



„Segmentale Spezifizierung der Neuroblastenlinie 6-4 in den gnathalen Segmenten von *Drosophila melanogaster*“

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Henrike Becker

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 02.06.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Regionalisierung und Kompartimentierung des Körpers führt zu funktionalen Einheiten	2
1.2. Grundlagen der Entstehung des Nervensystems von <i>Drosophila</i>	3
1.3. Hoxgenfunktionen sind für segmentspezifische Identitäten von Zellen entscheidend	6
1.4. Mangelnder Wissensstand über das VNS der gnathalen Segmente	7
1.5. Ausgangshypothesen und Grundlagen der Arbeit	8
1.6. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	11
1.7. Ausblick auf die Ergebnisse der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Chemikalien und Geräte	14
2.1.1. Verwendete Chemikalien.....	14
2.1.2. Lösungen.....	14
2.1.3. Verwendete Laborgeräte.....	17
2.1.4. Gebrauchsmaterialien.....	18
2.1.5. Verwendete Software.....	18
2.2. Fliegenarbeit	19
2.2.1. Haltung der Fliegen.....	19
2.2.2. Eiablagen.....	19
2.2.3. Balancieren von Fliegenstämmen.....	19
2.2.4. Kreuzungen.....	19
2.2.5. Ektopische Genexpression mithilfe des GAL4-UAS Systems.....	20
2.2.6. Verwendete Fliegenstämme.....	21
2.2.7. RNA-Interferenz als weitere Möglichkeit von Mutantanalyse.....	25
2.2.8. Zeitlich gesteuerte Expression eines Gens über ein hitzesensitives Allel.....	25
2.3. Vorbereitung der Embryonen für Färbungen	26
2.3.1. Chemische Dechorionisierung.....	26
2.3.2. Fixierung von Embryonen.....	26
2.4. Färbemethoden	26
2.4.1. Fluoreszenz Antikörperfärbung.....	26

2.4.2. Alkalische Phosphatase Färbung.....	27
2.4.3. Verwendete primäre Antikörper.....	27
2.4.4. Verwendete sekundäre Antikörper	31
2.5. Herstellung von Riboproben (mRNA in situ Sonden)	32
2.5.1. In situ Hybridisierung mit anschließender Fluoreszenz Antikörperfärbung oder anschließender Alkalischer Phosphatase Färbung	32
2.5.2. Reverse Transkription.....	33
2.5.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.5.4. Standard-PCR.....	35
2.5.5. Long Range-PCR bzw. RT-PCR.....	35
2.5.6. Expressed Sequence Tags Klone.....	36
2.5.7. Hergestellte Sonden aus EST Klonen.....	37
2.5.8. Mini-Präparation der Vektoren.....	39
2.5.9. Restriktion	40
2.5.10. Herstellung der Sonden über T7 und Sp6.....	40
2.5.11. Vermessung der Expressionsdomänen der Antennapedia-Komplex Gene	41
2.6. Gelelektrophorese	41
2.7. Western Blot und Immunoprecipitation für den Nachweis von Protein-Protein Interaktion.....	42
2.8. Präparation und Dokumentation der Embryonen.....	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Das Eagle Expressionsmuster der gnathalen Segmente.....	44
3.1.1. Das Eagle Expressionsmuster der gnathalen Segmente zeigt starke Abweichungen von dem bekannten Muster posteriorer Segmente.....	44
3.1.1.1. NB2-4 wird in den gnathalen Segmenten nicht gebildet	46
3.1.1.2. NB3-3 ist mithilfe von Markeranalysen nur im Maxillar- und Labialsegment zu identifizieren.	46
3.1.1.3. Segmentspezifische Zelllinien der gnathalen NB6-4	48
3.1.1.4. Die Frage nach der Existenz einer mandibularen NB6-4 Linie.....	50
3.1.1.5. Eindeutige Markerkombinationen lassen keinen NB6-4 im Mandibularsegment erkennen	50
3.1.1.6. Durch längeres Aufrechterhalten der Eagle Expression wird kein mandibularer NB6-4 sichtbar	52
3.1.1.7. <i>Cap-n-collar</i> Funktion ist für das Fehlen eines NB6-4 im Mandibularsegment nicht verantwortlich	53
3.1.1.8. NB7-3 bildet segmentspezifische Zellstammbäume in allen drei gnathalen Segmenten	53
3.1.1.9. Die Nachkommenzellen des gnathalen NB5-3 sind teilweise Eagle positiv.....	55
3.1.1.10. Der mandibulare und maxillare Mittellinien-Neuroblast (MNB) bringen Eagle positive Nachkommenzellen hervor	59

3.1.2. Im späteren Embryo werden Anteile weiterer mandibularer und maxillarer Neuroblastenlinien Eagle positiv	60
3.1.2.1. Verwendete Marker für die Identifizierung der gnathalen spät Eagle positiven Zellen.....	61
3.1.2.2. Anteile der mandibularen NB4-3 und NB4-4 Zellstammbäume sind Eagle positiv	62
3.1.2.3. Anteile der maxillaren NB4-3, NB5-6 und NB6-2 Zellstammbäume exprimieren zusätzlich Eagle	65
3.1.3. Weitere Beobachtungen über das Eagle Expressionsmuster in angrenzenden Segmenten .	69
3.1.3.1. Im Tritocerebrum und im Deutocerebrum tritt transient Eagle Expression auf.....	69
3.1.3.2. In thorakalen Segmenten exprimiert ein Teil der NB3-2 Nachkommenzellen Eagle.....	71
3.1.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.1.	75
3.2. Die Gene des <i>Antennapedia</i>-Komplexes können segmentale Identitäten der Eagle positiven Neuroblastenlinien der gnathalen Segmente spezifizieren	76
3.2.1. Analyse der Abhängigkeit der bekannten Eagle positiven gnathalen Neuroblastenlinien von <i>Antennapedia</i> -Komplex Genfunktionen	76
3.2.1.1. Fehlen des NB2-4 in den gnathalen Segmenten ist unabhängig von Hoxgenfunktion	76
3.2.1.2. <i>Deformed</i> und <i>Sex combs reduced</i> Funktion sind für die segmentale Identität gnathaler NB3-3 Zellstammbäume notwendig.....	76
3.2.1.3. Spezifizierung von segmentalen Identitäten der gnathalen NB6-4 durch <i>Antennapedia</i> -Komplex Gene	78
3.2.1.4. Validierung der Bedeutung von <i>Deformed</i> und <i>Sex combs reduced</i> Funktion für den maxillaren NB6-4	78
3.2.1.5. <i>Deformed</i> und <i>Sex combs reduced</i> Funktion bewirken die Reduktion der Zellzahlen der mandibularen und maxillaren NB7-3 Linien im WT	80
3.2.2. <i>Deformed</i> Funktion ist für die Eagle Expression der spät Eagle positiven Zelllinienanteile notwendig	81
3.2.3. Eagle Expression des NB5-3 wird in posterioren Segmenten durch die Funktion von <i>teashirt</i> unterdrückt.....	83
3.2.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.2.	84
3.3. Unterschiede der Identitäten der maxillaren versus der abdominalen NB6-4 Linien sind durch Hoxgenfunktionen bestimmt.....	85
3.3.1. Repression neuronaler NB6-4 Identität über die Funktion von <i>Deformed</i>	85
3.3.2. Zellproliferationsverhalten des maxillaren versus des abdominalen NB6-4.....	87
3.3.3. Immunoprecipitation von <i>Deformed</i> und <i>AbdominalA</i> mit <i>CyclinE</i> zeigt keine Protein-Protein Interaktion	88
3.3.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.3.	92
3.4. Die Identität des NB6-4max wird durch die Funktionen von <i>labial</i> und <i>Antennapedia</i> beeinflusst	93

3.4.1. Die Suche nach den Einflüssen von <i>labial</i> und <i>Antennapedia</i> Funktion auf den maxillaren NB6-4.....	94
3.4.2. Räumliche und zeitliche Expressionsdomänen der <i>Antennapedia</i> -Komplex Gene im wildtypischen gnathalen VNS.....	95
3.4.2.1. Die Expressionsdomäne von <i>labial</i> reicht nie in das Neuroektoderm des Maxillarsegments hinein.....	97
3.4.2.2. <i>Deformed</i> Expression überlappt anterior mit <i>labial</i> und posterior mit <i>Sex combs reduced</i> Expression.....	97
3.4.2.3. Die Expressionsdomäne von <i>Sex combs reduced</i> grenzt im Labialsegment an die <i>Antennapedia</i> Expressionsdomäne an.....	99
3.4.2.4. <i>Antennapedia</i> Expression findet sich nie anterior des Labialsegments.....	99
3.4.2.5. <i>Proboscipedia</i> wird nicht im NB6-4 exprimiert.....	100
3.4.3. Die Expressionsdomänen der Hoxgene sind in den Hoxmutanten nur geringfügig verändert.....	100
3.4.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.4.....	103
3.5. An der Entstehung maxillarer Identität des NB6-4 müssen weitere Faktoren beteiligt sein.....	104
3.5.1. Entwicklung der Arbeitshypothese.....	104
3.5.2. Ein Miniscreen für potentielle <i>Antennapedia</i> -Komplex Gen Interaktionspartner.....	104
3.6. Funktionsverlust der meisten Kandidaten verursacht keinen NB6-4 Phänotyp....	110
3.7. Vorstellung der Kandidaten, deren Funktionsverlust Veränderungen der segmentalen Identität des NB6-4 in unterschiedlichen Segmenten hervorrufen.	112
3.7.1. Der NB6-4 ist in <i>wingless</i> Mutanten verändert.....	112
3.7.2. Funktionsverlust von <i>humpty dumpty</i> verursacht einen NB6-4 Phänotyp.....	113
3.7.3. <i>teashirt</i> , <i>tiptop</i> , <i>disconnected</i> und <i>disco-related</i> sind als Interaktionspartner von Hoxgenen bekannt.....	115
3.7.3.1. Wildtypische Expression von <i>teashirt</i> im VNS ähnelt <i>Antennapedia</i> Expression.....	116
3.7.3.2. <i>teashirt</i> Funktionsverlust führt zum Verlust von labialen und thorakalen NB6-4 Neuronen....	118
3.7.3.3. Ektopische Expression von <i>teashirt</i> verändert die maxillare NB6-4 Identität.....	119
3.7.3.4. Die Expression von <i>teashirt</i> ist abhängig von <i>Antennapedia</i> Funktion.....	120
3.7.3.5. <i>teashirt</i> beeinflusst weitere Identitäten von Eagle positiven Zelllinien.....	121
3.7.3.6. <i>disconnected</i> zeigt keine Funktion für den maxillaren NB6-4.....	121
3.7.3.7. Die wildtypische Expressionsdomäne von <i>disconnected</i> in den gnathalen Segmenten umfasst nicht NB6-4.....	121
3.7.3.8. Die Entstehung der segmentalen Identitäten des NB6-4 ist unabhängig von der Funktion von <i>disconnected</i>	122
3.7.3.9. Ektopische Expression von <i>disconnected</i> hat geringe Effekte auf die segmentalen Identitäten von NB6-4.....	122

3.7.4. <i>homothorax</i> und <i>extradenticle</i> als bekannte Kofaktoren erfüllen nicht die gesuchten Kriterien	124
3.7.5. Zusammenfassung der Kapitel 3.5., 3.6. und 3.7.....	125
3.8. Amalgam besitzt eine entscheidende Funktion für die Identität des NB6-4max....	127
3.8.1. <i>Amalgam</i> Funktion ist für die korrekte segmentale Identität von NB6-4max notwendig.	127
3.8.2. Beschreibung der wildtypische Expression von <i>Amalgam</i> im VNS	130
3.8.3. Regulation der <i>Amalgam</i> Expression durch <i>Antennapedia</i> -Komplex Gene.....	131
3.8.3.1. Sex combs reduced wirkt als Repressor von Amalgam mRNA Transkription	131
3.8.3.2. Deformed, Antennapedia und labial wirken aktivierend auf Amalgam Transkription	132
3.8.4. DNA-Bindedomänen der <i>Antennapedia</i> -Komplex Gene im regulatorischen Bereich von <i>Amalgam</i> sind zwischen <i>Drosophilidaen</i> hoch konserviert.....	134
3.8.5. Die Amalgam Protein Expression ist im VNS sehr dynamisch	134
3.8.5.1. Expression von Amalgam Protein im WT	135
3.8.5.2. In Doppelmutanten ist die Amalgam Protein Verteilung verändert	135
3.8.6. Wie wirkt <i>Amalgam</i> auf die Identitätsfindung von NB6-4max?.....	137
3.8.7. Zusammenfassung des Kapitels 3.8.	139
3.9. Neurotactin besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max	140
3.9.1. Die Funktion von Neurotactin ist für die segmentale Identität von NB6-4max entscheidend	140
3.9.2. Die Expression von Neurotactin ist unabhängig von <i>Antp</i> -K Gen Funktion	141
3.9.3. Die apiko-basale Lokalisation von Amalgam und Neurotactin in sich teilenden Neuroblasten ist unregelmäßig.....	141
3.9.4. Vermitteln Amalgam und Neurotactin ein Signal für die korrekte segmentale Identität von NB6-4max?	143
3.9.5. Zusammenfassung des Kapitels 3.9.	143
3.10. Disabled besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max	144
3.10.1. Funktionsverlust von <i>Disabled</i> führt zur Transformation des NB6-4max	144
3.10.2. Disabled Proteinlevel ist zwischen WT und <i>lab¹Dfd¹²</i> Mutanten reduziert.....	145
3.10.3. Zusammenfassung des Kapitels 3.10.	145
3.11. Sind die gefundenen Effekte auf den Funktionsverlust der <i>Ableson tyrosin kinase</i> zurück zu führen?.....	146
3.11.1. Funktionen der <i>Ableson tyrosin kinase</i> sind für die segmentale Identität von NB6-4max verantwortlich.....	146
3.11.2. Unterschiede der Lokalisation von Abl Protein im WT und in der <i>lab¹Dfd¹²</i> Doppelmutante	146
3.11.2.1. Abl Proteinlevel ist in <i>lab¹Dfd¹²</i> im Vergleich zum WT stark reduziert.....	148
3.11.2.2. Abl ist weder in <i>lab¹Dfd¹²</i> Mutanten noch dem Wildtyp im Zellkern lokalisiert	148

3.11.2.3. Kortikale Anreicherung von Abl liegt nur im wildtypischen NB6-4max, jedoch nicht in <i>lab¹Dfd¹²</i> vor	150
3.11.3. Gleichzeitiger Funktionsverlust von <i>Abl</i> und <i>Deformed</i> verdoppelt die Transformationsrate von NB6-4max.....	150
3.11.4. Expressionsdaten deuten auf einen möglichen Signalweg von Amalgam zur Ableson Tyrosin Kinase hin.....	151
3.11.5. Abl ist in <i>Dfd¹⁶</i> - und Deformed in <i>Abl⁴</i> -mutanten NB6-4max exprimiert	153
3.11.6. Ektopisch exprimiertes <i>Abl</i> und <i>Ama</i> in <i>lab¹Dfd¹²</i> oder in <i>Dfd¹⁶Antp⁷</i> Mutanten verringert die Transformationsrate.....	155
3.11.7. Zusammenfassung des Kapitels 3.11.	156
3.12. Über welchen Weg wirkt die Ableson Tyrosin Kinase auf die segmentale Identität von NB6-4max?.....	157
3.12.1. <i>Trio</i> und <i>Enabled</i> besitzen keine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4.....	157
3.12.2. Abl wirkt auf die Expression von <i>CyclinE</i> im NB6-4max	158
3.12.3. Zusätzlicher Funktionsverlust von <i>CycE</i> reduziert die Entstehungsrate von NB6-4 Neuronen in Mutanten	160
3.12.4. Ektopische Expression von <i>Abl</i> kann die Bildung von NB6-4 Neuronen nicht unterdrücken	162
3.12.5. Abl muss über weitere Faktoren auf die Expression von <i>CyclinE</i> wirken	162
3.12.6. Zusammenfassung des Kapitels 3.12.	162
3.13. Zusätzlich zum NB6-4max Phänotyp tritt gesteigerte Zellproliferation und gesteigerte Zellkerngröße auf	164
3.13.1. Die Zellkerngröße ist statistisch signifikant erhöht	165
3.13.2. Der Ballonphänotyp tritt unspezifisch in verschiedenen Zellen auf.....	165
3.13.3. In weiteren Kandidaten tritt gesteigerte Proliferation und veränderte Morphologie der Zellkerne auf.....	167
3.13.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.13.	168
3.14. Abl wirkt über den Hippo/Salvador/Warts Signalweg auf die Festlegung der segmentalen Identität von NB6-4max	169
3.14.1. Yorkie Funktion beeinflusst die Identität des NB6-4max	169
3.14.2. Salvador Expression ist in <i>Abl⁴</i> und in <i>lab¹Dfd¹²</i> Mutanten deutlich reduziert.....	170
3.14.3. Alleiniger Funktionsverlust von <i>yorkie</i> hat keine Auswirkungen auf neuronale Identität von NB6-4	171
3.14.4. Gleichzeitiger Funktionsverlust von <i>yorkie</i> kann den durch <i>Abl</i> Funktionsverlust induzierten Phänotyp retten	173

3.14.5. Die Entstehung ektopischer Neurone geht nicht mit Ausweitung der <i>teashirt</i> Expressionsdomäne einher.....	173
3.14.6. Zusammenfassung des Kapitels 3.14.	175
3.15. Midline ist an der Festlegung segmentaler Identität des NB6-4max beteiligt	176
3.15.1. Die Expression von <i>midline</i> im VNS ist sehr dynamisch	176
3.15.2. Funktionsverlust von <i>midline</i> führt zur Identitätsveränderung von NB6-4max	177
3.15.3. Deformed und Sex combs reduced Expression ist unabhängig von <i>midline</i>	179
3.15.4. Teashirt Expression ist in <i>midline</i> Mutanten unverändert	179
3.15.5. <i>Amalgam</i> Expression wird über <i>midline</i> reguliert	180
3.15.6. Zusammenfassung des Kapitels 3.15.	181
3.16. Veränderungen mandibularer segmentaler Identität	182
3.16.1. Funktionsverlust von <i>Deformed</i> , <i>Abl</i> und <i>midline</i> haben Auswirkungen auf das Mandibularsegment	182
3.16.2. NB3-3 und NB7-3 sind in ihrer segmentalen Identität nicht von <i>Amalgam</i> , <i>Abl</i> oder <i>midline</i> Funktion abhängig.....	184
3.17. Transformationen des abdominalen NB6-4	185
3.17.1. Eindeutige Markerkombination für die Identifikation abdominaler NB6-4 Neurone.....	185
3.17.2. Im WT weicht der abdominale NB6-4 in 10% von rein glialer Identität ab	185
3.17.3. In <i>Antennapedia</i> -Komplex Mutanten weicht der abdominale NB6-4 in 13% von rein glialer Identität ab	187
3.17.4. Bei <i>Amalgam</i> und <i>Abl</i> Funktionsverlust weicht der abdominale NB6-4 nicht auffallend oft von rein glialer Identität ab	187
3.17.5. Funktionsverlust von <i>midline</i> hat stärkere Auswirkungen auf die segmentale Identität des abdominalen NB6-4	188
3.17.6. Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels 3.16 und 3.17.	188
4. Diskussion	189
4.1. Abweichungen und Gemeinsamkeiten des gnathalen Eagle Expressionsmusters.191	191
4.1.1. Serielle Homologe existieren in den gnathalen Segmenten.....	191
4.1.2. Abweichendes Expressionsmuster von Eagle in den gnathalen Segmenten eröffnet Möglichkeiten abweichender Funktionen	191
4.1.3. Zeitlich abweichendes Expressionsverhalten von Eagle ist nicht nur ein Phänomen der gnathalen Segmente.....	192
4.1.4. Mögliche Funktion von Eagle für späte proliferative Aktivität von Neuroblasten	193
4.2. Verwechslung von Zellidentitäten durch mangelnde Kenntniss von Expressionsmustern führt zu verfälschten Ergebnissen	194

4.2.1. NB6-2 Nachkommenzellen müssen eindeutig von ektopischen NB6-4 Neuronen unterschieden werden.....	194
4.2.2. Gefahr der Verwechslung von NB6-2 Zellen mit ektopischen NB6-4 Neuronen tritt in <i>Deformed</i> Mutanten nicht auf.....	195
4.3. Regulation gnathaler segmentaler Identität durch unerwartete Formen von Hoxgenregulation.....	196
4.3.1. Modelle der „Posterioren Prävalenz“ und „Posterioren Dominanz“ versus dem Modell der „Autonomen Dominanz“	196
4.3.2. Die Expressionsdomänen der funktionsfähigen <i>Antennapedia</i> -Komplex Gene bei Funktionsverlust anderer Hoxgene entsprechen nicht den Regeln der <i>Posterioren Dominanz</i> ..	197
4.3.3. Die Coexpression von <i>Deformed</i> und <i>Sex combs reduced</i> führt nicht zu <i>Phänotypischer Suppression</i>	197
4.3.4. Für die Eagle positiven gnathalen Neuroblastenlinien sind allgemeingültige Regeln nur schwer anwendbar.....	198
4.3.4.1. Transformation von NB6-4 in den Zustand seiner Grundidentität	198
4.3.4.2. Segmentspezifische gnathale Zelllinien des NB7-3 könnten über <i>Antennapedia</i> -Komplex Genfunktion auf programmierten Zelltod reguliert werden.....	199
4.3.4.3. NB3-3 verliert seine segmentale Identität bei <i>Deformed</i> oder <i>Sex combs reduced</i> Funktionsverlust.....	200
4.3.4.4. Weitere Cofaktoren könnten segmentale Identitäten mit beeinflussen	201
4.3.5. Das Modell der „Autonomen Dominanz“ ist für den maxillaren NB6-4 zutreffend.....	202
4.4. Nicht-zellautonome Wirkungsweise von Hoxgenen- ein bisher selten gefundener Regulationsmechanismus	203
4.4.1. Die segmentale Identität des maxillaren NB6-4 wird durch einen zellautonomen und einen nicht-zellautonomen Weg über die Funktionen der <i>Antennapedia</i> -Komplex Gene reguliert.....	203
4.4.2. Warum ist eine solch komplexe Regulation maxillarer NB6-4 Identität notwendig?.....	204
4.4.3. Die Lokalisation von <i>Amalgam</i> innerhalb des <i>Antennapedia</i> -Komplex ist evolutionär konserviert.....	205
4.4.4. <i>Amalgam</i> wurde bisher nicht als Zielgen von Hoxgenen identifiziert.....	205
4.5. Existiert ein Signalweg von <i>Amalgam</i> über <i>Neurotactin</i> und <i>Disabled</i> zur <i>Ableson Tyrosin Kinase</i>?	206
4.5.1. <i>Amalgam</i> kann aufgrund seiner Lokalisation nicht selbst als Transkriptionsfaktor wirken	206
4.5.2. <i>Neurotactin</i> könnte ein Vermittler eines Signals von <i>Amalgam</i> sein	206
4.5.3. <i>Disabled</i> könnte als Adapter zwischen <i>Neurotactin</i> und <i>Ableson</i> fungieren	207
4.5.4. Die <i>Ableson</i> Kinase könnte phosphorylierend auf <i>Hippo</i> wirken	208

4.5.5. Als Vermittler zwischen Yorkie und <i>CyclinE</i> kommen Teashirt und Homothorax in Betracht	209
4.6. Könnten der Ballonphänotyp und die gesteigerte Zellproliferation durch Funktionen von Notch verursacht sein?.....	210
4.6.1. Yorkie kann den NB6-4 Phänotyp, aber nicht den Ballonphänotyp retten.....	210
4.6.2. Literaturrecherche lässt einen möglichen Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg erkennen.....	210
4.7. Mögliche Verknüpfung der entschlüsselten Regulationen der <i>Antennapedia</i>-Komplex Gene mit Krebsentstehung.....	212
5. Zusammenfassung	213
6. Literaturverzeichnis	215
7. Anhang.....	237
7.1. Bindestellen-Analyse in der kodierenden Sequenz von Amalgam und der regulatorischen Sequenz 3 kb upstream von <i>Drosophila melanogaster</i> und Vergleich der Sequenzen mit <i>D. pseudoobscura</i> und <i>D. simulans</i>	237
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	241
7.3. Tabellenverzeichnis	244
7.4. Abkürzungsverzeichnis.....	245
7.4.1. Allgemeine Abkürzungen.....	245
7.4.2. Abkürzungen der Gennamen.....	248
7.5. Curriculum Vitae	251
7.6. Eidesstattliche Erklärung.....	252
7.7. Danksagung	253

1. Einleitung

Für den Erhalt seines eigenen Lebens und das seiner Art muss jedes Lebewesen im Austausch mit seiner Umwelt stehen und sehr komplexe Funktionen wie Stoffwechsel und Fortpflanzung durchführen können. Dafür sind spezialisierte Funktionen in distinkten Regionen des Organismus notwendig. Die Regionalisierung eines Körpers in funktionale Einheiten ist dabei eine Voraussetzung für ein Zusammenspiel der unterschiedlichen Funktionen einzelner Körperteile. Dies wird zunächst durch die Entstehung von Polaritätsachsen, anschließender Bildung von repetitiven funktionalen Einheiten und schlussendlicher Entstehung von spezialisierten Segmenten bereits in der frühen Embryonalentwicklung verwirklicht. Insbesondere im Nervensystem ist die Kompartimentierung und Bildung von funktionalen Einheiten für das Lebewesen ein unabdingbarer Entwicklungsvorgang, durch den ein sehr komplexes und extrem fein differenziertes Organ entsteht.

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (nachfolgend *Drosophila* genannt) sind die Vorgänge, die zu Spezialisierungen von Körperregionen und zur Entwicklung des Nervensystems führen in weiten Teilen bereits sehr gut untersucht, und eröffnen so die Möglichkeiten tiefergehender Forschungen. Neben dem bereits vorhandenen großen Wissen wird *Drosophila* als Modellorganismus aufgrund einiger weiterer Annehmlichkeiten gerne verwendet. Beispielsweise sind die leichte genetische Manipulierbarkeit mit einer Vielzahl sehr eleganter Werkzeuge und die kurze Generationszeit, die schnelle Beobachtungen ermöglicht, sehr von Vorteil. Der vergleichbar übersichtliche Körperaufbau, insbesondere des Nervensystems, bietet gute Voraussetzungen für die Entschlüsselung von Zusammenhängen verschiedenster Art. Da durch Konservierung von Genen in anderen, auch höher entwickelten Lebewesen wie Säugetieren und dem Menschen viele Vorgänge und Regulationskreisläufe auf dieselben Grundlagen zurück zu führen sind, sind die Ergebnisse an *Drosophila* häufig Ausgangsbasis für die Erforschung komplexer Zusammenhänge in Wirbeltieren und dem Menschen. Die an *Drosophila* erforschten Zusammenhänge können so auch über Erkenntnisse in der Entwicklungsbiologie hinaus für die medizinische Forschung und Entwicklung wertvolle Ergebnisse liefern.

Unabhängig von einem solchen Nutzen ist das Verstehen von Entwicklungsvorgängen und Prozessen, die zur Entstehung eines Lebewesens führen, elementarer Gegenstand der Biologie. Entwicklung von Leben ist ein faszinierender Prozess, dessen Entschlüsselung durch das Zusammenfügen einzelner Teile zu einem umfassenden größeren Gesamtverständnis immer wieder aufs Neue begeistert. Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit einzelnen Fragestellungen zur Entwicklung des wohl erstaunlichsten Organs, dem Nervensystem. Für die Entstehung einer solch komplexen Struktur sind sehr exakte und vielschichtige Mechanismen notwendig, um distinkte Zellarten und Zellzahlen entstehen und sich

miteinander verknüpfen zu lassen. Die Vorgänge, die zur Identitätsfindung einzelner Zellen führen sind Gegenstände intensiver Forschungen. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird das Gesamtverständnis dieses Prozesses entscheidend weiter voran gebracht.

1.1. Regionalisierung und Kompartimentierung des Körpers führt zu funktionalen Einheiten

Musterbildung und damit die Regionalisierung eines Körpers ist die erste Voraussetzung für die korrekte Formung funktionaler Einheiten und damit für die Interaktionsfähigkeit eines Lebewesens mit seiner Umwelt. Erste Informationen für Regionalisierungen eines Körpers werden bereits in der Eizelle und im noch nicht zellularen Embryo durch Morphogengradienten maternaler Faktoren erteilt. So legt beispielsweise zunächst die maternal bereits in der Oozyte regionalisierte mRNA des Transkriptionsfaktors *bicoid* den anterioren Pol der Eizelle fest. Durch einen Morphogengradienten wird durch Konzentrationsunterschiede in bestimmten Regionen entlang der anterior-posterioren Achse die Expression weiterer Faktoren spezifisch reguliert. Beispielsweise werden die teilweise ebenfalls schon maternal, aber auch in der frühen Oozyte transkribierten Faktoren *caudal* und *hunchback* so reguliert. Es schließen sich weitere zur Gruppe der Lückengene zählende Faktoren an, um die gesamte Eizelle in grobe Abschnitte zu unterteilen. Beim Funktionsausfall eines Lückengens fehlen im späteren Embryo gesamte Körperabschnitte. Derzeit sind mindestens elf zu dieser Gruppe gehörige Gene bekannt, ihre exakten Expressionsdomänen werden durch Kombinatorik der Expression von maternalen und den jeweils anderen Lückengenen reguliert (Akam, 1987; Peel et al., 2005).

Durch diese Expressionsgradienten der verschiedenen Lückengene werden nun die sogenannten Paarregeler in ihrer Expression reguliert. Sie unterteilen den Embryo in die ersten segmentalen Einheiten, indem sie durch abwechselnde Expressionsdomänen in schmalen Streifen je jedes gradzahlige oder ungradzahlige spätere Segment festlegen. Beim Funktionsverlust beispielsweise des Paarreglers *even-skipped* (*eve*) wird jedes zweite Segment nicht gebildet und der spätere Embryo weist nur sieben anstatt der sonst mindestens vierzehn Segmente auf.

Die nun folgenden Gengruppen der Segmentpolaritätsgene legen Parasegment- und Segmentgrenzen und deren Polarität fest und unterteilen den Embryo in drei prozephale, drei gnathale, drei thorakale und elf abdominale Segmente (Juergens, 1987; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Die wichtigsten Kandidaten sind hier *wingless*, *hedgehog* und *engrailed*, die durch eine gegenseitige Regulation die posteriore Grenze eines jeden Segments definieren (Akam, 1987).

Eine weitere Gengruppe übernimmt währenddessen Funktionen, die zur Identitätsfestlegung dieser einzelnen Segmente und Parasegmente führen. Die Funktionen dieser sogenannten Homeotischen Gene, oder auch kurz Hoxgene, sind bei der Entwicklung im gesamten Tierreich verbreitet - auch der Mensch bildet keine Ausnahme (siehe Kapitel 1.3.).

1.2. Grundlagen der Entstehung des Nervensystems von *Drosophila*

Während der frühen Embryogenese wird die Eizelle durch eine komplexe Regulationskaskade über einen Morphogengradienten des Transkriptionsfaktors *dorsal* zunächst in eine ventro-dorsale Achse unterteilt (Govind und Steward, 1991). Entlang dieser Achse werden die einzelnen Abschnitte des Embryos durch die weitere Wirkung von Faktoren spezifiziert. Das ventrale Ektoderm, aus welchem das Nervensystem hervorgeht, wird über die Wirkung des Faktors *Rhomboid* festgelegt (St Johnston und Nusslein-Volhard, 1992). Im Laufe der Entwicklung bildet die paarig angelegte neurogene Region gemeinsam mit der aus dem Mesektoderm hervorgehenden unpaarigen Mittellinie (Poulson, 1950) das ventrale Nervensystem (VNS, auch als Bauchmark bezeichnet). Alle Arthropoden besitzen ein ventrales Nervensystem, welches dem Rückenmark der Wirbeltiere entspricht. Das Gehirn entsteht aus dem procephalen Neuroektoderm (Technau und Campos-Ortega, 1987; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Weiterhin bildet sich ein peripheres Nervensystem aus verschiedenen Anlagen des Embryos aus (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Das VNS wird aus identischen, repetitiven, paarig entlang der Mittellinie angelegten Neuromeren gebildet. Innerhalb dieser ventralen neurogenen Region werden, durch Musterbildungsprozesse gesteuert, sogenannte proneuronale Cluster spezifiziert, die ihre Identität durch die Expression der Gene des *achaete-scute-Komplexes* aufrecht erhalten (Skeath und Carroll, 1994).

Durch einen komplexen Prozess lateraler Inhibition werden pro Hemineuomer ca. 30 neurale Vorläuferzellen (Neuroblasten, abgekürzt als NB; (Doe, 1992) gebildet. Diese späteren NBs werden zunächst aus einer Gruppe von gleichartigen Zellen innerhalb des proneuralen Clusters durch unterschiedliche Expression des zur Gengruppe der neurogenen Gene gehörenden Liganden Delta von den anderen unterschieden. Durch die damit verbundene Aktivierung des Rezeptors Notch in den Nachbarzellen werden diese in ihrer möglichen Entwicklung als neurale Stammzelle durch die Repression proneuraler Gene gehemmt und entwickeln sich stattdessen als epidermale Zellen weiter. Dieser Prozess wird als „laterale Inhibition“ bezeichnet (Artavanis-Tsakonas et al., 1991; Skeath und Carroll, 1994). Die nun determinierten NBs delaminieren in fünf zeitlich aufeinander folgenden Segregationswellen (S1 bis S5) innerhalb der Entwicklungsstadien (St; bestimmt nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) St8 bis spätes St11 in das Innere des Embryos und legen dort den Grundstein für den Aufbau des VNS.

Die durch diesen Vorgang entstehenden Neuroblasten werden zunächst durch die Kombinatorik von Musterbildungsgenen entlang der antero-posterioren, sowie der dorso-ventralen Achse in einer Art kartesischem Koordinatensystem in ihrer Identität spezifiziert (Skeath, 1999). Die Bezeichnung der Neuroblasten als NB1-1 usw. wird aufgrund ihrer Position relativ zu den weiteren Neuroblasten auf der antero-posterioren-Achse sowie der proximo-distalen Achse ausgehend von der Mittellinie getroffen. Diese Benennung lässt eindeutige Zuordnungen der Neuroblasten und ihrer später entstehenden

Zelllinien zu, gleichzeitig beinhaltet sie Informationen über die Position innerhalb eines Segments. Aufgrund des gleichartigen Aufbaus der Neuromere kommt jeder Neuroblast in jedem Segment einmal an analoger Position vor. Abweichungen finden sich in den gnathalen (siehe diese Arbeit und Urbach et al., 2016) und den posterioren abdominalen Segmenten (Birkholz et al., 2013a; Birkholz et al., 2013b).

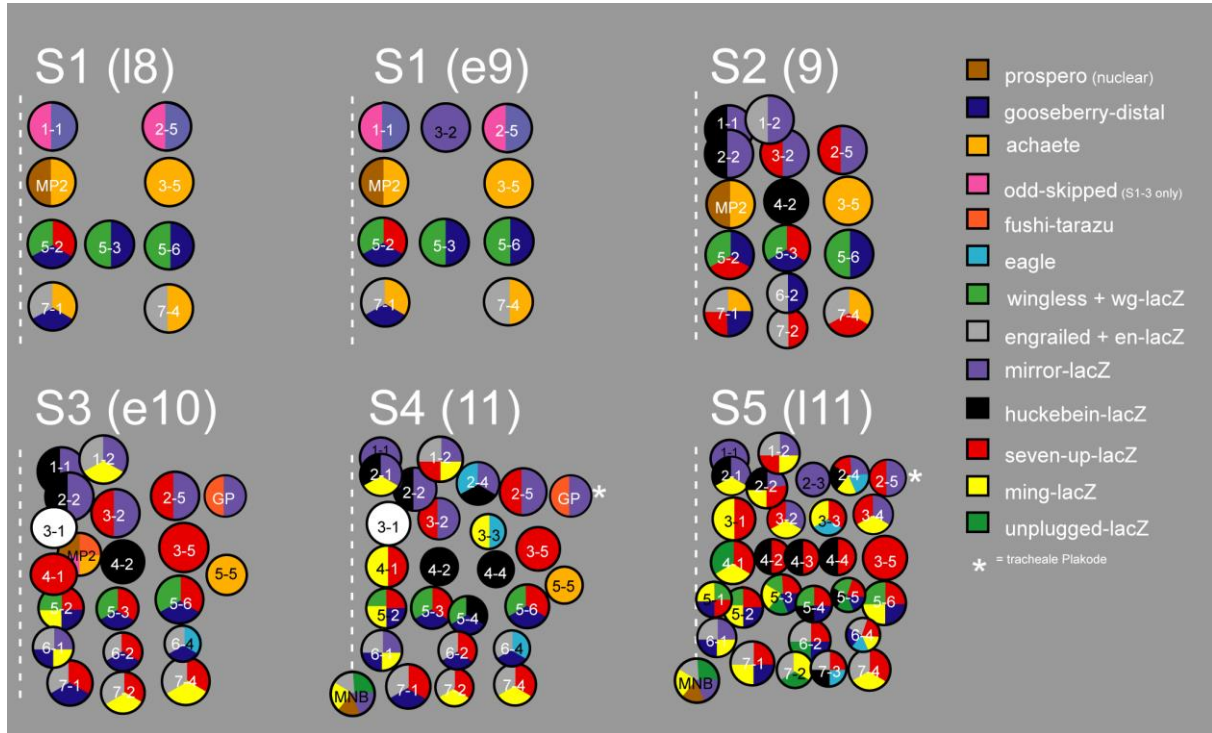


Abb. 1-1.: Neuroblastenkarte mit Markerkombinationen nach Doe 1992 und Broadus und Doe 1995.

Schematische Darstellung eines Hemisegments über den Zeitraum der Delamination der Neuroblasten in fünf aufeinander folgenden Wellen S1 im späten St8 bis S5 im späten St11, die gestrichelte Linie stellt die Mittellinie dar. Alle Neuroblasten sind durch eine jeweilige spezifische Genexpressionskombinatorik in ihrer Identität bezüglich ihrer Position innerhalb des Segments (wiedergegeben durch die Positionsinformation der Nummerierung) und ihrem Entstehungszeitpunkt festgelegt. Diese Genexpressionskombinatoriken werden als Marker verwendet, die hier durch den Farbcode wiedergegeben werden.

Für die Identität der Neuroblasten ist eine jeweils unverwechselbare Kombination an exprimierten Faktoren verantwortlich, die in der Forschung als Marker verwendet werden um einzelne Neuroblasten oder deren Zelllinien spezifisch ansprechen zu können (Doe, 1992). Aufgrund ihrer sich wiederholenden gleichartigen Identität innerhalb jedes Segments werden sie als serielle Homologe bezeichnet, die jeweils innerhalb der gleichen Segregationswellen an gleicher Position delaminieren.

In den Gehirnsegmenten werden etwa 100 Neuroblasten pro Hemisphäre gebildet, die ebenfalls spezifische Proteinkombinatoriken exprimieren und darüber auch in ihrer Identität identifizierbar und einzelnen Segmenten zuzuordnen sind (Urbach und Technau, 2003a; Urbach und Technau, 2003b). Insgesamt sind die zephalen Neuroblasten und die Mechanismen ihrer Spezifizierung im Vergleich zu den Segmenten des ventralen Nervensystems teilweise stark abweichend, einzelne Neuroblasten der

Gerhirnsegmente lassen sich jedoch auch als serielle Homologe zu den Neuroblasten des Thorax oder Abdomens identifizieren (Urbach und Technau, 2004).

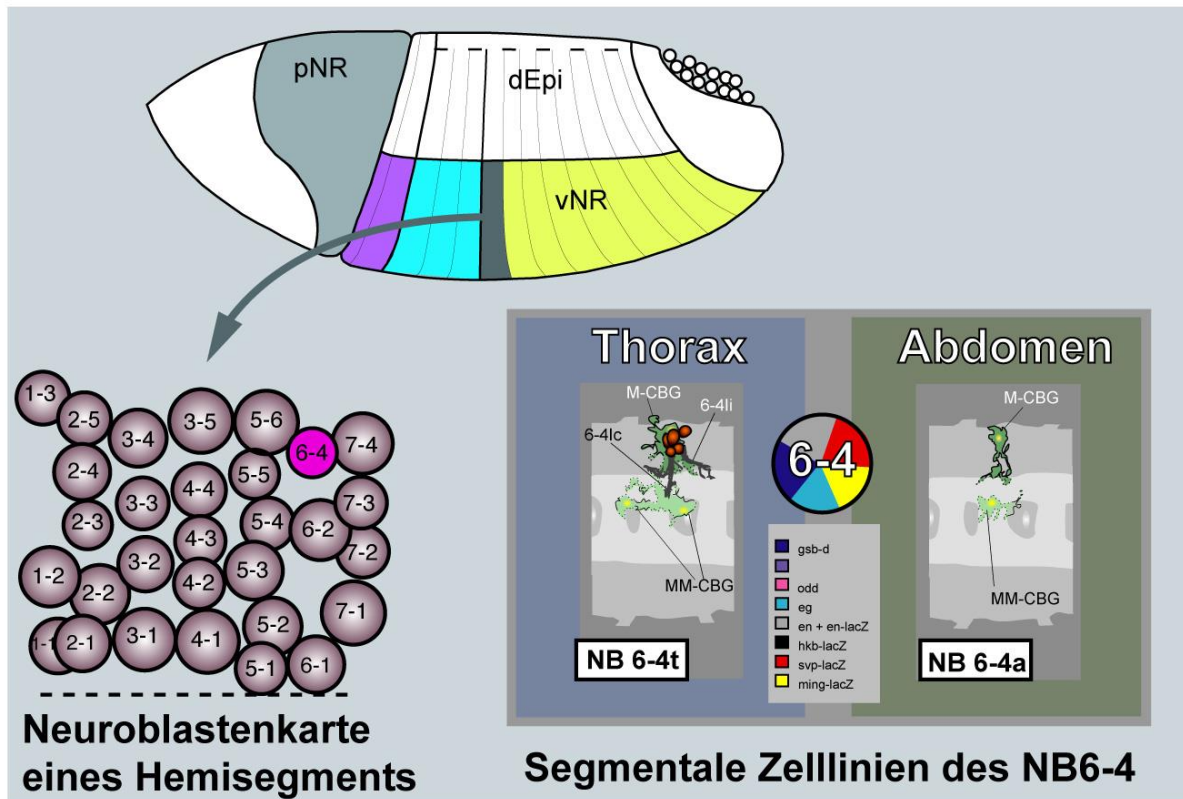


Abb. 1-2.: Ausdifferenzierung von segmentalen Identitäten des Neuroblasten 6-4 aus der ventralen neurogenen Region des *Drosophila* Embryo.

Die neurogene Region des frühen Embryos wird in die procephale neurogene Region (pNR), aus der das Gehirn hervorgeht, und die ventrale neurogene Region (vNR), aus der das ventrale Nervensystem hervorgeht unterteilt. Die vNR kann weiter in drei gnathle (violett), drei thorakale (türkis) und zehn abdominale (gelb) Segmente unterteilt werden. Aus der uniformen Anlage dieser Segmente mit den seriell homologen Neuroblasten jeden Segments werden im Laufe der Embryonalentwicklung segmentale Identitäten der einzelnen Neuroblasten gebildet. Ein Neuroblast, der segmental spezifische Zellstambäume ausbildet, ist der NB6-4. Die Zelllinien des NB6-4 (pink) unterscheiden sich zwischen Thorax (NB6-4t) mit einem neuronalen Cluster (orangene Zellen) und drei Gliazellen (grün) und dem Abdomen (NB6-4a) mit zwei Gliazellen pro Hemisegment. Abbildung verändert mit freundlicher Genehmigung von Christof Rickert.

Aus den Neuroblasten werden anschließend im Laufe der embryonalen Entwicklung Zellstambäume gebildet. Diese gehen aus einer Reihe asymmetrischer Teilungen des NB unter Selbsterhalt hervor, bei denen jeweils eine Gangliemutterzelle gebildet wird. Die Gangliemutterzellen teilen sich anschließend ein einziges Mal, so dass jeweils zwei postmitotische Tochterzellen entstehen (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Fuerstenberg et al., 1998a; Kang und Reichert, 2015). Im Nervensystem von *Drosophila* werden zwei Arten von Zellen, Neurone und Gliazellen, gebildet. Sie entstehen entweder durch einen nur Neurone generierenden Vorläufer, oder aber Glia und Neurone generierenden Neuroglioblasten oder einen ausschließlich Gliazellen generierenden Glioblasten. Die Zellstambäume

aller Neuroblasten des embryonalen VNS sind zumindest für Thorax und anteriore abdominale Segmente durch eindeutige DiI-Markierungsexperimente identifiziert worden (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Schmid et al., 1999). Einige Neuroblasten bilden tagmaspezifisch und segmentspezifisch unterschiedliche Arten und Anzahl von Nachkommenzellen aus. Beispielsweise bildet NB6-4 im Thorax als Neuroglioblast drei Gliazellen und fünf bis sechs Neurone aus, im Abdomen hingegen werden von einem reinen NB6-4 Glioblasten zwei Gliazellen pro Hemisegment gebildet (Abb. 1-2.).

Für die segmentalen Identitäten der Zelllinien der einzelnen seriellen Homologen haben sich die Hoxgene als verantwortlich gezeigt (Berger et al., 2005; Rogulja-Ortmann et al., 2008; Rogulja-Ortmann and Technau, 2008; Tsuji et al., 2008; Birkholz et al., 2013b). Segmentale Spezifizierung von Neuronen und Gliazellen ist vermutlich für die späteren Anforderungen und Funktionen eines jeden Körperabschnitts elementar.

1.3. Hoxgenfunktionen sind für segmentspezifische Identitäten von Zellen entscheidend

Hoxgene wirken als Transkriptionsfaktoren über eine charakteristische Basenabfolge von etwa 60 Basenpaaren, die eine DNA-Bindedomäne enthält. Diese sogenannte Homeodomäne ist zwischen den einzelnen Tiergruppen hochkonserviert und findet sich in allen Hoxgenen wieder. In *Drosophila* lassen sich die bisher bekannten Hoxgene in zwei Cluster unterteilen, den *Antennapedia*-Komplex (*Antp*-K; Kaufman et al., 1980), der die homeotischen Gene *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) und *Antennapedia* (*Antp*) umfasst, und den *Bithorax*-Komplex (*Bth*-K; Lewis, 1978) mit den Genen *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abdA*) und *Abdominal-B* (*AbdB*). Die Zusammenfassung als Komplexe ist impliziert durch die Anordnung der Gene auf dem Chromosom, bei *Drosophila* Chromosom 3R, in zwei Komplexen hintereinander. Die Expressionsdomänen der einzelnen Hoxgene innerhalb des Körpers entsprechen in der Abfolge ihrer Anordnung auf dem Chromosom, was mit dem Begriff der Colinearität zusammengefasst wird (Lewis, 1978; Duncan, 1987). Durch Evolution wurden die Anzahl der einzelne Hoxgene und deren Zugehörigkeiten zu sich manifestierten Genkomplexen zwischen den verschiedenen Tiergruppen teilweise verändert. Trotzdem sind die Gene hoch konserviert und es finden sich in allen Spezies Paraloge, die bis heute dieselben Merkmale und ähnliche Funktionen aufweisen (Lemons und McGinnis, 2006).

Die Expressionsdomänen der einzelnen Hoxgene werden in der frühen Embryogenese durch die Kombination von Konzentrationsgradienten von Lückengenen, sowie von Segmentpolaritätsgenen festgelegt (Ingham und Martinez-Arias, 1986; Carroll et al., 1986b; McGinnis et al., 1990). Manifestiert werden die Expressionsdomänen durch Regulationen der Hoxgene untereinander, durch Autoregulation, sowie durch Gene weiterer Gengruppen der Polycomb und Trithoraxgruppe (Kennison, 1995; Schuettengruber et al., 2007).

Hoxgene sind ein Teil des Netzwerks, dessen Ziel ein funktionierendes Lebewesen ist. Sie wirken darin als Transkriptionsfaktoren auf nachgeschaltete Gene, die ihrerseits weitere Funktionen steuern. Diese von den Hoxgenen beeinflussten Faktoren werden auch Realisatoren genannt, da sie die Hoxgenfunktion durch Wirkungskaskaden realisieren (Garcia-Bellido, 1975). Hoxgene wirken auf die Identitätsfindung von Zellen in allen aus den Keimblättern entstehenden Geweben. So ebenfalls im Neuroektoderm, aus welchem sich das Nervensystem entwickelt. Sie vermitteln hier über die transkriptionelle Regulation weiterer Faktoren beispielsweise die segmentspezifische Ausbildung von Zellstammbäumen der Neuroblasten. Dies wird über verschiedene Wege wie die Beeinflussung programmierten Zelltods, des Zellproliferationsverhalten oder der segmentspezifischen Bildung von Neuroblasten realisiert (Rogulja-Ortmann und Technau, 2008; Reichert und Bello, 2010; Birkholz et al., 2013a; Birkholz et al., 2013b; Urbach et al., 2016).

Spannend ist die zellspezifische Wirkungsweise von Hoxgenen, die zunehmend immer weiter entdeckt wird (Capovilla und Botas, 1998; Heuer et al., 1995; Miller et al., 2001; Foronda et al., 2006), nachdem in den Anfängen der Forschung eher die Tendenz nach Erkennen von allgemeingültigen Regeln bestand. So wurde in der Vergangenheit sehr intensiv die Regulation der Hoxgene untereinander untersucht, was zum Modell der Posterioren Prävalenz führte und die bekanntesten und offensichtlichen Phänotypen von Funktionsverlustmutationen erklären konnte (Kaufman et al., 1980; Harding et al., 1985; Akam, 1987; Gonzalez-Reyes und Morata, 1990; Duboule und Morata, 1994). Dieses Modell beinhaltet die Beobachtungen, dass weiter posterior exprimierte Hoxgene die Expressionsgrenze des weiter anterioren Gens kontrolliert. Fällt die Funktion des posterioren Gens weg, so breitet sich das anterior exprimierte in die weiter posteriore Region aus. In diesem Fall wird von einer homeotischen Transformation eines Segments gesprochen, von einer Veränderung in eine andere Segmentidentität (Zusammenfassung siehe McGinnis und Krumlauf, 1992). Es werden so bekannt gewordene, gut sichtbare Phänotypen verursacht. Beispielsweise kommt es durch den Funktionsverlust von *Ubx* zu einer Verdopplung des zweiten thorakalen Segments, das Flügel ausbildet, auf das anteriore dritte thorakale Segment, das normalerweise Halteren ausbildet, nun jedoch Flügel aufweist. Dies geschieht durch die nun fehlende Repression von *Antp* durch *Ubx*, dessen Expression sich daher in den weiter posterioren Bereich ausbreitet und so im dritten thorakalen Segment (T3) Flügelbildung induziert (Lewis, 1978). Beim Funktionsverlust aller Hoxgene bilden sich alle posterioren Segmente in der Identität von Segment T2 aus. Dies führte zur Aufstellung der Lewis-Hypothese, die besagt, dass T2 den Grundzustand der segmentalen Identität bildet, für den keine Hoxgenfunktion notwendig ist.

1.4. Mangelnder Wissensstand über das VNS der gnathalen Segmente

Die Erkenntnisse über die Wirkungsweisen und Funktionen von Hoxgenen im VNS von *Drosophila* beziehen sich bisher meist auf die Gene des *Bithorax*-Komplexes, da diese in den leichter zu untersuchenden Segmenten des posterioren Thorax und des Abdomens exprimiert werden. Insbesondere

im Nervensystem sind die weiter anterior gelegenen gnathalen Segmente und auch die Segmente des Gehirns schwieriger zu erforschen. In den gnathalen Segmenten wird das Gewebe durch die beginnende Auffaltung der Hemisphären während der Embryogenese morphologisch stark verändert und die Kopfkapsel verweigert einen direkten Zugang. Daher wurden diese Segmente bei der Erforschung von Musterbildungsprozessen bisher weitestgehend ausgespart. Zentrale Fragen sind hier erst in Ansätzen geklärt, beispielsweise ob und welche seriellen Homologen der thorakalen und abdominalen Segmente sich im VNS der gnathalen Segmente entwickeln (Urbach et al., 2016). Weiterhin wurde mit einer klonalen Analyse der gnathalen Zelllinien mithilfe der DiI Technik begonnen, die erlaubt, einzelne Zelllinien zu markieren und ihre Morphologie, ihr Projektionsmuster und ihre Zellzahl am Ende der Embryonalentwicklung zu bestimmen (persönliche Mitteilungen von Karin Lür-Kirsch). Neben diesen vielversprechenden Anfängen ist bisher nichts über die sich entwickelnden Zelllinien und ihre Identitäten in einzelnen gnathalen Segmenten, sowie über die Vorgänge zur Entwicklung segmentaler Identitäten von Neuroblastenlinien bekannt. Dabei spielen die gnathalen Segmente eine sehr interessante Rolle in der Entwicklung des VNS. Sie bilden eine Verbindung zwischen Bauchmark und Gehirn, welches nach bisherigem Wissenstand in grundlegenden Prozessen der Musterbildung abweichend vom VNS reguliert wird (Urbach und Technau, 2003a; Technau et al., 2006; Urbach und Technau, 2008; Seibert et al., 2009). Es ist somit eine zentrale Fragestellung, wie Musterbildungsprozesse und die Herstellung segmentaler Identität in den gnathalen Segmenten reguliert werden.

Die vorliegende Arbeit bildet die erste detaillierte Untersuchung über eine Gruppe von gnathalen Zelllinien und deren Ausprägung von segmentaler Identität durch den Einfluss der dort exprimierten Hoxgene und weiterer, bisher nicht in diesen Zusammenhang gestellter Faktoren.

1.5. Ausgangshypothesen und Grundlagen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit baut auf Ergebnissen, die im Rahmen meiner Diplomarbeit gefunden wurden, auf. Die Fragestellungen dieser Arbeit ergeben sich aus den offenen Fragestellungen und Beobachtungen der Diplomarbeit (Diplomarbeit Henrike Becker, 2008). Die wichtigsten Ergebnisse der Diplomarbeit sind daher in diesem Kapitel kurz zusammengefasst, um die sich ergebenden Fragestellungen der vorliegenden Arbeit zu erläutern. Teilweise werden die Ergebnisse der Diplomarbeit in den entsprechenden Kapiteln dieser Arbeit noch einmal aufgegriffen, sofern dies für das Verständnis der durchgeführten Untersuchungen grundlegend ist. Diese Ergebnisse werden an entsprechender Stelle deutlich als Diplomarbeitsergebnisse gekennzeichnet.

Folgende Ergebnisse der Diplomarbeit bilden die Ausgangslage der hier vorliegenden Arbeit:

eagle (eg) ist als Markergen für die gnathalen NB6-4 geeignet. Es wird bereits im delaminierenden NB6-4 des maxillaren und labialen Segments exprimiert (Abb. 1-3, siehe auch Kapitel 3.1.). NB6-4 bildet im wildtypischen Zustand unter dem Einfluss der Hoxgene *Dfd* und *Scr* im Maxillarsegment eine spezifische segmentale Identität aus (Abb. 1-3 und siehe auch Kapitel 3.2.), die aus vier Gliazellen pro Hemisegment besteht. Im Labialsegment wird hingegen eine gemischte Zelllinie aus drei Gliazellen und einem aus fünf bis sechs Zellen bestehenden neuronalen Anteil gebildet, die der thorakalen Identität gleicht. Die Ausbildung der labialen Identität des NB6-4 ist unabhängig von dem im Wildtyp exprimierten Hoxgen *Antp*. Die weiteren Gene des *Antp*-K, *lab* und *pb*, werden nicht in den gnathalen NB6-4 exprimiert.

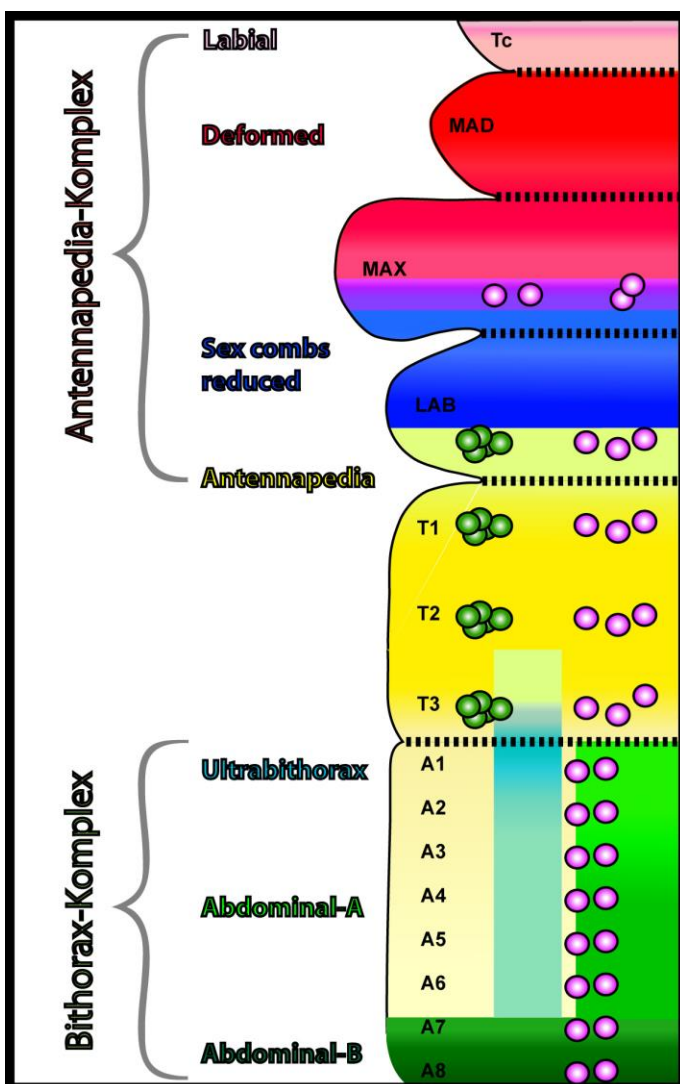


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Expressionsdomänen von Antennapedia- und Bithorax-Komplex Genen im WT im NB6-4 mit segmentalen Zelllinienidentitäten des NB6-4.

Schematische Darstellung einer Körperhälfte eines filetpräparierten Embryos mit besonderem Fokus auf die gnathalen Segmente. Die unterschiedlichen Expressions-domänen der einzelnen Hoxgene im VNS sind jeweils farblich dargestellt. Lab (rosa), Dfd (rot), Scr (blau), die überlappende Expression von Dfd und Scr im Maxillarsegment ist in magenta dargestellt, Antp (gelb), Ubx (türkis), AbdA und AbdB (grün). Die Zelllinien des NB6-4 umfassen Gliazellen (magenta) und Neurone (grün) und werden in unterschiedlichen Segmenten unter dem Einfluss der jeweils exprimierten Hoxgene segmental spezifisch in ihrer Identität ausgebildet. Die Segmentgrenzen sind durch schwarze gestrichelte Linien gekennzeichnet. Benennung der Segmente: Tritocerebrum (Tc), Mandibularsegment (Mad), Maxillarsegment (Max), Labialsegment (Lab), thorakale Segmente (T1-T3), abdominale Segmente (A1-A8). Diese Kennzeichnung wird in den folgenden Abbildungen beibehalten.

Der neuronale Anteil des labialen NB6-4 wird in Abhängigkeit von der Funktion des in diesem Zusammenhang in Thorax und Abdomen als verantwortlich identifizierten Faktors *CylineE* (*CycE*; Berger et al., 2005) gebildet. In *CycE* Funktionsverlustmutanten werden Neurone des maxillaren NB6-

4 nur noch in 65%, anstatt wie im WT in 100%, gebildet. Ektopisch exprimiertes *CycE* führt zu ektopisch gebildeten Neuronen des maxillaren NB6-4 in 12%. *Dfd*, welches im Wildtyp im maxillaren NB6-4 exprimiert ist, unterdrückt vermutlich über die Repression von *CycE* die Entstehung von Neuronen. Ektopisch exprimiertes *Dfd* kann in 74% die Entstehung von NB6-4 Neuronen im Labialsegment und in thorakalen Segmenten verhindern (siehe auch Kapitel 3.3.).

Anders als im Abdomen, wo *abdA* in den Segmenten A1 bis A6 bzw. *AbdbB* in Segment A7 und A8 die Entstehung von Neuronen des NB6-4 über die Repression von *CycE* in 100% verhindert (Berger et al. 2005), ist *Dfd* im Maxillarsegment nur in rund 60% der Hemisegmente erfolgreich in der Repression von neuronaler Identität und von *CycE*. Das wird durch die Analyse der Transformationsraten des maxillaren NB6-4 von 43% hin zu einer labialen oder thorakalen Identität in *Dfd* Funktionsverlustmutanten deutlich (Abb. 1-4, vergleiche auch Kapitel 3.2.). *Scr* ist trotz seiner Expression im maxillaren NB6-4 nur marginal an der Repression von neuronalem Schicksal beteiligt, Funktionsverlust führt zu 10% Transformation von einer rein glialen Identität hin zu gemischter Identität aus Neuronen und Gliazellen.

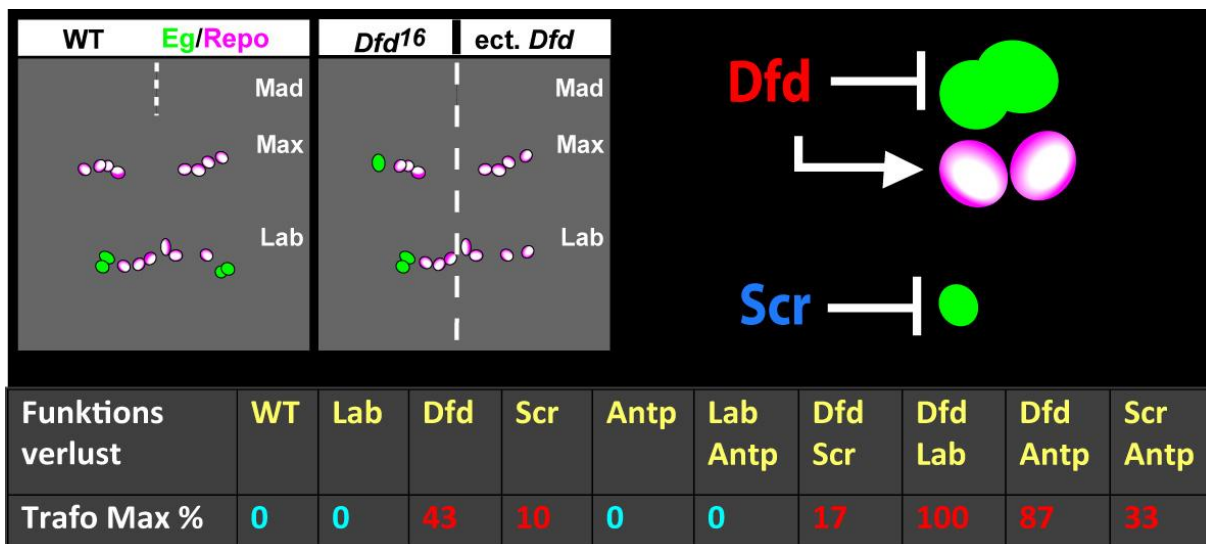


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der gnathalen Identitäten des NB6-4 im WT und bei Veränderung von Antennapedia-Komplex Gen Funktionen.

Schematische Darstellung der maxillaren und labialen Identitäten der NB6-4 Zelllinien im WT und bei veränderter Funktion von *Dfd* und *Scr* (oberer Bildteil). Im WT werden im Maxillarsegment rein gliale Zellidentitäten (magentafarbene Zellen) gebildet. Im Labialsegment entstehen Neurone (grün) und drei Gliazellen pro Hemisegment (Panel ganz links). Bei *Dfd* Funktionsverlust entstehen im Maxillarsegment ectopische Neurone (linke Seite des rechten Panels). Bei ectopischer Expression von *Dfd* kommt es zum Verlust der neuronalen Identität im Labialsegment (rechter Teil des rechten Panels). Im rechten oberen Bildteil ist der Einfluß von *Dfd* mit hemmender Funktion auf neuronale Identität und Förderung von glialer Identität verdeutlicht. *Scr* hingegen hat gering hemmenden Einfluss auf die Entstehung neuronaler Identität, ektopisch exprimiertes *Scr* hat jedoch keinen Einfluss auf die Förderung von rein glialer Identität der Zelllinien des Labialsegments.

Die Tabelle (unterer Bildteil) enthält die unterschiedlichen Transformationsraten des NB6-4 des Maxillarsegments hin zu labialer/thorakaler Identität bei Funktionsverlust der entsprechenden Gene.

Im Gegensatz zu ektopisch exprimiertem *Dfd*, das den NB6-4 labialer und thorakaler Segmente hin zu maxillarer Identität verändern kann, hat ektopisch exprimiertes *Scr* keinen Einfluss auf segmentale Identitäten.

Entgegen der Erwartung führt doppelter Funktionsverlust von *Dfd* gemeinsam mit *Scr* nicht zu einer Steigerung der Transformationsrate auf etwa 50%, sondern auf eine Reduktion gegenüber der Einzelmutation von *Dfd* auf 17% (vergleiche Tabelle in Abb. 1-4).

Eine 100%ige Transformation geschieht erst, wenn zusätzlicher Funktionsverlust von *Dfd* gemeinsam mit *lab* oder mit *Antp* vorliegt. Alleiniger Funktionsverlust von *lab* oder *Antp*, oder doppelter Funktionsverlust von *lab* gemeinsam mit *Antp* führt zu keiner Veränderung der segmentalen Identität des NB6-4max. Weder *lab* noch *Antp* werden im Maxillarsegment exprimiert (vergleiche Kapitel 3.4.).

1.6. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Aus den Ergebnissen und Beobachtungen der Diplomarbeit ergeben sich einige konkrete Fragestellungen:

1. Die Expression des als Marker verwendeten Faktors Eg in den gnathalen Segmenten ist bisher nur in Anfängen geklärt. Hauptsächlich wurde sich in der Diplomarbeit auf den NB6-4 bezogen, sowie ansatzweise auf NB3-3 und NB7-3. Es finden sich neben den bereits aus posterioren Segmenten als Eg positiv bekannten seriellen Homologen jedoch weitere Eg positive Zellen innerhalb der gnathalen Segmente. Welche Identitäten haben diese Zellen und wie entwickeln sich alle Eg positiven Zelllinien über die gesamte Embryonalzeit?
2. Sind für die verschiedenen Eg positiven Neuroblastenlinien segmentale Identitäten erkennbar? Der Einfluss der *Antp*-K Gene wurde bisher nur für NB6-4 analysiert. Gibt es einen Einfluss auf die segmentale Identität anderer Eg positiver Neuroblastenlinien, insbesondere der als Eg positiv bekannten seriellen Homologen? Lassen sich Vergleiche der segmentalen Spezifizierung zu NB6-4 ziehen?
3. Die Transformationsraten des maxillaren NB6-4 bei unterschiedlicher Kombination des Funktionsverlustes von Hoxgenen lassen sich bisher nicht erklären. Daher ergibt sich die Frage, durch welche Vorgänge der Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* gemeinsam mit *Dfd* (oder *Scr*) Einfluss auf die Herstellung segmentaler Identität des NB6-4max nehmen kann? Und warum reduziert gleichzeitiger Funktionsverlust von *Dfd* mit *Scr* die Transformationsrate, anstatt sich miteinander zu addieren?
4. Die unterschiedliche Transformationsrate von 43% des NB6-4max in *Dfd* Mutanten im Vergleich zu 100% des abdominalen NB6-4 in *abdB* oder *AbdB* Mutanten lassen einen unterschiedlichen Einfluss auf *CycE* vermuten. Damit könnte auch das Teilungsverhalten des abdominalen NB6-4 mit zwei Gliazellen

versus dem des maxillaren NB6-4 mit vier Gliazellen verbunden sein. Wie wirken *Dfd* und *abdA* auf *CycE*? Welche Funktionen haben verschiedene Hoxgene über diesen Weg auf Zellproliferation?

5. Weiterhin lassen sich in den Mutanten der *Antp*-K Gene ektopische Neurone des NB6-4 in abdominalen Segmenten beobachten. Über welchen Mechanismus können die anterior exprimierte Hoxgene abdominale segmentale Identität beeinflussen?

1.7. Ausblick auf die Ergebnisse der Arbeit

Aus diesen Fragestellungen ergab sich zunächst die Notwendigkeit, das gnathale Expressionsmuster und die Identität der Eg positiven Neuroblasten genauestens über die gesamte Entwicklungszeit hin zu charakterisieren: Der Transkriptionsfaktor Eg wird in den gnathalen Segmenten in einem abweichenden Muster im Vergleich zu weiter posterioren Segmenten exprimiert. Im Laufe der embryonalen Entwicklung beginnen Sub-Populationen mehrerer Neuroblastenlinien Eg zu exprimieren, was über die Zeit ein extrem komplexes Expressionsmuster entstehen lässt. Alle Identitäten der zusätzlichen Eg positiven Neuroblastenlinien konnten identifiziert werden. Die Eg Expression dieser Zelllinien ist von der Expression der *Antp*-K Gene abhängig. In diesem Zusammenhang wurde auch im Thorax eine weitere Eg positive Subpopulation einer Neuroblastenlinie, dem NB3-2, identifiziert.

Ein Hauptaugenmerk der Arbeit lag auf der Klärung der Effekte von Funktionsverlust von *lab* und *Antp* gemeinsam mit *Dfd* auf den maxillaren NB6-4. Um dabei möglicherweise beteiligte Faktoren zu identifizieren, wurde ein „Miniscreen“ durchgeführt und die darin gefundenen Kandidaten auf ihren Einfluss auf die segmentale Identität des NB6-4 untersucht. Es konnten einige Faktoren identifiziert werden, die eine Funktion für die Festlegung der segmentalen Identität des NB6-4 im Maxillarsegment oder aber auch in anderen Segmenten haben.

Über die identifizierten Faktoren konnte ein doppelter Regulationsmechanismus von direkter zellautonomer Hoxgenfunktion einerseits, gemeinsam zu parallel verlaufender nicht-zellautonomer Hoxgenfunktion zur Regulation der segmentalen Identität des maxillaren NB6-4 gefunden werden. Der nicht-zellautonome Weg vermittelt über die bisher nicht im Zusammenhang mit Hoxgenfunktionen bekannten Faktoren Amalgam, Neurotactin, Disabled und der Ablason-Tyrosin Kinase ein Signal auf den Hippo/Salvador/Warts Signalweg. Sowohl dieser nicht-zellautonome, als auch der direkte zellautonome Weg über die Funktionen von *Dfd* und *Scr* enden in einer Regulation des bereits als Schlüsselfaktor für die Entstehung neuronaler Identität des NB6-4 bekannten Faktor *CycE*, und regulieren darüber die Entstehung der segmentalen Identität der maxillaren NB6-4 Zelllinie.

Die vorliegende Arbeit bildet durch die erste Untersuchung zur Entstehung segmentaler Identität bestimmter Neuroblasten und ihrer Zellstammbäume in den gnathalen Segmenten von *Drosophila melanogaster* eine grundlegende Forschungsarbeit. Darüber hinaus konnten neue Interaktoren von

Hoxgenen ermittelt werden. Weiterführend wurde über die Entschlüsselung eines nicht-zellautonomen Regulationswegs eine neue Dimension von möglichen Hoxgen Funktionen und Einflüssen im VNS aufgedeckt. Diese Ansätze bilden eine neue und vielschichtige Grundlage für weiterführende Forschung im Bereich der Entwicklungsbiologie.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Geräte

2.1.1. Verwendete Chemikalien

Chemikalien, Enzyme und Kits in Analysequalität wurden von folgenden Firmen verwendet: MBI Fermentas, Merck, Roche, Roth, Peq Lab, Promega, Genterprise Genomics, Santa Cruz, Operon, Vector, Qiagen, Bionline und Sigma-Aldrich. Abweichungen hiervon werden gesondert erwähnt.

2.1.2. Lösungen

Tab. 2-1: Verwendete Lösungen und Chemikalien.

Ablagebrei für Eiablagen aus Apfelsaft-Agar	28-35g Agar-Agar in 1l Apfelsaft aufkochen und in PVC- Kulturgefäße gießen, bei 4°C lagern
AP-Detektionslösung (pH 9,5)	2ml 5M NaCl, 5ml 1M MgCl ₂ , 10ml 1M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1ml Tween 20, mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen
AP-Färbelösung	66µl 5% NBT in 70% N,N-Dimethylformamid (DMF), 33µl 5% BCIP in 100% N,N-Dimethylformamid (DMF), in 10ml AP-Detektionslösung
Coomassie Färbelösung	Coomassie Blue 1,25g, Isopropanol 227 ml, Eisessig 46 ml auf 500 ml Aqua dest.
DAB-Färbelösung	1 Tablette (10mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) auf 20ml PBS
DEPC-H ₂ O	1l H ₂ O und 1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC), über Nacht inkubieren und am nächsten Tag autoklavieren
Detektionspuffer für alkalische Phosphatase-Lösung	412 ml H ₂ O, 10 ml 5M NaCl, 25 ml 1M MgCl, 50 ml 1M Tris pH9,5, 0,5 ml Tween20
EB-Puffer (Qiagen)	10ml 1M Tris-HCl, pH 8,5 - autoklavieren

Material und Methoden

Extraktionspuffer	1µl Proteinase K (20mg/ml), 10ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 1ml 5M EDTA (Ethylendiamintetraacetat), 25ml 5M NaCl
Fixativ für Antikörperfärbung und in situ Hybridisierung	450µl PBS , 500µl Heptan , 50µl Formaldehyd (37%)
Gel	Trenngel: Aqua dest., 1.5M Trisp pH 8,8, 10% SDS, 30% Acrylamid, 10% APS, TEMED Sammegel: 1M Tris pH 6,8, ansonsten identisch
Glycerol 70%	70ml 100% Glycerol, 30ml 1x PBS
Hybridisierungspuffer für in situ Hybridisierung	20ml Formamid, 12,5ml 20x SSC (Saline Sodium Citrat)-Puffer, 17,5ml DEPC-H ₂ O, 50µl Tween 20
Ladepuffer (6x von Fermentas)	10mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylen Cyanol, 60% Glycerol, 60mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)
Lämmli-Auftragungspuffer	0,09M Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerol, 2% SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), 0,02% Bromphenolblau, 0,1M DTT (Dithiothreitol)
LB-Medium	10g Trypton, 10g NaCl, 5g Hefe Für Agarplatten Zugabe von 15g Agar auf 1l Aqua dest. auffüllen
Lysispuffer A	400µl 1M Tris-HCl, 800µl 0,5M EDTA, 200µl 2M NaCl, 200µl 10% SDS, 2400µl Aqua dest.
NBT/X-Phosphat-Färbelösung	1 ml Detektionspuffer, 4,5 µl NBT (Nitroblau-tetrazoliumchlorid; 50mg/ml in 70% DMF), 3,6 µl BCIP (X-Phosphat;5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat; 50mg/ml in 70% DMF) DMF= Dimethylformamid
20x PBS (pH 7,4) (Phosphate Buffered Saline)	500ml H ₂ O, 75,97g NaCl, 4,14g Na ₂ HPO ₄ , 9,94g NaH ₂ PO ₄ pH-Wert mit 10M NaOH bzw. konz. HCl einstellen

Material und Methoden

	1x PBS mit HCl auf pH 6,5 bzw. pH 7,2 einstellen
PBT (0,3%)	300ml 1x PBS, 900µl Triton X-100 1x PBT mit HCl auf pH 6,5 einstellen
PBTween	1l 1x PBS, 1ml Tween 20 1x PBTween mit HCl auf pH 7,2 einstellen
Stripping Buffer	100mM Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5ml Tris-HCl pH6,8
Transfer Puffer 1X	Glycin 14,4g, Tris-HCl 3,03g auf 1l Aqua dest., pH 8,5
50x TAE-Puffer	242g Tris, 57,1ml Eisessig, 100ml 0,5M EDTA (pH 8), pH 8 mit HCl einstellen, mit Aqua dest. auf 1l auffüllen
TBS (pH 7,5) (Tris Buffered Saline)	6,05g Tris-HCl, 8,76g NaCl mit Aqua dest. auf 1l auffüllen
TNB-Puffer	10ml 1M Tris pH 7,5, 3ml 5M NaCl, 0,5g "Blocking Reagent" auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen, erhitzen und filtrieren
TNT-Puffer	3,76ml 2M NaCl, 5ml 1M Tris pH 7,5, 25µl Tween 20 auf 50ml mit Aqua dest. auffüllen
Western Blocking Reagent und Blocking Lösung	Roche, 10% ig in TBS Puffer
Weitere verwendete Chemikalien	Agarose, Amphotericin (75ng/ml), Butanol, 15%ige Chlorbleichlauge (Natriumhypochloridlösung), Chloroform, Ethanol (EtOH) 70% und 100%, Ethidiumbromid (1mg/ml), Isopropanol, Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Methanol, 1%iges

Natriumazid (NaN_3), n-Heptan (C_7H_{16}), 30%iges
Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Sojamilch

2.1.3. Verwendete Laborgeräte

Tab. 2-2: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Binokular	M8	Wild
Fluoreszenzmikroskop	BX 50 WI	Olympus
Gelkamera	Quickstore	MS Laborgeräte
Gelkammer	HE99X	Hoefler
Gelkammer	HE33	Hoefler
Heizblock	TB 1 Thermoblock	Biometra
Inkubator	Fricocell	MMM Medcenter
Inkubator	WTB Binder	Labotec
Kamera	ProgRes 3012	Kontron Elektronik
Kamera	Axiocam	Zeiss
Konfokales Lasermikroskop	TCS SPII und SP5	Leica
Magnetrührer	MR3001	Heidolph
Mikroskop	Axioplan	Zeiss
Mikrowelle	R-210A	Sharp
Netzteil	GPS 200/400	Pharmacia
Netzteil	LKM 2002	LKB Brommer
PCR Maschine	TGradient	Biometra
PCR Maschine	TPersonal	Biometra
pH-Meter	CG840	Schott
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf
Schüttler	Vortex Genie	Bender & Hobein AG
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Vakuumpuller	Speedvac SPD101B	Savant
Vertikalpuller	P-30	Sutter

Material und Methoden

Waage	PM 4600	Mettler
Waage	AM50	Mettler
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5410	Eppendorf

2.1.4. Gebrauchsmaterialien

Objektträger, Deckgläser (22x22mm), PVDF-Membran., Pinzette, Skalpell, Pasteur- und Eppendorfpipetten, mit Knetgummi ausgekleidete Petrischalen zur Aufbewahrung der Glaskapillaren, Eppendorfreaktionsgefäße (0,2ml; 1,5ml; 2ml), Sarstedtreaktionsgefäße (15ml; 50ml), Wägeschälchen, Schere, Bunsenbrenner, Küvetten, Gazenetzchen, Etiketten, Alufolie, Glaskapillaren, Glaspipetten, Präpariernadeln, Pinzetten, Whatman-Papier

2.1.5. Verwendete Software

Tab. 2-3: Verwendete Software.

Acrobate 9 PRO	Adobe
Axiovision 4.1.1.	Visage Imaging
Chromas Lite 2.01	Technelysium
EndNote X2	Thomson
File Maker Pro7	Filemaker
Flash Player 11	Adobe
Illustrator CS4	Adobe
LAS AF	Leica
Leica confocal software	Leica
Office 2010	Microsoft
Photoshop CS4	Adobe
Quick Time Player	Apple
Volocity Demo 6.1.1	Perkin Elmer

2.2. Fliegenarbeit

2.2.1. Haltung der Fliegen

Die Haltung von *Drosophila* erfolgt bei 25°C (Generationszyklus etwa 220 Stunden), oder bei 18°C (Generationszyklus 440 Stunden; Ashburner et al., 1982) in Kulturgefäßen mit luftdurchlässigem Schaumstoffverschluss auf Standard Futtermedium (siehe oben). Um eine dauerhafte Population der Fliegen aufrecht zu erhalten werden sie 14tägig in frische Kulturgefäße überführt. Zu diesem Zeitpunkt schlüpft die Tochtergeneration, so dass junge Fliegen für die weitere Zucht zur Verfügung stehen.

2.2.2 Eiablagen

Um eine ausreichende Menge an Eiablagen zu erhalten, werden die Fliegen in kurzen Abständen in neue Kulturgefäße überführt und anschließend eine ausreichende Menge junger Fliegen für die Eiablage in mit Apfelsaftagar gefüllte Zuchtgefäße gebracht. Die Fliegen werden sowohl vor der Überführung als auch während der Eiablage mit Trockenhefe gefüttert, um ihre Legebereitschaft zu erhöhen. Je nach benötigtem Entwicklungsstadium der Embryonen erfolgt die Ablage über Tag (ca. 8 Stunden, Entwicklungsstadium 0 bis St11) oder über Nacht (ca. 16h alle Entwicklungsstadien).

2.2.3. Balancieren von Fliegenstämmen

Die meisten Mutationen sind bereits embryonal letal, daher können keine homozygot mutanten Stämme gehalten werden. Um weiterhin einen heterozygot mutanten Zustand aufrecht zu erhalten, muss der Verlust der Mutation durch einseitige Weitergabe der nicht veränderten Chromatiden oder Verlust des Mutationsereignisses durch Rekombination verhindert werden.

Zu diesem Zweck werden Balancerchromosomen (z.B. *CyO*; Lindsley und Zimm, 1992) eingesetzt. Sie verhindern durch große invertierte Bereiche Rekombinationen und enthalten zudem Lethalfaktoren, die im homozygoten Zustand zum Tod des Embryos oder der Larve führen. So ist gewährleistet, dass die Mutationen immer im heterozygoten Zustand an die Nachkommen weitergegeben werden. Da für die Versuche jedoch homozygot mutante Embryonen benötigt werden, ist es notwendig, bereits früh embryonal nachweisbare Marker auf dem Balancer zu integrieren. Um durch Kreuzung der Fliegenlinie einen früh embryonalen Marker tragenden Balancerstamm einzukreuzen sind zudem äußerlich sichtbare Marker für die Auswahl der adulten Fliegen zur Gründung des neu balancierten Stamms notwendig.

2.2.4. Kreuzungen

Für Kreuzungen werden generell jungfräuliche Fliegenweibchen verwendet um sicherzustellen, dass die gewünschten genetischen Kombinationen entstehen. Die Kutikula der frisch geschlüpften Fliege benötigt für ihre Aushärtung etwa 6h, in dieser Zeit ist noch keine erfolgreiche Paarung möglich. Daher werden zunächst alle adulten Fliegen eines Kulturröhrchens entfernt und alle vier Stunden (bei 25°C) die neu geschlüpften Tiere unter Betäubung mit CO₂ unter dem Binokular nach Geschlecht getrennt.

2.2.5. Ektopische Genexpression mithilfe des GAL4-UAS Systems

Über das Gal4-UAS System können Gene räumlich und zeitlich sehr elegant gezielt in unterschiedliche Regionen des Embryos exprimiert werden (Brand und Perrimon, 1993; Abb. 2-1). Im Gal4 Stamm befindet sich durch Insertion eines transposablen Elements das Gen für Galaktosidase (Gal) unter Kontrolle eines Enhancer Elements. Dieses Enhancer Element regt im Folgenden die Expression von Gal4 im zeitlichen und zellspezifischen Muster seines eigentlichen Zielgens an.

Für den UAS-Stamm wird ein transposables Element inseriert, auf dem sich das ektopisch zu exprimierende Gen befindet. Vor dieses Gen sind mehrere Aktivatorsequenzen (**u**pstream **a**ctivating **s**equences, UAS) inseriert, deren Aktivität durch Galaktosidase angeregt wird.

Durch Kreuzung der Gal4 Fliegenlinie mit der UAS-Fliegenlinie werden in der Tochtergeneration durch die Expression von Galaktosidase (Treiberlinie) die Aktivierung der UAS-Sequenzen erreicht, die wiederum die Expression des nachgeschalteten Gens bewirken.

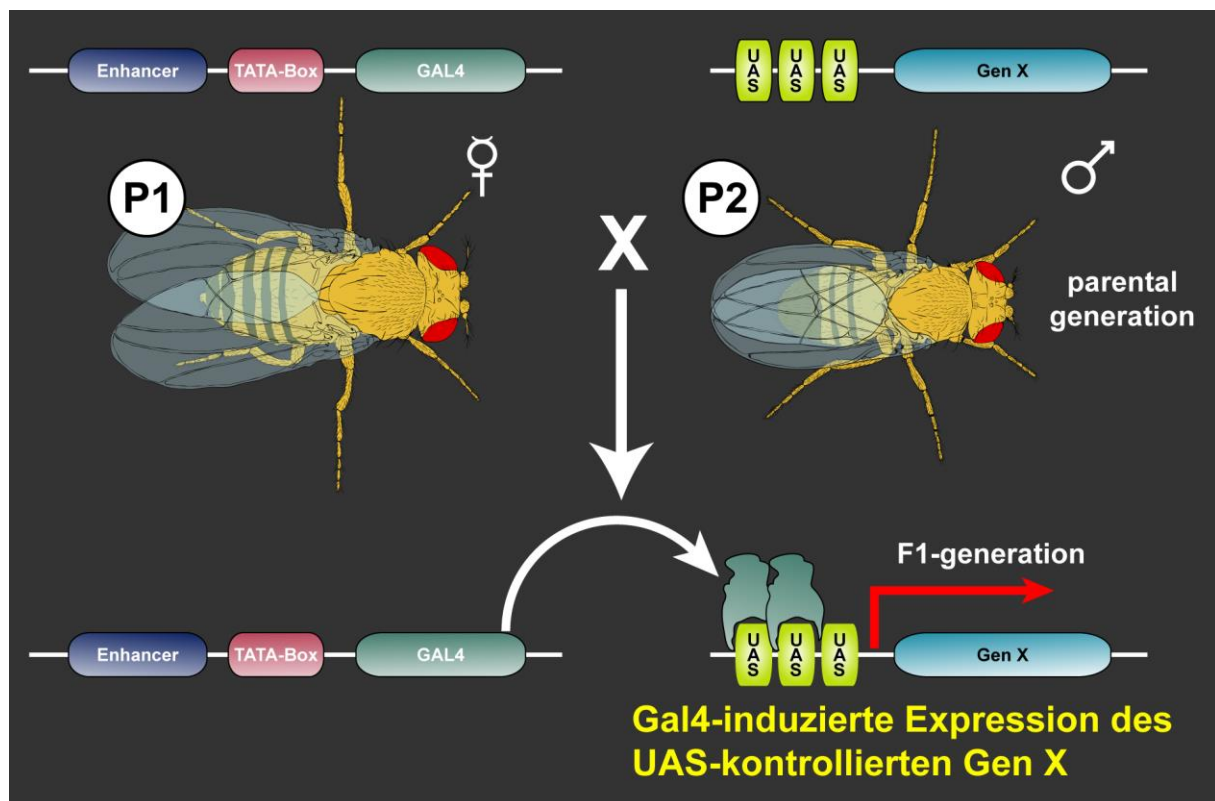


Abb. 2-1: Ektopische Expression mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems nach Brand und Perrimon (1993).

Über ein P-Element wurde in das Genom eines Parentalstamm (P1) das Gen für beta-Galaktosidase (Gal4) unter die Kontrolle eines Enhancers eingebracht. In einem zweiten Fliegenstamm (P2) befinden sich das zu exprimierende Gen X unter der Kontrolle mehrerer durch beta-Gal induzierbare upstream activating sequences (UAS). Durch die Kreuzung beider Stämme miteinander kann in der Tochtergeneration beta-Gal auf die UAS Sequenzen in dem für den Enhancer spezifischen Expressionszeitraum und Expressionsmuster wirken, und so spezifisch in diesem Expressionsmuster die Expression des Gen X anregen. Original Abbildung von Christof Rickert freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.6. Verwendete Fliegenstämme

Tab. 2-4: Verwendete Fliegenstämme.

Auflistung der Allele verwendeter Fliegenstämme, getrennt nach Wildtypstämmen, Funktionsverlustmutanten, Gal4- und UAS-Stämmen, sowie lacZ-Stämmen. Funktionsverlustallele der Gene werden nach dem auf der Datenbank Flybase notierten Abkürzungen angegeben. Die Bezugsquellen, sowie die erste veröffentlichte Referenz sind in der rechten Spalte angebene. Alle Funktionsverlustmutanten wurden mit unterschiedlichen Balancerstämmen kombiniert. Die verwendeten Balancerstämme sind in der untersten Tabelle aufgeführt.

Wildtypstämme

Oregon-R Wildtyp	Bloomington; (Lindsley und Zimm, 1992)
Canton S	Bloomington
White ⁻	Bloomington

Mutante Stämme

<i>Abl^l</i>	Eric Liebl (Liebl et al., 2003) und Bloomington
<i>Abl^d</i>	Bloomington (Bennett und Hoffmann, 1992)
<i>Alh^{r13}</i>	Bloomington (Lewis et al., 1980)
<i>Ama^{M109}Abl^l</i>	Eric Liebl (Liebl et al., 2003)
<i>Ama^{M109}Abl^lAbl⁺</i>	Eric Liebl (Liebl et al., 2003)
<i>Ama^{R1}Abl^l</i>	Eric Liebl (Liebl et al., 2003)
<i>Hsp70-Ama</i>	Bloomington, Thom Kaufman
<i>Antp²⁵</i>	Bloomington (Wakimoto et al., 1984)
<i>Antp¹¹</i>	Bloomington (Abbott und Kaufman, 1986)
<i>bcd^{l2}</i>	Bloomington (Frohnhofer und Nüsslein-Volhardt, 1986)
<i>cnc^{PZ}</i>	Bloomington (Mohler et al., 1995)
<i>CycE^{AR95}</i>	Bloomington (Knoblich et al., 1994)
<i>Dab^l</i>	Bloomington (Song et al., 2010)

Material und Methoden

<i>Df(3R)BSC467</i>	Bloomington
<i>Df(3R)Ama</i>	Bloomington (Fremion et al., 2000)
<i>Df(3L)H99</i>	Ana Rogulja-Ortmann (White et al., 1994)
<i>Dfd¹¹</i>	Bloomington (Lewis et al., 1980)
<i>Dfd¹²</i>	Bloomington (Lewis et al., 1980)
<i>Dfd¹⁶</i>	Bloomington (Lewis et al., 1980)
<i>Dfd¹⁶ Antp⁷</i>	Bloomington
<i>Dfd¹⁶ Scr⁴</i>	Bloomington
<i>disco¹</i>	Bloomington (Steller et al., 1987)
<i>dpp^{hr27}</i>	Bloomington (Spencer et al., 1982)
<i>ems⁴</i>	Bloomington; Nüsslein-Volhard
<i>ena²³</i>	Bloomington, (Ahern-Djamali et al., 1998)
<i>ftz¹¹</i>	Bloomington (Wakimoto et al., 1984)
<i>gbb¹</i>	(Wharton et al., 1999)
<i>gbb²</i>	(Wharton et al., 1999)
<i>gpp^{61A}</i>	(Shanower et al., 2005)
<i>hd^{Ff}</i>	Bloomington (Bandura et al., 2005)
<i>hth^{P2}</i>	AG Technau
<i>Scr⁴ Antp²⁵</i>	Bloomington
<i>lab⁴</i>	Bloomington (Merrill et al., 1989)
<i>lab⁷ Antp¹²</i>	Bloomington
<i>lab¹ Dfd¹²</i>	Bloomington
<i>Mspo^{c26}</i>	Akiyama Nose (Umemiya et al., 1997)
<i>Nrt¹</i>	Bloomington (Speicher et al., 1998)
<i>Nrt^{M54} Abl¹</i>	Eric Liebl (Liebl et al., 2003)

Material und Methoden

<i>pb¹⁷</i>	Bloomington (Cribbs et al., 1992)
<i>Sas4^{s2214}</i>	Bloomington (Basto et al., 2006)
<i>Scr¹¹</i>	Bloomington (Pattatucci et al., 1991)
<i>Scr¹⁷</i>	Bloomington (Pattatucci et al., 1991)
<i>tsh²⁷⁵⁷</i>	Laurent Fasano (Andrew et al., 1994)
<i>tsh⁸</i>	Laurent Fasano (Fasano et al., 1991)
<i>trio⁸</i>	Bloomington (Newsome et al., 2000)
<i>wg⁸</i>	AG Technau
<i>wg^{CX4}</i>	Julien Ng (Baker, 1987)
<i>yki^{B5}</i>	Jürgen Knoblich
<i>zen¹</i>	Bloomington (Wakimoto et al., 1984)

Gal4 Stämme

<i>eagle-Gal4, UAS-n-GFP</i>	Olaf Vef
<i>eagle-Gal4, UAS-CD8GFP</i>	Olaf Vef
<i>engrailed</i>	AG Technau
<i>inscuteable [Mz1407]</i>	(Ito et al., 1995)
<i>Pox neuro</i>	Markus Noll (Boll und Noll, 2002)
<i>scaborous</i>	Uwe Hinz (Klaes et al., 1994)

UAS Stämme

<i>abdominalA</i>	AG Technau; A. Michelson
<i>Ableson Tyrosin Kinase</i>	Bloomington
<i>Antennapedia</i>	A. Percival-Smith (Kurata et al., 2000)
<i>cap-n-collar</i>	W. McGinnis

Material und Methoden

<i>CyclinE</i>	AG Technau; C. Lehner
<i>Deformed</i>	(Percival-Smith et al., 2005)
<i>Dicer2</i>	AG Technau
<i>disconnected</i>	Bloomington (Robertson et al., 2002)
<i>homothorax</i>	AG Technau
<i>labial</i>	A. Percival-Smith (Miller et al., 2001)
<i>proboscipedia</i>	(Percival-Smith et al., 2005)
<i>Sex combs reduced</i>	(Percival-Smith et al., 2005)
<i>teashirt</i>	Laurent Fasano
<i>Yorkie</i> ^{S168A} (<i>Yki</i> ^{CA})	Bloomington (Oh and Irvine, 2008)

lac-Z Stämme

<i>eagle-lacZ</i> (<i>eg-lacZ</i> ; P289)	AG Technau (Dittrich et al., 1997)
<i>huckebein-lacZ</i> [5953]	Chris Doe (Doe, 1992)
<i>ming-lacZ</i> [1530]	Chris Doe (Doe, 1992)
<i>mirror-lacZ</i>	Chris Doe (Broadus et al., 1995)
<i>wingless-lacZ</i>	Chris Doe (Broadus et al., 1995)

Balancerstämme

CyO, <i>ftz-lacZ</i> /Pm	Olaf Vef
CyO, <i>twi-lacZ</i> /Pm; TM6b, <i>iab2-lacZ</i> /CxD	Olaf Vef
FM7, <i>ftz-lacZ</i> /N, Bx	Olaf Vef
TM6b, <i>iab2-lacZ</i> /TM3, <i>Kr-GFP</i>	Olaf Vef

2.2.7. RNA-Interferenz als weitere Möglichkeit von Mutantanalyse

Doppelsträngig vorliegende RNA wird im natürlichen Zustand über das Enzym Dicer abgebaut. Dieser Sachverhalt wird genutzt, um über das Gal4-UAS System räumlich und zeitlich den „Knock Down“ von spezifischen Genen zu ermöglichen. Dieses Werkzeug wird als RNA-Interferenz, kurz als RNAi bezeichnet (Kennerdell und Carthew, 1998; Brown et al., 1999; Misquitta und Paterson, 1999). Dafür wurden transgene Fliegenlinien erzeugt, die unter der Kontrolle von UAS-Sequenzen doppelsträngige Hairpin (in sich selbst gefaltete und dadurch als Doppelstrang vorliegende) RNAs besitzen. Werden diese mit einer spezifischen Gal4 Linie, die zusätzlich das Gen für Dicer unter demselben Enhancer enthält gekreuzt, so kann ein Funktionsverlust über Degradation der mRNA des entsprechenden Gens im räumlichen und zeitlichen Muster der Gal4 Linie erzeugt werden. Dadurch erhöhen sich die Möglichkeiten, Genfunktionen zu untersuchen, beispielsweise wenn stark lethale Faktoren oder bereits maternal verteilte Faktoren vorliegen.

Tab. 2-5: Verwendete RNAi Linien

Gen	RNAi Stamm
<i>Ableson tyrosin kinase</i>	GD28997
<i>Amalgam</i>	GD22944
<i>Deformed</i>	GD16159
<i>Disconnected</i>	GD1326
<i>Longitudinals lacking</i>	KK110256
<i>Sex combs reduced</i>	GD1527

2.2.8. Zeitlich gesteuerte Expression eines Gens über ein hitzesensitives Allel

Es besteht die Möglichkeit, über einen durch Wärmeeinwirkung induzierbaren Promotor (HSP-70 Promotor) die Aktivität eines Gens zeitlich zu steuern. Dafür muss zunächst der geeignete Zeitpunkt der Wärmeeinwirkung berechnet werden, um im gewünschten Entwicklungsstadium Expression zu gewährleisten. Für die Untersuchung des Einflusses von *Amalgam* musste im St9 Expression induziert werden. Dafür wurden Embryonen aus Über-Nacht Ablagen für 60 min bei 37°C in einem Wasserbad erwärmt. Anschließend konnten sie sich bei 25°C bis St12/St13 weiter entwickeln. Anschließend erfolgte der nun im Folgenden beschriebene Vorgang für die Fixierung und Färbung der Embryonen.

2.3. Vorbereitung der Embryonen für Färbungen

2.3.1. Chemische Dechorionisierung

Embryonen werden mit 7,5%iger Chlorbleichlauge zwei Minuten lang inkubiert, wodurch die Chorionhülle entfernt wird. Anschließend wird mit ausreichend Wasser das restliche Chlor entfernt und die Embryonen in Gazenetzen gespült. Anschließend werden sie mit Hilfe eines Skalpell in ein Reaktionsgefäß mit vorbereitetem Fixativ überführt.

2.3.2. Fixierung von Embryonen

Die mit Fixativ (450µl PBS, 50µl Formaldehyd (37%) und 500µl Heptan) gefüllten Reaktionsgefäße werden für 20 min auf dem Schüttler (140rpm) fixiert. Formaldehyd vernetzt die Proteine in der Zelle, Heptan durchlöchert die Zellmembran, so dass anschließend Antikörper oder Sonden in die Zellen eindringen können und sich an die fixierten spezifischen Stellen binden können. PBS stabilisiert die Phasen des Fixativs. An der Phasengrenze von Formaldehyd und Heptan werden die Embryonen durch die dort wirkenden Scherkräfte devittelinisiert. Dafür wird die untere wässrige Phase (PBS und Formaldehyd) zweimal gegen Methanol ausgetauscht und jeweils durch kräftiges Schütteln (vortexen) die Vittelinhülle entfernt. Devittelinisierte Embryonen sinken zu Boden, so dass anschließend der gesamte Überstand abgezogen und durch 1ml frisches Methanol ausgetauscht werden kann. Nach 10 min waschen auf dem Schüttler wird das Methanol ein weiteres Mal gewechselt und die Embryonen zur Aufbewahrung bei minus 20°C eingefroren oder für die direkt anschließenden Färbungen mit PBT gewaschen.

2.4. Färbemethoden

2.4.1. Fluoreszenz Antikörperfärbung

Antikörperfärbungen stellen eine sehr sensitive und zuverlässige Nachweismethode dar, bei der Proteine als Genexpressionsprodukte nachgewiesen werden können, indem sie über eine Immunreaktion von Farbstoffe tragenden Antikörpern gebunden werden.

Der primäre Antikörper wird entsprechend seiner wirkungsvollsten Konzentration mit PBT verdünnt und mit den ausreichend gewaschenen Embryonen über Nacht bei 4C° unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Embryonen gründlich durch mehrmalige Waschschrte mit PBT von allen nicht spezifisch gebundenen primären Antikörpern gereinigt.

Um ein auf diese Immunreaktion ausgerichtetes Farbsignal zu erreichen, werden anschließend mit Farbstoffen versehene sekundäre Antikörper verwendet, die nicht gegen das eigentliche Zielprotein gerichtet sind, sondern gegen das Herkunftstier des Primären Antikörpers. Die Inkubation mit dem

sekundären Antikörper erfolgt bei Raumtemperatur für ca. 2h unter leichtem Schütteln. Um die Fluoreszenzfarbstoffe nicht auszubleichen, sollten die Reaktion und die anschließende Aufbewahrung der gefärbten Embryonen im Dunkeln stattfinden. Nachdem die Embryonen anschließend wiederum von allen nicht gebundenen Antikörperrückständen gereinigt wurden, werden sie bei 4°C in einer 1:1-Mischung aus 70%igem Glycerol und Vectashield Mounting Medium aufbewahrt.

