. Die sichtbaren Zellen sind wie folgt markiert: unausgefüllte Pfeilspitze (ePG4), Pfeil (ePG5), gebogener Pfeil (ePG7), unausgefüllter gebogener Pfeil (ePG9) und Oe (Oenozyten). Die ePGs im Exitbereich sind nicht markiert, da einige von ihnen aufgrund ihrer tieferen Lage im Inneren des Embryos (im Vergleich zu den anderen ePGs) nicht zu sehen sind. Anterior ist oben und dorsal links.

$$t^{\text{total}} = 6:44:15 \text{ (h:min:sec)}$$

Zeitabstand zwischen zwei aufgenommenen Z-Stapeln = 2:45 (min:sec)

Jeweils aufgenommene Z-Stapel = 31 (Schrittweite zwischen zwei Z-Ebenen = 0,8 $\mu\text{m}$ ;  $Z^{\text{total}} = 24,42\mu\text{m}$ )

#### Film 2: Mz97, nGFP / UAS-nGFP; *repo*-Gal4 / +; Segmente A2-A6

In diesem Mz97, nGFP / UAS-nGFP; *repo*-Gal4 / + Embryo wurde die Migration aller ePGs über einen Zeitraum von ungefähr 6Std. aufgenommen. Markiert sind in der Aufnahme die ePGs der HS A2-A5, da nur diese im gesamten Verlauf des Filmes beobachtet werden können. Der Film startet etwa im St.12 und endet ca. im späten

St.16. In jedem HS ist es stets die ePG9 (unausgefüllter gebogener Pfeil), die als erste vom ZNS auswandernde ePG, den Exitbereich verlässt. Die Reihenfolge der nachfolgenden ePGs kann geringfügig variieren. In einigen HS (z.B. A2 und A5) kann beobachtet werden, wie eine der beiden vom NB2-5 abstammenden ePGs (ePG6 und ePG8, dünne Pfeile) im Verlauf ihrer Wanderung an der ePG7 (gebogener Pfeil) vorbeizieht. Für weitere Details siehe Abschnitt 3.1.6. Die sichtbaren Zellen sind wie folgt markiert: Sternchen (ePG1 und ePG3), unausgefüllter dünner Pfeil (ePG2), unausgefüllte Pfeilspitze (ePG4), Pfeil (ePG5), dünne Pfeile (ePG6 und ePG8), gebogener Pfeil (ePG7), unausgefüllter gebogener Pfeil (ePG9), geschwungener Pfeil (ePG12) und Oe (Oenozyten). Anterior ist oben und dorsal rechts.

$$t^{\text{total}} = 6:04 \text{ (h:min)}$$

Zeitabstand zwischen zwei aufgenommenen Z-Stapeln = 1:45 (min:sec)

Jeweils aufgenommene Z-Stapel = 64 (Schrittweite zwischen zwei Z-Ebenen = 1 $\mu$ m; Z<sup>total</sup> = 64,11 $\mu$ m)

**Film 3: Mz97, nGFP / UAS-nGFP; repo-Gal4 / +; Segmente A4**

Dieser Film eines Mz97, nGFP / UAS-nGFP; *repo-Gal4* / + Embryos zeigt einen Ausschnitt einer 4D-Aufnahme und beginnt etwa im St.15. Insgesamt ist ein Zeitraum von ca. 2<sup>1/2</sup>Std. (2:32:20sec) zu sehen. In der Aufnahme kann beobachtet werden, wie die zunächst proximaler gelegene der beiden vom NB2-5 abstammenden ePGs (ePG6 und ePG8, dünne Pfeile) die distalere überholt und anschließend auch noch an der ePG7 (gebogener Pfeil) vorbeizieht. Des Weiteren ist in diesem Film die gelegentlich auftretende dynamische Bewegung der ePG3 (Sternchen) zu sehen, welche im Zuge dieser Bewegungen kurzzeitig distaler positioniert ist als die ePG4 (unausgefüllte Pfeilspitze) und ePG5 (Pfeil). Für weitere Details siehe Abschnitt 3.1.6. Die GFP-positiven Zellen sind wie folgt markiert: Sternchen (ePG1 und ePG3), unausgefüllter dünner Pfeil (ePG2), unausgefüllte Pfeilspitze (ePG4), Pfeil (ePG5), dünne Pfeile (ePG6 und ePG8), gebogener Pfeil (ePG7), unausgefüllter gebogener Pfeil (ePG9), geschwungener Pfeil (ePG12) und Oe (Oenozyten). Anterior ist oben und dorsal rechts.