2.4.2. Alkalische Phosphatase Färbung

Bei sichtbaren Antikörperfärbungen erfolgt die Farbreaktion über die Reaktion der alkalischen Phosphatase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Inkubation des primären und sekundären Antikörpers erfolgt identisch mit dem Vorgehen bei der Fluoreszenzantikörperfärbung. Für die sichtbare Färbung wird zunächst AB-Komplexlösung 45 min auf dem Schüttler inkubiert (AB-Komplex: Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, bestehend aus Streptavidin und Avidin, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase), der durch Bindung von Avidin und Streptavidin an Biotin eine Verstärkung des eigentlichen Färbesignals hervorrufen soll. Anschließend erfolgt eine Inkubation der bereits mit sekundärer Antikörperreaktion abgeschlossenen Embryonen für 1h mit anschließendem Waschen in alkalischem Detektionspuffer. Die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase wird durch Zugabe von 3,6 µl BCIP und 4,5 µl NBT induziert. Eine Kontrolle des Färbeporgangs ist notwendig, um die Reaktion bei ausreichendem Farbsignal durch waschen mit Methanol und nachfolgend mit PBS abbrechen zu können. Die Aufbewahrung und Präparation erfolgt in 70%igem Glycerol.

2.4.3. Verwendete primäre Antikörper

Tab. 2-7. Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Spezies	Verd.	Herkunft/Referenz
Abdominal-A	Maus	1:200	Ian Duncan (Kellerman et al., 1990)
Abdominal-B	Maus	1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank (Celniker et al., 1989)
Ableson Tyrosin Kinase	Kaninchen	1:500	Edward Giniger (Song et al., 2010)
Alhambra	Maus	1:1000	Sami Bahri (Bahri et al., 2001)
Amalgam	Kaninchen	1:500	Israel Silman (Zeev-Ben-Mordehai et al., 2009b)
Antennapedia	Maus	1:50	DSHB
Beta-Gal	Huhn	1:1000	Abcam

Material und Methoden

Castor	Kaninchen	1:500	Ward Odenwald (Kambadur et al., 1998)
Cdc42	Kaninchen	1:400	Ulrich Tepass (Harris und Tepass, 2008)
Cousin of atonal	Schaf	1:1000	Andrew Jarman (zur Lage und Jarman, 2010)
Cyclin E	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Dachshund	Maus	1:250	DSHB
Dbx	Meerschweinchen	1:1500	James Skeath (Lacin et al., 2009)
Deadpan	Kaninchen	1:100	Harald Vaessin (Bier et al., 1992)
Deadpan	Meerschweinchen	1:1000	James Skeath
Deformed	Meerschweinchen	1:100	William McGinnis (Jack et al., 1988)
Deformed	Kaninchen	1:20	Santa Cruz
Deformed	Kaninchen	1:50	Heinrich Reichert
DIG-AP	Schaf	1:1000	Roche
Disabled	Maus	1:50	DSHB
Disconnected	Kaninchen	1:1000	Hermann Steller (Lee et al., 1991)
Eagle	Kaninchen	1:500	(Dittrich et al., 1997)
Eagle	Maus	1:100	Chris Doe (Karcavich und Doe, 2005)
Empty spiracles	Ratte	1:1000	Uwe Walldorf (Walldorf und Gehring, 1992)
Enabled	Maus	1:1000	DSHB
Engrailed	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Even skipped	Kaninchen	1:1000	Manfred Frasch (Frasch et al., 1987)
Even skipped	Meerschweinchen	1:500	John Reinitz (Kosman et al., 1998)
Extradenticle	Mouse	1:10	DSHB
Eyeless	Kaninchen	1:1000	Uwe Walldorf (Kammermeier et al., 2001)
FITC-AP	Schaf	1:1000	Roche
GFP	Kaninchen	1:500	Torrey Pines Biolabs

Material und Methoden

GFP	Maus	1:250	Roche
Gooseberry distal	Ratte	1:2	Robert Holmgren (Zhang et al., 1994)
Gooseberry proximal	Ratte	1:2	Robert Holmgren (Zhang et al., 1994)
Hunchback	Meerschweinchen	1:1000	Joachim Urban (Mettler et al., 2006)
Homothorax	Kaninchen	1:500	Adi Salzberg (Kurant et al., 1998)
H15 (Neuromancer1)	Kaninchen	1:500	James Skeah (Leal et al., 2009; Aad et al., 2015)
Intermediate neuroblasts defective	Kaninchen	1:1000	Tonia Von Ohlen (Von Ohlen et al., 2009)
Invected	Maus	1:2	DSHB (Patel et al., 1989)
Labial	Ratte	1:10	Frank Hirth und Heinrich Reichert
Labial	Kaninchen	1:100	Heinrich Reichert
Ladybird early	Maus	1:2	Krzysztof Jagla (Jagla et al., 1997)
Midline (Neuromancer2)	Kaninchen	1:100	James Skeath (Leal et al., 2009)
Miranda	Kaninchen	1:100	Jürgen Knoblich (Betschinger et al., 2006)
Muscle segment homeobox	Kaninchen	1:500	Matthew Scott/Ishikki
Modulo	Ratte	1:1000	Laurent Perrin (Perrin et al., 1998)
Neurotactin (BP106)	Maus	1:10	DSHB
pH3	Maus	1:1000	Cell Signaling Technologies
pH3	Kaninchen	1:1000	Abcam
Proboscipedia	Kaninchen	1:50	Thomas Kaufman (Randazzo et al., 1991)
Prospero	Maus	1:10	Chris Doe

Material und Methoden

Reversed polarity	Meerschweinchen	1:10000	Benjamin Altenhein
Reverse Polarity	Kaninchen	1:500	T. Halter
Runt	Meerschweinchen	1:500	John Reinitz (Kosman et al., 1998)
Sex combs reduced	Maus	1:20	DSHB
Single minded	Meerschweinchen	1:1000	Stephen Crews
Salvador	Kaninchen	1:1000	J. Jiang
Teashirt	Kaninchen	1:2000	Laurent Fasano
Tip Top	Ratte	1: 500	Laurent Fasano
Ultrabithorax	Maus	1:20	DSHB (White und Wilcox, 1984)
Ventral nervous system defective	Kaninchen	1:2000	Fernando Jimenez (McDonald et al., 1998)
Wingless	Maus	1:2	DSHB
Wrapper	Maus	1:20	DSHB (Noordermeer et al., 1998)
Yorkie	Kaninchen	1:400	K. Irvine
Zfh1	Meerschweinchen	1:500	James Skeath

2.4.4. Verwendete sekundäre Antikörper

Tab. 2-8: Verwendete Sekundärantikörper.

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

Material und Methoden

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

2.5. Herstellung von Riboproben (mRNA in situ Sonden)

2.5.1. In situ Hybridisierung mit anschließender Fluoreszenz Antikörperfärbung oder anschließender Alkalischer Phosphatase Färbung

Eine weitere Methode zum Nachweis von Genaktivität ist der mRNA Nachweis über die in situ Hybridisierung.

Fixierte Embryonen werden für 20 min in mit Wasserstoffperoxid versetztem Methanol (Methanol:H₂O₂, 10:1) auf dem Schüttler bei 70 rpm inkubiert, um endogene Peroxidasen zu zerstören die ansonsten starke Hintergrundfärbungen verursachen würden. Anschließend folgen Waschschritte mit DEPC-PBT unter hohen Hygienevorkehrungen mit gestopften RNase freien Pipettenspitzen und in autoklavierten Reaktionsgefäßen auf desinfizierten Arbeitsflächen mit Handschuhen um die Zerstörung von RNA durch RNAsen zu vermeiden.

Um bei der Fixierung geknüpft Doppelbindungen aufzubrechen und so die Autofluoreszenz zu reduzieren werden die Embryonen für 10 min mit 1ml Natriumborhydrid (1mg/ml) in PBTween inkubiert und anschließend wiederum gründlich gewaschen. Damit die Bindeeigenschaften der Sonde an die RNA erhöht werden, inkubieren die Embryonen mit formamidhaltiger Hybridisierungslösung. Unspezifische Bindungen werden durch eine Prähybridisierung mit 10µl einzelsträngiger Heringssperma-DNA (10mg/ml) für 2Std bei 55°C auf dem Thermoschüttler (450rpm) abgepuffert.

Die verwendeten Sonden werden entsprechend der benötigten Verdünnung in Hybridisierungslösung mit 10mg/ml Heringssperma DNA für 10min bei 95°C auf dem Thermoschüttler erhitzt, anschließend auf Eis gekühlt und dann auf die Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei einer für die Sonde spezifischen Bindetemperatur zwischen 45°C bis 65°C.

Durch intensives Waschen mit Hybridisierungslösung bei 65°C wird nach der Inkubation alle unspezifisch gebundene Sonde entfernt und anschließend die Antikörperreaktion für den Farbnachweis in TNB-Puffer durchgeführt. Es werden je nach Sonde DIG oder FITC spezifische Antikörper in TNB-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörperreaktion ist gegen bestimmte Desoxynukleotide (DIG/FITC) gerichtet, welche in die Sonde eingebaut sind. Nun folgend kann die Farbreaktion über alkalische Phosphatase stattfinden, oder aber ein Fluoreszenznachweis durchgeführt werden. Dafür werden die Embryonen in TNT Puffer überführt und mit Tyramid-Cyanin 3 (1:50 in „amplification diluent“ von Perkin Elmer) für maximal zehn Minuten inkubiert, anschließend wird alles übrige Substrat abgewaschen und die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

Sonden wurden über zwei unterschiedliche Wege hergestellt. Es existiert eine Bibliothek mit EST (Expressed sequence tag; BDGP) Klonen, in die bereits Vektoren mit einem entsprechenden gewünschten Genabschnitt eingebracht wurden. Der zweite Weg wurde über direkte Vervielfältigung der gewünschten Sequenzen über PCR aus cDNA gewählt. Diese Methoden erleichtern einen sonst sehr langwierigen Weg über Klonierung von DNA Fragmenten in Vektoren mit anschließender Sequenzierung der Produkte.

2.5.2. Reverse Transkription

Für die Herstellung der Sonden über PCR wird cDNA benötigt, die über reverse Transkription von mRNA erhalten wird. mRNA aus einer Gesamt-RNA Fällung aus Embryonen wird mithilfe ihres

spezifischen Poly-Adenin Schwanzes über einen Oligo-dT Primer spezifisch angesprochen und mit dem Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige copy (c)DNA umgeschrieben.

Ansatz Reverse Transkription:

2µl des jeweiligen gesamten RNA Ansatzes (ca. 6µg RNA)

1µl Oligo-dT Primer (0,5µg/µl)

13,5µl RNase freies H₂O

Um Sekundärstrukturen, welche die Reverse Transkriptase behindern können aufzulösen, wird der Ansatz bei 70°C 10 min inkubiert. Anschließend wird auf Eis folgendes hinzugegeben:

0,5µl RNase-Inhibitor

6µl 5x Erststrangpuffer

3µl 0,1M DTT (benötigt die Reverse Transkriptase als Kofaktor)

2µl dNTP-Mix (10mM)

2µl Superscript II = Reverse Transkriptase (200U/µl)

Die Reverse Transkription wird für 2h bei 42°C durchgeführt, deren Ergebnis ein cDNA/RNA-Hybrid ist, da die RNA nicht verdaut wurde. Um die DNA nun weiter zu vervielfältigen werden für die folgende PCR zwei spezifische Primer für das benötigte Transkript eingesetzt.

2.5.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine sehr effiziente und einfache Methode zur Vervielfältigung eines definierten durch zwei Primer flankierten DNA Bereichs mithilfe eines hitzestabilen Polymerase Enzyms aus *Thermus aquaticus*. Die Primer sind jeweils komplementär zu dem kodogenen Strang des einen Endes und zu dem Matrizenstrang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region. Die Taq Polymerase setzt an die 3'-OH-Enden dieser Primer an und liest von dort ausgehend den Matrizenstrang ab. Innerhalb von wenigen Reaktionszyklen werden so starke Vervielfältigungen der anfänglich einzelnen Nukleotidsequenz erreicht. Die Sonden wurde teilweise durch PCR aus cDNA amplifiziert, wobei die Sequenz für die T7 Polymerasesequenz am 5'Ende des reversen Primers enthalten ist. Der PCR-Zyklus enthält mehrere Temperaturschritte, über die das Anlagern (Annealing) der Primer an die DNA gesteuert wird. Durch die Verlängerung des Primers durch die T7 Sequenz

wurden teilweise abweichende Temperaturen zum Standardprotokoll verwendet (verwendete Primer siehe Tab. 2-11 unten).

2.5.4. Standard-PCR

Um Nukleotidfragmente bis zu einer Größe von 3kb zu vervielfältigen wird die Standard-PCR mit einem PCR Kit von Quiagen verwendet:

x μ l DNA-Ansatz mit ca. 1 μ g DNA

1 μ l dNTPs (10mM)

5 μ l 10x PCR-Puffer

1 μ l Forward-Primer (20 μ M)

1 μ l Reverse-Primer (20 μ M)

y μ l ddH₂O

1 μ l Taq (1U/ μ l)

50 μ l-Ansatz

Standard-PCR-Protokoll :

Deckel vorheizen	99°C		
Denaturieren	94°C	3min	
Denaturieren	94°C	1min	
Annealing	Schmelztemperatur der Primer – 5°C	30sec	← (40x)
Elongation	68°C	1000bp/min synthetisiert die Taq	
Finale Elongation	68°C	7min	
Ende	4°C	∞	

2.5.5. Long Range-PCR bzw. RT-PCR

Um die aus der RNA gewonnene cDNA zu amplifizieren wurde eine PCR Methode verwendet, bei der die Polymerase eine zusätzliche Korrekturlesefunktion besitzt und Fragmente von einer Länge bis zu 10kb amplifizieren kann. Das Long Range-Kit der Firma Qiagen ist somit sehr effizient und wenig

fehleranfällig (1 Fehler auf 250-500kb). Als Primer werden wiederum der OligodT-Primer und ein erster spezifischer Primer für die jeweilige DNA verwendet (Forward oder Reverse Primer 1). Ansatz für die Long-Range PCR:

x μ l DNA Ansatz mit ca. 1 μ g DNA

2,5 μ l dNTPs (10mM)

5 μ l 10x Long Range PCR-Puffer mit 25mM Mg²⁺

0,5 μ l Forward-Primer (100 μ M)

0,5 μ l Reverse-Primer (100 μ M)

y μ l ddH₂O

0,4 μ l Long Range PCR Enzym (2U/ μ l)

50 μ l-Ansatz

Long Range PCR Protokoll:

Deckel vorheizen	99°C		
Denaturieren	95°C	6min	
Denaturieren	95°C	30sec	
Annealing	Schmelztemperatur der Primer – 5°C	30sec	← (35x)
Elongation	68°C	1000bp/min synthetisiert die Taq	
Finale Elongation	68°C	15min	
Ende	4°C	∞	

2.5.6. Expressed Sequence Tags Klone

Die EST Klone werden bei minus 80 C° aufbewahrt und unter fachkundiger Anleitung aufgetaut und auf mit entsprechenden Antibiotika versetzten Agarplatten ausplattiert. Nach 24h Wachstumszeit bei 38 C° werden einzelne Klone gepickt und in LB Medium bei 38C° über Nacht in Reaktionsgefäßen auf dem Schüttler vermehrt. Anschließend erfolgt die Präparation der Vektoren.

2.5.7. Hergestellte Sonden aus EST Klonen**Tab. 2-9: EST Klone, Vektoren und Restriktionsenzyme der hergestellten Sonden gegen Kandidatengene aus dem Screen von Hueber et al. 2007**

Gen	EST Klon	Vektor	Restriktionsenzym
CG8827	LD11258	pBS SK-	EcoR1
CG8556	GM13874	pOT2	Ase1
CG15731	RE12587	PFLC1	BglII
CG 9083	LD42296	pOT2	EcoR1
CG9358	RE09339	PFLC1	EcoR1
CG10078	GH17891	pOT2	EcoR1
CG13701	RE14076	PFLC1	EcoR1
CG3132	HL01076	pBS SK-	Cla1
CG4722	LD45157	pOT2	BseR1
CG11205	RE21178	PFLC1	EcoR1
CG17579	RE38281	PFLC1	Bgl1
CG8975	LD41588	pOT2	NgoM4
CG4193	LD27857	pOT2	BsiW1
CG8363	LD25351	pOT2	EcoR1
CG3097	RE43153	PFLC1	Acc1
CG4880	LD20971	pBS SK-	EcoR1
CG6634	RE27439	PFLC1	Hpa1
CG7840	LD35060	pOT2	EcoR1
CG3773	SD18375	POT2	EcoR1
CG1707	RH47207	PFLC1	EcoR1
CG12052	LD03274	pBS SK-	Nde1

Material und Methoden

CG13159	RE25177	PFLC1	EcoR1
CG8589	RE23690	PFLC1	Cla1
CG9184	RE04770	PFLC1	EcoR1
CG7465	RE16136	PFLC1	EcoR1
CG31549	LD44221	pOT2	EcoR1
CG8116	RE40776	PFLC1	EcoR1
CG6725	LD03060	pBS SK-	Sac1
CG18594	LP12095	POT2	EcoR1
CG6733	RE20374	PFLC1	Acc1
CG6478	RE40851	PFLC1	EcoR1
CG12063	LD32760	pOT2	Age1
CG4440	RE16123	PFLC1	EcoR1
CG5773	RH46075	PFLC1	EcoR1
CG5765	RE37683	PFLC1	EcoR1
CG12117	GH04031	pOT2	EcoR1
CG3457	LD17911	pBS SK-	EcoR1
CG10287	LD05259	pBS SK-	EcoR1
CG1927	GH11112	pOT2	EcoR1
CG12787	GH02636	pOT2	Kpn1
CG15893	LD32923	pOT2	EcoR1
CG2962	LD27487	pOT2	EcoR1
CG12047	LD29039	pOT2	Acc1
CG7384	LD46023	pOT2	EcoR1
CG2064	SD07613	pOT2	EcoR1

CG7970 LD19311 pBS SK- EcoR1

Tab. 2-10: Sonden Informationen für weitere Kandidaten von Chromosom 3R und bekannter Hoxgen Interaktionspartner.

Gen	EST	Vektor	Restriktionsenzym
humpty dumpty	RE04029	PFLC1	Ava1
wingless	RE02607	PFLC1	Sal1 oder HincII
sala	RE40068	PFLC1	EcoR1
teashirt	RE67261	PFLC1	Cla1
brahma	LD36356	pOT2	Acc1
Amalgam	LD39923	pOT2	Sma 1
Disconnected	GH27656	pOT2	Sma1

Tab. 2-11: Primersequenzen der Sonden gegen *Deformed* und *Sex combs reduced*.

Dfd forward	CTCGTAAGACCGAAACGTCCGAC
Dfd T7 reverse	taatacactcactatagggagaccacCGAACTTACATACATCTAGAGACGCAC
Scr forward	GTCGCAGTTCGCGCACCTAAGC
Scr T7 reverse	taatacactcactatagggagaccacCCTGGCGGACTGTGAGTGCCC

Die in situ Sonde gegen *Antennapedia* wurde aus einem EST-Klon gewonnen (CG 1028, LD33666), der einen pot-2-Vektor enthält und bereits als Eluat einer Mini-Präparation von Sudha Myneni zur Verfügung gestellt wurde.

Die Sonde für *labial* wurde von Rolf Urbach zur Verfügung gestellt

2.5.8. Mini-Präparation der Vektoren

Die Präparation der Vektoren aus den vermehrten EST Klonen erfolgt über das Mini-Präparations-Kit der Firma Quiagen. Hierbei wird zunächst die Zellmembran der Zellen aufgelöst und alle bakteriellen Proteine ausgefällt. Anschließend wird die DNA auf eine Silikat-Membran einer Säule gebunden und durch mehrere Waschstschritte in der Zentrifuge gereinigt. Die Eluation der DNA erfolgt in ein sauberes Reaktionsgefäß mit erwärmtem DEPC-H₂O.

2.5.9. Restriktion

Um aus den EST Klonen geeignete Abschnitte für die Sonden herauszuschneiden werden spezifische Restriktionsenzyme verwendet, die auf den Vektorkarten der Klone angegeben sind. Die Abschnitte werden über PCR vervielfältigt und anschließend auf ein Gel aufgetragen.

Restriktionsansatz:

8µl Genomische DNA (~2µg DNA)

2,5µl 10x Restriktionspuffer

12,5µl ddH₂O

2µl Restriktionsenzym (10U/µl)

Je nach verwendetem Enzym wird in einem Zeitraum von zwei Stunden bis zu einem Über-Nacht-Verdau bei 37°C restringiert. Danach erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei 65°C zur Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym.

2.5.10. Herstellung der Sonden über T7 und Sp6

Über die flankierenden Promotoren T7 und Sp6 kann das Ablesen der Sense- oder der Antisense-Sonde gesteuert werden. Die Sonden werden mit Dig oder FITC-markierten UTP für die weitere Nachweismöglichkeit durch Antikörper versehen.

Markierungsansatz:

1µl linearisiertes Plasmid

2 µl 10x Markierungsgemisch (Boehringer)

2 µl 10x Transkriptionspuffer

2 µl Polymerase

18 µl Wasser

Inkubation für 2 Stunden bei 37°C

Anschließend Zugabe von 2 µl DNase 1 und inkubation für 15min zum Abstoppen der Reaktion durch Verdau der Matritze und Zugabe von 2 µl 0,2M EDTA zur Beendung der Enzymaktivität der RNA-Polymerase durch Chelatbildung. Anschließend wird die Sonde mit LiCl gefällt und in 100 µl Wasser aufgenommen. Zur Kontrolle wurden zunächst alle Sonden (Sense- und Anti-Sense) in unterschiedlichen Konzentrationen von 1:10, 1:100 und 1:1000 verwendet.

2.5.11. Vermessung der Expressionsdomänen der Antennapedia-Komplex Gene

Wildtyp Embryonen der Entwicklungsstadien 0 bis 9 (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) wurden fixiert und die mRNA von *lab*, *Dfd*, *Scr* und *Antp* über in situ Hybridisierung über Alkalische Phosphatase Nachweis sichtbar dargestellt. Die Embryonen wurden im „Whole-mount“ ohne Präparation seitlich auf Objektträger aufgelegt und mit 40x Vergrößerung mithilfe des Zeiss Axioplan Mikroskops und einer Contron Progress Kamera aufgenommen und digitalisiert. Anschließend wurde mit dem Adobe Photoshop CS4 Messinstrument zunächst die Gesamtlänge des Embryos und dazu im Verhältnis der Beginn und das Ende der mRNA Expression vom posterioren Pol ausgehend vermessen. Die Werte wurden in Microsoft Excel übertragen, dargestellt und der Mittelwert der Expressionsdomäne aller Embryonen einer Färbung ermittelt.

2.6. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese bietet eine Nachweismethode über die Größe und Konzentration von beispielsweise DNA oder RNA Fragmenten. Die Länge der Fragmente kann durch Größenvergleiche mit definierten Markerbanden bestimmt werden. Damit kann beispielsweise ein Restriktionsverdau auf erfolgreiche Durchführung überprüft werden.

Nukleinsäuren und Proteine haben eine spezifische negative Nettoladung und werden durch das an das Gel angelegte elektrische Feld in Richtung des positiven Pols bewegt. Das Agarose Gel (Dimer aus 3,6-Anhydro-L-Galactose und D-Galactose) bildet ein entsprechend der eingesetzten Agarosekonzentration variierendes grobmaschiges Netz. Moleküle bewegen sich abhängig von ihrer Größe und Konformation mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Netz, dass über die Agarosekonzentration in seiner Trennwirkung auf die zu trennenden Fragmente optimiert werden kann. Kleinere DNA-Fragmente werden bevorzugt in hochprozentigen Gelen (1,6-1,8%) und größere DNA-Fragmente in niedrigprozentigen Gelen (0,8%, d.h. 0,4g Agarose der Firma Genterprise Genomics in 50ml TAE-Puffer) getrennt.

Eine entsprechende Menge an Agarose für die gewünschte Konzentration wird in 50ml TAE Puffer unter erwärmen gelöst und nach abkühlen mit 20µl EtBr (1mg/ml) versetzt und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. EtBr interkaliert in der DNA und ist unter UV Licht (360nm, Emission bei 590nm) sichtbar. Nach dem Aushärten des Gels werden die aufzutrennenden Proben für die Beschwerung durch vorhandenes Glycerol mit 6fachem Ladepuffer (Fermentas, siehe Lösungen) versetzt und auf das in TAE Puffer befindliche Gel aufgetragen. Zusätzlich wird ein Größenmarker (100 Basenpaar-Ladder Plus von Fermentas, Hyper-Ladder I von Bionline) verwendet, um die Laufhöhe der einzelnen Banden einer Molekülgröße zuordnen zu können.

Das bei 80 Volt fertig aufgetrennte Gel wird auf dem UV Tisch mit einer Kamera fotografiert und anhand der Markerbanden ausgewertet. Für die weitere Verwendung können Fragmente aus dem Gel

mithilfe eines Skalpell's ausgeschnitten werden und anschließend die DNA mit dem Gel Purifikation Kit von Quiagen rückgewonnen werden.

2.7. Western Blot und Immunoprecipitation für den Nachweis von Protein-Protein Interaktion

Proteine können direkt aneinander binden, und sich in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob Dfd direkt mit CycE, sowie ob AbdA direkt mit CycE bindet. Der Nachweis einer Protein-Protein Bindung kann über eine Immunoprecipitation (IP) erbracht werden, wobei sich das Prinzip des Nachweises über Antikörper zu Nutze gemacht wird.

Die nachzuweisenden Proteine werden ektopisch mit dem Gal4-UAS-System in Embryonen exprimiert, um eine höhere Ausbeute an Protein zu erhalten. Die Embryonen von WT, *scaGal4XUASDfd*, *scaGal4XUASabdA* und *scaGal4XUASCycE* wurden mehrere Wochen lang gesammelt, jeweils frisch dechorionisiert und bei -80°C aufbewahrt.

Für den IP wurde das IP-Kit von Roche verwendet. Jeweils etwa 200 ml Embryonen werden mit Squeezing-Puffer zerstoßen und anschließend Zellreste durch Zentrifugation absedimentiert. Alle Schritte finden aufgrund von Gefahr von Proteinaseaktivität bei 4°C oder auf Eis statt. Das so aufgereinigte Protein-Gesamtmisch des Embryos wird mit 50µl Agarosekügelchen inkubiert und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert und getrennt, um unspezifisch an Agarose bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. In das nun gereinigte Proteingemisch wird ein primärer Antikörper (1-5µg Ak) gegen eines der Proteine zugegeben, und nach einer weiteren Inkubationszeit wiederum mit 50µl Agarosekügelchen inkubiert. Es wurden je ein Ansatz für Dfd, AbdA und CycE angesetzt, und auch im Folgenden jeweils revers zwei Ansätze für jede Kombination untersucht. Der primäre Antikörper bindet an die Agarosekügelchen und ist wiederum mit dem für ihn spezifischen Protein, beispielsweise CycE gebunden. Sollte nun Dfd oder AbdA an CycE Protein binden, so wäre an dem Agarose-Antikörper-CycE Komplex im Weiteren auch Dfd oder AbdA gebunden. Nach Inkubation über Nacht werden die Komplexe zentrifugiert und anschließend durch mehrere Waschschrte mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt. Anschließend werden die Proben mit Lämmli-Puffer (40 – 60 µl) versetzt und 5 min bei 100°C aufgekocht. Die Agarosekügelchen werden nun abzentrifugiert und die Konzentration des Proteins durch einen Bradfordtest bestimmt. Jeweils 20 µg Proteinlösung wird auf ein SDS-Gel aufgetragen. In einer Gelkammer bei 160V erfolgt die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe und Masse zu einer charakteristischen Position, die über einen ebenfalls im Gel laufenden Marker (Fermantas Protein Ladder) messbar wird.

Nun erfolgt der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran über einen Western Blot. Dazu werden das Gel und die Membran in Transferpuffer inkubiert und anschließend in der Blot-Apparatur (Bio Rad) fixiert. Der Transfer der Proteine erfolgt in einem

Spannungsfeld bei 100 Volt bei 4C°. Die Membran kann nach dem blotten mit Ponceau gefärbt werden, das Gel wird mit Coomassie-Färbung auf verbliebene Proteinreste kontrolliert. Erfolgreich transferierte PVDF Membran wird nun für den Nachweis des zweiten Proteins, hier Dfd oder AbdA, durch die Protein-Protein Bindung vorbereitet. Dazu wird nun primärer Antikörper gegen Dfd oder AbdA mit jeweils einem Streifen der PVDF Membran mit gebundenem Protein über Nacht bei 4C° inkubiert. Nach gründlicher Reinigung von unspezifischen Bindungen wird anschließend ein sekundärer Antikörper gegen das Wirtstier des primären AK inkubiert. Der Farbnachweis erfolgt anschließend über Alkalische Phosphatase Färbung.

2.8. Präparation und Dokumentation der Embryonen

Eine bessere Aufsicht auf das ventrale Nervensystem, insbesondere auf die gnathalen Segmente, wird durch eine Filetpräparation des Embryos erreicht. Hierfür wird der Embryo unter einem Binokular auf einen Objektträger aufgelegt und mithilfe fein ausgezogener Glaskapillare (Meterware Firma Hilgenberg mit Vertikalpuller) der Embryo auf der dorsalen Seite geöffnet und der Dotter und Darm entfernt. Hierbei sind je nach Entwicklungsstadium leicht voneinander abweichende Präparationstechniken zu wählen. Anschließend wird die Kopfkapsel geöffnet und nach vorne seitlich aufgeklappt und eröffnet so eine Aufsicht auf das VNS der gnathalen Segmente. Da für Vergleichszwecke auch Thorax und Abdomen betrachtet wurden, wurde immer der gesamte Embryo filetiert und alle Segmente blieben erhalten. Die präparierten Tiere werden mit Mounting Medium unter einem Deckgläschen abgedeckt und dadurch in ihrer Position fixiert.

Die Dokumentation und Auswertung der gefärbten Präparate erfolgt am Laserscan Mikroskop (LSM) der Firma Leica. Die anschließende Auswertung der Aufnahmen erfolgt mit Volocity von Perkin Elmer oder den für die jeweilige LSM Software erstellten Programmen von Leica. Abbildungen von Färbungen für die Dokumentation der Ergebnisse wurden mit Adobe Photoshop und Adobe Illustrator erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Das Eagle Expressionsmuster der gnathalen Segmente

Um segmentspezifische Identitäten von Neuroblastenlinien untersuchen zu können und Parallelen zu möglicherweise vorhandenen seriellen Homologen in anderen Segmenten ziehen zu können, müssen einzelne Zelllinien spezifisch ansprechbar sein. Dafür ist ein Marker notwendig, der über ein übersichtliches Expressionsmuster eine eindeutige Zugehörigkeit von Zellen zu ihrem Zellstammbaum erkennen lässt. Ein sehr exklusiver Marker ist der Transkriptionsfaktor Eagle (Eg; Higashijima et al., 1996; Dittrich et al., 1997; Lundell und Hirsh, 1998), der im Wildtyp (WT) in Thorax und Abdomen nach bisherigem Wissensstand in insgesamt vier Neuroblasten (NB), dem NB2-4, NB3-3, NB6-4 und NB7-3 und deren Nachkommenzellen exprimiert ist (vergleiche auch Abb. 1-1). NB2-4 und NB3-3 befinden sich im anterioren Bereich des Segments, während NB6-4 und NB7-3 im posterioren Bereich lokalisiert sind.

3.1.1. Das Eagle Expressionsmuster der gnathalen Segmente zeigt starke Abweichungen von dem bekannten Muster posteriorer Segmente

Die vorangegangenen Untersuchungen der Diplomarbeit konzentrierten sich hauptsächlich auf die gnathale segmentale Identität des NB6-4. Das Eg Expressionsmuster wurde im Detail nur bis Stadium 13 (St13, nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) im WT beschrieben. Da jedoch im Laufe der Embryonalentwicklung weitere Eg positive Zellen in Erscheinung treten, wird in der vorliegenden Arbeit die Identifizierung und Analyse aller gnathalen Eg positiven Linien im WT fortgeführt und auf *Antennapedia*-Komplex (*Antp*-K) Mutanten ausgeweitet. Die Kenntnis über das gesamte, auch spätembryonale Eg Muster der gnathalen Segmente ist beispielsweise für die weitere Analyse der Zellstammbäume von Neuroblasten wichtig. Diese werden im gnathalen Bereich derzeit im Embryo identifiziert (persönliche Mitteilung von Karin Luer-Kirsch) und könnten in weiterführenden Arbeiten mit larvalen Zelllinien verknüpft werden, wie es für thorakale und abdominale Zelllinien durchgeführt wurde (Birkholz et al., 2015). Weiterhin gibt die Untersuchung weiterer Eg positiver Linien Aufschlüsse über die Vielfalt möglicher Wirkungsweisen von Hoxgenen und deren teilweise stark zellautonomen Wirkungsweisen.

Es zeigen sich in den gnathalen Segmenten zum Teil starke Abweichungen vom bisher bekannten Eg Expressionsmuster weiter posteriorer Segmente, sowie Diskrepanzen zwischen Eg Expression in St11 auf Ebene der delaminierenden Neuroblasten (Abb. 3-1 A und B, sowie Urbach et al., 2016) und späterer Expression ab St14 (Abb. 3-13).

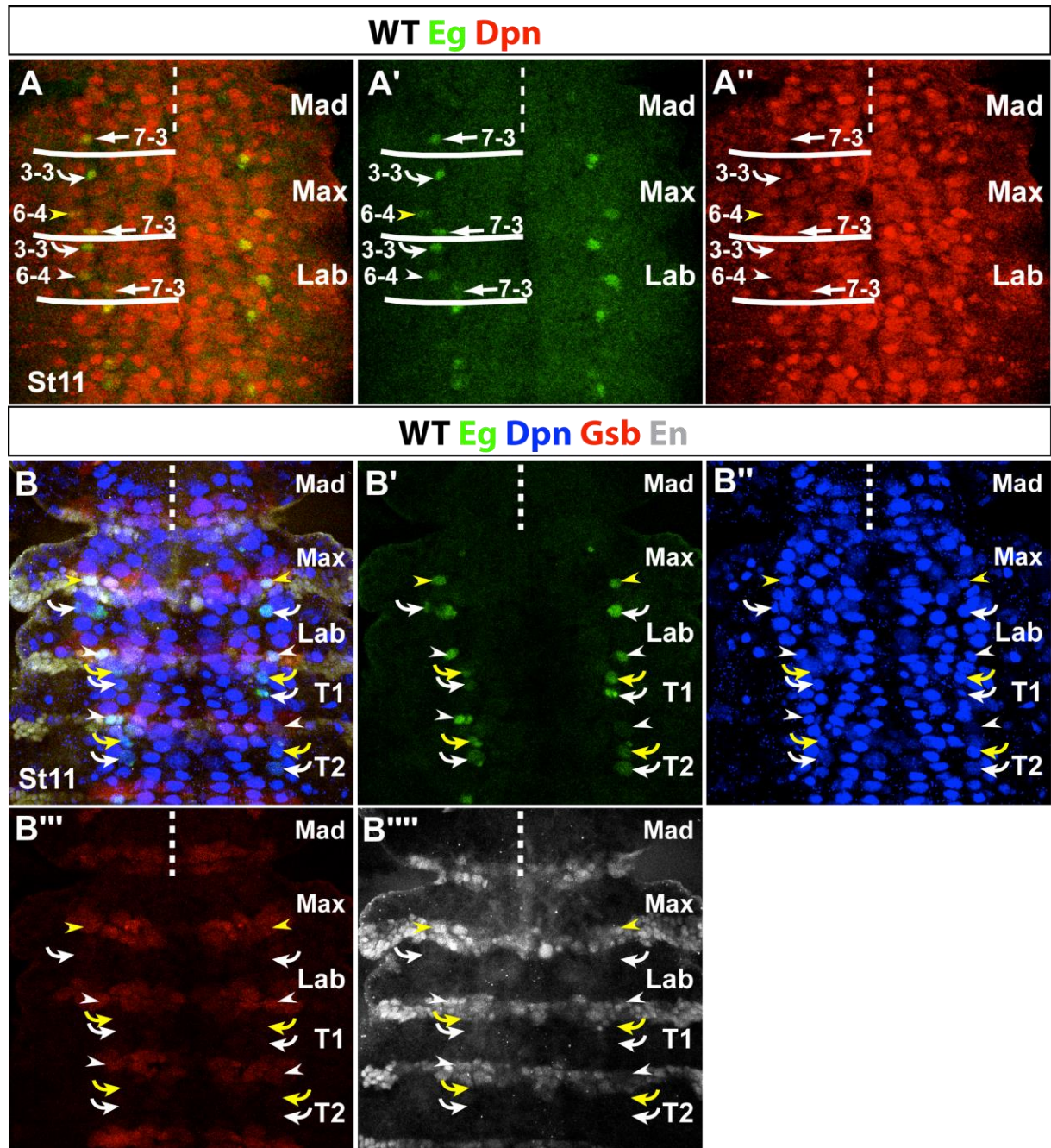


Abb. 3-1: Das gnathale Eagle Expressionsmuster in St11 im WT.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün, in (A') im Einzelkanal) und Deadpan (Dpn; rot, in (A'') im Einzelkanal). (B) Antikörperfärbungen gegen Eg (grün, in (B') im Einzelkanal), Dpn (blau, in (B'') im Einzelkanal), Gooseberry (Gsb; rot, in (B''')) im Einzelkanal) und Engrailed (En; grau, in (B'''')) im Einzelkanal) zur exakten Identitätsbestimmung der Eg positiven Neuroblasten im frühen St11 im WT. Die Einzelkanäle dienen der Verdeutlichung der Expression in den einzelnen Zellen. NB7-3 delaminiert in allen drei gnathalen Segmenten als Eg positiver Neuroblast (NB7-3 in dieser und allen folgenden Abbildungen gekennzeichnet mit geradem weißen Pfeil). NB6-4 delaminiert im Maxillarsegment und im Labialsegment als Eg positiver Neuroblast (NB6-4 des Maxillarsegments, bzw. NB6-4 Gliazellen werden in dieser und allen folgenden Abbildungen mit gelber Pfeilspitze, NB6-4 des Labialsegments, bzw. Neurone des NB6-4 mit weißer Pfeilspitze gekennzeichnet). NB6-4 exprimiert zudem sowohl En als auch Gsb. NB3-3 delaminiert im Maxillarsegment und im Labialsegment als Eg positiver Neuroblast (NB3-3 ist in dieser und allen folgenden Abbildungen gekennzeichnet durch einen weißen gebogenen Pfeil). NB2-4 ist in allen drei gnathalen Segmenten nicht als Eg positiver Neuroblast vorhanden. Er delaminiert jedoch in weiter posterioren Segmenten (hier gezeigt für T1 und T2 als Eg positiver Neuroblast in St11 früh (NB2-4 wird in dieser und allen folgenden Abbildungen mit gelbem gebogenem Pfeil gekennzeichnet).

Diese und alle folgenden Abbildungen zeigen eine filetrpräparierte Aufsicht auf das ventrale Nervensystem (VNS), sofern nicht anders gekennzeichnet. Links und rechts der (durch eine gestrichelte weiße Linie gekennzeichneten) Mittellinie sind die jeweiligen Hemisegmente sichtbar. Die einzelnen Segmente werden in dieser und allen folgenden Abbildungen mit Mad für Mandibularsegment, Max für Maxillarsegment, Lab für Labialsegment, T1-T3 für thorakale Segmente und A1 bis A10 für abdominale Segmente gekennzeichnet. Die Segmentgrenzen verlaufen posterior von NB7-3 und anterior von NB3-3 des nachfolgenden Segments. In (A) sind die Segmentgrenzen durch Linien verdeutlicht, in den nachfolgenden Abbildungen dient meist Antikörperfärbung gegen En für Reihe sechs und sieben (DiNardo et al., 1985) oder Gsb für Reihe fünf (Gutjahr et al., 1993) als Segmentgrenzenmarker.

3.1.1.1. NB2-4 wird in den gnathalen Segmenten nicht gebildet

NB2-4 ist in allen drei gnathalen Segmenten über Eg Expression nicht identifizierbar (Abb. 3-1 A, A'), während in den thorakalen Segmenten NB2-4 eindeutig als Eg positiver Neuroblast delaminiert (Abb. 3-1 B-B'''). Ein weiterer für diese Zelllinie exklusiver Marker ist *poxNeuro* (Dambly-Chaudiere et al., 1992), über das ebenfalls keine gnathale NB2-4 Zelllinie identifizierbar ist (Diplomarbeit Henrike Becker, 2008). Die Beobachtung, dass NB2-4 in den gnathalen Segmenten nicht gebildet wird, deckt sich mit dem Ergebnis der Kartierungen der gnathalen Neuroblastenlinien (Urbach et al., 2016). Ein weiterer Hinweis ist die fehlende Expression von *Optomotorblind* (Poeck et al., 1993), das in den Motoneuronen von NB2-4 exprimiert wird (persönliche Mitteilung von Theoni Michalopoulou, unveröffentlicht), in den gnathalen Segmenten an entsprechender Position jedoch fehlt (nicht gezeigt).

3.1.1.2. NB3-3 ist mithilfe von Markeranalysen nur im Maxillar- und Labialsegment zu identifizieren

NB3-3 ist im Thorax und Abdomen des WT neben seiner Expression von Eg zusätzlich über die Expression von *Runt* (Dormand und Brand, 1998) identifizierbar. Ein weiterer aus Thorax und Abdomen bekannter Marker für die Nachkommenzellen des NB3-3 ist *Even Skipped* (*Eve*; Frasch et al., 1987; Schmidt et al., 1997) was jeweils in fünf bis neun der zehn bis dreizehn thorakalen und der abdominalen Nachkommenzellen exprimiert wird. Sie werden auch als „*Eve laterale Neurone*“ bezeichnet. *Empty spiracles* (*Ems*; Walldorf und Gehring, 1992) wurde weiterhin als Marker für den Neuroblasten selbst gefunden (Hartmann et al., 2000).

Über Eg und *Deadpan* (*Dpn*; Bier et al., 1992) lässt sich NB3-3 im Maxillar- und Labialsegment anhand der Position zu anderen Eg positiven Neuroblasten und mithilfe fehlender Expression von En oder Gsb identifizieren (Abb. 3-1 A- A'', B- B'''). Über gleichzeitige Expression von *Runt* wird die Identität als NB3-3 (Abb. 3-2 A), bzw. NB3-3 Nachkommenzellen deutlich (Abb. 3-2 A'; sowie Diplomarbeit Henrike Becker, 2008). Auch *Ems* Protein findet sich bis in spätere Stadien hinein in Anteilen der Nachkommen des NB3-3 (Abb. 3-2 B; widersprüchlich zu Hartmann et al., 2000). Beide der gnathalen NB3-3 Linien bilden im WT bis St16 neun Zellen aus, sieben davon sind *Eve* positiv (Abb. 3-2 C, D).

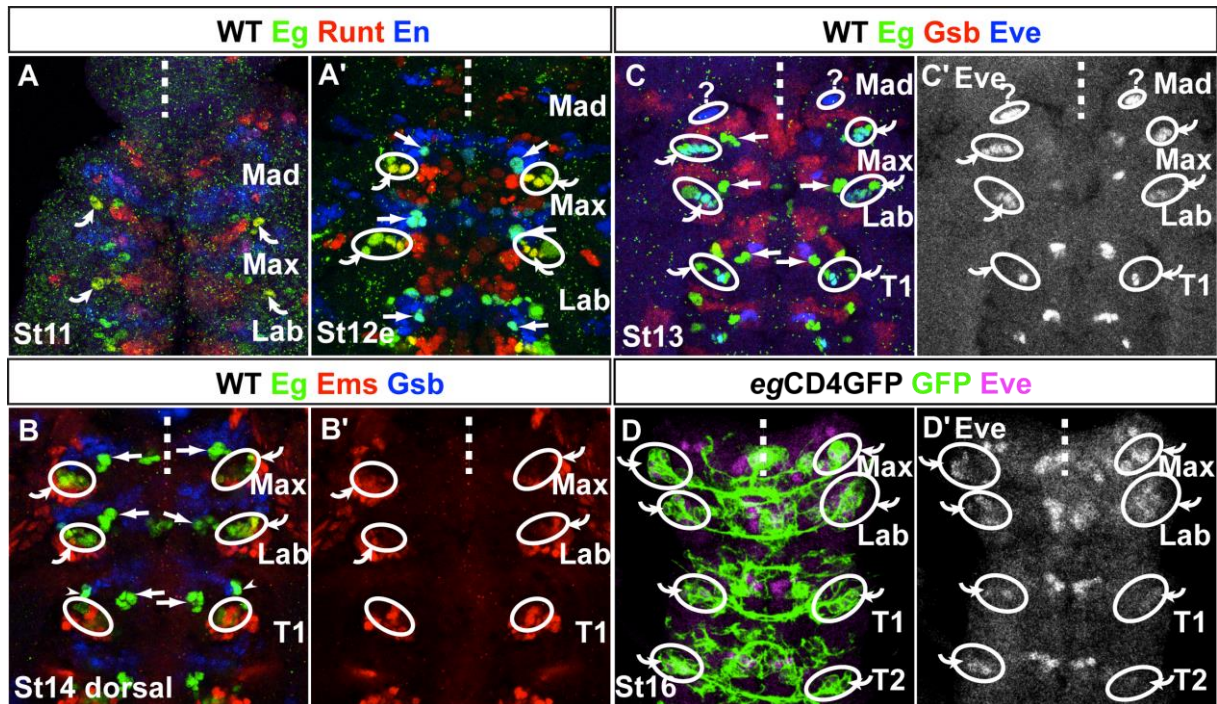


Abb. 3-2.: Markerexpressionsanalyse im gnathalen NB3-3.

(A-C) Antikörperfärbungen der für NB3-3 bekannten spezifischen Marker im WT und (D) in einem im Eg Expressionsmuster GFP exprimierenden Stamm *egGal4XUAS-CD4-GFP* zur Nachverfolgung des gebildeten Zellklons. (A) Im WT ist im Maxillarsegment und Labialsegment NB3-3 durch gleichzeitige Expression von Runt (rot) und Eg (grün) bereits als Neuroblast (A) im frühen St11, als auch in späteren Stadien (A', alle Nachkommenzellen sind mit weißer Markierung eingekreist) deutlich zu erkennen. Im Mandibularsegment findet sich an entsprechender Position eines möglichen NB3-3 weder Eg noch Runt Expression. (B) Die über Eg Expression als zu NB3-3 zugehörig identifizierte Zellen sind eingekreist. Ems ist auch in Anteilen der NB3-3 Nachkommenzellen des Labial- und Maxillarsegments exprimiert. Im Mandibularsegment findet sich wiederum keine Expression von Eg oder Ems an entsprechender Position anterior des Gsb (blau) Expressionsstreifens. (C) Eve (blau) positive Neurone werden von NB3-3 des Maxillar- und des Labialsegments ausgebildet, jedoch nicht alle Eg positiven NB3-3 Nachkommen exprimieren Eve. Im Mandibularsegment tritt ebenfalls Eve Expression anterior des Gsb Expressionsstreifens (rot) auf (markiert durch weiße Fragezeichen), hier ist jedoch keine Eg Expression erkennbar. (D) In St16 des *egGal4 x UAS-CD4-GFP* Stamm lassen sich über GFP Antikörperfärbung im Eg Expressionsmuster (grün) die Nachkommenzellen des NB3-3 zu einem Zellklon zuordnen. Es bilden sowohl der maxillare, als auch der labiale NB3-3 meist neun Nachkommenzellen aus, sieben davon sind Eve-positiv (magenta).

Im Mandibularsegment ist an der Position von NB3-3 weder Eg (Abb. 3-1 A) noch Runt Protein über Antikörperfärbung sichtbar (Abb. 3-2 A; abweichend zu den vorläufigen Ergebnissen der Diplomarbeit, in der Runt Expression im Mandibularsegment an möglicher Position des NB3-3 ohne Zuhilfenahme weiterer Marker als mögliche Zellen des NB3-3 erachtet wurden). Ems konnte im Mandibularsegment ebenfalls nicht gemeinsam mit Eg Expression gefunden werden (Abb. 3-2 B). Eve positive Zellen finden sich in einer Position anterior zum mandibularen Gsb Streifen, was ein Hinweis auf Eve positive Zellen eines mandibularen NB3-3 sein könnte (Abb. 3-2 C, ihre Position ist durch weiße Fragezeichen markiert). Allerdings könnten in diesem Segment auch andere Zellen Eve exprimieren und damit eine abweichende Identität als in weiter posterioren Segmenten erhalten. Zudem sind abweichende

Positionen von Zellen möglich. Die Beobachtungen über vermutliches Fehlen eines mandibularen NB3-3 und abweichender Eve Expression im Mandibularsegment decken sich mit dem aktuellen Stand der Kartierungen des gnathalen Neuroblastenmusters unter Verwendung unterschiedlicher Markerkombinationen von Rolf Urbach (Urbach et al., 2016).

3.1.1.3. Segment spezifische Zelllinien der gnathalen NB6-4

Auch der NB6-4 konnte als seriell homologer Neuroblast im Maxillar- und Labialsegment als Eg positiver Neuroblast identifiziert werden (Abb. 3-1 A- A''; Abb. 3-3 A und Diplomarbeit Henrike Becker, 2008). Der NB6-4 bildet im Maxillarsegment eine rein gliale Zelllinie aus (Abb. 3-3 A, A' im Einzelkanal), was an die ebenfalls rein gliale segmentale Identität der abdominalen Segmente mit zwei Glia pro Hemisegment erinnert (Schmidt et al., 1997). Es entstehen im Weiteren insgesamt vier maxillare Gliazellen. Die beiden äußeren maxillaren Glia wandern im Laufe der Embryonalentwicklung nach lateral, während die beiden medialen Gliazellen weiter medial verbleiben (beispielhaft für St12 Abb. 3-3 B und B'). Im Labialsegment wird eine Zelllinie mit drei Glia und ein Cluster von fünf bis sechs Neuronen ausgebildet (Abb. 3-3 B, B' und Diplomarbeit Henrike Becker, 2008), die exakt der thorakalen Zelllinienidentität entspricht (Schmidt et al., 1997).

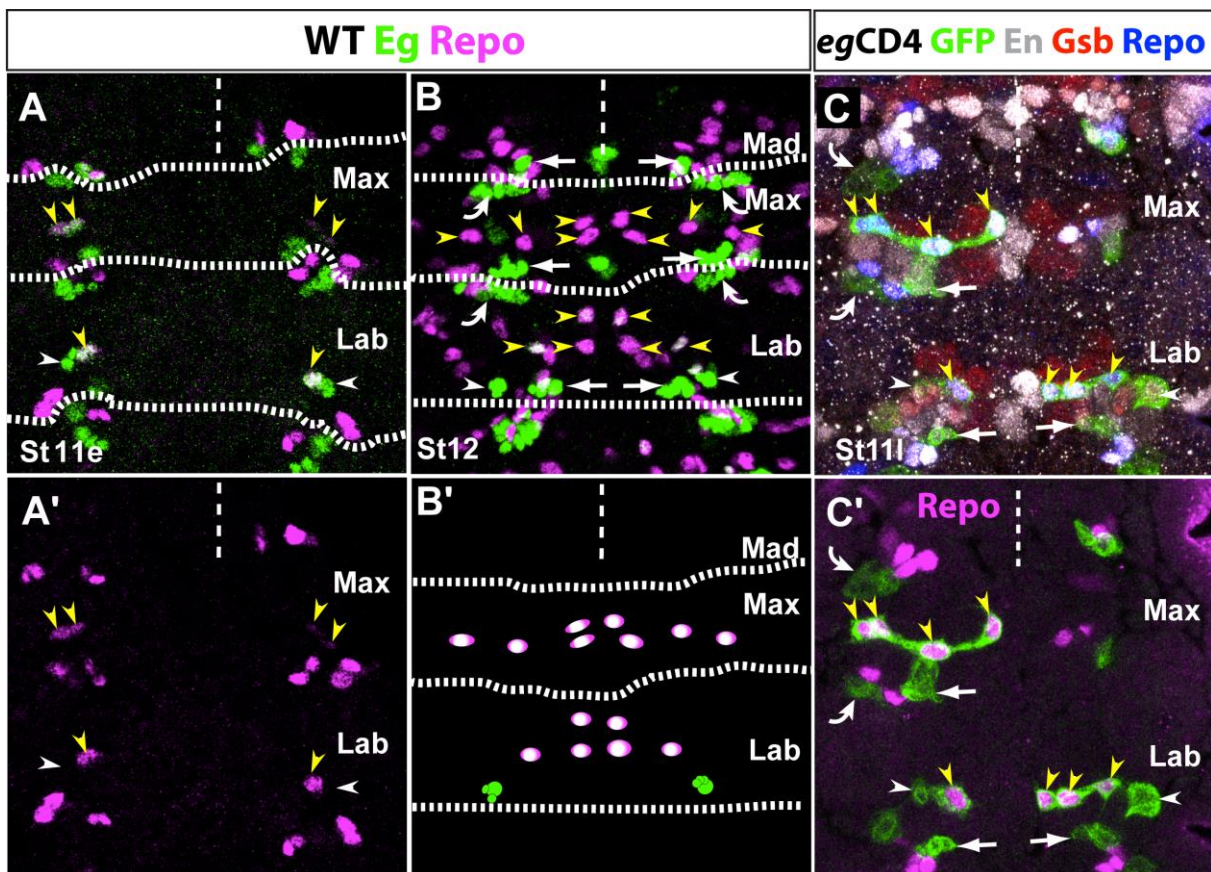


Abb. 3-3.: Gnathale NB6-4 Linien.

(A) Durch Antikörperfärbungen gegen Eg (grün) und Repo (magenta) lassen sich im Maxillar- und Labialsegment NB6-4 ab der Delamination im frühen St11 erkennen. (B) In späteren Stadien sind die Gliazellen des NB6-4max

und NB6-4lab über Expression von Repo und ihrer charakteristischen Positionen erkennbar. Eg Expression ist in NB6-4 Gliazellen ab St12 nur noch schwach sichtbar, während der neuronale Anteil des labialen NB6-4 Eg stark exprimiert. Alle weiteren Eg positiven Zelllinien lassen sich deutlich von NB6-4 abgrenzen. (B') Der Cartoon hebt die Anteile des maxillaren NB6-4 mit vier Glia (magenta) pro Hemisegment und des labialen NB6-4 mit drei Glia und einem neuronalen Cluster (grün) hervor. Die Segmentgrenzen sind durch weiße Linien gekennzeichnet. (C) Antikörperfärbungen gegen GFP im Eg Expressionsmuster des *eg-Gal4XUAS-CD4-GFP* Stamms, sowie gegen En (weiß), Gsb (rot) und Repo (blau, in C' magenta) zur eindeutigen Identifikation von NB6-4 und seinen Nachkommenzellen. (C') Reduktion der Farbkanäle auf Eg (grün) und Repo (magenta) zur Verdeutlichung der Zelllinie des NB6-4. Im Maxillarsegment bildet sich eine rein gliale Zelllinie mit vier Glia aus, während im Labialsegment ein neuronales Cluster und drei Gliazellen entstehen.

Alle Nachkommenzellen sind ab dem Zeitpunkt der Delamination durch Eg Expression, sowie über Expression von En und Gsb (Abb. 3-3 C) und ihre charakteristische Position eindeutig zu erkennen. Die Gliazellen exprimieren zusätzlich Reversed Polarity (Repo; Halter et al., 1995; Abb. 3-3 C'), die Expression von Eg ist jedoch nur etwa bis St12 über Antikörperfärbung sichtbar. Für die Identität als Neuron oder Gliazelle des NB6-4 sind auf die entstehenden Tochterzellen durch asymmetrische oder symmetrische Teilung verteilte Faktoren verantwortlich. Eine entscheidende Rolle für die Identität spielen die Lokalisation von *glia cells missing* (*gcm*) mRNA und von Prospero (Pros) (Akiyama-Oda et al., 1999; Bernardoni et al., 1999; Akiyama-Oda et al., 2000a; Akiyama-Oda et al., 2000b; Freeman und Doe, 2001; Ragone et al., 2001). Die Verteilung dieser Faktoren wird über die Funktion von CyclinE (CycE) im NB6-4 vermittelt (Berger et al., 2005; Kannan et al., 2010).

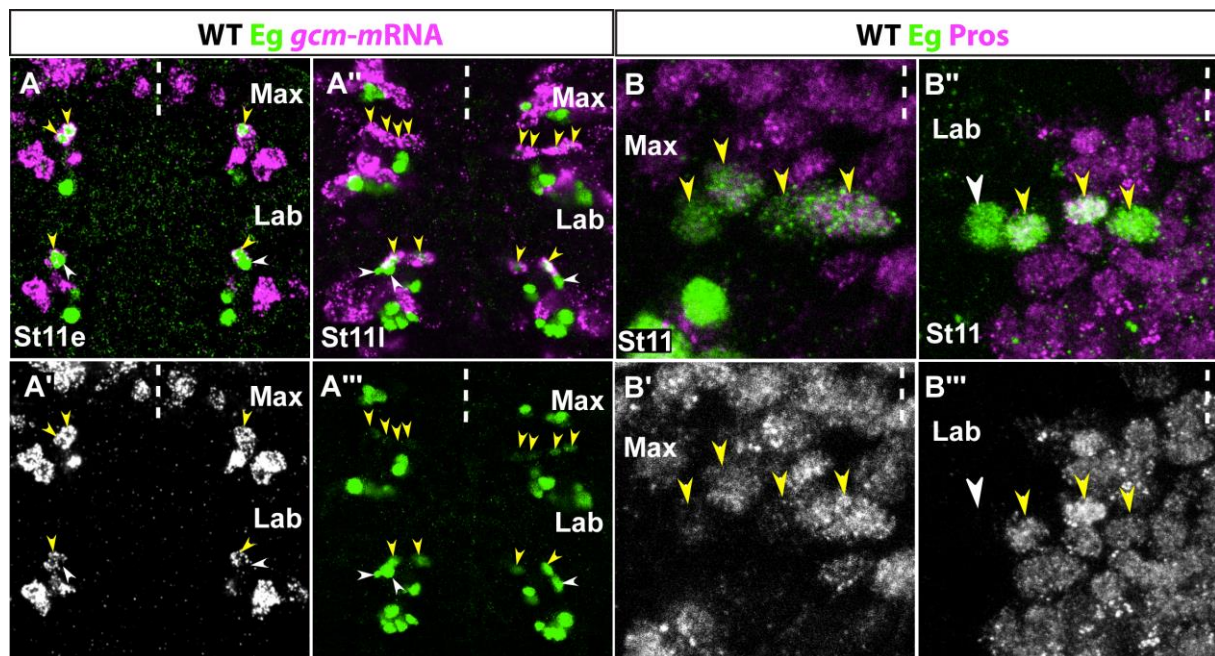


Abb. 3-4.: *gcm* mRNA und Pros werden symmetrisch auf maxillare NB6-4 Nachkommenzellen verteilt.

(A, A') *gcm* mRNA (magenta) wird während der ersten Teilung des maxillaren NB6-4 symmetrisch auf beide Nachkommenzellen verteilt, in (A') zur Verdeutlichung die Expression von *gcm* in weiß. (A'') In den anschließenden weiteren Teilungen wird im maxillaren Segment *gcm* auf beide weiteren Tochterzellen verteilt. Im Labialsegment bleibt die laterale Zelle aus der ersten Teilung *gcm*-negativ, während die drei medialen Zellen *gcm* exprimieren. (A''') Die Expression von Eg ist hervorgehoben, die in (A'') durch *gcm* überdeckt ist. (B)

Antikörperfärbung gegen Pros (magenta, in (B'') in weiß) und Eg (grün) lassen im Maxillarsegment Pros in allen vier glialen Nachkommenzellen erkennen, während im Labialsegment die laterale neuronale Vorläuferzelle kein Pros exprimiert ((B''), (B''')) Pros dargestellt in weiß).

Pros und *gcm* werden im thorakalen NB6-4 asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt, während im Abdomen eine symmetrische Verteilung erfolgt, und als Folge entsprechende segmentale Zelllinien entstehen (Akiyama-Oda et al., 2000b; Akiyama-Oda et al., 2000a; Berger et al., 2005). Im maxillaren NB6-4 wird *gcm* mRNA ebenfalls während der ersten Teilung symmetrisch verteilt, während es im labialen NB6-4 nur auf die mediale und nicht auf die laterale Zelle verteilt wird (Abb. 3-4 A, A'). Während der zweiten Teilung der maxillaren Gliazellen wird *gcm* mRNA weiterhin auf alle entstehenden Zellen verteilt (Abb. 3-4 A'', A'''). Im Labialsegment beginnt die laterale Zelle durch weitere Teilung das *gcm* negative neuronale Cluster zu bilden, während die entstehenden drei Glia alle positiv für *gcm* mRNA sind (Abb. 3-4 A'', A'''). Ebenso ist Pros Protein in allen vier maxillaren Glia nachweisbar (Abb. 3-4 B, B'). Im Labialsegment exprimieren die entstehenden drei Glia ebenfalls Pros, das laterale Neuron ist jedoch Pros negativ (Abb. 3-4 B'', B'''). Auch im maxillaren NB6-4 lässt sich bezüglich der Festlegung der Identität eine eindeutige Rolle von CycE feststellen (siehe Kapitel 3.3).

3.1.1.4. Die Frage nach der Existenz einer mandibularen NB6-4 Linie

Im Mandibularsegment delaminiert im St11 anterior zu NB7-3 kein weiterer Eg positiver Neuroblast. Daher ist bisher die Existenz eines mandibularen NB6-4 fraglich (Abb. 3-1 A und Diplomarbeit Henrike Becker, 2008). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass ein mandibularer NB6-4 eine rein gliale Zelllinie ausbildet, die eventuell nur sehr kurze Zeit Eg exprimiert. Rolf Urbach konnte transient Eg Expression in einem mandibularen Neuroblasten beobachten, den er zum Zeitpunkt des Erhebens dieser Ergebnisse als wahrscheinlichen NB6-4 des Mandibularsegments identifizierte (persönliche Mitteilung von Rolf Urbach). Da für die hier durchgeführten Untersuchungen hauptsächlich NB6-4 als Modellneuroblast verwendet wurde, ist die Frage nach der segmentalen Identität einer NB6-4 Linie in einem dritten gnathalen Segment für weitere Vergleiche sehr interessant. Daher wurden einige Anstrengungen unternommen, um einen möglichen NB6-4 des Mandibularsegments zu identifizieren.

3.1.1.5. Eindeutige Markerkombinationen lassen keinen NB6-4 im Mandibularsegment erkennen

Es wurden zunächst vierfache Antikörperfärbungen von Eg, En und Gsb als weitere im NB6-4 exprimierte Marker, sowie gegen Dpn als genereller Neuroblastenmarker, durchgeführt. In Thorax und Abdomen, sowie im Labial- und Maxillarsegment sind vier Neuroblasten Gsb und En positiv (Abb. 3-5 A). Einer dieser Neuroblasten exprimiert hier zusätzlich Eg, was ihn neben seiner lateralen Position eindeutig als NB6-4 kennzeichnet. Bei den weiteren drei NBs handelt es sich vermutlich um NB6-1, NB6-2 und NB7-1, der als einziger Neuroblast der Reihe sieben Gsb exprimiert (Urbach et al., 2016).

Im Mandibularsegment hingegen finden sich nur zwei Neuroblasten, die positiv für En und Gsb sind (Abb. 3-5 B). Keiner von beiden exprimiert Eg. Es könnte sich hierbei um NB6-1 und NB6-2 handeln.

NB6-2 exprimiert in posterioren Segmenten *intermediate neuroblasts defective* (*ind*; Weiss et al., 1998). Es lassen sich in allen Segmenten, auch dem Mandibularsegment, Ind und Gsb positive Zelllinien über die Embryonalentwicklung hinweg verfolgen.

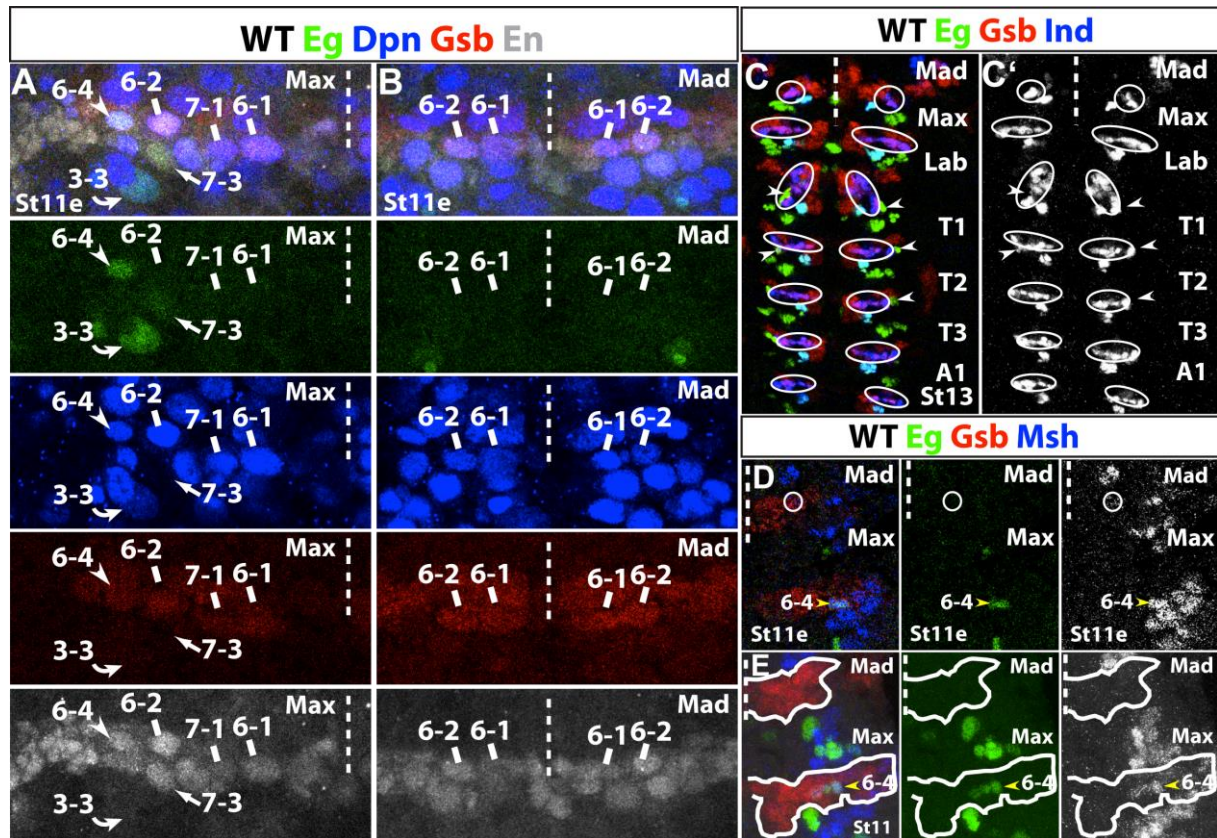


Abb. 3-5: Engrailed und Gooseberry positive Neuroblasten des Maxillar- und Mandibularsegment.

(A) NB6-4 kann durch vierfach-Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Dpn (blau), Gsb (rot) und En (weiß) im gnathalen VNS des Maxillarsegments im frühen St11 bestimmt werden. Weitere En und Gsb positive Neuroblasten des Maxillarsegments sind NB6-1, NB6-2 und NB7-1. (B) Im Mandibularsegment tritt keine Eg Expression in einem En und Gsb positiven Neuroblasten auf. Es sind nur zwei En und Gsb positive Neuroblasten (NB6-1 und NB6-2) erkennbar. (C) Antikörperfärbung gegen Ind (blau), Eg (grün) und Gsb (rot) zur Identitätsbestimmung der En und Gsb positiven Neuroblasten des Mandibularsegment über den Vergleich mit posterioren Segmenten. NB6-2 (weiß umkreist) im Mandibularsegment wird in späteren Stadien über die Expression von Ind (C', Ind Expression in weiß) in Gsb positiven Zellen über den Vergleich mit weiter posterioren Segmenten identifiziert. Die Ind-negativen NB6-4 Neurone sind mit Pfeilspitzen markiert. (D und E) Maximalprojektion aller Ebenen mit Antikörperfärbung gegen Msh (blau), Eg (grün) und Gsb (rot). (D) Msh Expression tritt im frühen St11 in einer Eg negativen Zelle im Gsb Expressionstreifen des Mandibularsegment auf. Abbildung (D) und (E) sind Maximalprojektionen aller Ebenen. (E) In späteren Stadien ist keine Msh (im Einzelkanal dargestellt in weiß) oder Eg Expression in der Gsb Expressionsdomäne (hier hervorgehoben durch die weiße Umrandung) feststellbar, während im Maxillarsegment NB6-4 Nachkommenzellen Eg und Msh exprimieren.

NB6-4 des Maxillarsegments und anderer weiter posteriorer Segmente hingegen ist deutlich Ind negativ und über Eg Expression sichtbar (NB6-4 Neurone in Abb. 3-5-C'). Ein weiterer Marker für NB6-4 ist

Muscle Segment Homeobox (Msh; Isshiki et al., 1997), der jedoch auch noch in einigen weiteren Neuroblasten exprimiert ist und in diesen ein zeitlich variables Muster aufweist. In posterioren Segmenten sind sowohl der NB6-4 selbst, als auch seine Nachkommenzellen Msh positiv (Doe, 1992). Im Labial- und Maxillarsegment findet sich im frühen St11 ebenfalls ein Eg und Msh positiver NB6-4 (Abb. 3-5 D), dessen Tochterzellen Msh Expression bis in späte Stadien hinein weiter aufrechterhalten (Abb. 3-5 E). Im Mandibularsegment tritt in St11 in einer einzigen Zelle innerhalb des Gsb Streifens transient Msh Expression auf, diese Zelle liegt jedoch sehr weit anterior und ist somit vermutlich ein Neuroblast der Reihe fünf (Abb. 3-5 D). Im späten St11 ist jedoch weder Eg noch Msh Expression innerhalb der mandibularen Gsb Expressionsdomäne zu finden, während im Maxillarsegment NB6-4 deutlich Eg und Msh exprimiert (Abb. 3-5 E). Daraus ergeben sich nun einige Hinweise, dass ein mandibularer NB6-4 vermutlich nicht gebildet wird.

3.1.1.6. Durch längeres Aufrechterhalten der Eagle Expression wird kein mandibularer NB6-4 sichtbar

Diese weiterführenden Markerexpressionsanalysen sprechen gegen das Bestehen eines mandibularen NB6-4. Es wäre jedoch möglich, dass die als Marker verwendeten Gene nur über einen sehr kurzen Zeitraum exprimiert werden.

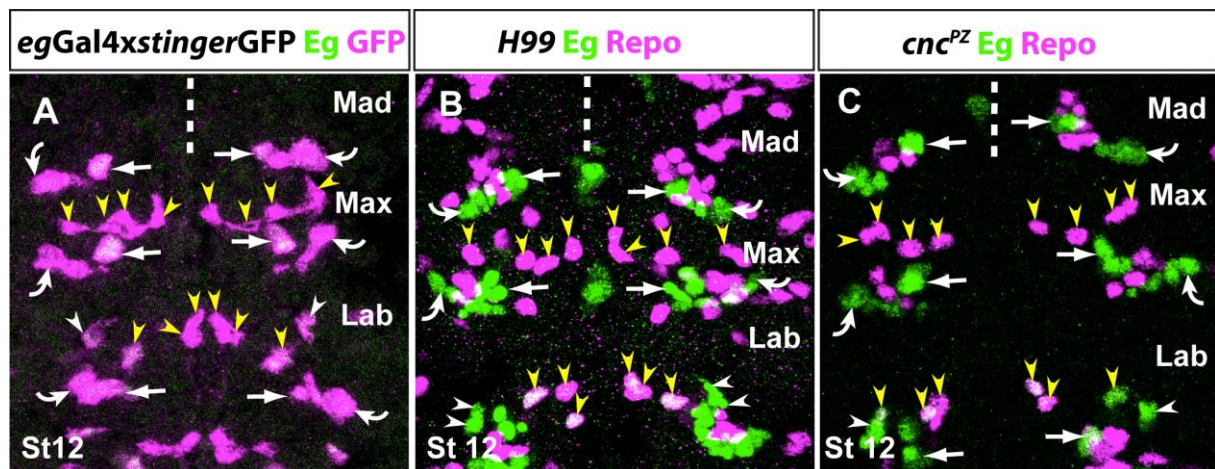


Abb. 3-6: Im Mandibularsegment tritt keine Expression von Eg an Position eines möglichen NB6-4 auf.

(A) Antikörperfärbung gegen *eg*-GFP (grün) und Eg (magenta) im *eg*-Gal4XUAS-*stinger*GFP Stamm in St12. Im Labial- und Maxillarsegment sind die Eg positiven Zelllinien über Expression von GFP und Eg deutlich sichtbar. Im Mandibularsegment exprimiert nur NB7-3 Eg, es ist keine Abweichung durch längeres Aufrechterhalten der im Eg Expressionsmuster angeregten Expression der Faktoren sichtbar. (B) Auch in *H99* Mutanten mit blockiertem Zelltod, hier in St13, ist über Eg (grün) und Repo (magenta) kein NB6-4 im Mandibularsegment erkennbar. (C) Ebenso wenig hat der Faktor *cnc* einen Einfluss auf die unterschiedliche Identität des Mandibular- und Maxillarsegments bezüglich NB6-4. Auch die anderen Eg positiven Zelllinien sind bei Funktionsverlust von *cnc* nicht augenscheinlich verändert.

Die möglicherweise transient auftretende Eg Expression wurde daher in ihrer Dauerhaftigkeit zu verlängern versucht. Beispielsweise unterliegt im Eg Expressionsmuster exprimiertes Green-

Flourescent-Protein (GFP) nicht den möglicherweise auf das Eg Protein wirkenden Abbauprozessen, die zur transienten Eg Expression führen könnten. Es lässt sich jedoch weder über *eg-lacZ* (Dittrich et al., 1997; nicht gezeigt), *egCD4-GFP* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Olaf Vef; siehe Abb. 3-3) oder *egGal4 UAS-stinger-CD8-GFP* (ebenfalls Olaf Vef) Expression an entsprechender Position im Mandibularsegment beobachten (Abb. 3-6 A). Auch in *H99* Mutanten, in denen Zelltod blockiert ist (Zhou et al., 1995), findet sich kein NB6-4 über Eg Expression im Mandibularsegment (Abb. 3-6 B).

Somit lässt sich festhalten, dass im Mandibularsegment nur zwei der ansonsten vier En und Gsb positiven Neuroblasten delaminieren. Keiner dieser beiden exprimiert die für NB6-4 charakteristischen Markergene Eg oder Msh. Daraus wird geschlossen, dass ein mandibularer NB6-4 entweder mit einer stark abweichenden Identität, oder aber gar nicht existiert. Neueste Ergebnisse der gnathalen Neuroblastenkartierungen konnten aufgrund derselben Markeranalysen und Neuroblastenzählungen ebenfalls die Existenz eines mandibularen NB6-4 mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen (Urbach et al., 2016).

3.1.1.7. *Cap-n-collar* Funktion ist für das Fehlen eines NB6-4 im Mandibularsegment nicht verantwortlich

Da sowohl im Mandibular- als auch im Maxillarsegment *Dfd* als segmentale Identität spezifizierendes Hoxgen exprimiert wird (siehe auch Kapitel 3.2. und folgende), stellt sich die Frage nach dem Grund der zu beobachtenden Unterschiede im Neuroblastenmuster bezüglich des NB6-4 dieser beiden Segmente. Bekannt ist bisher, dass *cap-n-collar* (*cnc*; Mohler et al., 1995) als ein weiterer Faktor entscheidend für die Identität des Mandibularsegments ist. Gefunden wurde in diesem Zusammenhang, dass Cnc *Dfd* Funktion im Mandibularsegment unterdrückt (Harding et al., 1995; Mohler et al., 1995; McGinnis et al., 1998; Veraksa et al., 2000).

Wird ein NB6-4 durch die Funktion von Cnc und der damit verbundenen Spezifizierung als mandibulares Segment unterdrückt? Ist dies der Fall, so wäre beim Funktionsverlust von *cnc* die Transformation der mandibularen NB6-4-Linie hin zu maxillarer Identität zu erwarten. In *cnc*^{PZ} Einzelmutanten entstehen jedoch keine Eg positiven Zellen an entsprechender Position im Mandibularsegment, auch sind keine Veränderungen der segmentalen Identität des NB6-4 im Maxillarsegment oder in anderen Segmenten zu beobachten (Abb. 3-6 C). Ektopische Expression von *cnc* bleibt ebenfalls ohne Effekt für die segmentale Identität von NB6-4 aller Segmente, insbesondere des maxillaren NB6-4 (nicht gezeigt). Somit kann ausgeschlossen werden, dass Cnc mandibulare segmentale Identität bezüglich NB6-4 spezifiziert.

3.1.1.8. NB7-3 bildet segmentspezifische Zellstammbäume in allen drei gnathalen Segmenten

NB7-3 und seine Nachkommenzellen sind in Thorax und Abdomen durch seine Expression von Eg und En eindeutig zu identifizieren. Zudem liegt er immer in einer typischen posterior-medialen Position und

ist somit unverwechselbar mit anderen Eg positiven Linien. Er bildet insgesamt drei Interneurone und ein Motoneuron aus (Bossing et al., 1996; Higashijima et al., 1996; Dittrich et al., 1997; Schmidt et al., 1997; Schmid et al., 1999; Novotny et al., 2002). In den ersten beiden thorakalen Segmenten überlebt zusätzlich eine der Vorläuferzellen als fünfte Zelle (Lundell und Hirsh, 1998; Rogulja-Ortmann et al., 2007; Rogulja-Ortmann et al., 2008).

Auch in den gnathalen Segmenten ist er in allen drei Segmenten durch Eg und En (Abb. 3-7 A, A'), sowie zusätzlich über seine mediale Position identifizierbar. Zusätzliche sind alle Nachkommenzellen der gnathalen NB7-3 positiv für Ind (Abb. 3-7 B, B') und Eyeless (Ey; Abb. 3-7 C, C'), was auch schon aus weiter posterioren Segmenten als Marker für NB7-3 bekannt ist (Urbach et al., 2016). NB7-3 zeigt eine große Diversität in den gnathalen Segmenten bezüglich seiner Zellzahlen im späten St16, in St12 bis St13 bildet er jedoch in allen drei Segmenten zunächst fünf bis sechs Zellen aus. Im Labialsegment bleiben von diesen sechs Zellen in St16 meist fünf Zellen erhalten, was der Identität von T1 und T2 entspricht. Im Maxillarsegment überleben von den Anfangs gebildeten fünf oder sechs Zellen nur drei, und im Mandibularsegment lediglich zwei Zellen (Abb. 3-7 D, D').

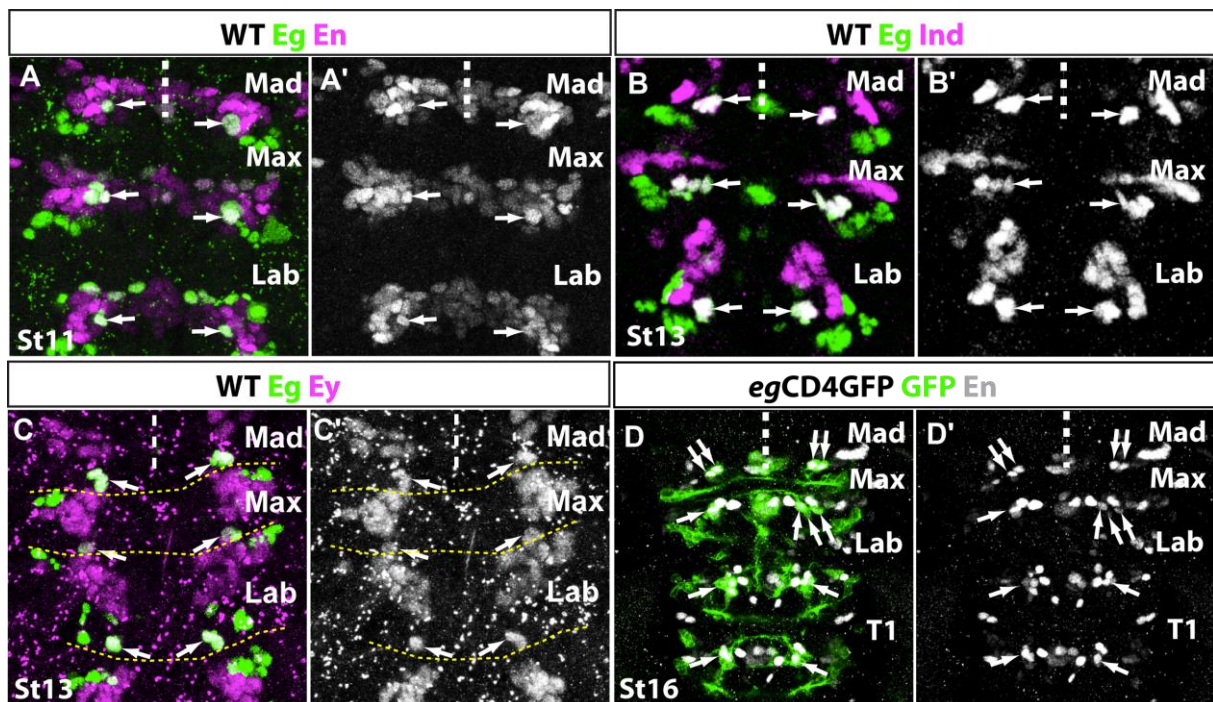


Abb. 3-7: Gnathale NB7-3 Zelllinien.

NB7-3 ist in allen drei gnathalen Segmenten neben der Expression von Eg (grün) über seine weiteren charakteristischen Marker über Antikörperfärbungen ab der Delamination im St11 (A) bis in späte Stadien (D) erkennbar und bildet segmental spezifische Zelllinien aus. (A) NB7-3 ist ab seiner Delamination im St11 über seine charakteristische Position medial posterior im Segment innerhalb des En (magenta, in A' in weiß) Expressionsstreifens erkennbar. (B) NB7-3 exprimiert in allen drei gnathalen Segmenten stark Ind (magenta, in B' in weiß). Im St13 sind in jedem Segment fünf bis sechs Zellen der NB7-3 Zelllinien erkennbar. (C) Ein weiterer bekannter Marker ist Ey (magenta, in C' in weiß), dass auch in allen drei gnathalen NB7-3 Zelllinien exprimiert ist. (D, D') Die segmentalen Identitäten der NB7-3 sind in allen drei gnathalen Segmenten unterschiedlich, hier verdeutlicht mithilfe von Antikörperfärbung gegen GFP (grün) und En (weiß, Einzelkanal in D') im *eg-*

Gal4XUAS-CD4-GFP Stamm, der eindeutig die Zusammengehörigkeit der Zellen einer Neuroblastenlinie erkennen lässt. Im Mandibularsegment bleiben im St16 von den in St13 vorhandenen fünf bis sechs Zellen nur zwei Zellen übrig. Im Maxillarsegment überleben drei Zellen und im Labialsegment alle fünf Zellen (aufgrund der Auswahl der Ebenen nur vier Zellen sichtbar) bis ins späte St16.

3.1.1.9. Die Nachkommenzellen des gnathalen NB5-3 sind teilweise Eagle positiv

Zusätzlich zu diesen seriell homologen Eg positiven Neuroblasten exprimieren ab frühem St12 weitere gnathale Zellen Eg, die in thorakalen und abdominalen Segmenten nicht als Eg positiv in Erscheinung treten. Dabei handelt es sich um ein Cluster in der Mittellinie des Mandibular- und Maxillarsegments, sowie um ein Cluster der Reihe fünf in allen drei gnathalen Segmenten (Abb. 3-8 A, A' im Cartoon; Diplomarbeit Henrike Becker).

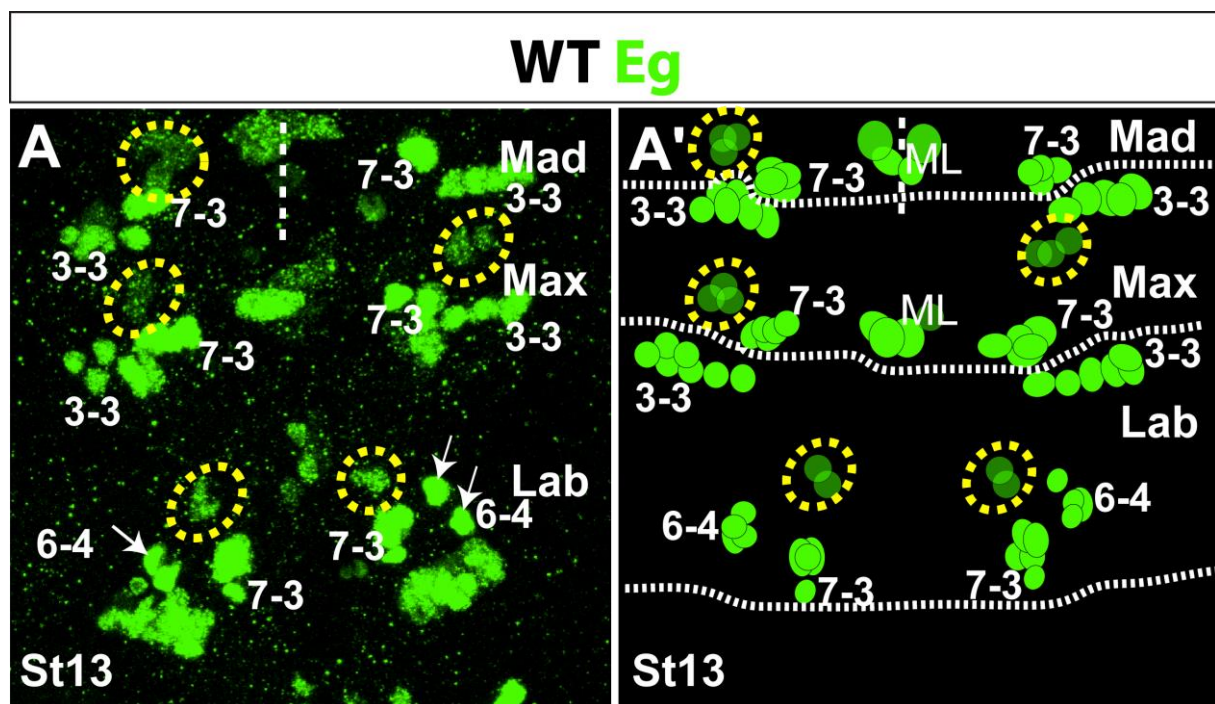


Abb. 3-8: Eg Expression im WT ab St12 in zusätzlichen Zellclustern.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg im WT in St13 lässt jeweils intermediär in allen drei gnathalen Segmenten gelegene Eg positive Zellen (markiert durch gelbe Umrandung), sowie ein Zellcluster in der Mittellinie des Mandibular- und des Maxillarsegments sichtbar werden. (A') Schematische Darstellung der Eg positiven Zellcluster im St13.

Die Identität dieser beiden zusätzlichen Linien konnte durch weitere Expressionsanalysen von Markergenen aufgeklärt werden:

Das Eg positive Cluster der Reihe fünf kann durch fehlende Expression von En (Abb. 3-9 A, A'') und die Expression von Gsb (Abb. 3-9 B, B''-D, D'') eindeutig auf Reihe fünf festgelegt werden und umfasst meist drei Eg positive Zellen. Färbungen von Eg gemeinsam mit Dpn (siehe Abb. 3-5) ließen keine Eg Färbung im delaminierenden Neuroblasten erkennen, was zur Vermutung führt, dass Eg erst

in den späteren Nachkommenzellen dieser Neuroblastenlinie exprimiert wird und somit nicht das gesamte Cluster des Neuroblasten Eg positiv ist. Selten tritt sehr schwache Eg Färbung in einer Dpn positiven Zelle auf.

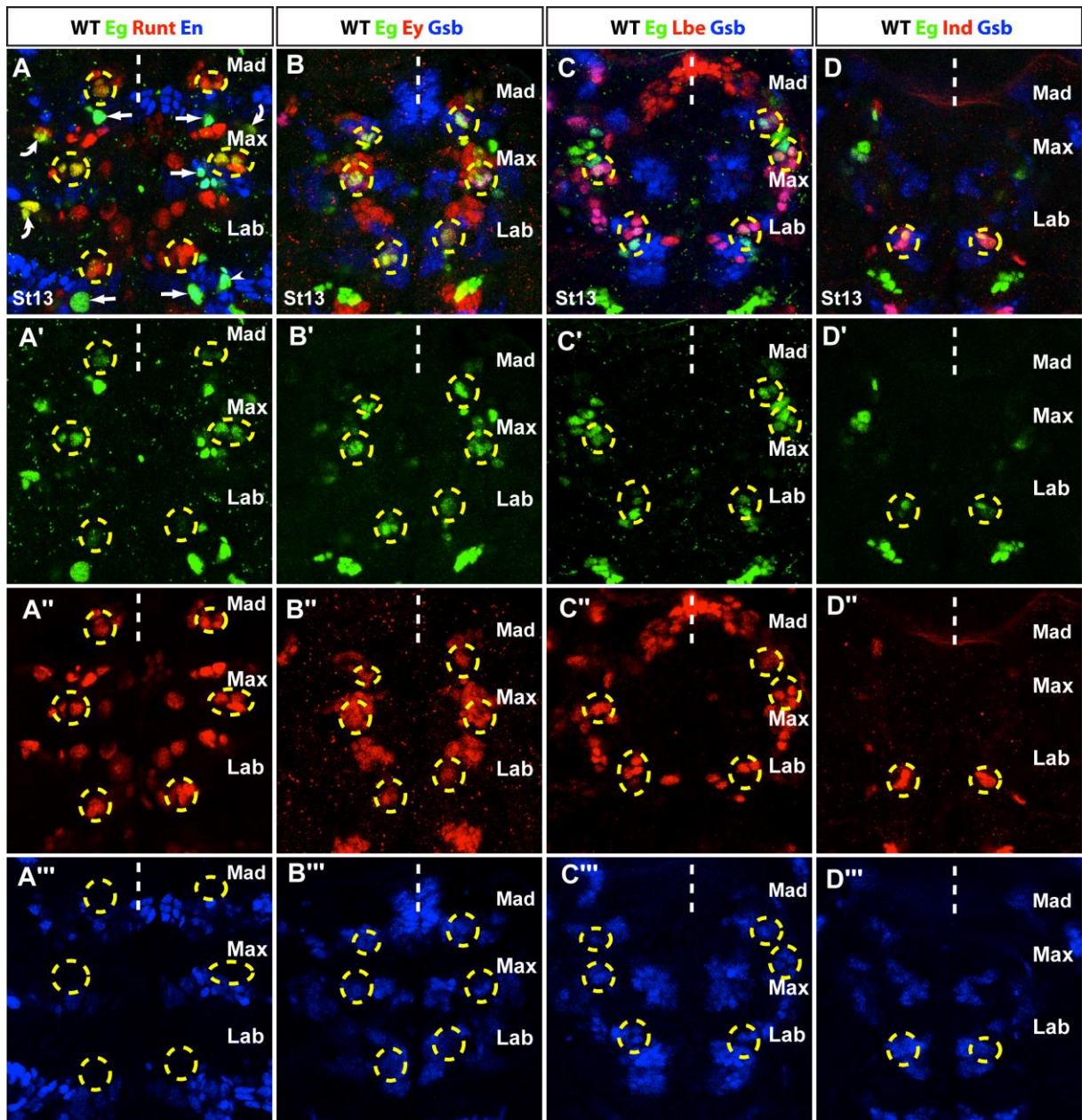


Abb. 3-9: Markerauspression für die Identifikation Eg positiver NB5-3 Nachkommenzellen.

Fokusebenen auf die Eg positiven Zellen der Reihe fünf im filetrpräparierten gnathalen VNS in St13 im WT. Die Eg positiven Zellen des NB5-3 sind durch gelbe gestrichelte Umkreisungen markiert. Antikörperfärbungen gegen Eg (grün) lassen fehlende Co-Expression von En (A, blau), aber Co-Expression von Gsb (B-D, blau) erkennen. Weiterhin werden Runt (A, rot) und Ey (B, rot) in allen drei Eg positiven Zellen exprimiert. Lbe (C, rot) tritt in zwei der drei Eg positiven Zellen auf. Ind (D, rot) wird in den labialen Eg positiven Zellen exprimiert. Für die bessere Übersicht sind die Einzelkanäle im jeweiligen Farbcode (A'-A''', B'-B''', C'-C''', D'-D''') dargestellt.

Für die weitere Einordnung der Identität der Eg positiven Zellen wurden weitere Protein Expressionsanalysen mit aus Thorax und Abdomen bekannten Markern wie Ladybird early (Lbe; De Graeve et al., 2004), Eyeless (Ey; Urbach et al., 2016), Runt (Dormand und Brand, 1998) und Ind durchgeführt. Ind wird stark in den Eg positiven Nachkommenzellen des Labialsegments exprimiert, in den beiden anterioren Segmenten ist die Expression nur sehr schwach (Abb. 3-9 D- D''). Ey und Runt werden in allen Eg positiven Zellen der Reihe fünf co-exprimiert (Abb. 3-9 A- A'', B-B''), und lassen eindeutig NB5-3 von NB5-6 unterscheiden (Doe, 1992). Aufgrund dieser Markeranalysen und dem Vergleich der Positionen der gnathalen Zellen zu thorakalen seriellen Homologen des NB5-3 wird in den gnathalen Segmenten auf die Identität der Eg positiven Zellen als Nachkommen des NB5-3 geschlossen.

Ein exklusiver Marker für Anteile der Nachkommenzellen von NB5-3 ist Lbe, da dieses Protein ansonsten nur noch in einem weiteren Neuroblasten und seinen Nachkommen, dem NB5-6 exprimiert wird (De Graeve et al., 2004). Lbe wird in mindestens zwei der Eg positiven gnathalen Zellen co-exprimiert, die dritte Eg positive Zelle ist nicht immer, oder nur schwach positiv für Lbe (Abb. 3-9 C, C''). Es finden sich in weiter lateraler Position zu den Eg und Lbe positiven Zellen noch weitere Zellen, die Lbe und Gsb exprimieren, und vermutlich zu NB5-6 gehören (vergleiche Kapitel 3.1.2.).

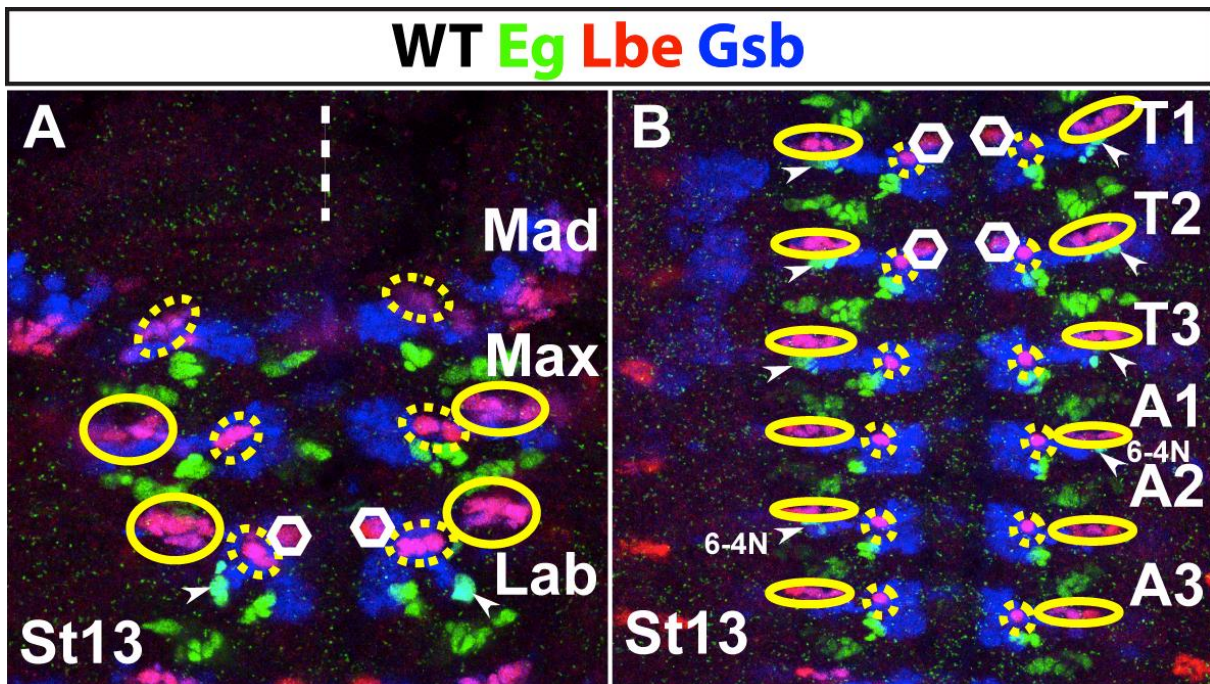


Abb. 3-10: Lbe Expression in Gsb-negativen medial gelegenen Zellen in den Segmenten Lab bis T2.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Lbe (rot) und Gsb (blau) im WT in St13 in den gnathalen (A) und den thorakalen und abdominalen Segmenten (B) als Maximalprojektion aller Ebenen. (A, B) Die Nachkommenzellen des NB5-3 (gelbe gestrichelte Kreise) exprimieren Lbe und Gsb in allen Segmenten. Sie sind räumlich deutlich abgegrenzt zu den zusätzlichen Lbe positiven, aber Gsb negativen medial gelegenen Zellen (weiße Sechsecke) in den Segmenten Lab bis T2. NB5-6 Nachkommenzellen (umkreist mit gelber durchgezogener Linie) liegen weit lateral zu NB5-3 und leicht lateral versetzt zu den neuronalen Clustern des NB6-4 (weißer Pfeilkopf, in Segment A1 und A2 jeweils ektopische NB6-4 Neurone, vergleiche Kapitel 3.18.)

Weiterhin finden sich im Labialsegment, T1 und T2 medial zu NB5-3 gelegen ab St12/St13 drei weitere Lbe positive Zellen, die jedoch negativ für Gsb sind. Aufgrund ihrer fehlenden Gsb Expression sind sie vermutlich weder Nachkommen von NB5-3, noch von NB5-6 (Abb. 3-10 A, B). Weiterhin fällt im Vergleich zu den thorakalen und abdominalen Segmenten auf, dass dort jeweils nur eine Zelle des NB5-3 Lbe exprimiert, wohingegen es in den gnathalen Segmenten drei Zellen sind (Abb. 3-10 B).

Nun stellt sich die Frage, ob alle Nachkommen der gnathalen NB5-3 Eg positiv sind? Im Mandibularsegment finden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen Eg positiven Zellen keine weiteren Ey oder Runt positiven Zellen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass der gesamte Zellstammbaum des NB5-3 nicht mehr als diese drei Eg positiven Zellen umfasst. Im Maxillar- und Labialsegment sind direkt benachbart jeweils noch mindestens drei weitere Ey positive Zellen zu finden, die kein Eg exprimieren. Daraus kann geschlossen werden, dass im Maxillar- und Labialsegment nur ein Teil der Nachkommen des NB5-3 Eg positiv werden und die Zelllinie aber insgesamt mindestens sechs Zellen umfasst.

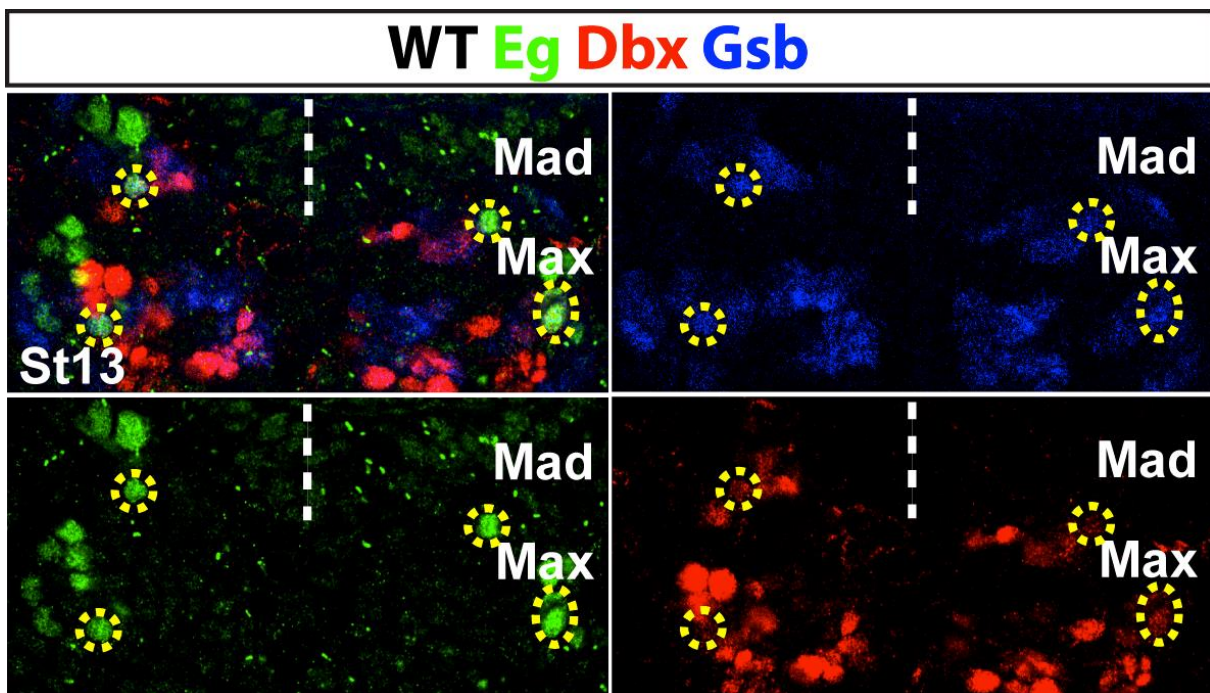


Abb. 3-11: Expression von Dbx in den Eg positiven Nachkommenzellen der gnathalen NB5-3.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Gsb (blau) und Dbx (rot) im WT in St13. Die Eg positiven Nachkommenzellen des NB5-3 (gelbe gestrichelte Linie) exprimieren im Mandibularsegment und im Maxillarsegment schwach Dbx.

Interessanterweise exprimieren die Eg positiven Zellen des NB5-3 im Mandibular- und Maxillarsegment Dbx (Abb. 3-11), was bisher aus weiter posterioren Segmenten nicht in diesem Zellstammbaum

gefunden wurde. Vielmehr wurde Dbx dort bisher in den Nachkommenzellen von NB4-2, NB5-2, NB6-1, NB6-2 und NB7-1 (Lacin et al., 2009), nicht jedoch in deren Neuroblasten selbst gefunden.

3.1.1.10. Der mandibulare und maxillare Mittellinien-Neuroblast (MNB) bringen Eagle positive Nachkommenzellen hervor

Auch in der Mittellinie des Mandibular- und Maxillarsegments treten Eg positive Zellcluster auf, die in weiter posterioren Segmenten nicht über Eg Expression sichtbar werden. Durch ihre Expression von *single minded* (*sim*; Crews et al., 1988) sind sie eindeutig als Mittellinienzellen festgelegt (Abb. 3-12 A).

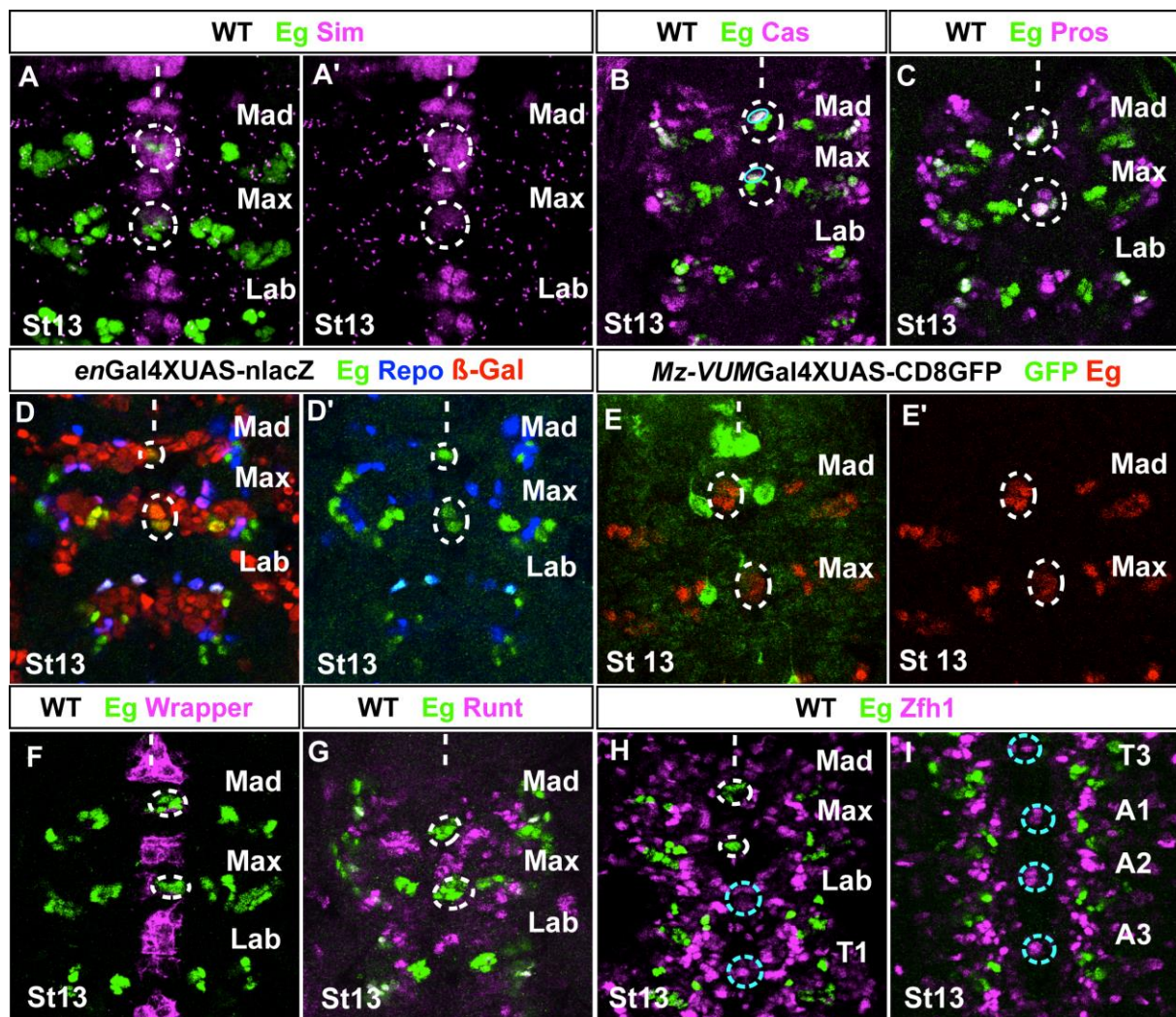


Abb. 3-12: Markeranalyse zur Identitätsbestimmung der Eg positiven MNB Nachkommenzellen des Mandibular- und Maxillarsegments.

Antikörperfärbungen mit spezifischer Markerkombination nach Wheeler et al., 2006 in St13 für die Identifikation der Eg positiven Mittellinienzellen des Mandibular- und Maxillarsegments. (A) Co-Expression von Eg (grün) und Sim (magenta, A') verdeutlicht die Identität der mittig auftretenden Eg positiven Zellen als Mittellinienzellen. Anteile der Eg positiven Mittellinienzellen exprimieren Cas (B, magenta), einige Pros (C, magenta), und sie sind En (D, rot) positiv (Herausstellung der Eg Expression in D'). (E) Die Identität der Mittellinienzellen als Ventral unpaired medial (VUM) wird durch fehlende Co-Expression von Eg (rot, E') mit GFP (grün) im *Mz-VUM Gal4XUAS-CD8 GFP* Stamm deutlich. Weiterhin findet in den Eg positiven Zellen

keine Co-Expression von Wrapper (F, magenta), Runt (G, magenta) oder Zfh1 (H, magenta) statt, wobei Zfh1 generell abweichend in der Mittellinie des Mandibular- und Maxillarsegments im Vergleich zum labialen, thorakalen und abdominalen Segment (I, türkisfarbene Umkreisung) exprimiert wird.

Die Mittellinie der posterioren Segmente setzt sich aus mehreren Zelltypen zusammen (Bossing und Technau, 1994; Kearney et al., 2004), die durch Markerkombinationen eindeutig identifiziert werden können (Wheeler et al., 2006). Für die Identifizierung der gnathalen Eg positiven Mittellinienzellen wurden als Grundlage diese von Scott R. Wheeler ermittelten Marker für posteriore Segmente verwendet. Diese Studie umfasst eine sehr genaue Analyse der Expressionsdaten verschiedener Mittellinienzellen in bestimmten festgelegten Entwicklungsstadien von *Drosophila* in posterioren Segmenten. Da die Identitäten und die Zusammensetzung der gnathalen Mittellinienzellen bisher nicht untersucht wurden, lassen sich die Aussagen über die Identitäten der Eg positiven gnathalen Mittellinienzellen auf diesem Wege nur über Vergleiche mit den posterioren Expressionsmustern weiterer bekannter Marker ziehen.

Die Identität dieser Eg positiven Mittellinienzellen konnte bereits in der Diplomarbeit mithilfe von Co-Expressionen von Castor (Cas, Abb. 3-12 B) Pros (Abb. 3-12 C), und En (Abb. 3-12 D) auf eine Identität als „Midline Neuroblast“ (MNB) Nachkommen oder „Ventral-Unpaired-Median“ (VUM) eingegrenzt werden (Wheeler et al., 2006; Diplomarbeit Henrike Becker, 2008). Mithilfe einer nur in den VUM Zellen exprimierten Gal4-Linie kann durch fehlende Co-Expression mit Eg nun die Identität der Eg exprimierenden Zellen als VUM ausgeschlossen werden (Abb. 3-12 E). Weiterhin lässt sich keine Co-Expression von Eg mit Wrapper (Abb. 3-12 F), das in den Mittellinien glia exprimiert ist, mit Runt (Abb. 3-12 G) oder mit Zfh1 (Abb. 3-12 H, I) feststellen. Zfh1 wird abweichend zu posterioren Segmenten nicht in der Mittellinie des Maxillar- und Mandibularsegments exprimiert (Abb. 3-12 H). Aufgrund dieser gesamten Markeranalyse ist die Identität der Eg exprimierenden Mittellinienzellen als Nachkommen des MNB sehr wahrscheinlich.

3.1.2. Im späteren Embryo werden Anteile weiterer mandibularer und maxillarer Neuroblastenlinien Eagle positiv

Überraschenderweise finden sich in den beiden anterioren gnathalen Segmenten ab St14 weitere Eg positive Zellen, die sich nicht den bisher bekannten Eg positiven Linien zuordnen lassen, und die erst im St14 Eg positiv werden (Abb. 3-13 A-C). Da die Möglichkeit von Verwechslungen mit bereits bekannten Neuroblastenlinien in dieser und in eventuell folgenden Arbeiten besteht (siehe Kapitel 4.2.), ist eine Identifikation dieser Zellen wichtig. Das Expressionsmuster ab St14 wird durch diese zusätzlichen Eg positiven Cluster sehr komplex. Zusätzlich wird es durch die morphologischen Bewegungen durch die Bildung der Hemisphären und damit verbundener Wölbung und Streckung des gnathalen VNS extrem schwer, anhand der Positionen Zellidentitäten zuzuordnen.

Um Aufschluss über die Identität dieser Zellen zu gewinnen, wurden kombinierte Markerfärbungen, die von Neuroblasten und teilweise deren Nachkommenzellen aus Thorax und Abdomen bekannt sind, durchgeführt. Die meisten dieser Marker wurden für delaminierende Neuroblasten zwischen St10 und St11 untersucht (in thorakalen und abdominalen Segmenten (Doe, 1992; für die gnathalen Segmente Urbach et al., 2016). Daher können aufgrund des späten Stadiums des Auftretens der zusätzlichen Eg Expression Abweichungen zu den für Neuroblasten gefundenen Expressionsdaten der Marker bestehen.

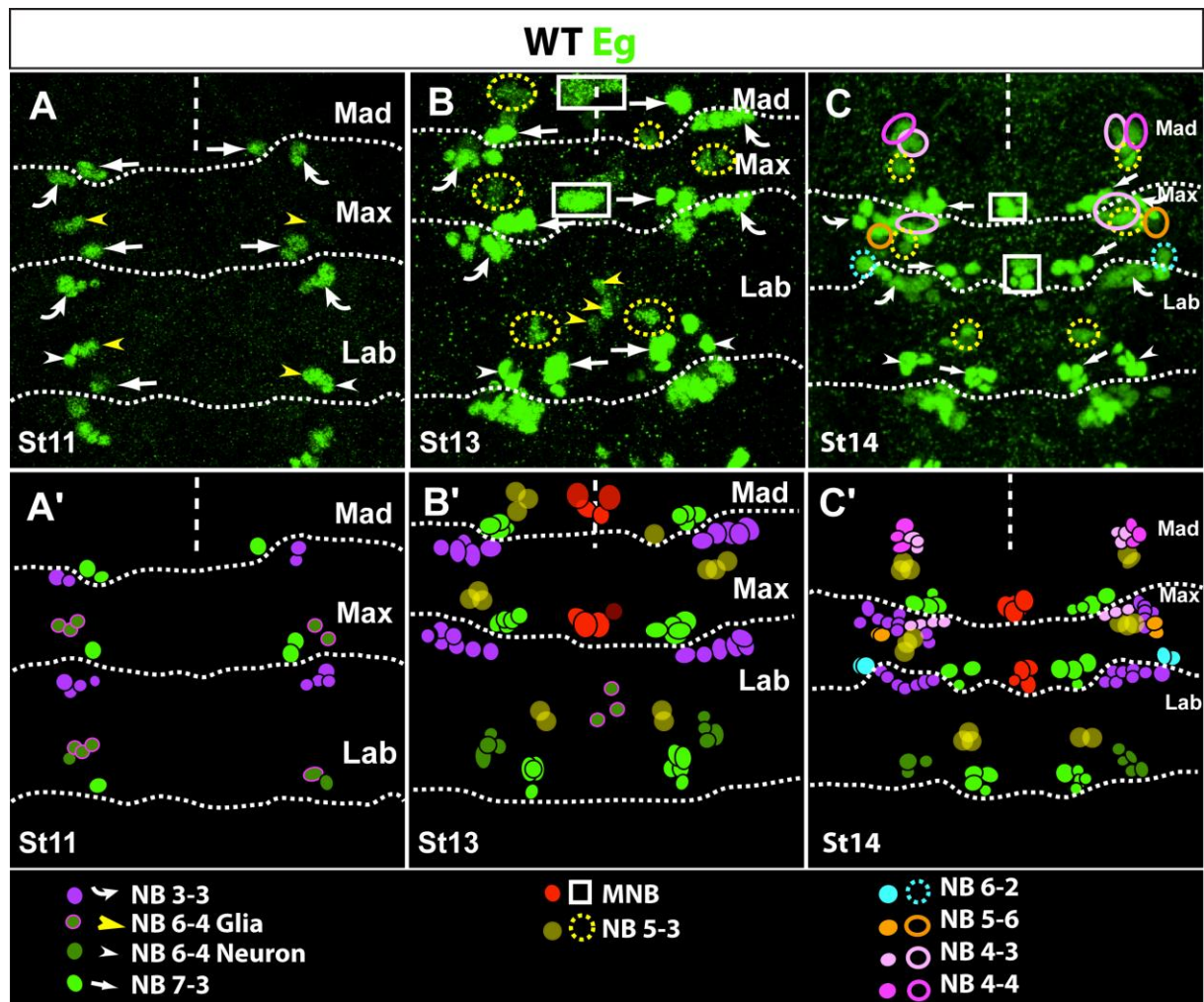


Abb. 3-13: Darstellung der zeitlichen Veränderungen des gnathalen Eg Expressionsmusters.

(A-C) Eg Antikörperfärbung im WT in (A) St11, (B) St13 und (C) St14. (A'-C') Schematische Darstellung der Eg positiven Neuroblastenlinien in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit unterschiedlicher farblicher Markierung. Die Zuordnung der Farbcodes ist in der Legende unterhalb der Abbildung angegeben. (A, A') Im St11 sind lediglich NB3-3, NB6-4 und NB7-3, sowie ihre Nachkommenzellen Eg positiv. (B, B') Im St 13 sind zusätzlich Nachkommenzellen des MNB, sowie des NB5-3 Eg positiv. (C, C') Im St14 beginnen zusätzlich der mandibulare NB4-3 und NB4-4, sowie des maxillare NB4-3, NB5-6 und NB6-2 Eg zu exprimieren und Eg positive Nachkommenzellen zu bilden.

3.1.2.1. Verwendete Marker für die Identifizierung der gnathalen spät Eagle positiven Zellen

Um die Identität zu bestimmen, folgten Markeranalysen von bisher aus Thorax oder Abdomen, sowie aus den Neuroblastenkartierungen der gnathalen Segmente bekannter Differenzierungsfaktoren.

Für die Orientierung innerhalb des Segments wurden wiederum die Marker En für Reihe sechs und sieben und Gsb für Reihe fünf und sechs verwendet. Als weitere Marker für die Identifizierung einzelner Neuroblastenlinien kamen folgende Faktoren zur Verwendung:

das zur Pax-Familie gehörende *eyeless* (*ey*; NB3-2, NB4-2, NB4-3, NB4-4, NB5-3 und NB7-3; Urbach et al., 2016),

das Lückengen *Empty spiracles* (*Ems*; NB3-5, sowie Tochterzellen des NB4-4 und NB3-3; Hartmann et al., 2000),

das Segmentpolaritätsgen *even skipped* (*eve*; Nachkommen des NB4-2 und des NB7-1 (Bossing et al., 1996); des NB1-1 (Broadus et al., 1995); und des NB3-3 (Schmidt et al., 1997),

das Paaregelgen *runt* (NB2-2, NB2-3, NB3-1, NB3-2, NB3-3, NB5-2 und NB5-3; Dormand und Brand, 1998),

Dbx (NB4-2, NB5-2, NB6-1, NB6-2 und NB7-1; Lacin et al., 2009),

Orthodenticle (*Otd*; NB2-1, NB3-1, NB5-1 und NB6-1; Urbach et al., 2016),

für die Spezifizierung dorsaler Neuroblasten verantwortliches *muscle segment homeobox* (*msh*; NB2-4, NB4-3, NB5-4, NB6-4 und NB7-4; Isshiki et al., 1997),

intermediate neuroblasts defective (*ind*; zeitlich variable Expression für die Identitätsfestlegung von intermediären Neuroblasten NB3-2, NB4-2, NB5-3, NB6-2 und NB7-2; Weiss et al., 1998),

ladybird early (*lbe*; NB5-6 und Nachkommenzellen, sowie Nachkommen des NB5-3; De Graeve et al., 2004),

ming-lacZ (entspricht dem Gen *castor* (*cas*)-lacZ, das eine Rolle bei temporärer Spezifizierung von Neuroblasten spielt (Doe, 1992; Isshiki et al., 2001), daher sehr variabel),

hkb-lacZ (NB1-1, NB2-1, NB2-2, NB2-4, NB4-2, NB4-3, NB4-4, NB5-4, NB5-5 und NB7-3; Doe, 1992),

mirror (*mirr*)-lacZ (Neuroblasten der Reihe 1 und 2, sowie NB3-2, NB3-4, NB6-1 und dem MNB; Broadus et al., 1995).

3.1.2.2. Anteile der mandibularen NB4-3 und NB4-4 Zellstammbäume sind Eagle positiv

Das Eg Muster des Mandibularsegments ist bis St12 sehr übersichtlich, lediglich NB7-3 in seiner typischen medial-posterioren Position mit starker Eg Expression ist vorhanden (Abb. 3-13 A, A').

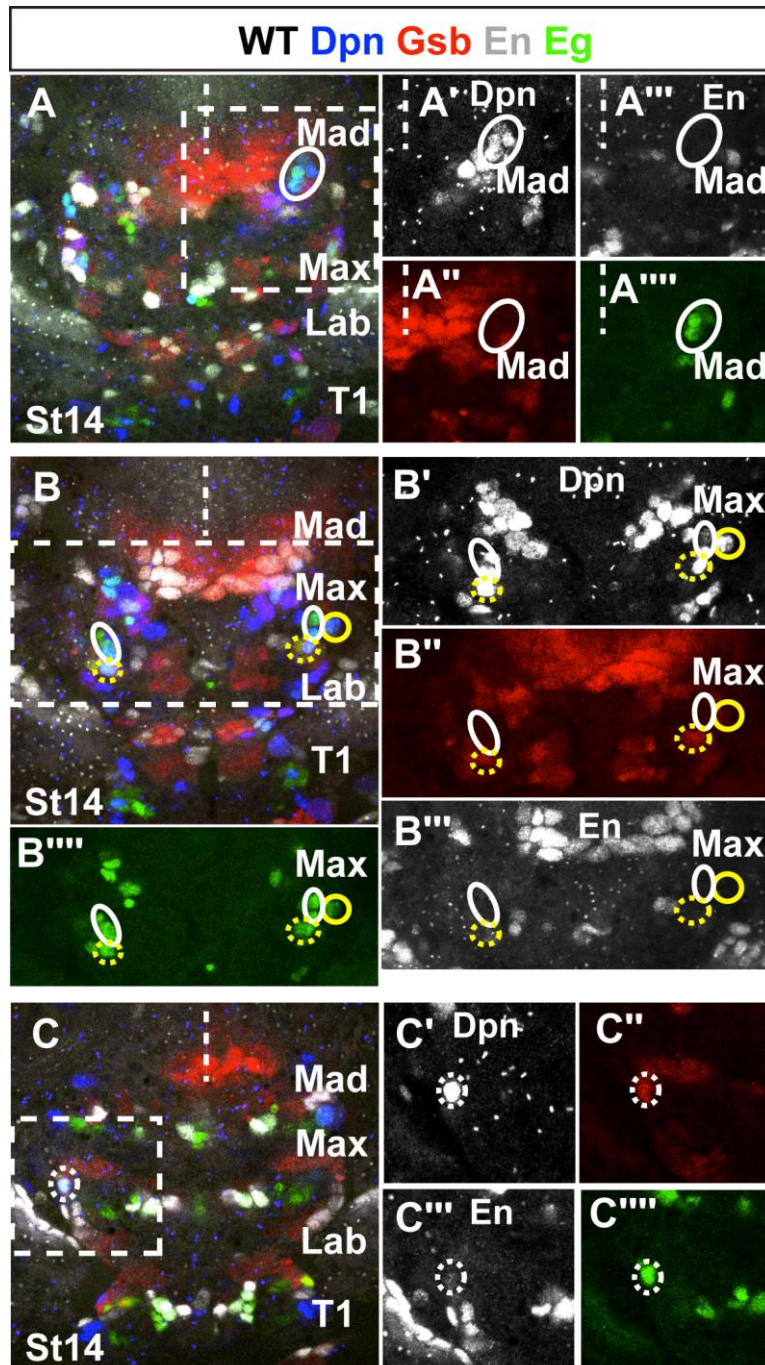


Abb. 3-14: Dpn Expression in den Eg positiven Zelllinien im St14.

Antikörperfärbungen gegen Dpn (blau, in den Ausschnitten als Einzelfarbkanal in weiß dargestellt), Eg (grün), Gsb (rot) und En (weiß) im St14 im WT.

(A) Ab St14 sind im Mandibularsegment vier eng benachbarte Eg (A''') und Dpn (A') positive Zellen anterior des Gsb Expressionstreifens sichtbar, die weder Gsb (A''), noch En (A''') exprimieren. (B) Im Maxillarsegment werden drei verschiedene benachbarte Cluster Eg positiv, die jeweils mindestens eine Dpn positive Zelle aufweisen (B'). Anhand der Expression von Gsb (B'') in zweien (gelbe gestrichelte Linie und gelbe geschlossene Linie) der drei Cluster, sowie fehlender En Expression (B''') lassen sich erste Rückschlüsse auf die Identität der Cluster zu Reihe fünf ziehen. (C) Ein weiterer Dpn exprimierender Neuroblast (C') wird in St14 im Maxillarsegment Eg positiv (C''') und exprimiert Gsb (C'') und En (C''').

Ab St12 exprimieren zudem der MNB, sowie NB5-3 Nachkommen Eg (Abb. 3-13 B, B'). Ab St14 werden zunächst schwach Eg positiv vier weitere Zellen anterior zum Gsb Expressionsstreifen sichtbar (Abb. 3-13 C, C'). Alle vier Zellen exprimieren den Neuroblastenmarker Dpn (Abb. 3-14), sowohl die Zellen im Mandibularsegment (Abb. 3-14 A-A'''), als auch die unterschiedlichen Cluster des Maxillarsegments (Abb. 3-14 B-B'''' und C-C'''). Da Dpn auch kurzzeitig in Gangliennutterzellen exprimiert ist (eigene Beobachtungen und persönliche Mitteilung von Sudha Myneni, gegenläufig zu Bier et al., 1992), könnte es sich somit bei diesen vier Dpn positiven Zellen um zwei Neuroblasten und jeweils eine neu gebildete Gangliennutterzelle handeln. Bis in St16 bildet jeder dieser beiden Eg

positiven Neuroblasten zwei bis vier weitere Eg positive Zellen, so dass zwei eng benachbarte Cluster von jeweils vier bis sechs Zellen sichtbar sind.

Eine mögliche Erklärung für die späte Dpn Expression wäre, dass es sich bei diesen Zellen um Vorläuferzellen der Sensorischen Organe („Sensory Organ Precursor“, SOP) handelt, die bis in späte Stadien hinein Dpn positiv sind (Bier et al., 1992). SOPs exprimieren *cousin of atonal* (*cato*; zur Lage und Jarman, 2010). Cato Expression ist in St14 im Vergleich zu St12 stark reduziert (vergleiche Abb. 3-15 A St12 und A'-A'' St14). Cato Expression findet sich in den spät Eg positiven Zellen des Mandibularsegments nicht (Abb. 3-15 A''), was deren Identität als SOPs unwahrscheinlich macht. Andere Cato positive Zellen (Abb. 3-15 A' und A'', markiert mit grüner Umkreisung) liegen zu diesem Zeitpunkt benachbart zu den Eg positiven Zellen (Abb. 3-15 A' und A'', markiert mit weißer gestrichelter Umkreisung ist NB6-2). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Cato Expression auch in St14 über Antikörperfärbung noch ausreichend in Eg und Dpn positiven Zellen nachweisbar wäre und somit eine Identität der Eg positiven Zellen als SOPs erkennbar wäre.

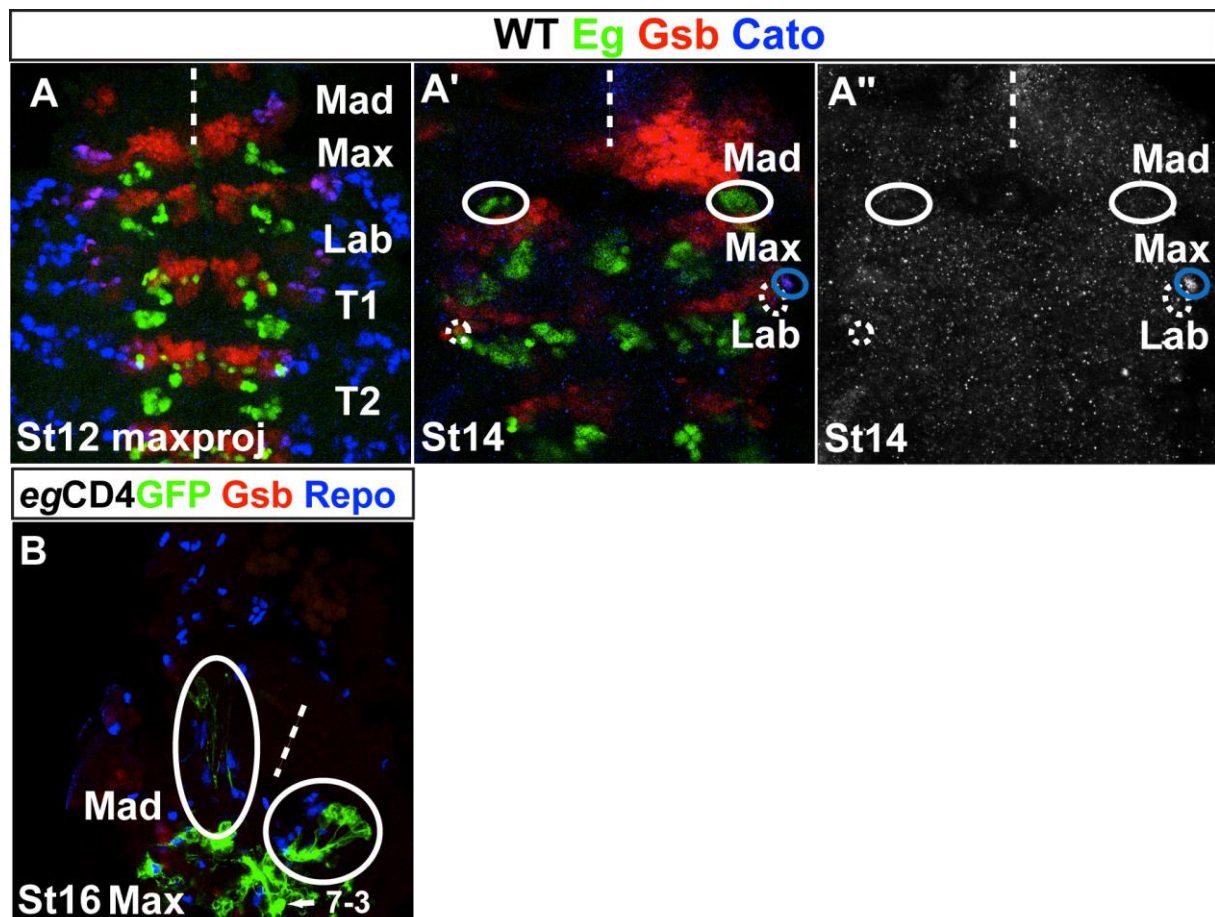


Abb. 3-15: Dpn positive Zellen in St14 sind keine Vorläuferzellen sensorischer Organe.

Antikörperfärbungen gegen Eg (grün), Gsb (rot) und Cato (blau, im Einzelfarbkanal A'' weiß dargestellt) lassen eindeutig eine sich stark verringerte Expression von Cato zwischen St12 (A) und St14 (A') erkennen. Trotzdem exprimieren auch in St14 noch Zellen Cato (grüne Umkreisung in A''), nicht jedoch die in St14 Eg positiven Neuroblasten. Hier hervorgehoben durch die weiße gestrichelte Umkreisung ist NB6-2.

(B) Die nach anterior orientierten Projektionen der mandibularen spät Eg positiven Zellen sind in St16 im *egGal4XUAS-CD4-GFP* Stamm anhand ihrer GFP Expression nachzuvollziehen.

Die spät Eg positiven Zellen des Mandibularsegments bilden Projektionen in die weiter anteriore Region aus (Abb. 3-15 B). Da sich die Zellen direkt anterior zum Gsb Streifen befinden und weder Gsb noch En exprimieren (Abb. 3-14 A'' und A'''), wurde zunächst auf die Identitäten von Neuroblastenlinien der Reihe drei oder vier geschlossen. Alle diese Zellen exprimieren Ey und *ming-lacZ*, sowie *hkb-lacZ* (Abb. 3-16 A). Aus der Kombination von *hkb-lacZ* und Ey und fehlender Expression von Gsb und En kann bisher auf NB4-2, NB4-3 oder NB4-4 geschlossen werden.

Weitere Eingrenzung der Identität ist durch den Nachweis von Ems und Msh Proteinexpression möglich (Abb. 3-16 A, die beiden unteren Reihen). Die Annahme, dass es sich bei den ursprünglich vier Eg und Dpn positiven Zellen um zwei verschiedene Neuroblasten und ihre Gangliemutterzellen handelt, wird durch die Expression von Msh und Ems gestützt. Beide Faktoren werden jeweils nur in einem Teil der Zellen exprimiert, so findet sich Ems Expression in dem lateralen Anteil des Clusters (pinke Umkreisung), Msh im medial gelegenen (rosa Umkreisung in Abb. 3-16 A in den beiden unteren Reihen).

Alle weiteren Marker sind nicht exprimiert. So kann für das lateralere Cluster aufgrund der Kombination von Ey, Ems, *ming-lacZ* und *hkb-lacZ* auf NB4-4 geschlossen. Das mediale Cluster exprimiert Ey, Msh, *ming-lacZ* und *hkb-lacZ* und ist somit am ehesten entsprechend der Identität von NB4-3.

3.1.2.3. Anteile der maxillaren NB4-3, NB5-6 und NB6-2 Zellstammbäume exprimieren zusätzlich Eagle

Im Maxillarsegment finden sich abweichend zum bekannten Eg Expressionsmuster aus NB3-3, 6-4 und 7-3, sowie den Zellen des MNB und des NB5-3 noch drei weitere Eg positive Cluster ab St14 (vergleiche Abb. 3-13 C und C'). Eines dieser Cluster ist in seiner Lage und ventro-dorsalen Position sehr ähnlich der NB4-3 und NB4-4 des Mandibularsegments (markiert durch rosafarbenen geschlossenen Kreis in Abb. 3-16 B). Im frühen St14 tritt in diesem Cluster zunächst eine einzelne Eg positive Zellen in Erscheinung. Während St14 entstehen vier bis fünf weitere Eg positive Zellen. Diese Zellen exprimieren Ey, Msh, *ming-lacZ* und *hkb-lacZ*, sowie Dac und sind negativ für alle weiteren geprüften Marker (Abb. 3-16 B). Aufgrund dieser Markerkombination von Ey, Hkb und Msh und der vergleichbaren Lage der Eg positiven NB4-3 Zellen des Mandibularsegments kommen auch im Maxillarsegment Nachkommen des NB4-3 als wahrscheinliche Identität in Betracht.

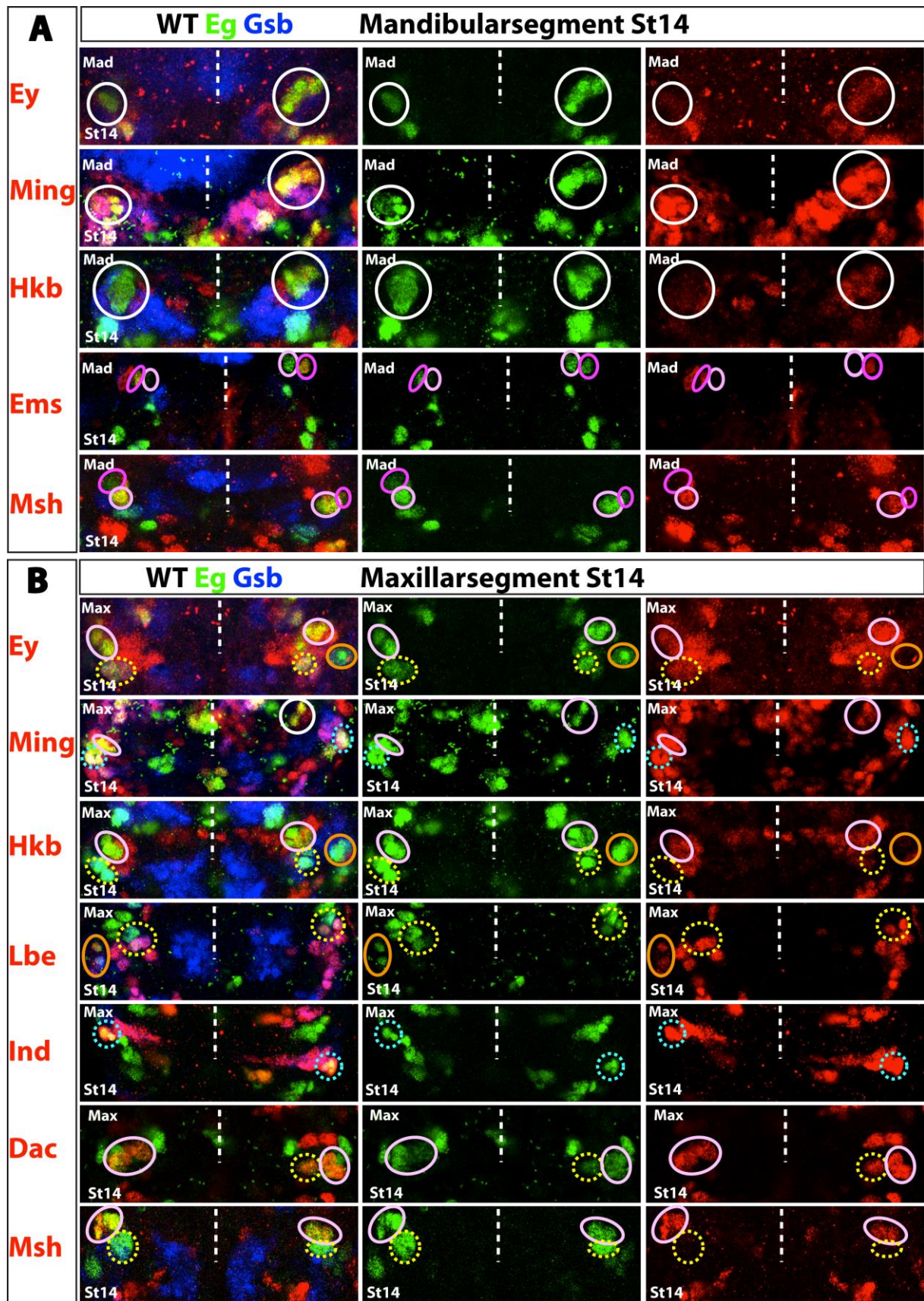


Abb. 3-16: Markeranalysen für die Bestimmung der Identitäten der ab St14 Eg positiv werdenden Neuroblastenlinien der gnathalen Segmente.

Antikörperfärbungen im St14 im WT gegen Eg (grün) und Gsb (blau), sowie gegen spezifische für St11 bekannte Marker für die Identitätsbestimmung von Neuroblasten (rot). (A) Markeranalyse für die Bestimmung der Identitäten der mandibularen Eg positiven Neuroblasten-Sublinien. Beide Eg positiven Neuroblasten-Sublinien exprimieren Ey, Ming und Hkb. Ems wird nur in dem lateral gelegenen Cluster des NB4-4 (magentafarbene Umkreisung) exprimiert, hingegen exprimiert das medial gelegene Cluster des NB4-3 (rosafarbene Umkreisung) Msh. (B) Markeranalyse für die Identitätsbestimmung der maxillaren Eg positiven Neuroblasten-Sublinien. Die Eg positiven Zellen des NB4-3max (rosafarbene Umkreisung) und des NB5-3 (gelbe gestrichelte Umkreisung) exprimieren Ey, während NB5-6 (orangene Umkreisung) und NB6-2 (cyanfarbene gestrichelte Umkreisung) nicht positiv für Ey sind. Ming wird im NB4-3 und NB6-2 exprimiert, während NB5-3 und NB5-6 negativ sind. Hkb wird einzig im NB4-3 exprimiert, alle weiteren sind Hkb negativ. Lbe ist ein eindeutiger Differenzierungsfaktor für NB5-6 und NB5-3 und wird in beiden Linien exprimiert, wobei von NB5-3 nur zwei der drei Eg positiven Zellen Lbe positiv sind. Ind wird stark im NB6-2 exprimiert. Dac Expression findet sich im NB4-3 und NB5-3. Msh wird in NB4-3 exprimiert, alle weiteren sind Msh negativ. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Ein weiteres Eg positives Cluster wird in St14 in Reihe fünf des Maxillarsegments sichtbar, weiter lateral gelegen als die Eg positiven NB5-3 Nachkommenzellen (markiert durch orangefarbenen geschlossenen Kreis in Abb. 3-16 B). Es besteht meist aus drei Zellen. Aufgrund der Expression von Lbe, Gsb und fehlender Ey Expression (Abb. 3-16 B), sowie fehlender En Expression (vergleiche Abb. 3-14 B'') lässt sich die Identität eindeutig auf NB5-6 festlegen.

Ab St14 werden in Reihe sechs des Maxillarsegments weitere Zellen Eg positiv (Abb. 3-13 C und Abb. 3-16 B, markiert durch gestrichelten cyanfarbenen Kreis). Diese Zellen liegen sehr weit lateral. Daraus ergibt sich eine große Gefahr, dieses Zellcluster mit ektopischen NB6-4 Neuronen zu verwechseln (siehe auch Kapitel 4.2.). Zunächst tritt hier eine Dpn positive Zelle auf (Abb. 3-14 C), die *ming-lacZ*, Gsb, En und sehr stark Ind exprimiert. Nach kurzer Zeit bildet sich eine weitere Eg und Dpn positive Zelle. Selten wird eine dritte Eg positive Zelle gebildet. Fehlende Expression weiterer Marker und die Kombinatorik dieser Marker, vor allem die Expression von Ind, deuten auf die Identität des NB6-2 hin.

Verwunderlich ist jedoch die Position des nun Eg positiven Neuroblasten, die sehr weit lateral für einen weiter medial geborenen Neuroblasten ist. Es lässt sich jedoch anhand der Ind Expression die Wanderung des Neuroblasten über die verschiedenen Entwicklungsstadien in die laterale Region nachvollziehen (Abb. 3-17 A und B). Aus weiter posterioren Segmenten ist bekannt, dass die Nachkommenzellen von NB6-2 Dbx exprimieren (Lacin et al., 2009). Dbx Expression findet sich nicht in den Eg positiven Zellen, auch nicht im späten St16, jedoch in direkt benachbarten Zellen der Reihe sechs (Abb. 3-17 C, C''). Somit sind die Dbx positiven Nachkommen des maxillaren NB6-2 nicht positiv für Eg.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Eg Expressionsmuster in den gnathalen Segmenten über die Zeit der Embryonalentwicklung hinweg sehr komplex wird. Die höchste Komplexität erreicht das Muster im Maxillarsegment, wo neben NB3-3, NB6-4 und NB7-3 der MNB, NB5-3, sowie der NB5-6, NB6-2 und NB4-3 Eg positive Nachkommenzellen generieren. Im Mandibularsegment sind neben NB7-3 Nachkommenzellen des MNB, NB5-3, voraussichtlich NB4-3 und NB4-4 Eg positiv. Die meisten dieser segmental unterschiedlichen Identitäten, reflektiert durch die spezifischen

Markerkombinationen gemeinsam mit Eg Expression, sind abhängig von der Funktion der Hoxgene *Deformed* und *Sex combs reduced* (siehe Kapitel 3.2.).

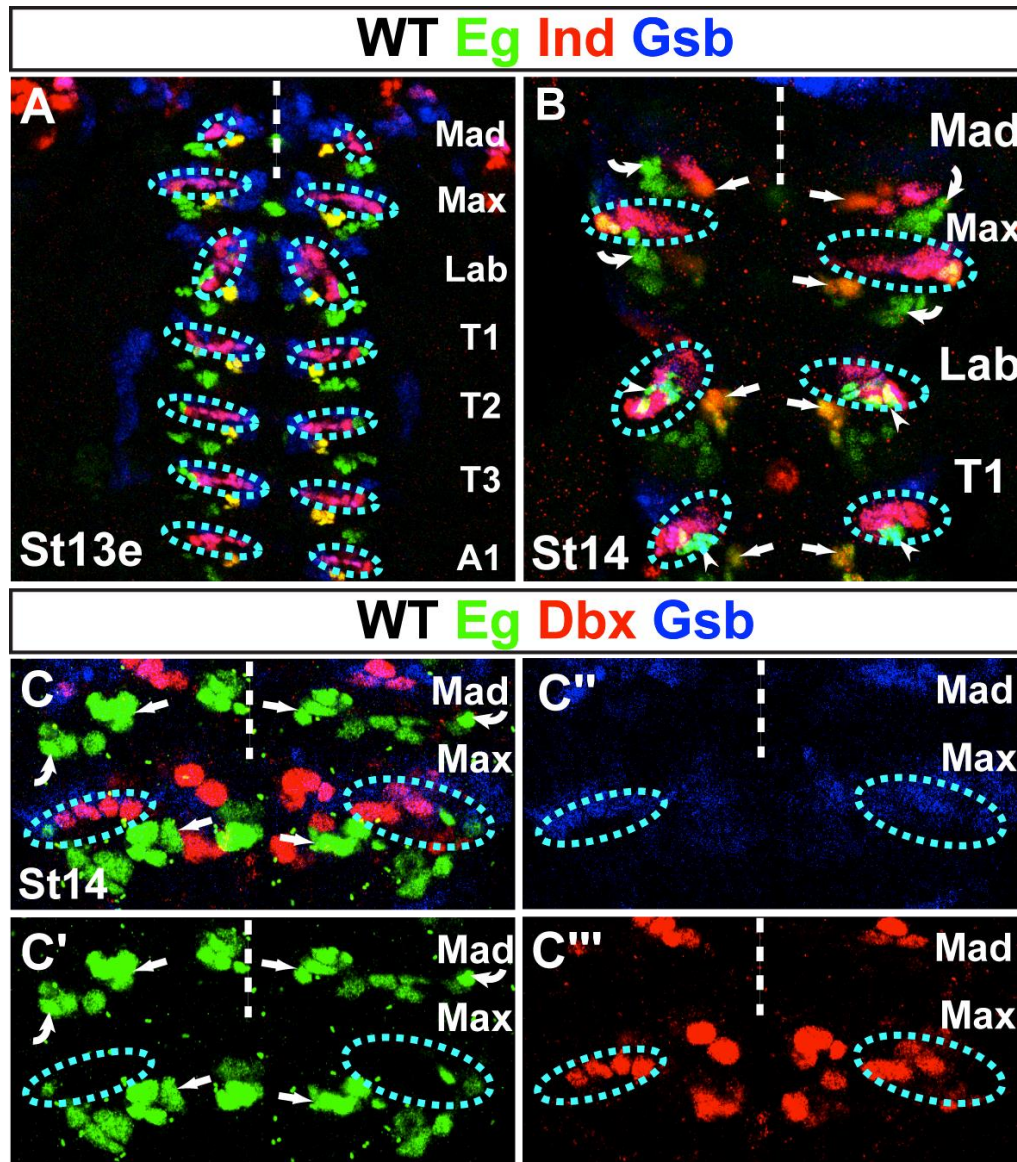


Abb. 3-17: Weitere Identitätsbestimmung und Lagebestimmung von NB6-2max.

Anhand von Antikörperfärbungen gegen Ind (rot) kann die laterale Lage der Eg positiven Nachkommen des NB6-2 nachvollzogen werden. (A) Vergleich der Ind Expression in den Nachkommenzellen des NB6-2 in den Segmenten Mad bis A1 in St13e lässt eine Wanderung des NB6-2 in eine laterale Region erkennen. Die neuronalen Cluster des NB6-4lab und NB6-4t liegen jedoch weiterhin lateral von NB6-2 Zellen. (B) In St14 liegen die Ind positiven Zellen des NB6-2 teilweise lateraler als NB6-4 Neurone. Im Maxillarsegment beginnt die am weitesten lateral gelegene Zelle des Ind positiven Zellclusters Eg zu exprimieren. (C) Antikörperfärbung gegen Eg (grün, Einzelkanal in C'), Gsb (blau, Einzelkanal in C'') und Dbx (rot, Einzelkanal in C''') als weiterer Marker für NB6-2 und seine Nachkommenzellen. Die Eg positiven Zellen von NB6-2 sind nicht Dbx positiv (C' im Vergleich mit C''').

3.1.3. Weitere Beobachtungen über das Eagle Expressionsmuster in angrenzenden Segmenten

3.1.3.1. Im Tritocerebrum und im Deutocerebrum tritt transient Eagle Expression auf

Während der Analyse des gnathalen Eg Musters fielen häufig Eg positive Zellen im Gehirn auf. Serielle Homologie zwischen VNS und Gehirn ist aktueller Gegenstand der Forschung (zusammengefasst in Urbach und Technau, 2003a; Urbach und Technau, 2004; Technau, 2008). Insbesondere im Hinblick auf Hoxgenfunktionen und die Entstehung von segmentaler Identität ist die Bildung seriell homologer Neuroblastenlinien zwischen Gehirn und Bauchmark interessant, da im Gehirn nicht die klassischen Hoxgene wirken. Aus der Analyse ähnlicher Markerkombinationen von Zellen in den gnathalen Segmenten und denen des Gehirns kann eventuell serielle Homologie erkannt werden. Diese Eg positiven Zellen werden daher hier kurz vorgestellt. Da die Erforschung von Mechanismen im Gehirn jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde auf weiterführende Untersuchungen verzichtet.

Im späteren St11 und im frühen St12 fallen im Tritocerebrum (Tc) zwei verschieden positionierte Eg positive Cluster auf (Abb. 3-18 A, C und D). Diese Expression ist auf ein relativ geringes Zeitfenster begrenzt, in St13 ist keine Expression im Tc mehr zu erkennen. Auch findet sich die Expression nicht in allen analysierten Embryonen, was eventuell auf das kurze Zeitfenster rückführbar ist. Weiterhin kann dies auch durch die relativ schwache Eg Expression erklärbar sein, die eventuell nicht in allen Präparaten sichtbar wird. Da die ungefähre Lage dieser Cluster mit einem sehr gut durch seine Expression von Sim und Dac zu identifizierenden Neuroblasten, dem Tv2 (persönliche Mitteilung von David Jussen, Diplomarbeit Paula Becker) übereinstimmen könnte, wurde zunächst auf dessen Eg Expression geprüft. Der Tv2 exprimiert kein Eg, somit handelt es sich bei den Eg positiven Zellen um Zellen anderer Identität (Abb. 3-18 C und D).

Eines der Eg positiven Cluster ist weiter medial posterior positioniert (markiert durch ein gelb gestricheltes Rechteck, Abb. 3-18 D), das andere weiter anterior lateral (markiert durch ein blaues Rechteck in Abb. 3-18 A-C und E, F). Beide Cluster exprimieren weder Gsb noch En (gezeigt für das anterior gelegene Cluster Abb. 3-18 A). In der weiteren Markerexpression unterschieden sich die beiden Cluster jedoch. Das weiter anterior lateral gelegene exprimiert Runt, Ey und *mirror-lacZ* (Abb. 3-18 B, E und F), das mediale Cluster nicht (nicht gezeigt). Die Neuroblasten des Gehirns wurden aufgrund von Markerkombinationen im Gehirn bereits klassifiziert, sowie teilweise als serielle Homologe der Segmente des VNS identifiziert (Urbach und Technau, 2003a). Die Kombination von Runt und *mirror-lacZ* findet sich im VNS im NB2-2, sowie die Kombination von Ey und Runt im NB3-2 und NB5-3, der jedoch weiterhin auch Gsb positiv ist. Im Tc ist bisher kein Neuroblast mit dieser Markerkombination zugeordnet (Urbach und Technau, 2003a). Da es sich bei den hier beobachteten Eg positiven Zellen aufgrund des späteren Zeitpunkts der Eg Expression vermutlich nicht um Neuroblasten selbst, sondern um Nachkommenzellen handelt, wird die Zuordnung zusätzlich komplizierter. Es könnten bisher

bekannte Markerkombinationen von Neuroblasten in den Nachkommenzellen abweichend exprimiert sein.

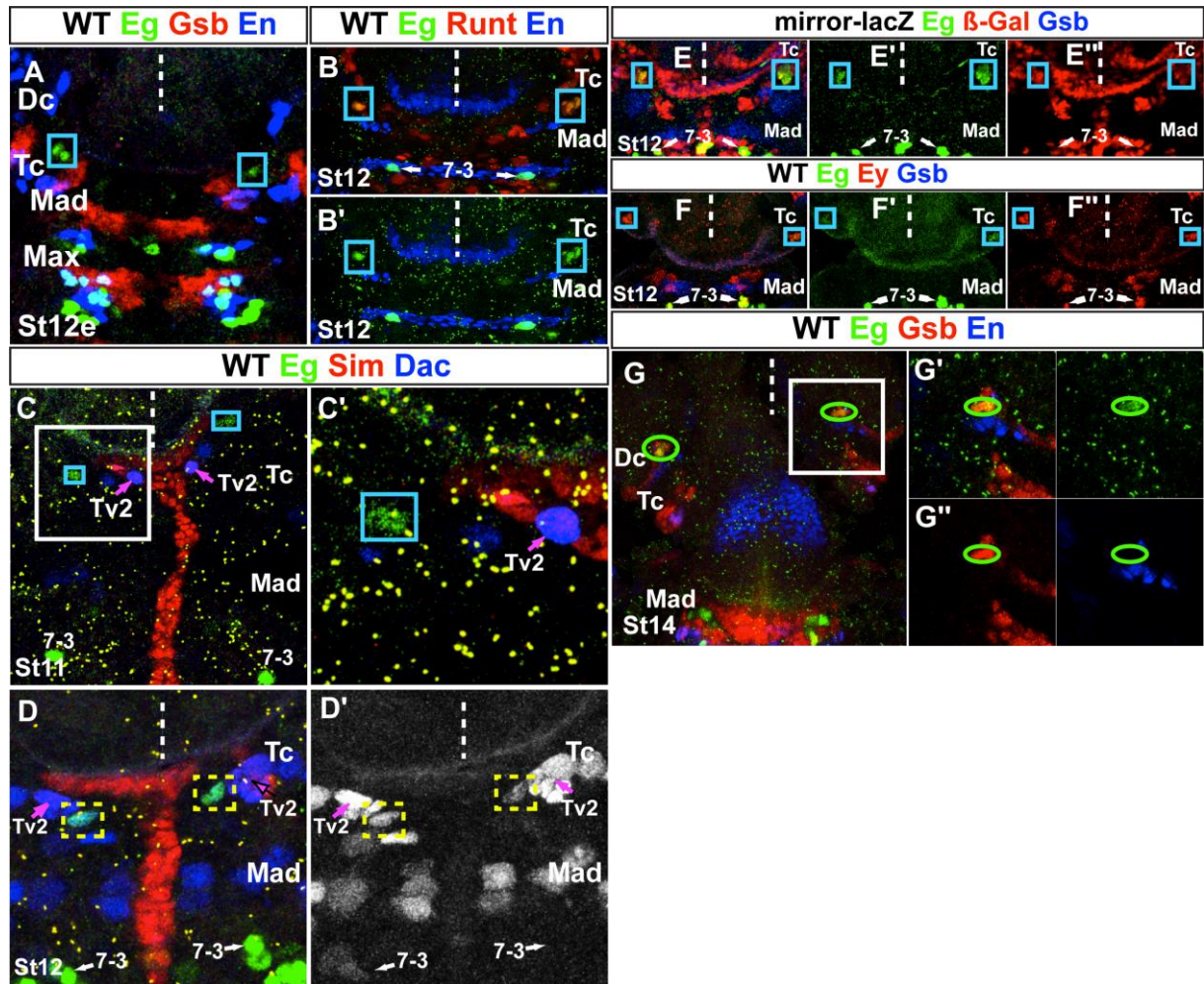


Abb. 3-18.: Eagle Expression in Zellen des Tritocerebrum und des Deutocerebrum.

Antikörperfärbung für die Identifikation der transient Eg positiven Zellen im Tritocerebrum (A-F) und im Deutocerebrum (G). Antikörperfärbung gegen En als Segmentgrenzenmarker lässt die Zugehörigkeit der Eg positiven Zellen zum Tc (A) und Dc (G) eindeutig erkennen. Im Tc treten zwei unterschiedlich positionierte Eg positive Cluster lateral (C, blaues Rechteck; der Ausschnitt der vergrößerten Ansicht in C' ist markiert durch das weiße Rechteck in C) und medial (D, gelb gestricheltes Rechteck; in D' monochrom Dac Expression zur bessern Sichtbarkeit) zum Tv2 gelegen auf. Tv2 ist über Coexpression von Sim (rot) und Dac (blau) zu identifizieren. Nur das mediale Cluster exprimiert Dac (D'), aber kein Sim. En und Gsb werden in den Eg positiven Zellen nicht exprimiert (A, B, E, F). Im lateralen Cluster ist Runt (B, Verdeutlichung der Eg Expression in B'), *mirror-lacZ* (E- E'') und Ey (F- F'') exprimiert. (G) Im Dc liegt ein Eg positives Cluster im Gsb Expressionsstreifen (G' und G''), rot; der vergrößerte Bereich aus G ist durch das weiße Rechtecke gekennzeichnet, es exprimiert jedoch kein En (G'' rechtes Panel, blau).

Für den weiter medial zum Tv2 gelegenen NB oder seine Nachkommen konnten bisher keine weiteren Marker beobachtet werden, allerdings exprimiert er Dac (Abb. 3-18 D, D').

Ein weiteres Eg positives Cluster findet sich im Gsb Streifen des Deutocerebrums (Dc; Abb. 3-18 G). Es ist nicht positiv für En oder für Ey. Aufgrund dieser Kombination kämen die Gehirnneuroblasten des Dc Dd7 oder Dd1 als mögliche Identitäten in Betracht (Urbach und Technau, 2003a).

Um Aussagen über die Identitäten dieser Eg positiven Zellen des Gehirns treffen zu können, sind in jedem Fall ausgiebige weiterführende Markeranalysen notwendig. Ein Eg positiver serieller Homologer zu NB6-4 des VNS kann in den Gehirnsegmenten jedoch aufgrund dieser Kombinatoriken mit einiger Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

3.1.3.2. In thorakalen Segmenten exprimiert ein Teil der NB3-2 Nachkommenzellen Eagle

Während der Markeranalyse der gnathalen Eg positiven Zelllinien wurden stets Vergleiche zu thorakalen und abdominalen Segmenten gezogen, um Abweichungen und Gemeinsamkeiten der Expressionsmuster zu erkennen. Dabei fiel während der Analysen der Expressionsmuster ein fünfter Eg positiver Neuroblast in allen drei thorakalen Segmenten auf (Abb. 3-19 A), der sich räumlich von den anderen Eg positiven Neuroblasten abgrenzen lässt. Aufgrund der definierten abgegrenzten Lage gegenüber den anderen Neuroblasten kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei nur um eine Dpn positive Ganglienmutterzelle eines der bekannten Eg positiven Neuroblasten handelt. Er tritt erst im späten St11 als Dpn und Eg positive Zelle in Erscheinung, die weder En, noch Gsb exprimiert (Abb. 3-19 B, B') und ist relativ nah an NB3-3 positioniert.

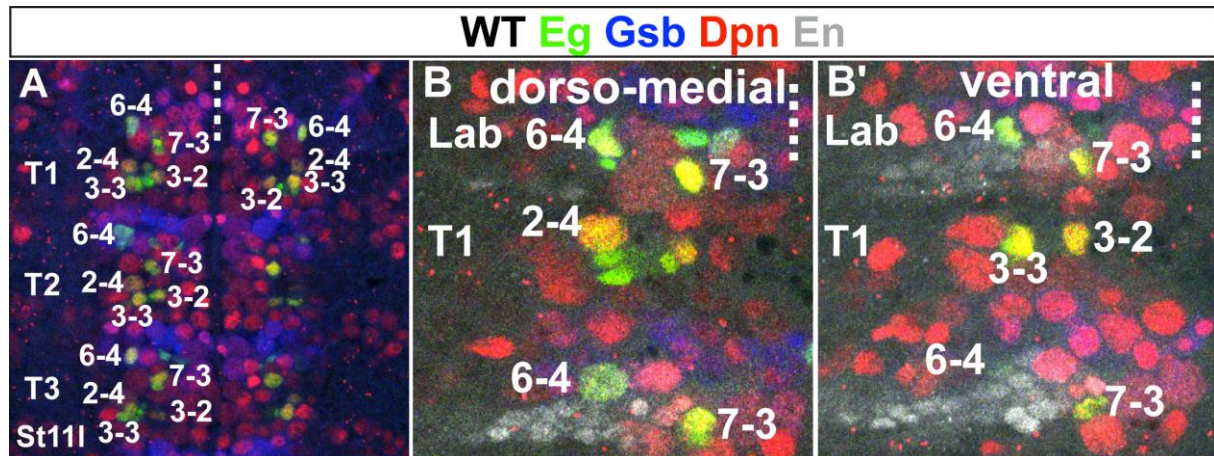


Abb. 3-19: Identifikation eines fünften Eg positiven Neuroblasten in allen drei thorakalen Segmenten.

(A) Antikörperfärbungen gegen Eg (grün), Gsb (blau) und Dpn (rot) lassen neben NB2-4, NB3-3, NB6-4 und NB7-3 ab dem späten St11 einen weiteren Eg positiven Neuroblasten erkennen. (A) In allen drei thorakalen Segmenten tritt anterior des Gsb Expressionsstreifens ein weiterer Eg positiver Neuroblast auf, der sehr nah an NB3-3 und NB2-4 positioniert ist. (B, B') Vergrößerter Ausschnitt des linken ersten thorakalen Hemisegments in zwei verschiedenen Ebenen für die Darstellung der einzelnen Neuroblasten in unterschiedlichen Ebenen. (B) Über Antikörperfärbungen gegen En (weiß) und Gsb (blau) lassen sich NB6-4 und NB7-3 eindeutig in dorso-medialer Position im Segment bestimmen. (B') Der zusätzliche fünfte Neuroblast exprimiert weder Gsb, noch En. Er ist ventral von NB2-4 (B') in ähnlicher Ebene wie NB3-3 positioniert.

Es findet sich in seinen Nachkommenzellen weder Expression von Eve (Abb. 3-20 A, Eve im Einzelkanal in A'), noch von Ems (Abb. 3-20 B, B'), jedoch Runt (Abb. 3-20 C, C'). Diese drei sind als Differenzierungsfaktoren von NB3-3 bzw. dessen Nachkommenzellen bekannt, und erlauben daher über Eve und Ems eine Unterscheidung zwischen NB3-3 und dem zusätzlichen Kandidaten (vergleiche Kapitel 3.1.1.2).

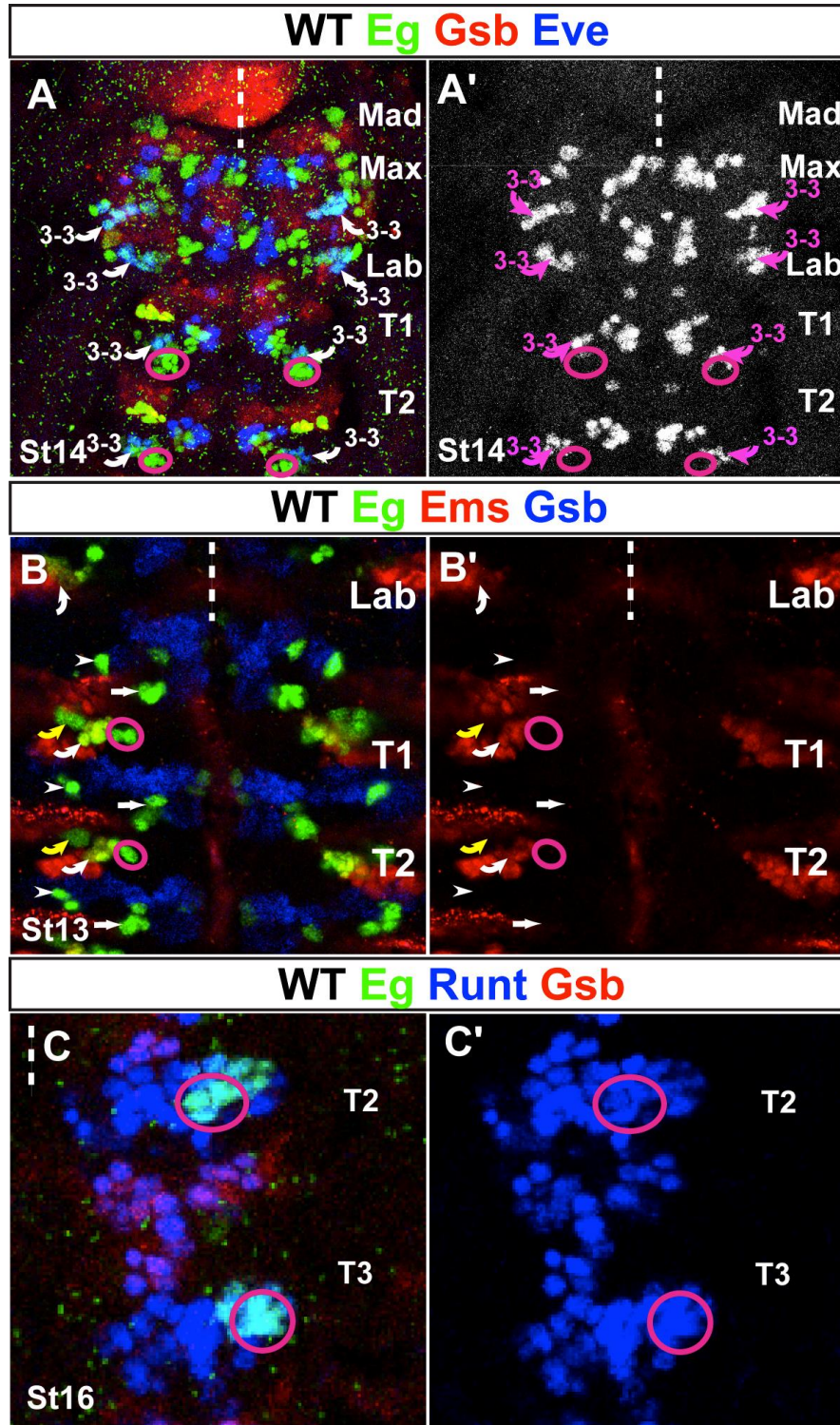


Abb. 3-20: Weitere Differenzierung zwischen NB3-3 und dem fünften Eg positiven Neuroblasten.

(A-C) In späteren Stadien sind die Nachkommenzellen von NB3-3 und dem zusätzlichen fünften Eg positiven thorakalen Neuroblasten räumlich schwer voneinander abzugrenzen. (A) Antikörperfärbung gegen Eve (blau) lassen Eg und Eve positive Zellen des NB3-3 und angrenzend stark Eg positive Zellen ohne Eve Expression (magentafarben umkreist) in den thorakalen Segmenten erkennen (in A' Eve in weiß). In den gnathalen Segmenten treten nur die Eg und Eve positive Zellen des NB3-3 auf, das stark Eg positive Cluster aus etwa fünf Zellen ohne Eve Expression fehlt hier. (B) Ein weiterer Differenzierungsfaktor von NB3-3 ist Ems, dass in St13 in den Nachkommenzellen des NB3-3 exprimiert ist, NB2-4 und der fünfte Eg positive Neuroblast exprimieren kein Ems (B'). (C) Runt (blau) wird in allen der NB3-3 Nachkommenzellen und in den Nachkommenzellen des fünften Neuroblasten exprimiert (C').

Weiterhin verdeutlicht die Coexpression von Dpn mit Eg und Ey (Abb. 3-21 A, A' und B, B'), sowie von Eg und Msh (Abb. 3-21 C, C') bei fehlender Coexpression mit En (NB6-4 exprimiert Eg, En und Msh), dass es sich hierbei neben NB2-4, NB3-3, NB6-4 und NB7-3 um einen weiteren Eg positiven Neuroblasten handelt.

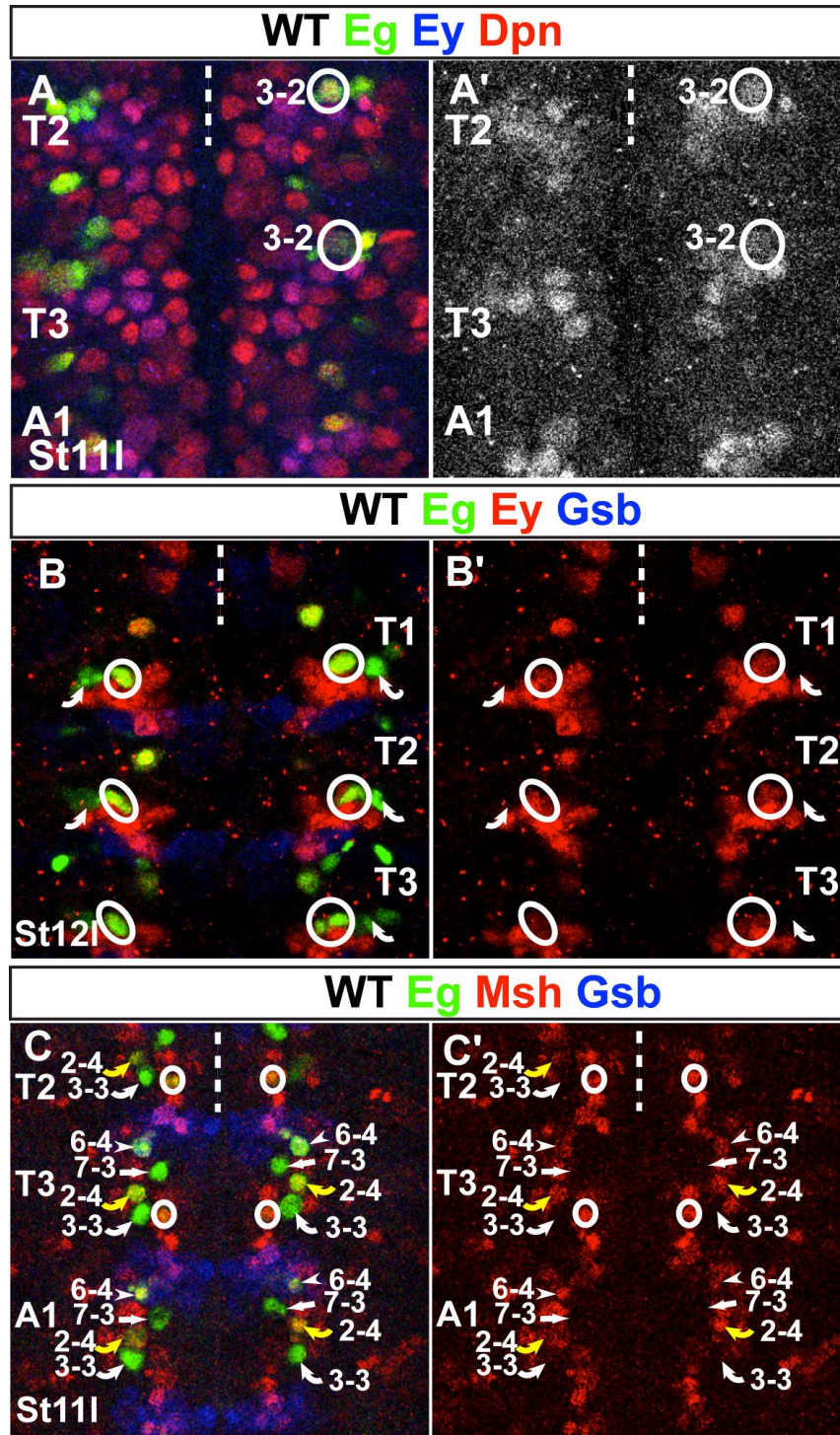


Abb. 3-21:
Markeranalyse zur Bestimmung der Identität des fünften Eg positiven NB als NB3-2.

Antikörperfärbungen zur Identitätsbestimmung des NB3-2 als Eg positiver Neuroblast in den thorakalen Segmenten im WT, NB3-2 ist mit weißer Umkreisung markiert.

(A) Antikörperfärbungen gegen Ey (blau, in A' in weiß dargestellt) gemeinsam mit Dpn (rot) lässt Ey Expression bereits im fünften Eg positiven thorakalen Neuroblasten selbst erkennen. (B) In späteren Stadien ist Ey (rot) in allen drei thorakalen Segmenten in den Eg positiven Nachkommenzellen des NB3-2 exprimiert, während NB3-3 deutlich keine Ey Expression aufweist (B'). (C) Msh (rot) ist stark im thorakalen Eg positiven NB3-2 exprimiert, während NB3-3 keine Expression aufweist. In abdominalen Segmenten tritt hierbei im Vergleich keine Eg und Msh positive Zelle an vergleichbarer Position in Erscheinung. (C') NB2-4 und NB6-4 sind als weitere Eg positive Neuroblasten Msh positiv.

Der zusätzliche Eg positive Neuroblast exprimiert somit eine zu allen bekannten Eg positiven Neuroblastenlinien abweichende Markerkombination von Eg, Ey, Runt und Msh. Die Kombination von Runt und Ey findet sich im NB3-2, eigentlich ist hier aber Ind Expression vorhanden (Weiss et al.,

1998). Da die Kolumnargene wie *ind* und *msh* ein zeitlich sehr variables Expressionsmuster aufweisen (Mitteilung von Rolf Urbach) ist es möglich, dass der Neuroblast während der Delamination zunächst Ind exprimiert, nach einem bestimmten Zeitraum dann aber stattdessen Msh Expression auftritt. NB3-2 ist ein Neuroblast, der recht früh in der Phase S1 delaminiert (Doe, 1992). Das späte Auftreten über Eg Antikörperfärbung erst im späten St11 ist ein Hinweis darauf, dass die Delamination schon eine Weile zurück liegt und nun ein Anteil der gesamten entstehenden Zelllinie des sich weiter teilenden Neuroblasten Eg Expression aufweisen könnte. Der gebildete Eg positive Zellstammbaum lässt sich über Eg Antikörperfärbungen sehr gut nachverfolgen. Es werden meist fünf Zellen gebildet, die Eg bis in späte Stadien hinein sehr stark exprimieren.

Im *eg-CD4-GFP* Stamm lassen sich die Projektionen dieser Zelllinie ein Stück weit verfolgen (Abb. 3-22 A, A'), sie projizieren gemeinsam mit NB3-3 nach medial (Abb. 3-22 B, B'). In von Christian Hessinger erzeugten Flybow-Klonen von Eg positiven Neuroblastenlinien lassen sich die Projektionen eindeutig verfolgen, da hier exklusiv Zelllinien markiert werden. Nachdem die Projektionen ein Stück weit nach medial ziehen, kehren sie um und projizieren nach anterior lateral aus dem VNS hinaus (persönliche Mitteilungen von Christian Hessinger). Ein Anteil des Projektionsmuster von NB3-2 aus den DiI Markierungen von Schmidt et al., 1997 und Bossing et al., 1996 passen genau auf dieses Projektionsmuster (Abb. 3-22 C). Allerdings ist der gesamte dort gefundene Zellstammbaum des NB3-2 größer als die in den thorakalen Segmenten auftretenden fünf Eg positiven Zellen (in Abb. 3-22 C grün umkreist) und weist zusätzliche Projektionen auf, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass nur ein Anteil des thorakalen NB3-2 Eg positiv wird.

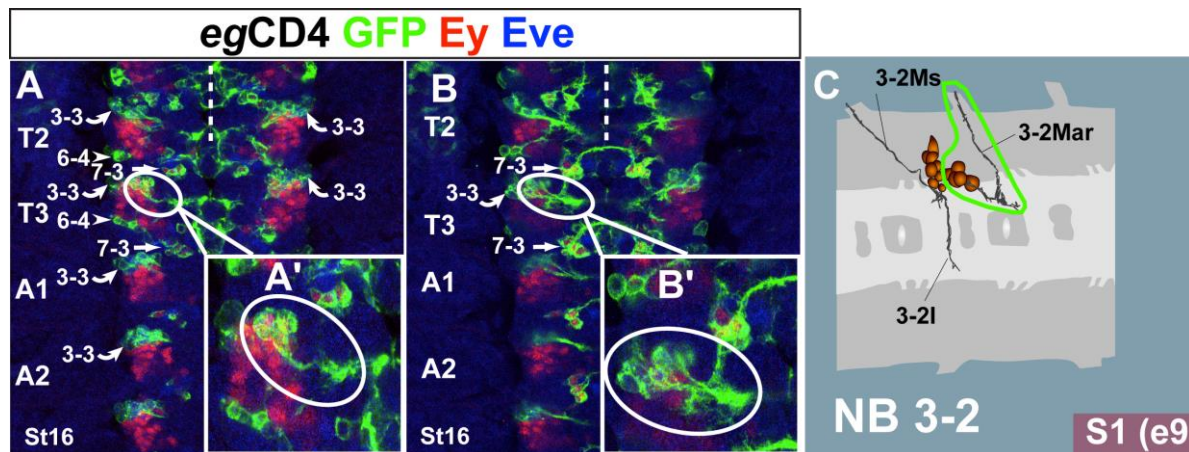


Abb. 3-22: Analyse des Projektionsmusters des Eg positiven Anteils des thorakalen NB3-2.

Im *egGal4XUAS-CD4-GFP* Stamm können über Ey (rot) und Eve (blau) Antikörperfärbung die Zellklone von NB3-3 (Eve) und NB3-2 (Ey) unterschieden werden. (A) Die Projektion des Eg positiven Anteils von NB3-2 aus T3 projiziert nach medial. (A') Vergrößerung der Zellkörper und der Projektion des Eg positiven Anteils von NB3-2 (umkreist). (B) Darstellung desselben Segments mit Fokusebene auf NB3-3. Die Projektion des NB3-2 verläuft parallel zur Projektion des NB3-3. (B') Vergrößerter Ausschnitt der Projektion von NB3-3 (umkreist). (C) Cartoon des gesamten NB3-2 mit seinem Projektionsmuster. Der Eg positive Anteil aus fünf Zellen in den thorakalen Segmenten und der nach medial ziehenden Projektion, die anschließend aus dem VNS hinaus projiziert, ist grün umrandet. Cartoon freundlicherweise von Christof Rickert zur Verfügung gestellt.

Interessanterweise ist die Expression von Eg in diesen Zellen des NB3-2 von der Funktion des Hoxgens *Antennapedia* abhängig, in *Antennapedia* Mutanten findet sich dieses Cluster nicht als Eg positiv (nicht gezeigt). Daraus ergeben sich interessante Fragen nach der segmentalen Spezifizierung dieser Zelllinie durch die Funktion von *Antennapedia*. Da diese Beobachtung nur durch die Vergleiche der gnathalen Segmente mit thorakalen Linien zufällig geschah, jedoch nicht weiter im Fokus dieser Arbeit steht, wurden die hier offen gebliebenen Fragen nicht weiter untersucht. Für die gnathalen Eg positiven Zelllinien finden sich jedoch auch sehr unterschiedliche und teilweise sehr gravierende Auswirkungen durch die jeweiligen Funktionen der Gene des *Antennapedia*-Komplexes, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

3.1.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.1.

In Kapitel 3.1. wurde die räumliche und zeitliche Charakterisierung des Eg Expressionsmuster der gnathalen Segmente genauestens beschrieben. Weiterführend wurden bisher nicht charakterisierte Eg positive Zellcluster in den Gehirnsegmenten, sowie in den thorakalen Segmenten vorgestellt.

Im frühen St11 delaminieren im Labialsegment und im Maxillarsegment NB7-3, NB6-4 und NB3-3 als Eg positive Neuroblasten. Im Mandibularsegment hingegen wird nur NB7-3 gebildet.

Der maxillare und labiale NB3-3 bilden im Laufe der Embryonalentwicklung bis St16 meist neun Zellen aus.

Der Zelllinie des maxillaren NB6-4 besteht aus vier Gliazellen, die des labialen NB6-4 aus drei Gliazellen und fünf Neuronen.

NB7-3 aller drei Segmente bildet bis St13 fünf bis sechs Zellen aus. Bis St16 reduziert sich der mandibulare Zellstammbaum zu zwei Eg positiven Zellen, der maxillare zu drei und der labiale besteht weiterhin aus fünf Zellen.

Im frühen St12 tritt in einem Anteil des NB5-3 und seinen Nachkommenzellen in allen drei gnathalen Segmenten, sowie im MNB des Mandibular- und Maxillarsegments Eg Expression auf.

Ab St14 tritt weitere Eg Expression im mandibularen NB4-3 und NB4-4, sowie im maxillaren NB6-2, NB5-6 und NB4-3 und den ab diesem Zeitpunkt gebildeten Nachkommenzellen auf.

Im Tritocerebrum existieren zwei unterschiedlich positionierte Eg positive Zellcluster, im Deutocerebrum tritt ein Eg positives Zellcluster in Erscheinung. Ihre Identitäten konnten leider nicht geklärt werden.

In allen drei thorakalen Segmenten wird ab spätem St11 NB3-2 Eg positiv und bringt ein Cluster sehr stark Eg exprimierender Nachkommenzellen hervor.

Im folgenden Kapitel wird auf die Bildung unterschiedlicher segmentaler Identitäten dieser Eg positiven Neuroblastenlinien unter dem Einfluss homeotischer Gene eingegangen.

3.2. Die Gene des *Antennapedia*-Komplexes können segmentale Identitäten der Eagle positiven Neuroblastenlinien der gnathalen Segmente spezifizieren

3.2.1. Analyse der Abhängigkeit der bekannten Eagle positiven gnathalen Neuroblastenlinien von *Antennapedia*-Komplex Genfunktionen

Sowohl NB3-3, NB6-4 und NB7-3 wurden in der Ausprägung und der Identität ihrer segmentalen Linien in Thorax und Abdomen in Abhängigkeit von Hoxgenfunktionen gefunden (z.B.: Berger et al., 2005; Rogulja-Ortmann et al., 2008; Rogulja-Ortmann und Technau, 2008; Tsuji et al., 2008; Birkholz et al., 2013b).

In den gnathalen Segmenten werden die Gene des *Antennapedia*-Komplexes (*Antp*-K, Lewis et al., 1980), *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) und *Antennapedia* (*Antp*) exprimiert. Die Analyse der Veränderungen der Eg positiven Neuroblastenlinien in unterschiedlichen *Antp*-K Mutanten kann weitere Klarheit hinsichtlich der Fragen nach den Mechanismen zur Herstellung segmentaler Identität im VNS der gnathalen Segmente bringen. Die Funktionen von Genen des *Antp*-K auf seriell homologe Neuroblastenlinien ist auch im Vergleich mit den Ergebnissen für die posterioren Segmente und den dort vorhandenen Wirkungen der *Bithorax*-Komplex (*Bth*-K) Gene interessant. Im folgenden Kapitel werden die Auswirkungen von *Antp*-K Genfunktionen auf die als Eg positiv bekannten seriell homologen Neuroblasten vorgestellt.

3.2.1.1. Fehlen des NB2-4 in den gnathalen Segmenten ist unabhängig von Hoxgenfunktion

Der NB2-4 wird im WT in den gnathalen Segmenten nicht gebildet. Da diese Besonderheit auf die Funktion von dort exprimierten *Antp*-K Genen zurückführbar sein könnte, wurde auf die Bildung von NB2-4 in Hoxmutanten geachtet. Obwohl eine Transformation der Segmentidentität durch fehlende Hoxfunktion angenommen werden kann, wird NB2-4 weder bei fehlender Funktion von *Dfd*, noch bei *Scr*, noch in irgendeiner anderen Kombination von doppelter Mutation von *Antp*-K Genen in den gnathalen Segmenten gebildet.

3.2.1.2. *Deformed* und *Sex combs reduced* Funktion sind für die segmentale Identität gnathaler NB3-3 Zellstammbäume notwendig

Die korrekte Bildung der Zellstammbäume der gnathalen NB3-3 ist abhängig von den Funktionen der jeweils exprimierten Hoxgene (Abb. 3-23).

Der wildtypische labiale NB3-3 (NB3-3lab) exprimiert *Scr* (Abb. 3-23 A, A'), während der maxillare NB3-3 (NB3-3max) *Dfd* positiv ist (Abb. 3-23 A''). In *Dfd*¹⁶ Mutanten ist im Maxillarsegment in über 90% kein NB3-3 mehr sichtbar. Weder Eg, noch Runt oder Eve werden an der eigentlichen Position des

NB3-3 exprimiert (Abb. 3-23 B-B'', C-C'; gezeigt für die *Dfd¹⁶Scr⁴* Doppelmutante, die diesbezüglich nicht von den Ergebnissen für die Einzelmutanten abweicht). In seltenen Fällen werden sehr stark reduzierte Zellstammbäume gebildet, die über Eg Expression schwach sichtbar sind.

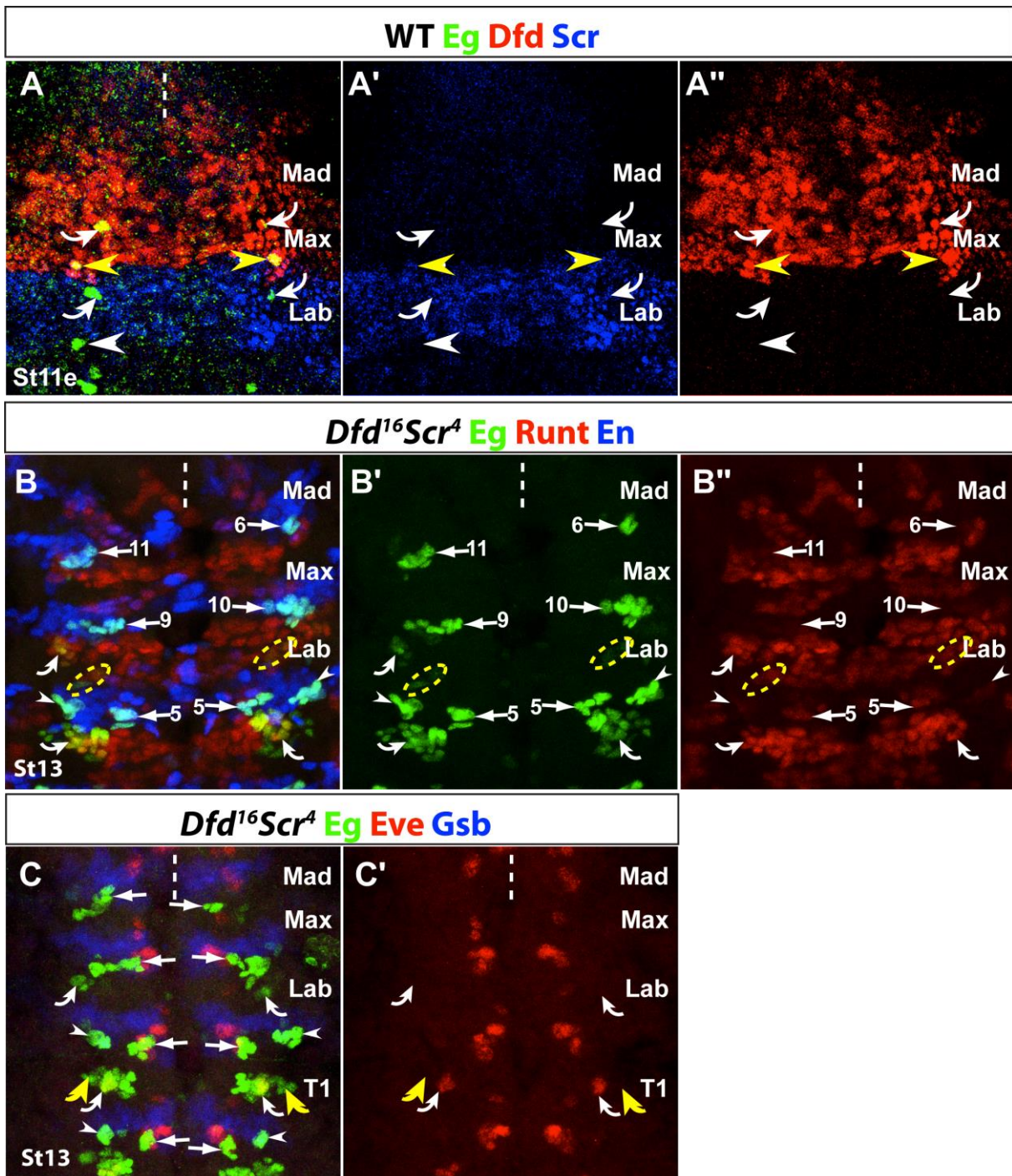


Abb. 3-23: Segmentale Identitäten der gnathalen NB3-3 sind von Hoxgenfunktion abhängig.

(A) Antikörperfärbungen gegen Eg (grün), Scr (blau) und Dfd (rot) im WT in St11. NB3-3 des Labialsegments exprimiert Scr (A'), NB3-3 des Maxillarsegments Dfd (A''). (B) Antikörperfärbungen gegen Eg (grün) und Runt (rot) in *Dfd¹⁶Scr⁴* Mutanten zur Analyse der NB3-3 Zellstammbäume bei Hoxgenfunktionsverlust. Es werden keine Eg (B') und Runt positive Zellen an Position des maxillaren NB3-3 ausdifferenziert. Im Labialsegment treten selten wenige schwach Eg und Runt positive Zellen auf (markiert durch weißen gebogenen Pfeil für NB3-

3). (C) Die Expression von Eve (rot, C') ist weder im Maxillarsegment, noch in den schwach Eg positiven, reduzierten labialen Zelllinien des NB3-3 bei Funktionsverlust von *Dfd* und *Scr* exprimiert. Zum weiteren Vergleich der Eve Expression im NB3-3 ist das erste thorakale Segment mit NB3-3 und NB2-4 (gelber gebogener Pfeil) zusätzlich dargestellt. Die Eg positiven Zellen des NB5-3 (markiert weiße gestrichelte Markierung für das Labialsegment in B) werden nicht verändert. NB7-3, deutlich durch Coexpression von Eg und En (blau, in B), bildet bei Funktionsverlust von *Dfd* oder *Scr* mehr als die wildtypisch entstehenden fünf bis sechs Zellen aus (Zellzahlen ersichtlich durch die jeweils angegebene Zahl in B).

In *Scr*¹⁷ oder *Dfd*¹⁶*Scr*⁴ Mutanten ist der labiale NB3-3 stark verändert. In 33% sind keine NB3-3 Zellen über Eg, Runt oder Eve Antikörperfärbung sichtbar. In den übrigen Fällen werden selten mehr als vier sehr schwach Eg positive Zellen gebildet, die auch alle Runt exprimieren, jedoch nicht den Differenzierungsmarker Eve (Abb. 3-23 C, C').

Zusätzlicher Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* gemeinsam mit *Dfd* führt zu keiner Veränderung der Auswirkungen, alleiniger Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* hat keine Effekte auf den maxillaren oder labialen NB3-3. Doppelter Funktionsverlust von *Dfd* gemeinsam mit *Scr* verändert die Häufigkeit des Fehlens nicht.

3.2.1.3. Spezifizierung von segmentalen Identitäten der gnathalen NB6-4 durch *Antennapedia-Komplex* Gene

Die Auswirkungen von veränderten Funktionen von *lab*, *Dfd*, *Scr* und *Antp* auf NB6-4 wurden bereits in der Diplomarbeit erfasst und sind grundlegend für die weiteren nun folgenden Untersuchungen. Da die in der Diplomarbeit durch Mutantenanalyse ermittelten Transformationsraten durch die Auswertung jeweils eines mutanten Fliegenstamms erhoben wurden, wären theoretisch Nebeneffekte durch weitere betroffene Gene in diesen Stämmen möglich. Daher wurden nun weitere Allele und verschiedene Kombinationen der mutanten Allele heterozygot getestet, um die gefundenen Transformationsraten abzusichern.

3.2.1.4. Validierung der Bedeutung von *Deformed* und *Sex combs reduced* Funktion für den maxillaren NB6-4

Die segmentale Identität des NB6-4max ist einerseits durch die Funktion von *Dfd* und die Funktion von *Scr* spezifiziert, die beide im Neuroblasten und seinen Nachkommenzellen exprimiert werden (Abb. 3-24 A, B). Der Funktionsverlust eines dieser Gene führt zu einer Transformation der maxillaren zu einer labialen bzw. thorakalen Identität (Abb. 3-24 und Abb. 3-34). *Dfd* ist dabei der entscheidendere Faktor, in *Dfd* Mutanten findet diese Transformation in 43% (n>100 Embryonen) statt (dies stellt eine leichte Korrektur gegenüber den in der Diplomarbeit erhobenen 41,4% dar). Diese Transformationsrate von *Dfd* Einzel-Funktionsverlust des Allels *Dfd*¹⁶ wurde durch transheterozygote Kombination der Allele *Dfd*¹¹ mit *Dfd*¹⁶ bestätigt, auch konnte mit dem Allel *Dfd*¹² und *Dfd*¹² über *Dfd*¹¹ dasselbe Ergebnis erzielt werden. Weiterhin wurde es über die Verwendung eines *Dfd* RNAi Stamms (n=50 Embryonen) exakt bestätigt (Abb. 3-24 C, C'). Wenn *Dfd* heterozygot als Funktionsverlustmutation vorliegt (*Dfd*¹⁶

transheterozygot über WT), wird der maxillare NB6-4 in 8% (n=50 Embryonen) transformiert (Abb. 3-24D).

In *Scr* Mutanten hingegen wird der maxillare NB6-4 nur in 10% (n>100 Embryonen) transformiert (vergleiche Abb. 3-34 F). Dieses Ergebnis wurde ebenfalls über die transheterozygote Kombination von *Scr¹¹* mit *Scr¹⁷* abgesichert. Mit der *Scr* RNAi Linie konnte nur in 3% eine Transformation erreicht werden (n=30 Embryonen, nicht gezeigt).

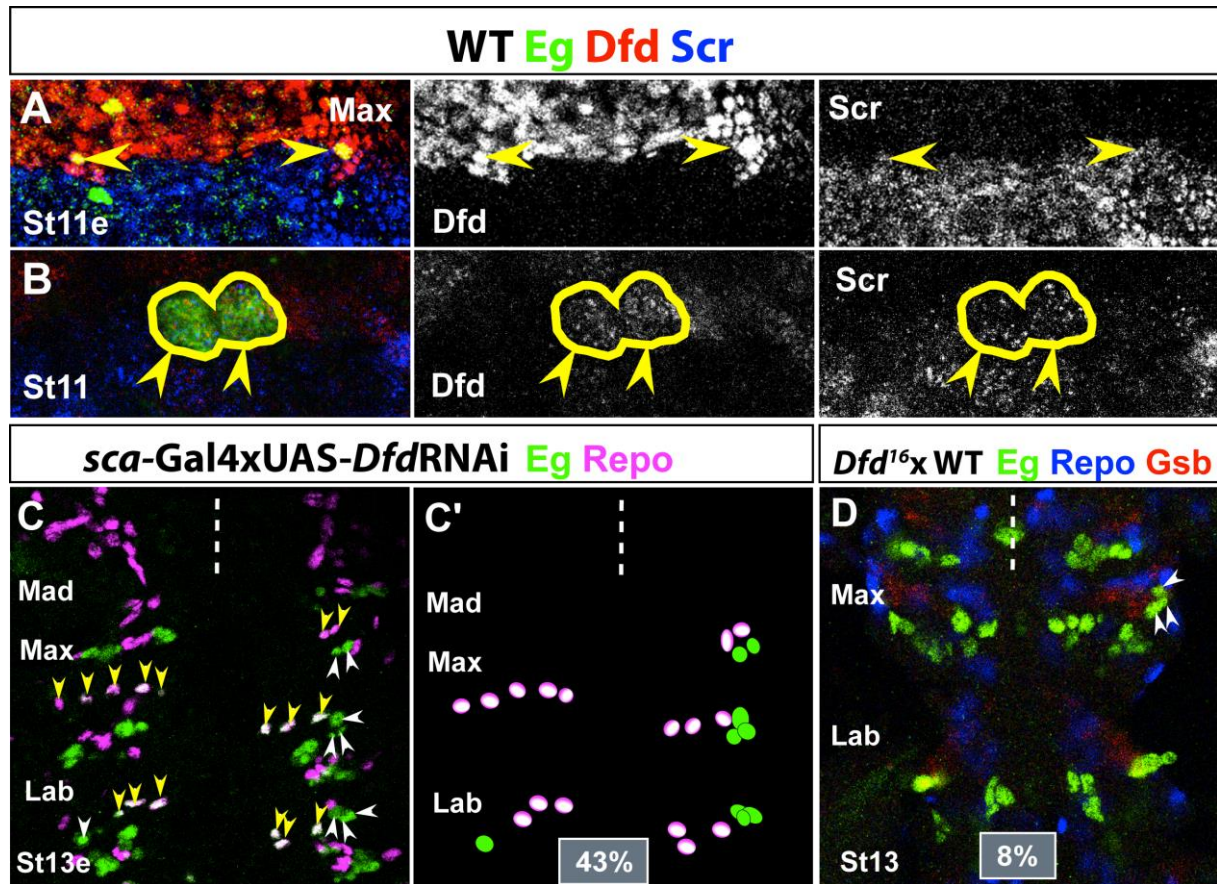


Abb. 3-24: Dfd besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.

(A, B) Antikörperfärbungen gegen Eg (grün), Dfd (rot) und Scr (blau) im WT in St11e (A) und St11 (B). Sowohl Dfd, als auch Scr sind im NB6-4 (A) und seinen Nachkommenzellen (hier nach der ersten Teilung, B) exprimiert. (C) Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (magenta, C') in *scaGal4XUASDfdRNAi* in St13e. Im Mandibularsegment treten ektopische NB6-4 auf, hier mit glialen und neuronalen Nachkommenzellen. Im Maxillarsegment treten ektopische Neurone in 43% auf. (C') Cartoon zur Verdeutlichung der NB6-4 Linien des Mandibular-, Maxillar- und Labialsegments. Gliazellen sind durch magentafarbene Kreise, Neurone durch grüne Kreise dargestellt. Die Zahl in der grauen Box hebt die Transformationsrate des maxillaren NB6-4 hin zu labialer bzw. thorakaler Identität hervor. Diese Darstellung wird in den folgenden Abbildungen beibehalten. (D) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Repo (blau) und Gsb (rot) in transheterozygot *Dfd¹⁶* gekreuzt über WT, in dieser Kombination verbleibt eine Transformationsrate von 8% des maxillaren NB6-4.

Da für den Funktionsverlust von *abda* oder *AbdB* 100%ige Transformation der abdominalen NB6-4 beschrieben wurde (Berger et al., 2005), ist die geringe Transformation durch *Scr* oder *Dfd* Funktionsverlust erstaunlich. Gleichzeitiger Funktionsverlust von *Scr* und *Dfd* führt, entgegen aller

Erwartungen, nicht zu einer Steigerung der Transformationsrate, sondern zu einer Reduktion auf 17% gegenüber der Transformationsrate von *Dfd* mit 43% (n>100 Embryonen; vergleiche Abb. 3-34 G). An dieser Stelle deutet sich an, dass neben der Funktion von *Dfd* und *Scr* für den maxillaren NB6-4 noch weitere Faktoren beteiligt sind, welche die segmentale Identität des NB6-4max im Falle des Funktionsverlustes von *Dfd* oder *Scr*, sowie von *Dfd* gemeinsam mit *Scr* weiter aufrecht erhalten. Das ist ein klarer Unterschied zu der Regulation segmentaler Identität des abdominalen NB6-4.

3.2.1.5. Deformed und Sex combs reduced Funktion bewirken die Reduktion der Zellzahlen der mandibularen und maxillaren NB7-3 Linien im WT

Die segmentalen Identitäten der gnathalen NB7-3 Linien sind ebenfalls abhängig von den jeweils exprimierten *Antp*-K Genen. NB7-3 des mandibularen Segments exprimiert *Dfd* (Abb. 3-25 A, A') und *Pb* (Abb. 3-25 B, B'). Der maxillare NB7-3 ist positiv für *Scr* (Abb. 3-25 A, A') aber negativ für *Pb* (Abb. 3-25 B, B'). Der labiale NB7-3 exprimiert, ebenso wie die des Thorax, *Antp* (Abb. 3-25 C, C'). Die Expression von *Dfd* Protein in den Nachkommen des mandibularen NB7-3 wird in späteren Stadien sehr stark.