**Film 4: Mz97 / +; UAS-mCD8::GFP / +; abdominale HS**

In diesem Mz97 / +; UAS-mCD8::GFP / + Embryo sollte die Migration der gesamten Zellen der Mz97-positiven ePGs über einen Zeitraum von knapp 5Std. dokumentiert werden. Der Film startet etwa im St.13 und endet ca. im späten St.16. In der Aufnahme ist allerdings zu erkennen, dass die Zellkörper der Mz97-positiven ePGs erst spät deutlich detektiert werden können, wodurch eine detaillierte Analyse der Migration der gesamten Zellkörper der Mz97-positiven ePGs nicht hinreichend möglich war. Insbesondere gegen Ende der Aufnahme können dynamische Membranausläufer von einzelnen ePGs und den Oe beobachtet werden. Individuelle ePGs und auch die Oe sind in dieser 4D-Aufnahme nicht markiert. Gelegentlich sind ebenfalls Mz97-positive Makrophagen in der Peripherie zu sehen. Für weitere Details siehe Abschnitt 3.1.6. Anterior ist oben und dorsal rechts.

$$t^{\text{total}} = 4:56:05 \text{ (h:min:sec)}$$

Zeitabstand zwischen zwei aufgenommenen Z-Stapeln = 1:35 (min:sec)

Jeweils aufgenommene Z-Stapel = 58 (Schrittweite zwischen zwei Z-Ebenen =  $1\mu\text{m}$ ;  $Z^{\text{total}} = 58\mu\text{m}$ )

**Film 5: UAS-Aktin::GFP / +; repo-Gal4 / +; abdominale HS**

In dieser Aufnahme eines UAS-Aktin::GFP / +; repo-Gal4 / + Embryos ist die Migration der Zellkörper aller ePGs über einen Zeitraum von knapp  $5^{1/2}$ Std. zu sehen. Der Film startet etwa im späten St.13 und endet ca. im späten St.16. Zu Beginn der Aufnahme kann insbesondere im zweiten HS von oben erkannt werden, dass die erste vom ZNS auswandernde ePG9 bereits ein Stück in der Peripherie vorliegt. Im weiteren Verlauf des Films ist es allerdings nicht möglich der Wanderung einzelner ePGs zu folgen, da die ePGs zu dicht beieinander liegen und zu stark miteinander in Kontakt stehen um individuelle Zellen zu erkennen. Deutlich beobachtet werden kann hingegen, dass ePGs fortwährend Zellmembranausläufer entsenden und zurückziehen. Besonders gut kann dies bei der separiert am SN vorliegenden ePG4

beobachtet werden, die progressiv zwei Nervenzweige (SNa und SNc) des SN umhüllt. Für weitere Details siehe Abschnitt 3.1.6. Anterior ist oben und dorsal rechts.

$t^{\text{total}} = 5:23:53$  (h:min:sec)

Zeitabstand zwischen zwei aufgenommenen Z-Stapeln = 1:40 (min:sec)

Jeweils aufgenommene Z-Stapel = 61 (Schrittweite zwischen zwei Z-Ebenen =  $1\mu\text{m}$ ;  $Z^{\text{total}} = 61\mu\text{m}$ )

**Film 6:  $SCAR^{169} / SCAR^{169}; repo\text{-Gal4} / UAS\text{-mCD8::GFP}$ ; abdominale HS**

In diesem  $SCAR^{169} / SCAR^{169}; repo\text{-Gal4} / UAS\text{-mCD8::GFP}$  Embryo ist die Migration aller ePGs in  $SCAR^{169}$ -Mutanten über einen Zeitraum von knapp 6Std. dokumentiert. Der Film startet etwa im St.13 und endet ca. im späten St.16. In der Aufnahme ist mehrfach zu sehen, wie ein im ruhenden Zustand vergrößerter  $repo\text{-Gal4}$ -postiver Zellkern während seiner aktiven Migration eher wie zwei dicht beieinander liegende Zellkerne erscheint, die allerdings stets in einem kleinen Bereich miteinander verbunden bleiben (dünner Pfeil). Fusionierungen von zunächst getrennten Zellkernen können nicht beobachtet werden. Für weitere Details siehe Abschnitt 3.5.2. Anterior ist oben und dorsal rechts.