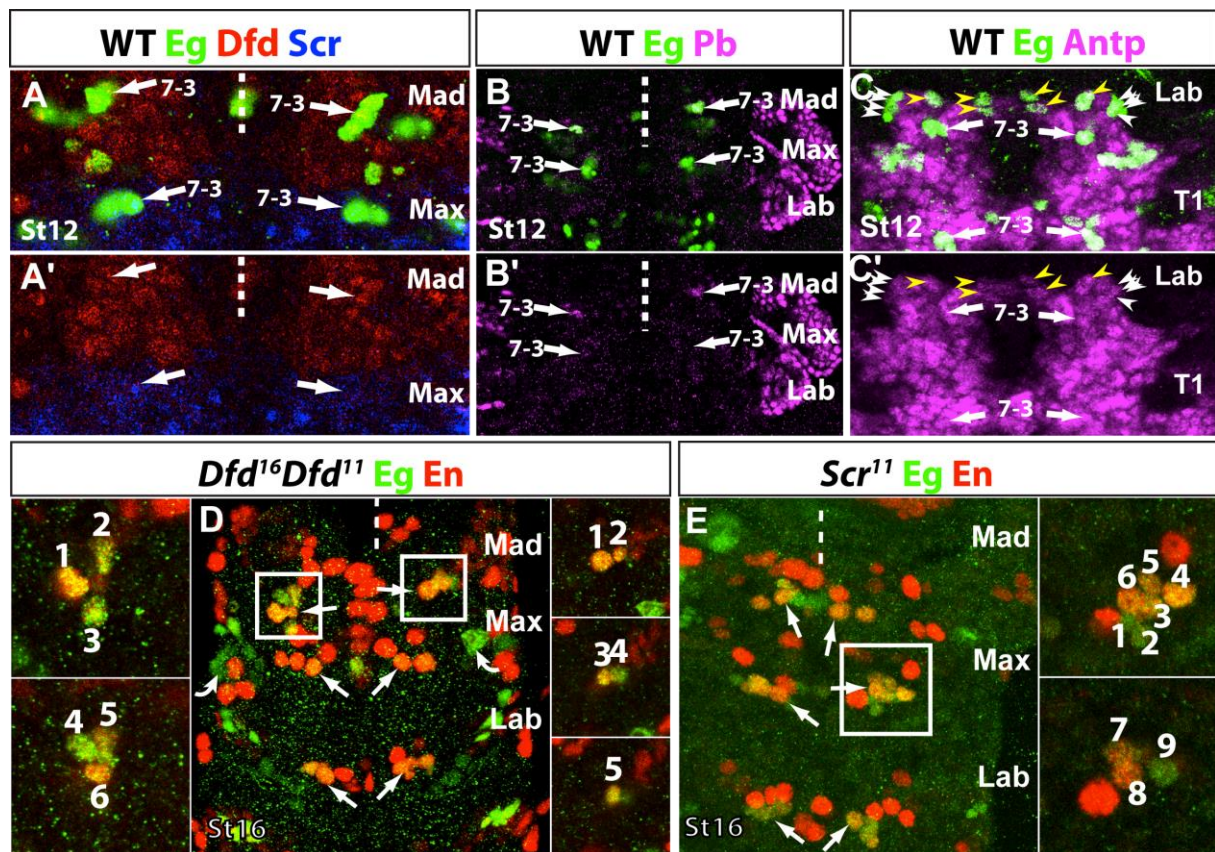


Abb. 3-25: Gnathale segmentale Identitäten des NB7-3 sind von den Funktionen der Hoxgene abhängig.

(A-C) Antikörperfärbungen gegen *Eg* (grün) gemeinsam mit *Dfd*, *Scr*, *Pb* und *Antp* im WT (A'-C') stellen jeweils die Einzelkanäle der Hoxgen-Antikörperfärbung dar. (A) Der mandibulare NB7-3 und seine Nachkommenzellen exprimieren *Dfd* (rot) und die des Maxillarsegments *Scr* (blau). (B) Weiterhin wird *Pb* (magenta) im mandibularen NB7-3 und seinen Nachkommenzellen exprimiert. (C) Der labiale NB7-3 exprimiert *Antp* (magenta), ebenso wie die des Thorax. (D und E) Antikörperfärbungen gegen *Eg* (grün) und *En* (rot) für die eindeutige Identifikation von

NB7-3 Nachkommenzellen. Funktionsverlust von *Dfd* und *Scr* verändert die segmentalen Identitäten von NB7-3. In den Vergrößerungen sind verschiedene Ebenen separat dargestellt, um die gesamte Anzahl der von NB7-3 gebildeten Zellen zu verdeutlichen, die Zahlen geben die jeweilige Zellanzahl an. (D) Bei Funktionsverlust von *Dfd* wird der mandibulare NB7-3 Zellstammbaum nicht mehr auf nur zwei Zellen im St16 reduziert, sondern es bleiben im linken Hemisegment alle der sechs gebildeten Zellen erhalten, im rechten Hemisegment verbleiben fünf Zellen. (E) Bei Funktionsverlust von *Scr* wird die Anzahl der maxillaren NB7-3 Zellen nicht wie im WT reduziert, sondern es bleiben alle gebildeten sechs Zellen erhalten. Häufig werden in beiden Segmenten auch mehr als sechs Zellen gebildet, im hier gezeigten Fall ist ein maxillarer NB7-3 Zellstammbaum mit neun gebildeten Zellen abgebildet.

Während im WT der mandibulare NB7-3 auf nur zwei Zellen in St16 reduziert wird (vergleiche Abb. 3-7), überleben in *Dfd*¹⁶ Mutanten bis in St16 in 60% (n=30 Embryonen) alle sechs Zellen des mandibularen NB7-3 (Abb. 3-25 D). Innerhalb dieser 60% werden in 40% sogar mehr als die wildtypisch entstehenden sechs Zellen gebildet (vergleiche Abb. 3-23 B; Abb. 3-25 E). Eine Reduktion auf zwei Zellen gibt es nie. In 17% überleben immerhin nur drei Zellen. Der zusätzliche mögliche Einfluss von *pb* auf den mandibularen NB7-3 wurde nicht weiter untersucht.

In *Scr*¹⁷ Mutanten (n=30 Embryonen) wird der maxillare NB7-3 Zellstammbaum nie auf drei Zellen reduziert, wie es im WT der Fall ist. Auf vier Zellen wird er in 5% reduziert, in 60% werden mehr als sechs Zellen generiert, ansonsten bleiben in 35% fünf bis sechs Zellen erhalten (Abb. 3-25 E).

Durch zusätzlichen Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* gemeinsam mit *Dfd* oder *Scr* verändern sich die Effekte auf NB7-3 nicht.

Für den labialen NB7-3 wurden keine genaueren Daten erhoben, da er den thorakalen NB7-3 in seiner wildtypischen Ausprägung und durch die Expression von *Antp* sehr ähnlich ist. Die Funktion von *Antp* im thorakalen NB7-3 wird derzeit eingehend untersucht (Sudha Myneni, unveröffentlicht).

3.2.2. Deformed Funktion ist für die Eagle Expression der spät Eagle positiven Zelllinienanteile notwendig

Abhängigkeit von *Dfd* Funktion lässt sich auch bei allen weiteren gnathalen Neuroblastenlinien erkennen, die spät Eg positiv werden. Die Zelllinien des maxillaren NB6-2, NB5-6 und NB4-3 und des mandibularen MNB, NB4-4 und NB4-3 exprimieren *Dfd* Protein (Abb. 3-26 A, A'). In *Dfd* Mutanten fehlt Eg Expression an den entsprechenden Stellen von NB4-3mad, NB4-4mad und des mandibularen MNB, sowie von NB5-6max und NB4-3max ab St14 (Abb. 3-26 B). Ob die fehlende Eg Expression durch einen Verlust der Zellen zustande kommt, oder nur die Expression von Eg betroffen ist, wurde bisher nicht untersucht.

Da durch die Eg Expression von NB6-2 Nachkommenzellen die Gefahr besteht, diese Zellen mit ektopisch gebildeten Neuronen des NB6-4 zu verwechseln, wurde diese Zelllinie in *Dfd* Mutanten genauer untersucht. Der NB6-2max tritt in *Dfd* Mutanten selten (unter 10%, n=50 Embryonen) mit einer einzelnen sehr schwach Eg-positiven Zelle auf, die weiterhin Ind stark exprimiert (Abb. 3-26 B- B''').

Meistens ist keine Eg Expression vorhanden. Ind Expression tritt an dieser Stelle jedoch immer auf, meist in drei Zellen, was ein Hinweis darauf ist, dass die Bildung von NB6-2 durch fehlende *Dfd* Funktion nicht betroffen ist.

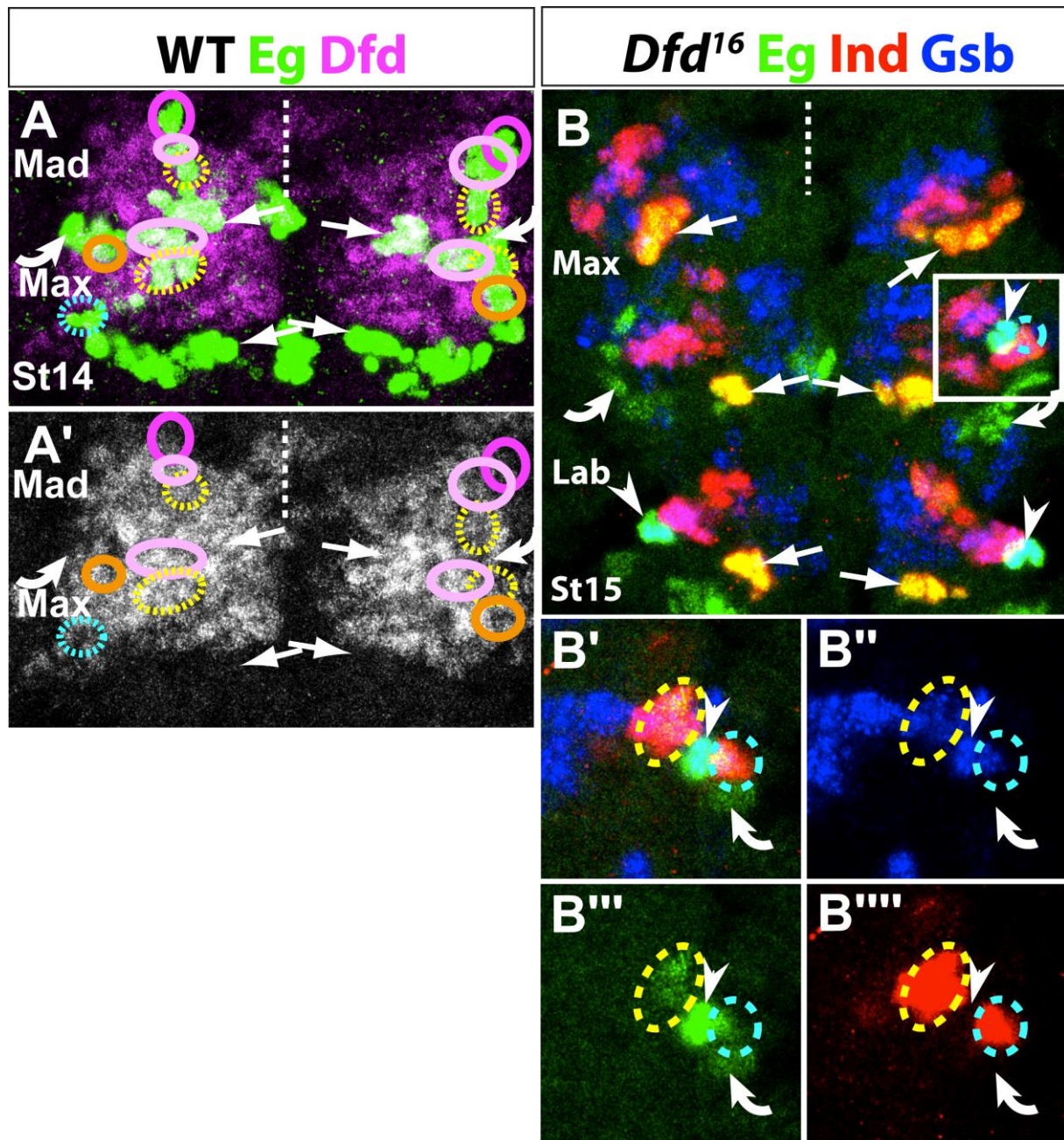


Abb. 3-26: Abhängigkeit der Eg Expression in den spät Eg positiven Neuroblastenlinien von *Dfd* Funktion.

(A) Alle der in späteren Stadien Eg exprimierenden Neuroblastenlinien des Mandibular- und Maxillarsegments exprimieren *Dfd* (magenta, in A' in weiß), einzige Ausnahme ist der maxillare MNB (A'). (B) Bei Funktionsverlust von *Dfd* sind die ab St14 Eg positiven Zelllinienanteile der mandibularen NB4-3, NB4-4 und des MNB nicht Eg positiv. Auch im maxillaren NB5-6 und NB4-3 ist keine Eg Expression vorhanden. (B') Vergrößerung des rechten maxillaren Hemisegments, gekennzeichnet durch den eingerahmten Bereich in (B). Unter Zuhilfenahme von Ind Expression (rot) und Gsb (blau) lässt sich auch bei *Dfd* Funktionsverlust weiterhin Eg Expression im Zelllinienanteil des NB5-3 erkennen, hier dargestellt im Maxillarsegment. NB6-2 des Maxillarsegments tritt bei Funktionsverlust von *Dfd* mit einer einzelnen schwach Eg positiven Zelle in Erscheinung.

3.2.3. Eagle Expression des NB5-3 wird in posterioren Segmenten durch die Funktion von *teashirt* unterdrückt

Die Besonderheit der gnathalen segmentalen Identitäten von NB5-3 ist über die zusätzliche Eg Expression sichtbar, die in den drei gnathalen Segmenten induziert wird, in allen weiteren posterioren Segmenten jedoch fehlt. Alle Eg positiven NB5-3 Nachkommenzellen des Mandibular- und Maxillarsegments exprimieren *Dfd* (Abb. 3-26 A, A'), die des Labialsegments liegen in der *Scr* Expressionsdomäne (Abb. 3-25 A). In allen drei gnathalen Segmenten sind sowohl in *Dfd* als auch in *Scr* Mutanten die NB5-3 Nachkommenzellen Eg positiv und lassen keine Veränderung in der Zellzahl der Eg positiven Zellen erkennen (Abb. 3-26 B für *Dfd* Funktionsverlust; Abb. 3-23 B für *Scr* Funktionsverlust). Dasselbe Ergebnis findet sich bei den unterschiedlichen Kombinationen der Hox-Doppelfunktionsverlustmutationen. So stellt sich die Frage, von welchen Faktoren die segmentale Identität dieser Zelllinie abhängig ist.

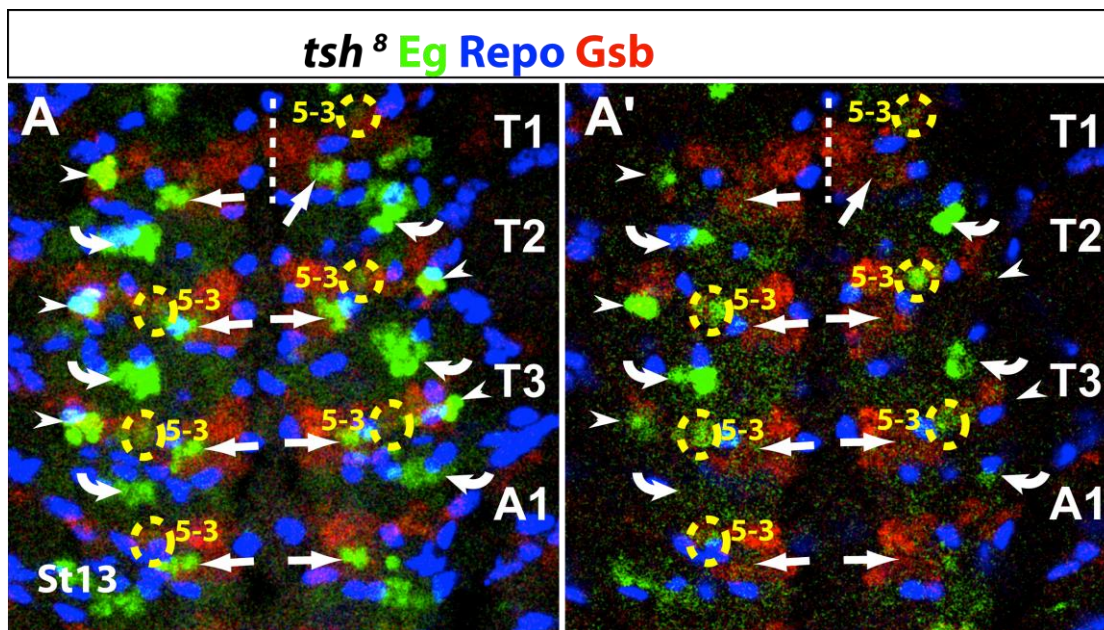


Abb. 3-27: Die Expression von Eg in thorakalen und abdominalen NB5-3 Nachkommenzellen wird durch die Funktion von Tsh verhindert.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Repo (blau) und Gsb (rot) in einer *tsh*⁸ Mutante in St13. (A) Maximalprojektion aller Ebenen. In thorakalen und abdominalen Segmenten tritt Eg Expression ectopisch in NB5-3 Nachkommenzellen auf. (A') Fokusebene einer einzelnen Ebene auf die ventral positionierten NB5-3 Zellen.

Der entscheidende Faktor hier ist *teashirt* (*tsh*; Fasano et al., 1991; Röder et al., 1992). *tsh* wird sehr ähnlich wie *Antp* ab Reihe sechs des Labialsegments nach posterior hin exprimiert, mit einer starken Expressionsdomäne in den thorakalen und einer schwächeren Expression in abdominalen Segmenten (siehe Abb. 3-41).

In *tsh* Funktionsverlustmutanten findet sich in allen drei thorakalen Segmenten und auch gelegentlich in abdominalen Segmenten Eg Expression in den Zellen des NB5-3 (Abb. 3-27 A, A'). Da in den abdominalen Segmenten nicht immer Eg Expression in NB5-3 Nachkommenzellen in *tsh* Funktionsverlustmutanten auftritt, ist hier eventuell neben Tsh ein weiterer Faktor an der Unterdrückung von Eg Expression beteiligt.

3.2.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.2.

Die segmentalen Identitäten aller Eg positiven gnathalen Zellstammbäume sind von den Funktionen der jeweils exprimierten *Antp*-K Gene abhängig, einzige Ausnahme bildet NB5-3.

Die Eg Expression von NB5-3 wird von *tsh* Funktion unterdrückt, in *tsh* Funktionsverlustmutanten wird Eg in NB5-3 Nachkommenzellen des Thorax und Abdomens exprimiert.

Die segmentale Identität der Zelllinie des maxillaren NB3-3 ist von der Funktion von *Dfd*, die des labialen NB3-3 von *Scr* Funktion abhängig. Bei Funktionsverlust des jeweils exprimierten Faktors lassen sich über die bekannten Marker meist keine Zellen mit NB3-3 Identität mehr erkennen.

Die segmentale Identität des mandibularen NB7-3 ist von *Dfd* Funktion abhängig. Bei Funktionsverlust bleiben häufig fünf Zellen, anstatt der wildtypischen zwei Zellen, erhalten. In einigen Fällen werden zusätzliche Zellen gebildet. Für den maxillaren NB7-3 lässt sich dasselbe Phänomen bei Funktionsverlust von *Scr* beobachten. Für den labialen NB7-3 Zellstammbaum wurden aufgrund der Ähnlichkeit zum Thorax keine Untersuchungen diesbezüglich vorgenommen.

Der maxillare NB6-4 ist abhängig von der Funktion von *Dfd* und von *Scr*, bei Funktionsverlust eines der beiden Faktoren treten ektopisch gebildete Neurone auf. Dies entspricht dann einer labialen oder thorakalen Identität, die unabhängig von Hoxgenfunktion ist. Doppelter Funktionsverlust beider Faktoren reduziert die Transformationsrate jedoch, anstatt sie zu addieren.

Die Eg Expression des MNB ist abhängig von *Dfd* Funktion im Mandibularsegment und von *Scr* Funktion im Maxillarsegment.

Die Eg Expression der ab St14 Eg positiv werdenden Zellen ist von *Dfd* Funktion abhängig.

3.3. Unterschiede der Identitäten der maxillaren versus der abdominalen NB6-4 Linien sind durch Hoxgenfunktionen bestimmt

Der maxillare NB6-4 bildet vier Gliazellen aus, der abdominale NB6-4 generiert hingegen nur zwei Gliazellen. Es werden keine Neurone gebildet. Der entscheidende Faktor für neuronale Identität des NB6-4 und gleichzeitig für die Regulation des Zellzyklus, und damit von Zellteilung, ist CyclinE (CycE). AbdA wirkt reprimierend auf CycE und verhindert dadurch die Entstehung von Neuronen im abdominalen NB6-4. Für die Entstehung von Neuronen des thorakalen NB6-4 ist hingegen die Funktion von CycE notwendig (Berger et al., 2005; Berger et al., 2010; Kannan et al., 2010). Für die segmentalen Identitäten der gnathalen NB6-4 lässt sich ebenfalls eine Abhängigkeit von CycE Funktion erkennen.

3.3.1. Repression neuronaler NB6-4 Identität über die Funktion von Deformed

CycE Funktionsverlust führt zum Verlust neuronaler Identität des labialen NB6-4 in 65% (Abb. 3-28), ektopische Expression von *CycE* mit *scaGal4* verursacht die Entstehung von ektopischen NB6-4max Neuronen in 12% (Abb. 3-29 C). Somit lässt sich eindeutig eine Abhängigkeit der Entstehung von NB6-4 Neuronen durch CycE Funktion erkennen.

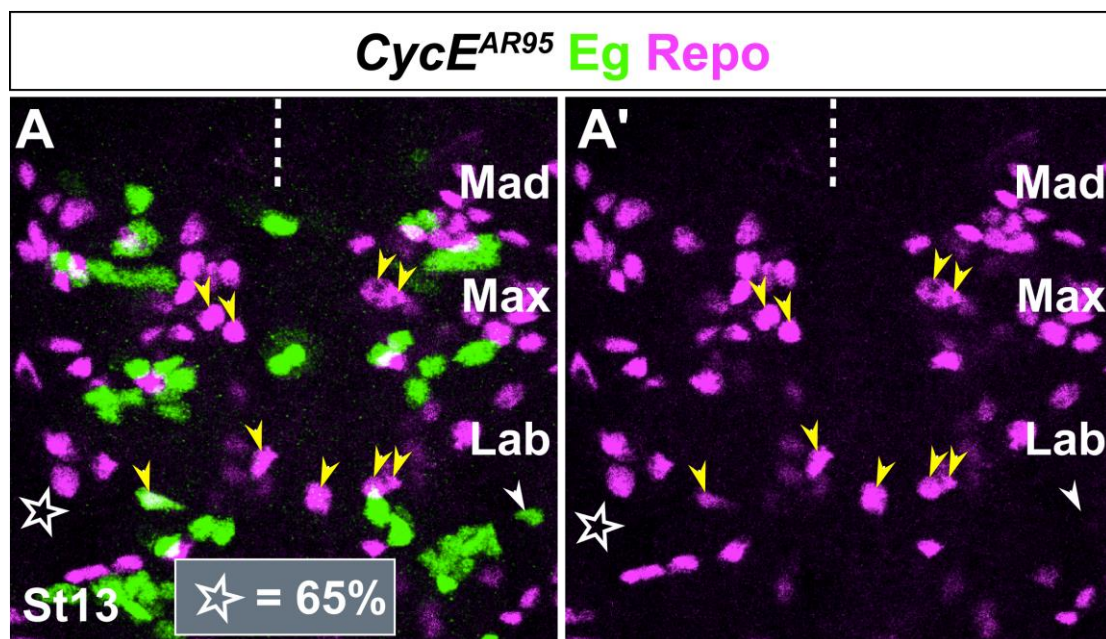


Abb. 3-28: Funktionsverlust von *CycE* führt zum Verlust von Neuronen des labialen NB6-4 und zu verringerter Zellzahl.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (magenta) in *CycE^{AR95}* Mutanten in St13, in (A') im Einzelkanal Repo. Im Maxillarsegment findet eine Reduktion auf zwei Glia pro Hemisegment statt. Im Labialsegment kommt es zu Verlust von NB6-4 Neuronen in 65%, das transformierte Hemisegment ist durch den weißen Stern gekennzeichnet.

Für den Erhalt der wildtypischen Identität wirkt Dfd im maxillaren NB6-4, so wie AbdA im abdominalen NB6-4, reprimierend auf CycE. Es muss hier jedoch aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Zellteilungen (vier maxillare Glia versus zwei abdominale Glia) eine abweichende

Regulation von *CycE* wirksam sein. Für das *CycE* Protein wurden zwei voneinander getrennte Funktionen, für den Zellzyklus einerseits und die Vermittlung neuronaler Identität andererseits, über zwei unterschiedliche Domänen des Proteins gefunden (Berger et al., 2010). Eine genauere Analyse der Effekte und Regulationen von *Dfd* und *AbdA* auf *CycE* und die darüber eventuell möglichen Erklärungen unterschiedlicher Zellzahlen wurde im Folgenden versucht.

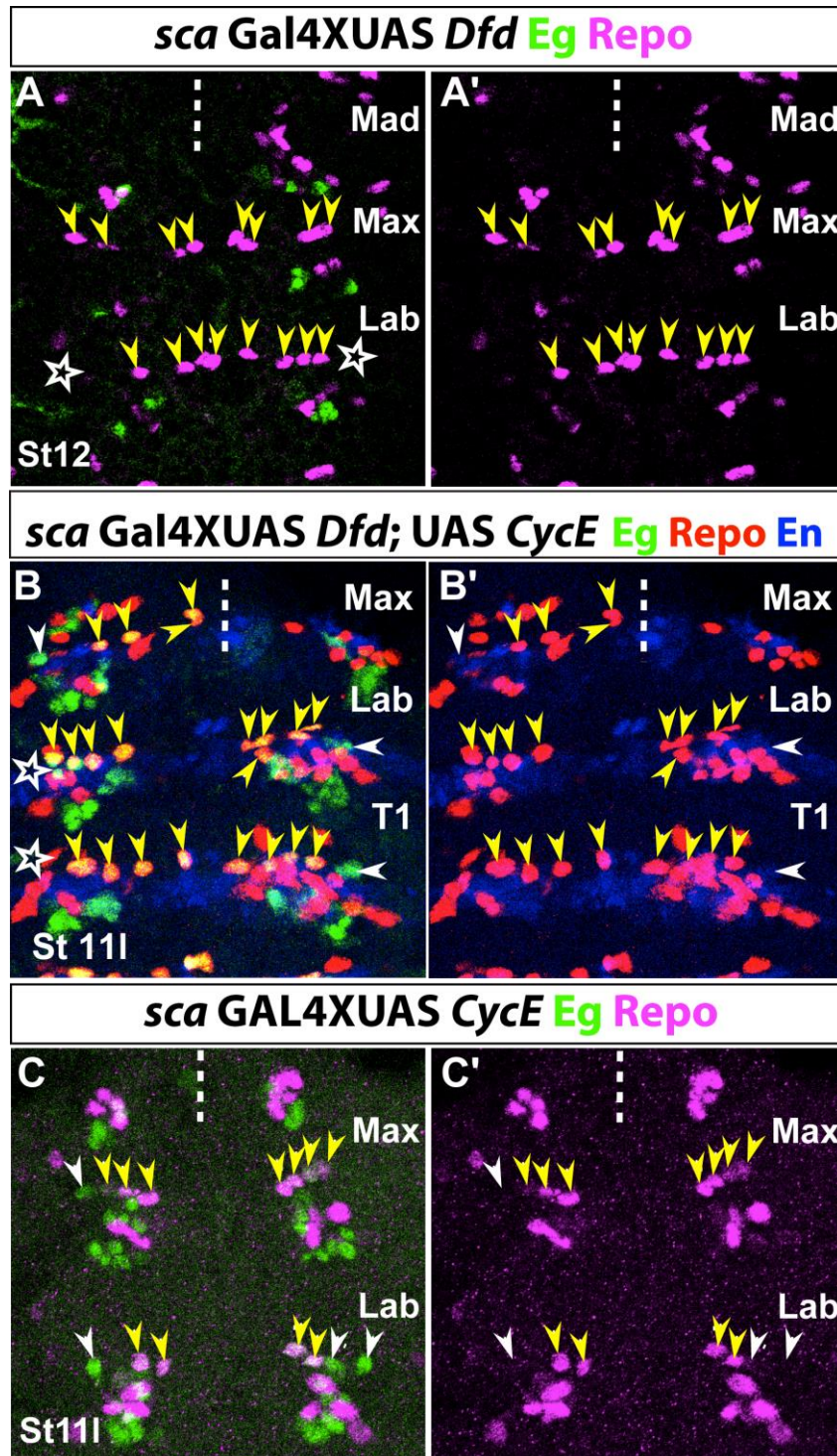


Abb. 3-29: Ektopische Expression von *Dfd*, *Dfd* gemeinsam mit *CycE* und von *CycE*.

Antikörperfärbungen gegen *Eg* (grün), *Repo* (magenta, in (B) rot) und *En* (blau) bei ektopischer Expression von *Dfd* und/oder *CycE*.

(A) Ektopische Expression von *Dfd* mit *sca*-Gal4 führt zum Verlust von NB6-4 Neuronen in 74% (betroffene Segmente gekennzeichnet durch weiße Sternchen). (B) Gleichzeitige ektopische Expression von *Dfd* und *CycE* mit *sca*-Gal4 führt zu Veränderungen der maxillaren und labialen NB6-4 Identitäten (für Einzelheiten siehe Text). (C) Ektopische Expression von *CycE* mit *sca*-Gal4 resultiert in der Bildung ektopischer maxillarer NB6-4 Neurone in 12%. (A'-C') Darstellung der *Repo* Expression zur Ermittlung glialer versus neuronaler Identität.

Auf die Entstehung von Neuronen hat *Dfd* deutlich reprimierende, *CycE* hingegen eine steigernde Wirkung. Das verdeutlichen Expressionsexperimente, die alle mit *scaGal4* mit einer jeweiligen Mindestanzahl von $n=15$ Embryonen durchgeführt wurden. So entstehen ektopische maxillare Neurone in 0% bei alleiniger ektopischer Expression von *Dfd* (Abb. 3-29 A), jedoch in 8% bei gleichzeitiger ektopischer Expression von *Dfd* und *CycE* gemeinsam (Abb. 3-29 B). Alleinige ektopische Expression von *CycE* steigert die Entstehungsrate von ektopischen NB6-4max Neuronen auf 12% (Abb. 3-29 C).

Im Labialsegment werden bei ektopischer Expression von *Dfd* nur noch in 13% der Hemisegmente Neurone des labialen und thorakalen NB6-4 gebildet (Abb. 3-29 A). Bei gleichzeitiger ektopischer Expression von *Dfd* und *CycE* entstehen in 73% Neurone des labialen und thorakalen NB6-4 (Abb. 3-29 B). Ektopische Expression von *CycE* alleine verändert die wildtypische Ausprägung mit 100% neuronaler Identität erwartungsgemäß nicht (Abb. 3-29 C). Die neuronale Identität verhindernde Wirkung von *Dfd* reicht somit nicht aus, die neuronale Identität verursachende Wirkung von *CycE* komplett zu unterbinden, jedoch wird eine reprimierende Funktion klar deutlich.

3.3.2. Zellproliferationsverhalten des maxillaren versus des abdominalen NB6-4

Gegenüber der Wirkung von *Dfd* hat *abdA* deutlich eine reduzierende Wirkung auf die Zellproliferationsrate, was durch die Anzahl von vier maxillaren versus zwei abdominalen NB6-4 Glia deutlich wird. Zudem werden bei ektopischer Expression von *abdA* meist lediglich zwei Glia in anderen Segmenten gebildet (Berger et al., 2005). Ektopische Expression von *Dfd* bewirkt jedoch meist die Entstehung von vier oder mehr Glia (Abb. 3-29 A für das Labialsegment, für thorakale und abdominale Segmente nicht gezeigt).

Eine zusätzliche Zellteilung im wildtypischen maxillaren NB6-4 muss eine unterschiedliche Regulation von *CycE* durch *Dfd* und *AbdA* zulassen. Bei zu starker Repression des Zellzyklusgens *CycE* durch *Dfd* könnte keine zweite Zellteilung im wildtypischen maxillaren NB6-4, oder bei ektopischer Expression von *Dfd* im NB6-4 weiterer Segmente, stattfinden. Die Funktionen von *CycE* auf Zellproliferation und das Zellzyklusverhalten wurden in der Vergangenheit ausführlich untersucht (siehe beispielsweise Knoblich et al., 1994; Richardson et al., 1995; und spezifisch für NB6-4 Berger et al., 2005; Berger et al., 2010).

Die genauere Untersuchung von *CycE* mRNA Expression im wildtypischen NB6-4max direkt nach der Delamination (Abb. 3-30 A und A'), als auch im Zwei-Zell-Stadium (Abb. 3-30 B, B') lässt eine geringe Konzentration von *CycE* mRNA erkennen. Sie ist besonders im Vergleich zur *CycE* Expression im labialen NB6-4 schwach, jedoch deutlich vorhanden (Abb. 3-30 A-A''). Dies stellt einen Unterschied zu der beschriebenen fehlenden Expression von *CycE* mRNA im abdominalen NB6-4 im Zwei-Zell-Stadium dar. Die Expression im delaminierenden abdominalen NB6-4 konnte aufgrund von zu schwacher *Eg* Expression in der von Christian Berger angefertigten Studie leider nicht untersucht werden (Berger et al., 2005 und Doktorarbeit Christian Berger, 2004).

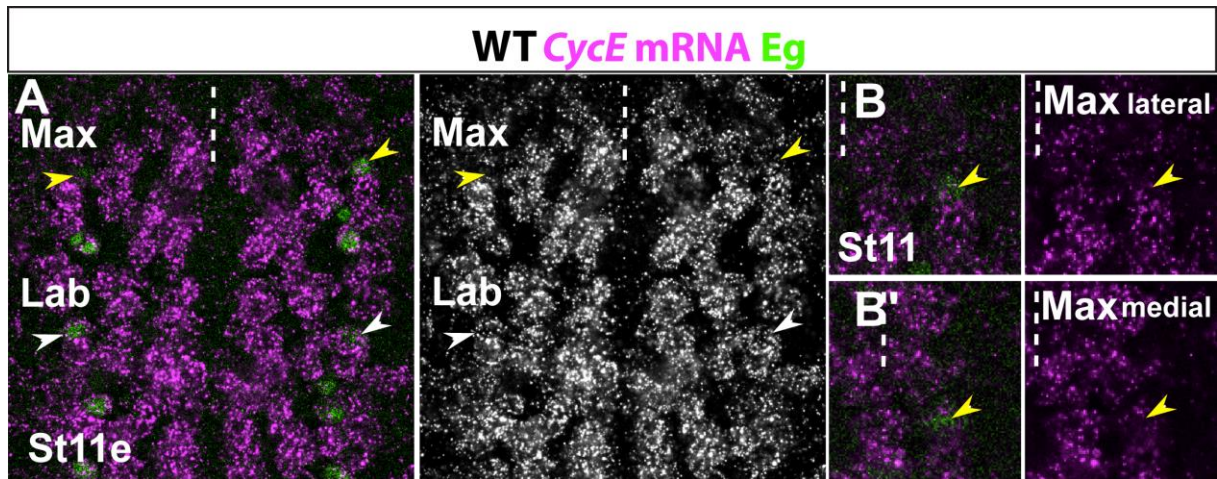


Abb. 3-30: *CycE* mRNA Expression im maxillaren und labialen NB6-4 im WT.

(A, B) *CycE* mRNA in situ Hybridisierung (magenta) und Eg Antikörperfärbung (grün) im WT in St11. (A) Zeitpunkt direkt nach der Delamination des NB6-4 im frühen St11, das rechte Bild ist die Darstellung von *CycE* mRNA in Monochrom. Der labiale NB6-4 exprimiert *CycE* stark, während im maxillaren NB6-4 eine geringere Konzentration von *CycE* mRNA erkennbar ist. (B und B') Ausschnitt des maxillaren NB6-4 im Zwei-Zell Stadium gerade nach der ersten Teilung. *CycE* mRNA ist schwach sowohl in der weiter lateral liegenden Zelle (B mit Einzelkanal *CycE* im rechten Bild) als auch in der weiter medial liegenden Zelle (B' mit Einzelkanal *CycE* im rechten Bild) exprimiert.

Aufgrund der Ergebnisse der Überexpressionsexperimente und vor dem Hintergrund von Ergebnissen über getrennte Funktionen von Domänen des CycE Proteins einerseits für die Zellzyklusregulation und andererseits für die Entstehung von NB6-4 Neuronen (Berger et al., 2010; Kannan et al., 2010), bestand die Vermutung, dass Dfd und CycE eventuell über Protein-Protein Interaktion miteinander interagieren könnten.

Um die Möglichkeit von direkter Proteininteraktion zwischen Dfd und CycE zu überprüfen, wurden Immunoprecipitationen (IP) durchgeführt. Da die Ausgangsfrage nach unterschiedlicher Wirkung von AbdA und Dfd auf CycE evtl. mit unterschiedlicher Wirkung auf das CycE Protein oder aber alternativ über transkriptionelle Regulation auf DNA Ebene erklärt werden könnte, wurden IPs mit AbdA und CycE ebenfalls durchgeführt.

3.3.3. Immunoprecipitation von Deformed und AbdominalA mit CyclinE zeigt keine Protein-Protein Interaktion

Durch eine Immunoprecipitation lassen sich Protein-Protein-Interaktionen nachweisen. Dafür wird ein Antikörper an Agarosebällchen gekoppelt und anschließend mit dem für ihn spezifischen Protein in Interaktion gebracht. Durch die Fixierung an Agarose sind die gebundenen Komponenten beispielsweise über ihre Sedimentationseigenschaften durch Zentrifugation extrahierbar. Findet nun im Weiteren eine Protein-Protein Interaktion von dem an den Antikörper gebundenen Protein mit einem weiteren Protein

statt, so lässt sich diese Interaktion durch eine weitere Antikörperfärbung gegen das zweite Protein nach erfolgter Fixierung auf einer Membran nachweisen (siehe auch Material und Methoden Kapitel 2.8.).

Es wurden zunächst als Kontrolle alle drei verwendeten primären Antikörper gegen Dfd (gewonnen aus Ziege), AbdA (aus Ziege) und CycE (aus Kaninchen) und die für den weiteren Nachweis verwendeten sekundären Antikörper auf einem Western Blot getestet, um Bindespezifität, Bandenlaufhöhe und Hintergrund der Antikörperfärbung festzustellen. Es gelang schließlich, ein verlässliches Farbsignal von Dfd, AbdA und CycE Protein zu erreichen, und den Hintergrund der sekundären Antikörper zu minimieren (Abb. 3-31).

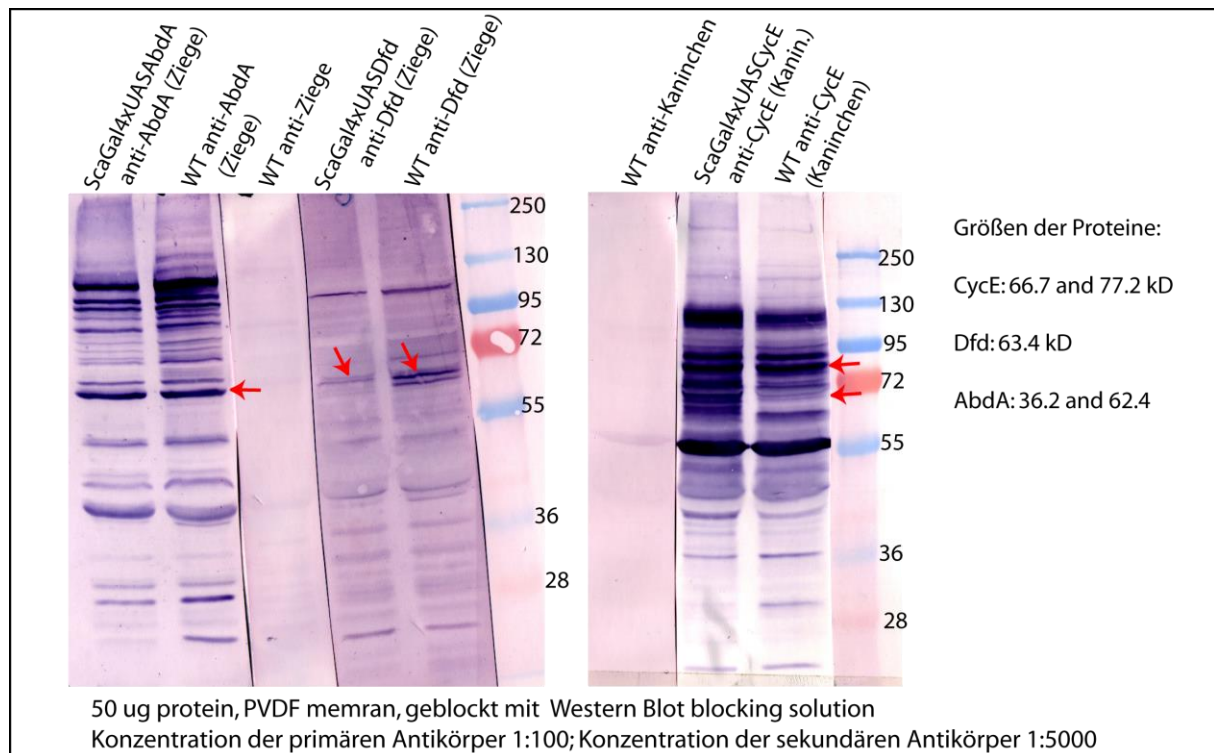


Abb. 3-31: Western Blot zum Test der primären und sekundären Antikörper.

Als Vorbereitung für die Immunoprecipitation werden zunächst die Bindeeigenschaften der zu verwendenden Antikörper auf einem Western Blot getestet. Auftrag mit jeweils 50 µg Protein, die Konzentration der primären Antikörper beträgt 1:100, die der sekundären 1:5000. Die bekannten Bandenlaufhöhen der Proteine AbdA, Dfd und CycE sind abhängig von der Größe der Proteine (siehe Legende rechts) in Kilo-Dalton (kD). Die Laufhöhen lassen sich anhand der Markerbanden ablesen und sind jeweils mit roten Pfeilen markiert. Die primären Antikörper wurden jeweils einmal mit Lysat aus Wildtyp und einmal mit Lysat aus ektopischer Expression des jeweiligen Proteins getestet. Die verwendeten sekundären Antikörper gegen Kaninchen und gegen Ziege verursachen keinen unspezifischen Hintergrund.

Im Weiteren wurde nun versucht, eine Immunoprecipitation (IP) von CycE mit Dfd und CycE mit AbdA durchzuführen. Als Kontrolle gegen methodische Fehler wurden Dfd-IP mit Antikörperfärbung gegen Dfd überprüft, sowie CycE-IP mit Antikörperfärbung gegen CycE und AbdA-IP mit Antikörperfärbung gegen AbdA. Für Dfd und CycE lässt sich ein deutlicher Nachweis von Protein im IP erkennen (Abb.

3-32), was ein Hinweis darauf ist, dass die Methode an sich funktionierte. Für AbdA ergibt sich eine Bande mit entsprechender Laufhöhe einer Isoform des Proteins im Lysat, jedoch nicht im IP. Hier liegt vermutlich ein methodischer Fehler vor. Trotz Wiederholungen und Veränderungen der Parameter konnte kein AbdA Protein nach dem IP festgestellt werden.

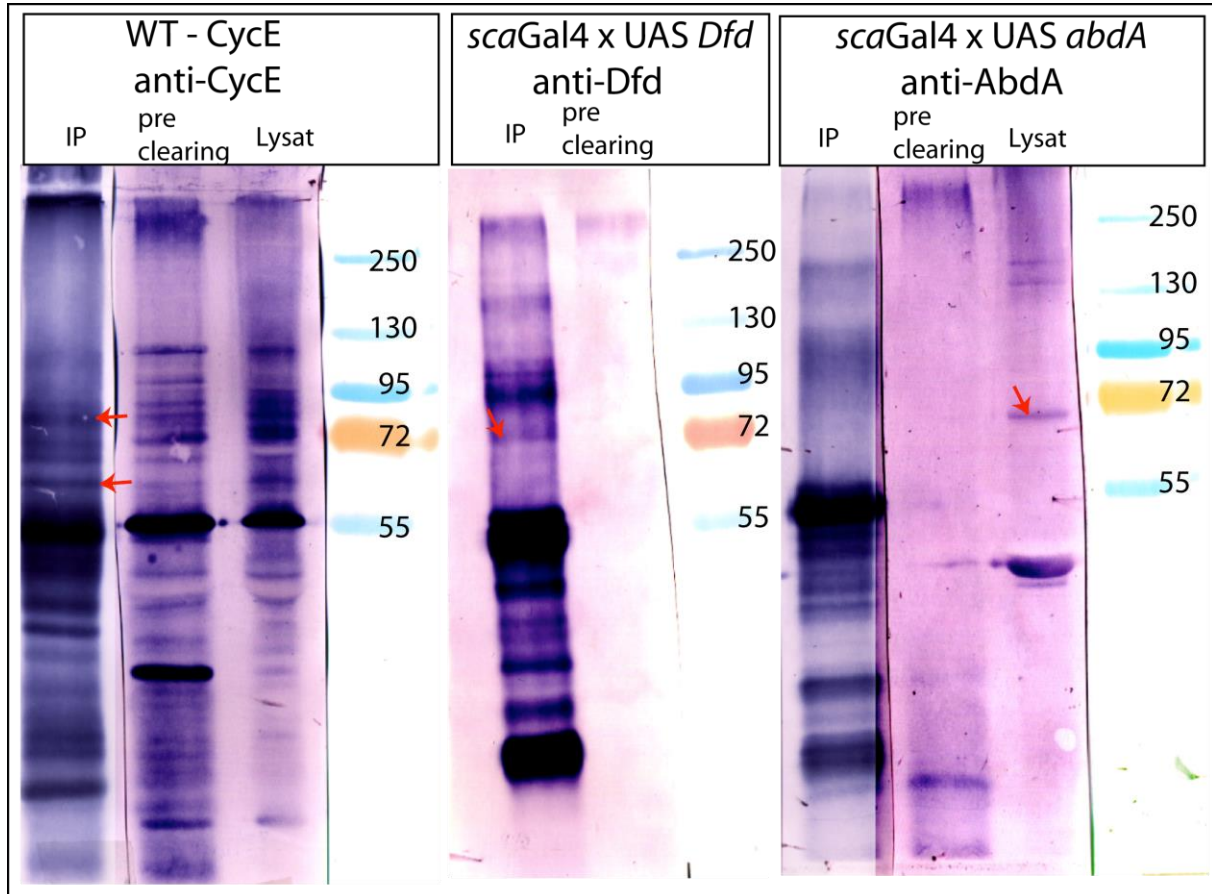


Abb. 3-32: IP von AbdA, Dfd und CycE als Kontrolle mit Antikörperfärbung gegen das jeweilige gleiche Protein.

Antikörperfärbung gegen CycE nach IP von CycE Protein (aus WT), von Dfd nach IP von Dfd Protein (aus ektopischer Expression) und gegen AbdA nach IP von AbdA Protein (aus ektopischer Expression). In der Immunoprecipitation von CycE und Dfd lässt sich das jeweilige Protein nach Bindung an die an Agarose Beads gekoppelten Antikörper nachweisen, AbdA hingegen hat nicht gebunden und befindet sich im Lysat.

Für die Protein-Protein Bindung von Dfd mit CycE lässt sich durch den IP leider kein eindeutiger Nachweis erbringen. Es lassen sich in allen vier Ansätzen von unterschiedlicher Kombination von CycE und Dfd Protein keine nachweisbare Bindung der Proteine feststellen, was durch fehlende Proteinbanden auf etwa 140 kDa Höhe sichtbar ist. Da die Einzelnachweise von Dfd Protein und CycE Protein sowohl im IP, als auch der Antikörpernachweis auf dem Western Blot funktionierte, könnte eventuell aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass Dfd und CycE Protein keine Protein-Protein Bindung eingehen.

Da aber in allen IPs relativ viele unspezifische Banden, besonders im unteren kDa Bereich bestehen, müsste für eine ganz sichere Aussage zunächst die Qualität der IPs verbessert werden.

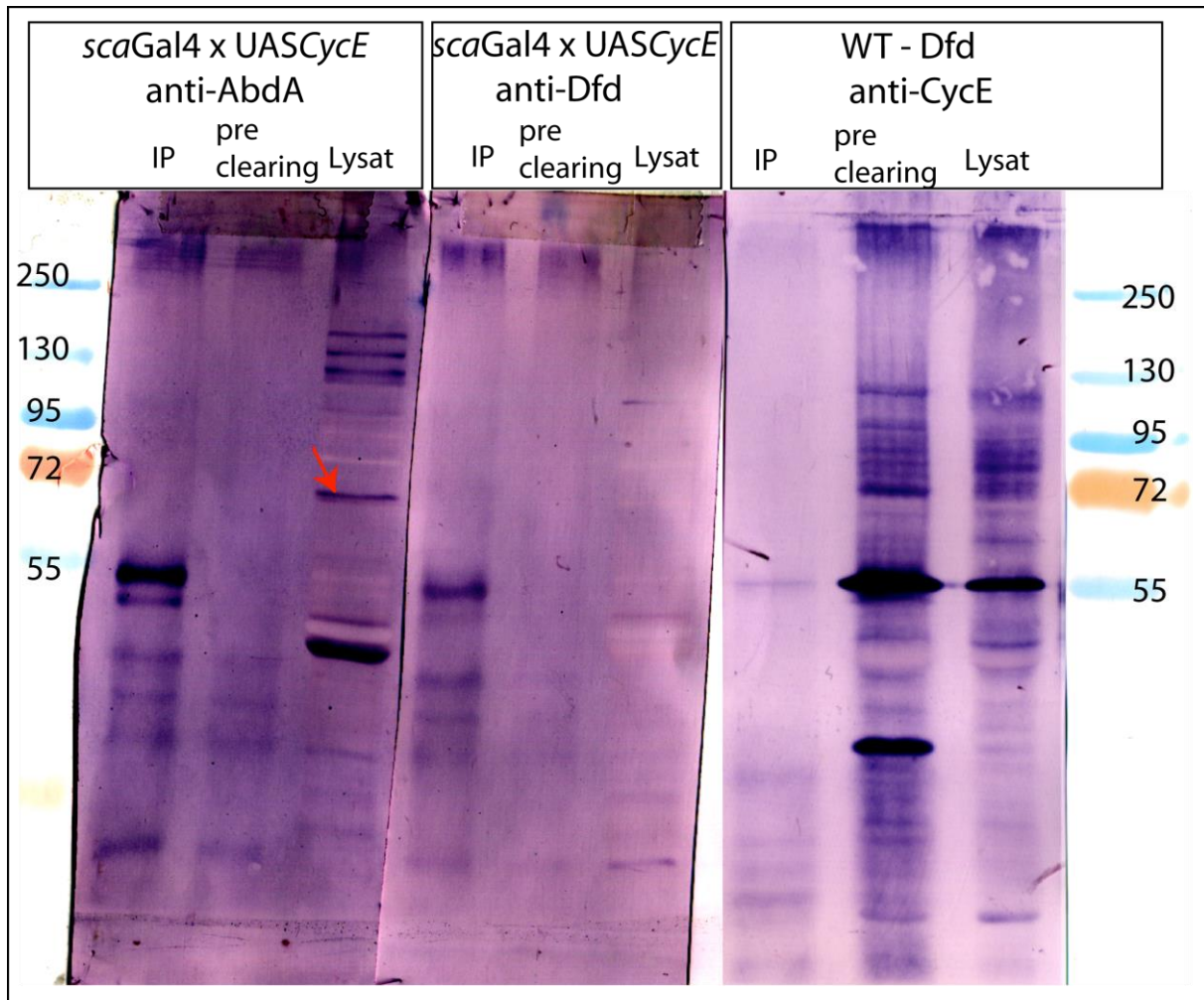


Abb. 3-33: IP von Dfd mit CycE und AbdA mit CycE zur Überprüfung von Protein-Protein Interaktion von CycE und Dfd, sowie CycE und AbdA.

Antikörperfärbung gegen AbdA in der Immunoprecipitation von CycE mit AbdA (mit ektopisch exprimiertem CycE), Antikörperfärbung gegen Dfd im IP von CycE mit Dfd, sowie Antikörperfärbung gegen CycE im IP von CycE mit Dfd (aus WT). AbdA Protein findet sich nach dem IP mit CycE im Lysat (gekennzeichnet mit rotem Pfeil). Eine Bindung von Dfd mit CycE lässt sich durch die beiden IP zur Testung der Interaktion von Dfd und CycE nicht zeigen.

Für CycE mit AbdA lassen sich ebenfalls keine Protein-Protein Bindungen nachweisen, sondern AbdA Protein findet sich wiederum im Lysat und nicht gebunden. Bei diesem Ansatz ist als Fehlerquelle aber vermutlich nicht die fehlerhafte Bindung von AbdA an die Membran oder den Antikörper anzunehmen. Denn hier hat zunächst CycE Antikörper und CycE Protein gebunden, und daran hätte AbdA binden können, sofern Protein-Protein Interaktion von AbdA und CycE vorliegen sollte. Daher kann ebenfalls geschlossen werden, dass vermutlich keine Protein-Interaktion von AbdA und CycE stattfindet. Dieses Projekt wurde zusammen mit einem Austauschstudenten, Thomas Zaykowski, durchgeführt und

nach Ende seiner Praktikumszeit nicht weiter verfolgt. Um die hier getroffenen Annahmen zu validieren wären dringend weitere Untersuchungen notwendig.

3.3.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.3.

Dfd Funktion verhindert die Entstehung von NB6-4 Neuronen in allen Segmenten, *CycE* Funktion hingegen bewirkt die Entstehung von NB6-4 Neuronen. Ektopische Expression von *Dfd* bewirkt die Entstehung von vier Gliazellen in anderen Segmenten und hat somit eventuell eine von *abdA* abweichende Regulationsmöglichkeit auf *CycE*.

Im maxillaren NB6-4 ist nach der Delamination und nach der ersten Teilung geringe Konzentration von *CycE* mRNA nachweisbar, der labiale NB6-4 exprimiert *CycE* stark.

Protein-Protein Interaktionen von *Dfd* mit *CycE* und *AbdA* mit *CycE* konnten nicht nachgewiesen, aber auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

3.4. Die Identität des NB6-4max wird durch die Funktionen von *labial* und *Antennapedia* beeinflusst

Die Identität des maxillaren NB6-4 wird nicht durch die Funktionen der exprimierten Hoxgene *Dfd* und *Scr* alleine reguliert. Vollkommen unerwartet lassen sich auch Auswirkungen durch die nicht exprimierten Hoxgene *lab* und *Antp* beobachten. Diese Ergebnisse wurden bereits in der Diplomarbeit erhoben, und werden daher in einer Übersicht als Einleitung des nun folgenden Kapitels dargestellt:

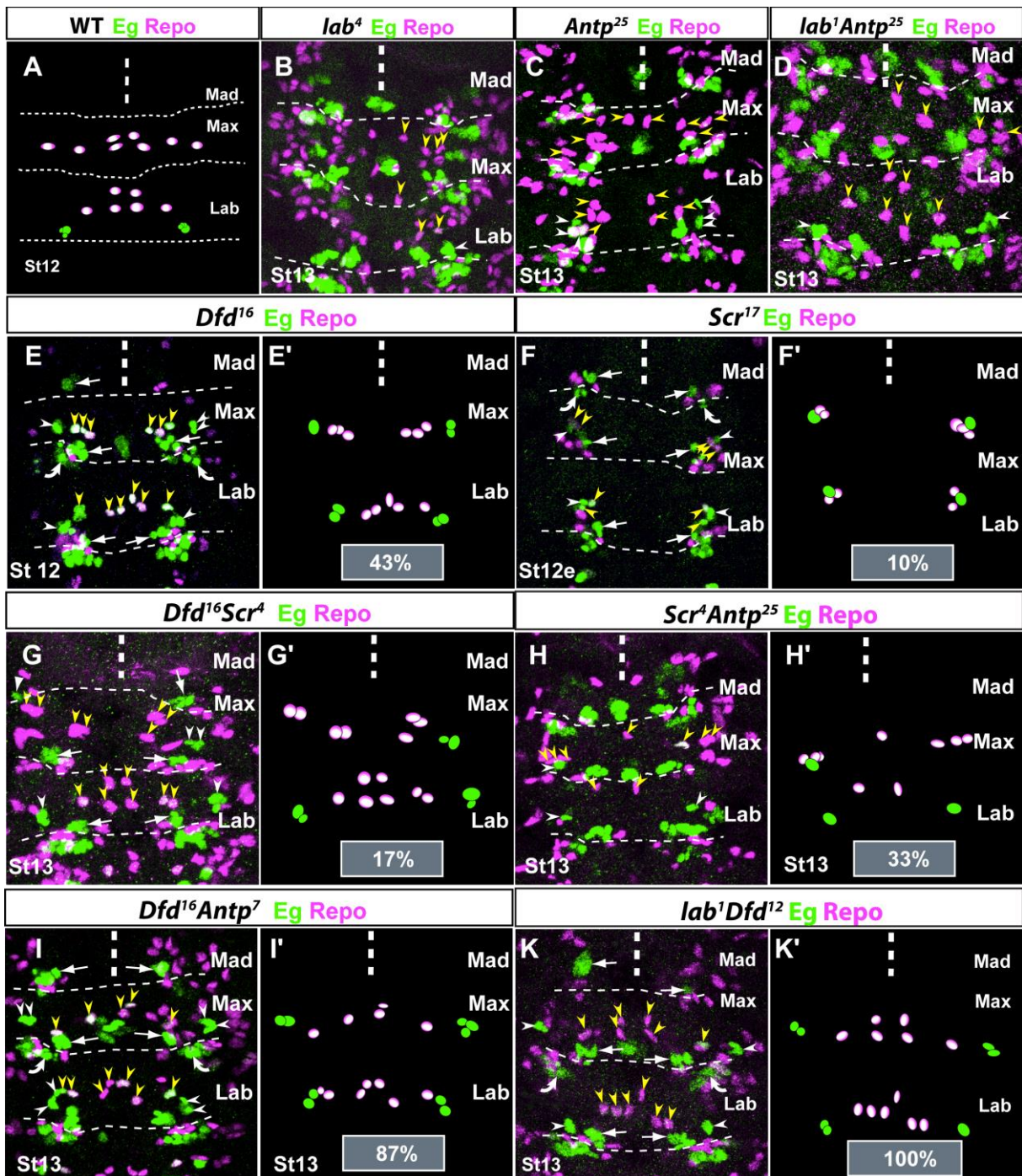


Abb. 3-34: Transformationen des maxillaren NB6-4 in *Antp*-K Mutanten.

Antikörperfärbungen gegen Eg (grün) und Repo (magenta) für die Analyse der Transformation des maxillaren NB6-4 von rein glialer Identität hin zu gemischter Identität aus Neuronen und Gliazellen. (A) Die wildtypischen gnathalen NB6-4 Linien sind zur besseren Übersicht als Cartoon dargestellt. (B-D) Die Einzelmutanten von *lab* (B), *Antp* (C) und die Doppelmutante von *lab* gemeinsam mit *Antp* (D) ergeben keinen Phänotyp. (E-K) Bei allen weiteren Einzel- und Doppelmutanten ist NB6-4 des Maxillar- und Labialsegments im Cartoon (E'-K') hervorgehoben. Die Transformationsrate des jeweiligen Genotyps ist durch die Prozentzahl ersichtlich.

Einzel-Funktionsverlust von *Dfd* führt zu 43% Transformation (Abb. 3-34 E) und Einzelfunktionsverlust von *Scr* zu 10% (Abb. 3-34 F) Transformation von rein glialer maxillarer Identität mit vier Gliazellen pro Hemisegment hin zu labialer oder thorakaler Identität, bestehend aus drei Glia und einem neuronalen Cluster. Doppelter Funktionsverlust von *lab*¹ gemeinsam mit *Dfd*¹² führt zu einer Transformationssteigerung hin zu neuronaler Identität in 100% (Abb. 3-34 K). Auch *Dfd*¹⁶*Antp*⁷ (Abb. 3-34 I) oder Mutation von *Scr*⁴ gemeinsam mit *Antp*²⁵ (Abb. 3-34 H) ruft deutliche Transformationssteigerung gegenüber den Einzelereignissen hervor, obwohl alleiniger Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* oder Doppelfunktionsverlust von *lab* mit *Antp* keinerlei Auswirkungen auf die segmentale Identität des maxillaren NB6-4 hat (Diplomarbeit Henrike Becker, 2008, und Abb. 3-34).

Die Expressionsdomänen von *lab* und *Antp* umfassen nicht das Maxillarsegment und alleiniger Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* führt zu keinerlei Auswirkungen auf NB6-4max (Abb. 3-34 B-D). Auch Doppelfunktionsverlust von *lab* mit *Antp* hat keine Auswirkungen. Auch hier wurden für die Überprüfung der in der Diplomarbeit gefundenen Ergebnisse zunächst transheterozygot *lab*¹ mit *lab*⁴ und *Antp*¹¹ mit *Antp*²⁵ gegeneinander gekreuzt. Eine leichte Abweichung bringt *Antp*⁷, wo im Labialsegment und im Thorax eine gesteigerte Anzahl an NB6-4 Neuronen entsteht (nicht gezeigt, auch persönliche Mitteilung von Sudha Myneni). *Antp*⁷ wurde im Vergleich zu *Antp*¹¹ und *Antp*²⁵ in weiteren Zusammenhängen als stärkeres Allel gefunden (persönliche Mitteilung von Sudha Myneni). Eine Neukombination von *lab* mit *Dfd* oder *Dfd* mit *Antp* ist aus methodischen Gründen nur sehr schwer möglich gewesen, erschien jedoch auch vor dem Hintergrund der im Weiteren gefundenen Ergebnisse nicht mehr als unbedingt notwendig. Zunächst wurden jedoch die Expressionsdomänen aller *Antp*-K Gene im Detail untersucht.

3.4.1. Die Suche nach den Einflüssen von *labial* und *Antennapedia* Funktion auf den maxillaren NB6-4

Der Einfluss von *lab* oder *Antp* zusammen mit *Dfd* oder *Scr* hat durch fehlende Expression im Maxillarsegment nicht zu erklärende Effekte auf die segmentale Identität des NB6-4max. Daher wurde nun zunächst untersucht, ob die Transformationssteigerung aufgrund direkter zellautonomer Wirkungsweisen zustande kommen kann. Dies wäre beispielsweise durch frühe Expression von *lab* und *Antp* mRNA oder Protein im Neuroektoderm an späterer Position des Maxillarsegments möglich.

Eine weitere Möglichkeit wäre auch durch einen sehr kurzen Expressionszeitraum oder sehr schwaches Expressionsniveau von *lab* oder *Antp* mRNA oder Protein im NB6-4max oder dem Neuroektoderm gegeben.

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass sich durch den Funktionsverlust eines oder zweier *Antp*-K Gene die Expression angrenzender Hoxgene verändert und so Effekte im NB6-4max hervorgerufen werden.

Daher wurde die Expression aller *Antp*-K Gene über die gesamte frühe Embryonalentwicklung zunächst im WT genauestens in ihren Positionen verfolgt. Um auch geringe Expressionslevel sichtbar zu machen, wurden sowohl mRNA als auch Protein nachzuweisen versucht. Anschließend wurden in den unterschiedlichen *Antp*-K mutanten Hintergründen alle verbleibenden Hoxgene auf Veränderungen in ihren Expressionsdomänen überprüft.

3.4.2. Räumliche und zeitliche Expressionsdomänen der *Antennapedia*-Komplex Gene im wildtypischen gnathalen VNS

Räumliche und zeitliche Expression der *Antp*-K Gene wurden in der Vergangenheit ausführlich analysiert, aber nur selten im Detail im sich entwickelnden VNS (Martinez-Arias et al., 1987; Merrill et al., 1987; Diederich et al., 1991; Urbach et al., 2016). Um zu analysieren welche Hoxgene während der frühen Embryonalentwicklung in der Region des Neuroektoderms des späteren Maxillarsegments exprimiert werden, und ob die Expressionsdomänen der Hoxgene sich stark verändern, wurden die Positionen der Expressionsdomänen von *lab*, *Dfd*, *Scr* und *Antp* vom Beginn der Embryogenese bis St9 vermessen und in Relation zueinander definiert. *pb* wird nicht in einer definierten Domäne, sondern in einzelnen Zellgruppen innerhalb des VNS exprimiert, daher wurde *pb* Expression in die Vermessung nicht mit einbezogen.

Die Expressionsdomänen wurden mithilfe von in situ Hybridisierungen mit selbst hergestellten Sonden über Alkalische Phosphatase Färbungen sichtbar gemacht. In situ Hybridisierungen wurden aufgrund ihrer höheren Sensitivität gegenüber dem Proteinnachweis benutzt, um auch geringe Mengen an Transkript detektieren zu können. Die Messungen wurden vom posterioren Pol ausgehend mit den Messinstrumenten von Adobe Photoshop durchgeführt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.5.11. und Abb. 3-35).

Zusätzlich wurde anschließend die Expression aller *Antp*-K Gene gemeinsam mit einer Antikörperfärbung gegen den Segmentgrenzenmarker *En* durchgeführt, und die Embryonen für die Auswertung filetpräpariert.

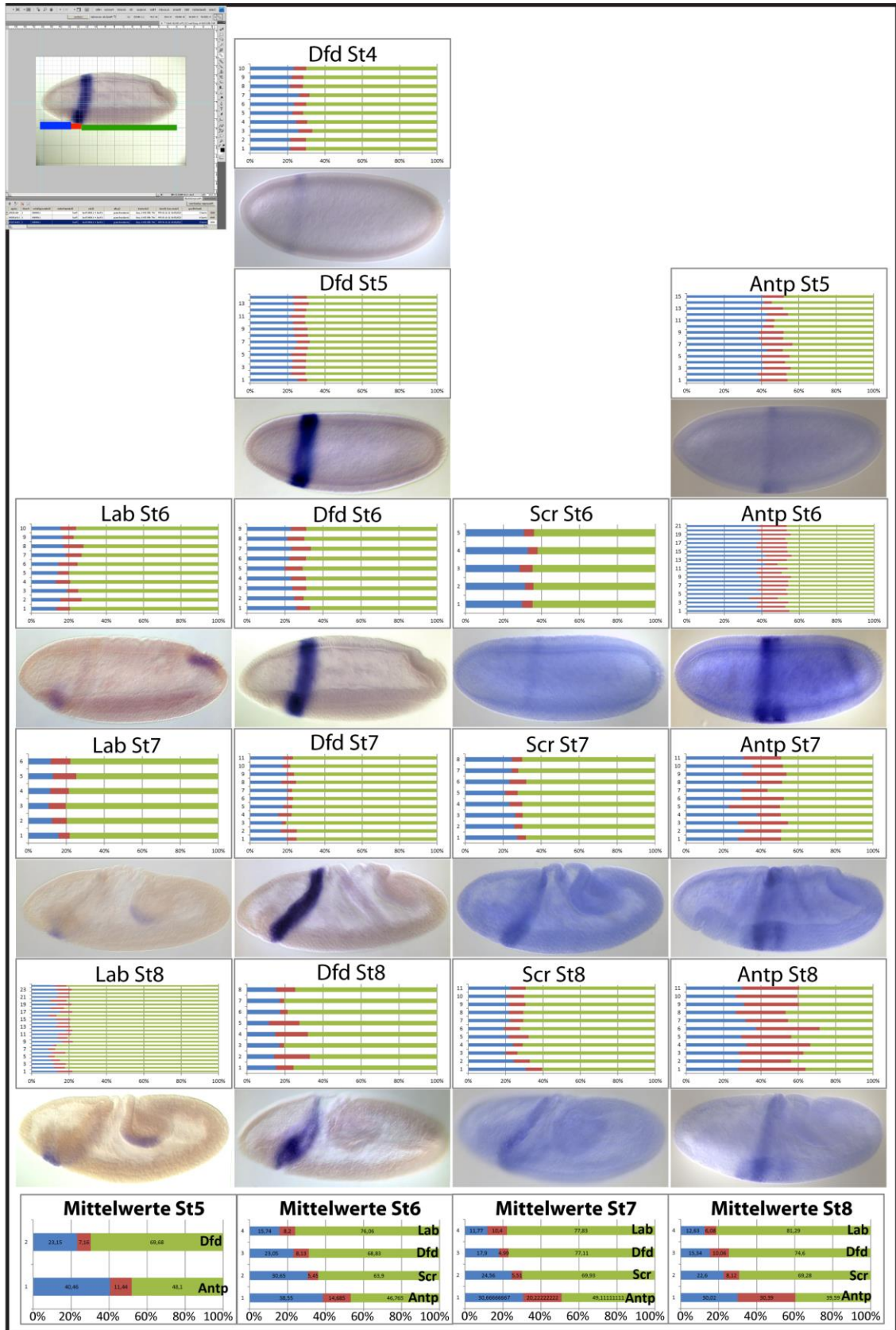


Abb. 3-35: Vermessung der wildtypischen Expressionsdomänen der *Antp*-K Gene im frühen Neuroektoderm.

Mithilfe von Adobe Photoshop wurden Vermessungen der Positionen der Expressionsstreifen der mRNA der *Antp*-K Gene vom anterioren und posterioren Pol des Embryos ausgehend vorgenommen. mRNA Expression von *lab* (Reihe 1), *Dfd* (Reihe 2), *Scr* (Reihe 3) und *Antp* (Reihe 4). Die Expression von *lab* beginnt in St6, *Dfd* in St4, *Scr* in St6 und *Antp* in St5. Die einzelnen Messwerte in den jeweiligen Graphiken stellen in blau den Abstand vom anterioren Pol bis zum anterioren Beginn der Expressionsdomäne dar (vergleiche kleines Fenster oben links). Die Expressionsdomäne selbst wird durch den roten Bereich gekennzeichnet. In grün ist der Abstand von der posterioren Grenze der Expressionsdomäne zum posterioren Ende des Embryos verbildlicht. Je ein Messbalken stellt einen einzelnen Embryo dar. Die Gesamtwerte der Expressionsdomäne eines Hoxgens in den jeweiligen Entwicklungsstadien werden als Mittelwerte (unten) verdeutlicht.

3.4.2.1. Die Expressionsdomäne von *labial* reicht nie in das Neuroektoderm des Maxillarsegments hinein

lab mRNA Expression ist ab St6 von 84% - 76% der Ei-Länge (EL) zu detektieren, im St7 von 88% - 78% und in St8 und St9 reicht sie von 88% bis 80% der EL (Abb. 3-35, erste Spalte). Lab Protein wird ab St7 über Antikörperfärbungen sichtbar. Co-Färbung mit En in diesen Entwicklungsstadien zeigt deutlich, dass die Lab Protein Expressionsdomäne von der ersten Reihe des Tritocerebrums (Tc) bis zum posterioren Bereich des tritocerebralen En Streifens reicht (Abb. 3-36 B; siehe auch Diederich et al., 1989; Merrill et al., 1989).

3.4.2.2. *Deformed* Expression überlappt anterior mit *labial* und posterior mit *Sex combs reduced* Expression

Einige Zellen der anterioren Region des Mandibularsegments exprimieren ab St11 ebenfalls *lab*, wobei sie zeitgleich positiv für *Dfd* sind, was bereits auch von Diederich et al., 1991 beschrieben wurde (Abb. 3-35 Mittelwerte). Der Hauptteil der Expressionsdomänen ist jedoch deutlich voneinander getrennt (vergleiche auch Abb. 3-36 A). Antikörperfärbungen gegen Lab und Dfd gemeinsam mit En zeigen deutlich, dass während der gesamten früheren embryonalen Entwicklung nur diese wenigen Zellen im anterioren Bereich des Mandibularsegments beide Proteine exprimieren. Weiter posterior im Bereich des späteren Maxillarsegments findet sich nie Expression von Lab Protein oder *lab* mRNA (Abb. 3-36 A, B; siehe auch Hoey et al., 1986; Diederich et al., 1989; Merrill et al., 1989; Diederich et al., 1991).

Dfd mRNA wird am frühesten von allen *Antp*-K Genen ab St4 vor der Zellularisierung des Embryos auf Höhe von 77% bis 70% der EL exprimiert (Abb. 3-35 zweite Spalte; siehe auch Chadwick und McGinnis, 1987). Während dem frühen St8 bildet sich die cephalo Furche (Foe, 1989), und große Anteile des gnathalen Gewebes werden in diese Furche invaginiert. *Dfd* Expression findet sich zu diesem Zeitpunkt in einem Ring innerhalb der Furche, was die Vermessung dieser Expressionsdomäne mit der gewählten Methode schwer umsetzbar macht. Zudem findet sich zu diesem Zeitpunkt, verursacht durch die seitliche Vermessung, eine Überlappung der Expressionsdomänen von *Dfd* und *lab* durch die Invagination des *Dfd* exprimierenden Gewebes (*lab*: 88%-78%, *Dfd*: 82%-77%). Die Überlappung lässt sich durch Doppelfärbungen gegen mRNA und Protein beider Faktoren jedoch eindeutig als keine

großflächige Coexpression zeigen, sondern sie ist als ein Artefakt der gewählten Methode zu verstehen (Abb. 3-36 B). Im späteren St8 beginnt auch das weiter anterior zur cephalen Furche gelegene Gewebe des späteren Mandibularsegments Dfd zu exprimieren (Abb. 3-35 und 3-36 B).

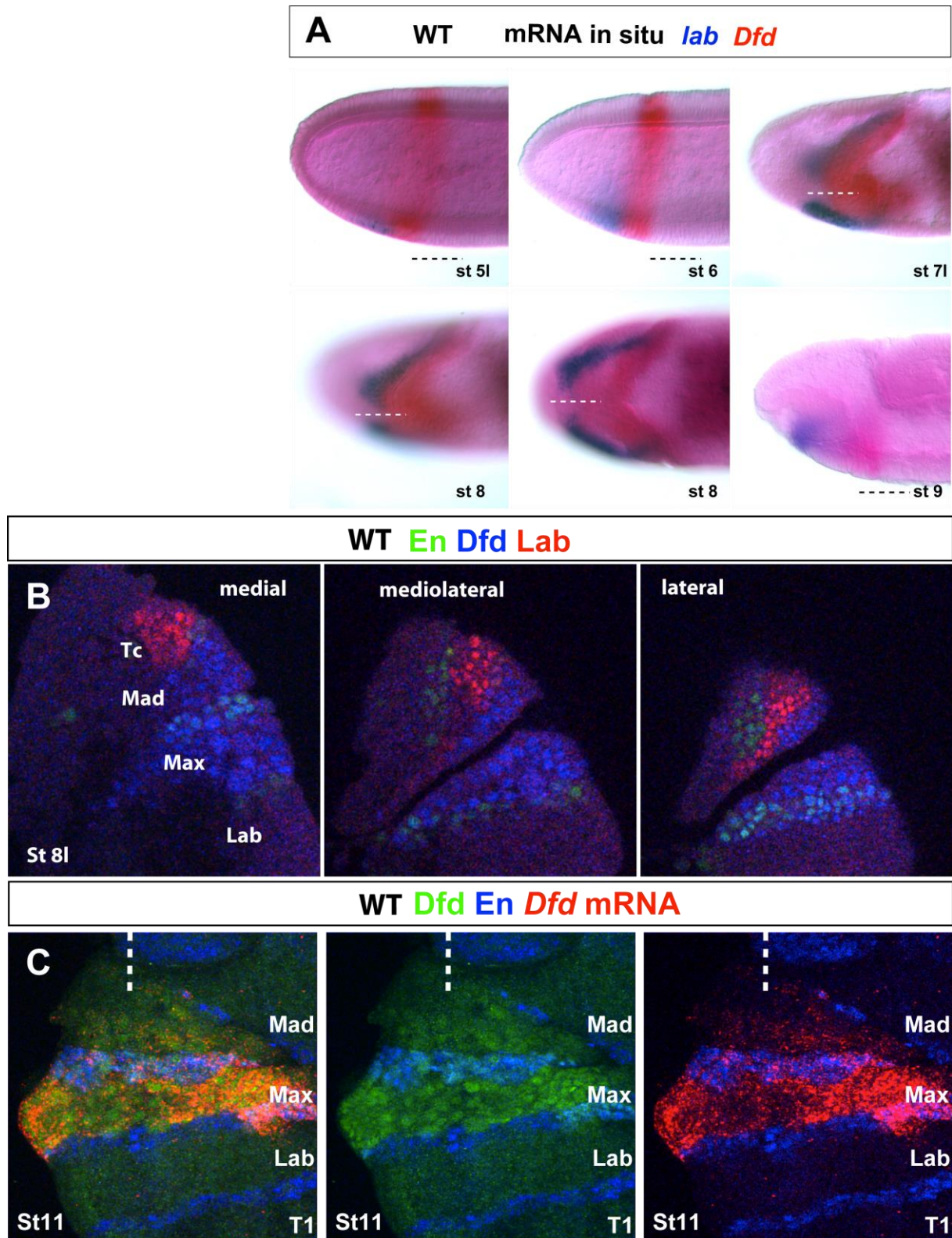


Abb. 3-36.: Wildtypische Expression von *lab* und *Dfd* mRNA und Protein ist weitestgehend voneinander getrennt.

(A) mRNA in situ gegen *lab* (blau) und *Dfd* (rot) im WT in verschiedenen Entwicklungsstadien, die gestrichelte Linie symbolisiert die ventrale Mittellinie des nicht präparierten Embryos, anterior ist links. Die Expressionsdomänen sind immer deutlich voneinander getrennt, erscheinen in St7 und St8 durch die Invagination der Kopffalte bei Lateralaufsicht auf einer Ebene, bei der Ansicht von ventro-lateral können die unterschiedlichen Expressionsdomänen erkannt werden. (B) Verdeutlichung der Überlagerung der Expressionsdomänen. Aufnahme der gnathalen Region eines nicht präparierten Embryos von lateral, anterior ist oben, ventral rechts, mit Antikörperfärbung gegen Lab (rot), Dfd (blau) und En (grün) in verschiedenen Ebenen. Die Expressionsdomänen überlappen durch die Invagination des Gewebes in die cephalen Furche, Coexpression beider Faktoren findet aber nicht weiträumig statt. (C) Antikörperfärbung gegen En (blau), Dfd (grün) und in situ-Hybridisierung gegen *Dfd* mRNA (rot) im WT in St11. Die Expressionsdomänen von mRNA und Protein sind identisch.

Dfd Protein Expression beginnt ab St5 und unterscheidet sich in seiner Expression bis in späte Stadien nicht von der mRNA Expression (Abb. 3-36 C; auch Merrill et al., 1987). Protein und mRNA Expression reichen im Neuroektoderm vom anterioren Bereich des Mandibularsegments bis Reihe sechs des Maxillarsegments. Rolf Urbach und David Jussen konnten darüber hinaus laterale neuroektodermale *Dfd* Expression im anterioren Bereich des Labialsegments finden (Urbach et al., 2016). Vorhergehende Studien über die Verteilung von *Dfd* Transkript fanden hingegen explizit keine Expression innerhalb des maxillaren En Streifens des Neuroektoderms (Martinez-Arias et al., 1987). Antikörperfärbungen von *Dfd* gemeinsam mit *Scr* lassen jedoch eindeutig Coexpression dieser beiden *Antp*-K Gene in Reihe sechs des Maxillarsegments erkennen (vergleiche Abb. 3-24 A; gegenläufig zu Mahaffey et al., 1989). Auch durch die Mittelwerte der Vermessungen wird eine Überlappung der Expressionsdomänen von *Dfd* mit *lab* und von *Dfd* mit *Scr* mRNA deutlich (Abb. 3-35 Mittelwerte). In St7 ergibt sich in den Mittelwerten keine Überlappung der Expression von *Dfd* und *Scr*. Allerdings ist dies wahrscheinlich auf die gewählte Methode der Ermittlung der Expressionsdomänen mit anschließender Bildung des Mittelwerts zurückzuführen. Durch die Invagination des Gewebes in die Kopffalte sind in diesem Stadium die exakten Expressionswerte durch seitliche Ansicht sehr schwer zu ermitteln. Es treten Schwankungen zwischen den Embryonen auf (vergleiche die Einzelwerte), die sich eventuell durch eine größere Anzahl an vermessenen Embryonen minimieren lassen würden.

3.4.2.3. Die Expressionsdomäne von *Sex combs reduced* grenzt im Labialsegment an die *Antennapedia* Expressionsdomäne an

Die Expression von *Scr* mRNA tritt im VNS erstmals im St6 auf 70% - 64% der EL auf, aber Protein Expression beginnt erst relativ spät im frühen St9 (Abb. 3-35 dritte Spalte; siehe auch Riley et al., 1987). Die Expressionsdomäne reicht von Reihe sechs des Maxillarsegments bis Reihe fünf des Labialsegments, die En positiven Zellen des Labialsegments exprimieren kein *Scr* (Abb. 3-37). *Scr* mRNA Expression in St7 reicht bis 69% der EL, wo es ab diesem Stadium direkt von *Antp* Expression abgelöst wird (Abb. 3-35 Mittelwerte).

3.4.2.4. *Antennapedia* Expression findet sich nie anterior des Labialsegments

Die Expression von *Antp* mRNA beginnt ebenfalls im St5 auf 59% - 48% der EL (Abb. 3-35 vierte Spalte). Zusätzliche En Antikörperfärbung verdeutlicht, dass es sich in dieser Region um das zweite

thorakale Segment handelt, welches am frühesten *Antp* exprimiert (nicht gezeigt, siehe auch Carroll et al., 1986a). Wenig später wird ein zweiter dazu anterior gelegener Streifen deutlich, der auf der Grenze zwischen posteriorem labialen und anteriorem ersten thorakalen Segment lokalisiert ist (siehe auch Carroll et al., 1986a). Im späteren Labialsegment wird *Antp* Protein das erste Mal im St6 exprimiert, was die am weitesten nach anterior reichende Expressionsdomäne darstellt (siehe auch Wirz et al., 1986). Dazu noch weiter anterior gelegene Expression, wie die von Wirtz et al., 1986 berichtete Expression im Kopf, konnte mit den hier verwendeten Nachweisverfahren nicht detektiert werden.

3.4.2.5. Proboscipedia wird nicht im NB6-4 exprimiert

pb hat eine spezielle Rolle als Hoxgen, es ist in seiner Expression als von *Dfd* und *Scr* Protein Expression abhängig beschrieben worden und definiert keine segmentale Identität einzelner Segmente (Pultz et al., 1988; Rusch und Kaufman, 2000). *Pb* Protein wird im sich entwickelnden VNS in einzelnen Zellgruppen exprimiert (Pultz et al., 1988). Die Analyse der Expression von *Pb* wurde daher stark eingeschränkt, denn durch die Expression in Zellgruppen war keine Vermessung einer Expressionsdomäne möglich. Mithilfe von Antikörperfärbungen gegen *En* und *Eg* wurde die Expression im Maxillarsegment und im NB6-4 ausgeschlossen (vergleiche auch Abb. 3-25 B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expressionsdomänen der einzelnen Hoxgene bereits sehr früh im sich entwickelnden VNS festgelegt werden und über die gesamte Zeit der früheren embryonalen Entwicklung konsistent in ihrer Abfolge bleiben. Überlappende Expression findet sich im anterioren Mandibularsegment von *lab* und *Dfd* und in Reihe sechs des Maxillarsegments von *Dfd* und *Scr*. Ansonsten werden weder *Lab* noch *Antp* Protein oder mRNA zu irgendeinem Zeitpunkt der Entwicklung im VNS oder im Neuroektoderm des posterioren Maxillarsegments exprimiert, in dem der maxillare NB6-4 gebildet wird.

3.4.3. Die Expressionsdomänen der Hoxgene sind in den Hoxmutanten nur geringfügig verändert

Diese im WT im Detail vorgenommenen Färbungen gegen Protein und mRNA wurden, kombiniert mit *En* Antikörperfärbung, in allen Hox Einzel- und Doppelmутanten wiederholt, um Abweichungen zur wildtypischen Expression erkennen zu können. Es wäre möglich, dass bei Funktionsverlust eines oder zweier *Antp*-K Gene andere Hoxgene die jeweiligen Expressionsdomänen einnehmen und darüber segmentale Identität verändern.

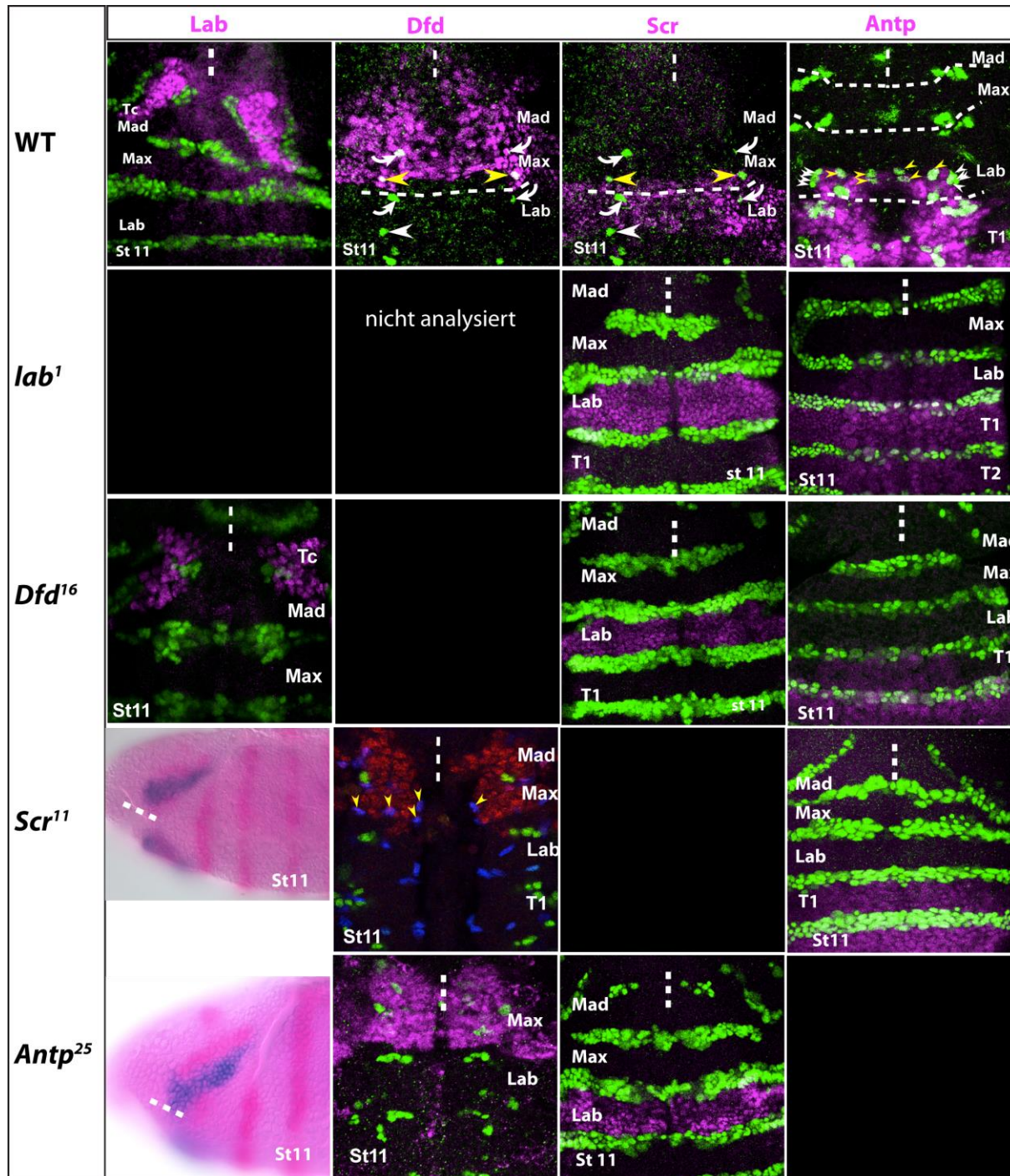


Abb. 3-37: Expressionsdomänen der jeweiligen *Antp*-K Gene bleiben bei Hoxgen-Funktionsverlust im Wesentlichen in ihren wildtypischen Grenzen erhalten.

Antikörperfärbung gegen Lab, Dfd, Scr und Antp (magenta) mit Antikörperfärbung gegen En (grün) oder Eg (grün), oder in situ Hybridisierung (blau, gegen *lab* mRNA in *Scr¹¹* und *Antp²⁵* mit gleichzeitiger Antikörperfärbung gegen En in magenta) im WT (Spalte 1) und in *lab* (Spalte 2), *Dfd* (Spalte 3), *Scr* (Spalte 4) und *Antp* (Spalte 5) Mutanten im St11. Die Expressionsdomänen bleiben im Wesentlichen unverändert gegenüber der wildtypischen Expression.

Die Expressionsdomänen der *Antp*-K Gene im VNS verändern sich weitestgehend nicht, wenn ein oder zwei Faktoren als Funktionsverlustmutation vorliegen (Abb. 3-37). Es gibt jedoch zwei Ausnahmen, in denen sich in wenigen Zellen die Expression der angrenzend exprimierten Gene im Vergleich zum WT verändert. Eine Ausnahme ist im Vergleich zu der wildtypischen Expression von *Scr* (vergleiche Abb. 3-24) die Expression von *Scr* Protein in *Dfd* Mutanten im NB6-4max. *Scr* Protein ist mit Antikörperfärbungen nicht, oder in einigen wenigen Fällen nur sehr schwach, im Neuroblasten oder in seinen Nachkommenzellen nachweisbar (Abb. 3-38 A). *Scr* mRNA wird hingegen weiterhin wildtypisch exprimiert (Abb. 3-38 B). Die Expression von *Dfd* Protein in *Scr* Mutanten ist ebenfalls unverändert (Abb. 3-38 C).

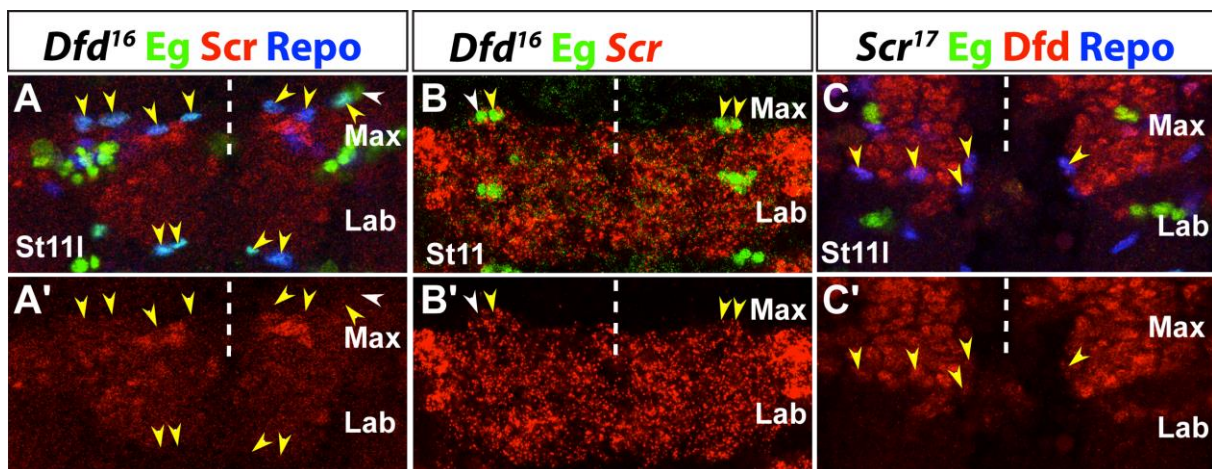


Abb. 3-38: Expression von *Scr* oder *Dfd* Protein und *Scr* mRNA in *Dfd*¹⁶ oder *Scr*¹⁷ Mutanten.

(A) Antikörperfärbung in St 111 in *Dfd*¹⁶ Mutanten gegen *Scr* Protein (rot) im NB6-4max verdeutlicht fehlende *Scr* Proteineexpression in NB6-4 Nachkommenzellen, (A') Einzelkanal der *Scr* Protein Expression. (B) *Scr* mRNA wird weiterhin wildtypisch in den NB6-4 Nachkommenzellen exprimiert, (B') Einzelkanal der *Scr* mRNA Expression. (C) *Dfd* Expression hingegen ist in *Scr*¹⁷ Mutanten unverändert zum WT, (C') Einzelkanal der *Dfd* Protein Expression.

Eine zweite Ausnahme bildet die Expression von *Lab* in *Dfd* Mutanten. Im WT ist *Lab* bis zur posterioren Grenze des Tc exprimiert. In wenigen Zellen im anterioren Mandibularsegment findet sich zusätzlich Coexpression von *Lab* und *Dfd* (vergleiche Abb. 3-36; bereits beschrieben von Diederich et al., 1991). In *Dfd* Mutanten ist die Expression von *Lab* im Mandibularsegment insbesondere in lateralen Regionen nach weiter posterior hin ausgeweitet (Abb. 3-37). Diese ektopische Expression konnte erst ab St11 beobachtet werden, in früheren Stadien ist die Expressionsgrenze in Richtung Mandibularsegment wildtypisch. Die Expression beschränkt sich jedoch weiterhin auf eine sehr anteriore mandibulare Expressionsdomäne und erreicht zu keinem Zeitpunkt das Maxillarsegment.

3.4.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.4.

Weder im WT noch in *Antp*-K Mutanten wird zu irgendeinem Zeitpunkt Lab oder Antp Protein oder mRNA im Bereich des Maxillarsegments exprimiert. Die Expressionsdomänen der einzelnen *Antp*-K Gene sind sehr klar abgegrenzt und verändern sich über den Zeitraum der frühen Embryonalentwicklung nur wenig. Ihre Relation zueinander bleibt bestehen. Die Grenzen der wildtypischen Expressionsdomänen werden nicht durch die angrenzenden Hoxgene reguliert.

Daher kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass die transformationssteigernde Wirkung von zusätzlichem Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* auf NB6-4max durch direkte zellautonome Funktion dieser Faktoren zustande kommt. Es ist somit wahrscheinlich, dass durch die Funktionen der *Antp*-K Gene weitere Faktoren beeinflusst werden, die für die segmentale Identität von NB6-4max entscheidende Funktionen besitzen.

3.5. An der Entstehung maxillarer Identität des NB6-4 müssen weitere Faktoren beteiligt sein

3.5.1. Entwicklung der Arbeitshypothese

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde die Suche nach einem oder mehreren beteiligten Interaktionspartnern der *Antp*-K Gene begonnen. Diese Faktoren müssten verschiedene Bedingungen erfüllen:

Sie müssten durch die *Antp*-K Gene *lab* oder *Antp* direkt oder indirekt positiv oder negativ reguliert sein. Weiterhin könnten sie in gleicher Weise durch *Dfd* beeinflussbar sein, da die Abwesenheit von *lab* oder *Antp* gemeinsam mit *Dfd* eine Steigerung der Transformationsrate hervorruft. Durch *Scr* hingegen müssten sie in genau entgegengesetzter Weise zu *Dfd* reguliert sein, da die Abwesenheit der Funktion von *Scr* zusammen mit *Dfd* eine Verminderung der Transformation des NB6-4max hervorruft.

Die gesuchten Interaktionsfaktoren müssten vermutlich einem Signalweg angehören, oder sezernierte Faktoren sein, da die Effekte im maxillaren NB6-4 auftreten, obwohl hier niemals messbare Expression von *lab* oder *Antp* vorhanden ist.

Weiterhin sollte der Funktionsverlust dieser gesuchten Faktoren einen Effekt auf die segmentale Identität des NB6-4max haben. Der Doppelfunktionsverlust dieser Faktoren gemeinsam mit *Dfd* müsste ebenfalls eine Transformationssteigerung gegenüber den Einzelmutationsraten hervorrufen, im Idealfall in annähernd 100%.

Schließlich könnte die Expression dieser Faktoren in *Antp*-K Mutanten verändert sein, oder aber sich die Expression der *Antp*-K Gene verändern, wenn die Funktionen dieser Faktoren fehlen.

3.5.2. Ein Miniscreen für potentielle *Antennapedia*-Komplex Gen Interaktionspartner

Zunächst wurden Ansätze entwickelt, um aus der unübersichtlichen Fülle möglicher Kandidaten in Frage kommende Faktoren auszuwählen. Durch drei verschiedene Ansätze wurden zunächst 77 Kandidaten eingegrenzt.

Im ersten Ansatz wurden Gene, die auf Chromosom 3R zwischen den *Antp*-K Genen lokalisiert sind, sowie einige sich in der Nähe der *Antp*-K Region befindende Gene ausgewählt (Tab. 3.1.). Hier lag die Spekulation zugrunde, dass innerhalb der Evolution eventuell Gene mit ähnlicher oder sich gegenseitig beeinflussender Funktion auseinander hervor gegangen sein könnten und nun miteinander benachbart ähnliche Vorgänge regulieren.

Tab. 3-1.: Kandidaten von Chromosom 3.

Als Kandidaten, die innerhalb des *Antp*-K lokalisiert sind, wurden *Ama*, *Zen* und *Ftz* ausgewählt. Weitere in der Region, jedoch nicht innerhalb des *Antp*-K liegende Gene wurden aufgrund ihrer bereits bekannten Funktionen als Kandidaten eingestuft.

Gename	Lokalisation auf Chr3 und Auswahlkriterium	Referenz
Alhambra	Chr3R, ausserhalb des <i>Antp</i> -K. Interaktion mit <i>Ubx</i> (Pallavi et al., 2006).	(Bahri et al., 2001; Perrin und Dura, 2004)
Amalgam	Innerhalb des <i>Antp</i> -K, benachbart zu <i>bcd</i> . Sezerniertes Molekül, exprimiert im VNS.	(Seeger et al., 1988)
Fushi tarazzu	Innerhalb des <i>Antp</i> -K, zwischen <i>Scr</i> und <i>Antp</i> . Enhancer-Elemente werden mit <i>Scr</i> geteilt.	Beispielsweise (Calhoun et al., 2002)
Grappa	Chr3R, ausserhalb des <i>Antp</i> -K. Interaktion mit <i>AbdB</i> .	(Shanower et al., 2005)
Humpty dumpty	Ch3R, ausserhalb des <i>Antp</i> -K. Involviert in Zellzykluskontrolle.	(Bandura et al., 2005)
Sas4	Ch3R, ausserhalb des <i>Antp</i> -K. Involviert in asymmetrische Zellteilung von Stammzellen.	(Stevens et al., 2007)
Zerknüllt	Innerhalb des <i>Antp</i> -K, benachbart zu <i>bcd</i> .	Beispielsweise (Doyle et al., 1986)

Der zweite Ansatz war eine Auswahl von bereits durch andere Labore gefundene Hox Interaktoren über durchgeführte Screens (Leemans et al., 2001; Hueber et al., 2007). Da sowohl der Funktionsverlust von *Dfd* und *Scr*, als auch von *lab* und *Antp* in Kombination mit *Dfd* oder *Scr* Auswirkungen auf den maxillaren NB6-4 haben, wurden zunächst sämtliche, auf ein oder mehrere der *Antp*-K Gene reagierende Zielgene ausgewählt (Tab. 3.2. und Tab. 3.3.).

Tab. 3-2.: Kandidaten aus dem Screen von Hueber et al., 2007.

Ausgewählt wurden Kandidaten, die auf Einwirkung von mindestens zwei *Antp*-K Genen mit veränderter Expression reagieren. Dabei werden die Abkürzungen „d“ für „downregulation“ (für verminderte Expression) und „u“ für „upregulation“ (für gesteigerte Expression) verwendet. Beispielsweise reagiert der erste Kandidat, CG8827 bei Expression von *Dfd*, *Scr*, *Antp* und *abdA* mit „upregulation“ der Expression, ist somit von diesen vier Hox Genen positiv reguliert.

CG	Gename	Regulation durch Hox	Wirkungsfeld/Expression
Dfd induziert gesteigerte Expression			
CG8827	Ance	Dfd u Scr u Antp u abdA	Kopfentwicklung

CG8556	Rac2	Dfdu Antpu	Glia
CG15731		Dfdu Antpu AbdBd	Expression im VNS in St 7, St13 segmentales Muster
CG5080		Dfdu Scru	Glia
CG13323		Dfdu Scru abdAd	nichts bekannt
CG6018		Dfdu Antpu andBu	Zellzyklus Kontrolle
CG 9083		Dfdu Antpu AbdAd	nichts bekannt
CG9358		Dfdu Antpu Ubxu	AP-Achsendetermination
CG10078		Dfdu Antpu Ubxd abdAd abdBd	evtl. Trx-respond Element
CG13701	sickle	Dfdu Scru Ubxu abdBu	Zelltod
CG6783		Dfdu Antpu Ubxu abdBu	Glia
CG3132		Dfdu Antpu abdAd	Pc und Trx

Dfd induziert reduzierte Expression

CG5779		Dfdd Antpd Ubxd abdAd	Glia
CG4722	big brain	Dfdd Antpd	VNS Entwicklung
CG3839	lethal of scute	Dfdd Antpd Ubxd abdAd AbdBd	VNS Entwicklung
CG11205		Dfdd Antpd Ubxd	Glia
CG17579	Sca	Dfdd Antpd abdAd abdBd	VNS
CG31034	jonah	Dfdd Scrd alled	Zellzyklus
CG3429	swallow	Dfdd Scrd abdAu	AP-Achsendetermination
CG4889	wingless	Dfdd Antpd abdBd	bekannt
CG1322	zfh1	Dfdd Scrd Ubxd	bekannt
CG8975		Dfdd Antpd Ubxd	Exprimiert im VNS
CG4193	deadhead	Dfdd Scrd Ubxd	Kopfentwicklung
CG10895		Dfdd Antpd	Zellzyklus
CG8363		alled	Glia
CG4501	bubblegum	Dfdd abdAd abdBd	VNS Expression
CG3097		Dfdd Antpd Ubxd abdAd	VNS
CG4880		Dfdd Scrd Antpu abdAu	nichts bekannt
CG6634	mid	Dfdd Antpd abdBd	ZNS NBs Mittellinie, NB2-4 und NB1-1
CG7840		Dfdd Scrd	nichts bekannt

CG3773		Dfdd Scrd abdAu	nichts bekannt
CG1707		Dfdd Scrd	nichts bekannt
CG8193		alle d	Glia
CG12052	lola	Dfdd Scrd Antpd	ZNS
CG13159		Dfdd Antpd Ubxd abdAd AbdbBd	gnathal
CG8589		Dfdd Scrd Ubxd abdAu	nichts bekannt
CG14478		Dfdd Scrd Antpd	nicht viel bekannt
CG13427		Dfdd Antpu Ubxu abdAd	nichts bekannt
CG9184		Dfdd Antpd Ubxd abdAu AbdBd	VNS St 11-12
CG7465		Dfdd Scrd abdAu	Zellzyklus
CG10591		Dfdd Antpd Ubxd abdAu abdBd	VNS
CG31549		Dfdd Scrd	nichts bekannt
CG8116		Dfdd Scrd abdAu	nichts bekannt
CG6725		Dfdd Antpd abdBd	VNS Expression
CG18594		alle d	nichts bekannt
CG6733		alle d	nicht bekannt außer Proteindimerisierung
CG6478	TweedleB	Dfdd Scrd Ubxu abdABd	Späte segmentale Expression
CG12063		Dfdd Scrd abdAd	wnt signalling pathway
CG1546		Dfdd Scru Antpd	Expression im Max
CG13064		Dfdd Antpu Ubxu AbdBu	nichts bekannt
CG4440		Dfdd Antpd Ubxd AbdBd	VNS Expression

Scr inzudiert gesteigerte Expression

CG33121		Scru Antpu	nichts bekannt
CG5773		Scru Antpu Ubxu	nichts bekannt,
CG5765		Scru Antpd abdAd AbdBd	nichts bekannt
CG3396	ocho	Scru Antpu abdAd AbdBd	Notch-Signalweg, reagiert auf Ubx

Scr induziert reduzierte Expression

CG1034	bcd	Scrd Antpu abdAu	bekannt
CG12117		Scrd Antpu abdAu	Nichts bekannt
CG3457		Scrd Antpu	nichts bekannt

CG10287	Scrd Antpu	Flügelimaginalscheibe, nicht viel bekannt
CG1927	Scrd Antpu	nichts bekannt
CG12787	hoeppel Scrd Antpu abdAu	Nicht viel bekannt
CG15893	Scrd Antpd Ubx	Nichts bekannt
CG2962	Scrd Antpu Ubxu AbdBu	nichts bekannt
CG12047	mud Scrd Antpd abdAu	adult ZNS
CG7384	Scrd Antpu abdAu	nichts bekannt
CG2064	Scrd Antpd Ubx abdAd AbdBd	nichts bekannt Expression im VNS?
CG7970	Scrd Antpu	

Tab. 3-3.: Kandidaten aus dem Screen von Leemans et al., 2001.

Drei ausgewählte Kandidaten aus dem Screen von (Leemans et al., 2001) reagieren alle auf die Expression von *labial* mit verminderter Expression. Sie gehören Signalwegen an oder sind sezernierte Faktoren und könnten bei veränderter *labial* Expression ein Signal aus der *labial* Expressionsdomäne abweichend als im WT weiterleiten.

Genname	Regulation	Wirkungsfeld
Glass-bottom-boat	Lab d	Sezernierter Faktor
M-Spondin	Lab d	Sezernierter Faktor
Neurotactin	Lab d	Rezeptor

Der dritte Ansatz umfasst einige der aus der Literatur bereits bekannten Interaktionspartner und Zielgene von *Antp*-K Genen (Tab. 3.4.).

Tab. 3-4.: Auswahl bekannter Kofaktoren von Hoxgenen.

Genname	Regulation	Referenz
Disconnected	Vermittlung segmentaler Identität der gnathalen Segmente; Interaktion mit Dfd	(Mahaffey et al., 2001; Robertson et al., 2002)
Extradenticle	Kofaktor von Hoxgenen, Interaktion mit Dfd, lab Scr und Antp	(Peifer und Wieschaus, 1990; Mann und Chan,

Ergebnisse

	Veränderung der segmentalen Identität	1996; Pinsonneault et al., 1997; Florence und McGinnis, 1998; Ryoo und Mann, 1999; Prince et al., 2008)
Homothorax	Kofaktor verschiedener Hoxgene, Interaktion mit Exd, Tsh und CycE	(Kurant et al., 1998; Abu-Shaar et al., 1999; Ryoo und Mann, 1999; Yao et al., 1999; Brumby et al., 2002; Brumby et al., 2004)
Teashirt	Spezifizierung von segmentaler Identität Interaktion mit Antp	(Fasano et al., 1991; Roder et al., 1992; Laugier et al., 2005)
Tip Top	Homologes und Interaktions-Partner von Tsh	(Laugier et al., 2005)

Die Kandidaten wurden aus diesen drei Ansätzen rekrutiert, im Weiteren jedoch nicht getrennt voneinander behandelt. Die verschiedenen Ansätze erklären nur die getroffene Auswahl, die daraus gewählten Faktoren müssen jedoch dieselben Bedingungen erfüllen.

Die weitere Eingrenzung von den so ausgewählten Faktoren wurde durch rein praktische Gründe gesteuert. Da bei der Kandidatensuche neben bisher schon bekannten Genen auch eine große Anzahl an bisher nicht oder nur wenig untersuchten Faktoren gefunden wurde, wurden aus der relativ großen Auswahl nur Kandidaten weiter untersucht, für die entweder RNAi Linien (Kennerdell und Carthew, 1998; Brown et al., 1999; Misquitta und Paterson, 1999) oder Mutanten erhältlich waren. Denn die Analyse des mutanten Phänotyps ist ein entscheidendes Kriterium. Diese so eingegrenzten Kandidaten wurden dann auf der in situ Datenbank BDGP (Adams et al., 2000), die für viele Gene das Expressionsmuster der mRNA auflistet, auf Expression im ventralen Nervensystem überprüft. Expression im VNS, möglichst in den Bereichen der Expression der *Antp*-K Gene, erschien als notwendig für die Verursachung eines Phänotyps im maxillaren NB6-4. Es wurden anschließend mRNA Sonden gegen die entsprechenden Transkripte dieser Kandidatengene hergestellt und deren Expression auf mRNA und Proteinebene (sofern Antikörper erhältlich waren) zwischen WT und *Antp*-K Mutanten verglichen.

Teilweise wurden die Analyse des mutanten Phänotyps und die Untersuchung der Expressionsmuster zeitgleich durchgeführt. Die wichtigste Frage lautete: gibt es in den Funktionsverlust-Mutanten dieser Kandidaten Auswirkungen auf die segmentale Identität des NB6-4, insbesondere des NB6-4max?

3.6. Funktionsverlust der meisten Kandidaten verursacht keinen NB6-4 Phänotyp

Um eine Übersicht über den möglichen Einfluss der Kandidatengene auf den NB6-4 zu bekommen, wurde zunächst in allen Segmenten auf eine Veränderung der Zelllinien des NB6-4 in den mutanten Hintergründen geachtet. Das Hauptaugenmerk lag jedoch auf dem NB6-4 des Maxillarsegments, die zusätzlichen Beobachtungen in anderen Segmenten sollten zu einer besseren Vergleichbarkeit und internen Kontrolle der Daten dienen. Die meisten der ausgewählten Kandidaten verursachen keinen NB6-4 Phänotyp (Tab. 3.5.).

Tab. 3-5.: Genauer untersuchte Kandidaten ohne NB6-4 Phänotyp.

Die Auswirkungen auf NB6-4 bei Funktionsverlust der Kandidaten und die Analyse der Expressionsdomänen der Kandidaten wurden teilweise parallel durchgeführt. Wenn sich ein Kandidat in der Mutantenanalyse als nicht weiter relevant herausstellte, wurde das Expressionsmuster nicht weiter untersucht.

Funktionsverlust von Kandidat	Auswertung Phänotyp NB6-4 bei Funktionsverlust von Kandidat	Auswertung des Expressionsmusters Protein oder mRNA
Alhambra	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	starke Protein-Expression im VNS in nahezu allen Zellen, auch im NB6-4
Bicoid	Zu starke Beeinträchtigung der Embryonen, NB6-4 nicht ansprechbar	Keine mRNA Expression gnathal, keine Veränderung in <i>Dfd</i> Mutanten
Bigbrain	Nicht ausgewertet	Protein-Expression im gesamten VNS
Decapentaplegic	Embryonen zu stark geschädigt, NB6-4 nicht ansprechbar	Nicht analysiert
Fushi tarazzu	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	Nicht analysiert
Glass-bottom-boat	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	Nicht analysiert
Grappa	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	Nicht analysiert
Headcase	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	Protein-Expression in definierten Zellclustern als zytoplasmatische Färbung im VNS ab St11, keine Eg positiven Zelllinien außer NB2-4 Nachkommen in T und A
Longitudinals lacking	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	Expression der mRNA im VNS in allen Segmenten. Exprimiert in Neuroblasten selbst, auch im NB6-4max. Im WT weder in Neuronen noch in Glia des NB6-4
M-spondin	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	Nicht analysiert

Ergebnisse

Sas4	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten über RNAi	Nicht analysiert
Sickle	Nicht ausgewertet	mRNA in einzelnen Zellclustern, nicht NB6-4
Zerknüllt	Embryonen zu stark geschädigt, NB6-4 nicht ansprechbar	Nicht analysiert
Zfh1	Keine Veränderung der segmentalen Identitäten	Protein-Expression in Zellgruppen, nicht im NB6-4

Nachdem bei einigen der untersuchten Kandidaten positive Ergebnisse auf ihren Einfluss auf die segmentale Identität des NB6-4 gefunden wurden, wurden die weiteren verbliebenen Kandidaten nicht mehr weiter ausführlich untersucht (siehe Kapitel 3.7. und folgende). Im Folgenden werden die näher untersuchten Faktoren vorgestellt.

3.7. Vorstellung der Kandidaten, deren Funktionsverlust Veränderungen der segmentalen Identität des NB6-4 in unterschiedlichen Segmenten hervorrufen.

3.7.1. Der NB6-4 ist in *wingless* Mutanten verändert

Für *wingless* (*wg*) wurde bereits eine Interaktion mit *Dfd* gezeigt (Stobe et al., 2009). Auswirkungen auf den NB6-4 über *wg* Funktion sind ebenfalls bereits bekannt (Matsuzaki und Saigo, 1996; Deshpande et al., 2001). Matsuzaki und Saigo konnten in dem von ihnen verwendeten *wg* Allel *wg^{IL}* (hitzesensitives amorphes Allel; Couso und Martinez Arias, 1994) einen 100%igen Verlust von NB6-4 feststellen (Matsuzaki und Saigo 1996). Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen NB6-4 Phänotypen in den verwendeten *wg* Allelen *wg^{CX4}* (Funktionsverlust Allel; Neumann und Cohen, 1996) und *wg^{I-8}* (Abb. 3-39 A-C; amorphes Allel; Peifer et al., 1991) sind jedoch sehr divers. Innerhalb eines Embryos treten in verschiedenen Segmenten unterschiedliche Effekte auf. Das Spektrum der Phänotypen reicht jedoch weiterhin von dem bereits beschriebenen Verlust des NB6-4 (Abb. 3-39 B), bis hin zu starker Überproliferation verschiedener Eg positiver Zellstammbäume und dem Verwischen von klaren segmentalen Identitäten (3-39 B, C). In den Fällen, in denen der maxillare NB6-4 sicher in seiner Identität zu bestimmen ist, können hier und auch in abdominalen Segmenten teilweise ektopische NB6-4 Neurone beobachtet werden (Abb. 3-39 A, C).

Daraufhin wurde versucht, die Expression von Wg im NB6-4max genauer zu analysieren und mit Hoxmutanten zu vergleichen. Da Wg ein sezerniertes Protein ist und sich das Expressionsmuster sehr dynamisch verändert, war die Analyse der Expression sehr schwierig. Im WT konnte keine Expression in St11 oder St12 im NB6-4 detektiert werden. Die Expression ist aber insgesamt so schlecht zu erfassen, dass aus dieser Expressionsanalyse leider keine Aussage getroffen werden kann. In St13 ist Wg Protein detektierbar, jedoch nicht im NB6-4 (Abb. 3-39 D). In *Dfd* Mutanten ist Wg Expression insgesamt verringert (Abb. 3-39 E). Für eine bessere Analyse der Expression in NB6-4 wurde eine *wg-lacZ* Linie zu Hilfe genommen, deren kernständig lokalisierte lacZ Expression im *wg* Muster nicht den sezernierenden Prozessen unterworfen ist, wie das Wg Protein. Hier ist in St11 und auch in späteren Stadien Wg Expression über β Gal Färbung detektierbar, allerdings nicht im NB6-4 (Abb. 3-39 F).

Eine Statistik und weitere Untersuchung des *wg* Funktionsverlust-Phänotyps wurden nicht weiter verfolgt, da die Anzahl an sicher bestimmbareren NB6-4max zu gering ist und die Diversität der Phänotypen Probleme für eine eindeutige Zuordnung birgt.

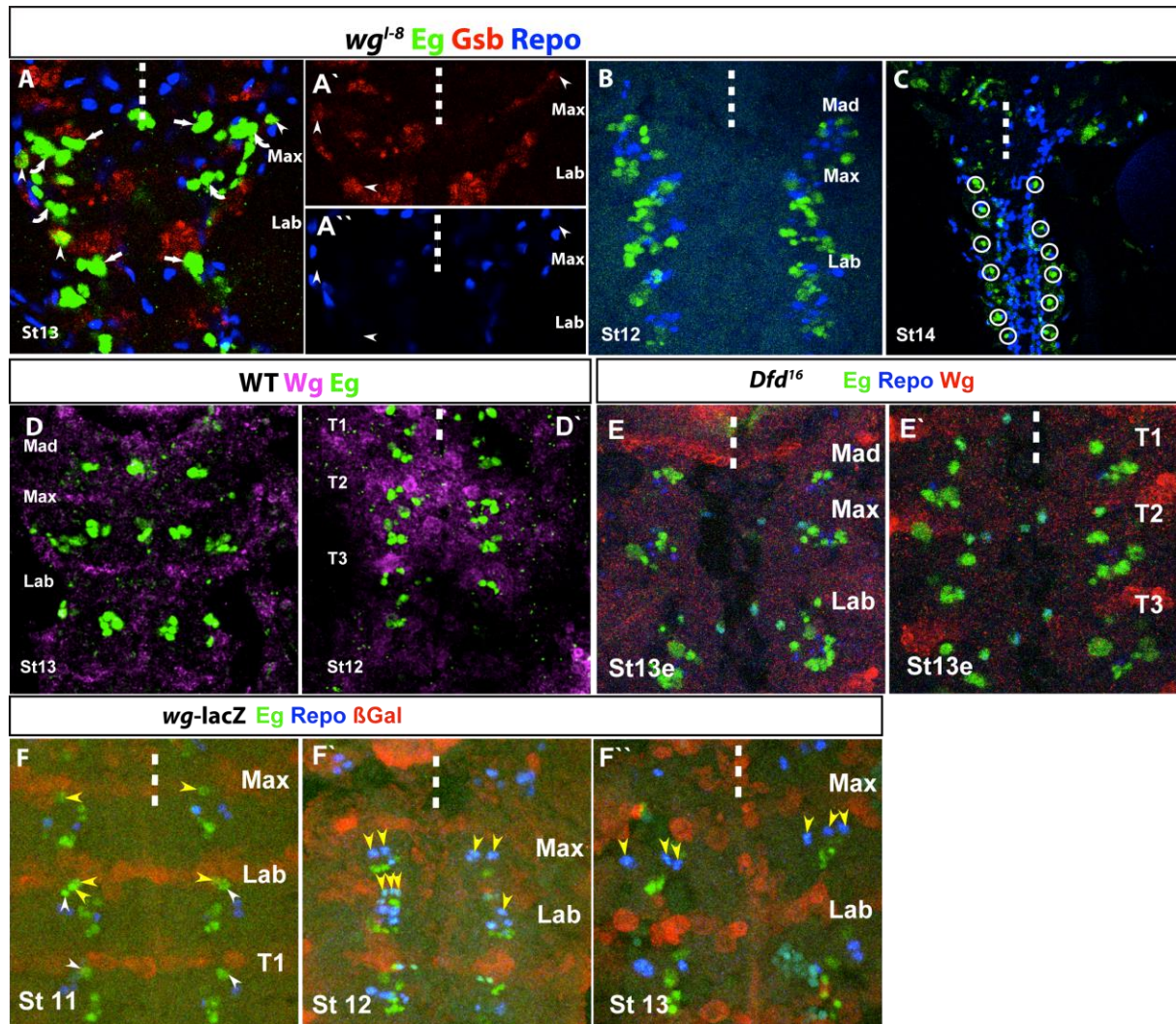


Abb. 3-39: Auswirkungen von *wg* Funktionsverlust auf NB6-4max.

Mit Hilfe von Eg (grün), Gsb (rot) und Repo (blau) Antikörperfärbungen werden sehr diverse Auswirkungen auf die segmentale Identität von NB6-4max bei Funktionsverlust von Wg deutlich. (A) In einigen Embryonen bilden sich ektopische Neurone des NB6-4max, hier in beiden maxillaren Hemisegmenten (gekennzeichnet über den Pfeilkopf). (A' und A'') Ausschnitt aus (A) mit Einzelkanälen zur Identifikation der ektopischen maxillaren NB6-4 Neurone. (B) In einigen Embryonen ist das Expressionsmuster von Eg bereits in St12 sehr unübersichtlich, eine Zuordnung der Eg positiven Zellen zu einzelnen Zelllinien ist nicht möglich. (C) Ektopische Neurone des NB6-4 entstehen auch in Segmenten des Abdomens, hier in einem St14 Embryo (weiße Umkreisungen), einzelne Segmentgrenzen sind nicht deutlich zu erkennen. (D) Wildtypische Expression von Wg Protein (magenta) und Eg (grün) in den gnathalen Segmenten in St13 und (D') in den thorakalen Segmenten. Wg ist nicht in Nachkommenzellen des NB6-4 exprimiert. (E) In *Dfd* Mutanten ist die Expression von Wg (rot) im Vergleich zum WT insgesamt verringert. (F) β Gal Expression (rot) im Expressionsmuster von Wg im *wg-lacZ* Stamm im St11, gemeinsam mit Antikörperfärbungen gegen Eg (grün) und Repo (blau). NB6-4 exprimiert kein Wg. Auch in späteren Stadien (F' und F'') ist keine Wg Expression in Zellen des NB6-4 sichtbar.

3.7.2. Funktionsverlust von *humpty dumpty* verursacht einen NB6-4 Phänotyp

Ein weiterer Kandidat, *humpty dumpty* (*hd*, Bandura 2005) ist auf dem rechten Arm des Chromosom 3 (Chr3R), allerdings nicht innerhalb des *Antp*-K, lokalisiert. Bisher ist über *hd* nicht viel bekannt. Es

existiert eine Beschreibung des mRNA in situ Musters über die Datenbank BDGP, die Expression im VNS angibt. *hd* kam für dieses Projekt zudem in die nähere Auswahl, da es eine Rolle im Zellzyklus im Übergang von S zu G1 Phase spielt (Bandura et al., 2005) und somit auf CycE wirken könnte.

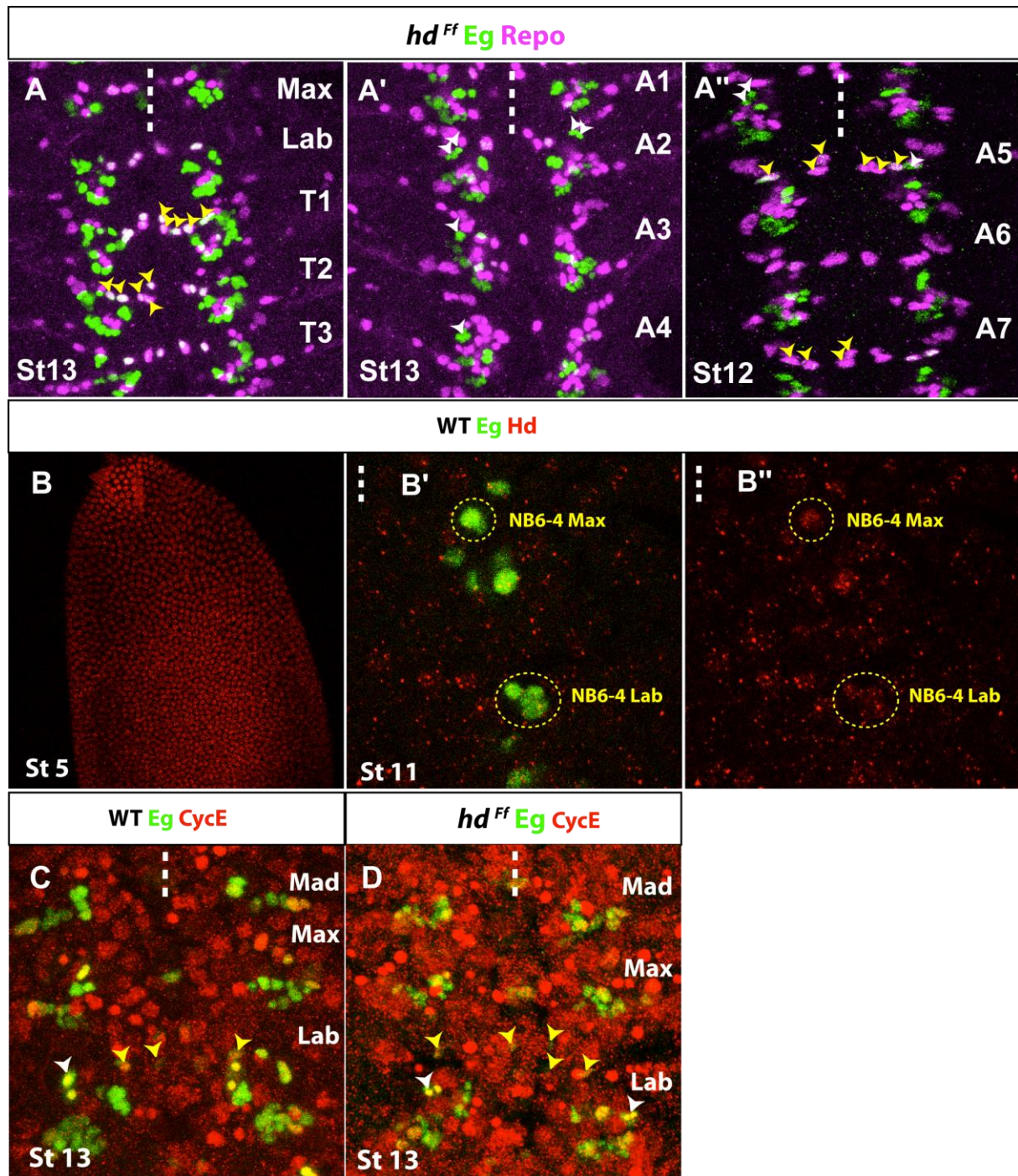


Abb. 3-40: Wildtypische Expression von Hd und Phänotyp von Funktionsverlust von *hd* auf NB6-4.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (magenta). In *hd^{Ff}* Funktionsverlustmutanten wird eine gesteigerte Anzahl an NB6-4 Glia in allen Segmenten gebildet. In abdominalen Segmenten treten zudem ektopische NB6-4 Neurone auf (A', A''). (B) Hd Protein ist über Antikörperfärbungen bereits in St5 nachweisbar. Es wird sowohl im delaminierenden NB6-4 als auch in seinen glialen und neuronalen Zellen exprimiert (B', B''). (C, D) Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und CycE (rot) im WT und in *Hd^{Ff}*. Proteineexpression von CycE ist

sehr dynamisch und findet sich sowohl in NB6-4 Glia als auch in NB6-4 Neuronen im WT und in *hd^{Ff}*. In *hd^{Ff}* entsteht der Eindruck, dass die CycE Proteinmenge im Vergleich zum WT leicht verstärkt sein könnte.

CycE wurde als Schlüsselgen für die Entstehung von NB6-4 Neuronen gefunden (Berger et al., 2005). Sollte Dfd oder eines der anderen *Antp*-K Gene auf *hd* wirken und damit eine Veränderung beispielsweise der Konzentration von CycE hervorrufen, könnte die Entstehung von ektoptischen Neuronen des NB6-4 evtl. darüber erklärbar werden.

In Funktionsverlustmutanten mit dem Allel *hd^{Ff}* entstehen ektoptische NB6-4 Neurone im Abdomen und die Gliaanzahl ist in allen Segmenten stark erhöht (Abb. 3-40 A). Dieser Phänotyp erinnert stark an ektoptische Expression von *CycE* im abdominalen NB6-4 (Berger et al., 2005). Interessanterweise ist die Spezifizierung des maxillaren NB6-4 nicht verändert, es entstehen hier keine Neurone. Antikörperfärbung gegen Hd Protein verdeutlicht, dass Hd im WT bereits sehr früh exprimiert wird und in den Zellen des NB6-4 sowohl in Glia als auch Neuronen vorhanden ist (Abb. 3-40 B). Somit besteht vermutlich kein Unterschied für die Spezifizierung in gliales oder neuronales Schicksal durch Hd direkt.

Bisher wurde jedoch beschrieben, dass beim Verlust von Hd Funktion verringerte Zellzahlen die Folge sind. Eine Vermutung war daher hier, dass evtl. CycE akkumulieren könnte, da bei Hd Funktionsverlust Zellen in der G1-Phase verbleiben oder sehr verlangsamt in die S-Phase eintreten (Bandura et al., 2005), und sich darüber eine gesteigerte Konzentration an CycE auf NB6-4 Neuronentstehung auswirken könnte. Die gesteigerte Zellzahl der Gliazellen lässt sich durch angeblich verlangsamte Zellteilung jedoch nicht erklären. Um der Frage nach CycE Konzentrationsänderungen nachzugehen, wurden Antikörperfärbungen von CycE in *hd^{Ff}* und im Vergleich zum WT analysiert. CycE ist in *hd^{Ff}* (Abb. 3-40 C, D) augenscheinlich stärker exprimiert als im WT, eine Quantifizierung wurde jedoch nicht vorgenommen. Ein großes Problem bei der Auswertung ist zudem, dass CycE Protein Konzentration sehr dynamisch ist. Da in *hd^{Ff}* keine ektoptischen Neurone des maxillaren NB6-4 gefunden wurden, die Suche jedoch auf einen Faktor ausgerichtet ist, der das maxillare Schicksal verändert, wurde *hd* aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.7.3. *teashirt*, *tiptop*, *disconnected* und *disco-related* sind als Interaktionspartner von Hoxgenen bekannt

Die zur Zink-Finger Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren *teashirt* (*tsh*; Fasano et al., 1991) und sein Paraloges *tiptop* (*tio*; Laugier et al., 2005), sowie *disconnected* (*disco*; Roder et al., 1992) und sein Paraloges *disco-related* (*disco-r*) wurden als Gene mit unter anderem homeotischer Funktion bekannt. Sie können als Interaktionspartner der Hoxgene wirken (Gonzalez-Reyes und Morata, 1990; Fasano et al., 1991; Roder et al., 1992; de Zulueta et al., 1994; Laugier et al., 2005; Taghli-Lamalle et al., 2007;

Coiffier et al., 2008; Wang et al., 2013). *Disco* ist für die Spezifizierung anteriorer segmentaler Identität verantwortlich, *tsh* für thorakale und abdominale (Fasano et al., 1991; Roder et al., 1992). Funktionsverlust eines dieser Gene führt zu segmentalen Transformationen in die jeweils andere Körperregion, daher werden diese Gene als Faktoren mit homeotischer Funktion eingestuft. Es sind aber auch nicht-homeotische Funktionen dieser Kandidaten bekannt (Gallet et al., 1998; Erkner et al., 1999; Wu und Cohen, 1999; Wu und Cohen, 2000; Culi et al., 2006; Bessa et al., 2009). Beispielsweise wurde *tsh* im Zusammenhang mit der Entwicklung der Epidermis (Andrew et al., 1994; de Zulueta et al., 1994; Gallet et al., 2000; Robertson et al., 2004), der Speicheldrüsen (Henderson et al., 1999), der Imaginalscheiben (Erkner et al., 1999; Singh et al., 2004) und des Darms (Mathies et al., 1994; Waltzer et al., 2001; Saller et al., 2002) untersucht. Über die Funktionen von *tsh* und *disco* im ZNS ist bisher sehr wenig bekannt. Für andere Gewebe wurden aber teilweise Interaktion mit Hoxgenen beschrieben, beispielsweise zwischen *Antp* und *tsh* (Roder et al., 1992; McCormick et al., 1995; Bhojwani et al., 1997) oder *disco* und *Dfd* (Mahaffey et al., 2001). Daher wäre es möglich, dass durch den Funktionsverlust der Hoxgene in den *Antp*-K Mutanten die Expression oder Wirkung von *tsh* und *disco* ebenfalls im VNS verändert werden. Auch könnten diese Faktoren vor diesem Hintergrund eine veränderte Wirkung haben und sich daher verstärkende Effekte auf das Transformationsereignis des NB6-4max ergeben.

Aufgrund dieser Datenlage aus der Literatur wurden beide Faktoren auf ihre Auswirkungen auf NB6-4 und ihre Expressionsveränderungen in den verschiedenen *Antp*-K Mutanten genauer geprüft.

3.7.3.1. Wildtypische Expression von *teashirt* im VNS ähnelt *Antennapedia* Expression

tsh wird im VNS exprimiert (Fasano et al., 1991), über seine Wirkungen gibt es bisher jedoch wenige Ergebnisse. So wurden fehlerhafte Entwicklung und Wegfindung von Neuronen beschrieben (Fasano et al., 1991), detaillierte Untersuchungen stehen jedoch noch aus.

Tsh wird im VNS sehr ähnlich wie *Antp* exprimiert (Abb. 3-41 A, B). mRNA in situ Hybridisierung gegen *tsh* (Abb. 3-41 A-A'') mit einer selbst hergestellten Sonde lässt erste Expression ab frühem St4 in einem einzelnen Streifen im Bereich des späteren Thorax erkennen. Der Vergleich zur Expression von *Antp* mRNA (Abb. 3-41 B-B'') lässt deutliche Ähnlichkeit beider Expressionsdomänen erkennen. Doppelfärbungen gegen Tsh Protein mit *Antp* in jungen Stadien verdeutlicht, dass Tsh früher als *Antp* in einer breiteren Domäne exprimiert wird, und sich auch früher nach anterior in den späteren Bereich des Labialsegments ausbreitet (Abb. 3-41 C). Auch in späten Stadien überlappen die Expressionsdomänen weitestgehend (Abb. 3-41 D). Tio wird abweichend zu Tsh in einzelnen Zellgruppen über das VNS hinweg exprimiert, wobei eine erhöhte Expression im Bereich des posterioren Labialsegments bis Segment A2 auftritt (Abb. 3-41 E, und vergleiche Kapitel 3.7.3.2.).

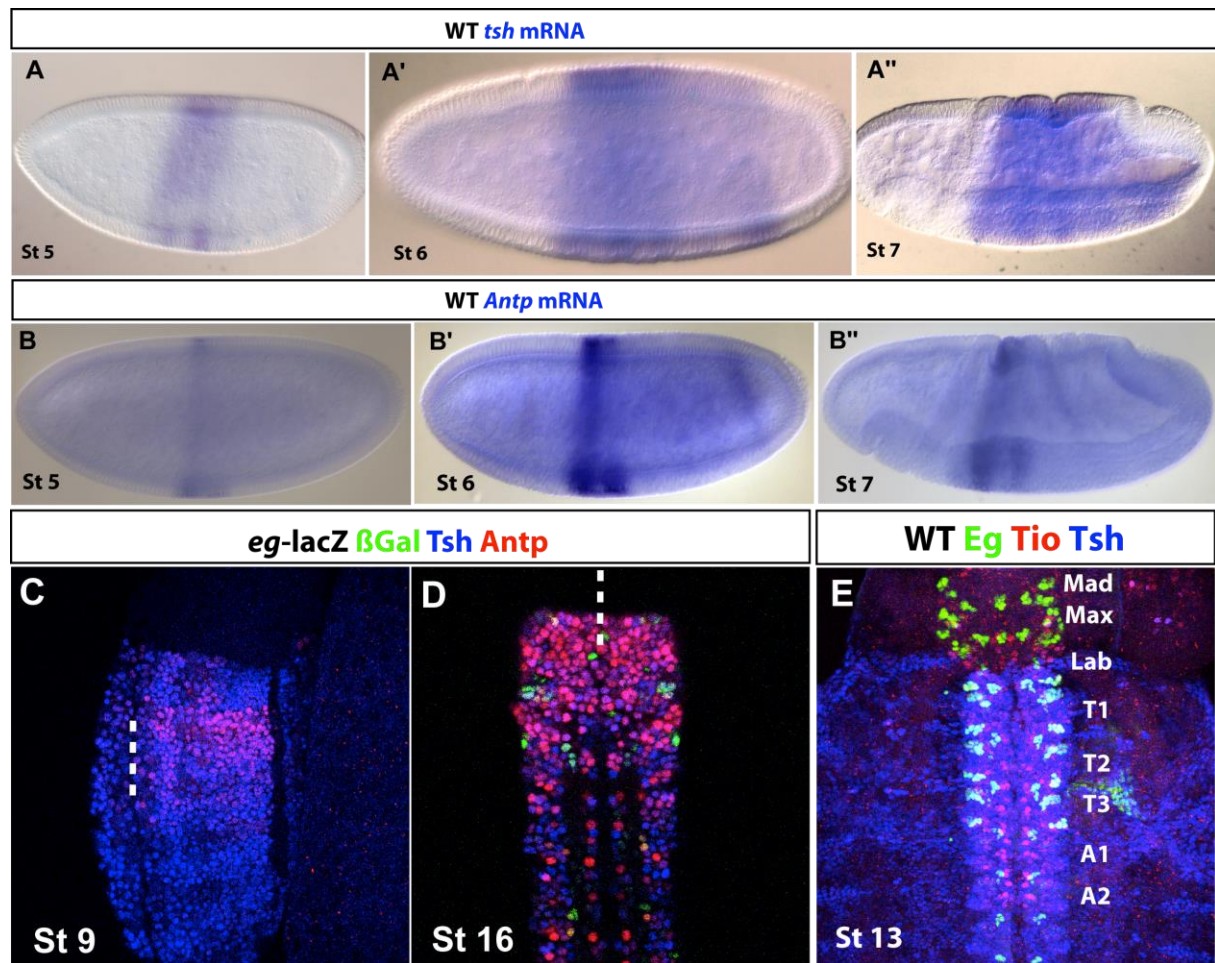


Abb. 3-41: Wildtypische Expression von Tsh im Vergleich zu Antp und Tio Expression.

(A, B) in situ Hybridisierungen gegen *tsh* mRNA (A) und *Antp* mRNA (B) mit alkalischer Phosphatase Färbung in wildtypischen nicht filet-präparierten Embryonen, anterior ist links. (A) *tsh* wird im St5 in einer etwas breiteren Domäne als (B) *Antp* etwa im zweiten Drittel des Embryos exprimiert. (A', B') Im St6 breiten sich die Expressionsdomänen nach posterior aus. (A'', B'') In St7 ist *tsh* Expression in der gesamten posterioren Region des Embryos ausgeprägt, nach anterior hin ist sowohl *tsh*, als auch *Antp* Expression scharf abgegrenzt. Es findet sich zu keinem Zeitpunkt während der frühen Embryogenese Expression im anterioren Neuroektoderm. (C, D) Fluoreszenz-Antikörperfärbung gegen β Gal (grün) Tsh (blau) und Antp (rot) im *eg-lacZ* Stamm. (C) Wholemout im St9, anterior ist oben, ventral ist links, gekennzeichnet durch die Mittellinie. Auch im St9 unterscheiden sich die Expressionsdomänen in ihrer Ausprägung nach posterior, die scharfe anteriore Expressionsgrenze beider Faktoren bleibt jedoch über die gesamte Embryonalentwicklung erhalten (St16 in D). (E) Antikörperfärbung gegen Tio (rot), Tsh (blau) und Eg (grün) im WT in St13. Tio wird im Vergleich zu Tsh in einzelnen Zellgruppen im gesamten VNS exprimiert, wobei eine konzentrierte Expression im Bereich vom posterioren Labialsegment bis zu Segment A2 auftritt.

Ab der Delamination exprimieren der labiale NB6-4, sowie alle thorakalen und abdominalen NB6-4 Tsh, während im gesamten Maxillarsegment keine Tsh Expression auftritt (Abb. 3-42 A-C). Dabei wird Tsh in labialen und thorakalen Glia und Neuronen gleich stark exprimiert. Verwunderlich sind daher die Auswirkungen von Tsh Funktionsverlust auf neuronale Identität des NB6-4.

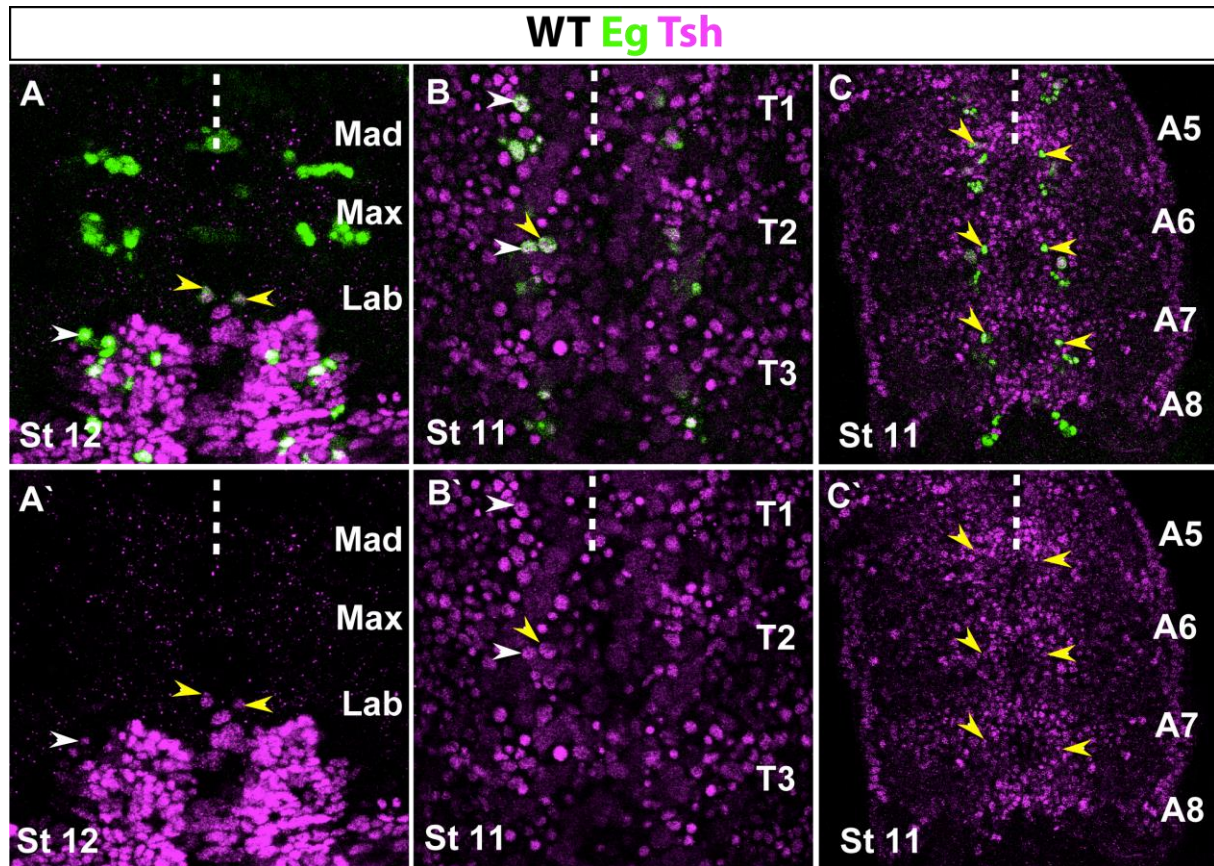


Abb. 3-42: Analyse der Expression von Tsh im NB6-4.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Tsh (magenta) im WT, A' bis C' sind Einzelkanäle zur Verdeutlichung der Tsh Expression. (A) Tsh wird im Maxillarsegment nicht exprimiert. Die NB6-4 Nachkommenszellen des Labialsegments exprimieren sowohl in den Glia als auch in den Neuronen Tsh. (B) Im Thorax wird Tsh ebenfalls im NB6-4 in Neuronen und Glia exprimiert und (C) alle abdominalen NB6-4 sind Tsh positiv.

3.7.3.2. *teashirt* Funktionsverlust führt zum Verlust von labialen und thorakalen NB6-4 Neuronen

Die Auswirkungen eines *tsh* Funktionsverlustes wurden mit zwei verschiedenen Allelen untersucht: *tsh*⁸ und *tsh*²⁷⁵⁷ (Fasano et al., 1991; Laugier et al., 2005). Diese beiden Allele unterscheiden sich folgendermaßen: *tsh*⁸ umfasst zusätzlich eine Mutation seines Paralogen *tio*. In *tsh*²⁷⁵⁷ ist *tio* nicht betroffen. *tio* ist als Paraloges Gen zu *tsh* beschrieben. Tio Protein wird nicht vor dem späten St12 im VNS exprimiert, und ist somit für die Identitätsfindung von NB6-4 vermutlich zu spät exprimiert. Es weist ab diesem Zeitpunkt eine Expressionsdomäne ähnlich der von Tsh Protein auf, hat jedoch zusätzliche Expression in einzelnen Zellclustern auch anterior in den gnathalen Segmenten (Abb. 3-41 E). Im NB6-4max konnte keine Expression von Tio beobachtet werden. Funktionsverlust von *tio* wird bisher als wirkungslos für *Drosophila* beschrieben, eventuell durch die starke Paralogie zu *tsh* (Bessa et al., 2009).

Beide *tsh* Allele zeigen einen Phänotyp im labialen und thorakalen, jedoch nicht im maxillaren NB6-4. Es kommt zum Verlust von NB6-4 Neuronen im Labialsegment und im Thorax in 25% (n= jeweils 38

Embryonen) und gelegentlich zu einer Erhöhung der Gliazellzahl auf vier Zellen pro Hemisegment in den betroffenen Segmenten (Abb. 3-43 A, B, gezeigt für thorakale Segmente). Die Bildung von vier Glia spiegelt die maxillare Ausprägung des NB6-4 wieder. Der Phänotyp ist in *tsh*²⁷⁵⁷, eventuell durch die redundante Funktion von *tio*, leicht gemildert. Eine *tio* Einzelmutante wurde nicht auf ihre Effekte bezüglich NB6-4 untersucht.

Da die Bildung von ektopischen Neuronen im maxillaren NB6-4 in *Antp*-K Mutanten auf die ektopische Anwesenheit eines neuronale Identität vermittelnden Faktors zurück zu führen sein könnte, war dieses und das folgende Ergebnis zunächst sehr interessant.

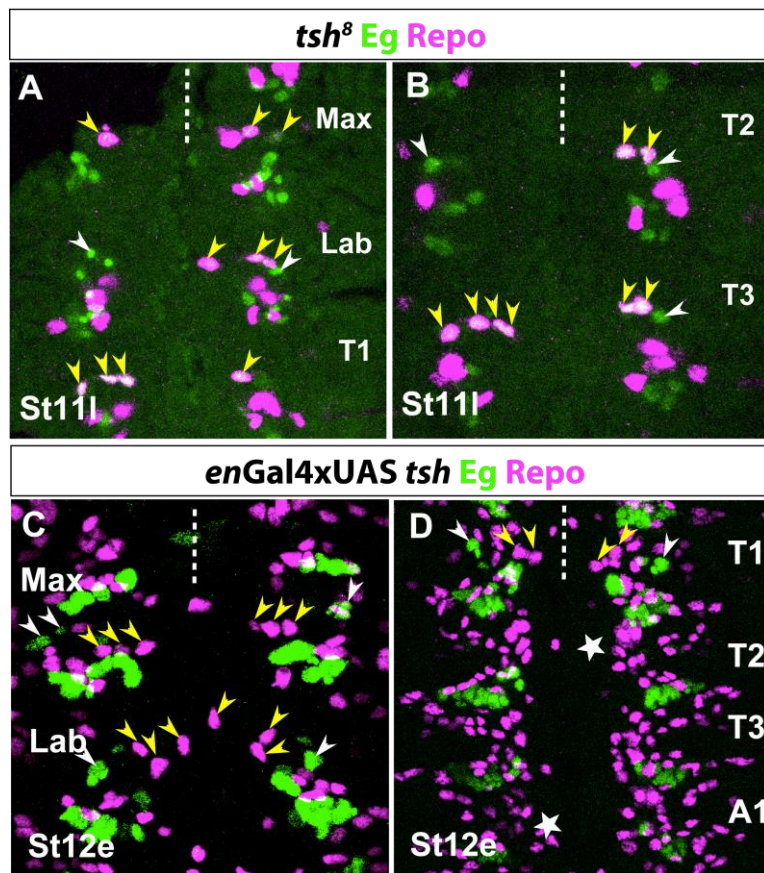


Abb. 3-43: Tsh Funktion ist für die wildtypische segmentale Identität des labialen und thorakalen NB6-4 entscheidend.

(A, B) Antikörperfärbungen gegen *Eg* (grün) und *Repo* (magenta) in *tsh*⁸ im St11. In labialen oder den thorakalen Segmenten kommt es zum Verlust von NB6-4 Neuronen in 25% (in T1 (A) in beiden Hemisegmenten, T3 (B) linkes Hemisegment). (C, D) Ektopische Expression von *tsh* mit *enGal4*. Die *UAS_{tsh}* Linie ist gleichzeitig eine Funktionsverlustmutante. Es kommt zur Bildung ektopischer Neurone im maxillaren NB6-4 in 90% (hier in beiden Hemisegmenten). Zeitgleich werden thorakale Neurone ebenfalls nicht mehr gebildet (beide Hemisegmente in T2 und T3). (D) NB7-3 wird häufig nicht gebildet (Hemisegmente markiert durch weiße Sterne).

3.7.3.3. Ektopische Expression von *teashirt* verändert die maxillare NB6-4 Identität

Ektopische Expression von *tsh* mit *en*-Gal4 (*UAS-tsh* Linie von L. Fasano und *tsh*⁸; *UAS-tsh*) führt zu ektopischen NB6-4 Neuronen im Maxillarsegment in 90% (n= 27 Embryonen; Abb. 3-43 C). Beide *UAS-tsh* Linien sind gleichzeitig Funktionsverlustmutanten, es kommt trotz ektopischer *tsh* Expression gleichzeitig zum gelegentlichen Verlust von Neuronen im Labialsegment und im Thorax. Zudem tritt der Verlust von NB7-3 auf (betroffene Hemisegmente markiert durch weiße Sterne in Abb. 3-43 D, vergleiche Kapitel 3.7.3.5.).

3.7.3.4. Die Expression von *teashirt* ist abhängig von *Antennpedia* Funktion

Da *tsh* für die Bildung neuronaler Anteile des NB6-4 mit verantwortlich ist, wurde zunächst Tsh Protein Expression in allen *Antp*-K Einzel- und Doppelmutanten untersucht. Es wäre denkbar, dass in diesen mutanten Hintergründen, durch mögliche Ausweitung der *tsh* Expression in das Maxillarsegment hinein, dort Neurone von NB6-4 induziert werden. Tsh Protein Expression im VNS weicht jedoch von ihrem wildtypischen Muster weder in *Dfd*, *Scr* oder *lab* Einzelmutanten, noch in Doppelmutanten ab (Abb. 3-44 A-C). Allerdings ist in späteren Stadien die Expression von Tsh in *Antp* Mutanten im Bereich des Labialsegments und dem anterioren Thorax vermindert (Abb. 3-44 D). In der Epidermis wurde die Stärke der Tsh-Expression von dem Vorhandensein von *Antp* abhängig beschrieben (McCormick et al., 1995), es wurden in diesem Zusammenhang bisher gewebespezifische Enhancer für *tsh* gefunden. Für das ZNS ist der Enhancer noch nicht bekannt, er ist anscheinend jedoch ebenfalls von *Antp* Funktion gesteuert. So führt ektopische Expression von *Antp* zu ektopischer Expression von *tsh* in den entsprechenden Domänen (Abb. 3-44 E).

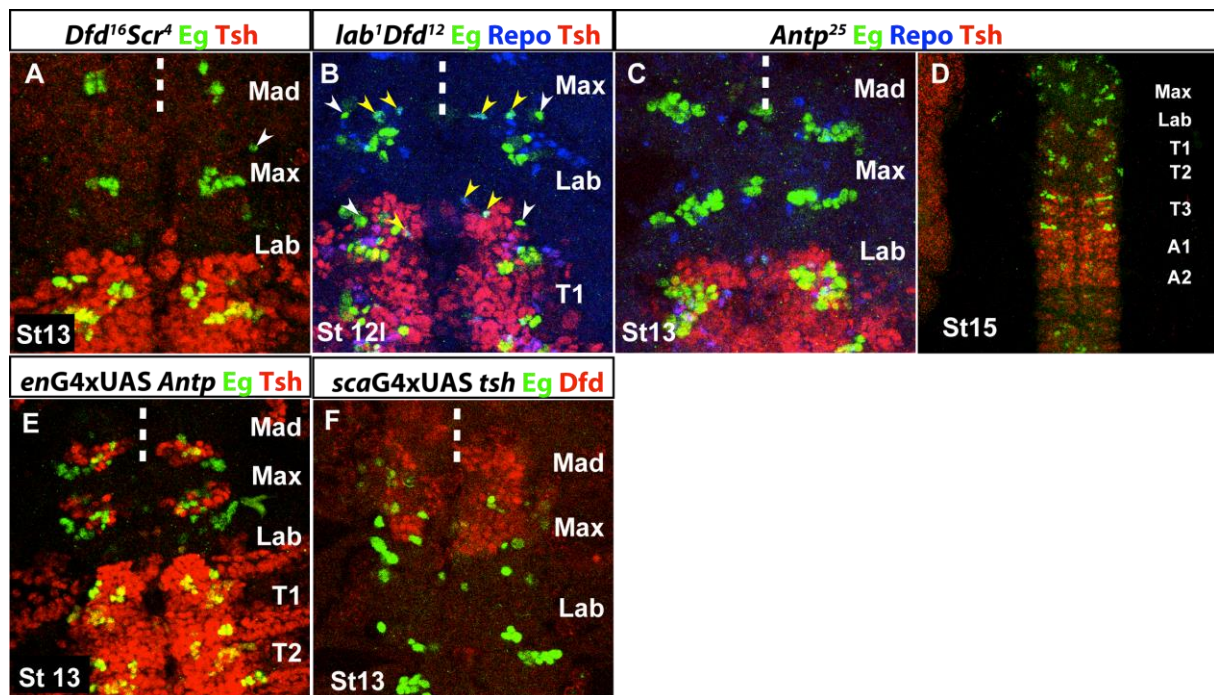


Abb. 3-44: Tsh Expression breitet sich bei *Antp*-K Gen Funktionsverlust nicht in anteriore Regionen aus.

(A-C) Antikörperfärbungen gegen Tsh (rot), Eg (grün) und Repo (blau) in verschiedenen *Antp*-K Gen Funktionsverlustmutanten. (A) Tsh Expression bleibt in *Dfd* oder *Scr* Funktionsverlustmutanten wildtypisch exprimiert. (B) Ebenso wenig ist Tsh Expression von der Funktion von *lab* oder durch Doppelfunktionsverlust von *lab* mit *Dfd* beeinflussbar. (C) In *Antp* Mutanten ist in früheren Stadien die Expression von Tsh wildtypisch, (D) in späteren Stadien ist die Expression im Bereich vom Labialsegment bis zu T3 verringert. (E) Ektopische Expression von *Antp* mit *enGAI4* kann im Gegenzug Tsh Expression in anterioren Bereichen anregen. (F) Durch ektopische Expression von *tsh* wird die Expressionsdomäne von *Dfd* nicht verändert.

Die Expression von *Dfd* ist unabhängig von der Expression von *tsh*. Die Proteinexpression von *Dfd* verändert sich bei ektopischer Expression von *tsh* nicht (Abb. 3-44 F), der Verlust von NB6-4 Neuronen

im Thorax kann somit nicht auf die Wirkung von ektopisch vorhandenem *Dfd* Protein zurückgeführt werden (vergleiche Abb. 3-29 A, ektopisch exprimiertes *Dfd* führt zum Verlust von thorakalen und labialen NB6-4 Neuronen).

Zusammenfassen kann festgehalten werden, dass in den verschiedenen *Antp*-K Mutanten keine Ausdehnung der Expressionsdomäne von *tsh* in die Domänen des nun „fehlenden“ Hoxgens hinein stattfindet, und somit die Neuronbildung des NB6-4max in *hox*-mutanten Hintergründen nicht auf *tsh* Funktion zurückzuführen ist.

3.7.3.5. *teashirt* beeinflusst weitere Identitäten von Eagle positiven Zelllinien

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass *tsh* Funktion weiteren Einfluss auf Eg positive Zellstammbäume und Neuroblasten hat. NB7-3 ist bei ektopischer Expression von *tsh* in 27% (n=40 Embryonen) aller Hemisegmente nicht mehr über Eg Expression sichtbar und somit evtl. in seiner Bildung betroffen (Abb. 3-43 D).

Weiterhin ist *tsh* für die Unterdrückung von Eg Expression in thorakalen NB5-3 Nachkommen und damit wahrscheinlich für deren segmentale Identität mit verantwortlich (siehe Kapitel 3.2.3.).

3.7.3.6. *disconnected* zeigt keine Funktion für den maxillaren NB6-4

Da die ektopischen Neurone des NB6-4max nicht auf ektopische Expression von *tsh* zurückzuführen sind, wurde nun untersucht, ob eventuell die Funktion von *disco*, dem Gegenspieler von *tsh*, unterstützend zu *Dfd* die segmentale Identität des NB6-4 max vermittelt.

disco wurde in der Vergangenheit als ein möglicher Cofaktor für die Autoaktivierung von *Dfd* (Kuziora und McGinnis, 1988a; Pinsonneault et al., 1997) und für die Funktionen von *Dfd* überhaupt diskutiert (Steller et al., 1987; Heilig et al., 1991; Lee et al., 1991). *Dfd* Funktion selbst ist aber nicht von *disco* Funktion abhängig. Vielmehr wurde *disco* als äquivalenter Cofaktor wie beispielsweise *extradenticle* (siehe Kapitel 3.7.4) gefunden. *Dfd* Zielgene, nicht aber *Dfd* Expression selbst, werden in ihrer Funktion und Expression verändert, wenn *disco* Funktion fehlt. Das hat Auswirkungen auf die Struktur der gnathalen Segmente, es werden durch *disco* Funktionsverlust ähnliche Effekte ausgelöst wie durch *Dfd* Funktionsverlust (Mahaffey et al., 2001). *disco* wurde somit zunächst in die sehr enge Auswahl von möglichen Kandidaten genommen und ausführlicher untersucht.

3.7.3.7. Die wildtypische Expressionsdomäne von *disconnected* in den gnathalen Segmenten umfasst nicht NB6-4

disco mRNA wird bis St12 in einer hauptsächlich anterioren lateralen Domäne exprimiert (Abb. 3-45 A), ab St13 findet sich die Expression in einzelnen Zellgruppen im gesamten ZNS (Abb. 3-45 A', A''). *disco* mRNA konnte in keinem Segment sicher und regelmäßig im NB6-4 lokalisiert werden. Es ist bereits bekannt, dass die Proteinexpression etwas von der mRNA Expression abweicht (Steller et al., 1987; Lee et al., 1991), leider konnte mit den sehr geringen Mengen von zur Verfügung stehendem

Antikörper (Steller et al., 1987) kein verlässliches Färbeergebnis erzielt werden. Die Frage nach möglicher Proteinexpression im NB6-4 lässt sich daher leider nicht beantworten. Die Expression von *disco* mRNA verändert sich in *Dfd* Einzelmutanten und in *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten im Vergleich zum WT nicht (Abb. 3-45 B, C).

3.7.3.8. Die Entstehung der segmentalen Identitäten des NB6-4 ist unabhängig von der Funktion von *disconnected*

Es existiert nur ein Fliegenstamm mit verringerter *disco* Funktion mit dem Allel *disco¹*, eine Nullmutante wurde bisher nicht generiert. Dieser Stamm ist ohne Balancerchromosom homozygot lebensfähig. Es gibt keine Effekte auf den NB6-4max (Abb. 3-45 D) und es kommt sehr selten, in etwa 3% (n=18 Embryonen), zum Verlust von Neuronen im Thorax und im Labialsegment (Abb. 3-45 D'). Um eine weitere mutante Situation zu erzeugen wurde ein *disco*-RNAi-Stamm mit *en*-Gal4 oder mit *sca*-Gal4 gekreuzt und die Embryonen auf die segmentale Identität des NB6-4 untersucht. Es konnten keine Effekte auf NB6-4max gefunden werden (nicht gezeigt).

Es existiert ein Paraloges zu *disco*, *disco-r*, das teilweise dieselben Funktionen wie *disco* erfüllt und verstärkende Effekte bei gemeinsamer Mutation gegenüber der Einzelmutation von *disco* hat (Mahaffey et al., 2001). *disco-r* wird jedoch, später als *disco*, erst ab St11 in der gnathalen Region exprimiert (Mahaffey et al., 2001). Es ist daher wahrscheinlich, dass sein Effekt für die erste Teilung von NB6-4max zu spät ist. Aufgrund der geringen Auswirkungen von *disco* auf die segmentalen Identitäten von NB6-4, und da weder *Disco-r* Antikörper oder Mutanten erhältlich waren, wurde *disco-r* nicht weiter untersucht. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es einen gemeinsamen Effekt von *disco* und *disco-r* bei gleichzeitigem Funktionsverlust auf NB6-4max geben könnte.

3.7.3.9. Ektopische Expression von *disconnected* hat geringe Effekte auf die segmentalen Identitäten von NB6-4

Ektopische Expression von *disco* mit *sca*-Gal4 hat keine Effekte auf die segmentalen Identitäten der NB6-4 Linien, sehr selten (unter 3%, n=16 Embryonen) weisen Embryonen eine verringerte Gliaanzahl in einigen Segmenten auf, oder Neurone im Labialsegment oder Thorax werden nicht gebildet (Abb. 3-45 E).

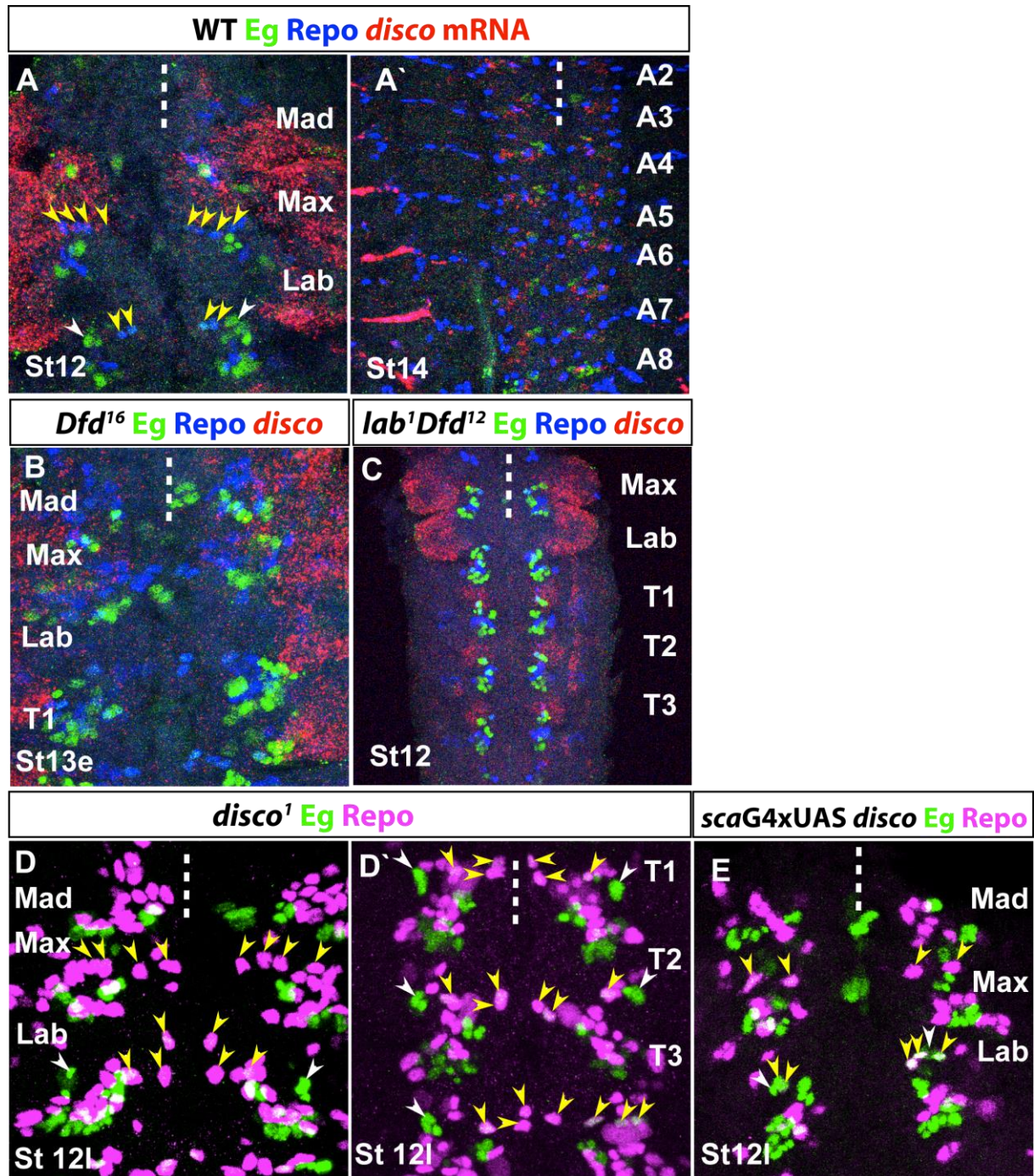


Abb. 3-45: Disco besitzt keine Funktion für die Identität von NB6-4.

(A, A') *disco* mRNA in situ Hybridisierung (rot) im WT in St12 (A) und St14 (A') mit Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (blau). NB6-4 und seine Nachkommenzellen des Maxillarsegments und aller anderen Segmente exprimieren kein *disco*. Die Expressionsdomäne von *disco* mRNA verändert sich über den Zeitraum der Embryonalentwicklung, in frühen Stadien ist eine laterale Expression anterior in den gnathalen Segmenten dominierend (A), während in späteren Stadien einzelne Zellgruppen im gesamten VNS *disco* exprimieren (A'). (B) In *Dfd* Mutanten verändert sich die Expression von *disco* im Vergleich zum WT nicht, ebenso wenig in *lab¹Dfd¹²* Mutanten (C). (D) *Disco* Funktionsverlust führt zu keiner Veränderung der segmentalen Identität des maxillaren NB6-4. (D') In thorakalen Segmenten tritt sehr selten ein Verlust von NB6-4 Neuronen auf. (E) Ektopische Expression von *disco* mit *scaGal4* führt ebenfalls zu keinerlei Veränderungen der segmentalen Identitäten von NB6-4, die Zellanzahl der gebildeten Nachkommenzellen ist gelegentlich verringert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mithilfe der zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden keine Funktion von *disco* auf die Entstehung von ektopischen maxillären NB6-4 Neuronen festgestellt werden konnte. Somit wurde *disco* nicht weiter in die Untersuchungen über die Herstellung segmentaler Identität des NB6-4max mit einbezogen.

3.7.4. *homothorax* und *extradenticle* als bekannte Kofaktoren erfüllen nicht die gesuchten Kriterien

Als weitere bereits bekannte Interaktionspartner von Hoxgenen, und auch aufgrund der Ergebnisse von *tsh* Funktion auf NB6-4, kamen *extradenticle* (*exd*; Wieschaus et al., 1984) und *homothorax* (*hth*; Rieckhof et al., 1997) in die nähere Auswahl. Diese beiden Faktoren interagieren miteinander und mit verschiedenen Genen des *Bth*- und *Antp*-K, insbesondere auch mit *Dfd*, *Scr*, *lab* und *Antp*. *hth* und *exd* wirken gemeinsam mit Hoxgenen, beispielsweise indem sie Komplexe bilden, um anschließend als Transkriptionsfaktor-Komplex auf verschiedene Zielgene zu wirken. So kann Funktionsverlust von *hth* oder *exd* segmentale Transformationen hervorrufen (Peifer und Wieschaus, 1990; Chan und Mann, 1996; Mann und Chan, 1996; Pinsonneault et al., 1997; Rieckhof et al., 1997; Azpiazu und Morata, 1998; Casares und Mann, 1998; Florence und McGinnis, 1998; Kurant et al., 1998; Ryoo und Mann, 1999; Ryoo et al., 1999; Yao et al., 1999).

hth wurde im Weiteren im Zusammenhang mit *tsh* Funktion gefunden. Hth und Tsh formen gemeinsam Komplexe, um weitere Faktoren beispielsweise bei der Augenentstehung zu regulieren (Bessa et al., 2002). Weiterhin wurden Funktionen von *hth* und *tsh* im Zusammenhang mit dem Hippo-Signalweg gefunden, der Zellwachstum und Zellproliferation reguliert. *tsh* und *hth* Expression werden hier durch den Faktor *yorkie* (*yki*; Oh und Irvine, 2008; Reddy und Irvine, 2011) gesteuert und sind so als Transkriptionsfaktoren an der Regulation von Zielgenen beteiligt (Peng et al., 2009; Reddy und Irvine, 2011). Ein Zielgen von Yki über Tsh und Hth ist *CycE* (Huang et al., 2005; zusammengefasst in Zhao et al., 2011).

Sowohl *Exd*, als auch *Hth* Protein werden im maxillären NB6-4 exprimiert und ebenso im NB6-4 anderer Segmente (Abb. 3-46 A, B). Der Funktionsverlust von *exd* ist ohne Konsequenzen für die segmentalen Identitäten des NB6-4, auch des NB6-4max (nicht gezeigt). Die Expression von *Exd* Protein im gnathalen VNS zwischen WT und *lab¹Dfd¹²* Mutanten verändert sich nicht (Abb. 3-46 A, C).

Die Expression von *Hth* Protein verändert sich ebenfalls zwischen NB6-4 im WT und *lab¹Dfd¹²* Mutanten nicht (Abb. 3-46 B, D). *hth* besitzt jedoch eine Funktion für die Bildung thorakaler Neurone des NB6-4. Da gravierende Probleme mit den zur Verfügung stehenden *hth* Mutanten bestanden (persönliche Mitteilungen von Christian Berger und Ana Rogulja-Ortmann), wurden bereits bestehende Aufnahmen von *hth^{p2}* mit Eg Antikörperfärbung, die dankenswerterweise von Ana Rogulja-Ortmann zur Verfügung gestellt wurden, für die Datenerhebung verwendet. Hier konnten fünf gefärbte Embryonen ausgewertet werden und in etwa 20% fehlten thorakale NB6-4 Neurone. Diese Daten stellen

aufgrund mangelnder Embryonenanzahl nur eine Tendenz dar und wären im Falle weiteren Interesses durch eine umfassendere Statistik abzusichern. Es zeichnet sich eine Funktion von *hth* für das Aufrechterhalten von neuronaler Identität ab, Hth ist jedoch im maxillaren NB6-4 sowohl im WT als auch in *lab¹Dfd¹²* Mutanten exprimiert. Daher wurde geschlussfolgert, dass *hth* zwar eine Rolle für das Aufrechterhalten von neuronaler Identität spielt, jedoch nicht für die Entstehung ektopischer NB6-4max Neurone verantwortlich sein kann. Zudem konnte Christian Berger keine Effekte von *hth* Funktionsverlust auf den ebenfalls eine rein gliale Zelllinien bildenden abdominalen NB6-4 finden (persönliche Mitteilung von Christian Berger). Weiterhin ist ektopische Expression von *hth* mit *scaGal4* ohne Effekte für den maxillaren NB6-4 (nicht gezeigt).

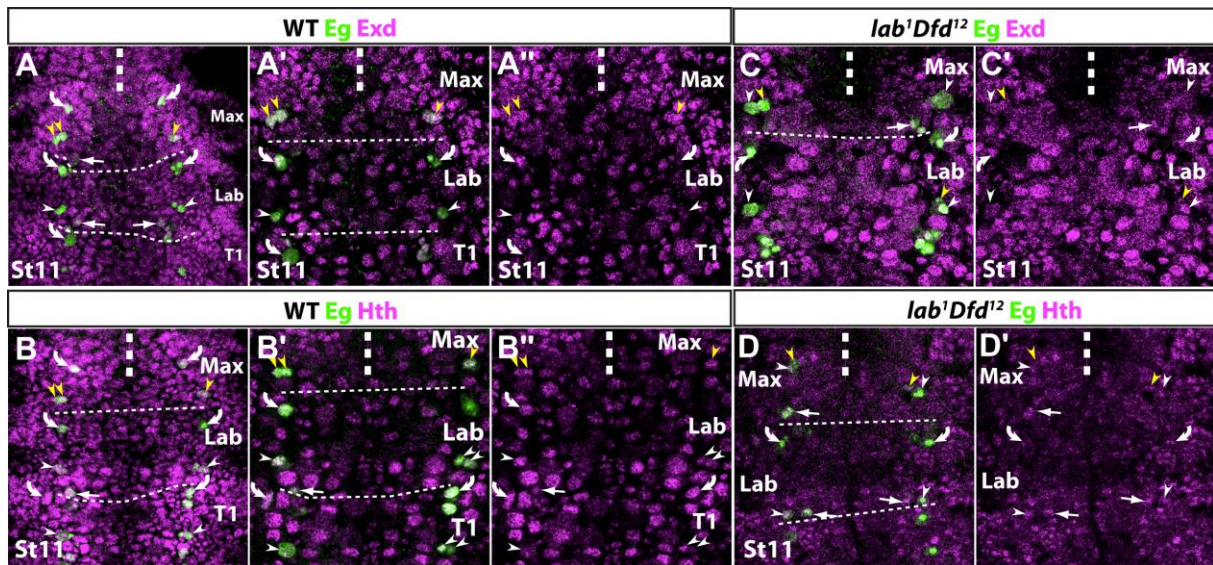


Abb. 3-46: Expression von Hth und Exd im WT und *lab¹Dfd¹²* Mutanten.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Exd (A und C, magenta) und Hth (B und D, magenta) im WT (A und B) und in *lab¹Dfd¹²* (C und D) Mutanten in St11. (A) und (B) sind Maximalprojektionen aller Ebenen für die Erfassung der Gesamtexpression von Exd und Hth in den gnathalen Segmenten. (A') und (B') sind Einzelebene für die Erfassung der Expression in NB6-4. (A'') und (B'') sind jeweils die Einzelkanäle von Exd und Hth. Alle NB6-4 exprimieren sowohl im WT, als auch in *lab¹Dfd¹²* Mutanten sowohl Exd als auch Hth.

3.7.5. Zusammenfassung der Kapitel 3.5., 3.6. und 3.7.

Diese sehr aufwendige Untersuchung der unterschiedlichen Kandidaten lässt sich sehr übersichtlich zusammenfassen. Die meisten der untersuchten Kandidaten besitzen keine Funktion für die Ausbildung der segmentalen Identität des maxillaren NB6-4.

Tsh und Hth Funktion sind für die Ausbildung der thorakalen Identität des NB6-4 notwendig. Wg und Hd besitzen eine Funktion für die Ausbildung der Identität des NB6-4 anderer Segmente, die Effekte konnten nicht genau erfasst werden.

Als Ausblick auf die folgenden Kapitel erfolgt hier eine Gesamtübersicht aller genauer untersuchter Kandidaten: für die Herstellung maxillarer Identität zeigten sich im Folgenden die im Zusammenhang mit Hoxgenfunktion bisher vollkommen unbekanntem Faktoren *Amalgam*, lokalisiert auf Chr3R, und der bereits mit *lab* Funktion im Zusammenhang gebrachte Faktor *Neurotactin* als verantwortlich. Durch bereits bekannte Interaktionen mit weiteren bisher nicht im Screen aufgetretenen Faktoren konnten im Folgenden einige weitere Kandidaten identifiziert werden, auf die nun in den folgenden Kapitel genauer eingegangen wird (Abb. 3-47)

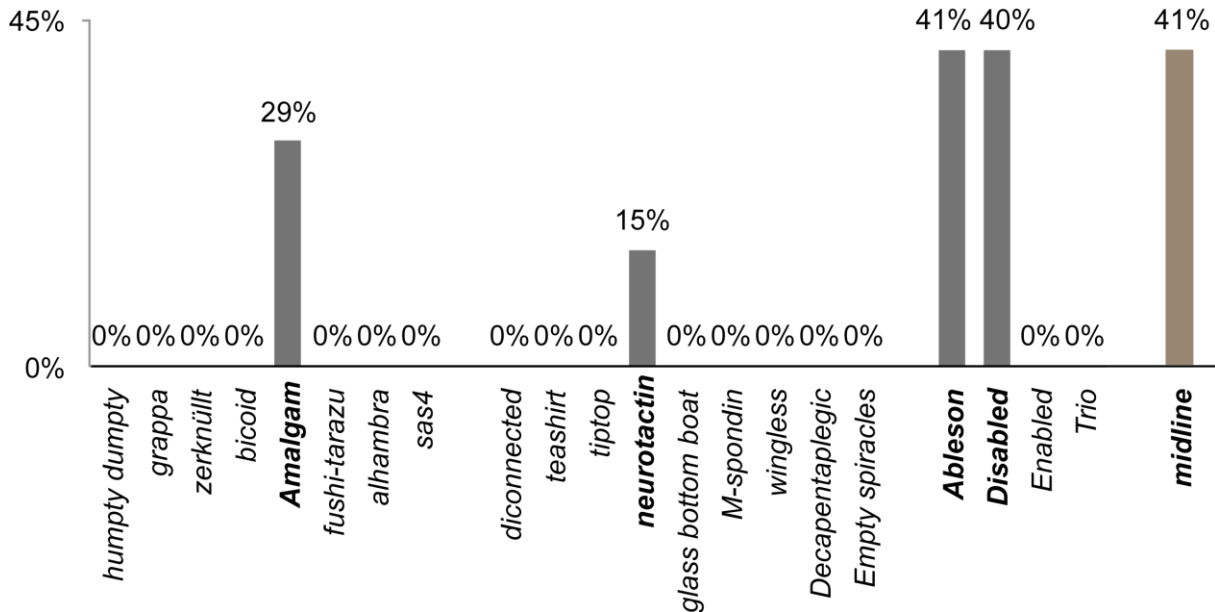


Abb. 3-47: Zusammenfassende Darstellung der Effekte von Funktionsverlust der verschiedenen genauer analysierten Kandidaten mit Angabe der Transformationsrate des maxillaren NB6-4 als Ausblick auf die folgenden Untersuchungen.

Die Abweichung von rein glialer Identität des maxillaren NB6-4 (y-Achse) bei Funktionsverlust der unterschiedlichen Kandidaten (x-Achse). Es lässt sich bei Verlust von *Ama*, *Abl*, *Dab* und *mid* eine sehr ähnliche Transformationsrate erkennen. Bei Verlust von *Nrt* Funktion tritt eine verminderte Transformationsrate auf. Alle weiteren Kandidaten haben keinen Einfluss auf die Identität des maxillaren NB6-4.

3.8. Amalgam besitzt eine entscheidende Funktion für die Identität des NB6-4max

Da die gefundenen Effekte der Transformationssteigerung durch die fehlende Funktion von *lab* oder *Antp* zustande kommen, die jeweils über ein Segment weit vom maxillaren NB6-4 exprimiert werden, wurde bei der Suche nach verantwortlichen Faktoren besondere Aufmerksamkeit auf sezernierte Faktoren und Mitglieder von Signal-Transduktionswegen gelegt. Ein daher besonders interessanter Kandidat für die Beeinflussung des hier gefundenen Effekts war *Amalgam* (*Ama*; Seeger et al., 1988).

Ama liegt auf Chromosom 3R zwischen *bcd* und *zen* inmitten des *Antp*-K. *Ama* codiert für ein sezerniertes neuronales Adhäsionsprotein, das sich an der Zellmembran anlagert. Es bildet selbst Aggregate aus, welche für die Dimerisierung und damit vollständige Funktionsfähigkeit seines Transmembran-Rezeptors *Neurotactin* (*Nrt*) notwendig sind (Seeger et al., 1988; Fremion et al., 2000; Liebl et al., 2003; Zeev-Ben-Mordehai et al., 2009b). *Ama* übernimmt eine Funktion im Zusammenhang mit axonaler Wegfindung, die für die Ausbildung eines neuro-anatomisch korrekten ventralen Nervensystems maßgeblich ist (Seeger et al., 1988; Liebl et al., 2003). Hier verstärkt der Funktionsverlust von *Ama* den Phänotyp der *Ableson Tyrosin Kinase* (*Abl*) mit dem Allel *Abl^l* (Liebl et al., 2003). *Ama* oder *Abl^l* Einzelmutanten sind lebensfähig, Doppelmutanten für *Ama* und *Abl* entwickeln sich jedoch nur bis zum pupalen Stadium und sterben dann. Für *Ama* ist bisher keinerlei Verbindung im Zusammenhang mit Hoxgenen bekannt, der *Ama*-Rezeptor *Nrt* jedoch wurde in einem Screen als potentiell *lab* Zielgen gefunden (Leemans et al., 2001). Die gemeinsame Mutation von *Nrt* zusammen mit *Abl^l* hat denselben verstärkenden Effekt bezogen auf die Ausbildung des VNS im Vergleich zu einer Mutation von *Abl*, *Nrt* oder *Ama* alleine (Liebl et al., 2003).

3.8.1. Amalgam Funktion ist für die korrekte segmentale Identität von NB6-4max notwendig

Auf NB6-4max bezogen lässt sich eindeutig eine Funktion von *Ama* für die korrekte segmentale Identität beobachten (Abb. 3-48). In der Studie von Liebl et al., 2003 wurden zwei verschiedene *Ama* Allele erzeugt, die sich sowohl in der Art ihrer Produkte als auch in der Stärke ihrer Auswirkungen auf NB6-4max unterscheiden. Da sie in einem Mutagenese-Screen im Hintergrund einer Mutation der *Ableson-Tyrosin Kinase* erzeugt wurden, die als *Abl^l* Allel benannt wurde, sind beide *Ama* Allele mit *Abl^l* kombiniert. *Abl^l* bildet ein Restprotein mit aktiver Kinasefunktion (Smith und Liebl, 2005). Da die Genloki von *Ama* und *Abl* sehr dicht aufeinanderfolgend liegen, ist aus methodischen Gründen keine einfache Neukombination der Allele möglich (persönliche Mitteilungen von Olaf Vef und von Eric Liebl). Um mögliche Auswirkungen von *Abl^l* von den Effekten von veränderter *Ama* Funktion auf NB6-4max unterscheiden zu können, wurde zunächst der Phänotyp von *Abl^l* Mutation bestimmt. *Abl^l* alleine zeigt keinerlei Auswirkungen auf NB6-4, es werden keine ektopischen Neurone im NB6-4max gebildet (n=30 Embryonen; Abb. 3-48 A). Weiterhin werden die NB6-4 anderer Segmente oder weitere Eg positive Neuroblastenlinien von NB3-3 oder NB7-3 nicht augenscheinlich verändert.

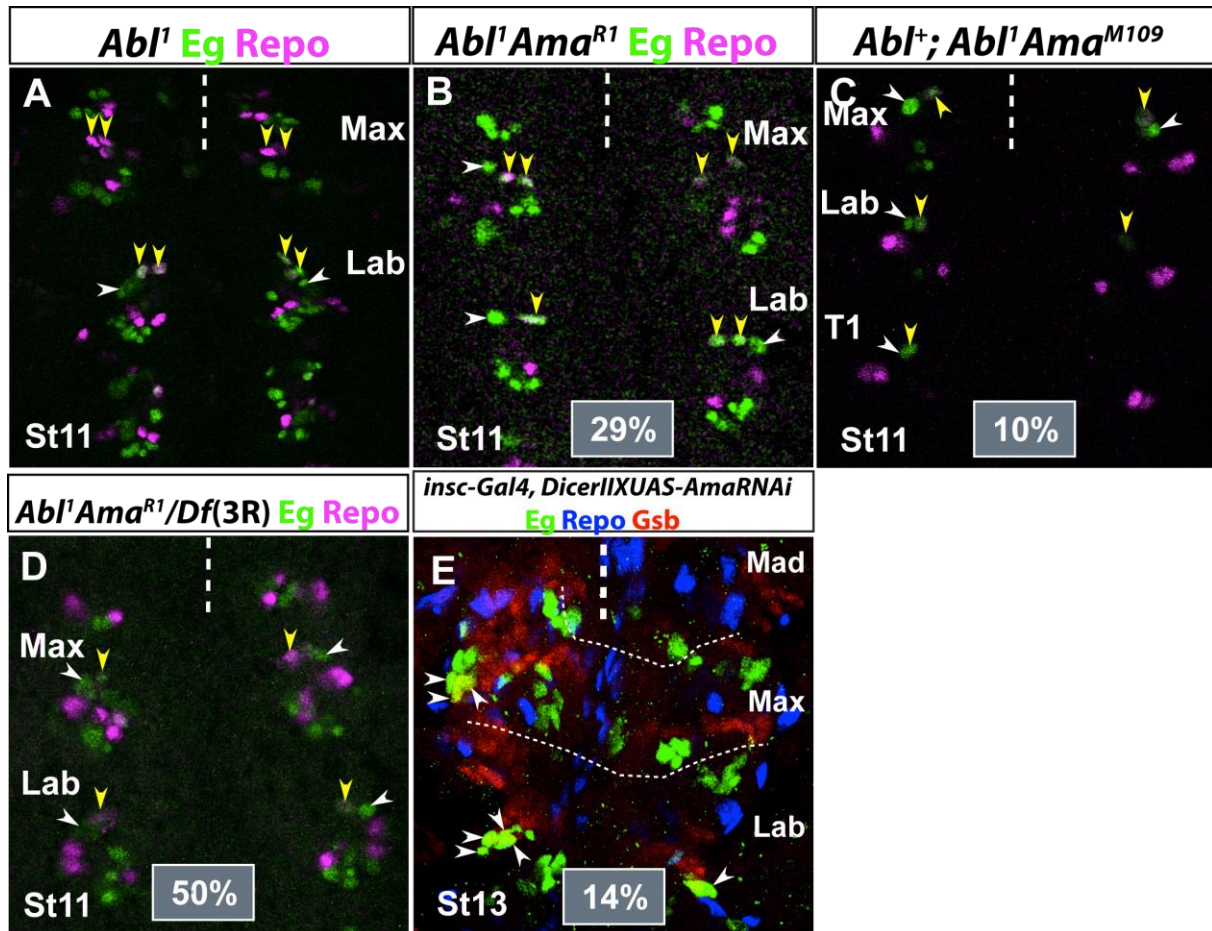


Abb. 3-48: Funktionsverlust von *Ama* hat Auswirkungen auf die segmentale Identität des NB6-4max.

Antikörperfärbungen gegen Eg (grün), Repo (magenta/blau) und Gsb (rot). (A) Mutation mit dem Allel *Abl¹* hat keine Auswirkungen auf die segmentale Identität des NB6-4. (B) *Abl¹Ama^{R1}* Mutanten zeigen eine Transformationsrate des maxillaren NB6-4 hin zu neuronaler Identität von 29%. (C) *Ama^{M109}* Mutanten haben eine Transformationsrate von 10%. (D) *Abl¹Ama^{R1}* Mutanten gekreuzt über eine Defizienz des gesamten Antp-K steigert die Transformationsrate von NB6-4max auf 50%. (E) Über RNAi von *Ama* mit *insc-Gal4; DicerII* lassen sich ebenfalls ektopische Neurone von NB6-4max erzeugen.

In *Abl¹Ama^{R1}* Embryonen bildet der NB6-4max in 29% (n=50 Embryonen) aller Hemisegmente zusätzlich zu Gliazellen Neurone aus, meist entstehen drei Glia und ein Cluster von drei bis fünf Neuronen (Abb. 3-48 B). *Ama^{R1}* enthält eine Punktmutation die eine Missence-Mutation auslöst und zusätzlich eine 29 Basenpaar („base pair“, bp) Deletion die eine Leserahmenverschiebung auslöst, und entspricht wohl am ehesten einer Protein-Null-Mutation (Liebl et al., 2003). In *Abl¹Ama^{M109}* Mutanten ist der maxillare NB6-4 in 10% (n=30 Embryonen) aller Hemisegmente hin zu einer gemischten Identität aus Glia und Neuronen verändert. *Ama^{M109}* hingegen ist nur eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch. Es codiert für ein verändertes Protein, das selbst nicht mehr dimerisiert, jedoch seine Bindungsmöglichkeit zu *Nrt* erhält. Ein Fliegenstamm mit dem Allel *Abl¹Ama^{M109}* existiert auch mit einem wildtypisch eingekreuzten *Abl⁺* Allel. In diesem Stamm wird NB6-4max ebenfalls in 10%

(n=30 Embryonen) verändert, was die Unabhängigkeit des hier beobachteten Effekts auf NB6-4 von *Abl^l* unterstreicht (Abb. 3-48 C).

Die NB6-4 anderer Segmente sind sehr unregelmäßig verändert. So kommt es gelegentlich zu ektopischen Neuronen im Abdomen (siehe auch Kapitel 3.18.), sowie zum Verlust von Neuronen im Thorax. Auch NB7-3 ist gelegentlich nicht über Eg Antikörperfärbungen sichtbar. Zudem treten in allen Segmenten teilweise einzelne Eg positive Zellen auf, die sich keinem der bekannten Eg positiven Zellstammbäumen zuordnen lassen. Diese Effekte sind sehr unregelmäßig und schwer reproduzierbar (anders als der NB6-4max Phänotyp) und wurden daher nicht weiter klassifiziert. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass *Ama* Funktion auch für weitere Effekte auf Einzelzellebene verantwortlich ist.

Da die Transformationsrate des NB6-4max von *Ama^{R1}* bei 29% liegt, dieses Allel aber trotzdem ein Restprotein bildet (Liebl et al., 2003), besteht die Möglichkeit, dass die Transformationsrate von NB6-4max durch kompletten Funktionsverlust von *Ama* noch gesteigert werden könnte. *Abl^lAma^{R1}* wurde daher über *Df(3R)BSC467* gekreuzt, die eine gesamte Deletion des *Antp*-K ist und somit auch kein *Ama*, aber *Abl* enthält. Hier steigert sich die Transformationsrate des NB6-4max auf 50% (n=35 Embryonen; Abb. 3-48 D). Da *Dfd^{l6}* über WT gekreuzt eine Transformationsrate von 8% ergibt (vergleiche Kapitel 3.2.1.4.), werden hier somit etwa 40% Transformation ausgelöst. Die höhere Transformationsrate von 50% wird vermutlich zusätzlich durch die heterozygot abwesende *Dfd* Funktion verursacht- zudem sind hier heterozygot *lab*, *Scr* und *Antp* nicht funktionsfähig.

Zur besseren Einschränkung dieser Nebeneffekte wurde versucht *Abl^lAma^{R1}* über eine kleine Deletion des *Antp*-K *Df(3R)Ama* zu kreuzen, welche die Gene *Ama*, *bcd* und *zen* umfasst. Diese Embryonen waren so sehr geschädigt, dass die Präparation häufig unmöglich war. Zudem zeigten sie häufig sehr extreme Proliferation aller Eg positiver Zellstammbäume, so dass in den meisten Fällen keine segmentale Zuordnung der Eg positiven Zellen möglich war (nicht gezeigt).

Als weitere Kontrolle wurde versucht, *Ama* Funktionsverlust über *Ama*-RNAi zu erzeugen. Dafür wurde der Stamm der VDRC Bibliothek benutzt und mit *inscutable*-Gal4/DicerII gekreuzt. Es konnten in rund 14% (n=28 Embryonen) Embryonen mit ektopischen NB6-4max Neuronen gefunden werden (Abb. 3-48 E).

Aufgrund dieser variierenden Ergebnisse kann keine exakte Aussage über die genaue Transformationsrate von NB6-4max bei *Ama* Funktionsverlust getroffen werden. Da der Funktionsverlust von *Ama* jedoch deutliche Auswirkungen auf den NB6-4max hat, wurde sich im Weiteren auf die genauere Herkunft dieser Effekte konzentriert.

Der für die veränderten Transformationsraten bei doppeltem Funktionsverlust zweier *Antp*-K Gene verantwortliche Faktor (oder die Faktoren) müsste durch die Gene des *Antp*-K reguliert sein. Daher

wurde die Expression von *Ama* im WT und in den verschiedenen *hox*mutanten Hintergründen genauer untersucht und miteinander verglichen.

3.8.2. Beschreibung der wildtypische Expression von *Amalgam* im VNS

Die Expression und Verteilung von *Ama* Protein im VNS wurde bisher nicht auf Einzelzellebene untersucht. Bekannt ist jedoch eine das Neuroektoderm umfassende Expression ab St8, die sich über die Embryonalentwicklung in bestimmten Zellgruppen, unter anderem in Neuronen, manifestiert. Expression in Neuroblasten selbst konnte nicht beobachtet werden (Seeger et al., 1988; Fremion et al., 2000). Über die mRNA Expression ist bekannt, dass sie zeitlich von der Proteinexpression abweicht und bereits in St13 keine *Ama* mRNA mehr im VNS sichtbar ist (Fremion et al., 2000).

Für die Expressionsanalysen bezüglich NB6-4 waren daher zunächst detailliertere Untersuchungen notwendig. Das *in situ* Expressionsmuster einer selbst hergestellten Sonde gegen *Ama* mRNA gemeinsam mit Antikörperfärbung gegen *En* zeigt ein sehr interessantes Muster. In St10 (Abb. 3-50 A) und St11e (Abb. 3-50 B) ist *Ama* mRNA im gesamten Neuroektoderm gleichmäßig, mit verringerter Intensität innerhalb der *En* exprimierenden Domänen, in jedem Segment exprimiert. Im späteren St11 (Abb. 3-50 C) manifestiert sich die Expression in der Mittellinie und in lateralen Bereichen des VNS. Auch im Neuroektoderm des Tritocerebrums wird *Ama* mRNA im St10 und St11 exprimiert, während die weiter anterioren Gehirnsegmente keine Expression aufweisen. Die einzige Ausnahme der segmental wiederholten Expression bildet interessanterweise nur eine Domäne im labialen Segment, in der keine *Ama* mRNA Expression auftritt (in Abb. 3-50 B hervorgehoben durch die gelbe Markierung). Antikörperfärbungen gegen *Scr* bestätigten den ersten Verdacht: nur im Bereich der wildtypischen *Scr* Expressionsdomäne, entsprechend dem Parasegment 2, wird keine *Ama* mRNA exprimiert (Abb. 3-49). Wirkt *Scr* als Repressor von *Ama* Transkription?

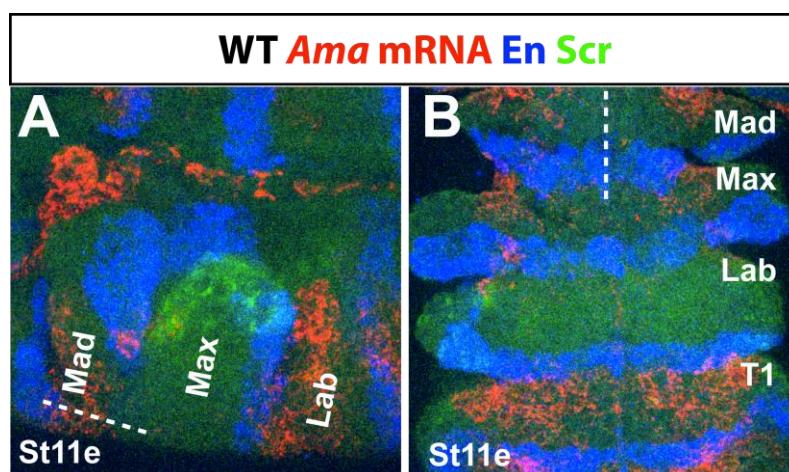


Abb. 3-49: *Ama* mRNA wird im WT nicht in der *Scr* Expressionsdomäne exprimiert.

Antikörperfärbung gegen *Scr* (grün), *En* (blau) und mRNA *in situ* Hybridisierung gegen *Ama* mRNA (rot) im WT. (A) Seitliche Ansicht der gnathalen Segmente eines nicht präparierten Embryos, anterior ist links, dorsal ist oben. *Ama* mRNA wird nicht in der *Scr* Expressionsdomäne exprimiert. (B) Filetpräparierter Embryo, Aufsicht auf das

VNS. Auch hier ist keine *Ama* mRNA im posterioren Maxillarsegment und dem Labialsegment im Bereich der *Scr* Expression detektierbar.

3.8.3. Regulation der *Amalgam* Expression durch *Antennapedia*-Komplex Gene

3.8.3.1. *Sex combs reduced* wirkt als Repressor von *Amalgam* mRNA Transkription

Bisher ist nichts über mögliche transkriptionelle Regulation von *Ama* bekannt, daher würde die Regulation von *Ama* Expression durch *Scr* die erste bekannte Regulation darstellen. Tatsächlich ist in *Scr*¹¹ und *Scr*¹⁷ *Ama* mRNA Expression im gesamten VNS einschließlich der *Scr* Expressionsdomäne deutlich ektoptisch exprimiert. Die im WT zu beobachtende Reduktion innerhalb des anterioren Labialsegments und des posterioren Maxillarsegments ist hier nicht mehr sichtbar (Abb. 3-50 D).

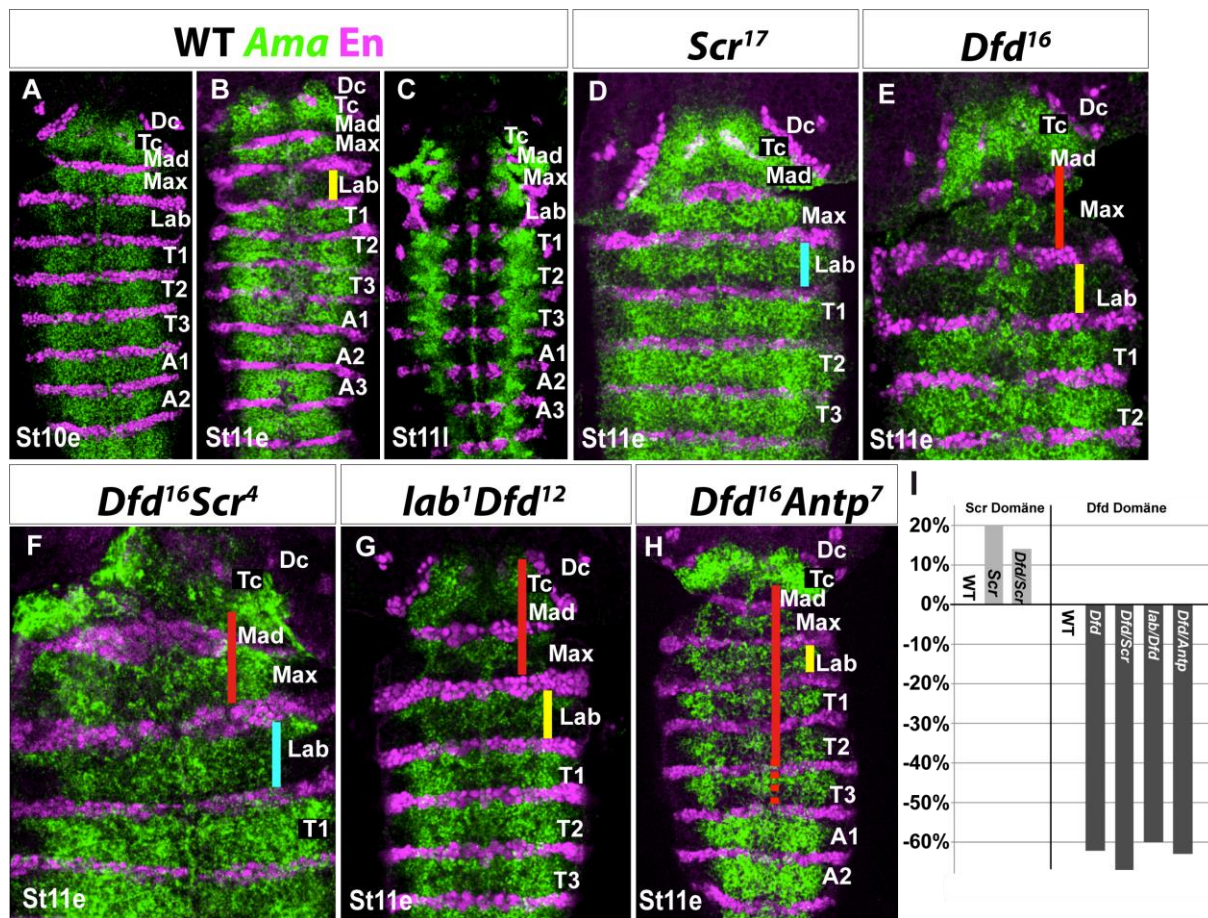


Abb. 3-50: *Ama* mRNA Expression im WT im Vergleich zu *Antp*-K Mutanten.

mRNA in situ Hybridisierung gegen *Ama* (grün) und Antikörperfärbung gegen En (magenta) im Neuroektoderm. (A) Im WT wird *Ama* mRNA im St10e relativ gleichmäßig im Neuroektoderm exprimiert. Schwächere Expression findet sich jeweils in den En Expressionsdomänen, sowie im Labialsegment. Bis St11e wird die Expression von *Ama* insgesamt intensiver, die fehlende Expression im Labialsegment (bzw. PS2, vergleiche Text) tritt deutlich hervor (markiert durch cyanfarbene Linie). Im späteren St11 exprimieren hauptsächlich laterale Bereiche, sowie Zellen der Mittellinie *Ama*, im sich bildenden VNS findet sich keine mRNA Expression mehr. (D-I) Expression von *Ama* mRNA in verschiedenen *Antp*-K Mutanten im St11e im Vergleich zum WT, die Bereiche mit veränderter Expression sind jeweils durch farbige Linien (gelb: wildtypische Reduktion im Labialsegment, rot: Reduktion im

Vergleich zum WT, cyan: verstärkt im Vergleich zum WT) markiert. (D) *Ama* wird bei Funktionsverlust von *Scr* ektopisch im Bereich des Labial- und anterioren Maxillarsegments exprimiert. (E) Bei Funktionsverlust von *Dfd* ist die Expression von *Ama* im Bereich des Maxillar- und Mandibularsegments verringert. (F) Bei gleichzeitigem Funktionsverlust von *Dfd* und *Scr* wird *Ama* einerseits im Mandibular- und Maxillarsegment weniger stark exprimiert, die Expression im Bereich des Labialsegments ist jedoch gesteigert. (G) Bei gleichzeitigem Funktionsverlust von *lab* und *Dfd* fehlt zusätzlich die starke Expression im Tritocerebrum. (H) Bei Funktionsverlust von *Dfd* mit *Antp* ist die Expression im Bereich des Thorax (insbesondere der Segmente T1 und T2) ebenfalls verringert, in Segment T3 ist die Expression ebenfalls schwächer als in den abdominalen Segmenten (gestrichelte rote Linie). (I) Semi-quantitative Analyse der Pixelintensitäten des Signals der *Ama* mRNA Expression im WT und den verschiedenen Einzel- und Doppelmantanten der *Antp*-K Gene. Die Abweichung der Intensität ist jeweils auf Segment T2 desselben Embryos bezogen und wird entlang der y-Achse dargestellt. Die Intensität ist innerhalb der *Scr* exprimierenden Domäne sowohl in *Scr*¹⁷ Einzelmutanten, als auch in *Dfd*¹⁶*Scr*⁴ Doppelmantanten gesteigert. In der *Dfd* exprimierenden Domäne ist deutlich eine Reduktion der Intensität sowohl in *Dfd*¹⁶ Einzelmutanten, als auch in *Dfd*¹⁶*Scr*⁴, *lab*¹*Dfd*¹² und *Dfd*¹⁶*Antp*⁷ Mutanten zu messen.

3.8.3.2. *Deformed*, *Antennapedia* und *labial* wirken aktivierend auf *Amalgam* Transkription

Die weitere Analyse ergab, dass *Dfd* Funktion für die korrekte Transkription von *Ama* mRNA in der *Dfd* Expressionsdomäne notwendig ist. In *Dfd* Mutanten ist besonders im Maxillarsegment, aber auch im anterioren Bereich des Mandibularsegments nur noch sehr schwache *Ama* Expression über mRNA in situ sichtbar (Abb. 3-50 E).