$t^{\text{total}} = 5:46:40$  (h:min:sec)

Zeitabstand zwischen zwei aufgenommenen Z-Stapeln = 1:40 (min:sec)

Jeweils aufgenommene Z-Stapel = 61 (Schrittweite zwischen zwei Z-Ebenen =  $1\mu\text{m}$ ;  $Z^{\text{total}} = 61\mu\text{m}$ )

## 7.2 Liste der verwendeten Defizienzen-Stämme und Verlauf der Kartierung der EMS-Stämmen 223 und 1541

Zu Beginn der Dissertation konnte der betroffene Bereich in EMS223 durch Komplementationskreuzungen bereits auf den Chromosomenbereich **42B3-42C1** eingegrenzt werden. Komplementationskreuzungen mit der Def.1007 und 1888 resultierten in Nicht-Komplementation, wohingegen die Komplementationskreuzung mit der Def.224 zu Komplementation führt (Diplomarbeit von Hilchen, 2005). Def.1888 komplementiert auch die Mutation in der EMS-Linie 1541 nicht (Diplomarbeit von Hilchen, 2005). Aus diesem Grund habe ich Komplementationskreuzungen zwischen EMS223 und EMS1541 durchgeführt, mit dem Ergebnis der Nicht-Komplementation. Folglich sind EMS223 und EMS1541 allelisch und der Mutationsloкус liegt im Chromosomenabschnitt **42B3-42C1**. Dieser Bereich enthält nach FlyBase:

A) Acht annotierte Gene mit bekannter Genomsequenz:

1. Gen 1.28: Kein Allel bei Bloomington erhältlich.
2. CG15233: Kein Allel bei Bloomington erhältlich.
3. CG15234: Bloomington Stamm (Def.10984) erhältlich, der den entsprechenden Bereich abdeckt. Komplementationskreuzung zwischen EMS223 und Def.10984 durchgeführt (siehe Tab. 7-1).
4. Gen *jing*: Zwei Defizienzen-Stämme (Def.10984 und 10378) bei Bloomington erhältlich, die den Genloкус von *jing* beinhalten. Komplementationskreuzungen zwischen EMS223 und beiden Defizienzen-Stämmen durchgeführt (siehe Tab. 7-1).
5. CG33919: Kein Allel bei Bloomington erhältlich.
6. Gen *Vha16*: Kreuzungen mit zwei von Bloomington erhältlichen Defizienzen-Stämmen (Def.17244 und 19893) durchgeführt, die den entsprechenden Lokus abdecken (siehe Tab. 7-1).
7. Gen *Trap1*: Keine Defizienzen-Stämme bei Bloomington erhältlich.
8. Gen *Bap170*: Keine Defizienzen-Stämme bei Bloomington erhältlich.



## B) Acht annotierte Gene mit unbekannter Genomsequenz:

1. I(2)k14805: Zwei Defizienzen-Stämme bei Bloomington erhältlich (Def. 11135 und 102951). Komplementationskreuzung des EMS-Stammes 223 mit der Def. 11135 durchgeführt (siehe Tab. 7-1).
2. I(2)k03204: Mit einem bei Bloomington erhältlichen Defizienz-Stamm (Def. 10529) Komplementationskreuzungen mit EMS223 durchgeführt (siehe Tab. 7-1).
3. rambl: Kein Allel bei Bloomington erhältlich.
4. eK6: Kein Allel bei Bloomington erhältlich.
5. I(2)04535b: Ein Defizienzen-Stamm (Def. 11381) bei Bloomington erhältlich. Wurde bereits von O. Vef in einer Komplementationskreuzung mit EMS223 getestet und resultierte in Komplementation.
6. I(2)k09107: Defizienz-Stamm 10860 (*geminin*) (Def. 10860 bereits getestet; Komplementation mit EMS223)
7. anon-MMS91: Kein Allel bei Bloomington erhältlich.
8. mat(2)twg: Kein Allel bei Bloomington erhältlich.

Tab. 7-1: Liste der Defizienzen-Stämme, die für Komplementationskreuzungen mit EMS223 verwendet wurden

Defizienz-Stamm:	Lokus:	Ergebnis der Kreuzung:	Bemerkung(en):
10984	42C1 (R4 flank)	Komplementation	Während Diplomarbeit durchgeführt.
10378	42C1 (R4 gene)	Komplementation	Während Diplomarbeit durchgeführt.
17244	42C1 (R4 flank)	Komplementation	Während Diplomarbeit durchgeführt.
19893	42C1 (R4 flank)	Komplementation	Während Diplomarbeit durchgeführt.
11135	42C3 (R4 flank)	Komplementation	Zweimal durchgeführt.
10529	42B1-3 ( <i>in-situ</i> )	Komplementation	Zweimal durchgeführt.
16155	42B2	Komplementation	Zweimal durchgeführt.
14374	42C1 (R4 flank)	Komplementation	Zweimal durchgeführt.
1006	041D02-E01;042B01-03, 041A-B;042BC (1.Bruchpunkt Defizienz und 2. Duplikation)	<b>Nicht-Komplementation</b>	Zweimal durchgeführt, aber am Fluoreszenzmikroskop keinen Phänotyp erkennen können.
8044	42A11;42C7 (R3 estimated cytology)	Komplementation	Lokalisation der Defizienz im Stamm

			8044 ist nicht ganz klar!
8045	42A14;42E7 (R3 estimated cytology)	Komplementation	Lokalisation der Defizienz im Stamm 8045 ist nicht ganz klar!
10860	042C01-02	Komplementation	Von mir nur einmal durchgeführt und auf Phänotyp hin untersucht. Keiner der Embryonen zeigte den Phänotyp der EMS223-Mutante.