Somit erfüllt *Ama* schon zwei wichtige Punkte der Arbeitshypothese: es wird von *Scr* reprimiert und von *Dfd* aktiviert. In Doppelmantanten von *Dfd* und *Scr* zeigt sich die unterschiedliche Regulation von *Ama* ebenfalls, wenn auch nicht ganz so deutlich wie in den Einzelmutanten. In *Dfd*¹⁶*Scr*⁴ Doppelmantanten ist im Bereich des Labialsegments die Expression von *Ama* im Vergleich zum WT verstärkt, im Bereich der *Dfd* Expressionsdomäne hingegen etwas abgeschwächt (Abb. 3-50 F). Somit ist nun für die Erklärbarkeit der beobachteten Effekte von zusätzlichem Funktionsverlust zweier *Antp*-K Gene fraglich, ob zusätzlicher Funktionsverlust von *lab* oder *Antp* den durch *Dfd* oder *Scr* bestehenden Einfluss auf *Ama* mRNA Expression weiter verändert.

In Doppelmantanten von *lab*¹*Dfd*¹² ergibt sich eine dramatische Reduktion der *Ama* mRNA Expression vom Tc bis einschließlich des Maxillarsegments (Abb. 3-50 G), in *Dfd*¹⁶*Antp*⁷ Mutanten vom Mandibularsegment bis zu T2, im Segment T3 ist die Expression im Vergleich zu den abdominalen Segmenten ebenfalls noch merklich reduziert (Abb. 3-50 H).

Um die beobachteten Intensitäten der unterschiedlichen Expressionsstärken zu objektivieren, wurden semi-quantitative Pixelintensitätsmessungen durchgeführt (die hierzu gewonnenen Daten wurden in Zusammenarbeit mit Christian Berger erstellt). Hierfür wurde die Intensität der *Ama* Expression in der *Dfd* exprimierenden und der *Scr* exprimierenden Region in den verschiedenen genetischen Hintergründen gemessen und jeweils auf die Intensität im Segment T3 desselben Embryos bezogen. Die Messungen verdeutlichen eine Intensivierung des Signals in der *Scr* Expressionsdomäne bei Funktionsverlust von *Scr* alleine, sowie eine weniger starke Intensivierung des Signals bei doppeltem

Funktionsverlust von *Scr* gemeinsam mit *Dfd* (Abb. 3-50 I). Diese Intensivierung der *Ama* Expression in *Dfd¹⁶Scr⁴* Doppelmutanten kann eventuell die Transformationsrate von nur 17% in *Dfd¹⁶Scr⁴* Doppelmutanten im Vergleich zu den Daten der Einzelmутanten (*Scr*: 10%, *Dfd*: 43%) erklären.

Bei Funktionsverlust von *Dfd* alleine, oder in Kombination mit einem der anderen *Antp*-K Gene kommt es zu einer Abschwächung der *Ama* mRNA Expression in der *Dfd* exprimierenden Region (Abb. 3-50 I). Insgesamt ist auffällig, dass die wildtypische *Ama* mRNA Expression im Tc und anteriorem Mandibularsegment sehr stark ist, stärker als in weiter posterior gelegenen Segmenten. In *Dfd¹⁶Antp⁷* Mutanten erscheint die Intensität der Expression im Tc und anterioren Mandibularsegment im Vergleich zum Wildtyp noch mal gesteigert, hier ist ein sehr starkes Farbsignal sichtbar. Die Intensität dieser Expression wurde nicht quantifiziert.

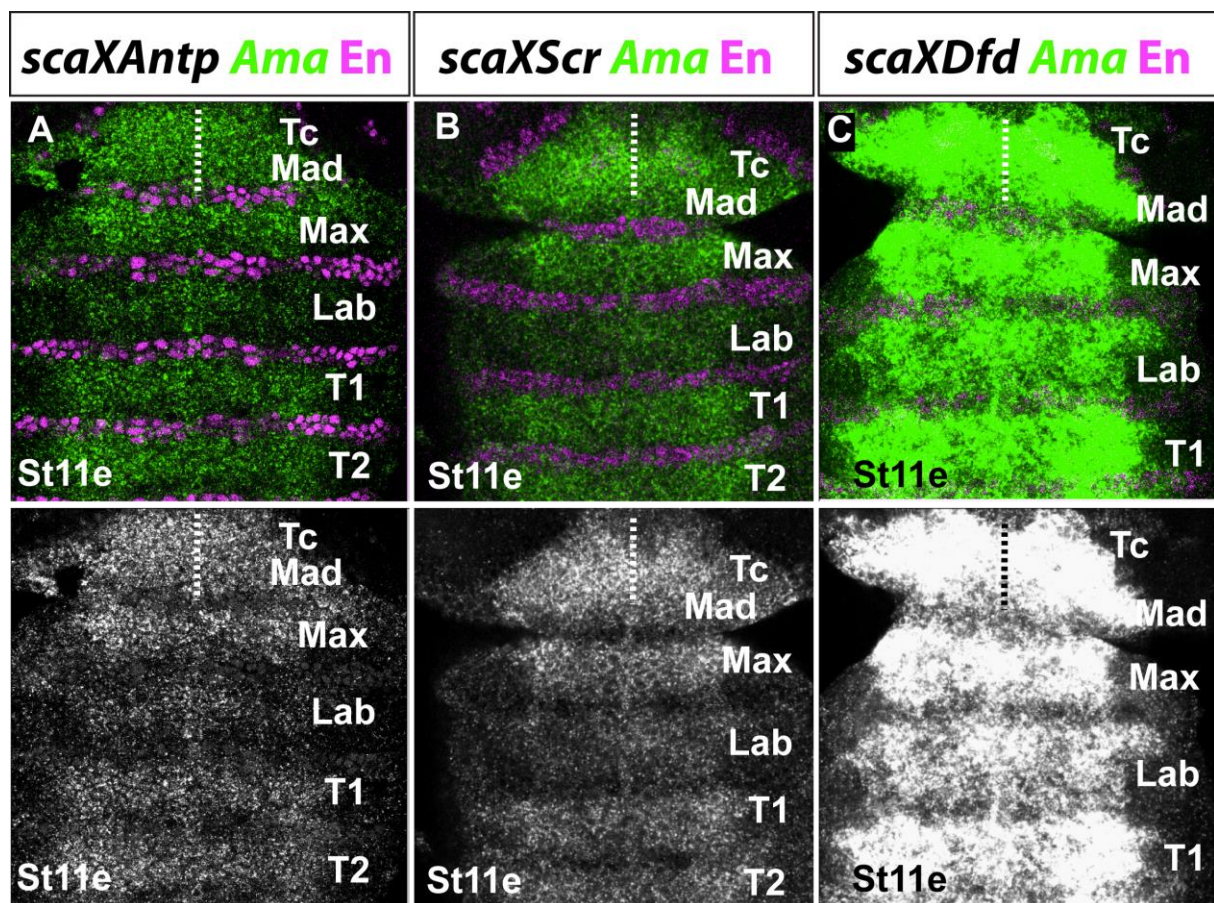


Abb. 3-51: Veränderung der Expression von *Ama* durch ektopisch exprimierte Hoxgene.

Ama mRNA in situ Hybridisierung (grün) und Antikörperfärbung gegen En (magenta) im St11e bei ektopischer Expression von *Antp*, *Scr* und *Dfd* mit *sca*-Gal4. (A) Ektopische Expression von *Antp* verändert die Expression von *Ama* nicht offensichtlich. (B) Ektopische Expression von *Scr* ruft keine offensichtliche Reduktion der *Ama* mRNA Expression hervor. (C) Die Expression von *Dfd* führt zu einer starken Expression von *Ama* mRNA in allen Segmenten.

Somit zeigen sich sowohl *lab* als auch *Antp* als Aktivator von *Ama* mRNA Expression in den jeweiligen Expressionsdomänen. Um hier eine weitere Einschätzung der regulatorischen Funktion der Hoxgene auf *Ama* treffen zu können, wurden *Dfd*, *Scr* und *Antp* ektopisch mit *sca*-Gal4 exprimiert, und anschließend die Veränderung der *Ama* Expression analysiert. Diese Kreuzungen und die in situ Hybridisierung wurden freundlicherweise von Simone Renner durchgeführt.

Ektopische Expression von *Antp* mit *sca*-Gal4 lässt keine abweichende Expression von *Ama* mRNA gegenüber dem WT erkennen (Abb. 3-51 A), ektopische Expression von *lab* wurde nicht auf ihren Effekt hin untersucht. Ektopische Expression von *Scr* mit *sca*-Gal4 reduziert die Expression von *Ama* mRNA nicht merklich (Abb. 3-51 B), allerdings ist hier die Expression von *Lab*, *Dfd* und *Antp* wildtypisch vorhanden und wirkt weiterhin aktivierend auf *Ama* Expression. Ektopische Expression von *Dfd* mit *sca*-Gal4 hingegen ruft eine deutlich gesteigerte Expression von *Ama* mRNA im gesamten VNS hervor (Abb. 3-51 C). Somit lässt sich festhalten, dass *Dfd* einen sehr starken regulatorischen Effekt auf die Expression von *Ama* hat, *Scr*, *Lab* und *Antp* hingegen nur in ihren wildtypischen Expressionsdomänen regulierend auf die Expression von *Ama* wirken.

3.8.4. DNA-Bindedomänen der *Antennapedia*-Komplex Gene im regulatorischen Bereich von *Amalgam* sind zwischen *Drosophilidaen* hoch konserviert

Da *Ama* bisher nicht als Zielgen von Hoxgenen bekannt wurde, stellt sich die Frage, ob *Ama* ein direktes Zielgen von *Antp*-K Genen ist, oder ob weitere Faktoren für die Regulation verantwortlich sind. Daher wurden die Enhancer-Regionen von *Ama* 5kb „upstream“ und „downstream“ der codierenden Region auf *Antp*-K Bindestellen untersucht. Sowohl für *Lab* und *Dfd* (Ebner et al., 2005; Joshi et al., 2010), für *Antp* (Affolter et al., 1990), als auch für *Scr* (Joshi et al., 2007) konnten Bindestellen identifiziert werden, die bis zu *Drosophila pseudoobscura* konserviert sind (siehe Anhang 7.1.). Diese Art der *Drosophilidea* hat sich bereits vor 25-50 mio Jahren von *Drosophila melanogaster* getrennt. Ein Erhalt von Bindestellen über die Evolution hinweg lässt eine wichtige regulatorische Funktion von *Antp*-K Genen auf *Ama* vermuten und verdeutlicht zudem die mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt stattfindende Regulation von *Ama* über *Antp*-K Gene. Die Analyse der Konservierung von *Antp*-K Bindestellen im *Ama* Enhancer wurde gemeinsam mit Christian Berger durchgeführt.

3.8.5. Die *Amalgam* Protein Expression ist im VNS sehr dynamisch

Da *Ama* für ein sezerniertes Protein codiert, ist die Verteilung von *Ama* Protein im Hinblick auf die Festlegung der segmentalen Identität des NB6-4max besonders interessant. Lässt sich die verminderte *Ama* mRNA Transkription in den hoxmutanten Hintergründen auf *Ama* Proteinebene ebenso verfolgen? Es wurde daher nun untersucht, ob sich die Proteinverteilung und die über Antikörperfärbungen nachvollziehbaren Proteinmengen in *lab¹Dfd¹²*, *Dfd¹⁶Antp⁷* und *Dfd¹⁶Scr⁴* Doppelmutanten und *Dfd* Einzelmutanten im Vergleich zum WT verändern.

3.8.5.1. Expression von Amalgam Protein im WT

Die Expression von Ama Protein ist anhand von Antikörperfärbungen schwer nachvollziehbar, da das Expressionsmuster bezüglich der Lokalisation innerhalb der Zellen, als auch in der gesamten Verteilung im VNS des Embryos sehr dynamisch ist (Abb. 3-52 A-D). Generell lässt sich im WT im St10 (Abb. 3-52 A) deutliche starke Ama Protein Expression im Tc und im Mad und schwache Expression in den weiter posterioren Segmenten feststellen. Bis zum frühen St11 (Abb. 3-52 B) erscheint das Protein deutlicher an der Oberfläche der Zellen lokalisiert und ist im gesamten VNS mit verminderter Proteinkonzentration im Bereich der Scr Expressionsdomäne exprimiert, was über das Entwicklungsstadium 11 durch stärkere Proteinexpression deutlicher wird (Abb. 3-52 C). Vom späten St11 (Abb. 3-52 D) an ist Ama Protein deutlich an den Zelloberflächen lokalisiert und uniform über das VNS verteilt. Da Scr die *Ama* mRNA Expression im PS 2 unterdrückt, ist die im späteren St11 beobachtbare gleichmäßige Verteilung über alle Segmente hinweg ein Hinweis darauf, dass Ama Protein über weitere Distanzen sezerniert wird.

3.8.5.2. In Doppelmутanten ist die Amalgam Protein Verteilung verändert

In *Dfd* Einzelmutanten ist im St10/St11e durch Antikörperfärbungen gegen Ama keine augenscheinliche Veränderung der Proteinverteilung im Vergleich zum WT bemerkbar. Zwar ist eine verminderte Expression im Bereich des Mandibular- und Maxillarsegments zu erahnen, die starke Expression im Bereich des Tritocerebrums bleibt jedoch erhalten und erweckt den Eindruck einer sehr starken Ama Protein Expression (Abb. 3-52 E). In *lab¹Dfd¹²* Mutanten ist im späten St10 jedoch im gesamten anterioren Bereich des VNS (der Bereich verminderter Expression ist in Abb. 3-52 F durch den seitlichen roten Balken gekennzeichnet) nur eine sehr geringe Menge an Ama Protein auch bis in spätere Stadien hinein über Antikörperfärbungen sichtbar (nicht gezeigt). In *Dfd¹⁶Antp⁷* Mutanten ist die Expression von Ama Protein im Bereich des Mandibularsegments bis einschließlich T2 stark reduziert, in T3 ist leichte Expression vorhanden (Abb. 3-52 G, Bereich der verminderten Expression gekennzeichnet durch den seitlichen Balken). In *Dfd¹⁶Scr⁴* Mutanten ist deutliche Expression im Bereich der thorakalen Segmente zu verzeichnen, in den dazu anterior gelegenen Segmenten ist die Expression stark verringert (Abb. 3-52 H). Im Bereich des Labialsegments erscheint die Proteinkonzentration nur sehr gering gegenüber dem Maxillarsegment erhöht (cyanfarbene Markierung). Eine starke Erhöhung der Proteinexpression im Labial- und posterioren Maxillarsegment aufgrund des Funktionsverlustes von Scr ist nicht feststellbar. Insgesamt ist die Expression von Ama Protein in den unterschiedlichen mutanten Hintergründen sehr schwer zu analysieren. Da jedoch kein weiterer Antikörper zur Verfügung stand, konnte hierauf leider nicht weiter eingegangen werden.

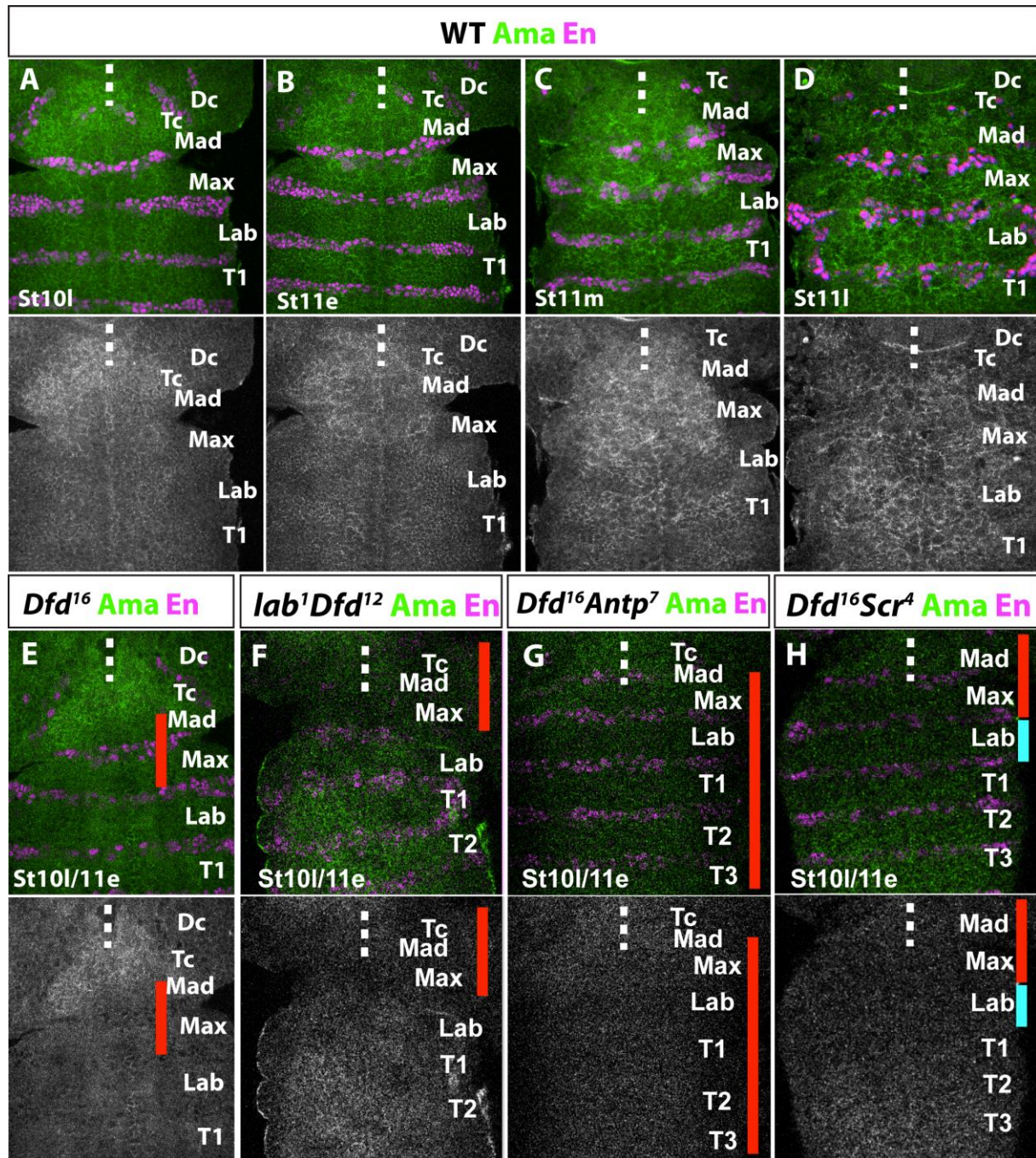


Abb. 3-52: Ama Protein Expression im WT, in *Dfd* Einzel- und *lab¹Dfd¹²*, *Dfd¹⁶Antp⁷* und *Dfd¹⁶Scr⁴* Doppelmutanten.

Antikörperfärbungen gegen En (magenta) und Ama (grün) im WT (A-D) und hoxmutanten Hintergründen (E-H, die Bereiche mit verringerter Expression sind über einen roten seitlichen Balken, die Bereiche verstärkter Expression über einen cyanfarbenen Balken gekennzeichnet). Die Expression von Ama ist in allen Abbildungen jeweils im unteren Bild im Einzelkanal in weiß für eine bessere Übersicht dargestellt. (A) Ama Protein wird in St10e stark in einer anterioren Domäne im Tritocerebrum und dem Mandibularsegment exprimiert, während die weiter posteriore Expression weniger stark erscheint. Im Bereich des PS 2 (Bereich des posterioren Maxillar- und des anterioren Labialsegments) ist kein Proteinsignal sichtbar. (B) In St11e wird die Lokalisation des Proteins deutlicher an der Zelloberfläche sichtbar. (C) Über das Entwicklungsstadium 11 hinweg wird das über Antikörperfärbung detektierbare Signal des Ama Proteins stärker. (D) Im St11l befindet sich das nun uniform auch im PS 2 verteilte Ama Protein hauptsächlich an die Zelloberfläche verteilt. (E) In *Dfd* Einzelmutanten ist im

Bereich des Mandibular- und Maxillarsegments die Expression zwar verringert, es wird in St 10I/11e jedoch ebenfalls die wildtypische starke Expression im Tc ausgebildet. (F) In *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten ist hingegen die starke anteriore Expression extrem reduziert. (G) In *Dfd¹⁶Antp⁷* Doppelmutanten ist die Expression ab dem Mandibularsegment stark reduziert. (H) In *Dfd¹⁶Scr⁴* Doppelmutanten ist deutliche Expression in den thorakalen Segmenten zu sehen, im Labialsegment ist die Expression gegenüber dem Maxillarsegment nur sehr geringfügig erhöht (Bereich der cyanfarbenen versus der roten Markierung).

3.8.6. Wie wirkt *Amalgam* auf die Identitätsfindung von NB6-4max?

Der delaminierende wildtypische NB6-4max exprimiert *Ama* Protein vor und nach seiner ersten Teilung (Abb. 3-53 A). Im Labialsegment ist im NB6-4 ebenfalls *Ama* Protein exprimiert. Es wurden keine zusätzlichen Dpn Färbungen angefertigt, jedoch verdeutlicht die *Eg* Expression im NB6-4 vor und während seiner ersten Teilung deutlich, dass *Ama* Protein bereits im Neuroblasten exprimiert ist (gegenläufig zu Seeger 1988, vergleiche auch Kapitel 3.9.). *Ama* Protein ist im NB6-4 immer zytoplasmatisch oder zelloberflächennah, niemals kernständig, was ebenfalls über die kernständige Lokalisation von *Eg* deutlich wird. In *lab¹Dfd¹²* ist auch im NB6-4max deutlich verminderte Expression von *Ama* im Vergleich zum WT feststellbar (Abb. 3-53 B).

Ama erfüllt somit die gesetzten Kriterien nach transkriptioneller Regulation durch Hoxgene, positiv durch *Lab*, *Dfd* und *Antp* und negativ durch *Scr*. Weiterhin hat *Ama* Funktionsverlust Auswirkungen auf die segmentale Identität des NB6-4max. *Ama* Protein wird sezerniert und liegt im Zytoplasma bzw. angelagert an die Zellmembran vor (eigene Färbungen, sowie Seeger et al., 1988; Fremion et al., 2000). Daher ist fraglich, wie *Ama* die Identität des NB6-4max beeinflussen kann? Aufgrund der Lokalisation kann *Ama* nicht direkt als Transkriptionsfaktor im Zellkern wirken. Möglicherweise gibt es also weitere von *Ama* beeinflusste Faktoren, die auf die Entstehung der segmentalen Identität von NB6-4max wirken könnten. Da für *Ama* über die Studien zur axonalen Wegfindung genetische Interaktionspartner bekannt sind, wurden zunächst die in diesem Zusammenhang identifizierten Cofaktoren *Nrt* und *Abl* auf mögliche Auswirkungen auf die segmentale Identität von NB6-4 weiter untersucht.

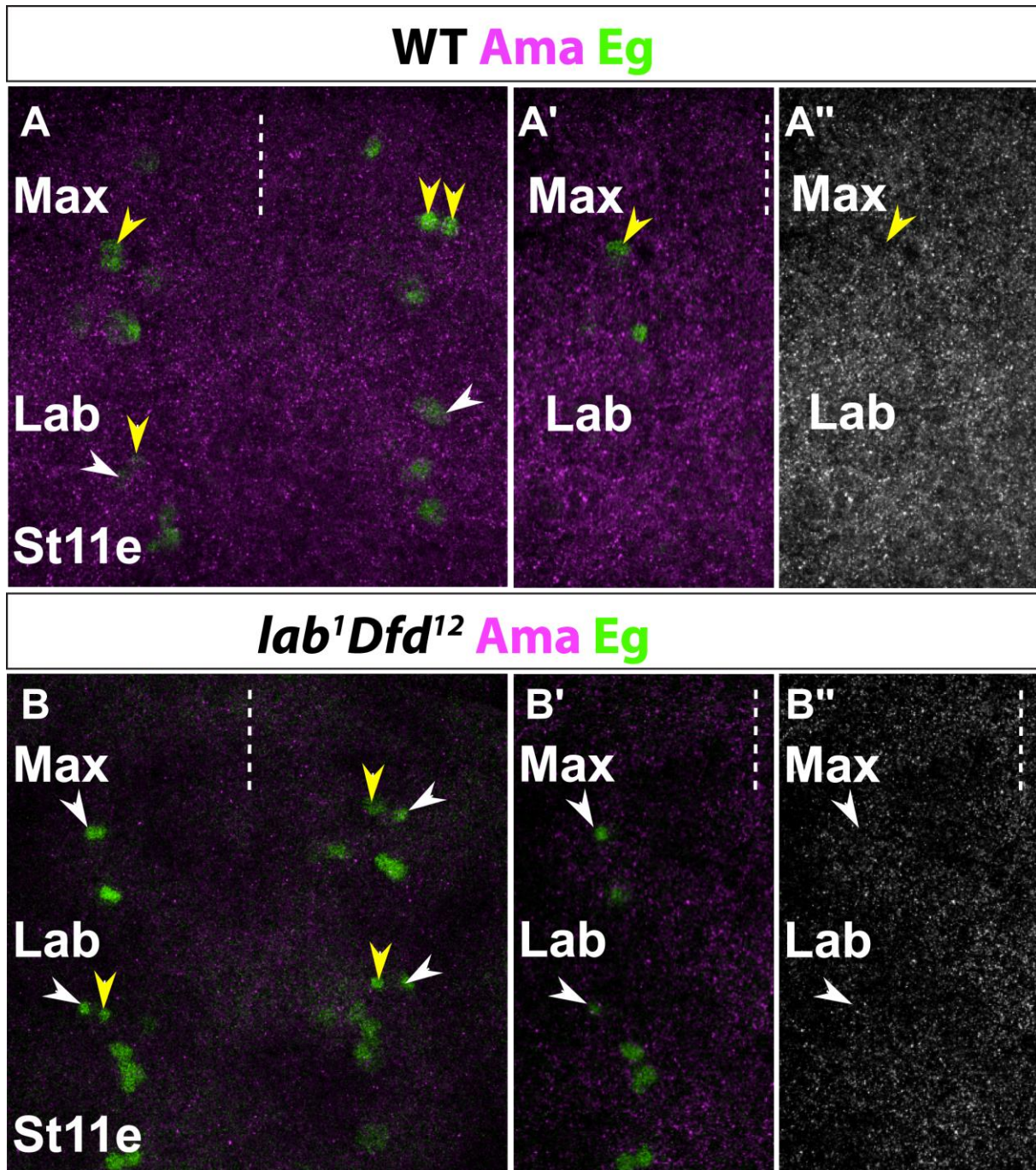


Abb. 3-53: Ama Protein Expression im gnathalen NB6-4.

Antikörperfärbung gegen Ama (magenta) und Eg (grün) für die Identifikation von Ama Protein im delaminierenden NB6-4 in St11e im WT (A) und *lab¹Dfd¹²* Mutanten (B). (A) Im WT ist Ama Protein sowohl im labialen als auch im maxillaren NB6-4, hier während der ersten Teilung, exprimiert. (A') Vergrößerung des linken Hemisegments und Darstellung des Ama Einzelkanal in (A''). (B) In *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten ist das Expressionslevel von Ama insgesamt sehr gering, auch im NB6-4max und NB6-4lab. (B') Vergrößerung des linken Hemisegments und Darstellung des Ama Einzelkanal in (B'').

3.8.7. Zusammenfassung des Kapitels 3.8.

In *Ama* Funktionsverlustmutanten wird der maxillare NB6-4 in 29% transformiert.

Ama mRNA und Protein Expression wird über *Antp*-K Gene reguliert, dabei wirkt Scr reprimierend und Lab, Dfd und Antp aktivierend.

In Doppelfunktionsverlustmutanten von *lab¹Dfd^{1/2}* ist *Ama* Expression im Vergleich zum WT stark reduziert.

3.9. *Neurotactin* besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max

Nrt wurde als Rezeptor von Ama identifiziert. Nrt ist ein single-pass Transmembranrezeptor-Protein, welches Ama Protein für seine Dimerisierung, und davon abhängiger Funktionalität als Zelladhäsions-Molekül, benötigt (Seeger et al., 1988; Fremion et al., 2000; Liebl et al., 2003; Zeev-Ben-Mordehai et al., 2009b).

3.9.1. Die Funktion von Neurotactin ist für die segmentale Identität von NB6-4max entscheidend

Veränderte Nrt Funktion hat Auswirkungen auf die segmentale Identität des NB6-4max. In 15% der Hemisegmente wird der NB6-4max in *Nrt¹* Mutanten zu einer gemischten Identität aus Neuronen und Gliazellen verändert (Abb. 3-54 A).

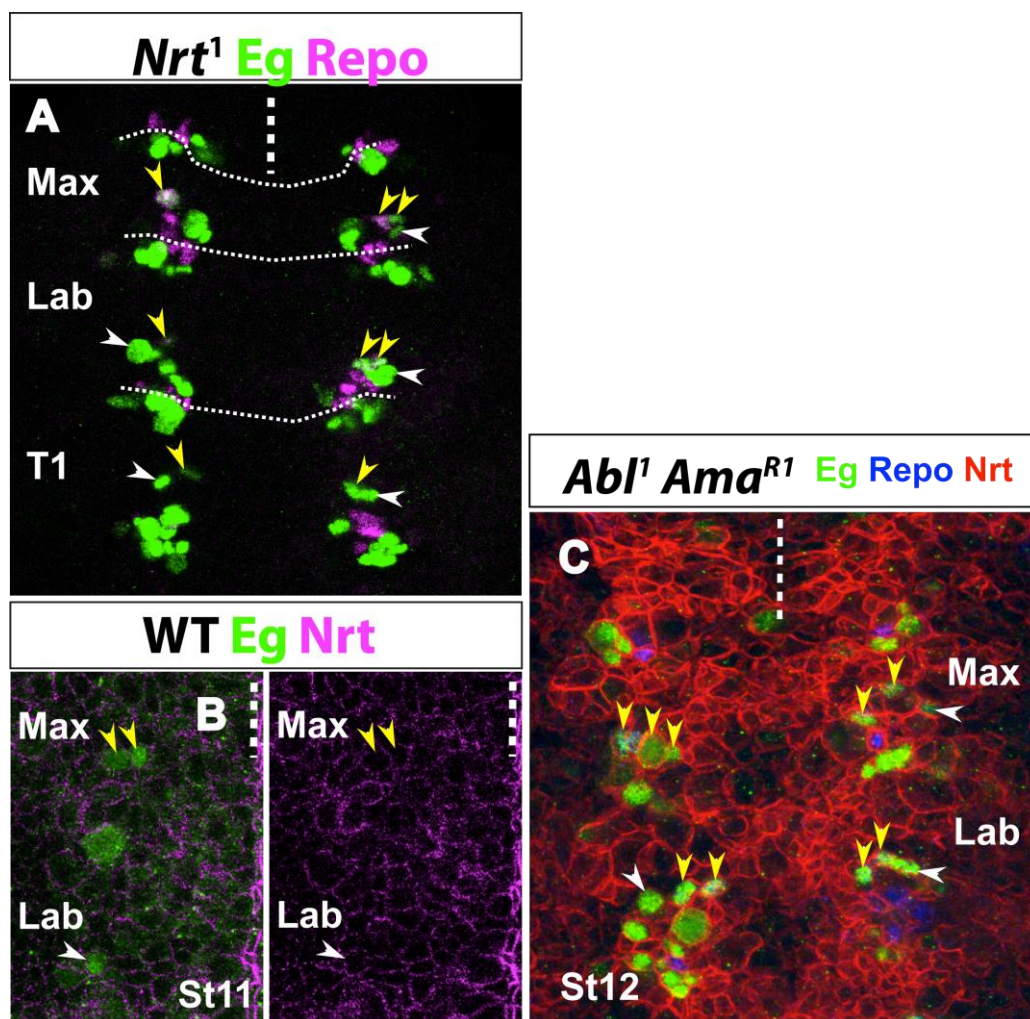


Abb. 3-54: Nrt besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.

(A) Antikörperfärbung gegen *Eg* (grün) und *Repo* (magenta) in *Nrt¹* Mutanten. Im maxillaren NB6-4 werden in 15% ektopische Neurone gebildet. (B) Wildtypische Expression von *Nrt* (magenta). Sowohl der maxillare, als auch der labiale NB6-4 exprimieren *Nrt*. (C) Expression von *Nrt* (rot) in *Abl¹Ama^{R1}* Mutanten. Die Expression von *Nrt* ändert sich im Vergleich zum WT nicht.

Die Transformationsrate von 15% ist im Vergleich zu der von *Ama^{R1}* mit mindestens 29% relativ gering. Obwohl verschiedene Allele untersucht wurden, *Nrt¹*, *Nrt²* und *Nrt^{M54}* (letzteres aus der Studie von Eric Liebl, das daher wiederum mit *Abl¹* gekoppelt ist) lässt sich keine gesteigerte Transformationsrate erreichen. In allen diesen drei Allelen wird ein verändertes Nrt Protein gebildet, die eventuell noch eingeschränkt funktional sein können (Speicher et al., 1998; Liebl et al., 2003).

3.9.2. Die Expression von Neurotactin ist unabhängig von *Antp*-K Gen Funktion

Die Expression von Nrt Protein ist im Vergleich von WT (Abb. 3-54 B) mit Mutanten des *Antp*-K (nicht gezeigt) und auch mit *Ama* Mutanten (Abb. 3-54 C) nicht verändert, in allen NB6-4max und allen weiteren Zellen des VNS ist deutlich Nrt Protein an der Zellmembran zu beobachten. Nrt Expression wird somit nicht über die Gene des *Antp*-K reguliert. Abweichungen von der Funktion durch fehlerhafte Dimerisierung bei Funktionsverlust von *Ama* lassen sich über die angefertigten Antikörperfärbungen offensichtlich nicht erkennen.

3.9.3. Die apiko-basale Lokalisation von Amalgam und Neurotactin in sich teilenden Neuroblasten ist unregelmäßig

Da *Ama* und Nrt aufgrund ihrer Lokalisation außerhalb des Zellkerns vermutlich nicht als Transkriptionsfaktoren wirken können, wäre eine Möglichkeit zur Beeinflussung der Identität von NB6-4 Nachkommenzellen über unterschiedliche Lokalisation dieser Faktoren vorstellbar. Nrt wurde in der Vergangenheit in Zusammenhang mit asymmetrischer Lokalisation am Zellcortex während der Zellteilung gebracht (Wodarz et al., 2000). Da für die Teilung von NB6-4 die Lokalisation von verschiedenen Faktoren symmetrisch oder asymmetrisch über die Entstehung von Neuronen entscheidet (Berger et al., 2005), wurde die genaue Lokalisation von Nrt im VNS in sich teilenden Neuroblasten untersucht.

Nrt wurde in delaminierenden Neuroblasten und sich vor der Teilung befindlichen Epithelzellen an der basolateralen Plasmamembran lokalisiert gefunden. Am apikalen Pol, an dem der apikale Faktor aPKC lokalisiert ist, wird Nrt nicht lokalisiert (Wodarz et al., 2000). Es wäre daher möglich, dass Nrt eine Rolle bei der asymmetrischen Verteilung von Faktoren im sich teilenden NB6-4 übernimmt, oder dass Nrt durch die Teilung selbst asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt wird. Somit könnte die Verteilung von Nrt bei der Teilung von NB6-4 ausschlaggebend für die Identität der Nachkommenzellen sein. Um diesem Verdacht nachzugehen, wurden zunächst im WT Antikörperfärbungen gegen den asymmetrisch lokalisierenden Faktor Miranda (Mira; Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Shen et al., 1997; Fuerstenberg et al., 1998b; Fuerstenberg et al., 1998c), Phosphohiston 3 (pH3; Li et al., 2010), das sich im kondensierten Spindelapparat anlagert und somit sich teilende Zellen erkennen lässt, und Nrt bzw. *Ama* angefertigt. Im nächsten Schritt sollte dann mithilfe von zusätzlicher Eg Färbung spezifisch die Verteilung von Nrt und von *Ama* in NB6-4max im WT, und anschließend transformierte NB6-4max in *lab¹Dfd¹²* Mutanten analysiert und miteinander verglichen werden.

Es lässt sich im Neuroektoderm von wildtypischen St10 Embryonen unregelmäßige Lokalisation von Nrt in delaminierenden und sich vor der Teilung befindlichen Neuroblasten beobachten. Die Lokalisation von Nrt ist im Bezug auf die Lokalisation von Mira nicht klar zu definieren. In einigen pH3 positiven Zellen ist Nrt vor der Teilung relativ deutlich basolateral lokalisiert (Abb. 3-55 A; markiert durch Pfeile), in anderen wiederum lässt sich keine deutliche asymmetrische Lokalisation von Nrt ausmachen (markiert durch Pfeilspitzen). Zu Beginn der Teilung (Abb. 3-55 A'), und auch während der Abschnürung der Tochterzelle (Abb. 3-55 A''), ist Nrt relativ gleichmäßig auf der Membran lokalisiert. Auch für Ama lässt sich weder regelmäßig vor der Teilung (Abb. 3-55 B), noch während der Teilung (Abb. 3-55 B') eine deutlich asymmetrische Lokalisation ausmachen. Aufgrund dieser uneindeutigen Ergebnisse und der im Weiteren gefundenen sehr vielversprechenden Ergebnissen wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Es kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass speziell im NB6-4max eine veränderte Verteilung von Nrt oder Ama vorliegen könnte, die mit einer veränderten segmentalen Identität einhergeht.

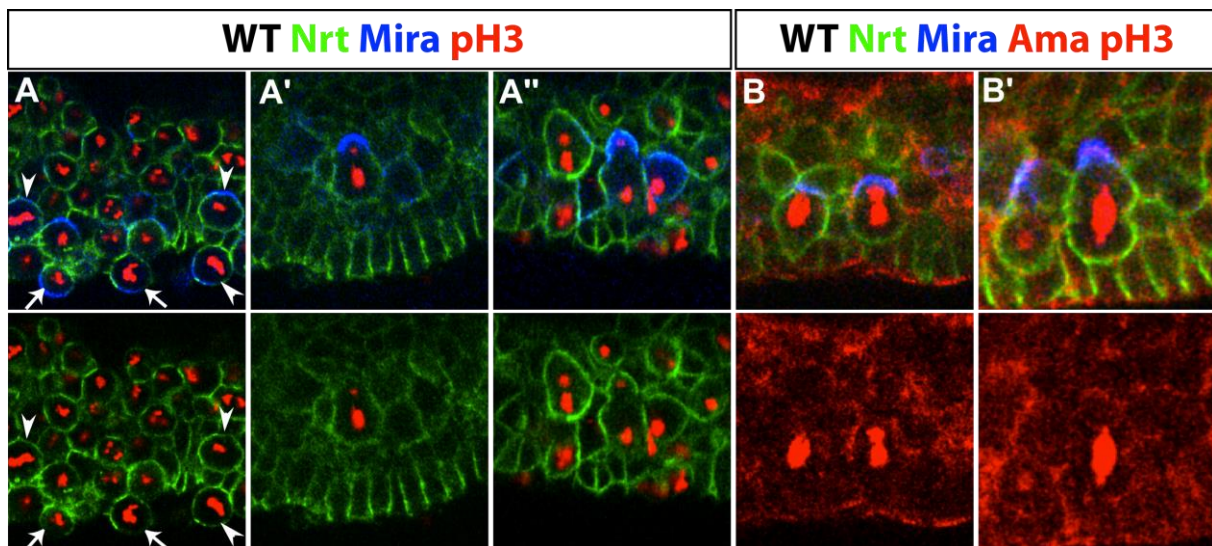


Abb. 3-55: Apiko-basale Lokalisation von Nrt und Ama in sich teilenden Neuroblasten.

Antikörperfärbungen gegen (A) Nrt (grün), Miranda (blau) und pH3 (rot), sowie (B) gegen Nrt (grün), Mira (blau), Ama (rot) und pH3 (ebenfalls rot, aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation unterscheidbar) im Neuroektoderm des WT im St10. Delaminierte Neuroblasten sind durch ihre Zellgröße deutlich zu erkennen. Die Konzentration von pH3 im Zellkern lässt sich in Teilung befindliche Neuroblasten erkennen. Durch die Antikörperfärbung gegen Nrt werden die Zellumrisse deutlich. Mira lokalisiert asymmetrisch innerhalb der sich teilenden Zellen, so dass im Bezug zu Mira die Lokalisation von Nrt und Ama deutlich wird. (A) Nrt lokalisiert in einigen Zellen relativ gleichförmig und lässt keine Abschwächung im apikalen Bereich erkennen (betroffene Zellen sind markiert durch weiße Pfeilspitzen), in anderen Zellen ist im apikalen Bereich keine Nrt Lokalisation erkennbar (markiert durch weiße Pfeile). Auch in sich gerade teilenden Zellen (A') ist keine eindeutige Lokalisation von Nrt in nur eine der verbleibenden Zellen erkennbar. Das zeigt sich auch bei beginnender Abschnürung der Tochterzelle (A''), vielmehr findet sich gleichförmige Lokalisation von Nrt. (B) Die Lokalisation von Ama ist unregelmäßig im Bezug zu Nrt und zu Mira, es lässt sich keine eindeutige apikale oder basale Lokalisation erkennen.

3.9.4. Vermitteln Amalgam und Neurotactin ein Signal für die korrekte segmentale Identität von NB6-4max?

Es wäre möglich, dass die Transformation des NB6-4max in *Nrt* Mutanten durch nicht korrekte Weitergabe eines von Ama ausgehenden Signals zustande kommen könnte. Diese Annahme setzt voraus, dass Ama durch seinen Rezeptor Nrt Signale an weitere Faktoren in die Zelle vermittelt, und diese Faktoren im Weiteren auf das Teilungsverhalten von NB6-4max wirken. Ein möglicher Kandidat für einen, das Ama-Signal über Nrt empfangenden Faktor, ist *Disabled (Dab)*. Funktionen von *Dab* wurden in der Vergangenheit versehentlich mit *Nrt*-mutanten Phänotypen verwechselt, so wurden *Nrt* Allele fälschlicherweise als Mutationen im *Dab* Gen publiziert (aufgeklärt durch Liebl et al., 2003). Funktionen von *Dab* für die axonale Wegfindung konnten anschließend jedoch zweifelsfrei identifiziert werden (Song et al., 2010).

3.9.5. Zusammenfassung des Kapitels 3.9.

Bei Nrt Funktionsverlust wird NB6-4max in 15% zu neuronaler Identität transformiert. Die Expression von Nrt ist unabhängig von *Antp*-K Genfunktion und von Ama Funktion.

3.10. Disabled besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max

Dab ist ein Adapterprotein mit einer phospho-tyrosin Bindedomäne (Gertler et al., 1993; Howell et al., 1997; Le und Simon, 1998). Es wurde als Komponente des *Abl* Signalweges identifiziert (Hoffmann, 1991; Song et al., 2010), in dem es mit Abl colokalisiert und für die Verteilung von Abl Protein notwendig ist (Gertler et al., 1993; Hill et al., 1995; Liebl et al., 2003).

3.10.1. Funktionsverlust von *Disabled* führt zur Transformation des NB6-4max

Funktionsverlust von *Dab*¹ führt im NB6-4max in 40% (n=37 Embryonen) zu einer Transformation von einer rein glialen hin zu neuronaler und glialer Identität der Nachkommenzellen (Abb. 3-56 A- A''). Da sowohl *Ama*, als auch *Nrt* und *Dab* Funktionsverlust eine Veränderung der Identität von NB6-4max hervorrufen und alle diese Faktoren als Interaktoren von *Abl* gefunden wurden, wurde im Anschluss an die Expressionsanalyse von Dab trotz der negativen Ergebnisse für *Abl*¹ als weiteres *Abl* Allel *Abl*^d auf seine Funktion für NB6-4 untersucht.

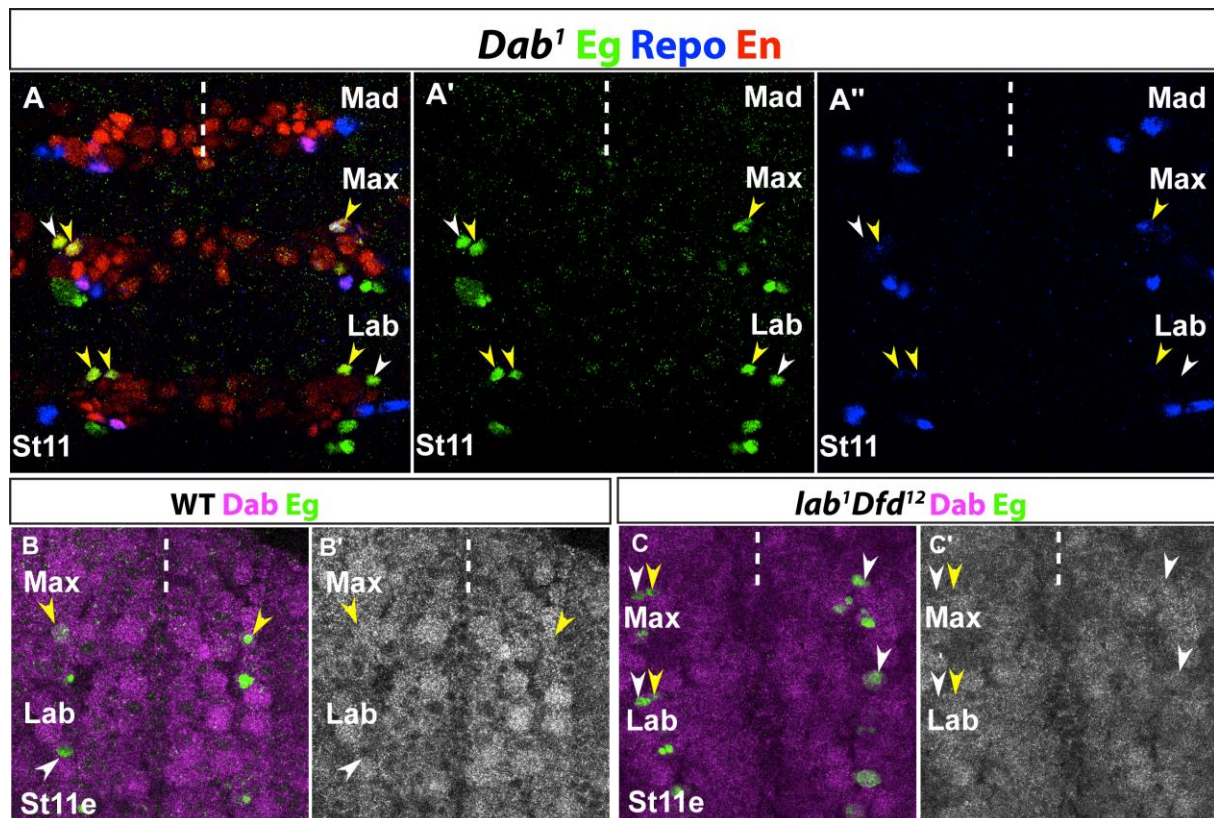


Abb. 3-56: Dab besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün, in A' im Einzelkanal), Repo (blau, in A'' im Einzelkanal) und Gsb (rot) in *Dab*¹. Die Fokusebene liegt auf dem maxillaren NB6-4, daher ist das labiale Neuron nicht sichtbar. Der maxillare NB6-4 bildet in 40% ektopische Neurone. (B und C) Antikörperfärbung gegen Dab (magenta, in B' und C' in weiß) und Eg (grün) im WT (B) und *lab*¹*Dfd*¹² Doppelmutanten (C). Im WT (B) wird Dab sowohl im maxillaren als auch im labialen NB6-4 exprimiert. In *lab*¹*Dfd*¹² (C) ist das Expressionslevel von Dab stark verringert.

3.10.2. Disabled Proteinlevel ist zwischen WT und *lab¹Dfd¹²* Mutanten reduziert

Dab Protein ist im wildtypischen VNS im maxillaren und labialen NB6-4 während der Delamination und auch während der ersten Teilung exprimiert und liegt zytoplasmatisch lokalisiert vor (Abb. 3-56 B). Um Vergleichbarkeit von wildtypischem und mutantem Proteinlevel zu bekommen, wurden die Antikörperfärbungen unter exakt denselben Bedingungen zeitgleich durchgeführt und auch die Aufnahmeparameter wurden nicht verändert. In *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten ist Dab Protein über Antikörperfärbungen erkennbar reduziert und weniger deutlich lokalisiert (Abb. 3-56 C).

3.10.3. Zusammenfassung des Kapitels 3.10.

Bei Funktionsverlust von *Dab* tritt eine Transformationsrate von 40% des maxillaren NB6-4 auf.

Dab Protein Expression ist in *lab¹Dfd¹²* Mutanten im Vergleich zum WT reduziert.

3.11. Sind die gefundenen Effekte auf den Funktionsverlust der *Abl* tyrosin kinase zurück zu führen?

Abl, das *Drosophila*-Homologe zu c-Abl der Vertebraten, gehört zu den Nicht-Rezeptor Tyrosin Kinasen (Henkemeyer et al., 1990; Gertler et al., 1993; Comer et al., 1998) und übernimmt im Zusammenhang mit der Entstehung des Nervensystems in *Drosophila* Aufgaben bei der Wegfindung von Neuronen (Elkins et al., 1990; Henkemeyer et al., 1990; Gertler et al., 1993; Zhu und Bhat, 2011). Weiterhin übernimmt Abl Regulationen der embryonalen Entwicklung durch seine Funktion als Aktinregulator (Grevengoed et al., 2001; Harden, 2002).

Die veränderte Funktion von *Abl^l* Mutation hat auf NB6-4max keinerlei Auswirkungen (vergleiche Abb. 3-48 A). Eric Liebl fand allerdings in seiner Studie verstärkte Effekte, wenn er die *Abl^l/Ama* Mutanten über *Abl^d*, anstatt über *Abl^l*, transheterozygot kreuzte. *Abl^d* ist im Gegensatz zu *Abl^l* eine Protein-Null-Mutation (Grevengoed et al., 2003), die keine Kinasedomäne mehr besitzt (Smith und Liebl, 2005). Abl besitzt eine maternale Komponente (Wadsworth et al., 1985), allerdings ist Abl in *Abl^d* nicht, oder in wenigen Fällen nur sehr schwach, mit Antikörperfärbung in St10 und St11 sichtbar (nicht gezeigt), d.h. Restprotein von einer maternalen Komponente ist in diesem, für die Identitätsfestlegung von NB6-4 entscheidendem Stadium, nicht oder nur schwach vorhanden.

Daher stellte sich aufgrund der Einflüsse von Dab, Nrt und Ama Funktionsverlust auf NB6-4max die Frage, ob *Abl^d* Auswirkungen auf die segmentale Identität hat?

3.11.1. Funktionen der *Abl* tyrosin kinase sind für die segmentale Identität von NB6-4max verantwortlich

Überraschenderweise verändert *Abl^d* Mutation den NB6-4max in 41% (n>100 Embryonen) von rein glialer Identität der Nachkommenzellen hin zu einer gemischten Identität aus Glia und Neuronen (Abb. 3-57 A). Die Mutationsrate von *Abl^d* ist mit der von *Dfd* Einzelmutation mit 43% und von der mit *Dab* von 40% vergleichbar. Sollte Abl ein entscheidender Faktor sein, der durch *lab* oder *Antp* Funktion reguliert ist, so muss die Expression von Abl in *lab¹Dfd^{l2}* Mutanten im Vergleich zum WT verändert sein.

3.11.2. Unterschiede der Lokalisation von Abl Protein im WT und in der *lab¹Dfd^{l2}* Doppelmutante

Abl Antikörperfärbungen wurden mit einem von Edward Giniger (Song et al., 2010) zur Verfügung gestellten Antikörper durchgeführt. Bisher ist über die Expression von Abl im VNS, insbesondere auf Einzelzellniveau, nicht viel bekannt (Gertler et al., 1989; Bennett und Hoffmann, 1992). Leider war die Antikörperfärbung mit etlichen methodischen Schwierigkeiten verbunden, der Antikörper erforderte eine sehr aufwendige Handhabung. Daher wurde sich bei der Analyse des Expressionsmusters in den Mutanten auf die *lab¹Dfd^{l2}* Doppelmutante konzentriert, da hier die höchste Transformationsrate von NB6-4max auftritt. Die Antikörperfärbungen für die Analyse der Abl Expression im NB6-4 wurden

zwischen WT und *lab¹Dfd¹²* Doppelmutante ebenfalls zeitgleich unter exakt denselben Bedingungen durchgeführt und ausgewertet.

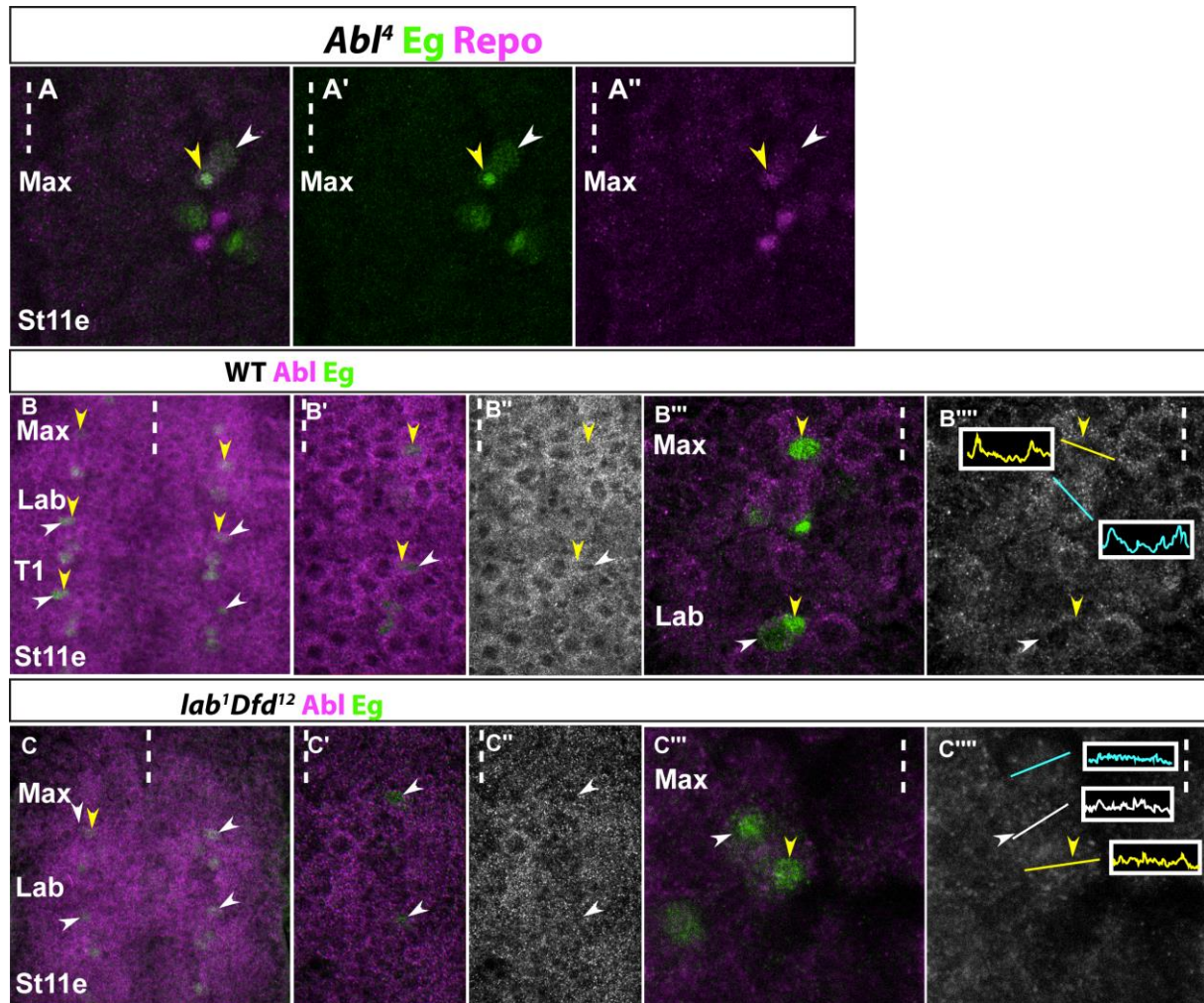


Abb. 3-57: Abl besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (magenta) im gnathalen VNS von *Abl⁴* Mutanten. NB6-4max bildet in 41% ektopische Neurone aus. (B, C) Antikörperfärbungen gegen Eg (grün) und Abl (magenta, in B'' und C'' in weiß) in (B) WT und (C) *lab¹Dfd¹²* Mutanten. (B' und C') Vergrößerungen des linken Hemisegments. (B''' und C''') starke Vergrößerung und Einzelebene zur Verdeutlichung von NB6-4max und NB6-4lab der linken Hemisegmente. Im WT ist Abl deutlich im gesamten VNS exprimiert (B), auch im NB6-4 (B'-B''') ist eindeutig keine Lokalisation von Abl im Zellkern sichtbar. (B''') Pixelintensitätsmessung der Verteilung des Abl Antikörpersignals über die Zelle hinweg entlang der gezogenen Linie. Sowohl in NB6-4max (dargestellt in gelb), als auch in einem anderen NB (dargestellt in cyan) ist anhand der Verteilung der Pixelintensität eine stärkere Konzentration kortikal und zytoplasmatisch, sowie schwache Intensität im Bereich des Zellkerns zu beobachten. (C) In *lab¹Dfd¹²* Mutanten ist die gesamte Expression von Abl im Neuroektoderm reduziert. Die Lokalisation von Abl im NB6-4 lässt sich nicht mehr eindeutig erkennen (C'-C'''). (C''') Pixelintensitätsmessung im neuronalen Anteil des NB6-4max (in weiß), im glialen Anteil des NB6-4max (in gelb), sowie in einem anderen NB (in cyan) lassen eine uniforme Verteilung des Abl Antikörpersignals erkennen.

3.11.2.1. Abl Proteinlevel ist in *lab¹Dfd¹²* im Vergleich zum WT stark reduziert

Abl Protein liegt im VNS des WT in St11, ebenso wie Dab und Ama Protein, zytoplasmatisch lokalisiert vor (Abb. 3-57 B). NB6-4max und auch NB6-4lab exprimieren Abl ab der Delamination (Abb. 3-57 B’; gegenläufig zu Bennett und Hoffmann, 1992, die keine Expression in Neuroblasten feststellen konnten) und auch während der ersten Teilung (Abb. 3-57 B’’). Ab frühem St12 verlagert sich der Großteil der Abl Proteinkonzentration nach kortikal an die Zellmembran. In *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten ist das Proteinlevel in St11 insgesamt stark reduziert (Abb. 3-57 C) und die Lokalisation ist schwer zu bestimmen (Abb. 3-57 C’’). Messungen der Pixelintensitätsverteilung des Färbesignals der Abl Antikörperfärbung über NB6-4max, sowie einen beliebigen weiteren Neuroblasten im WT (Abb. 3-57 B’’’) und in *lab¹Dfd¹²* (Abb. 3-57 C’’’) hinweg, lässt im WT generell eine kortikale und zytoplasmatische Lokalisation erkennen, während in den Mutanten eine uniforme Verteilung auftritt (vergleiche auch Abb. 3-58).

Intrazelluläre Lokalisation von Abl Protein wurde mit unterschiedlichen Funktionen in Verbindung gebracht. So wird eine katalytisch inaktive Form in Axonen zytoplasmatisch lokalisiert, während Abl Protein mit aktiver Kinasefunktion kortikal vorliegt (Henkemeyer et al., 1990; Bennett und Hoffmann, 1992; Stevens et al., 2008). Henkemeyer findet jedoch *Abl¹* Protein ebenfalls verändert lokalisiert, obwohl hier die Kinasedomäne intakt ist (Henkemeyer et al., 1990, Smith und Liebl, 2005). Für das Vertebraten-Homologe von Abl, c-Abl, ist eine kernständig lokalisierte Form bekannt, die keine Kinasefunktion mehr besitzt (Wang, 2000). Für *Drosophila* ist eine solche kernständig lokalisierte Form jedoch nicht bekannt. Da in den *lab¹Dfd¹²* Mutanten die Lokalisation von Abl durch das insgesamt zu schwache Färbesignal nicht deutlich ist, wurde die Lokalisation von Abl innerhalb der Zelle genauer untersucht, und auf Expression innerhalb des Zellkerns geachtet. Es wäre möglich, dass durch die veränderte Lokalisation von Abl in *lab¹Dfd¹²* Mutanten abweichend zum WT Effekte erzeugt werden.

3.11.2.2. Abl ist weder in *lab¹Dfd¹²* Mutanten noch dem Wildtyp im Zellkern lokalisiert

Mithilfe von Lamin Antikörperfärbungen wurde die Zellkernmembran im VNS von frühen St11 Embryonen gefärbt und somit eine Analyse der genauen Lokalisation von Abl innerhalb und angrenzend an den Zellkern von Neuroblasten möglich. Im WT verdeutlicht die Lamin Färbung eindeutig die ringförmige zytoplasmatische Lokalisation von Abl außerhalb des Zellkerns (Abb. 3-58 A). Selten ist zudem eine kortikale Anreicherung in diesem frühen Stadium erkennbar. In *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten ist das Abl-Färbesignal in den meisten Zellen zu schwach, um eine deutliche Lokalisation erkennen zu können. In den Zellen, in denen die Lokalisation des Abl Proteins über Antikörperfärbung deutlich wird, ist es eindeutig ebenfalls außerhalb des Zellkerns lokalisiert (Abb. 3-58 B).

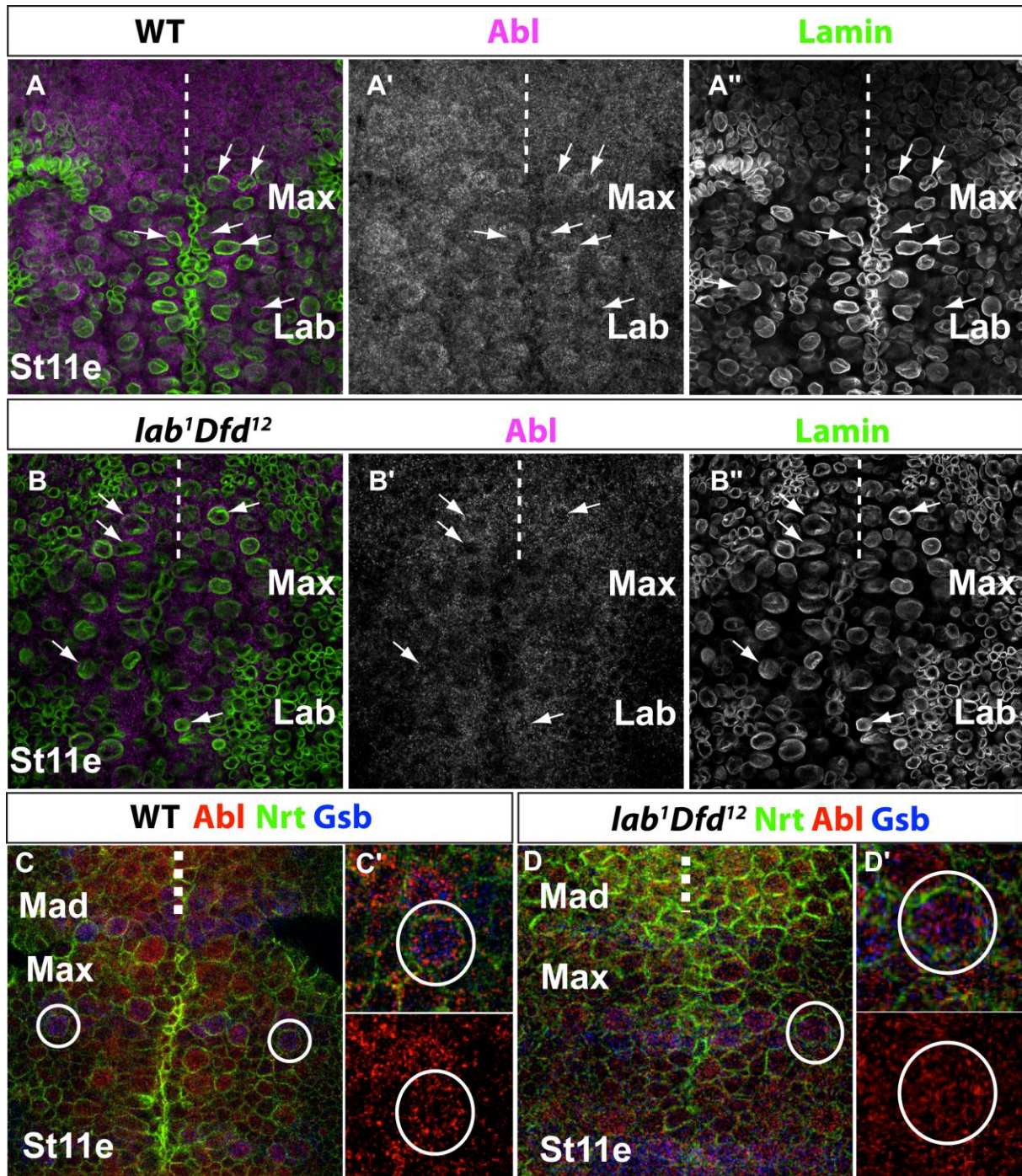


Abb. 3-58: Lokalisation von Abl Protein.

(A, B) Antikörperfärbung gegen Abl (magenta, A' und B' Einzelkanal in weiß) und Lamin (grün, A'' und B'' Einzelkanal in weiß), über das die Zellkernmembran sichtbar wird, im WT (A) und in *lab¹Dfd¹²* (B). Während im WT Abl eindeutig außerhalb der Zellkernmembran im Zytoplasma lokalisiert ist (zur Verdeutlichung sind einige Zellen mit Pfeilen markiert), ist in *lab¹Dfd¹²* durch das schwache Expressionsniveau die Lokalisation nur in wenigen Zellen nachvollziehbar. Dort ist Abl Protein ebenfalls eindeutig außerhalb des Zellkerns lokalisiert (Zellen markiert durch weiße Pfeile). (C-D) Antikörperfärbung gegen Abl (rot), Nrt (grün) und Gsb (blau) im WT (C) und in *lab¹Dfd¹²* (D). (C' und D') Vergrößerung des rechten NB6-4max. Im NB6-4max des WT ist Abl kortikal lokalisiert (C'), während in *lab¹Dfd¹²* keine kortikale Lokalisation erkennbar ist (D').

Somit ist in *lab¹Dfd¹²* Mutanten vermutlich weder eine unterschiedliche Lokalisation in den Zellkern noch eine unterschiedliche Funktion von Abl entscheidend. Vielmehr könnte die geringe Menge und damit die fehlende Funktion von Abl die gesteigerte Transformationsrate in *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten verursachen. Weiterhin könnten Unterschiede bei der Aktivität von Abl als Kinase bestehen. Mögliche Unterschiede zwischen kortikaler Anreicherung versus zytoplasmatischer Lokalisation können durch diese Färbung nicht eindeutig erkannt werden und lassen daher keine Aussagen über veränderte Kinaseaktivität zwischen WT und *lab¹Dfd¹²* Mutanten zu. Daher wurde weiterführend über die Pixelintensitätsmessung (vergleiche Abb. 3-57 B''''', C''''') hinaus versucht, über einen kortikalen Marker die genaue Lokalisation von Abl Protein am Zellkortex des maxillaren NB6-4 im Vergleich zwischen WT und *lab¹Dfd¹²* zu bestimmen (Abb. 3-58 C und D).

3.11.2.3. Kortikale Anreicherung von Abl liegt nur im wildtypischen NB6-4max, jedoch nicht in *lab¹Dfd¹²* vor

Nrt befindet sich als Transmembranrezeptor in der Zellmembran lokalisiert und kann daher als Marker für die Zelloberflächenmembran verwendet werden. Um NB6-4max eindeutig zu ermitteln wäre eine Antikörperfärbung gegen Eg das Mittel der Wahl, leider ließ die Kombination der notwendigen Antikörper keine zusätzliche Antikörperfärbung gegen Eg zu. Daher wurde Gsb gefärbt und das Neuroblastenmuster mit vorhergegangenen Färbungen mit En, Gsb und Eg (siehe Abbildung 3-1) verglichen, und so NB6-4 anhand der Lage als Gsb positiver Neuroblast ermittelt. Die Lokalisation von Abl im NB6-4max hat eindeutig kortikale Anteile (Abb. 3-58 C und C'), während in *lab¹Dfd¹²* (Abb. 3-58 D und D') keine kortikale Anreicherung erkennbar ist. Somit finden sich hier vermutlich Unterschiede zwischen der Kinaseaktivität von Abl in den unterschiedlichen genetischen Hintergründen.

3.11.3. Gleichzeitiger Funktionsverlust von *Abl* und *Deformed* verdoppelt die Transformationsrate von NB6-4max

Sollte Abl der gesuchte Faktor sein, der über einen nicht-zellautonomen parallelen Weg auf die segmentale Identität von NB6-4max wirkt, so müsste sich beim gemeinsamen Funktionsverlust von *Abl* mit *Dfd* die Transformationsrate von NB6-4max im Vergleich zu den Werten der Einzelmutanten stark steigern. Da es aufgrund der chromosomalen Nachbarschaft von *Ama* mit *Dfd* leider mit großen Schwierigkeiten verbunden wäre, eine Doppelmutante von *Dfd¹⁶* gemeinsam mit *Ama^{R1}* zu erzeugen, wurde nun stattdessen eine dritt-dritt-chromosomale Doppelmutante von *Dfd¹⁶* mit *Abl^t*, das auf Chromosom 3L lokalisiert ist, erzeugt.

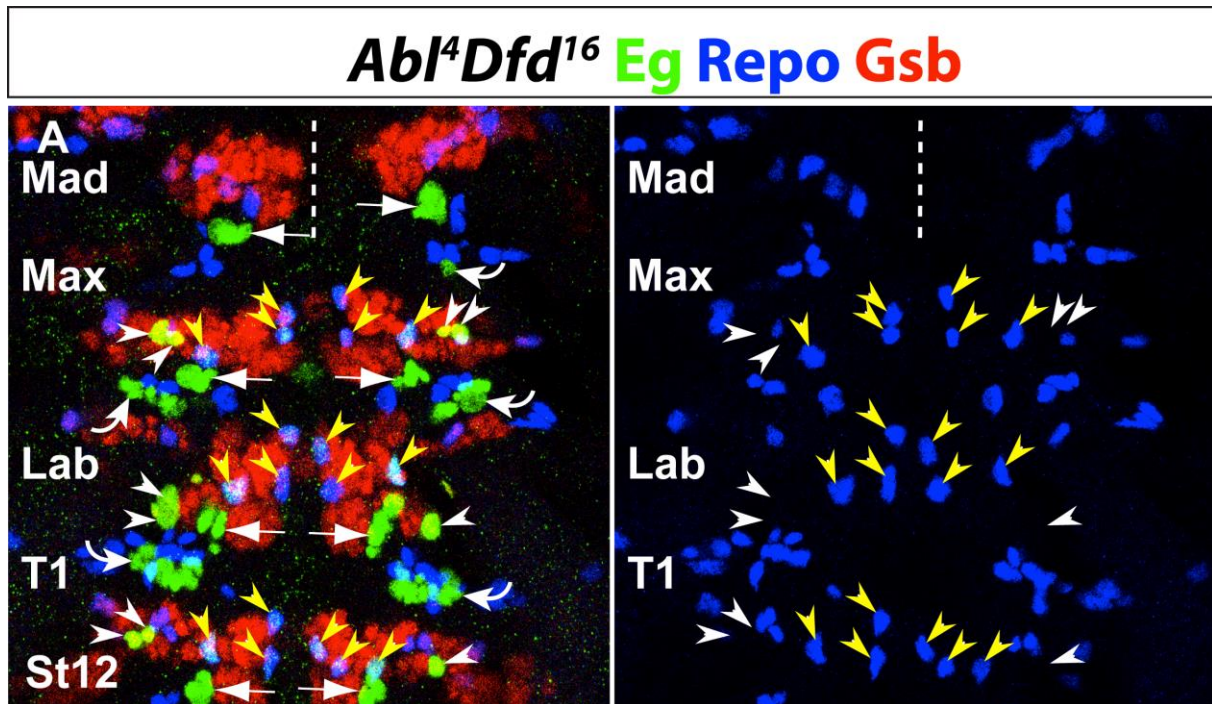


Abb. 3-59: Phänotyp der *Abl⁴Dfd¹⁶* Doppelmutante.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Repo (blau) und Gsb (rot) in *Abl⁴Dfd¹⁶* Doppelmutanten, die Darstellung zeigt keine Einzelebene. NB6-4max bildet in 95% ektopische Neurone aus; rechtes Panel Einzelkanal von Repo zur eindeutigen Bestimmung von glialer und neuronaler Identität.

In diesem mutanten Hintergrund ist NB6-4max in 95% (n=60 Embryonen) aller Hemisegmente transformiert (Abb. 3-59 A). Somit kann stark davon ausgegangen werden, dass *Abl* ein entscheidender Faktor in dem bisher entschlüsselten Netzwerk eines nicht-zellautonomen Regulationsweges für die Herstellung segmentaler Identität des NB6-4max ist und parallel zu *Dfd* segmentale Identität von NB6-4max bestimmt.

3.11.4. Expressionsdaten deuten auf einen möglichen Signalweg von Amalgam zur Abllesen Tyrosin Kinase hin

Die Transformationsdaten von *Ama*, *Nrt*, *Dab* und *Abl* Funktionsverlust, sowie die Steigerung der Transformation bei *lab* und *Dfd* oder *Abl* und *Dfd* Doppelfunktionsverlust, als auch die Daten aus der Literatur der bisher bekannten Verknüpfungen der einzelnen Faktoren, lassen folgende Frage aufkommen: Liegt hier ein Signalweg vor? So könnte ein Signal über die Regulation von *Ama* Transkription durch die Gene des *Antp*-K auf den Rezeptor *Nrt* weiter geleitet werden, und darüber eine Signalvermittlung auf das Adapterprotein *Dab* übertragen werden und somit anschließend auf die *Abl* Kinase wirken.

Sollte *Abl* tatsächlich über einen Signalweg von *Ama* und *Nrt* über *Dab* gesteuert sein, so müssten die jeweils nachfolgend in der Regulationskette wirkenden Faktoren bei Funktionsverlust eines der

vorgeschalteten Gene in ihrer Expression reduziert sein, ebenso wie in *lab¹Dfd¹²* Mutanten, da über die *Antp*-K Gene die Expression von *Ama* beeinflussbar ist. *Abl* ist in *Abl¹Ama^{R1}* und *Dab¹* Mutanten, ebenso wie in *lab¹Dfd¹²* Mutanten, nicht mehr klar nachweisbar und im Vergleich zum WT insgesamt reduziert (Abb. 3-60, beispielhaft gezeigt für *Ama* Funktionsverlust).

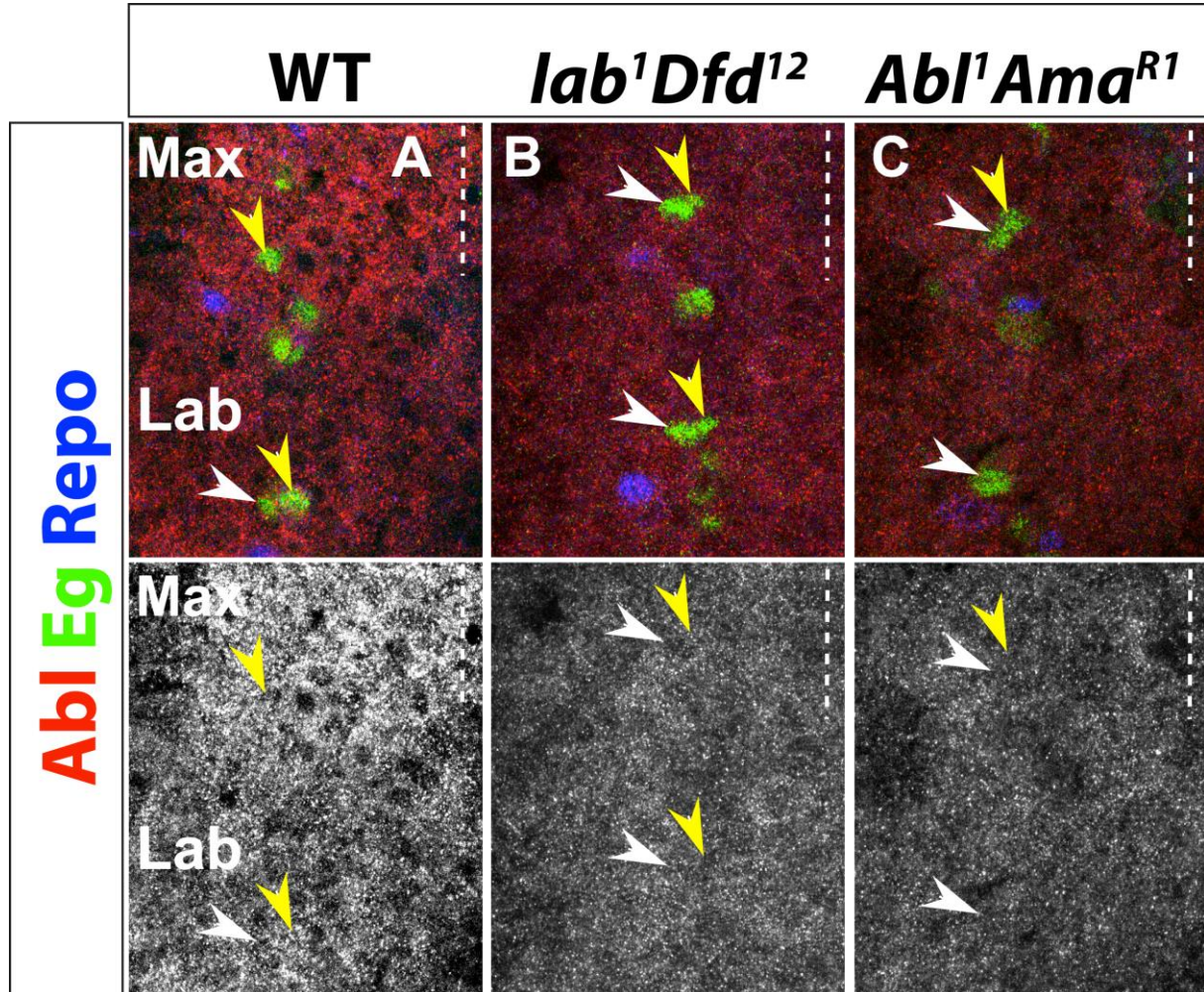


Abb. 3-60: Expression von Abl ist in *lab¹Dfd¹²* und *Ama^{R1}* Mutanten gleichermaßen reduziert.

Antikörperfärbung gegen Abl (rot, in den unteren Abbildungen jeweils in weiß), Eg (grün) und Repo (blau) im WT (A), *lab¹Dfd¹²* (B) und *Abl¹Ama^{R1}* (C) Doppelmутanten, dargestellt sind jeweils die linken Hemisegmente des Maxillar- und Labialsegments. Expression von Abl ist im Vergleich zum WT in beiden mutanten Hintergründen gleichermaßen reduziert.

Ebenso ist *Dab* Expression in *Abl¹Ama^{R1}* (nicht gezeigt) oder *lab¹Dfd¹²* (vergleiche Abb. 3-56 C) deutlich reduziert. Für den Funktionsverlust von *Nrt* wurden aufgrund der geringen Transformationsrate keine Expressionsdaten der nachgeschalteten Faktoren erhoben. *Nrt* wird bei *Ama* Funktionsverlust wildtypisch exprimiert, was verdeutlicht, dass die Expression von *Nrt* durch *Ama* nicht verändert ist, sondern vermutlich funktionale Veränderungen vorliegen (siehe auch Liebl et al., 2003; Seeger et al., 1998; vergleiche Abb. 3-54).

Sollten beide Wege, der direkte zellautonome Einfluss über Dfd und der nicht zellautonome Weg über Abl, parallel auf NB6-4max wirken, so dürfen Abl und Dfd nicht voneinander in ihrer Expression und Wirkung abhängig sein. Daher wurde die Expression von Dfd in *Abl^f*-mutanten NB6-4max und die Expression von Abl in *Dfd^{f6}*-mutanten NB6-4max untersucht.

3.11.5. Abl ist in *Dfd^{f6}*- und Deformed in *Abl^f*-mutanten NB6-4max exprimiert

Der wildtypische NB6-4max exprimiert direkt nach seiner Delamination und auch während seiner ersten Teilung Abl und Dfd Protein (vergleiche Abb. 3-38 und Abb. 3-57). Die erste Teilung ist entscheidend für die Schicksalsfestlegung als glialer oder neuronaler Anteil des NB6-4. In *Dfd^{f6}* Mutanten ist Abl wie im WT während der ersten Teilung im NB6-4max exprimiert (Abb. 3-61 A). Ebenso ist Dfd im sich gerade teilenden NB6-4max von *Abl^f* Mutanten exprimiert (Abb. 3-61 B). Dfd und Abl werden sogar jeweils in ektopischen Neuronen von transformierten NB6-4max exprimiert (für Dfd in *Abl^f* Abb. 3-61 C).

Es ist somit sowohl in der *Dfd* Einzelmutante, als auch in der *Abl* Einzelmutante jeweils die neuronale Identität reprimierende Funktion eines der beiden Faktoren im NB6-4max vorhanden. In *lab¹Dfd^{f2}* Doppelmutanten ist im frühen St11 und während der ersten Teilung hingegen kein oder nur eine sehr geringe Menge an Abl Protein im NB6-4 nachweisbar. Es spiegelt sich daher hier annähernd dieselbe Situation wieder, die in der *Abl^fDfd^{f6}* Doppelmutante vorliegt. Der NB6-4max der *lab¹Dfd^{f2}* und der *Abl^fDfd^{f6}* Doppelmutanten hat somit weder Expression von Dfd, noch von Abl. Es gibt also keinerlei reprimierende Funktion auf neuronales Schicksal und daher eine Transformationsrate von (annähernd) 100%.

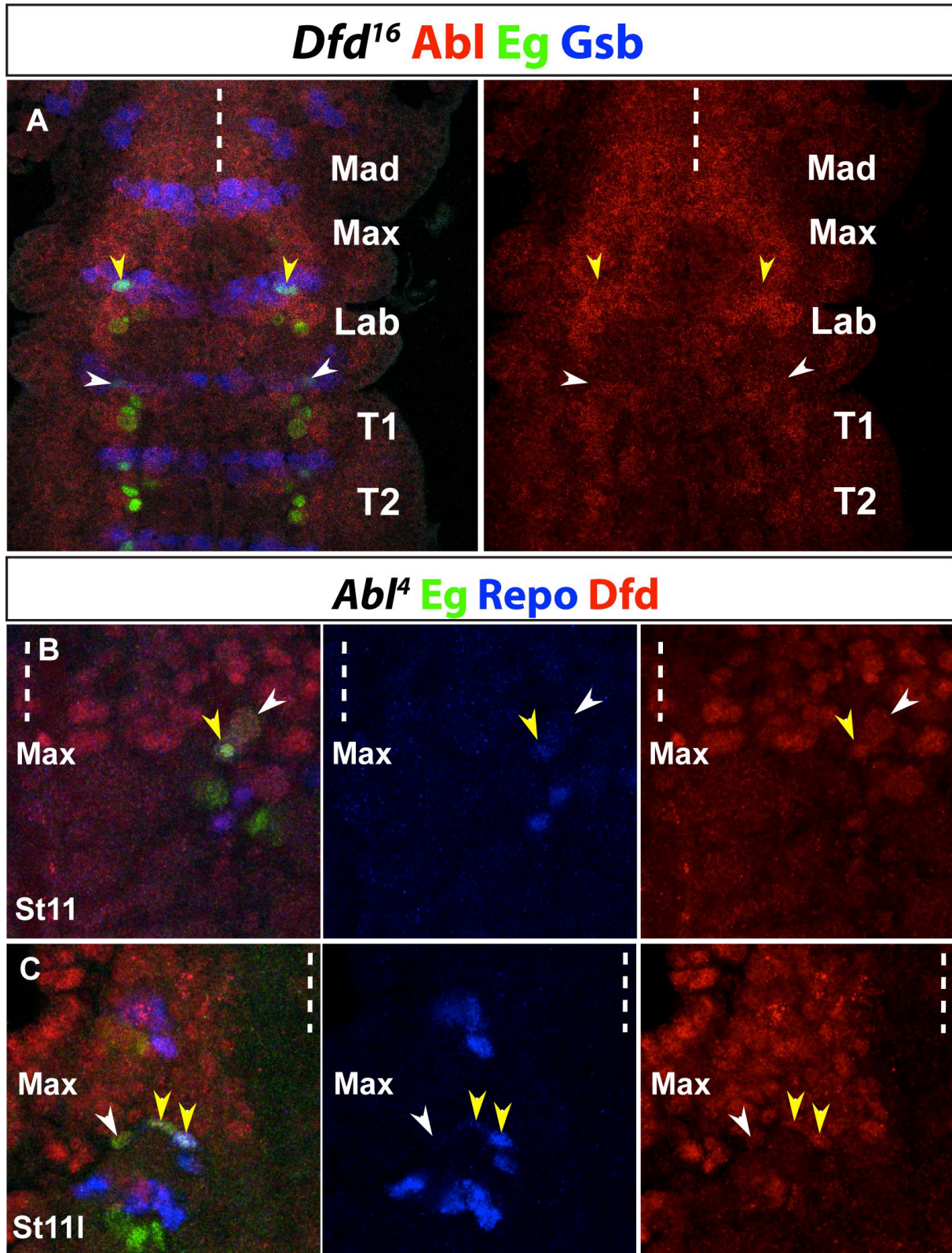


Abb. 3-61: Voneinander unabhängige Expression von Abl und Dfd.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Gsb (blau) und Abl (rot) im NB6-4max in *Dfd*¹⁶. Expression von Abl in *Dfd*¹⁶ Mutanten ist generell unverändert gegenüber wildtypischer Expression und findet sich auch im NB6-4max. (B) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Repo (blau) und Dfd (rot) in *Abl*⁴. Die Expression von Dfd in *Abl*⁴ Mutanten ist während der ersten Teilung (in B) und in späteren Teilungen (in C) in allen Zellen des NB6-4max

exprimiert, auch in ektopischen Neuronen. Die Panels der Einzelkanäle entsprechend der jeweiligen zugewiesenen Farbe.

3.11.6. Ektopisch exprimiertes *Abl* und *Ama* in *lab¹Dfd¹²* oder in *Dfd¹⁶Antp⁷* Mutanten verringert die Transformationsrate

Die in *lab¹Dfd¹²* erreichte 100%ige Transformationsrate des maxillaren NB6-4, bzw. in *Dfd¹⁶Antp⁷* erreichten 87% im Vergleich zu 43% von *Dfd* Mutation alleine, kommen der Arbeitshypothese nach durch die parallel geschalteten Wege von *Dfd* einerseits und *Ama* bzw. *Abl* andererseits zustande.

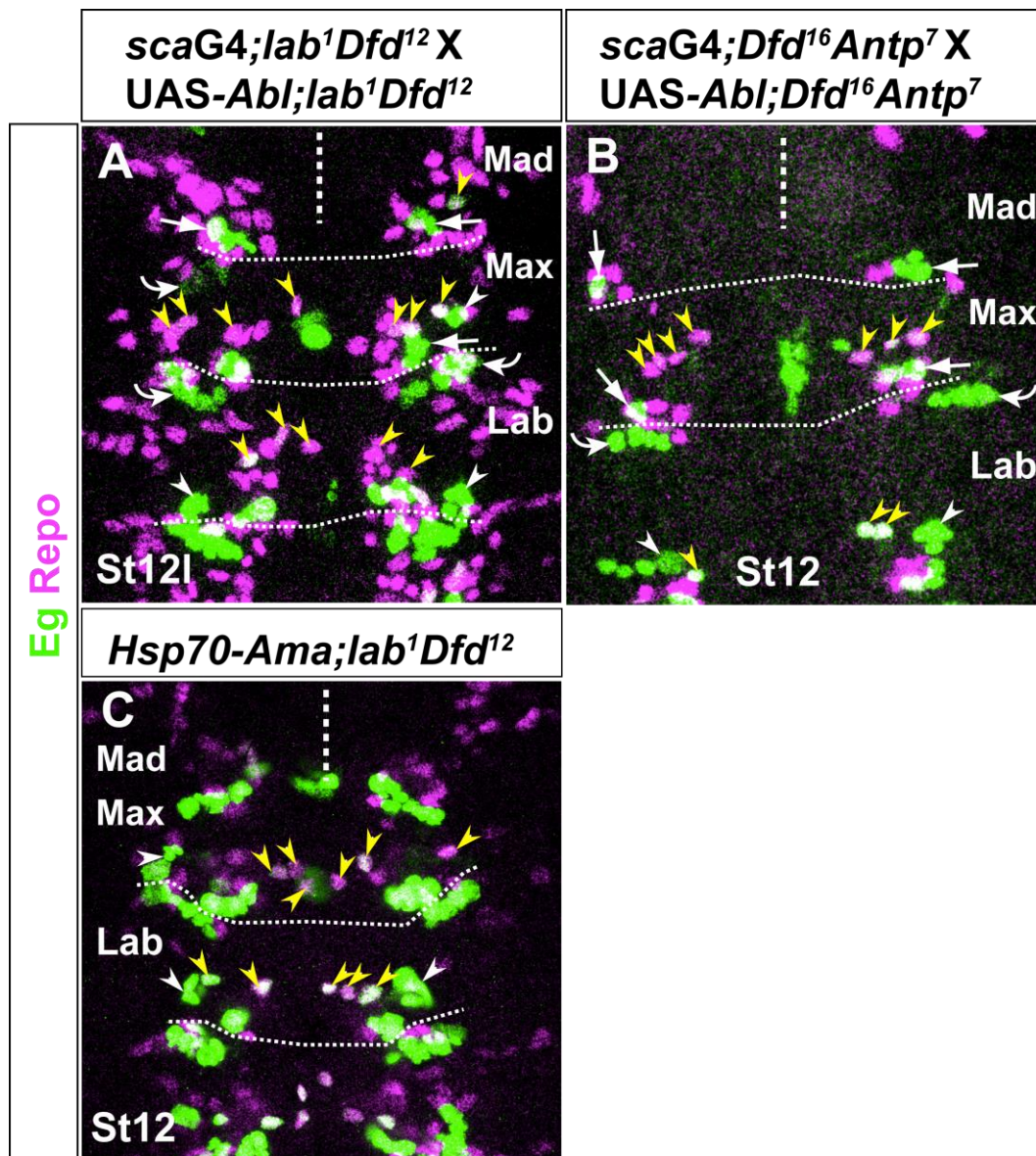


Abb. 3-62: Ektopische Expression von *Abl* und hitzeinduzierte Expression von *Ama* reduzieren die Transformationsraten in *lab¹Dfd¹²* bzw. in *Dfd¹⁶Antp⁷* Mutanten.

Antikörperfärbung gegen *Eg* (grün) und *Repo* (magenta) in (A) *sca-Gal4; lab¹Dfd¹² X UAS-Abl; lab¹Dfd¹²* und (B) *sca-Gal4; Dfd¹⁶Antp⁷ X UAS-Abl; Dfd¹⁶Antp⁷*. Die Transformationsrate des maxillaren NB6-4 wird durch

ektopisch exprimiertes Abl in (A) um 20% und in (B) um 40% reduziert. (C) Hitzeinduzierte Expression von *Ama* über *Hsp-70-Ama* in *lab¹Dfd¹²* reduziert die ursprüngliche Transformationsrate von 100% um 40% auf 60%.

Somit müsste durch ektopisch exprimiertes Abl oder *Ama* in *lab¹Dfd¹²* Mutanten oder *Dfd¹⁶Antp⁷* Mutanten eine Reduktion bzw. „Rettung“ der Transformationsraten erreicht werden können. Es wurden *sca-Gal4* mit *lab¹Dfd¹²* bzw. mit *Dfd¹⁶Antp⁷*, und UAS-*Abl* mit *lab¹Dfd¹²* bzw. mit *Dfd¹⁶Antp⁷* kombiniert und miteinander verkreuzt (Abb. 3-62). Da für *Ama* kein UAS-Stamm erhältlich ist, wurde ein wärmesensitives Allel von *Ama* (HS-*Ama*) verwendet, das über eine Temperatursteigerung im Embryo zu Expression angeregt wird. Dadurch kann zeitlich steuerbar verstärkte Expression von *Ama* ausgelöst werden (dankenswerterweise wurden diese Fliegenstämme von Christian Berger gekreuzt und die Färbungen von Simone Renner durchgeführt).

Ektopisch exprimiertes *Abl* in *lab¹Dfd¹²* Mutanten rettet die 100% Transformation des maxillaren NB6-4 um 20% auf 80% Transformation (Abb. 3-62 A; n=22 Embryonen). Ektopisch exprimiertes *Abl* in *Dfd¹⁶Antp⁷* Mutanten rettet die Transformationsrate von ursprünglich 87% um 40% auf 47% (Abb. 3-62 B; n=30 Embryonen). Expression von HS-*Ama* in *lab¹Dfd¹²* Mutanten rettet die Transformationsrate von ursprünglich 100% um 40% auf 60% (Abb. 3-62 C; n= 20 Embryonen). Somit ist eindeutig die Funktion von *Ama* und *Abl* im Zusammenhang mit der durch *lab* oder *Antp* Funktionsverlust verursachten zusätzlichen Transformation in *lab¹Dfd¹²* oder *Dfd¹⁶Antp⁷* Doppelmutanten klar ersichtlich.

3.11.7. Zusammenfassung des Kapitels 3.11.

NB6-4max weist in *Abl⁴* Mutanten eine Transformationsrate von 41% auf. Doppelter Funktionsverlust von *Dfd¹⁶* und *Abl⁴* steigert die Transformationsrate auf 95%.

Die Expression von *Abl* ist in *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten und in *Ama* Mutanten im Vergleich zum WT stark reduziert. Die Proteinverteilung in Neuroblasten ist im WT deutlich zytoplasmatisch-kortikal, während in den *lab¹Dfd¹²* Mutanten eine uniforme Proteinverteilung auftritt.

Dfd ist im NB6-4max in *Abl⁴* Mutanten, und *Abl* ist im NB6-4max in *Dfd¹⁶* Mutanten exprimiert. Somit ist nur in *lab¹Dfd¹²* (100% Transformation), *Dfd¹⁶Antp⁷* (87% Transformation) und *Abl⁴Dfd¹⁶* (95% Transformation) Mutanten keine Expression von *Abl* und *Dfd* im NB6-4max vorhanden.

Ektopische Expression von *Abl* in *lab¹Dfd¹²* rettet die Transformationsrate des NB6-4max um 20%, in *Dfd¹⁶Antp⁷* um 40% und ektopisch exprimiertes *Ama* in *lab¹Dfd¹²* um 40%.

3.12. Über welchen Weg wirkt die Ablason Tyrosin Kinase auf die segmentale Identität von NB6-4max?

Abl liegt als zytoplasmatisch lokalisiertes Protein mit kortikaler Anreicherung im NB6-4max vor und wird, verdeutlicht durch die Lamin Färbung, nicht in den Zellkern transportiert. Es kann somit nicht direkt auf DNA-Ebene als Transkriptionsfaktor wirken. Daher stellt sich die Frage, wie Abl reprimierend auf neuronale Identität vermittelnde Faktoren wirken kann, um die segmentale Identität von NB6-4max festzulegen?

Eine mögliche Funktion von Abl auf die segmentale Identität von NB6-4max könnte über die Beeinflussung der Teilungsspindel durch seine bekannte Funktion als Aktin-Regulator zustande kommen (Van Etten, 1999; Grevengoed et al., 2003).

3.12.1. *Trio* und *Enabled* besitzen keine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4

Es sind bereits mehrere weitere Faktoren bekannt, die als Interaktoren von Abl Funktionen, beispielsweise in der Regulation von Axonwachstum und Richtungsfindung von Axonwachstum, oder bei der dorsalen Schließung des Embryos, übernehmen. Ein für die hier vorliegende Untersuchung wichtiger Aspekt ist die für diese Cofaktoren identifizierte Rolle als Aktin-Regulatoren (Giniger, 1998; Grevengoed et al., 2001; Grevengoed et al., 2003). Die räumliche Orientierung von Aktinfilamenten spielt eine wichtige Rolle bei der Ausrichtung der Teilungsspindel von Zellen und damit bei der Festlegung der Teilungsebene. Die erste Teilung von NB6-4 entscheidet über die Bildung von Neuronen und Glia durch eine asymmetrische erste Teilung, oder aber über die Identität von rein glialen Nachkommen durch eine symmetrische erste Teilung (Akiyama-Oda et al., 1999; Freeman und Doe, 2001; Ragone et al., 2001; Berger et al., 2005). Zwei wichtige Regulatoren in diesem Zusammenhang sind der Abl Antagonist *Enabled* (*Ena*; Gertler et al., 1990; Gates et al., 2007; Stevens et al., 2008) und der Kooperationspartner *Trio* (Liebl et al., 2000). Weder Funktionsverlust von *Ena*, noch von *Trio* ergeben irgendeine Veränderung der segmentalen Identität von NB6-4max (nicht gezeigt). Auch alle weiteren Eg positiven Zellstammbäume und NB6-4 anderer Segmente sind unverändert.

Ena wurde gemeinsam mit Abl lokalisiert gefunden (Gertler et al., 1990). Daher wurde auf die Expression von *Ena* im NB6-4 etwas genauer eingegangen, auch da sich im Hinblick auf die recht schwer zu bestimmende Lokalisation von Abl innerhalb der Zellen darüber weitere aufschlussreiche Informationen erhofft wurden. Antikörperfärbungen in frühen Stadien im WT gegen *Ena* Protein lassen dieselbe zytoplasmatische Verteilung wie Abl erkennen, allerdings finden sich auch einige Zellen, die gleichmäßige Färbung auch im Zellinneren erkennen lassen (Abb. 3-63 A). In *lab¹Dfd¹²* ist *Ena*, im Gegensatz zu Abl Proteinkonzentration, jedoch nicht deutlich reduziert, wobei sich eine etwas weniger deutlich lokalisierte Proteinverteilung auch hier feststellen lässt (Abb. 3-63 B). Interessanterweise ist *Ena* im WT im maxillaren NB6-4 vor, während und nach der ersten Teilung exprimiert. Hingegen ist im labialen NB6-4 keine oder nur geringe *Ena* Proteinkonzentration feststellbar (Abb. 3-63 C). Dieser

Unterschied zwischen maxillarem und labialem NB6-4 findet sich jedoch auch in *lab¹Dfd¹²* Mutanten (nicht gezeigt).

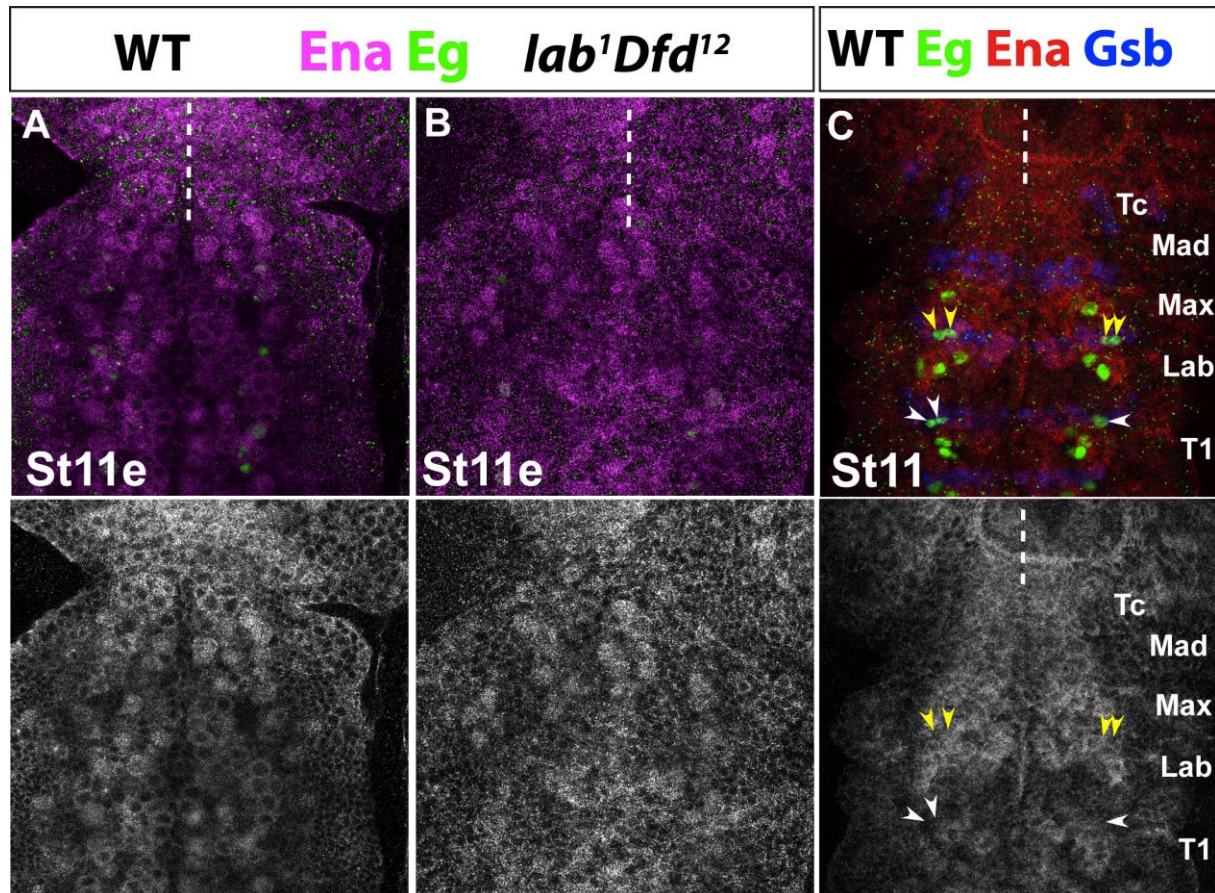


Abb. 3-63: Expression von Ena im WT und *lab¹Dfd¹²* Mutanten.

(A-B) Antikörperfärbungen gegen Ena (magenta) und Eg (grün) in der gnathalen Region im frühen St11, die Eg positiven Neuroblasten sind noch unvollständig und daher nicht gekennzeichnet. Ena Protein ist im Vergleich von WT (A, im unteren Panel dargestellt in weiß) und *lab¹Dfd¹²* Mutante (B, ebenfalls unten in weiß) nicht schwächer exprimiert, jedoch etwas undeutlicher in der Lokalisation. (C) Antikörperfärbung gegen Ena (rot, im unteren Panel in weiß), Eg (grün) und Gsb (blau) im WT in St11. NB6-4 des Maxillarsegments exprimiert Ena direkt während der ersten Teilung. Im labialen NB6-4 und seiner ersten Nachkommenzelle ist hingegen keine Expression von Ena feststellbar.

Diese Beobachtung unveränderter Ena Expression zwischen WT und *lab¹Dfd¹²* Mutanten, sowie ein fehlender Phänotyp bei Ena Funktionsverlust lassen keine Funktion von Ena auf NB6-4 Identität vermuten. Somit wird Abl vermutlich auf NB6-4 Identität ohne die Beeinflussung der Orientierung der Teilungsspindel wirken.

3.12.2. Abl wirkt auf die Expression von *CyclinE* im NB6-4max

Der entscheidende Faktor für die Entstehung von NB6-4 Neuronen ist *CycE* (Berger et al., 2005). Dfd, AbdA und AbdB wirken reprimierend auf die Expression von *CycE*, was dadurch zu einer

Unterdrückung der Identität von NB6-4 als Neuroglioblast und damit der neuronalen Identität der Nachkommenzellen führt. In *Dfd¹⁶* Mutanten werden in 43% *CycE* mRNA positive NB6-4max Neurone gebildet (Abb. 3-64 A, B), in *ablA* Mutanten generiert der abdominale NB6-4 in 100% ektopische *CycE* positive Neurone (Berger et al., 2005).

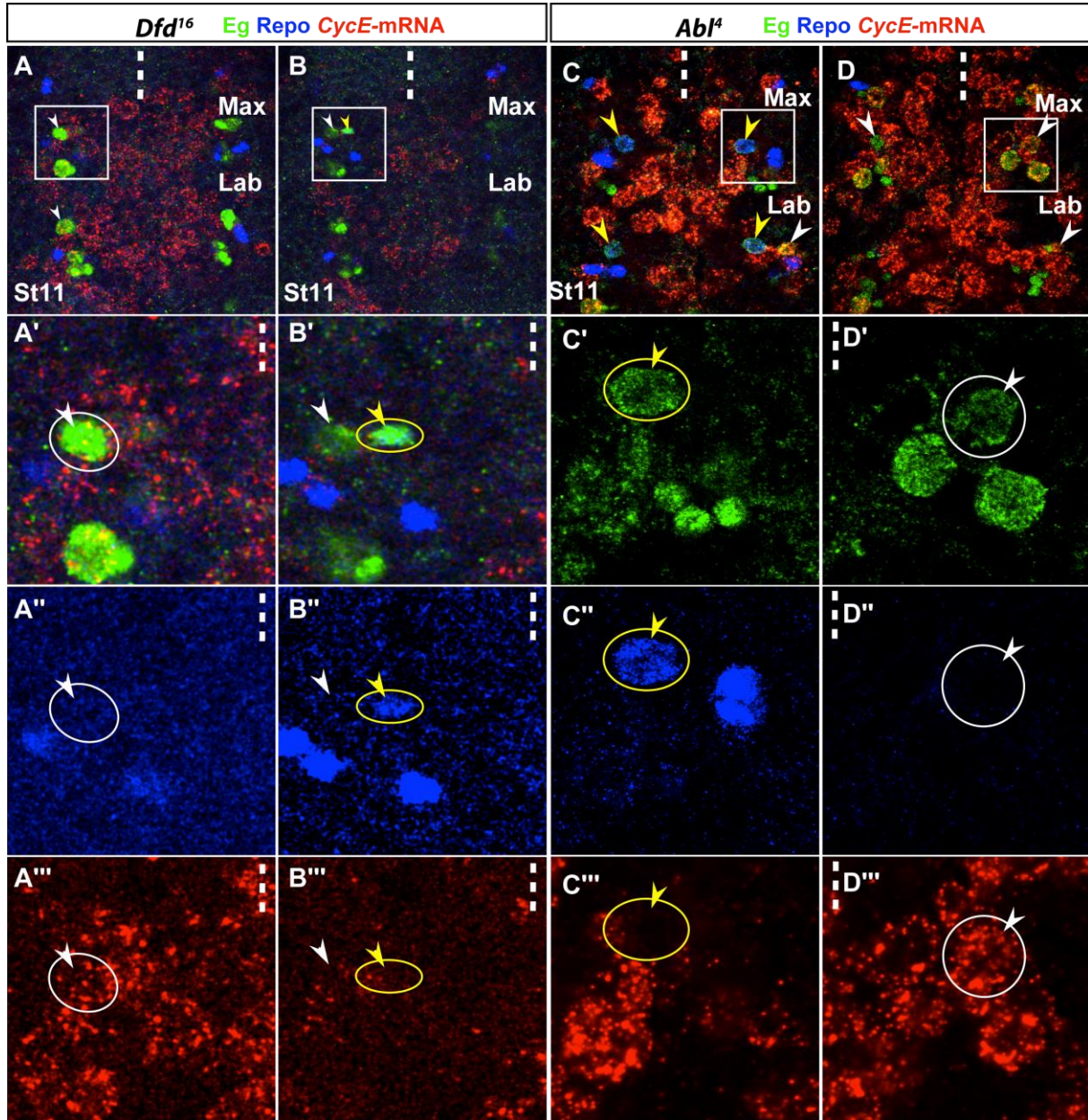


Abb. 3-64: *CycE* Expression im NB6-4max in *Dfd* und *Abl* Mutanten.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (blau) mit *CycE* mRNA (rot) in situ Hybridisierung in *Dfd¹⁶* und *Abl⁴* im St11. Gnathales VNS von (A, B) *Dfd* und (C, D) *Abl*, (A'-D') sind Vergrößerungen des maxillaren NB6-4. In den aus dem sich gerade teilenden NB6-4 hervorgehenden Gliazellen in *Dfd¹⁶* (B'', B''') und in *Abl* (C'' und C''') wird keine *CycE* mRNA exprimiert. In ektopisch gebildeten Neuronen von *Dfd¹⁶* (A'' und A''') und *Abl⁴* (D'' und D''') ist *CycE* mRNA exprimiert.

Abl ist ein entscheidender Kandidat für den nicht-zellautonomen Weg der segmentalen Identitätsfindung von NB6-4. Es stellt sich aber nun die Frage, ob dieses zytoplasmatisch lokalisierte Protein auf die Transkription des für die Identitätsfestlegung als Gliazelle oder Neuron ausschlaggebenden Faktors *CycE* eine Funktion haben kann? Abl wurde bereits in einem „Modifier-Screen“ als möglicher Repressor von *CycE* identifiziert (Brumby et al., 2004). In sich gerade teilenden NB6-4max in *Dfd^{l6}* (Abb. 3-64 A''') oder *Abl⁴* (Abb. 3-64 B''') Mutanten exprimiert das entstehende ektopische Neuron stark *CycE* mRNA, während die Gliazellen keine *CycE* mRNA exprimieren (Abb. 3-64 B''' und D'''). Im wildtypischen NB6-4 mit rein glialer Identität tritt nur schwache *CycE* mRNA Expression auf, niemals so starke wie im labialen NB6-4 oder in den ektopisch gebildeten Neuronen der Mutanten (vergleiche Abb. 3-30). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sowohl *Dfd*, als auch *Abl* reprimierend auf *CycE* und darüber reprimierend auf die Entstehung neuronaler Identität wirken.

3.12.3. Zusätzlicher Funktionsverlust von *CycE* reduziert die Entstehungsrate von NB6-4

Neuronen in Mutanten

Sollte die Entstehung von ektopischen Neuronen des maxillaren NB6-4 in *Dfd* und *Abl* Mutanten über die fehlende Repression von *CycE* zustande kommen, so müsste zusätzlicher Funktionsverlust von *CycE* in diesen Mutanten wiederum zu einer Reduktion oder gar zu einer Verhinderung von ektopischen NB6-4 Neuronen führen. Daher wurden *Dfd^{l1}* Mutanten und *Abl⁴Dfd^{l6}* Mutanten mit *CycE^{AR95}* Funktionsverlustmutanten kombiniert (dankenswerterweise wurde die Einkreuzungen von *CycE^{AR95}* von Christian Berger und die anschließenden Färbungen von Simone Renner vorgenommen).

In *CycE^{AR95}; Dfd^{l1}* Mutanten ist die Entstehung von ektopischen NB6-4 Neuronen von 43% in *Dfd* Einzelmutanten um 77% auf 14% reduziert (n= 27 Embryonen; Abb. 3-65 A). In *CycE^{AR95}; Abl⁴Dfd^{l6}* ist die Transformationsrate gegenüber 95% in *Abl⁴Dfd^{l6}* Doppelmutanten um 85% auf nur noch 15% Transformation reduziert (n= 37 Embryonen; Abb. 3-65).

Als interne Kontrolle wurden hier auch wiederum das Labialsegment und die thorakalen Segmente ebenfalls analysiert. Funktionsverlust von *CycE^{AR95}* ruft im Labialsegment einen Verlust von NB6-4 Neuronen in 65% hervor (vergleiche Abb. 3-28), im Thorax führt es ebenfalls zum Verlust der Neurone (Berger et al., 2005). In *CycE^{AR95}; Abl⁴Dfd^{l6}* Mutanten werden in 46% (n= 187 Hemisegmente; Abb. 3-65 B) keine Neurone mehr gebildet, in *CycE^{AR95}; Dfd^{l1}* kommt es in 70% (n=153 Hemisegmente; Abb. 3-65 A) zum Verlust von NB6-4 Neuronen. Insgesamt zeigt sich hier für diese Segmente eine Varianz in der Rate des Verlustes neuronaler Identität, an sich ist der Effekt auf NB6-4 aber derselbe.

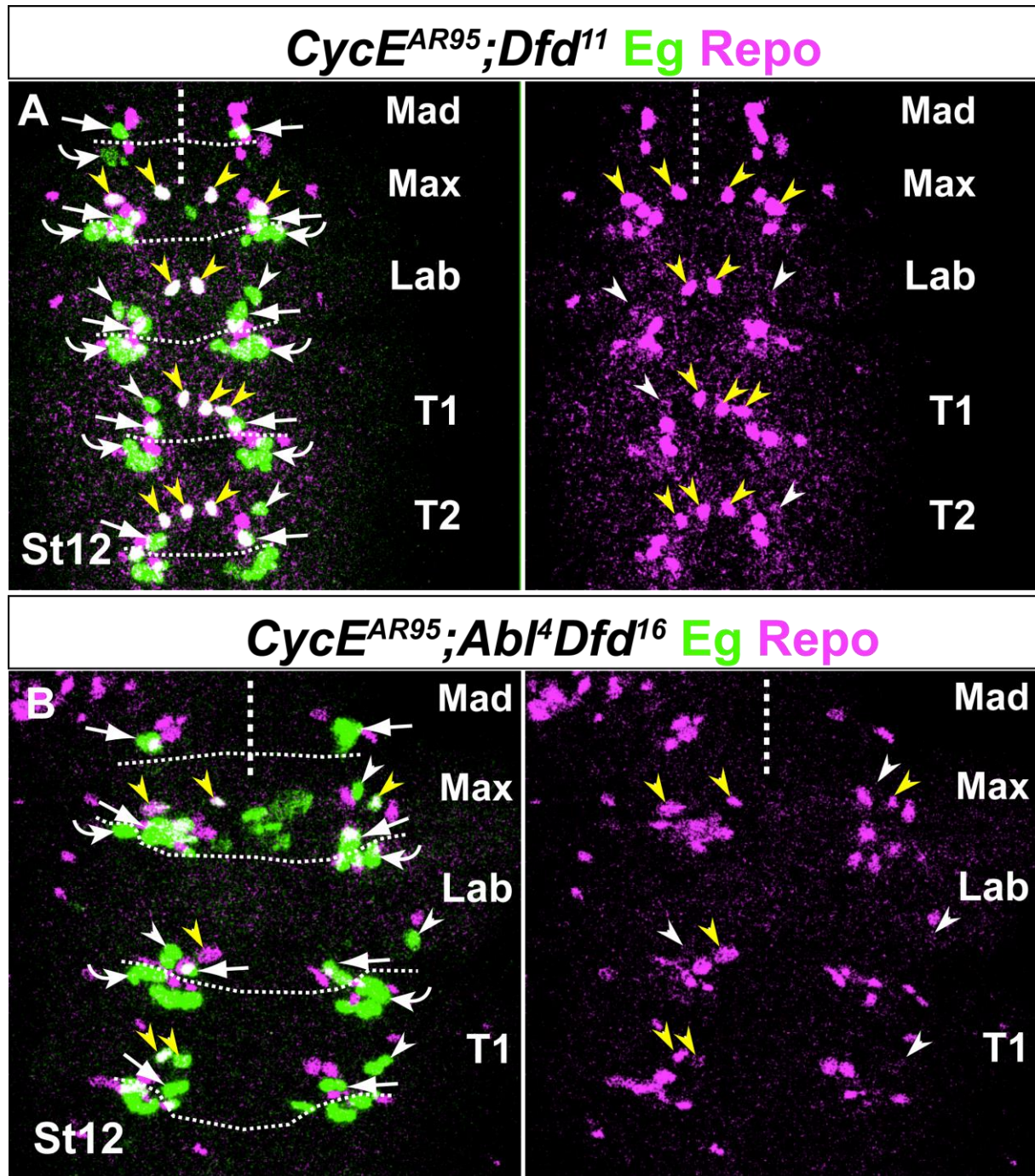


Abb. 3-65: Funktionsverlust von *CycE* reduziert die Entstehungsrate ectopischer NB6-4max Neurone in *Dfd¹¹* und *Abl⁴Dfd¹⁶* Mutanten.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (magenta) in Mutanten *CycE^{AR95};Dfd¹¹* (A) und *CycE^{AR95}; Abl⁴Dfd¹⁶* Mutanten (B). (A) In *CycE^{AR95};Dfd¹¹* kommt es zu 14% Transformation des maxillaren NB6-4 hin zu neuronaler Identität, sowie zu 70% Verlust von Neuronen im Labialsegment und den thorakalen Segmenten. (B) In *CycE^{AR95}; Abl⁴Dfd¹⁶* entstehen ectopische NB6-4max Neurone in 15%. Im Labialsegment und den thorakalen Segmenten werden in 46% keine NB6-4 Neurone mehr gebildet.

Festzuhalten bleibt, dass der Effekt von Dfd und Abl auf die Identität der NB6-4 Nachkommenzellen eindeutig über CycE realisiert wird. Nun schließt sich die Frage an, über welche Art der Regulation Dfd und Abl auf CycE wirken können. Im Enhancerbereich von *CycE* konnten Bindestellen für Dfd identifiziert werden (Diplomarbeit Henrike Becker, 2008). Wie jedoch wirkt Abl auf *CycE*? Durch die zytoplasmatische Lokalisation von Abl kann es sich nicht um eine transkriptionelle Regulation handeln, zumindest nicht direkt. Daher war eine Idee, dass Abl im Zytoplasma auf *CycE* mRNA wirken könnte, während Dfd eventuell auf die Transkription im Zellkern wirkt. Protein-Protein-Interaktion von Dfd und CycE konnte schließlich nicht festgestellt werden (vergleiche Kapitel 3.3.3.). Somit müsste in *Abl* Mutanten im Zytoplasma mehr *CycE* mRNA oder auch bereits translatiertes Protein nachweisbar sein als im WT. Im Zellkern sollte sich jedoch kein Unterschied zum WT zeigen, da hier Dfd noch reprimierend wirkt. In *Dfd* Mutanten hingegen sollte im Zytoplasma kein Unterschied zum WT feststellbar sein, im Zellkern sollte jedoch deutliche Reduktion von CycE Protein oder mRNA sichtbar sein. Leider lassen sich aufgrund der hohen Dynamik von CycE Expression keinerlei Aussagen diesbezüglich aus den angefertigten Färbungen von CycE Protein und mRNA im WT, *Dfd*^{l6} und *Abl*^t treffen (nicht gezeigt).

3.12.4. Ektopische Expression von *Abl* kann die Bildung von NB6-4 Neuronen nicht unterdrücken

Zur weiteren Einschätzung der möglichen Wirkung von Abl auf *CycE* wurde ektopisch exprimiertes *Abl* auf mögliche Effekte für NB6-4 anderer Segmente getestet. Ektopische Expression von *Dfd* verursacht den Verlust von NB6-4-Neuronen in Thorax und Labialsegment (vergleiche Abb. 3-29). Ektopische Expression von *Abl* hat keinen Einfluss auf die Entstehung von NB6-4 Neuronen im Labialsegment und den Thorakalsegmenten (nicht gezeigt). Dies unterstreicht die Vermutung, dass Abl eventuell nicht direkt auf die Expression von *CycE* wirken kann.

3.12.5. Abl muss über weitere Faktoren auf die Expression von *CyclinE* wirken

Eine weitere Möglichkeit neben der direkten Beeinflussung von *CycE* durch Abl ist die Weiterleitung eines Signals auf Faktoren, die Zugang zu transkriptioneller Regulation besitzen. So wurde versucht, weitere Faktoren zu identifizieren, die ein Signal von Abl auf die Regulation von *CycE* Transkription vermitteln könnten.

Ein weiterer sehr auffälliger Phänotyp, sowie Recherchen über Parallelen aus der Forschung in Säugertieren brachten die Überlegungen entscheidend weiter. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapitel dargestellt.

3.12.6. Zusammenfassung des Kapitels 3.12.

Abl wirkt nicht über die Beeinflussung der Teilungsspindel auf die Identität von NB6-4max.

Während der ersten Teilung des NB6-4max in *Dfd*^{l6} oder *Abl*^t Mutanten wird im ektopisch entstehenden neuronalen Anteil *CycE* mRNA exprimiert, im glialen nicht.

Gleichzeitiger Funktionsverlust von *CycE^{AR95}* in *Abl⁴Dfd¹⁶* rettet den Phänotyp von ektopischen NB6-4max Neuronen in 85% und in *Dfd¹¹* Mutanten in 77%.

Ektopisch exprimiertes *Abl* hat, im Gegensatz zu ektopisch exprimiertem *Dfd*, keinen Einfluss auf die segmentale Identität des NB6-4.

3.13. Zusätzlich zum NB6-4max Phänotyp tritt gesteigerte Zellproliferation und gesteigerte Zellkerngröße auf

In *Abl⁴* und *Ama* Mutanten, in *lab¹Dfd¹²* Mutanten, sowie besonders in Kreuzungen von *Abl¹Ama^{R1}* mit *Abl⁴* oder *Abl¹Nrt^{M54}* mit *Abl⁴* fiel auf, dass generell Zellkerne häufig übermäßig groß und morphologisch auffällig sind (Abb. 3-66 A, B). Bereits augenscheinlich bestehen gravierende Unterschiede in der Zellkerngröße und der Morphologie.

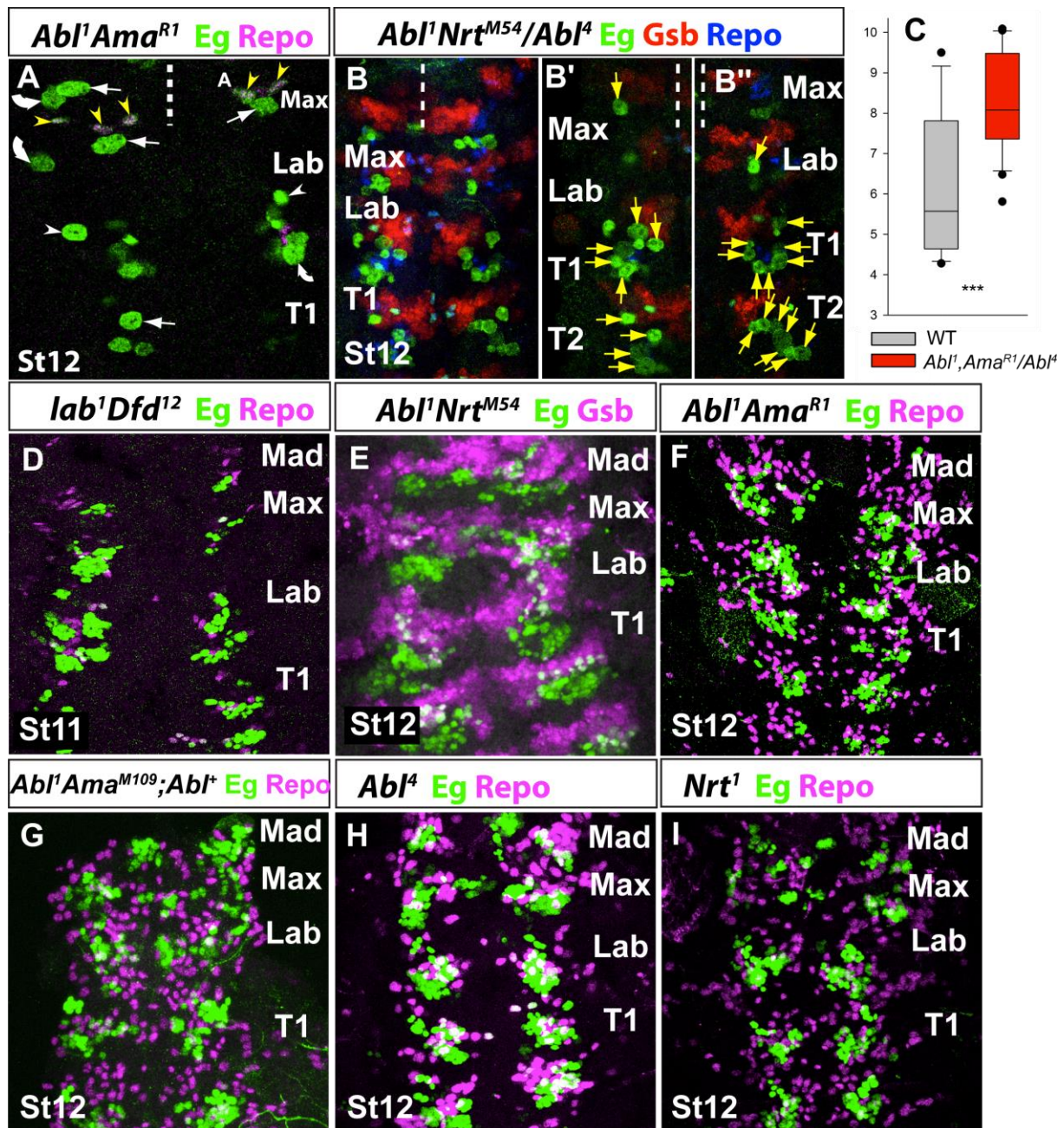


Abb. 3-66: Ballonphänotyp und Proliferationsphänotyp in verschiedenen genetischen Hintergründen.

(A und B) Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo oder Gsb (magenta, in B rot und blau) in *Abl¹Ama^{R1}* (A) und *Abl¹Nrt^{M54}/Abl⁴* (B). Etliche Eg positive Zellen weisen den Ballonphänotyp auf: die durch die kernständige

Eg Antikörperfärbung (grün) sichtbaren Zellkerne wirken aufgebläht und sind vergrößert. Zudem weisen sie im Zentrum keine Antikörperfärbung auf. Beispielsweise sind in (A) NB7-3lab und NB6-4lab im linken Hemisegment vom Ballonphänotyp betroffen. (B') Im linken Hemisegment von (B) und (B'') im rechten Hemisegment von (B) sind die betroffenen Zellen durch gelbe Pfeile gekennzeichnet. (C) Statistische Analyse der Zellkerngröße im WT (grau, n= 12 NBs) und in *Abl¹Ama^{R1}/Abl⁴* Mutanten (rot, n= 23 NBs) der Eg positiven gnathalen Neuroblasten. Die Kerngröße ist in den Mutanten statistisch hochsignifikant erhöht, was über eine t-Test Analyse ($p < 0,001$) abgesichert ist. (D-I) Überproliferationsphänotyp in verschiedenen Genotypen in St11 und St12. Die Anzahl der Eg (grün) positiven Zellen, der Gsb (magenta) positiven Zellen in (E), sowie der Gliazellen (Repo in magenta in D, F-H) ist massiv erhöht.

3.13.1. Die Zellkerngröße ist statistisch signifikant erhöht

Eine Vermessung der Zellkerngröße aller Eg positiven Neuroblasten der gnathalen Segmente im WT (n=12 NBs) und in Kreuzungen von *Abl¹Ama^{R1}* mit *Abl⁴* Mutanten (n=23 NBs) ergab einen statistisch hochsignifikanten Anstieg in der Zellkerngröße (Abb. 3-66 C). Zudem weisen die Kerne eine mittig gelegene Domäne auf, in der keine Antikörperfärbung und daher vermutlich kein Protein auftritt. Dadurch erscheinen sie wie hohl und aufgeblasen. Dieser Phänotyp wird im Folgenden Ballonphänotyp genannt. Weiterhin geht dieser Phänotyp häufig mit einer extremen Überproliferation von Zellstammbäumen einher (Abb. 3-66 D-I).

Es tritt teilweise so massive Überproliferation auf, dass ab St12 keine Zuordnung der Eg positiven Zellen zu einzelnen Neuroblastenlinien mehr möglich ist. Da meistens Eg Antikörperfärbungen durchgeführt wurden, beziehen sich die Daten hierzu hauptsächlich auf Eg positive Zellstammbäume. Es lassen sich aber auch in anderen, beispielsweise Gsb positiven aber Eg negativen Zellen dieselben Effekte beobachten. Auch das gliale Muster weicht augenscheinlich, erkennbar durch Repo Antikörperfärbung, durch massive Proliferation extrem von der wildtypischen Anordnung und Anzahl der Zellen ab.

3.13.2. Der Ballonphänotyp tritt unspezifisch in verschiedenen Zellen auf

Bei in Teilung befindlichen Zellen erscheinen über Antikörperfärbung Zellkerne häufiger als groß und eventuell mit nicht ganz gleichmäßiger Färbung. Bei den Zellkernen mit Ballonphänotyp handelt es sich jedoch nicht um Zellen in Teilung, was durch die Überprüfung der Konzentration von pH3 deutlich wird (Abb. 3-67 A). In den hier als Beispiel gewählten Kreuzungen von *Abl¹Nrt^{M54}* mit *Abl⁴* Mutanten erscheinen etliche Zellen über Dpn oder Eg Antikörperfärbung als Zellen mit Ballonphänotyp (gelbe Pfeile in Abb. 3-67 A'). Nur in wenigen Fällen befinden sich diese Zellen in Teilung, was durch die zusätzliche pH3 Färbung (Abb. 3-67 A'') zweifelsfrei deutlich wird. Weiterhin sind die den Ballonphänotyp aufweisenden Zellen nicht immer Dpn positiv (Abb. 3-67 B, C), was klar verdeutlicht, dass diese Zellen auch postmitotische Identität haben. Die gesteigerte Kerngröße ist somit nicht über eine Identität der Zellen als Neuroblasten erklärbar, die generell häufig größer als ihre Nachkommenzellen sind.

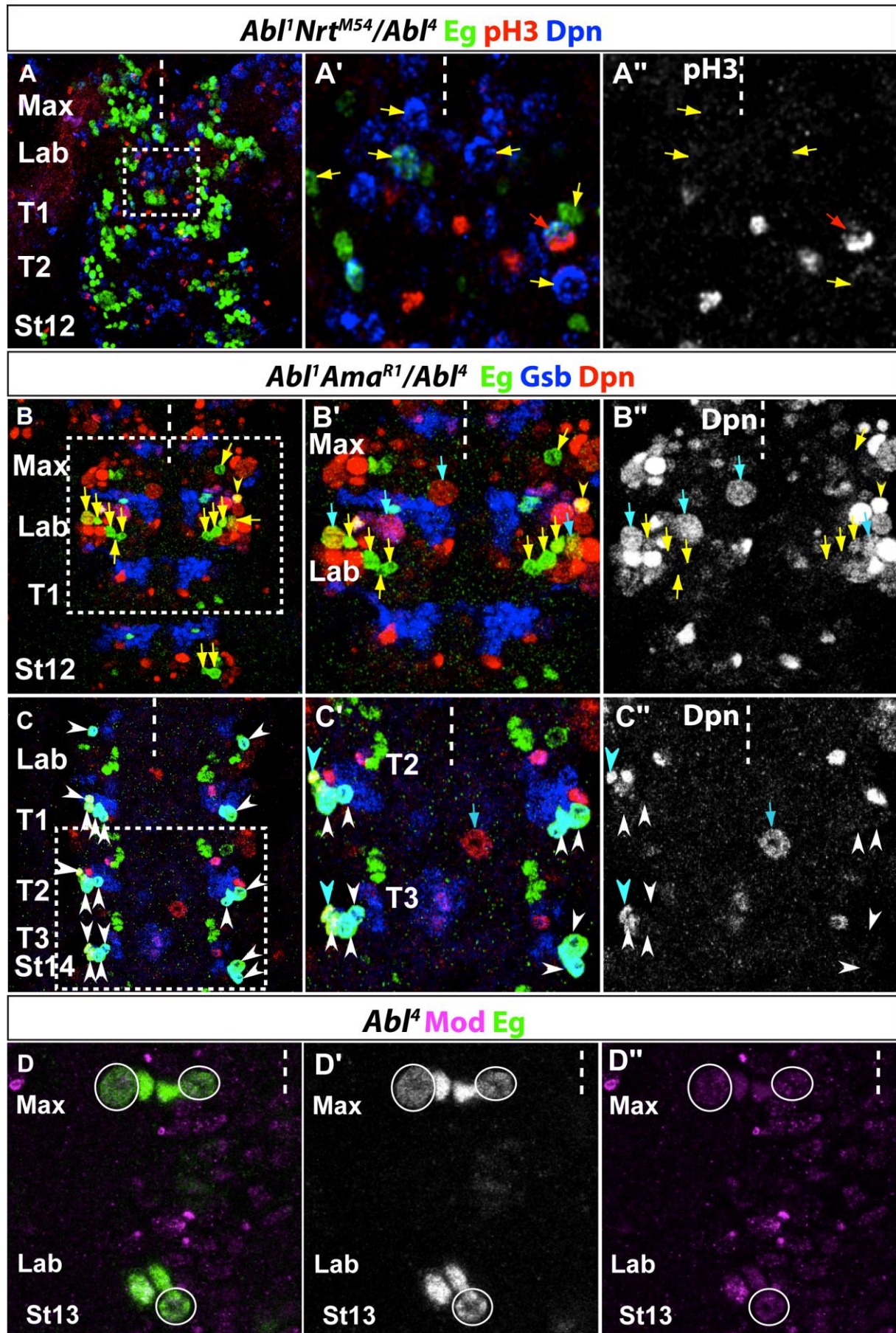


Abb. 3-67: Genauere Charakterisierung des Ballonphänotyps.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), pH3 (rot) und Dpn (blau) in Kreuzungen von *Abl¹Nrt^{M54}* mit *Abl⁴* Mutanten im St12. (A') und (A'') sind vergrößerte Ausschnitte aus (A), markiert durch das Viereck, ebenso in (B) und (C). (A') Mit gelben Pfeilen markiert sind die den Ballonphänotyp aufweisenden Zellen, die negativ für pH3 sind, sich demnach nicht in Teilung befinden. Der rote Pfeil markiert einen sich in Teilung befindenden Neuroblasten, der pH3 positiv ist. (A'') stellt den pH3 Kanal in grau zur besseren Übersicht dar. Nicht alle der Zellen weisen Dpn Färbung auf, es sind somit auch Zellen ohne Neuroblastenidentität vom Ballonphänotyp betroffen, vergleiche auch (B) und (C). (B, C) Antikörperfärbungen gegen Eg (grün), Gsb (blau) und Dpn (rot) in *Abl¹Ama^{R1}/Abl⁴* Kreuzungen in St12 (B) und St 14 (C). (B') Dpn positive Neuroblasten sind durch cyanfarbene Pfeile markiert. Nachkommenzellen mit Ballonphänotyp ohne Dpn Färbung sind durch gelbe Pfeile markiert. (B'') verdeutlicht die Expression von Dpn. (C) Ballonphänotyp in Neuronen des NB6-4 in den Segmenten Labial - T3 im St14. Cyanfarbene Pfeilköpfe markieren die Dpn positiven Neuroblasten (siehe auch (C'')), weiße Pfeilköpfe zeigen ausdifferenzierte ballonartige NB6-4 Neurone. Der cyanfarbene Pfeil verdeutlicht einen weiteren Dpn positiven Neuroblasten ohne NB6-4 Identität mit Ballonphänotyp. (D) Antikörperfärbung gegen Eg (grün, in D' in weiß) und Mod (magenta, in D'' im Einzelkanal) in *Abl⁴* Mutanten im St13 im linken Hemisegment des Maxillar- und Labialsegments. Gezeigt ist eine Einzelebene zur Darstellung des Hohlraums der Zellen. Mod Antikörperfärbung findet sich in diesen Zellen nicht in der gleichen Ebene, was verdeutlicht, dass der Nucleolus sich in einer anderen Position innerhalb der Zellen befindet.

Eine weitere Vermutung für die Erklärung der merkwürdigen Morphologie der Ballonzellen war, dass der Hohlraum innerhalb der Zellkerne durch die Anwesenheit des Nucleolus an dieser Stelle zustande kommen könnte. Modulo (Mod) ist ein Faktor, der im Nucleolus konzentriert ist (Bantignies et al., 2002). In den Ballonzellen ist keine Mod Antikörperfärbung innerhalb der Hohlräume der Zellen zu erkennen, somit handelt es sich bei dem erkennbaren Hohlraum innerhalb der Zellkerne nicht um den Nucleolus (hier gezeigt für *Abl⁴*, Abb. 3-67 D).

3.13.3. In weiteren Kandidaten tritt gesteigerte Proliferation und veränderte Morphologie der Zellkerne auf

Ein weiterer Faktor, bei dessen Funktionsverlust derselbe Überproliferationsphänotyp und derselbe Ballonphänotyp auftreten, ist *longitudinals lacking (lola)* (Giniger et al., 1994); Abb. 3-68). Dieser Kandidat wurde im Zusammenhang des Miniscreens als potentieller Hox Downstream-Faktor für die Beeinflussung von NB6-4max aus dem Screen von Stefanie Hueber ausgewählt (siehe Tabelle 3.2.). *lola* Mutanten haben keine Auswirkungen auf die segmentalen Identitäten von NB6-4, und *lola* mRNA ist weder in Neuronen noch in Glia des NB6-4 exprimiert (nicht gezeigt). Daher wurde *lola* als Kandidat für die Festlegung von segmentaler Identität des NB6-4max ausgeschlossen, der Proliferationsphänotyp erregte jedoch Aufmerksamkeit.

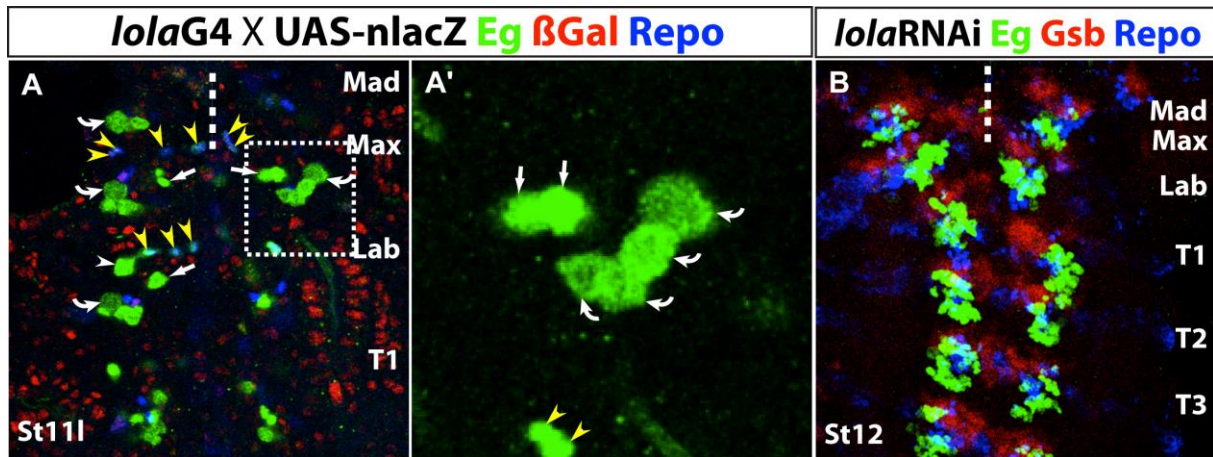


Abb. 3-68: Ballonphänotyp und Überproliferation bei Funktionsverlust von *lola*.

(A) Ballonphänotyp in verschiedenen Eg positiven Neuroblastenlinien im *lolaGal4 X UAS-n-lacZ* Fliegenstamm in St12. βGal Färbung ist nur in wenigen Zellen exprimiert, alle nicht βGal exprimierenden Zellen sind *lola* funktionsverlustmutante Zellen. (A') Vergrößerung des labialen NB3-3 und seinen Nachkommen, die alle den Ballonphänotyp aufweisen. (B) Überproliferation bei Funktionsverlust von *lola* durch RNAi im St12.

3.13.4. Zusammenfassung des Kapitels 3.13.

In Kreuzungen von *Abl¹Ama^{R1}* mit *Abl⁴* oder *Abl¹Nrt^{M54}* mit *Abl⁴*, sowie auch innerhalb der einzelnen Stämme tritt massive Überproliferation und eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellkerngröße im VNS auf, die mit einer sehr auffälligen Morphologie einhergeht.

Die Effekte sind nicht auf Neuroblasten beschränkt, sondern treten auch bei ausdifferenzierten Zellen auf.

3.14. Abl wirkt über den Hippo/Salvador/Warts Signalweg auf die Festlegung der segmentalen Identität von NB6-4max

Die Beobachtung des Proliferationsphänotyps in *Abl* mutantern Hintergrund führte zu der Annahme, dass *Abl* auch in die Regulation von Zellwachstum und Zellteilung involviert sein könnte. Ein Signalweg, der für die Regulation von Zellwachstum bekannt ist und der zudem auf *CycE* wirkt, ist der Hippo-Signalweg.

Beim Hippo/Salvador/Warts-Signalweg (HSW-Signalweg) handelt es sich um eine komplizierte Aufeinanderfolge von Kinasereaktionen, begonnen bei der Kinase Hippo, die im aktiven Zustand Salvador (Sav) (Pantalacci et al., 2003), sowie seine nachgeschalteten Kinasen Mats und Warts phosphoryliert. Warts kann so den für die weitere Reaktion verantwortlichen Faktor Yorkie (Yki) phosphorylieren (Huang et al., 2005; Harvey und Tapon, 2007; Pan, 2010; Halder und Johnson, 2011). Phosphoryliertes Yki kann die Kernmembran nicht passieren und verbleibt im Zytoplasma. Wird jedoch der HSW-Signalweg nicht aktiviert, kann das nicht phosphorylierte Yki in den Zellkern einwandern und dort gemeinsam mit den Transkriptionsfaktoren Tsh, Hth und Scalloped komplexieren und so die Transkription von unter anderem *CycE* anregen (Huang et al., 2005; Zhao et al., 2011).

3.14.1. Yorkie Funktion beeinflusst die Identität des NB6-4max

Sollte die Identität des maxillaren NB6-4 über Yki, und somit eventuell über die vorgeschaltete Regulationskaskade des HSW-Signalwegs, beeinflussbar sein, so müsste über Yki Funktion die Entstehung von ektopischen NB6-4max Neuronen induzierbar sein. Durch die ektopische Expression von konstitutiv aktivem Yki, das sich nicht phosphorylieren lässt und somit in den Zellkern eindringen kann, werden in 29% (n=30 Embryonen) der maxillaren NB6-4 Neurone gebildet (Abb. 3-69 A, A'). Die aufgeblähten Zellkerne und die verstärkte Zellproliferation treten hier ebenso wie in *Abl* Mutanten auf (Abb. 3-69 B). Somit festigt sich die Annahme, dass *Abl* über diesen Signalweg auf NB6-4max wirken könnte.

Im Idealfall würde sich die Delokalisation von nicht phosphoryliertem Yki in den Kern des NB6-4max in *Abl* Mutanten im Vergleich zum WT durch Antikörperfärbungen beobachten lassen. Im WT ist Yki im NB6-4max kurz vor seiner ersten Teilung zytoplasmatisch lokalisiert und somit vermutlich phosphoryliert und inaktiv (Abb. 3-69 C-C''). Leider ist die Lokalisation von Yki jedoch generell so dynamisch und das Farbsignal insgesamt so schwach, dass keine Aussagen aus den Antikörperfärbungen gegen Yki in *Abl^t* oder *lab¹Dfd¹²* Mutanten abgeleitet werden können (nicht gezeigt). Daher musste ein Umweg über den Nachweis von Sav eingeschlagen werden.

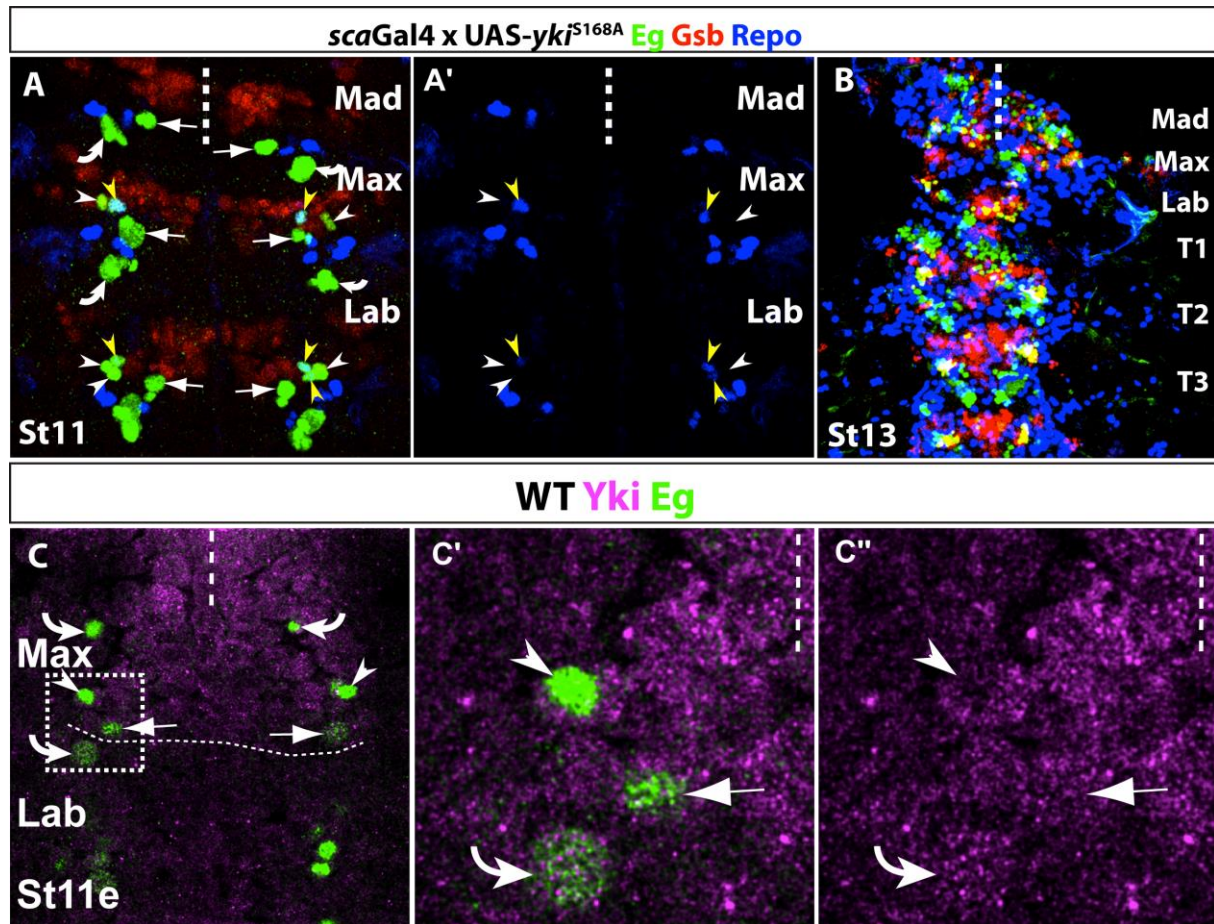


Abb. 3-69: Yki besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.

(A, B) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Repo (blau) und Gsb (rot) in *scaGal4 X UAS yki^{S168A}*, das eine konstitutiv aktive Form von Yki exprimiert, die sich nicht phosphorylieren lässt. (A) Es werden ektopische Neurone des NB6-4max in 29% gebildet. (B) Überproliferation und Ballonphänotyp treten auch bei konstitutiv aktivem Yki auf. (C) Wildtypische Expression von Yki (magenta) in den Eg positiven Neuroblastenlinien der Gnathalsegmente. (C') Vergrößerung des maxillaren linken Hemisegments. Yki ist im NB6-4max exprimiert und vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert, (C'') Einzelkanal Yki Proteinverteilung.

3.14.2. Salvador Expression ist in *Abl⁴* und in *lab¹Dfd¹²* Mutanten deutlich reduziert

Sav Protein muss für seine Stabilität durch Hippo phosphoryliert werden. Liegt Sav unphosphoryliert vor, so wird es abgebaut (Pantalacci et al., 2003). Sollte Abl Hippo phosphorylieren und Hippo daraufhin Sav, so könnte Sav hier als Indikation für Hippo Funktion benutzt werden. In Abwesenheit von *Abl* Funktion wäre Hippo und somit Sav nicht mehr phosphoryliert und somit müsste das Level an Sav geringer sein als im WT. Für Sav stand, im Gegensatz zu Hippo, ein funktionierender Antikörper zur Verfügung. Alle Antikörperfärbungen wurden wiederum unter exakt gleichen Bedingungen zeitgleich durchgeführt und standardisiert ausgewertet und bearbeitet, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

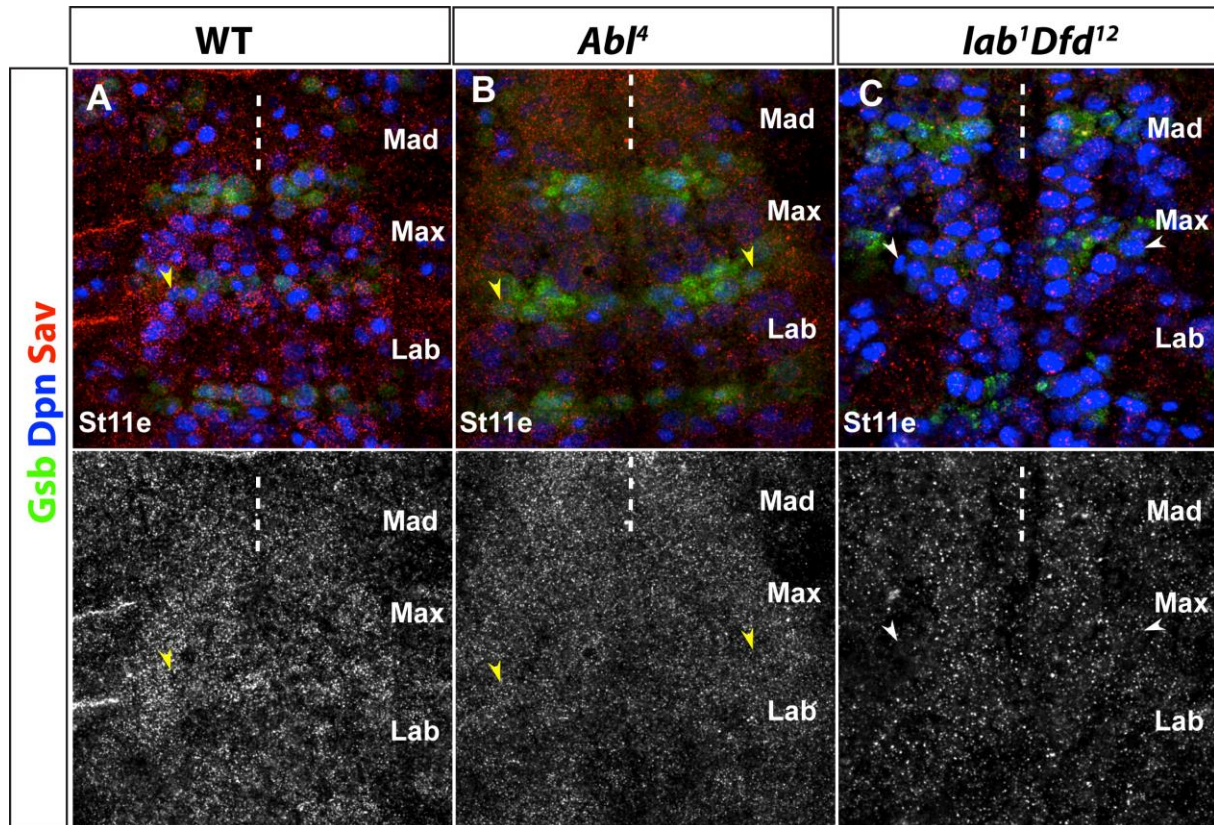


Abb. 3-70: Das Level an Sav ist in *Abl⁴* und *lab¹Dfd¹²* Mutanten reduziert.

Antikörperfärbung gegen Sav (rot) im WT (A), *Abl⁴* (B) und *lab¹Dfd¹²* Mutanten (C) gemeinsam mit Dpn (blau) und Gsb (grün) für die Identifikation des NB6-4max in St11. Sav (untere Abbildung jeweils in weiß) ist insgesamt in den mutanten Hintergründen im Vergleich zum WT stark reduziert, auch im NB6-4max.

In St11 liegt Sav im WT in allen Neuroblasten, auch im NB6-4max, deutlich vor (Abb. 3-70 A). Sowohl in *Abl⁴* (Abb. 3-70 B), als auch in *lab¹Dfd¹²* (Abb. 3-70 C) Mutanten gibt es eine deutliche Reduktion von Sav im Neuroektoderm. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass Abl über Hippo und Yki auf *CycE* Transkription wirken könnte, und darüber die Identität des NB6-4max beeinflusst. Bei *Abl* Funktionsverlust liegt kein stabiles Sav vor und somit ist Hippo sehr wahrscheinlich nicht aktiv.

3.14.3. Alleiniger Funktionsverlust von *yorkie* hat keine Auswirkungen auf neuronale Identität von NB6-4

Der Funktionsverlust von *yki* sollte im Umkehrschluss den Verlust von Neuronen des NB6-4 im labialen oder in den thorakalen Segmenten verursachen, da so *CycE* Expression über die Funktionen von Yki nicht mehr induziert werden kann. *Yki* Funktionsverlust hat starke Auswirkungen auf den Embryo, meist sind die Tiere embryonal lethal (persönliche Mitteilung von Christian Berger). In *yki^{B5}* (n=25 Hemisegmente) mutantern Hintergrund werden jedoch alle NB6-4 in allen Segmenten wildtypisch ausdifferenziert (nicht gezeigt). Diese Situation entspricht der von ektopisch exprimierten *Abl*, auch dort ließ sich kein Effekt auf NB6-4 Neurone des Thorax oder Labialsegments feststellen. Somit ist die

Funktion von *yki* keine zwingende Voraussetzung für die Transkription von *CycE* im labialen und thorakalen NB6-4.

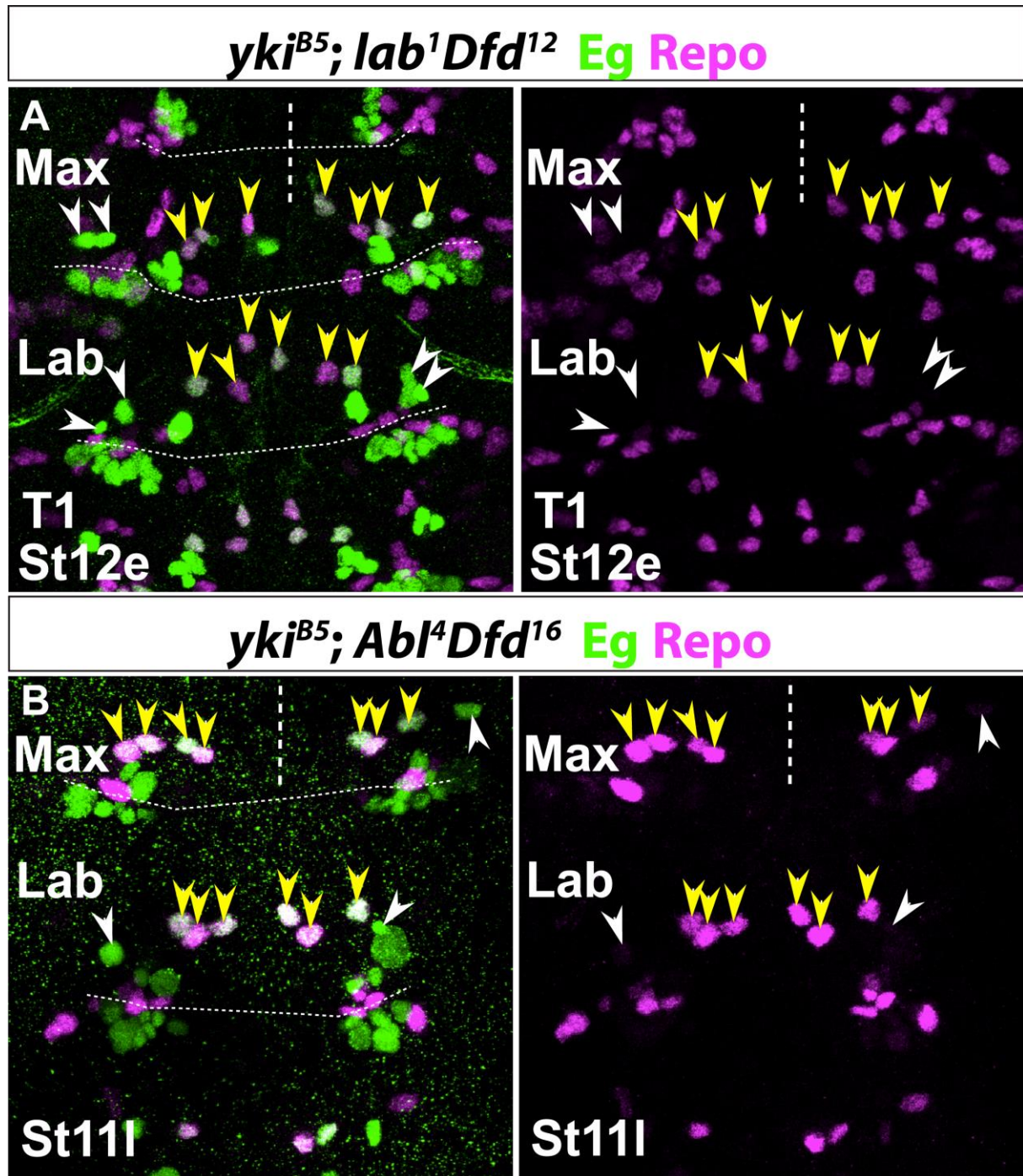


Abb. 3-71: Gleichzeitiger *yki* Funktionsverlust kann den durch *Abl* Verlust induzierten NB6-4max Phänotyp retten.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (magenta, im Einzelkanal rechts) in einer Dreifachmutante von (A) *yki*, *lab* und *Dfd* im St12e und (B) *yki*, *Abl* und *Dfd* in St111. (A) Zusätzlicher Funktionsverlust von *yki*^{B5} rettet die 100%ige Transformationsrate des maxillaren NB6-4 aus *lab*¹*Dfd*¹² Doppelmutanten um 36% auf eine Transformationsrate von 64%. (B) Zusätzlicher Funktionsverlust von *yki*^{B5} rettet die Transformationsrate von 95% der *Abl*⁴*Dfd*¹⁶ Doppelmutante um 31% auf 64%.

3.14.4. Gleichzeitiger Funktionsverlust von *yorkie* kann den durch *Abl* Funktionsverlust induzierten Phänotyp retten

Konstitutiv aktives Yki kann Neuronentstehung im NB6-4 auslösen (siehe Abb. 3-69). Sollte die Transformation des maxillaren NB6-4 durch die Abwesenheit von *Abl* Funktion und dessen Effekt auf Yki zustande kommen, so müsste die Transformationsrate von NB6-4max sowohl in *Abl⁴Dfd¹⁶* Mutanten, als auch in *lab¹Dfd¹²* Mutanten durch zusätzliche Mutation von *yki* wieder reduzierbar sein. In diesem Falle würde sich nur noch der Funktionsverlust von *Dfd* auswirken, der Effekt von *Abl* Funktionsverlust müsste aufgehoben sein. Tatsächlich lässt sich die Transformationsrate in *yki^{B5};lab¹Dfd¹²* (Abb. 3-71 A) Mutanten von 100% um 36% auf 64% aller Hemisegmente und in *yki^{B5};Abl⁴Dfd¹⁶* (Abb. 3-71 B) von 95% um 31% auf 69% Transformationsrate reduzieren (n=jeweils 35 maxillare Hemisegmente; die Erzeugung der Dreifachmutanten wurde dankenswerterweise von Christian Berger durchgeführt).

3.14.5. Die Entstehung ektopischer Neurone geht nicht mit Ausweitung der *teashirt* Expressionsdomäne einher

Als wichtiger Faktor für die Entstehung von NB6-4 Neuronen im WT wurde *tsh* identifiziert (vergleiche Kapitel 3.7.3.). Weiterhin ist *tsh* bisher der einzige identifizierte Faktor neben *CycE*, der über ektopische Expression Neuronentstehung im maxillaren NB6-4 induzieren kann. Eine Möglichkeit innerhalb oder parallel zu der Regulation von *CycE* Transkription über den Hippo Signalweg könnte eine Induktion von Neuronentstehung durch ektopisch auftretende Expression von *tsh* in den verschiedenen mutanten Hintergründen sein. Das über Antikörperfärbung feststellbare Expressionsmuster von Tsh ändert sich im Vergleich zum WT in den Einzel- oder Doppelmutanten nicht (Abb 3-72 A, hier gezeigt für *Abl⁴Dfd¹⁶*, vergleiche mit Abb. 3-43 für den WT). Ein weiterer für Neuronentstehung im Thorax und im Labialsegment verantwortlicher Faktor ist *hth* (vergleiche Kapitel 3.7.4.), wobei Hth im Gegensatz zu Tsh auch im WT im NB6-4max exprimiert ist. Hth Expression verändert sich in den verschiedenen mutanten Hintergründen ebenfalls nicht (Abb. 3-72 B, hier gezeigt für *Abl⁴*, vergleiche mit Abb. 3-47 für den WT). Auch Exd Expression (vergleiche Kapitel 3.7.4.) bleibt in *Abl⁴* Mutanten unverändert (nicht gezeigt).

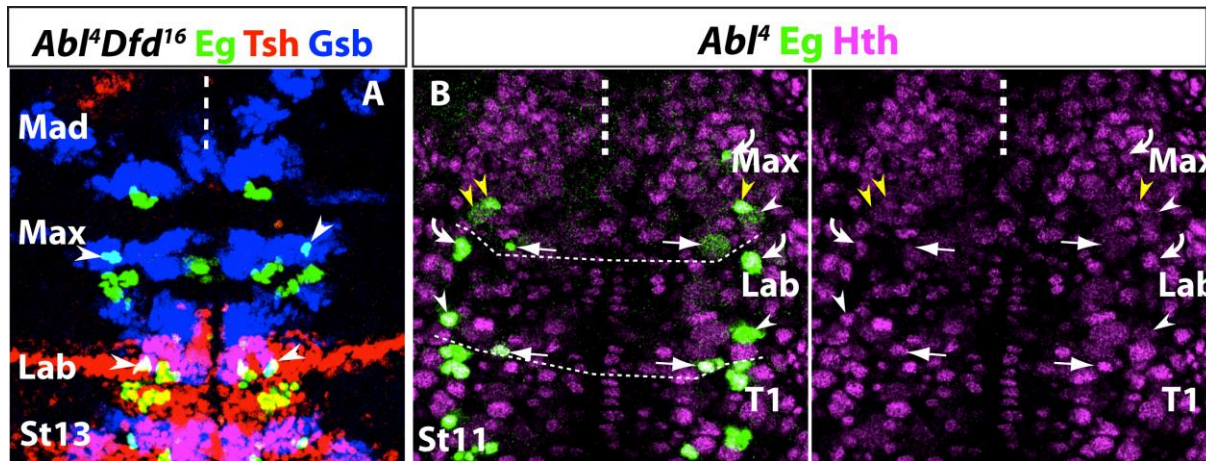


Abb. 3-72: Die Expressionsdomänen von Tsh und Hth ändern sich in *Abl* Mutanten im Vergleich zum WT nicht.

(A) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Tsh (rot) und Gsb (blau) in *Abl⁴Dfd¹⁶* Doppelmutanten im St13. Die Expressionsdomäne von Tsh umfasst das posteriore Labialsegment und weiter posterior lokalisierte Segmente, im Maxillarsegment ist keine Expression feststellbar. Auch in ektopischen Neuronen des NB6-4 (markiert durch Pfeilspitzen in beiden Hemisegmenten) ist keine Expression von Tsh vorhanden. (B) Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Hth (magenta, rechts im Einzelkanal) in *Abl⁴* Mutanten im St11. Die Expression von Hth umfasst den maxillaren NB6-4 und seine Nachkommenzellen.

Es lässt sich bis hierhin festhalten, dass die wildtypische segmentale Identität des NB6-4max neben der direkten zellautonomen Funktion von *Dfd* und *Scr* in einem zweiten, nicht-zellautonomen Weg über *lab*, *Dfd*, *Scr* und *Antp* Funktion entscheidend mitbestimmt wird. *Lab*, *Antp*, *Scr* und *Dfd* wirken auf die Transkription von *Ama*, einem sezernierten Protein. Die Funktion von *Ama* ist die Voraussetzung für eine korrekte Funktion von *Nrt* (Liebl et al., 2003). Wildtypische Expression von *Ama* ist weiterhin die Voraussetzung für eine wildtypische Expression von *Abl*. *Abl* kann, vermutlich über den Hippo-Signalweg, die Phosphorylierung von *Yki* ermöglichen und so voraussichtlich die Transkription von *CycE* im maxillaren NB6-4 verhindern. *CycE* ist der entscheidende Faktor für die Festlegung von neuronaler Identität der Nachkommenzellen des NB6-4. Fehlt die Funktion von *Ama*, *Nrt*, *Dab* oder *Abl*, oder liegt *Yki* als konstitutiv aktive, nicht-phosphorylierbare Variante vor, so entstehen als Folge in etwa 40% ektopische NB6-4max Neurone. Fehlt die reprimierende Funktion sowohl des nicht-zellautonomen Weges von *lab* oder *Antp* als auch die zellautonome Funktion von *Dfd* gemeinsam, so entstehen in 100% NB6-4max mit einer Identität aus Gliazellen und einem neuronalen Cluster. Fehlt zusätzlich zum Funktionsverlust von *Abl* mit *Dfd* oder von *lab* mit *Dfd* die Funktion von *yki*, so kommt es wieder zu einer Reduktion der Transformationsrate auf etwa 64%. Dieser bis hierher gefundene komplexe Regulationsweg ist jedoch höchst wahrscheinlich noch von weiteren Faktoren beeinflussbar, wie die im Folgenden gefundenen Ergebnisse vermuten lassen.

3.14.6. Zusammenfassung des Kapitels 3.14.

Ektopische Expression von *yki* führt zu einer Transformationsrate von des NB6-4max um 29%, die auffällige Zellkernmorphologie und die starke Überproliferation treten hier ebenfalls auf.

Die Lokalisation von Yki innerhalb des NB6-4 lässt sich aufgrund zu hoher Expressionsdynamik nicht ermitteln.

Sav Proteinlevel ist in *Abl⁴* und *lab¹Dfd¹²* im Vergleich zum WT reduziert.

Alleiniger Funktionsverlust von *yki^{B5}* hat keine Auswirkungen auf NB6-4. Gleichzeitiger Funktionsverlust von *yki^{B5}* mit *lab¹Dfd¹²* rettet den Phänotyp um 36%, gleichzeitig mit *Abl⁴Dfd¹⁶* um 31%.

Die Entstehung von ektopischen Neuronen des NB6-4max ist nicht mit ektopischer Expression von *tsh* oder *hth* verbunden.

3.15. Midline ist an der Festlegung segmentaler Identität des NB6-4max beteiligt

Ein weiterer unerwartet in die Ausprägung segmentaler Identität von NB6-4max involvierter Faktor ist das Segmentpolaritätsgen *midline* (*mid*), auch als *neuromancer2* bekannt (Buescher et al., 2004; Reim und Frasch, 2005). An welcher Stelle und mit welcher Funktion *mid* auf die Identitätsfestlegung von NB6-4max wirkt, ist vor dem Hintergrund dieses bisher gefundenen Regulationsweges eine sehr interessante Frage.

mid wurde als möglicher Faktor für dieses Projekt ausgewählt, da es im Screen von Stefanie Hueber et al., 2007 als Hoxgen Interaktionspartner gefunden wurde. Weiterhin gibt es Hinweise auf Expression im NB6-4 (Gaziova und Bhat, 2009), wobei dieses Ergebnis strittig ist und sich durch die Untersuchungen anderer Labore nicht bestätigte (Buescher et al., 2006). Um hier Klarheit über *mid* Expression für den NB6-4max zu schaffen, wurde zunächst die Expression von *mid* mRNA und Protein untersucht.

3.15.1. Die Expression von *midline* im VNS ist sehr dynamisch

mid gehört zur Tbx Genfamilie und ist an der Regulation von Musterbildungsprozessen in der Epidermis, bei der Spezifizierung von Kardioblasten und bei der Identitätsbildung von Eve exprimierenden Neuronen im VNS beteiligt (Qian et al., 2005; Reim und Frasch, 2005; Buescher et al., 2006; Leal et al., 2009). Zu *mid* existiert ein paraloges Gen, *H15*, das teilweise dieselben Funktionen übernimmt. H15 Protein wird erst spät ab St14 exprimiert (Leal et al., 2009) und wurde daher nicht weiter als Kandidat für die Identitätsfestlegung von NB6-4max untersucht. Die Expression von *mid* ist im WT schwer zu analysieren, da das Expressionsmuster zeitlich sehr dynamisch ist. Protein und mRNA unterscheiden sich in ihrer Verteilung und in ihrer Expressionsdauer stark. Generell ist *mid* im posterioren Teil jedes Segments exprimiert, wobei sich gradzahlige und ungradzahlige Segmente in ihrer Expressionsstärke stark unterscheiden (Buescher et al., 2004).

Im WT ist *mid* mRNA ab frühen Stadien auch im Neuroektoderm als segmental wiederholtes Expressionsmuster sichtbar (Abb. 3-73 A). Im St11 ist die mRNA im VNS eher in einzelnen Zellgruppen nachweisbar (Abb. 3-73 B). Im NB6-4max und NB6-4lab ist zum Zeitpunkt der Delamination geringe Menge an *mid* mRNA detektierbar, allerdings tritt dieses Farbsignal nur in wenigen Embryonen auf (Abb. 3-73 B). In etwas späteren Stadien ist deutlich keine mRNA im NB6-4 vorhanden (Abb. 3-73 C). Antikörperfärbungen gegen Mid lassen ebenfalls kein Protein im NB6-4 oder seinen Nachkommenzellen erkennen (Abb. 3-73 D). Es ist somit unwahrscheinlich, dass der Neuroblast nach seiner Delamination Mid exprimiert. In *Dfd* Einzelmutanten und *lab¹Dfd¹²* Doppelmutanten konnte keine Abweichung von der wildtypischen Expression beobachtet werden (Abb. 3-73 E, F). Auf die segmentale Identität von NB6-4 hat *mid* jedoch Auswirkungen.

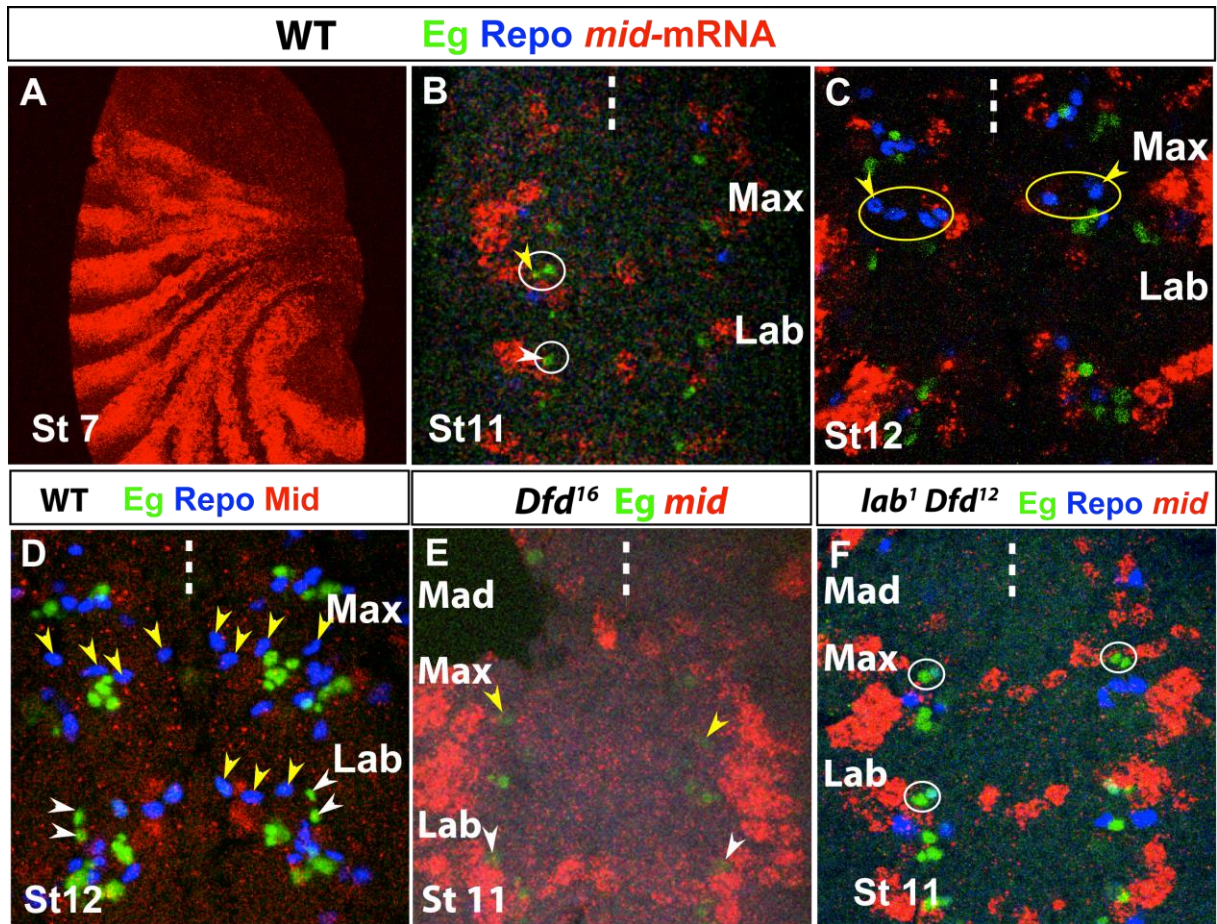


Abb. 3-73: Wildtypische Expression von *mid*.

(A-C) *mid* mRNA in situ Hybridisierung (rot) mit Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (blau) im WT in verschiedenen Entwicklungsstadien. (A) *mid* ist in einem, sich segmental wiederholenden Streifenmuster schon in frühen Entwicklungsstadien exprimiert. (B und C) In wenigen Embryonen ist Expression von *mid* mRNA im NB6-4 direkt nach der Delamination detektierbar (B), in den meisten Fällen und auch seinen Nachkommenzellen findet keine Expression statt. (D) Antikörperfärbung gegen Mid (rot), gezeigt ist St12. Es findet keine Expression im NB6-4 statt. (E und F) *mid* mRNA in situ Hybridisierung (rot) mit Antikörperfärbung gegen Eg (grün) und Repo (blau) in *Dfd*¹⁶ und *lab*¹*Dfd*¹² im Vergleich zum WT. Die Expression von *mid* verändert sich nicht, auch hier findet keine Expression im NB6-4 statt.

3.15.2. Funktionsverlust von *midline* führt zur Identitätsveränderung von NB6-4max

Eg Protein Expression ist in *mid* Mutanten auch im NB7-4 vorhanden (Gaziova und Bhat, 2009). Dieser NB und alle seine Nachkommen, zu denen auch Gliazellen gehören, exprimieren Eg. Dadurch wird die Analyse von NB6-4 Nachkommenzellen schwierig, weshalb Eg, Gsb und En Antikörperfärbungen durchgeführt wurden, um NB6-4 und NB7-4 durch die Expression von Gsb eindeutig voneinander unterscheiden zu können (Abb. 3-74 A).

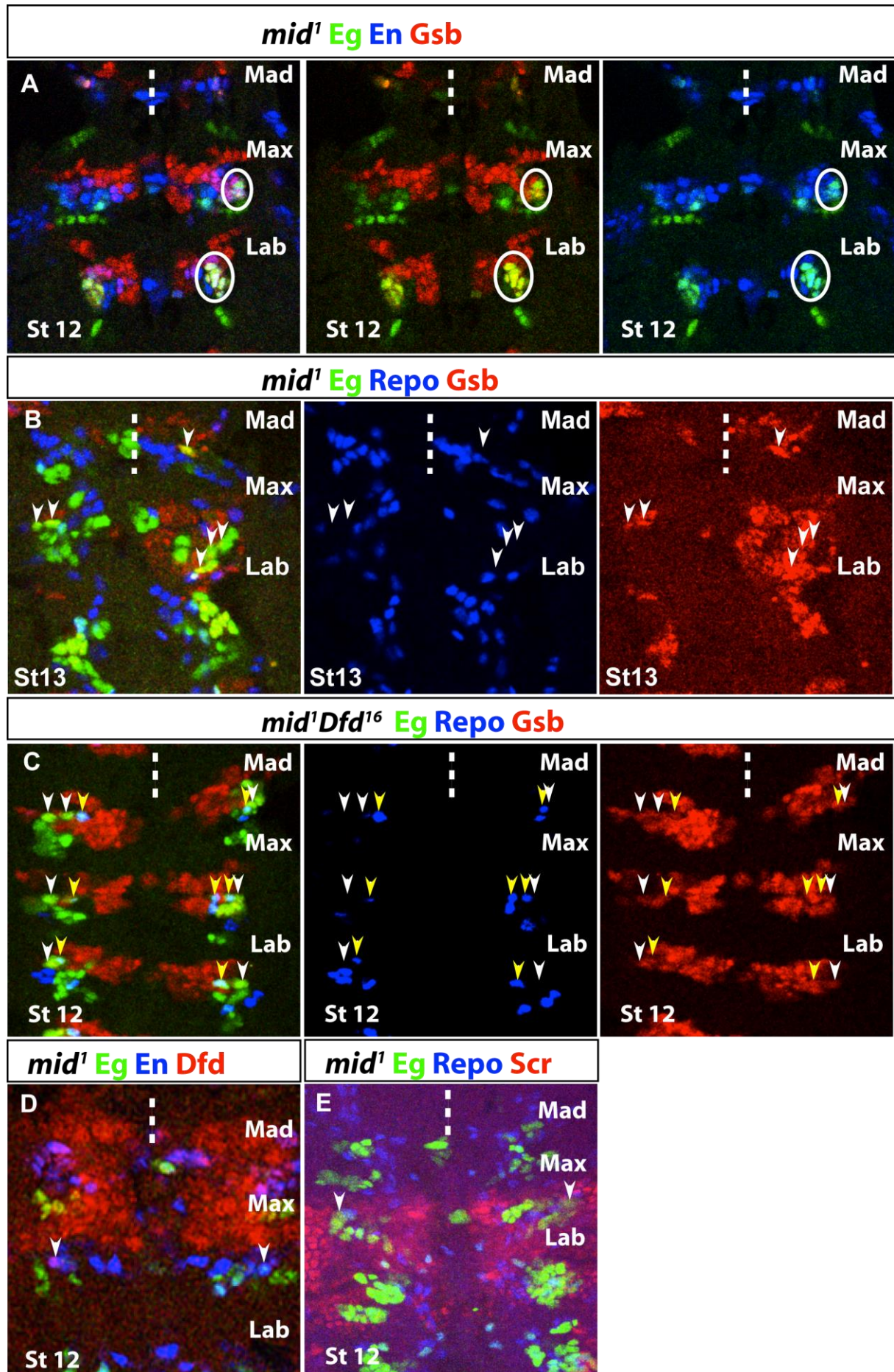


Abb. 3-74: Mid besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.

(A, B) Analyse des NB6-4max Phänotyps in *mid^l* Mutanten. (A) Antikörperfärbung der Markerkombination von Eg (grün), En (blau) und Gsb (rot) zur eindeutigen Erkennung von NB6-4 (markiert durch weiße Kreise), da NB7-4 bei *mid* Funktionsverlust ektopisch Eg exprimiert. Die jeweilige Darstellung einzelner Kanäle (bzw. in A gemeinsam mit Eg) dient dem eindeutigen Nachweis von Coexpression im NB6-4. NB6-4 weist Expression von Gsb und En auf. (B) Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Repo (blau) und Gsb (rot). NB6-4max bildet ektopische Neurone in 41% aus, zudem tritt ein ektopischer NB6-4mad, meist mit ektopischen Neuronen in 40% auf. (C) Doppelmutante von *Dfd^{l6}* mit *mid^l*, hier treten ektopische Neurone des ektopischen mandibularen und des maxillaren NB6-4 in 85% auf. (D und E) Analyse der Expression von *Antp*-K Genen in *mid^l*. Die Expression von *Dfd* und *Scr* ist nicht verändert gegenüber dem WT, in ektopischen Neuronen des NB6-4max tritt sowohl *Dfd* (D), als auch *Scr* (E) Expression auf.

In *mid^l* Einzelmutanten ist in 41% (n=52 Embryonen) der NB6-4max zu einer gemischten Identität aus drei Gliazellen und einem neuronalen Cluster transformiert (Abb. 3-74 B), vergleichbar mit der Transformationsrate in *Dfd*, *Ama*, *Abl* und *Dab* Mutanten. Da *mid* auf Chromosom 2 lokalisiert ist, konnte eine Doppelmutante von *Dfd^{l6}* und *mid^l* erzeugt werden. Diese Doppelmutante hat eine Transformationssteigerung des NB6-4max auf 85% gegenüber den beiden Einzelmutationsraten von jeweils 41% (*mid*) bzw. 43% (*Dfd*) der Einzelmutation (Abb. 3-74 C). Ektopische Expression von *mid* mit *sca*-Gal4 hat keinerlei Auswirkungen auf die segmentalen Identitäten des NB6-4 oder auf andere Eg positive Zelllinien (nicht gezeigt). Dass *mid* Funktionsverlust aufgrund seiner Funktion als Segmentpolaritätsgen vermutlich weitreichende Auswirkungen auf die Festlegung von segmentalen Identitäten hat, wird an häufiger auftretender ektopischer Eg Expression im MNB weiter posteriorer Segmente deutlich (nicht gezeigt). Zusätzlich tritt auch in *mid* Mutanten der Überproliferationsphänotyp auf (vergleiche Abb. 3-75).

3.15.3. Deformed und Sex combs reduced Expression ist unabhängig von *midline*

Die Protein Expression von *Dfd* und *Scr* bleiben in *mid^l* Mutanten unverändert gegenüber wildtypischen Embryonen. In ektopischen NB6-4max Neuronen von *mid^l* findet sich in St11, ebenfalls wie in *Abl⁴*, *Dfd* Expression (Abb. 3-74 D), sowie Expression von *Scr* (Abb. 3-74 E).

3.15.4. Teashirt Expression ist in *midline* Mutanten unverändert

Auch hier stellt sich die Frage nach möglicher Expansion der Expressionsdomäne des neuronale Identität induzierenden Faktors *tsh* auf das Maxillarsegment durch eventuell fehlende Repression von *tsh* durch *Mid*. Die Expression von *Tsh* weicht hier jedoch nicht von ihrer wildtypischen Expression ab (Abb. 3-75).

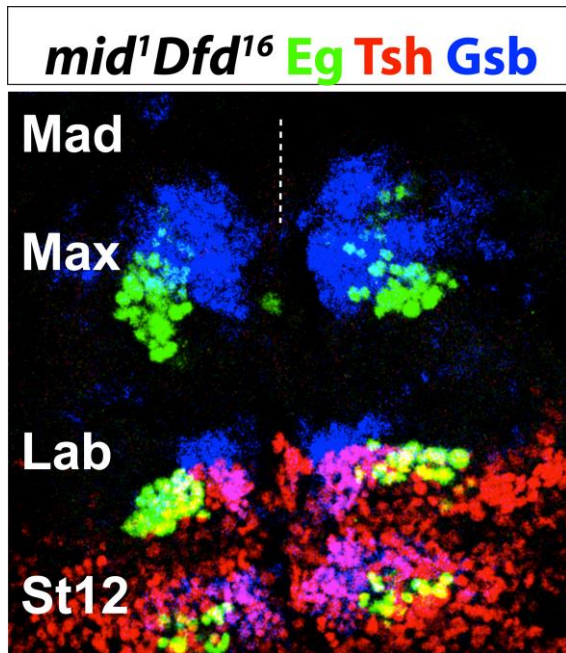


Abb. 3-75: Expression von Tsh in *mid*¹; *Dfd*¹⁶ Doppelmutanten breitet sich nicht in das Maxillarsegment aus.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün), Tsh (rot) und Gsb (blau) in *mid*¹; *Dfd*¹⁶ Doppelmutanten im St12. Der mandibulare und der maxillare Gsb Expressionsstreifen sind durch starke Proliferation nur schwer voneinander unterscheidbar, ebenso können die Eg positiven Zellstambäume nicht mehr einzeln angesprochen werden. Das Maxillarsegment ist neben der Expressions von Gsb durch die Eg Expression im MNB erkennbar, der mandibulare MNB exprimiert bei *Dfd* Funktionsverlust kein Eg mehr. Die Expression von Tsh reicht in den posterioren Teil des Labialsegments, anterior dazu findet sich keine Tsh Expression.

3.15.5. Amalgam Expression wird über *midline* reguliert

Nun stellt sich die Frage, ob *mid* einen weiteren Weg zur Herstellung der korrekten segmentalen Identität des NB6-4max kontrolliert, oder ob *mid* ebenfalls Einfluss auf den nicht zellautonomen Regulationsweg über *Ama* hat. Da keine regelmäßige Veränderung der Expression von *mid* in Hoxmutanten und auch keine veränderte Hox Expression in *mid* Mutanten beobachtbar ist, jedoch eine hohe Transformationsrate des NB6-4max besteht, wäre dies eine Erklärungsmöglichkeit.

Eine in situ Hybridisierung von *Ama* mRNA in *mid* Mutanten bringt ein überraschendes Ergebnis. *Ama* mRNA Expression ist in *mid* Mutanten im Vergleich zum WT stark reduziert (Abb. 3-76). Häufig entsteht der Eindruck von insgesamt verminderter Expression, die jedoch nicht die *lab* Expressionsdomäne im Tc umfasst. In St10 und St11 Embryonen tritt deutlich ein Streifenmuster der *Ama* mRNA auf, das in jedem ungradzahligen Segment stärker verminderte Expression zeigt als in jedem gradzahligen (Abb. 3-76 B). Dies deckt sich mit der stärkeren wildtypischen Expression von *mid* in jedem ungradzahligen Segment (Buescher et al., 2004). Da Scr Expression in *mid* Mutanten unverändert gegenüber wildtypischer Expression ist, kann die Reduktion der *Ama* mRNA Expression nicht auf eine Veränderung der Scr Expressionsdomäne zurückgeführt werden. *mid* Funktion ist somit für die korrekte Expression von *Ama* mRNA notwendig und kann daher eventuell den gesamten weiteren, nicht zellautonomen Weg über *Abl* und *yki* für die Herstellung segmentaler Identität des NB6-4max mit beeinflussen.

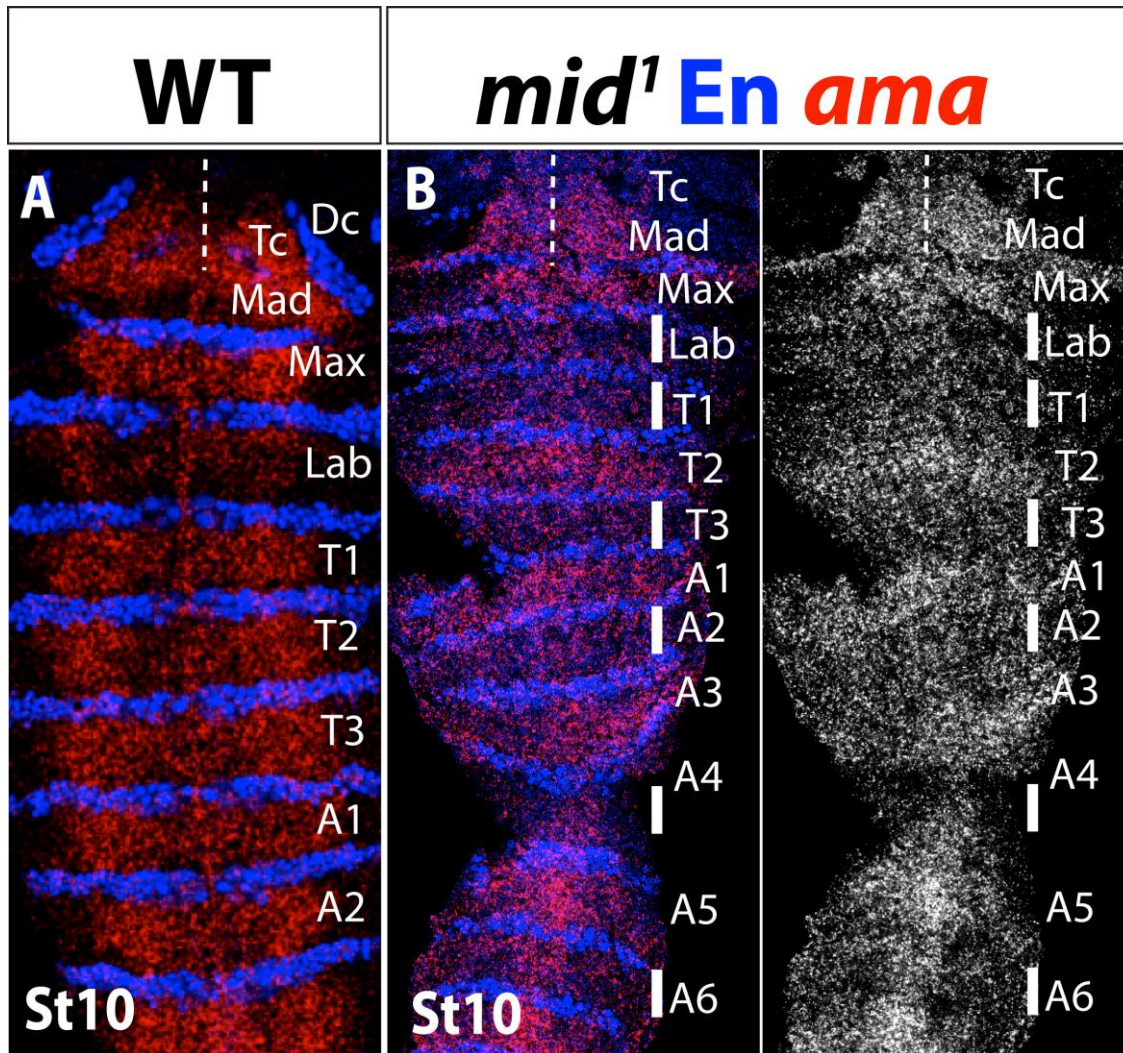


Abb. 3-76: *Ama* mRNA Expression ist in *mid*¹ verändert.

Ama mRNA *in situ* Hybridisierung (rot, im Einzelkanal weiß) mit Antikörperfärbung gegen En (blau) im WT (A) und in *mid*¹ Mutanten (B). *Ama* mRNA ist in *mid*¹ Mutanten, neben der wildtypischen schwachen Expression im Labialsegment, in jedem zweiten Segment reduziert (Segmente mit schwächerer Expression sind durch die weißen Balken gekennzeichnet).

3.15.6. Zusammenfassung des Kapitels 3.15.

In *mid*¹ Mutanten tritt eine Transformationsrate von 41% des maxillaren NB6-4 auf. Bei Doppelfunktionsverlust von *Dfd*¹⁶ und *mid*¹ steigert sich die Transformationsrate auf 85%.

In *mid*¹ Mutanten tritt der starke Überproliferationsphänotyp auf.

Die Expression von *mid* ist zwischen WT und *Antp*-K Mutanten nicht verändert. Die Expression von *Scr* und *Dfd*, sowie von *Tsh* ist in *mid*¹ Mutanten unverändert.

Ama mRNA Expression ist von *mid* Funktion abhängig, in *mid*¹ Mutanten ist *Ama* Expression reduziert.

3.16. Veränderungen mandibularer segmentaler Identität

3.16.1. Funktionsverlust von *Deformed*, *Abl* und *midline* haben Auswirkungen auf das Mandibularsegment

Nicht nur der maxillare NB6-4 ist von der Funktion von *Dfd* abhängig, auch im Mandibularsegment werden Veränderungen bei Funktionsverlust von *Dfd* hervorgerufen. Interessanterweise treten diese Veränderungen auch in *mid*, *Ama*, *Nrt*, *Dab* und *Abl* Mutanten auf.

Im WT wird ein mandibularer NB6-4 nicht gebildet (siehe Kapitel 3.1.1.4. und Urbach et al., 2016). Vor diesem Hintergrund wird die Existenz eines zusätzlichen Eg positiven Neuroblasten im Mandibularsegment in den verschiedenen mutanten Hintergründen besonders interessant.

In *Dfd* Mutanten sind in etwa 10% (n>100 Embryonen) der mandibularen Hemisegmente Eg oder Eg und Repo positive Zellen an möglicher Position eines zusätzlich entstehenden mandibularen NB6-4 platziert (Abb. 3-77 A). In *Ama*, *Abl*, *Dab*, (Abb. 3-77 B-C) oder *Nrt* Mutanten werden ebenfalls mögliche ektopische NB6-4 im Mandibularsegment generiert. In *mid* Mutanten entstehen sogar in bis zu 40% (n=50 Embryonen) Eg und Repo positive Zellen, die durch zusätzliche Gsb Expression und anhand ihrer Lage NB6-4 zugeordnet werden könnten, in Doppelmutanten von *mid*¹; *Dfd*¹⁶ ist ein möglicher mandibularer NB6-4 in 85% (n=50 Embryonen) der Hemisegmente zu identifizieren (siehe Abb. 3-74 B, C). In *lab*¹*Dfd*¹² Doppelmutanten bleibt allerdings die Entstehungsrate von 10% (n>100 Embryonen) erhalten.

Diese Zellen exprimieren eindeutig En und Gsb und könnten sowohl von ihrer Markerexpression als auch von ihrer Lage, im Bezug auf die weiteren Eg positiven Neuroblastenlinien, ektopisch entstehende NB6-4 Nachkommenzellen sein. Die gebildeten Eg, Gsb und En positiven Glia liegen zunächst lateral und wandern dann wie NB6-4 Glia in anderen Segmenten nach medial. In rund einem Viertel der Hemisegmente entstehen neuronale Cluster. Sie weisen meist drei Zellen auf und liegen lateral. Ektopisch exprimiertes *CycE* kann einen mandibularen möglichen NB6-4 ebenfalls in 8% der Hemisegmente generieren (Ergebnis aus Statistik der Diplomarbeit entnommen).

Es zeichnet sich ab, dass sowohl *Dfd* als auch *Ama*, *Abl* und *mid* eine Funktion für die Herstellung segmentaler Identität des Mandibularsegments besitzen. Die Bedeutung des Segmentpolaritätsgens *mid* hebt sich diesbezüglich jedoch deutlich von den Effekten der anderen Kandidaten ab.

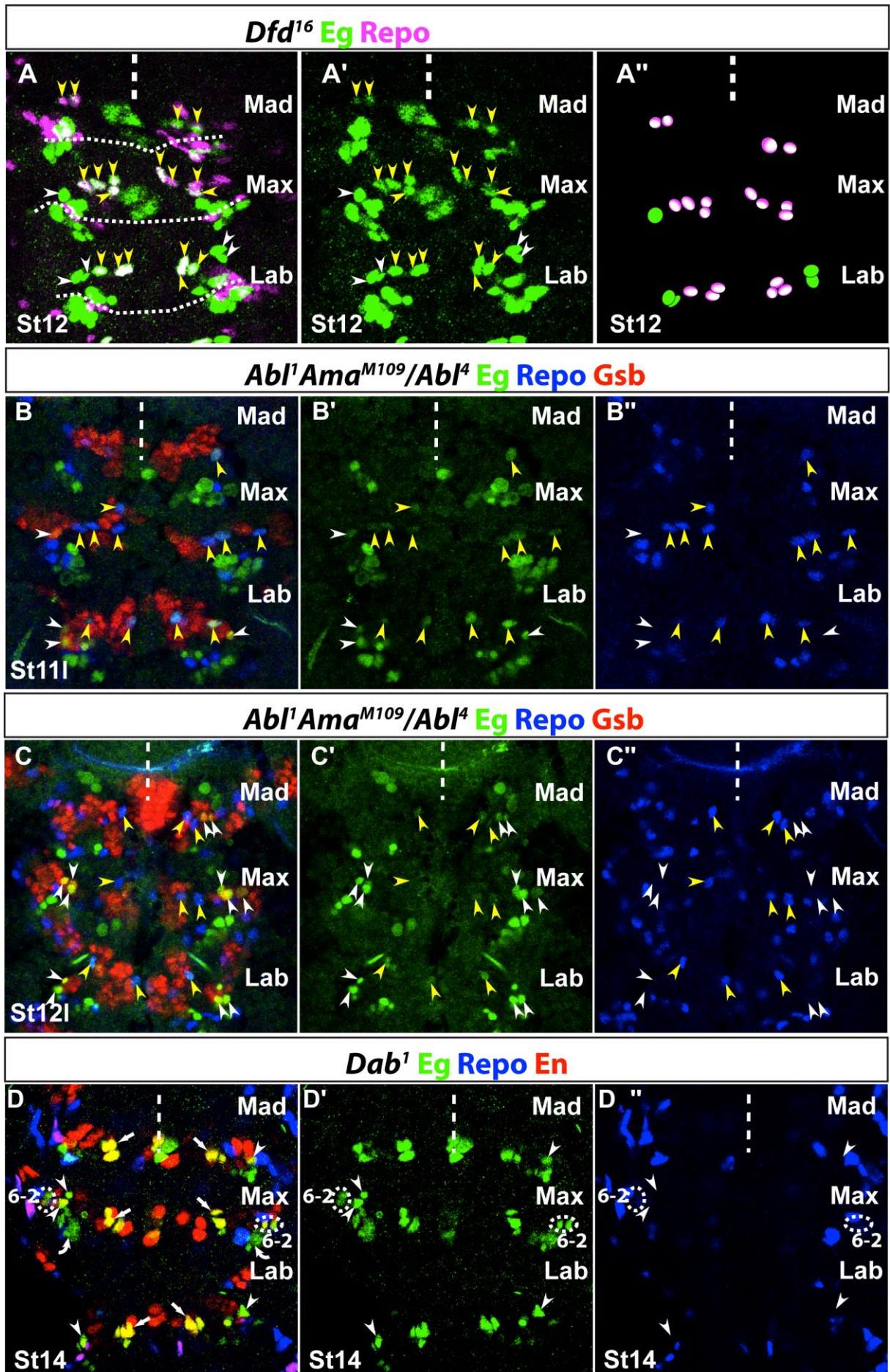


Abb. 3-77: Entstehung eines Eg positiven mandibularen NB6-4 in verschiedenen Funktionsverlustmutanten.

Antikörperfärbungen gegen Eg (grün) und Repo (in (A) magenta, in (B-D) blau) und zusätzliche Expression von Gsb oder En (rot) in verschiedenen mutanten Hintergründen zur Identifikation eines ektopischen mandibularen Eg positiven Neuroblasten als möglicher NB6-4. (A) In *Dfd*¹⁶ Mutanten entstehen regelmäßig in etwa 10% der Hemisegmente Eg oder Eg und Repo positive Zellen an Position eines mandibularen NB6-4. (A') Einzelkanal Eg zur eindeutigen Identifikation der zusätzlichen Zellen als Eg positiv. (A'') Cartoon mit Hervorhebung der NB6-4 Zelllinien in allen drei gnathalen Segmenten. (B, C) In Kreuzungen aus *Abl*¹*Ama*^{M109} mit *Abl4* entstehen mandibulare Glia (in B), oder Glia und Neurone (in C). (D) In der *Dab*¹ Mutante sind zusätzlich zu ektopischen NB6-4 Neuronen im Mandibular- und im Maxillarsegment auch die Eg positiven Zellen des NB6-2 gekennzeichnet (D, weiße Kreise). (B'-C' und B''-C'') Einzelkanäle zur Identifikation der Identität der Zellen als Glia oder Neurone.

Da während der Anfertigung dieser Arbeit die Existenz eines wildtypischen mandibularen NB6-4 und dessen möglicherweise vorhandene wildtypische transiente Eg Expression aufgrund vorläufiger Ergebnisse der Kartierungen des gnathalen Neuroblastenmusters von Rolf Urbach strittig war, wurde ab diesem Punkt die Entstehung des NB6-4mad nicht weiter untersucht. Es war aufgrund der strittigen wildtypischen Existenz eines mandibularen NB6-4 nicht klar, ob die gefundene Effekte in den verschiedenen Mutanten nur eine Veränderung der Dauer der Eg Expression, eine Veränderung der Identität oder tatsächlich die Entstehung eines Neuroblasten bewirken (siehe Kapitel 3.1.1.4.).

3.16.2. NB3-3 und NB7-3 sind in ihrer segmentalen Identität nicht von *Amalgam*, *Abl* oder *midline* Funktion abhängig

Der NB3-3 ist im Mandibularsegment im WT ebenfalls nicht eindeutig zu identifizieren (siehe Kapitel 3.1.1.2.). In *Dfd* Mutanten tritt jedoch kein ektopischer NB3-3 im Mandibularsegment auf, wie es bei NB6-4 der Fall ist, vielmehr gibt es einen Verlust des NB3-3 im Maxillarsegment (siehe Kapitel 3.1.2.2.). In *Ama*, *Abl* oder *mid* Mutanten wird ebenfalls kein ektopischer mandibularer NB3-3 gebildet. Der maxillare NB3-3 ist in diesen mutanten Hintergründen in seiner Identität und Ausprägung, abgesehen vom Proliferationsphänotyp, nicht betroffen. Dasselbe Ergebnis trifft für NB7-3 zu. Eine Abhängigkeit der segmentalen Identität des NB7-3 ist von den exprimierten Hoxgenen in den ganthalen Segmenten feststellbar (siehe Kapitel 3.2.1.5.), von *Ama*, *Abl* oder *mid* Funktionsverlust ist NB7-3 aber, abgesehen vom Proliferationsphänotyp, nicht regelmäßig betroffen.