Da die Phänotypen von EMS223 und EMS1541 dem Phänotyp von SCAR<sup>169</sup> stark ähneln, habe ich auch Komplementationskreuzungen zwischen EMS223 bzw. EMS1541 und SCAR<sup>169</sup> durchgeführt. Diese Komplementationskreuzungen resultierten alle in Nicht-Komplementation.

### 7.3 Sequenzierung der kodierende Region des SCAR Gens

Verwendete Primerpaare für die PCR:

1 US-Primer: GTCTGATTTTCCGAAATGATGAATCCC

1 DS-Primer: CGCAGCTTAGTTTTACACAGTCCACC

2 US-Primer: TTATGTAGTAAATCAGTAAATAAAGGG

2b US-Primer: ATGCCCAGTGCGACAAACCGCC

2 DS-Primer: CCAATAACAGCCTATGAATTTGGTTCGC

3 US-Primer: CATTTTAATGGGTGGTTAGTCAACGGC

3 DS-Primer: GCGTGGGTCATGGAATGGAGGCAGC

4 US-Primer: CGAGGAAGGCATGGGCAGTGCC

4 DS-Primer: GCATAAGACCAGAGGAAATTCCC

## 7.4 Verwendete Puffer und Lösungen

6%ige Chlorbleichlauge:

12% Cl enthaltende Natriumhypochloridlösung wird im Verhältnis 1:1 mit dest. H<sub>2</sub>O verdünnt

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (20x):

Für die Herstellung werden 1,4M NaCl, 0,07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,03M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in autoklavierten H<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mittels HCl auf 7,4 eingestellt. 1xPBS wird durch eine 1:20 Verdünnung der 20x PBS Stammlösung gewonnen.

0,1%PBT:

1xPBS wird mit 0,1% Tween (PBTween) bzw. 0,1% TritonX (PBTx) versetzt. Im Allgemeinen wird mit Ausnahme von ISH PBTx verwendet.

0,3%PBT:

1xPBS wird mit 0,3% Tween (PBTween) bzw. 0,3% TritonX (PBTx) versetzt.

PEMS-Puffer:

100mM PIPES (pH 6,9), 1mM EGTA, 1mM MgSO<sub>4</sub> und 1,2M Sorbitol werden in autoklaviertem H<sub>2</sub>O gelöst.

Sylgard 184- Silicone Elastomere:

1 Volumenteil „Curing Agent“ wird mit 5 Volumenteilen „BASE Silicone Elastomere“ vermischt und in eine Petrischale gegossen. ÜN bei 65°C aushärten lassen.

AB-Komplex:

4µl des Puffer A (bestehen aus 2,84g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 0 H<sub>2</sub>O in 100ml H<sub>2</sub>O) werden mit 4µl des Puffer B (bestehend aus 2,76g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 1H<sub>2</sub>O in 100ml H<sub>2</sub>O) in 300µl 1xPBT. Vor Gebrauch etwa eine Stunde warten, damit sich die Komponenten verbinden können.

DAB-Färbelösung:

Eine Tablette (10mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) werden in 40ml 1xPBS gelöst.

AP-Detektionspuffer:

Setzt sich aus 5M NaCl, 1M MgCl, 1M Tris pH 9,5 und 0,1% Tween zusammen.

Hybridisierungspuffer für ISH:

Besteht aus 50% (V/V) Formamid, 5x SSC und 0,1% Tween20.

TNT-Puffer:

Setzt sich zusammen aus 1M Tris-HCl (pH 7,5), 0,15M NaCl und 0,05% Tween20

## 7.5 Verwendete Software

**Tab. 7-2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software**

Name	Version	Hersteller
Director Shockwave Studio	8.5	Macromedia®
Endnote	9.00	Thomson
Exel	Office Professional Edition 2003	Microsoft®
File Rename with Joe	Freeware k.A.	LAB1.DE
Illustrator® CS	11.0.0	Adobe®
Leica Confocal Software	2.61	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Leica Lite	2.00	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
LCS Simulator	2.61	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Photoshop® CS2	9.0	Adobe®
SIMI-BioCell®	3.3.133	SIMI reality motion systems GmbH, Unterschleißheim
Word	Office Professional Edition 2003	Microsoft®