3.17. Transformationen des abdominalen NB6-4

Bereits in den Untersuchungen der Diplomarbeit fiel auf, dass in den untersuchten *Antp*-K Mutanten abdominale NB6-4 in etwa 13% in thorakale Identität transformiert werden, hier beispielsweise gezeigt für *Dfd¹⁶* (Abb. 3-78 A). Die abdominalen Segmente wurden, ebenso wie die thorakalen Segmente, in den Untersuchungen über die gnathalen Zelllinien als interne Kontrolle innerhalb der verschiedenen Mutanten häufig in geringerer Stichprobe mitbetrachtet, daher fiel dieser Phänotyp auf. Diese abdominale Transformation ist aufgrund der anterioren Expressionsdomänen der *Antp*-K Gene sehr verwunderlich. Aber da sich dieser abdominale Phänotyp zunächst in die nicht durch die zellautonomen Funktionen der Hoxgene zu erklärenden Phänomene, die die Grundlage dieser Arbeit bilden, einreichte, wurde die Entschlüsselung der Auswirkungen der *Antp*-K Gene auf die abdominalen NB6-4 als ein eigenes Teilprojekt definiert (siehe Kapitel 1.5.).

3.17.1. Eindeutige Markerkombination für die Identifikation abdominaler NB6-4 Neurone

Da für die erste Bestimmung der Transformationsrate der abdominalen NB6-4 meistens nur Eg Repo Doppelfärbungen ohne weiteren Marker zur Identitätsbestimmung der NB6-4 Nachkommenzellen verwendet wurden, wären theoretisch Verwechslungsmöglichkeiten mit Zellen anderer Neuroblastenlinien möglich. Um dies auszuschließen, wurde zunächst eine eindeutigere Markerkombination mit Gsb oder als vierfach Kombination Eg, Repo, Gsb und En gewählt. Aufgrund dieser Markerkombination sind bereits in St11 bis in spätere Stadien hinein Zellen eindeutig als NB6-4 Nachkommenzellen zu identifizieren und können durch die Expression von Gsb nicht mit NB7-3 Zellen verwechselt werden.

Da bisher das wildtypische Auftreten von NB6-4 Neuronen im Abdomen als zu vernachlässigend gering beobachtet wurde (persönliche Mitteilung von Christian Berger, Ana Rogulja-Ortmann und Joachim Urban), wurde als Referenz dieselbe Markerkombination im WT durchgeführt. Zuvor war jedoch aufgefallen, dass auch im WT in einigen Fällen im Abdomen Zellen zu beobachten sind, die ihrer Position nach NB6-4 Neurone sein könnten.

3.17.2. Im WT weicht der abdominale NB6-4 in 10% von rein glialer Identität ab

Erstaunlicherweise finden sich im als Wildtypstamm verwendeten *Oregon R* in 10% (n= 52 Embryonen mit jeweils 16 abdominalen Hemisegmenten) ektopische Neurone des NB6-4, in einigen Embryonen tritt dieser Phänotyp sogar in mehreren Hemisegmenten eines einzigen Embryos auf (Abb. 3-78 B). Dies stellt eine Abweichung von bisher bekannten Daten mit den Ergebnissen ohne Transformationen des abdominalen NB6-4 dar. Um eine verlässliche Ausgangsbasis für die darauf folgenden Untersuchungen in mutanten Hintergründen zu schaffen, wurde daher zunächst versucht, dieses Ergebnis zu hinterfragen und abzusichern.

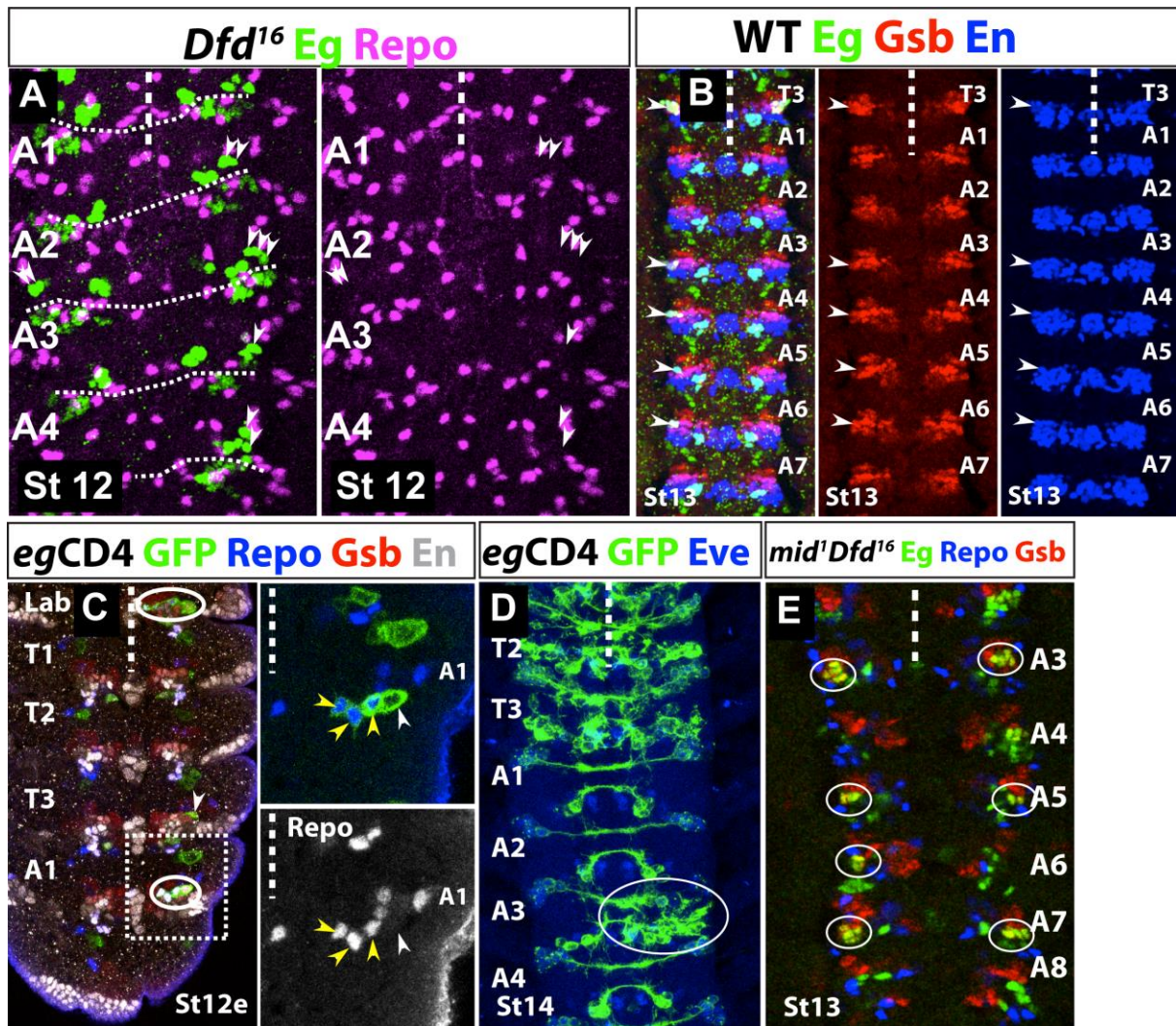


Abb. 3-78: Entstehung von Neuronen des NB6-4 in abdominalen Segmenten.

Antikörperfärbungen für die Identifikation von NB6-4 Neuronen im Abdomen in verschiedenen genetischen Hintergründen. (A) In den *Antp*-K Mutanten, hier ist die *Dfd*¹⁶ Mutante als Beispiel gezeigt, treten in etwa 13% ektopische NB6-4 Neurone auf. (B) Antikörperfärbung gegen En (blau), Gsb (rot) und Eg (grün) im WT in St13 für die eindeutige Identifikation von lateral gelegenen NB6-4 Neuronen. In 10% werden ektopische NB6-4 Neurone in abdominalen Segmenten gebildet. (C, D) Die ektopischen Neurone im Abdomen sind auch im *eg* Gal4 X UAS-CD4GFP Stamm eindeutig über ihre Expression von GFP als Neurone des NB6-4 zu erkennen. (D) Eindeutige Morphologie als NB6-4 neuronales Cluster im Vergleich zu thorakalen Segmenten wird in späteren Stadien durch die GFP Expression deutlich. Durch die Expression von Eve lässt sich NB3-3 eindeutig von ektopischen NB6-4 neuronalen Clustern im Abdomen unterscheiden. (E) Ektopische Neurone der abdominalen NB6-4 treten in *mid*¹; *Dfd*¹⁶ Mutanten in 70% auf.

Eine Vermutung war, dass sich durch veränderte Haltungsbedingungen die Ausprägung des NB6-4 (beispielsweise durch Veränderung der Nippagin Konzentration im Futterbrei) gegenüber den zeitlich weiter zurückliegenden Untersuchungen verändert haben könnte. Daher wurde die Transformationsrate in verschiedenen WT Stämmen aus unserem und aus dem Labor von Roland Strauß untersucht. Einige der verwendeten fixierten Embryonen wurden bereits im Jahr 2011 vor der Erhöhung von Nippagin im

Futterbrei fixiert, auch in diesen findet sich der Phänotyp in 10%. Interessanterweise tritt im WT *Canton S* aus beiden Laboren kein einziges ektopisches Neuron auf (n= 23 Embryonen mit jeweils 16 Hemisegmenten, nicht gezeigt).

Weiterhin wurde der *eg-Gal4XUAS-CD4-GFP* Stamm, der für die Analyse der gnathalen Eg positiven Zelllinien verwendet wurde, auf den abdominalen Phänotyp analysiert. Es lassen sich auch hier eindeutig NB6-4 Neurone im Abdomen finden, ebenfalls in teilweise mehr als einem Hemisegment pro Tier (Abb. 3-78 C, D).

Der Grund für die bisherige Beobachtung, dass der abdominale NB6-4 extrem selten Neurone generiert und für die hier abweichend gefundenen Ergebnisse für den abdominalen NB6-4 im WT, lässt sich nicht finden. Es ist jedoch festzuhalten, dass aufgrund der verwendeten Markerkombination eindeutig NB6-4 Neurone in abdominalen Segmenten sowohl im Wildtyp als auch in Mutanten identifiziert werden können.

3.17.3. In *Antennapedia*-Komplex Mutanten weicht der abdominale NB6-4 in 13% von rein glialer Identität ab

Die in den *Antp-K* Mutanten beobachteten Transformationsraten von rund 13% des abdominalen NB6-4 sind vor dem Hintergrund einer wildtypischen Transformationsrate von 10% nicht mehr besonders aussagekräftig. Aufgrund dieser Ergebnisse der Transformation im WT wird nicht mehr weiter davon ausgegangen, dass *Antp-K* Gene weitreichende Auswirkungen auf den abdominalen NB6-4 haben.

Geringe Einflüsse auf die segmentale Identität des abdominalen NB6-4 in *Antp-K* Mutanten über die Beeinflussung durch veränderte Konzentration an *Ama* und darüber ausgelöste Effekte, sind nicht per se auszuschließen. Da die gefundenen Effekte in den *Antp-K* Mutanten, sofern überhaupt vorhanden, jedoch sehr gering sind, kann hieraus keine derartige Vermutung gezogen werden. Um jedoch abschließend zu klären, ob die Funktion von *Ama* oder *Abl* Effekte auf den abdominalen NB6-4 hat, wurde der abdominale NB6-4 in *Abl* und *Ama* mutanten Hintergründen auf Veränderungen untersucht.

3.17.4. Bei *Amalgam* und *Abl* Funktionsverlust weicht der abdominale NB6-4 nicht auffallend oft von rein glialer Identität ab

In den Mutanten von *Ama* und *Nrt* entstehen ebenfalls unregelmäßig NB6-4 Neurone im Abdomen, allerdings nicht in regelmäßig vom WT abweichender Rate. In einigen Embryonen sind, wie im WT und den *Antp-K* Mutanten, ebenfalls mehr als ein abdominales Hemisegment hin zu neuronaler Identität verändert. Es treten jedoch, ebenso wie im WT und den *Antp-K* Mutanten, auch hier Embryonen ohne jegliche Transformation im Abdomen auf. In *Abl* Mutanten konnten interessanterweise keine ektopischen NB6-4 Neurone beobachtet werden (n= 56 Embryonen).

Aufgrund dieser stark divergierenden Ergebnisse kann keine Aussage über den Einfluss von *Ama* oder *Abl* Funktion auf die segmentale Identität des abdominalen NB6-4 getroffen werden. Es lässt sich jedoch

festhalten, dass die Auswirkungen von *Ama* oder *Nrt* Funktionsverlust nicht in einem Ausmaß zu einer Veränderung der segmentalen Identität führt, wie es für den maxillaren NB6-4 beobachtet werden konnte.

3.17.5. Funktionsverlust von *midline* hat stärkere Auswirkungen auf die segmentale Identität des abdominalen NB6-4

Eine Ausnahme bezüglich der Auswirkungen auf die segmentale Identität des abdominalen NB6-4 ist der Funktionsverlust von *mid*. In *mid* oder *mid¹Dfd¹⁶* Mutanten tritt eine abdominale Transformationsrate von 70% aller analysierten Hemisegmente auf, nicht selten gibt es eine Transformationsrate innerhalb eines Embryos von über 50% (Abb. 3-78 E). Eine so starke Abweichung von rein glialer Identität des abdominalen NB6-4 tritt im WT nicht auf. Allerdings gibt es auch *mid*-mutante Embryonen ohne ein einziges transformiertes abdominales Hemisegment. In diesen Embryonen ist jedoch durch beispielsweise die Transformation des maxillaren NB6-4 oder durch ektopische Eg Expression in MNB Nachkommenzellen des Thorax der Effekt von *mid* Funktionsverlust auf den Embryo erkennbar, abdominale NB6-4 sind aber dennoch nicht betroffen (nicht gezeigt).

Insgesamt zeichnet sich die Analyse der Transformationsrate des abdominalen NB6-4 als sehr variabel und komplex aus. Da die Unterschiede zum WT nicht klar zu verzeichnen sind und das Hauptaugenmerk dieser Studie auf der Ausprägung gnathaler Identität lag, wurde die weitere Suche nach Erklärungen für die Transformation des abdominalen NB6-4 hier abgebrochen. Festhalten lässt sich aber eindeutig, dass die in *Antp-K* mutanten Embryonen transformierten abdominalen NB6-4 wahrscheinlich nicht durch über weite Strecken wirkende Funktionen von *Antp-K* Genen auf abdominale Regionen zustande kommen. Der für die segmentale Identität des maxillaren NB6-4 entschlüsselte Wirkungsweg ist vermutlich ohne Funktion für die Identität des abdominalen NB6-4.

3.17.6. Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels 3.16 und 3.17.

In *Dfd*, *mid*, *Ama*, *Nrt*, *Dab* und *Abl* Mutanten tritt ein ektopisch gebildeter NB6-4 im Mandibularsegment auf. Im WT hingegen ist niemals ein NB6-4 zu beobachten.

Im Abdomen treten ektopische NB6-4 Neurone auf. Dieser Phänotyp entsteht sowohl im WT (10%), als auch in unterschiedlichen Mutanten der *Antp-K* Gene (13%). In *mid* Mutanten ist die Entstehung von NB6-4 Neuronen im Abdomen mit 70% im Vergleich zum WT stark erhöht.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit bildet die erste grundlegende Untersuchung zur Entstehung segmentaler Identität in den gnathalen Segmenten auf Einzelzellebene im VNS von *Drosophila*.

Dabei wurden detaillierte und für weitere Untersuchungen grundlegend wichtige Ergebnisse über die Expression des, häufig als Marker verwendeten, Transkriptionsfaktors Eagle (Eg) gefunden. Die Expression von Eg ist wesentlich komplexer und zeitlich vielschichtiger als in weiter posterioren Segmenten. Trotzdem erlaubt das sehr distinkte Expressionsmuster von Eg, auch in den gnathalen Segmenten einzelne Zellstammbäume zu verfolgen. Mithilfe von Eg konnten seriell homologe Neuroblastenlinien identifiziert werden und deren gnathale segmentale Identitäten entschlüsselt werden.

Segmentale Identitäten der gnathalen Eg positiven Neuroblastenlinien werden über die Funktionen der Gene des *Antennapedia*-Komplexes (*Antp*-K) gesteuert. Die Art der Auswirkungen von *Antp*-K Gen Funktionsverlust ist bei allen drei genauer untersuchten Neuroblastenlinien des NB3-3, NB6-4 und NB7-3 unterschiedlich. Während die segmentalen Identitäten von NB3-3 und NB7-3 direkt durch das jeweils innerhalb der Zelllinie exprimierte Hoxgen bestimmt ist, bildet NB6-4 eine Besonderheit. Seine segmentale Identität im Maxillarsegment wird durch eine Kombination von direkter zellautonomer Funktion von Deformed (Dfd) und gering von Sex combs reduced (Scr), sowie auf einem zweiten Weg durch nicht-zellautonome Funktion von diesen und weiteren *Antp*-K Genen gesteuert. Der hier zu Grunde liegende Mechanismus beinhaltet eine transkriptionelle Regulation des sezernierten Faktors Amalgam (Ama) durch Labial (Lab), Dfd, Scr und Antennapedia (Antp), sowie durch Midline (Mid), das zur Gruppe der Segmentpolaritätsgene gehört. Durch die Funktion von Ama wird vermutlich ein Signal über den Transmembranrezeptor Neurotactin (Nrt), und von dort voraussichtlich weiter auf das Adapterprotein Disabled (Dab) vermittelt. Dab interagiert mit der Ablason Tyrosin Kinase (Abl), die dann der Hypothese nach über die Regulation des Hippo Signalwegs und des darin verschalteten Faktors Yorkie (Yki) auf die Transkription von *CyclinE* (*CycE*) wirkt. Als die von Yki initiierte Transkription von *CycE* vermittelnde Faktoren im NB6-4 kommen Teashirt und Homothorax in Betracht (Abb. 4-1). *CycE* ist der entscheidende Faktor für die Vermittlung neuronaler Identität im NB6-4 aller Segmente, auch der gnathalen.

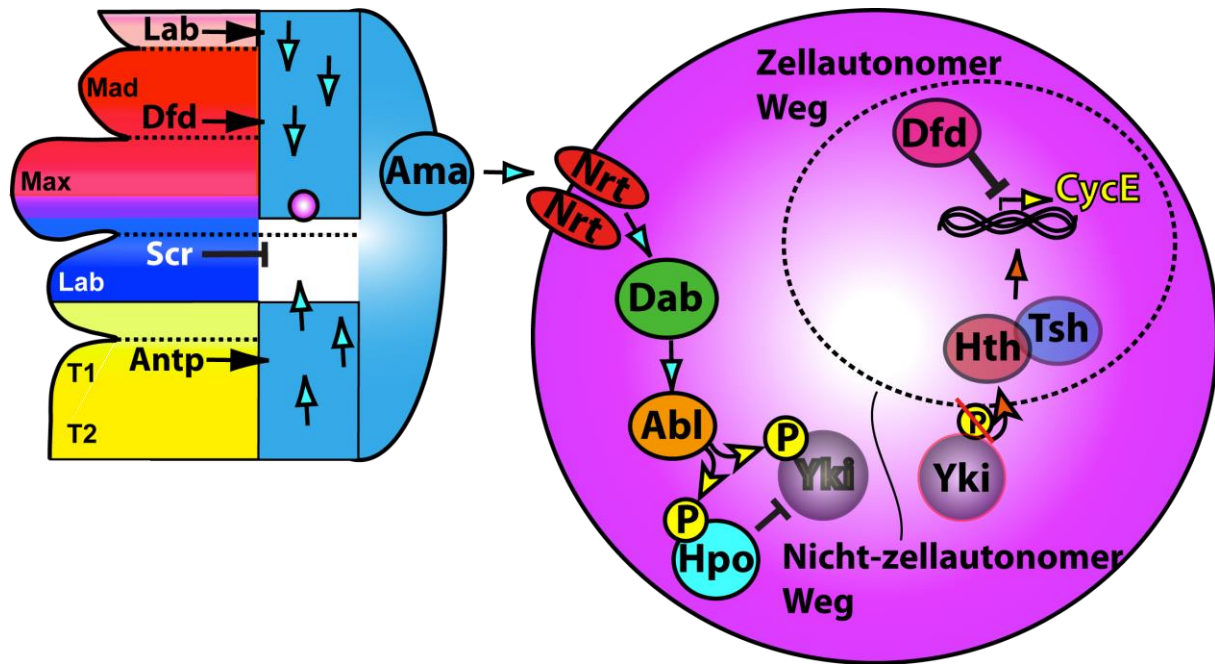


Abb. 4-1: Schematische Übersicht der Mechanismen zur Identitätsfestlegung des NB6-4max.

Die linke Seite der Darstellung umfasst eine schematische Aufsicht auf die linken Hemisegmente eines frühen Embryos in St11e vom Tritocerebrum bis zu Segment T2. Die rechte Hälfte der Darstellung stellt den maxillaren NB6-4 vergrößert dar. Die Gene des *Antp*-K (Expressionsdomäne dargestellt im jeweiligen Farbcode) werden im Neuroektoderm exprimiert und regulieren die Expression von *Ama* (cyan). *Ama* Protein wird sezerniert und reguliert über einen nicht-zellautonomen Weg eine Regulationskaskade im maxillaren NB6-4. Durch die Anwesenheit von *Ama* dimerisiert der Transmembranrezeptor *Nrt* (rot) und regt das Adaptermolekül *Dab* (grün) an. *Dab* wiederum reguliert die Kinase *Abl* (orange). *Abl* phosphoryliert eventuell die Kinase *Hpo* (grau), was anschließend auf *Yki* (braun) wirkt, oder *Abl* wirkt eventuell auch direkt phosphorylierend auf *Yki*. Im phosphorylierten Zustand verbleibt *Yki* außerhalb des Zellkerns und regt somit nicht die Expression von *CycE* an. Fehlen die Komponenten des nicht-zellautonomen Weges (oberer Teil der Zelle), so wird *Yki* nicht phosphoryliert und kann in den Zellkern gelangen. Dort regt es eventuell über *Tsh* und *Hth* die Expression von *CycE* an. Die Identität des NB6-4max verschiebt sich hin zu neuronaler Identität. Gleichzeitig wird die Identität über den direkten zellautonomen Weg durch *Dfd* gesteuert, das als Transkriptionsfaktor im Zellkern reprimierend auf die Transkription von *CycE* wirkt.

Ein weiterer sehr interessanter Phänotyp ist eine sehr starke Proliferation von Zelllinien, sowie eine veränderte Morphologie und Vergrößerung von Zellkernen bei Funktionsverlust eines dieser, im nicht-zellautonomen Regulationsweg verketteten Faktoren. Der schon lange geknüpfte Zusammenhang von Hoxgenfunktionen im Hinblick auf Krebsentstehung und Tumorwachstum wird durch diese Verbindung von *Antp*-K Gen Funktionen mit dem Hippo Signalweg in eine bisher nicht bekannte Richtung eröffnet. In Säugetieren allgemein und auch im Menschen finden sich für alle in der vorliegenden Arbeit identifizierten Faktoren paraloge Gene, was die Forschung auf diesem Gebiet auch in ein medizinisch relevantes Licht rücken könnte. Dies macht die Erforschung dieser Zusammenhänge und ihrer Wirkungsweisen neben dem Interesse an Entwicklungsvorgängen zusätzlich interessant.

4.1. Abweichungen und Gemeinsamkeiten des gnathalen Eagle Expressionsmusters

4.1.1. Serielle Homologe existieren in den gnathalen Segmenten

Serielle Homologie von Neuroblastenlinien zwischen verschiedenen Segmenten begründet sich aus der frühen uniformen Anlage der segmentalen Einheiten über den gesamten entstehenden Embryo hinweg. Obwohl sich die späteren Funktionen der einzelnen Tagmata und der darin enthaltenen Segmente stark unterscheiden, so gehen doch alle Zellen des Nervensystems aus exakt denselben Stammzellen, den Neuroblasten, hervor. Die Identitäten der einzelnen Neuroblasten innerhalb eines Segments lassen sich durch spezifische Kombinationen exprimierter Faktoren erkennen, die unverwechselbar mit der spezifischen Expressionskombination weiterer Neuroblasten desselben Segments sind. In den verschiedenen Segmenten treten jeweils dieselben Identitäten der Stammzellen, die seriellen Homologen, auf (Doe, 1992). Die Erkenntnis, dass sich das VNS der gnathalen Segmente ebenfalls aus seriellen Homologen der Neuroblasten der thorakalen und abdominalen Segmente zusammensetzt (diese Arbeit und Urbach et al., 2016), bildet eine sehr gute Grundlage für vergleichende Analysen zwischen den verschiedenen Tagmata. Auch bieten sich hierdurch weitere Möglichkeiten für Antworten der Fragen nach Besonderheiten der gnathalen Segmente und deren Unterschieden zu den Segmenten des Gehirns (Urbach und Technau, 2003a; Urbach und Technau, 2003b; Urbach und Technau, 2004).

Es fällt trotz serieller Homologie auf, dass in den gnathalen Segmenten im Vergleich zu Thorax und Abdomen einige Besonderheiten bestehen. Einerseits werden Neuroblasten wie beispielsweise NB2-4 aller drei gnathaler Segmente, oder aber auch NB6-4 und vermutlich NB3-3 im Mandibularsegment nicht gebildet. Auch die Ausdifferenzierung der Zelllinien weicht teilweise von posterioren Segmenten ab und bildet segmental spezifische Zellstammbäume. Teilweise werden auch unterschiedliche Kombinationen von Faktoren, die für die Identität von Zelllinien relevant sind, abweichend exprimiert. Insbesondere dem Transkriptionsfaktor Eg galt ein besonderes Augenmerk.

4.1.2. Abweichendes Expressionsmuster von Eagle in den gnathalen Segmenten eröffnet Möglichkeiten abweichender Funktionen

Es existiert bisher sehr wenig Wissen über die genauen Funktionen von Eg. Bekannt ist eine Rolle in der korrekten Ausführung des männlichen Paarungsverhaltens (Moehring und Mackay, 2004) und Eg übernimmt eine wichtige Funktion bei der Identitätsbildung der Nachkommenzellen des NB7-3 als serotonerge Neurone (Higashijima et al., 1996; Dittrich et al., 1997; Lundell und Hirsh, 1998; Lundell et al., 2003; Couch et al., 2004). Die Bildung Eg positiver Neuroblasten ist durch Eg Funktionsverlust nicht betroffen (Higashijima et al., 1996).

Die späte Expression von Eg in den gnathalen Sublinien von NB4-3, NB4-4 und dem MNB im Mandibularsegment, sowie von NB6-2, NB5-6, NB4-3 und dem MNB im Maxillarsegment, als auch von NB5-3 in allen drei gnathalen Segmenten, die zeitlich versetzt und nicht bereits bei Delamination des Neuroblasten stattfindet, bildet ein weiteres Spektrum an Möglichkeiten der Funktionen von Eg.

Welche Identitätsänderung erfolgt in diesen Nachkommenzellen durch zusätzliche späte Eg Expression im Vergleich zu den Zellstammbäumen und deren Funktionen in posterioren Segmenten? Durch die späte Expression ergeben sich auch für die Erforschung möglicher Funktionen von Eg für die Zellidentität weitere Möglichkeiten. Eventuell erfüllen diese Eg positiven Zellen andere Funktionen als ihre Eg negativen Schwesterzellen in posterioren Segmenten. Es ist weiterhin möglich, dass durch das Fehlen von Neuroblastenlinien gnathal, beispielsweise des NB2-4, Nachkommenzellen anderer Neuroblastenlinien weitreichendere Funktionen übernehmen müssen, und diese Kompetenz durch Eg Expression in Zellen festgelegt wird.

4.1.3. Zeitlich abweichendes Expressionsverhalten von Eagle ist nicht nur ein Phänomen der gnathalen Segmente

Die relativ späte Expression von Eg in einzelnen Tochterzellen oder kleinen Teilen des gesamten Zellstammbaums ist ein bisher nicht bekanntes Expressionsverhalten dieses Faktors. Bisher war Eg in Thorax und Abdomen nur als Faktor bekannt, der sowohl im Neuroblasten selbst, als auch in allen Nachkommen exprimiert wird und dadurch die gesamte Identität einer Zelllinie vermutlich maßgeblich mitbestimmt (Higashijima et al., 1996). In den gnathalen Segmenten treten nun jedoch einige Stammbäume zu Tage, die nur in einem Teil ihrer Nachkommen Eg exprimieren. Dass dies jedoch nicht ausschließlich ein Phänomen der gnathalen Segmente ist, zeigt die bisher nicht bekannte Eg Expression im Anteil des NB3-2 im Thorax, sowie die transiente Expression im Gehirn. Die Eg Expression von NB3-2 Nachkommen ist abhängig von Antp Expression, in *Antp* Mutanten wird Eg nicht im NB3-2 exprimiert. Hier zeigt sich eine Parallele zu der Funktion von Dfd für Eg Expression in den spät Eg positiven Neuroblasten des Mandibular- und Maxillarsegments (und auch von *Scr*, allerdings beschränkt auf fehlende Eg Expression im maxillaren MNB bei *Scr* Funktionsverlust).

Von einigen der spät Eg positiven gnathalen Zellstammbäumen lassen sich über *egCD4-GFP* stark nach anterior verlaufende Projektionen beobachten (siehe Abb. 3-15). Die Erforschung der Projektionsmuster und Projektionsziele dieser Zellen, sowie Ablationsexperimente könnten hier Aufschlüsse über die Hintergründe der im Vergleich zu weiter posterioren Segmenten veränderten Eg Expression bringen. Vermutlich bestehen in den gnathalen Segmenten durch die spätere Bildung der gnathalen Anlagen wie Mundwerkzeugen und den notwendigen Funktionen wie beispielsweise Nahrungsaufnahme gesonderte Anforderungen an ein neuronales Netzwerk.

Um weitere Aussagen treffen zu können, wäre es hilfreich, die genauen Effekte von Eg Expression für die Identitätsfindung dieser Zelllinienanteile zu kennen. Dafür wären beispielsweise die Verfolgung der Projektionsmuster und evtl. auch eine Analyse von späteren Funktionen dieser Zellen, auch im larvalen oder gar adultem Stadium, notwendig. Da sich beim Übergang von embryonalem zum larvalen ZNS starke Umwandlungen ereignen, und sich so über Markerexpressionen embryonale Zellstammbäume nicht ohne Weiteres ins Larvenstadium verfolgen lassen, wären hier spezielle Techniken notwendig.

Erst kürzlich konnten die embryonalen Zellstammbäume des Thorax und Abdomen mit larvalen Zelllinien verknüpft werden (Birkholz et al., 2015), was eine gute Grundlage für die Ausweitung dieser Arbeiten auch in die gnathalen Segmente schafft. Die Verfolgung der embryonalen Zelllinien bis in späte embryonale Stadien mithilfe der DiI-Technik ist ebenfalls ein bereits in Angriff genommenes Projekt (persönliche Mitteilung von Karin Luer-Kirsch), was eventuell Aussagen zu abweichender Morphologie von Zelllinien zwischen gnathalen und posterioren Segmenten ermöglichen könnte.

4.1.4. Mögliche Funktion von Eagle für späte proliferative Aktivität von Neuroblasten

Auffällig ist auch die späte Proliferation dieser spät Eg positiven Neuroblasten, die durch die Expression von Dpn eindeutig in ihrer Identität als Neuroblast bestimmbar werden. Dass diese Eg positiven Neuroblasten bereits ab St11 existieren und nicht erst zu diesem späten Zeitpunkt in St14 delaminieren, werden durch die Kartierungen von David Jussen und Rolf Urbach eindeutig (Urbach et al., 2016). Weitere Markerfärbungen verdeutlichen auch, dass bereits mehrere Eg negative Zellen von den Neuroblasten gebildet wurden, bevor sie beginnen Eg zu exprimieren (siehe beispielsweise Ind Expression im NB6-2max Abb. 3-17). Der Vergleich der Dpn Expression von St11, in dem Neuroblasten hauptsächlich delaminieren und ihre Gangliennutterzellen bilden, mit dem Expressionsmuster von Dpn in St14 zeigt sehr deutliche generelle Reduktion der Dpn Expression und der Identität von Zellen als Neuroblasten auf sehr wenige Einzelfälle (vergleiche Abb. 3-1 mit Abb. 3-14). Eine rein spekulative Annahme, die sich durch den Zusammenhang von Eg Expression in anteilmäßig sehr vielen dieser spät Dpn positiven Neuroblasten ergibt, könnte eine Funktion von Eg für späte proliferative Aktivität und das Überleben einzelner Neuroblasten sein.

4.2. Verwechslung von Zellidentitäten durch mangelnde Kenntniss von Expressionsmustern führt zu verfälschten Ergebnissen

Die exakte Bestimmung von Proteinexpressionsmustern verwendeter Markergene ist für die Erforschung der einzelnen Funktionen der Faktoren interessant, weiterhin ist sie im Hinblick auf die Verwendung als Marker für einzelne Zellen oder Zellstambäume notwendig. Besonders im Maxillarsegment wurde dies deutlich, als in späteren Stadien im WT Eg Expression lateral in Reihe sechs, und somit in möglicher Position von NB6-4 Neuronen, auftrat. Die vorherige Klassifizierung des maxillaren NB6-4 als rein gliale Zelllinie stand dieser Entdeckung gegenüber. Erst mehrfache Kombinationen unterschiedlicher Marker, sowie Nachverfolgung der räumlichen Herkunft des Zellstambaums zeigten, dass es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um NB6-2 Nachkommen handelt.

4.2.1. NB6-2 Nachkommenzellen müssen eindeutig von ektopischen NB6-4 Neuronen unterschieden werden

Bei der ersten Auswertung auf mögliche NB6-4 Phänotypen der Kandidaten des durchgeführten Mini-Screens führten diese zusätzlichen Eg positiven Zellen des maxillaren NB6-2 durch mangelnde Kenntnis des detaillierten spätembryonalen Eg Expressionsmusters zunächst zu einem verfälschten Ergebnis. Da bereits zu diesem Zeitpunkt bekannt war, dass sich das Eg Expressionsmuster der gnathalen Segmente ab St13 stark verändert und die Auswertung von NB6-4 auch Mithilfe von zusätzlicher Gsb oder En Expression extrem kompliziert wird, wurde darauf geachtet, keine älteren Embryonen als bis St13 für die Analyse zu verwenden.

Für den Kandidaten Cdc42 wurde zunächst eine Transformationsrate von über 20% für den maxillaren NB6-4 festgestellt. Cdc42 wurde nicht als Funktionsverlustmutante verwendet, sondern als sich selbst hemmende, konstitutiv aktive Komponente über das UAS-Gal4 System ektopisch exprimiert. Es wurden zwar Embryonen bis St13 nach den angelegten Kriterien (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) ausgewählt, aber zunehmender Kenntnisstand über das Eg Expressionsmuster der gnathalen Segmente ließen nach und nach Zweifel an der gefundenen Transformationsrate und dem korrekten Entwicklungsstadium aufkommen. In den Embryonen fielen dieselben Eg positiven Zellen im Mandibular- und Maxillarsegment auf, die im WT ab St14 auftreten. Eine daraufhin auf diesen Sachverhalt ausgelegte Analyse der als ektopische NB6-4 Neurone eingestufteten Zellen zeigte deutlich, dass diese mit hoher Wahrscheinlichkeit Zellen des NB6-2 sind. Dies ist anhand der Lage der Zellen nachvollziehbar. Zudem treten diese Eg positiven Zellen nur gemeinsam mit den weiteren spät Eg positiven Neuroblastensublinien auf und sie exprimieren Eg schwächer als ektopisch gebildete Neurone des NB6-4max. Möglicherweise könnten durch die ektopische Expression und der gewählten Temperatur für die Entwicklung der Eiablagen bei 29°C (für die bessere Wirkung des Gal4-Systems)

Unterschiede in der Entwicklung dieser Embryonen vorliegen. Für Cdc42 konnte im Weiteren keine Transformation des NB6-4max festgestellt werden.

Diese Beobachtungen werfen ein grundlegendes Problem auf. Als Kriterium wurde daher im Weiteren sehr genau auf die Eg Expression aller Neuroblastenlinien geachtet und nur Embryonen analysiert, die eindeutig noch keine Eg Expression in den zusätzlichen spät Eg positiven Zelllinien erkennen lassen. Meist wurden daher Embryonen bis Mitte St12 benutzt, die auch meist noch Eg Expression in den NB6-4 Glia erkennen lassen. Wenn weiterhin Zweifel an den Ergebnissen bestanden, wurde eine genaue Analyse mit aufwendiger Markerkombination gemeinsam mit Ind (NB6-2, Abb. 3-17) oder Msh (NB6-4, Abb. 3-5) im Einzelfall notwendig.

4.2.2. Gefahr der Verwechslung von NB6-2 Zellen mit ektopischen NB6-4 Neuronen tritt in *Deformed* Mutanten nicht auf

In *Dfd* Mutanten tritt keine oder nur sehr schwache Eg Expression in den zusätzlich spät Eg positiven Zellstammbäumen der gnathalen Segmente auf. Eine Ausnahme ist NB5-3, der aber durch seine Lage und seine schwache Eg Expression, sowie über fehlende Expression von En nicht Gefahr läuft, mit NB6-4 verwechselt zu werden. In NB6-2 Zellen ist in *Dfd* Mutanten in seltenen Fällen sehr schwache Expression von Eg in einer einzelnen Zelle zu beobachten. Ektopische NB6-4 Neurone exprimieren Eg jedoch stark. Während der gesamten Analyse aller Mutanten auf ektopische Neurone des NB6-4max wurde starke Eg Expression als Kriterium für die Einstufung als NB6-4 Neuron angelegt. Zudem ist die Lage von NB6-2 Zellen und ektopischen NB6-4 Neuronen unterscheidbar. Somit ist die Möglichkeit einer Verwechslung von NB6-2 und NB6-4 Neuronen im Maxillarsegment in *Dfd* Einzel- und Doppelmутanten aus diesen Gründen weitestgehend ausgeschlossen.

In allen weiteren der analysierten Mutanten ist die späte Expression von Eg nicht verändert. Daher wurde hier auf die oben genannten Kriterien nach Entwicklungsalter des Embryos, bereits vorhandener Expression von Eg in den spät Eg positiv werdenden Neuroblastenlinien und starker Expression von Eg in den als ektopische NB6-4 Neurone eingestuften Zellen geachtet. So konnten in späteren Stadien zusätzlich zu Eg positiven NB6-2 Nachkommenzellen ektopische Neurone des NB6-4 beobachtet werden. Das verdeutlicht, dass es sich bei der erst spät auftretenden Eg Expression in Reihe sechs des Maxillarsegments im WT nicht um NB6-4 Neurone, sondern um Zellen des NB6-2 handelt, sowie in Mutanten um NB6-2 Zellen und zusätzliche NB6-4 Neurone (vergleiche Abb. 3-26 B, hier ist zusätzlich zu einem ektopischen NB6-4 Neuron eine einzelne Eg positive Zelle des NB6-2 sichtbar).

Nur aufgrund der nun genauen Kenntnis des Expressionsmusters von Eg über die gesamte Embryonalentwicklung hinweg kann einer Verwechslung von Eg positiven Zellen im Maxillarsegment hier und in eventuell noch folgenden Studien in den gnathalen Segmenten vorgebeugt werden.

4.3. Regulation gnathaler segmentaler Identität durch unerwartete Formen von Hoxgenregulation

4.3.1. Modelle der „Posterioren Prävalenz“ und „Posterioren Dominanz“ versus dem Modell der „Autonomen Dominanz“

Anhand der Expression von *Eg* lassen sich segmentale Identitäten von Neuroblastenlinien erkennen, diese segmentalen Identitäten werden über die Wirkungen der Hoxgene reguliert. Da in der Vergangenheit allgemeingültige Regeln über die Wirkungen von Hoxgenfunktion auf segmentale Identität aufgestellt wurden, sollen die gefundenen Ergebnisse auf diese allgemeingültigen Regeln geprüft und anschließend diskutiert werden.

Zu Beginn der Entdeckung von Hoxgenfunktionen und ihren Wirkungen als identitätsgebende Faktoren wurden einige, sich für alle untersuchten Hoxgene wiederholenden Regeln gefunden, welche das Verständnis über ihre Wirkungsweisen zunächst entscheidend voran brachten. Hauptsächlich betrachteten diese Untersuchungen offensichtliche Transformationen der äußeren Körperanhänge. Eine entscheidende Entdeckung war die Identität des Segments T2 als Grundzustand der Segmentidentität. Diese sogenannte Lewis Hypothese bezeichnet den Sachverhalt, dass beim Funktionsverlust aller Hoxgene abdominale und thorakale Segmente die segmentale Identität von T2 annehmen. Für die Identität von T2 ist keine Hoxgenfunktion notwendig (Lewis, 1978; Lewis, 1982). Eine weitere Regel, die hauptsächlich für die Gene des *Bithorax*-Komplex aufgestellt wurde, ist die Theorie der *Posterioren Prävalenz* oder der *Posterioren Dominanz* (Duboule und Morata, 1994). Sie besagt, dass weiter posterior exprimierte Gene das jeweils anterior exprimierte Hoxgen reprimieren und so Expressionsdomänen festlegen (Hafen et al., 1984; Harding et al., 1985; Struhl und White, 1985; Carroll et al., 1986a; Wedeen et al., 1986; Duboule und Morata, 1994). Fällt die reprimierende Funktion des jeweils posterioren Gens weg, so breitet sich das anterior exprimierte gemäß der Regel der *Posterioren Dominanz* in die posteriore Region aus und ruft so eine segmentale Transformation in weiter anteriore Identität hervor (Lewis, 1978). Eine weitere Regelmäßigkeit ist die *Phänotypische Suppression*, die besagt, dass bei miteinander coexprimierten Hoxgenen das weiter posteriore das anteriore in seiner Funktion durch Konkurrenz um Bindestellen unterdrückt (Harding et al., 1985; Gibson und Gehring, 1988; Kuziora und McGinnis, 1988b; Gonzalez-Reyes und Morata, 1990; Lamka et al., 1992; Bachiller et al., 1994; Castelli-Gair et al., 1994; Ekker et al., 1994).

Da diese aufgestellten Regeln nur direkte und voneinander abhängige Einflüsse von Hoxgenfunktion berücksichtigen, postulierte Miller als Gegenvorschlag das Modell der *Autonomen Dominanz* (Miller et al., 2001) in dem einzelne Hoxgene autonom voneinander individuelle Identitäten regulieren und über Segmentgrenzen hinweg wirken können. Vorrausgegangen waren Ergebnisse, die eine Funktion von Hoxgenen über einen Signalweg über Segment- und Gewebegrenzen hinweg im Endoderm zeigten (Bienz, 1996; Bienz, 1997), und die allen bisher aufgestellten Modellen widersprachen.

4.3.2. Die Expressionsdomänen der funktionsfähigen *Antennapedia*-Komplex Gene bei Funktionsverlust anderer Hoxgene entsprechen nicht den Regeln der *Posterioren Dominanz*

Auch für die Expressionen und Wirkungsweisen der Gene des *Antp*-K im VNS sind diese Regeln nicht so eindeutig zu übernehmen. Bereits in der Vergangenheit sammelten sich nach und nach Ausnahmen zu diesen Regeln (z.B.: (Wang et al., 1993; Heuer et al., 1995; Capovilla und Botas, 1998; Foronda et al., 2006). Beispielsweise findet bei Funktionsverlust von *lab* oder von *Dfd* keine homeotische Transformation äußerer Segmentidentität statt, sondern in beiden Fällen gibt es Defekte bei der Entwicklung des Kopfes (Merrill et al., 1987; Regulski et al., 1987; Diederich et al., 1991).

Die Gene des *Antp*-K regulieren sich im VNS nur sehr gering gegenseitig in ihrer Expression, meist bleiben die Expressionsgrenzen der angrenzend exprimierten Gene bei Funktionsverlust eines *Antp*-K Gens erhalten. Dies wurde auch beispielsweise für *Antp* (Wirz et al., 1986) oder für *Dfd* und *Scr* in *lab* Mutanten (Hirth et al., 1998) berichtet. Einzige Ausnahmen sind die in diesem Zusammenhang in dieser Arbeit und ebenfalls von Frank Hirth 1998 beobachtete Expression von *Lab* in *Dfd* Mutanten, die sich geringfügig in den anterioren Bereich des Mandibularsegments ausbreitet, sowie die in der vorliegenden Arbeit gefundene verhinderte Expression von *Scr* Protein im NB6-4max in *Dfd* Mutanten (siehe Abb. 3-38). Die Expansion von *Lab* in die *Dfd* Expressionsdomäne hinein entspricht den Regeln der *Posterioren Prävalenz*, allerdings findet hier nur eine räumlich sehr geringe Ausbreitung statt. Die in *Dfd* Mutanten auftretenden Veränderungen der *Eg* positiven Zellstammbäume, beispielsweise der Entstehung von NB6-4 im Mandibularsegment in 10% der *Dfd* Mutanten oder die abweichenden Zellzahlen des mandibularen NB7-3 werden somit nicht durch ektopische *Lab* Expression hervorgerufen. Eine durch die Ausweitung der *Lab* Expression stattfindende segmentale Transformation des Mandibularsegments in das dritte Gehirnsegment durch ektopische Expression von *Lab* gemäß der Regel der *Posterioren Dominanz* findet nicht statt. Eine solche Transformation würde weitreichende Veränderungen in den Identitäten der Neuroblastenlinien erwarten lassen, die über *Eg* Expression sichtbar sein müssten.

4.3.3. Die Coexpression von *Deformed* und *Sex combs reduced* führt nicht zu *Phänotypischer Suppression*

Die Überlappung von *Dfd* und *Scr* Expression im VNS in den Neuroblasten der Reihe sechs des Maxillarsegments war bisher nicht bekannt. Vielmehr wurden explizit voneinander getrennte Expressionsdomänen beider Faktoren im VNS beobachtet (Martinez-Arias et al., 1987; Mahaffey et al., 1989). Weiterhin wurden kontextabhängige Regulationen von *Dfd* durch *Scr* beschrieben. Beispielsweise fanden (Jack et al., 1988, (Kaufman et al., 1990), dass die Expressionsdomäne von *Dfd* unabhängig von *Scr* Funktion ausgebildet wird. Andererseits wurden Transformationen beispielsweise des Prothorax in maxillare Identitäten bei *Scr* Funktionsverlust beschrieben, was eine Transformation zu weiter anterior gelegener Identität gemäß den Regeln der *Posterioren Dominanz* entspricht (siehe

beispielsweise (Struhl, 1982; Mahaffey und Kaufman, 1987; Martinez-Arias et al., 1987; Pattatucci et al., 1991; Rogers et al., 1997; Barmina und Kopp, 2007).

Im NB6-4max ist in *Dfd* Mutanten kein *Scr* Protein über Antikörperfärbung nachweisbar (Abb. 3-38 E). Hier zeichnet sich somit eine positive Regulation von *Scr* durch *Dfd* im VNS ab, und nicht eine reprimierende Funktion von *Scr* auf *Dfd* nach der Regel der *Phänotypischen Repression*. Die Expression von *Dfd* ist hingegen vollkommen unabhängig von *Scr* Funktion (siehe Abb. 3-30 C). Weiterhin führt ektopische Expression von *Dfd* zu einer Veränderung der NB6-4 Identitäten in maxillares Schicksal in thorakalen und abdominalen Segmenten. Auch wenn ektopische Expression eines Faktors eine sehr künstliche Situation darstellt, so lässt sich hier keine Unterdrückung von *Dfd* Funktion durch weiter posterior exprimierte Gene feststellen.

4.3.4. Für die Eagle positiven gnathalen Neuroblastenlinien sind allgemeingültige Regeln nur schwer anwendbar

Die Transformationsereignisse der Eg positiven seriell homologen Neuroblastenlinien der gnathalen Segmente bei *Antp*-K Gen Funktionsverlust lassen sich schwer einheitlich einordnen. Vielmehr finden in NB3-3, NB6-4 und NB7-3 jeweils unterschiedliche Auswirkungen statt. Dies macht die Anwendung allgemeingültiger Regeln unmöglich und hebt die starke autonome und zellspezifische Wirkungsweise von Hoxgenen hervor. Die unterschiedlichen Veränderungen dieser drei Neuroblastenlinien sollen daher im Folgenden genauer diskutiert werden.

4.3.4.1. Transformation von NB6-4 in den Zustand seiner Grundidentität

Die Identität des thorakalen NB6-4 wurde als Zustand seiner Grundidentität definiert, die keine Hoxgenfunktion benötigt (Berger et al., 2005). Für den labialen NB6-4 zeichnet sich dieselbe Identität ab. Um abweichende Identitäten der thorakalen und labialen Identität dieser Neuroblastenlinie zu generieren, ist zusätzliche Hoxgenfunktion notwendig. Dies wird nach posterior hin durch die Funktionen von *abdB* und *AbdB* (Berger et al., 2005), sowie nach anterior hin durch die Gene des *Antp*-K, insbesondere von *Dfd* realisiert. Fällt die Funktion von *Dfd* weg, so findet sich keine Hoxgenexpression mehr im maxillaren NB6-4, da auch die Proteinexpression von *Scr* im maxillaren NB6-4 von *Dfd* Funktion abhängig ist. NB6-4max wird dann in 43% in seine weiter posterior ausgeprägte Grundidentität transformiert.

Die abdominalen NB6-4 werden bei Funktionsverlust der dort wirkenden Hoxgene *abdB* und *AbdB* ebenfalls in den Grundzustand transformiert, allerdings in 100% (Berger et al., 2005). In den abdominalen NB6-4 findet sich zwar eine Transformationsrichtung in weiter anteriore Identität gemäß der Regel der *Posterioren Dominanz*, diese Identitätsänderung ist jedoch nicht auf den Einfluss des nun ektopisch exprimierten Hoxgen *Ultrabithorax (Ubx)* zurück zu führen (Berger et al., 2005). Der zugrundeliegende Regulationsmechanismus für die Identität der Nachkommenzellen von NB6-4 ist eine reprimierende Wirkung von Hoxgenen auf den neuronale Identität vermittelnden Faktor CycE. Christian

Berger konnte *CycE* als entscheidenden Faktor identifizieren, der durch die Beeinflussung der Teilungssymmetrie und damit verbundener Verteilung von *gcm* mRNA und Prospero Protein die Identität der Nachkommenzellen festlegt. Auch im NB6-4max lässt sich durch ektopische Expression von *CycE* neuronale Identität der Nachkommenzellen induzieren und es findet ein Verlust von neuronaler Identität im labialen NB6-4 bei Funktionsverlust von *CycE* statt.

Welcher Art diese reprimierende Funktion von *Dfd* oder *AbdA* auf *CycE* ist, konnte mit den gewählten Untersuchungsmethoden nicht herausgefunden werden. Eine Protein-Protein Interaktion zwischen *Dfd* und *CycE* oder *AbdA* und *CycE* über eine Immunoprecipitation konnte weder deutlich festgestellt, noch eindeutig ausgeschlossen werden (vergleiche Kapitel 3.3.3.).

Für die weiteren Eg positiven Neuroblastenlinien zeichnete sich kein Mechanismus der Regulation der segmentalen Identität durch *CycE* ab.

4.3.4.2. Segmentspezifische gnathale Zelllinien des NB7-3 könnten über *Antennapedia*-Komplex Genfunktion auf programmierten Zelltod reguliert werden

Für den NB7-3 der gnathalen Segmente lassen sich bei *Dfd* oder *Scr* Funktionsverlust ebenfalls Transformationen in thorakale bzw. labiale Identität beobachten, zumindest die Zellzahlen betreffend. Zellidentitäten mithilfe weiterer Markerkombinationen wurden nicht bestimmt. Ausnahme bildet die in 60% stattfindende Überproliferation (über sechs Zellen hinausgehend) dieser Neuroblastenlinie bei Funktionsverlust von *Dfd* oder *Scr* (siehe Kapitel 3.2.1.5.). Da dieser Effekt auch in posterioren NB7-3 Linien beim Funktionsverlust von dort exprimierten Hoxgenen auftritt und dies derzeit eingehend von Sudha Myneni untersucht wurde, wurde auf die Hintergründe dieser vermehrten Zellanzahl nicht weiter eingegangen.

Die beobachtete Reduktion der Zellstammbäume des NB7-3 im WT von anfangs sechs Zellen auf zwei Zellen im Mandibularsegment bzw. drei Zellen im Maxillarsegment deutet auf dort stattfindenden programmierten Zelltod hin. Die Herstellung von segmentaler Identität des NB7-3 in Thorax und Abdomen ist abhängig von der späten Funktion der Hoxgene auf Apoptose einzelner Zellen (Novotny et al., 2002; Karcavich und Doe, 2005; Rogulja-Ortmann et al., 2007; Rogulja-Ortmann et al., 2008). In 60% der *Dfd* Mutanten überleben alle der gebildeten sechs Zellen des mandibularen NB7-3 und in 35% der *Scr* Mutanten die des maxillaren NB7-3, eine Reduktion auf die wildtypische Zellanzahl gibt es nie. Das deutet auf eine mögliche Funktion von *Dfd* und von *Scr* auf die Bildung der segmentalen Identität von NB7-3 durch programmierten Zelltod hin.

Eine aktivierende Funktion von *Dfd* auf programmierten Zelltod über die Regulation proapoptotischer Gene wurde in der Vergangenheit für die Ausbildung maxillarer versus mandibularer Identität gefunden (Lohmann et al., 2002). Für *Scr* ist bisher jedoch keine aktivierende Funktion auf Apoptose in *Drosophila* bekannt. Im Gegenteil wurde eine reprimierende Funktion von *Scr* auf das proapoptotische

Gen *reaper* in der Epidermis entdeckt (Zhai et al., 2009). Für den Hornkäfer *Onthophagus* konnte allerdings eine Rolle des Scr-Homologen für die Regulation der Bildung des Horns, über Aktivierung von programmiertem Zelltod, entschlüsselt werden (Wasik et al., 2010). Eine Beteiligung bei der Entscheidung über das Überleben oder Absterben von Neuronen im VNS von *Drosophila* wäre jedoch eine neue Funktion für dieses Hoxgen.

Die Auswirkungen von Dfd und Scr auf programmierten Zelltod und darüber der Schaffung von segmentaler Identität gnathaler NB7-3 Linien ist bisher eine Hypothese, die sich aus den Beobachtungen ergibt. Es wurden keinerlei Untersuchungen mit Apoptose spezifischen Genen durchgeführt. Allerdings kann die Wahrscheinlichkeit von Apoptose, gesteuert durch die exprimierten Hoxgene, über den Vergleich zu NB7-3 in posterioren Segmenten und den dort gefundenen Vorgängen als Annahme getroffen werden. Sollte diese Vermutung durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, schafft sich hier eine Analogie zwischen anterioren und posterioren Segmenten, in denen derselbe Mechanismus durch unterschiedliche Hoxgene gesteuert wird.

Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht diese späte Hoxgenfunktion, sondern die frühen Wirkungen von Hoxgenen, die bereits bei der ersten Teilung des NB6-4 über die segmentale Identität entscheiden, untersucht werden sollten, wurden die Hintergründe für die Veränderungen in NB7-3 Zelllinienidentitäten nicht weiter bearbeitet. Die genaue Wirkung von Dfd und Scr im Hinblick auf mögliche Funktionen bei der Vermittlung von programmiertem Zelltod wäre auch über NB7-3 hinaus interessant. Die Regulation von Apoptose von Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren und Krebs (siehe auch Kapitel 4.7. weiter unten). Weiterhin könnte *proboscipedia* durch seine Expression im mandibularen NB7-3 eine Rolle für die segmentale Identität des NB7-3, und damit auch auf Apoptose spielen. In diesem Zusammenhang könnte auch die Analyse einer *pb, Dfd* Doppelmutante aufschlussreich sein.

4.3.4.3. NB3-3 verliert seine segmentale Identität bei *Deformed* oder *Sex combs reduced* Funktionsverlust

Im WT bildet sowohl der Dfd exprimierende maxillare, als auch der Scr exprimierende labiale NB3-3 neun Zellen aus, sieben Zellen sind Even skipped (Eve) positiv (siehe Kapitel 3.1.1.2.). Interessanterweise sind im Gegensatz zu weiter posterioren NB3-3 Zelllinien die beiden lateral gelegenen Zellen nicht Eve positiv. Für die Ausbildung der wildtypischen Zellstambäume unterscheiden sich die Funktionen von Dfd und Scr demnach nicht, da betreffend der Zellzahlen und Markergenexpression im Labialsegment und im Maxillarsegment dieselben Linien entstehen.

Die thorakalen und abdominalen NB3-3 unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zellzahl und der Anzahl der Eve exprimierenden Neurone (Schmidt et al., 1997). Es werden hier durch unterschiedliche Zeitpunkte der Zellproliferationsruhe durch Hoxgenfunktion und weitere Cofaktoren unterschiedliche segmentale Identitäten generiert (Tsuji et al., 2008). Die thorakalen und abdominalen NB3-3 sind laut

dieser Studien bei Hoxgenfunktionsverlust der jeweils exprimierten Gene nicht in ihrer Bildung eingeschränkt. Die Auswirkungen von Funktionsverlust der *Antp*-K Gene auf die gnathalen NB3-3 unterscheiden sich stark von den Effekten der *Bth*-K Gene auf weiter posteriore NB3-3.

Die gnathalen NB3-3 sind bei Hoxgenfunktionsverlust von *Dfd* oder *Scr* nur noch sehr unregelmäßig über Markerfärbungen sichtbar (siehe Kapitel 3.2.1.2.). In den Fällen, in denen Nachkommen des NB3-3 sichtbar sind, liegt eine stark verringerte Zellzahl und eine recht schwache *Eg* Expression vor. Vermutlich ist hier die Bildung des Neuroblasten betroffen, da weder mit *Eg*, noch mit *Runt*, noch mit *Eve* Zellen des NB3-3 gefunden werden können. Sollte der Neuroblast nicht in seiner Bildung betroffen sein, so exprimiert er jedoch nicht mehr die ihn charakterisierenden Marker. Von daher wäre er in seiner Identität sehr stark verändert. Um hier eindeutige Antworten geben zu können, müsste das Neuroblastenmuster in frühen Stadien in *hox*mutanten Hintergründen mithilfe weiterer Markerkombinationen und Auszählungen der entstehenden Neuroblasten analysiert werden. Eine solche Untersuchung wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Bei Funktionsverlust von *Dfd* oder *Scr* kann daher nur schwer von einer Transformationsrichtung oder der Übernahme einer anderen segmentalen Identität des NB3-3 gesprochen werden. Das einzige Segment im Wildtyp, das mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen NB3-3 aufweist, ist das Mandibularsegment (Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und Urbach et al., 2016). Da sowohl im Mandibularsegment als auch im Maxillarsegment *Dfd* exprimiert wird, werden vermutlich die wildtypischen unterschiedlichen Identitäten dieser beiden Segmente bezüglich NB3-3 durch weitere Faktoren mitbestimmt. Der labiale NB3-3 wird bei Funktionsverlust von *Scr* nur in 33% nicht mehr über Antikörperfärbungen sichtbar, ansonsten bleibt er mit meist vier Zellen erhalten, die *Eg* und *Runt*, aber nicht *Eve* exprimieren. Dies ist ein großer Unterschied zum maxillaren NB3-3 in über 95% bei *Dfd* Funktionsverlust. Es deutet sich daher an, dass im labialen NB3-3 eventuell noch ein weiterer Faktor für die segmentale Spezifizierung verantwortlich sein könnte.

Um der Frage nach den verantwortlichen Faktoren für die Festlegung von labialer NB3-3 Identität nachzugehen, müssten ähnlich umfassende Analysen wie für NB6-4 durchgeführt werden.

4.3.4.4. Weitere Cofaktoren könnten segmentale Identitäten mit beeinflussen

Eine Variation der verbleibenden Zellzahlen, ähnlich wie bei NB3-3, findet sich bei der Veränderung von NB7-3 beim Funktionsverlust von *Dfd* oder *Scr* (siehe Kapitel 3.2.1.5.). Auch hier lässt sich zwar eine eindeutige Funktion der *Antp*-K Gene feststellen, aber ob und welche weiteren Faktoren benötigt werden, um segmentale Identität festzulegen, lässt sich ohne weitere eingehende Untersuchungen nicht beantworten. Erst kürzlich konnte Oliver Birkholz für die Spezifizierung von segmentaler NB7-3 Identität in den Segmenten A9 und A10 einen Einfluss von *caudal* zusätzlich zu *AbdB* finden (Birkholz et al., 2013b). Für die gnathalen Segmente sind ebenfalls Faktoren bekannt, die gemeinsam mit Hoxgenfunktion segmentale Identität spezifizieren. Einer dieser Faktoren ist *cap-n-collar* (*cnc*), was

jedoch bei alleinigem Funktionsverlust oder ektopischer Expression keine Veränderung der Eg positiven Neuroblastenlinien herbeiführte (siehe Kapitel 3.1.1.7.).

Ein weiterer hier bisher nicht untersuchter Cofaktor ist *apterous* (*ap*), das als Kandidat für die Herstellung gnathaler Identität gemeinsam mit *Dfd* gefunden wurde (Gellon et al., 1997). *Ap* könnte daher ein interessanter Faktor für die Unterschiede zwischen Identitäten mandibularer und maxillarer Zelllinien sein. Weitere Regulationsmöglichkeiten von Hoxgenfunktion wurden in den letzten Jahren über micro-RNAs entdeckt (siehe beispielsweise (Enright et al., 2003; Stark et al., 2003; Brennecke et al., 2005; Ruby et al., 2007; Yekta et al., 2008; Gummalla et al., 2012)). Somit bieten sich weitere Möglichkeiten an, den Antworten nach hier offen gebliebener Fragen bezüglich der Spezifizierung von mandibular versus maxillar segmentaler Identität näher zu kommen.

4.3.5. Das Modell der „Autonomen Dominanz“ ist für den maxillaren NB6-4 zutreffend

Zusammenfassend lässt sich eine sehr diverse Wirkung von *Antp*-K Genen auf die unterschiedlichen segmentalen Identitäten der verschiedenen Eg positiven gnathalen Neuroblastenlinien festhalten. Segmentale Identität wird in den gnathalen Segmenten in einigen Fällen nicht alleine über die direkte Funktion der Hoxgene hergestellt. Auch in Thorax und Abdomen konnten sehr verschiedene Mechanismen zur Herstellung der segmentalen Identitäten der Neuroblastenlinien gefunden werden (beispielsweise: Tsuji et al., 2008 für NB3-3; (Badenhorst, 2001; Berger et al., 2005) für NB6-4, Rogulja-Ortmann et al., 2007 und (Rogulja-Ortmann et al., 2008) für NB7-3). Die Besonderheit der Herstellung segmentaler Identität des maxillaren NB6-4 gegenüber der Spezifizierung von NB3-3 und NB7-3 ist jedoch die zusätzliche nicht-zellautonome Wirkung von *Antp*-K Genen. Weder bei der Spezifizierung von NB3-3, noch bei NB7-3 lässt sich ein verstärkender oder abschwächender Einfluss durch nicht-zellautonome Funktion von Hoxgenen gleichzeitig zum direkten zellautonomen Weg feststellen. Diese Aussage wird daher möglich, da in den Hox-Doppelmutanten keine Abweichungen der Veränderungen von NB3-3 und NB7-3 im Vergleich zu den Einzelmutanten sichtbar sind. Es zeichnet sich aber ab, dass hier jeweils unterschiedliche und stark zelllinienspezifisch und segmentspezifisch wirksame Prozesse greifen, die vermutlich für die Herstellung segmentaler Identitäten weitere Faktoren benötigen. Dies zeigt deutlich, dass in den gnathalen Segmenten das Modell der *Posterioren Dominanz* nicht zum Tragen kommt. Insgesamt fällt es sehr schwer, für die Diversität der gefundenen Effekte allgemein gültige Regeln aufzustellen. Für den NB6-4 bestätigt sich hier das Modell der *Autonomen Dominanz*, das die Auswirkungen von Hoxgenfunktionen über Segmentgrenzen hinweg durch Signalwege mit beinhaltet.

4.4. Nicht-zellautonome Wirkungsweise von Hoxgenen- ein bisher selten gefundener Regulationsmechanismus

Funktionen von Hoxgenen auf Signalwege, die über längere Strecken Effekte regulieren, sind bisher erst in Anfängen bekannt. So konnte Mariann Bienz Effekte von mesodermal exprimiertem *Ubx* und *AbdA* auf die Expression von *lab* im Mesoderm über Gewebegrenzen hinweg über den *wingless* (*wg*) und *decapentaplegic* (*dpp*) Signalweg (Bienz, 1996; Miller et al., 2001), sowie Fani Papagiannouli von *AbdB* über den *sevenless* Signalweg bei der Spermientwicklung (Papagiannouli et al., 2014) erste Beispiele finden. Im Nervensystem wurde bisher keine derartige Regulation gefunden. Die vorliegende Arbeit eröffnet daher eine neue Dimension der möglichen Wirkungsweisen von Hoxgenen im VNS.

Die sich durch kombinierte Funktion von getrennt exprimierten Hoxgenen ergebenden Effekte können aber eventuell auch weiterführend Erklärungen liefern. So fielen beispielsweise bereits in der Vergangenheit Effekte von Mutationen von *lab* und *Dfd* auf, die nicht mit den gefundenen Expressionsdomänen übereinstimmten und somit zu Verwunderung führten (Merill et al., 1989, Diederich et al., 1991). Hier fiel auf, dass die maxillaren Palpen und andere Strukturen der Mundwerkzeuge sowohl bei Funktionsverlust von *Dfd*, als auch bei Funktionsverlust von *lab* nicht mehr korrekt gebildet werden. Dies führte zu Untersuchungen der Expressionsdomänen beider Gene, die eindeutig keine Coexpression in der larvalen Augen- und Antennenimaginalscheibe zeigte, aus der die gnathalen Anhänge gebildet werden (Diederich et al., 1991). Geringe Coexpression konnte jedoch in den embryonalen Vorläuferzellen der Imaginalscheibe gefunden werden. Diese geringe frühe Coexpression wird von den Autoren jedoch nur mit Zweifeln als hinreichende Erklärung für die späteren Effekte aufgefasst, und veranlasste daher zu Spekulationen über weitere mögliche Erklärungen. So wurden beispielsweise morphologische Veränderungen der Kopfkapsel, falsche bzw. unzureichende Ursprungsanalysen der imaginalen Strukturen oder unzureichende Interpretationen der mutanten Phänotypen angeführt. Eine abschließende Erklärung wurde bisher nicht gefunden, allerdings besteht die Möglichkeit, dass die früh im Embryo stattfindende Coexpression ausreichend für die gefundenen Effekte ist. Es besteht mit dem Wissen um den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Regulationsmechanismus über Segmentgrenzen hinweg aber theoretisch die Möglichkeit, dass auch in den von R. J. Diederich und V. K. Merill beobachteten Fällen Funktionen von *lab* auf nicht-zellautonom wirkende Prozesse als Erklärung dienen könnten.

4.4.1. Die segmentale Identität des maxillaren NB6-4 wird durch einen zellautonomen und einen nicht-zellautonomen Weg über die Funktionen der *Antennapedia*-Komplex Gene reguliert

Die Entstehung der segmentalen Identität des NB6-4 ist ein sehr komplexes Zusammenspiel der Wirkungen verschiedener homeotischer Gene im VNS in einer bisher nicht bekannten Weise. Es ist hier gelungen, einen Mechanismus für die Festlegung von segmentaler Identität aufzuklären, der sowohl auf zellautonomer Weise über die bekannte Funktion von Hoxgenen als Transkriptionsfaktoren, sowie

zusätzlich über einen durch Hoxgene gesteuerten nicht-zellautonomen Signalweg wirkt. So wird der Einfluss von räumlich entfernt exprimierten *Antp*-K Genen auf weitere Segmente ermöglicht. Diese Art der Wirkungsweise von Hoxgenen eröffnet ein sehr komplexes Feld für die Möglichkeiten ihrer Einflüsse und Funktionen. Insgesamt bietet es sich in der Zukunft an, diese nicht-zellautonome Wirkungsweise von Hoxgenen zu berücksichtigen und nicht nur an zellautonomer Wirkungsweise orientiert zu bleiben. Ob der hier gefundene Mechanismus eine exklusive Rolle für den maxillaren NB6-4 spielt, oder ob sich durch die Regulation von Amalgam und der nachfolgenden Regulation der Ablason Tyrosin Kinase und Mitgliedern des Hippo/Salvador/Warts-Signalwegs über die Gene des *Antp*-K noch weitere Funktionen und Effekte ergeben, ist eine sehr spannende Frage. Für die segmentale Identität des als Modell verwendeten NB6-4 konnte ein Mechanismus aufgedeckt werden, der um einiges komplexer ist, als durch die bisher gefundenen Ergebnisse zur Herstellung segmentaler Identität des NB6-4 in weiter posterioren Segmenten angenommen werden konnte.

4.4.2. Warum ist eine solch komplexe Regulation maxillarer NB6-4 Identität notwendig?

Diese komplexe Art der Regulation segmentaler Identität des maxillaren NB6-4 wirft Fragen nach den Gründen dafür auf. Die Regulation der maxillaren NB6-4 Identität über zwei voneinander getrennt wirkende Systeme könnte durch die Notwendigkeit einer feineren Regulation von CycE begründet sein. CycE übernimmt für den NB6-4 zwei verschiedene Funktionen. So reguliert es zum einen über seine Funktion als Zellzyklusgen die Zellteilung und übernimmt zum anderen als Differenzierungsfaktor für neuronale Identität eine entscheidende Funktion für die Spezifizierung der Nachkommenzellen. Diese beiden Funktionen von CycE werden durch unterschiedliche Domänen des Proteins vermittelt (Berger und Kannan et al., 2010). Im maxillaren NB6-4 könnte durch die beiden getrennt voneinander wirkenden Systeme des zellautonomen und des nicht-zellautonomen Wegs eine differenziertere Regulationsmöglichkeit auf CycE bestehen. In Embryonen, in denen Abl Funktion eingeschränkt ist, tritt häufig verstärkte Zellproliferation auf. Die Entstehung von ektopischen Neuronen tritt jedoch sowohl in *Dfd* als auch in *Abl* Mutanten auf, daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass zwei funktional komplett getrennte Wege durch *Dfd* und *Abl* reguliert werden. Denkbar wäre eventuell eine quantitativ unterschiedliche Regulation von CycE über *Dfd* und *Abl* gemeinsam. Diese Annahme ist spekulativ und wurde nicht durch die Quantifizierung des CycE Expressionslevels überprüft. Allerdings findet sich eine schwache Expression von *CycE* mRNA auch im wildtypischen NB6-4max, der jedoch niemals neuronale Identität annimmt. Die, wenn auch schwache, Expression von *CycE* mRNA im delaminierenden und auch im bereits einmal geteilten NB6-4max (Abb. 3-30) stellt einen Unterschied zum abdominalen NB6-4 dar, in dem keine *CycE* mRNA Expression nach der ersten Teilung detektierbar ist (Berger et al., 2005). Über diese Expressionsunterschiede lässt sich eventuell auch die unterschiedliche Zellzahl von maxillarem NB6-4 mit vier Gliazellen und abdominalem NB6-4 mit zwei Gliazellen erklären, die wiederum eine differenziertere Regulation von CycE voraussetzt.

4.4.3. Die Lokalisation von *Amalgam* innerhalb des *Antennapedia*-Komplex ist evolutionär konserviert

Es fällt schwer, sich die komplexe Regulation für die Herstellung segmentaler Identität des maxillaren NB6-4 als singuläres Ereignis vorzustellen, auch wenn für die weiteren Eg positiven Neuroblastenlinien keine Auswirkungen von *Ama* oder *Abl* Funktionsverlust festgestellt werden konnten. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob die Lokalisation von *Ama* innerhalb des *Antp*-K mit der Regulation durch *Antp*-K Gene verknüpft ist? Vor dem Hintergrund der gegenseitigen Regulation von Hoxgenen untereinander erscheint die Lokalisation von *Ama* gar nicht so zufällig. Dies ist hauptsächlich für die Gene des *Bithorax*-Komplexes bekannt (Lewis, 1978; Sanchez-Herrero et al., 1985a; Sanchez-Herrero et al., 1985b; Shimell et al., 1994). Weiterhin findet sich dieses Phänomen auch bei der posttranskriptionellen Regulation von Hoxgenexpression durch micro-RNAs, deren codierende Sequenzen ebenfalls innerhalb des Hox-Clusters lokalisiert sind (beispielsweise Kosman et al., 2004; und zusammenfassend Lemons et al., 2012). Diese Abfolge der Anordnung von Genen innerhalb des *Antp*-K mit und ohne homeotische Funktion, auch von *Ama*, ist zudem zwischen *Drosophila melanogaster* und *Drosophila pseudoobscura* evolutionär konserviert und ist von daher vermutlich eine für die Funktionen der Gene bewährte Reihenfolge (Randazzo et al., 1993).

4.4.4. Amalgam wurde bisher nicht als Zielgen von Hoxgenen identifiziert

Bisher wurde *Ama* in Screens nicht als mögliches Zielgen von Hoxgenen gefunden. Dies liegt eventuell an der hauptsächlich transkriptionellen Regulation der mRNA in den jeweiligen Hoxexpressionsdomänen. Offensichtliche, über Antikörperfärbung sichtbare Reduktion der Proteinmenge ergibt sich aber erst beim gleichzeitigen Funktionsverlust von zwei *Antp*-K Genen gemeinsam. Die bisher durchgeführten Screens untersuchten jedoch die Veränderungen von Expressionslevels der Kandidatengene bei Veränderung jeweils nur eines Hoxgens (beispielsweise Leemans et al., 2001; Hueber et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit für das bisherige Nichterkennen wäre eine nicht direkte Regulation von *Ama* durch *Antp*-K Gene, die dadurch in Screens eventuell verborgen bleiben könnte. Es finden sich jedoch Bindestellen für die unterschiedlichen *Antp*-K Gene innerhalb der regulatorischen Sequenzen von *Ama* (siehe Kapitel 3.8.4.). Das kann als ein wichtiger Hinweis auf eine direkte Regulation von *Ama* Transkription durch *Antp*-K Gene gewertet werden. Diese Bindedomänen sind zwischen verschiedenen *Drosophila* Spezies hoch konserviert, was auf eine in der Evolution bewährte regulatorische Beziehung hindeutet.

4.5. Existiert ein Signalweg von Amalgam über Neurotactin und Disabled zur Ableson Tyrosin Kinase?

Der aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse vorgeschlagene Regulationsweg von Hoxgenen auf die Transkription von *Ama* und einer Weiterleitung über *Nrt*, *Dab*, *Abl* auf *Yki* und darüber auf *CycE* ist eine komplexe Annahme. Sie wird durch die Daten zu Transformationsereignissen des NB6-4, sowie den Expressionsdaten der jeweiligen Faktoren in den verschiedenen Funktionsverlustmutanten unterstützt. Beispielsweise ist *Abl* Protein in *Ama* und *Dab* Mutanten deutlich reduziert. Zudem kann die Transformationsrate in Doppelmutanten durch sogenannte Rettungsexperimente durch sekundäre Beeinflussung des nicht-zellautonomen Weges eindeutig wieder reduziert werden (vergleiche Kapitel 3.11.6.). Trotz einiger in der Vergangenheit gefundener genetischer Interaktionen der verschiedenen Komponenten (siehe dieses Kapitel weiter unten) wurde bisher ein Regulationsweg von *Ama* über *Nrt* und *Dab* auf *Abl* nicht vorgeschlagen. Daher soll in diesem Kapitel der mögliche Signalweg diskutiert werden.

4.5.1. Amalgam kann aufgrund seiner Lokalisation nicht selbst als Transkriptionsfaktor wirken

Die *Antp-K* Gene regulieren die Transkription von *Ama* im entstehenden VNS und verursachen somit unterschiedliche Level an *Ama* Protein Konzentration. *Ama* Protein wird sezerniert und verteilt sich innerhalb des Neuroektoderms und des entstehenden VNS über Segmentgrenzen hinweg, was durch die Anwesenheit von *Ama* Protein in z.B. der *Scr* Expressionsdomäne im späten St12 im posterioren Maxillarsegment und anterioren Labialsegment trotz der repressiven Wirkung von *Scr* auf *Ama* deutlich wird. Ein weiteres Beispiel für die Sezernierung von *Ama* Protein über Segmentgrenzen hinweg ist das nicht wesentlich vom WT zu unterscheidende *Ama* Proteinmuster in *Dfd* Mutanten, obwohl *Ama* mRNA Transkription hier in der *Dfd* Expressionsdomäne reduziert ist (siehe Kapitel 3.8.4.2.).

Ama wirkt als neuronales Adhäsionsprotein und wird an der Membran verankert (Seeger et al., 1988; Liebl et al., 2003; Fremion et al., 2000). Es ist somit nicht in der Lage, selbst als Transkriptionsfaktor im Zellkern zu wirken. Daher sind weitere Schritte notwendig, um den Effekt von fehlendem *Ama* Protein auf die Entstehung neuronaler Anteile des NB6-4max durch die Expression von *CycE* erklären zu können.

4.5.2. Neurotactin könnte ein Vermittler eines Signals von Amalgam sein

Ama ist notwendig für die Dimerisierung und damit der korrekten Funktion seines Transmembran-Rezeptors Neurotactin (Diano und Piovant, 1995; Liebl et al., 2003, Zeev-Ben-Mordehai et al., 2009). Der Funktionsverlust von *Nrt* verursacht denselben Phänotyp im NB6-4max wie der Funktionsverlust von *Ama*, allerdings nur in 15% der Hemisegmente (siehe Kapitel 3.9.). *Nrt* wurde als von *Lab* Funktion abhängig exprimiertes Gen gefunden, das bei ektopischer ubiquitärer Expression von *lab* weniger stark exprimiert wird (Leemans et al., 2001). Ein solcher Screen stellt eine sehr künstliche Situation dar und

spiegelt nicht unbedingt die regulativen Prozesse in einzelnen Geweben oder gar einzelnen Zellen wieder. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Abhängigkeit von Nrt Expression von *Antp*-K Gen Funktion über Antikörperfärbung festgestellt werden.

Für die geringere Transformationsrate der *Nrt* Mutanten kann es unterschiedliche Erklärungen geben. Es wäre möglich, dass Nrt nicht der einzige Rezeptor für Ama ist und Ama daher zusätzlich über einen zweiten Weg auf die folgenden Komponenten wirken könnte. Eine Analyse von in Frage kommenden Kandidaten wäre für die Entschlüsselung weiterer Funktionen von Ama interessant. Es sind bisher nur wenige weitere Interaktoren von Ama bekannt (Guruharsha et al., 2011). Interessanterweise konnte eine Relation von Ama zu Notch durch einen Screen für neue Interaktoren des Notch Signalwegs hergestellt werden (Hurlbut et al., 2009), allerdings wurde dieser Zusammenhang bisher nicht weiter untersucht. Weitere Interaktion mit einem weiteren Rezeptor konnten bisher nicht gefunden werden (Ozkan et al., 2013). Die chemische Struktur und damit verbundene Bindemöglichkeiten von Ama konnten jedoch entschlüsselt werden (Zeev-Ben-Mordehai et al., 2009a; Zeev-Ben-Mordehai et al., 2009b) und könnten eine Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung bilden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die geringe Transformationsrate in Nrt Mutanten ist eine mögliche Restfunktion des in den Mutanten gebildeten Nrt Proteins. Bei den verwendeten Mutanten handelt es sich nicht um absolute Protein-Null Mutationen (Speicher et al., 1998; Liebl et al., 2003). Möglicherweise ist ausreichend Restfunktion vorhanden, um einige funktionierende Transmembranbrücken zu bilden und als Signalvermittler zu fungieren. Es lassen sich somit eventuelle Gründe für die geringere Transformationsrate von Nrt finden und sollten daher der Annahme eines Signalwegs nicht im Wege stehen.

4.5.3. Disabled könnte als Adapter zwischen Neurotactin und Ableson fungieren

Für Nrt und Abl wurden genetische Interaktionen gefunden (Liebl et al., 2003), ebenso für Dab und Abl (Song et al., 2010). Dab wurde im Zusammenhang mit Axonentwicklung als Komponente identifiziert, welche vorgeschaltet zu Abl wirkt und genetisch mit Abl interagiert (Song et al., 2010). Die Vermutung für den in der vorliegenden Arbeit angenommenen Signalweg beinhaltet weiterhin, dass durch die von Ama vermittelte Dimerisierung der Nrt Moleküle Signale an Dab in die Zelle weitergegeben werden und diese wiederum an Abl. Von welcher Art die durch Nrt weitergegebenen Signale sind, ist bisher nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass das Adapterprotein Dab (Gertler et al., 1993; Howell et al., 1997; Le und Simon, 1998) möglicherweise ein Verbindungsglied zwischen Zelloberflächenrezeptoren und intrazellulären Komponenten darstellen könnte (Song et al., 2010). Bisher ist bekannt, dass Dab durch seine Bindeeigenschaften in den *sevenless* Signalweg (ebenfalls eine Phosphotyrosin Kinase) involviert ist (Le und Simon, 1998), und über seine Bindung zum Notch-Rezeptor an axonaler Wegfindung beteiligt ist (Le Gall und Giniger, 2004; Le Gall et al., 2008). Diese Art der Weiterleitung von Signalen findet sich auch in Vertebraten, wo das Dab-Homologe Dab1 als

Reaktion auf die Bindung des sezernierten Moleküls Reelin an seinen Rezeptor phosphoryliert wird und in diesem Zustand anschließend Notch bindet (Hashimoto-Torii et al., 2008). Die Vermutung, dass durch die Bindung von Ama an Nrt ein Signal an Dab weitergegeben wird, ist durch die bisher bekannten Eigenschaften und Funktionen der Faktoren gut möglich.

Weiterhin ist denkbar, dass die Gene des *Antp*-K auch direkt auf die Regulation oder Aktivität von Abl wirken. Da Dab Funktionsverlust jedoch dieselbe Transformationsrate des NB6-4max wie Abl und Ama Funktionsverlust von ca. 40% ergibt, ist ein Signalweg von Ama über Dab auf Abl wahrscheinlich. Zudem kann die verursachte Transformationssteigerung in den Doppelmutanten im Vergleich zu Rate der Einzelmutanten sowohl durch ektopisch induziertes Abl, als auch durch ektopisches Ama nachträglich wieder reduziert werden. Um direkte Regulation von Abl durch *Antp*-K Gene zu klären, könnte ebenfalls eine Suche nach Hox-Bindestellen im Enhancerbereich von Abl mögliche Hinweise bringen.

4.5.4. Die Ableson Kinase könnte phosphorylierend auf Hippo wirken

Im Folgenden wird nun eine Verbindung von Abl zu einer Regulation von *CycE* Expression notwendig, um die Effekte auf die Identitätsfindung des maxillaren NB6-4 erklären zu können. Abl wurde bereits als potentieller Repressor von *CycE* identifiziert, weitere Untersuchungen über den dort zu Grunde liegenden Mechanismus wurden jedoch nicht durchgeführt (Brumby et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte ein regulatorischer Mechanismus von Abl auf den Hippo/Salvador/Warts-Signalweg (HSW-Signalweg), der auch für die Regulation von *CycE* Expression bekannt ist (Huang et al., 2005; Zhao et al., 2011), identifiziert werden.

An welcher Stelle des HSW-Signalwegs die Funktion von Abl genau ansetzt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Zwischen WT und *lab¹Dfd¹²* bzw. *Abl⁴* Mutanten existiert ein stark unterschiedliches Level an Salvador Protein, das als Erkennungsmarke für die Kinaseaktivität von Hippo gilt (Pantalacci et al., 2003; Aerne et al., 2015). Daher wäre eine Wirkung von Abl direkt auf Hippo möglich. Das Abl Homologe in Wirbeltieren, c-Abl (Grevengoed et al., 2003) ist in der Lage, sowohl Säuger Hippo, bezeichnet als MST1, als auch *Drosophila* Hippo zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Levy et al., 2008; Liu et al., 2012). Es wäre jedoch in der Abfolge von mehreren Kinasen im Hippo Signalweg ein alternativer oder auch ein zusätzlicher Ansatzpunkt für Abl denkbar. Auch auf Yki selbst könnte Abl durch seine Kinaseaktivität phosphorylierend wirken. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Yki im VNS auch durch Faktoren phosphoryliert werden kann, die nicht dem HSW-Signalweg angehören (Gailite et al., 2015). Die exakten Interaktionen von Abl auf Hippo und Yki sind auch im Hinblick auf weitere Funktionen dieser bedeutenden Faktoren interessant und sollten daher in folgenden Arbeiten genauer entschlüsselt werden.

4.5.5. Als Vermittler zwischen Yorkie und *CyclinE* kommen Teashirt und Homothorax in Betracht

Die Entstehung von NB6-4 Neuronen ist von der Funktion von *teashirt* (*tsh*) und von *homothorax* (*hth*) abhängig. *tsh* wurde als Faktor gefunden, der eine segmentale Grundidentität vermittelt (de Zulueta et al., 1994), die für NB6-4 in seiner thorakale Neurone und Gliazellen umfassenden Identität gefunden wurde (Berger et al., 2005). Funktionsverlust von *tsh* führt zu 25% Neuronverlust im labialen und thorakalen NB6-4, ektopische Expression von *tsh* führt zu 90% ektopischer maxillarer NB6-4 Neurone, was seine Funktion hierin stark unterstreicht (siehe Kapitel 3.7.3.).

Funktionsverlust von *hth* führt ebenfalls zum Verlust neuronaler Identität des labialen und thorakalen NB6-4. Ektopische Expression von *hth* hat keine Auswirkungen auf den maxillaren NB6-4, es wird jedoch auch, anders als *tsh*, wildtypisch im NB6-4max exprimiert (siehe Kapitel 3.7.4.).

Die transkriptionelle Wirkung von Yki auf *CycE* wird unter anderem durch Tsh und Hth vermittelt (Huang et al., 2005, zusammengefasst in Zhao et al., 2011; Peng et al., 2009, Reddy und Irvine, 2011). Weder im WT, noch in Mutanten tritt Expression von Tsh anterior zum Labialsegment auf. Auch in *lab¹Dfd¹²*, *Abl⁴Dfd¹⁶* und *mid¹Dfd¹⁶* Mutanten bleibt die Tsh Expressionsdomäne wildtypisch erhalten (vergleiche Abb. 3-44, Abb. 3-67 und Abb. 3-70). Daher kommt Tsh im NB6-4max nicht als Vermittler zwischen Yki und CycE in Betracht, auch wenn Tsh eindeutig das Potential besitzt, die segmentale Identität von NB6-4 zu beeinflussen. Hth Protein ist in den gnathalen Segmenten sowohl im WT als auch in *lab¹Dfd¹²* oder *Abl⁴* Mutanten vorhanden, auch im NB6-4max (siehe Abb. 3-46). Es ist möglich, dass in den mutanten Hintergründen Yki über Hth auf *CycE* wirken könnte. Im WT hingegen entstehen im NB6-4max keine Neurone, daher muss die aktivierende Funktion von Hth auf *CycE* im maxillaren NB6-4 im WT ausgeschaltet sein. Dies könnte über die Phosphorylierung von Yki über ausreichende Funktion von Abl im WT geschehen.

In den abdominalen Segmenten konnte keine Abhängigkeit der segmentalen Identität des NB6-4 von Abl festgestellt werden. Tsh und Hth sind in den abdominalen NB6-4 exprimiert, daher muss hier ein stark hemmender Mechanismus vorhanden sein, der die neuronale Identität fördernde Wirkung von Hth und Tsh unterdrückt. Hier tritt vermutlich die reprimierende Funktion von AbdA in Kraft und unterdrückt *CycE* Transkription ausreichend (Berger et al., 2005).

4.6. Könnten der Ballonphänotyp und die gesteigerte Zellproliferation durch Funktionen von Notch verursacht sein?

In allen dem möglichen Signalweg zugeordneten Komponenten tritt zusätzlich zur Veränderung der segmentalen Identität des NB6-4 ein weiterer sehr auffälliger Phänotyp auf. Dieser Phänotyp ist zum einen eine sehr starke Proliferation von Neuroblastenlinien, sowie eine Morphologie von Zellkernen, die an einen Ballon erinnern und wie aufgeblasen und stark vergrößert erscheinen. Da der HSW-Signalweg für die Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation bekannt ist (Thompson und Cohen, 2006) Huang et al., 2005; Oh und Irvine, 2011), und zudem auch in Embryonen mit ektoptisch konstitutiv aktivem Yki dieser Phänotyp auftritt, könnte sich die Ursache für diesen Phänotyp in den Funktionen des Hippo Signalwegs finden lassen. Beispielsweise konnte Peng in ektoptisch Tsh oder Hth exprimierenden Klonen in der Augenheimmaginalscheibe extremes Zellwachstum feststellen (Peng et al., 2009).

4.6.1. Yorkie kann den NB6-4 Phänotyp, aber nicht den Ballonphänotyp retten

Nachdenklich stimmt jedoch, dass durch zusätzliche Mutation von *yki* in *lab¹Dfd¹²* oder *Abl⁴Dfd¹⁶* Mutanten zwar die Transformationsrate von NB6-4 reduziert werden kann, der Ballon- und Proliferationsphänotyp jedoch weiterhin besteht (dieses Ergebnis wurde dankenswerterweise von Christian Berger ausgewertet). Zudem bleibt dieser Phänotyp nicht auf Mutanten mit veränderter Yki Aktivität beschränkt, sondern er findet sich auch bei Funktionsverlust des untersuchten Kandidaten *longitudinals lacking (lola)*, der keinen NB6-4 Phänotyp aufweist.

4.6.2. Literaturrecherche lässt einen möglichen Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg erkennen

In der Literatur wurde im Zusammenhang mit fokaler kortikaler Dysplasie, einer Veränderung des menschlichen Gehirns, die im Zusammenhang mit Formen von Epilepsie auftritt, von einem Ballon-ähnlichen Phänotyp der Zellen gesprochen (Taylor et al., 1971; Yasin et al., 2010). Dieser Phänotyp wurde im Zusammenhang mit Funktionen des Notch Signalwegs gestellt (Cotter et al., 1999; Lasky und Wu, 2005). Da weder in der vorliegenden Arbeit, noch in den genannten Publikationen der Phänotyp genau charakterisiert wurde, ist keine Aussage möglich, ob es sich hierbei um denselben Phänotyp handelt.

Für alle die in dieser Arbeit behandelten Faktoren in denen der Ballonphänotyp im VNS auftritt, konnten ebenfalls Funktionen im Zusammenhang mit dem Notch Signalweg identifiziert werden. Aml wurde als potentieller Interaktionspartner von Notch in einem Screen über neue Interaktoren des Notch-Ras Signalwegs identifiziert (Hurlbut et al., 2009). Für Abl werden Funktionen für axonale Wegfindung im Zusammenhang von Interaktion mit Notch vermutet (Crown et al., 2003); Giniger, 1998, Song et al., 2010) und konnten schließlich bestätigt werden (Kuzina et al., 2011; Song und Giniger, 2011). Verstärktes Notch-signaling in Abl-mutanten Klonen der Photorezeptorzellen führt zu einem

veränderten Schicksal dieser Zellen (Xiong et al., 2013). Weiterhin ist eine Regulation im Zusammenhang mit axonaler Wegfindung von Dab über Notch bekannt (Giniger, 1998), und Notch coimmunoprezipitiert mit Dab (LeGall et al., 2008). Für Lola wird eine Rolle in der Axonentwicklung im peripheren Nervensystem gemeinsam mit Notch vermutet (Giniger et al., 1994). Yki wird über Notch-signaling nicht-zellautonom in der Flügelimaginalscheibe aktiviert (Graves et al., 2012), bzw. wird Yki Aktivität über Notch-signaling in der zentralen Region der Flügelimaginalscheibe inhibiert (Djiane et al., 2014). Weiterhin konnte Yki als Repressor von Notch bei der Polzellentwicklung in der Oogenese identifiziert werden (Chen et al., 2011).

Festzuhalten ist demnach, dass in allen genetischen Hintergründen, in denen der Ballonphänotyp auftritt, zusätzlich zu der über Abl gesteuerten Aktivität von Yki auch möglicherweise Notch-signaling verändert sein könnte. Diese Hypothese ergibt sich nur aus den bisher bekannten Zusammenhängen in der Literatur und wurde in keiner Weise in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Verbindung des beobachteten auffälligen Phänotyps wurde ebenfalls nur über bekannte Daten in der Literatur mit Notch in Verbindung gebracht.

Um aber diesen Möglichkeiten weiter nachzugehen, wären umfassende Analysen der Zusammenhänge von Notch mit Ama, Abl und Yki im VNS notwendig. Da Notch ein Faktor mit sehr vielfältigen, zeitlich sehr unterschiedlichen und teilweise sehr Kontext abhängigen Funktionen ist (Udolph et al., 2001; Van De Bor und Giangrande, 2001; Umesono et al., 2002), müssten die Untersuchungen mit großer Umsicht auf die möglichen Nebeneffekte durchgeführt werden. Nur in Ansätzen begonnene Antikörperfärbungen von Notch-intra und Notch-extra im entstehenden VNS des WT ließen große methodische Schwierigkeiten aufgrund der hohen Dynamik der Expression aufkommen und wurden daher nicht weiter verfolgt (nicht gezeigt). Trotzdem bietet sich hier eine interessante Möglichkeit der Verknüpfung von Funktionen sehr wichtiger Faktoren, die gerade in der letzten Zeit häufig auch in Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren und Krebs gebracht wurden. Beispielsweise führt die Regulation von Yki über Notch zu einer Verhinderung von Apoptose in Tumorzellen (Graves et al., 2012). Für Hoxgene ist ebenfalls schon lange ein Zusammenhang mit Tumorgenese und Krebsentstehung bekannt, daher ist eine Verknüpfung von Hoxgenfunktionen mit Signalwegen für die Regulation von Zellproliferation und Zellwachstum auch in diesem Zusammenhang sehr vielversprechend.

4.7. Mögliche Verknüpfung der entschlüsselten Regulationen der *Antennapedia*-Komplex Gene mit Krebsentstehung

Laufen Zellwachstum und Zellproliferation aus ihren normalen Bahnen und ist apoptotische Aktivität in diesen Zellen verringert, so entstehen Tumore und Krebs. Eine Rolle von Funktionen von Hoxgenen in diesen Zusammenhängen wurde schon häufiger gefunden (siehe unten). Auch Abl ist als Proto-Onkogen bekannt (zusammengefasst in (Sirvent et al., 2008)). Die in der vorliegenden Arbeit gelungene Verknüpfung von Hoxgenfunktion mit der Regulation des Proto-Onkogen Abl lässt eine weitere sehr interessante Dimension in diesem Zusammenhang entstehen.

In Vertebraten wurden gesteigerte proliferative Aktivität und verringerte apoptotische Reaktionen im Zusammenhang mit Funktionen des *lab* Homologen HOXA1 gefunden (Grier et al., 2005). Weitere Beispiele in der Krebsforschung in Vertebraten enthüllten in den letzten Jahren eine Vielzahl an Funktionen der verschiedenen Hoxgene im Zusammenhang mit der Entstehung unterschiedlicher Krebsarten (Shah und Sukumar, 2010). Sie reichen von direkter Regulation von p53 über HoxA5 (Raman et al., 2000), einem *Scr* Homologen, in der Entstehung von Brustkrebs, über die Funktionen als Regulator von Apoptose von beispielsweise HOXA5 (Chen et al., 2004) und HOXA10 (Chu et al., 2004). Funktionen für die Regulation von Zellproliferation wird von einigen Mitgliedern der HOXA und HOXB Gruppe (Lawrence und Largman, 1992), beispielsweise von HOXA9, in Zusammenhang mit Leukämieentstehung gebracht (Calvo et al., 2002). Weitere Beispiele sind Rezeptor-Signalwege, die durch Fehlfunktionen zu Krebsentstehung führen (Daftary und Taylor, 2006), beispielsweise von HOXB13 (Miao et al., 2007). Weitere Regulationen wurden im Zusammenhang mit Zelldifferenzierung und Hormonregulation gefunden (Shah und Sukumar, 2010).

In *Drosophila* wurde für Dfd eine direkte Beeinflussung von Apoptose über die Regulation von proapoptotischen Genen und des apoptotischen Inhibitor Protein 1 (DIAP1) identifiziert, die bei Dfd Fehlfunktion zu Tumorbildung führt (Lohmann et al., 2002). Weitere Beispiele gibt es bei der Regulation von Zelladhäsion im Zusammenhang mit Cadherinen und Integrinen, die ebenfalls Parallelen zu der Entstehung verschiedener Krebsarten in Vertebraten erkennen lassen (Taniguchi, 2014).

Die Verbindung von Funktionen der *Antp*-K Gene zu den Funktionen von Ams und Abl, sowie weiterer Regulation von Yki lassen möglicherweise vollkommen neue Zusammenhänge bezüglich der Funktionen von Hoxgenen auf Tumorentstehung durch Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation erkennen.

5. Zusammenfassung

Die segmentalen Identitäten der gnathalen NB6-4 Zelllinien sind über ihre Expression des in Thorax und Abdomen als Marker etablierten Transkriptionsfaktors Eagle (Eg) eindeutig zu identifizieren. Eg bildet in den gnathalen Segmenten ein wesentlich komplexeres Expressionsmuster aus, als es von posterioren Segmenten bekannt ist. Es findet zeitlich versetzte Expression in Subpopulationen von Zellen mehrerer Neuroblastenlinien statt. Alle Identitäten dieser spät Eg positiven Neuroblastenlinien konnten mithilfe weiterer Markeranalysen als serielle Homologe der posterioren Segmente identifiziert werden. Der maxillare NB6-4 (NB6-4max) bildet eine rein gliale Zelllinie aus, während der labiale NB6-4 (NB6-4lab) über die Wirkung von CyclinE (CycE) ein neuronales Cluster zusätzlich zu Gliazellen ausbildet. Die segmentalen Identitäten der gnathalen NB6-4, NB3-3 und NB7-3 sind von der Funktion der dort exprimierten Gene des *Antennapedia*-Komplexes (*Antp*-K) abhängig. Für NB6-4 des Maxillarsegments (NB6-4max) konnte neben einem direkten zellautonomen Mechanismus durch Deformed (Dfd) Funktion (43% Transformation des NB6-4max bei *Dfd* Funktionsverlust hin zu labialer Identität) ein zweiter paralleler nicht zellautonomer Mechanismus identifiziert werden, der den entfernt exprimierten *Antp*-K Genen *labial* (*lab*) und *Antennapedia* (*Antp*) einen Einfluss auf die segmentale Identität des NB6-4max ermöglicht. *Lab*, *Dfd*, *Sex combs reduced* (*Scr*) und *Antp* wirken transkriptionell auf die Expression von *Amalgam* (*Ama*), das vermutlich in einem Signalweg über seinen Rezeptor Neurotactin auf das Adapterprotein Disabled wirkt, und so ein Signal auf die Ablason Tyrosin Kinase (*Abl*) vermittelt. In Einzel-Funktionsverlustmutationen dieser Faktoren tritt eine Transformation des NB6-4max in ca. 40% auf, die Kombination von *lab¹Dfd¹²*, *Dfd¹⁶Antp⁷* oder *Abl⁴Dfd¹⁶* führt zu annähernd 100% Transformation. Durch ektopische Expression von *Abl* oder *Ama* kann die Transformationsrate in den Hox-Doppelmutanten wiederum reduziert werden, was eindeutig belegt, dass *Antp*-K Gene *Ama* und *Abl* regulieren und darüber in einem parallelen nicht-zellautonomen Weg segmentale Identität des NB6-4max beeinflussen.

Als Regulator für die Entstehung von Neuronen und damit verbundener segmentaler Identität des NB6-4 wurde *CycE* identifiziert. *Dfd* reprimiert die Expression von *CycE* im NB6-4max vermutlich direkt über seine Funktion als Transkriptionsfaktor, wobei nicht geklärt werden konnte, ob hierbei eine Protein-Protein Interaktion stattfindet. Die von NB6-4max räumlich entfernt exprimierten Gene *lab* und *Antp* wirken hingegen über den nicht-zellautonomen Weg über *Abl* auf den Hippo/Salvador/Warts-Signalweg. Darin wirkt der durch Hippo regulierte Faktor Yorkie über die Regulation von weiteren Faktoren, unter anderem Teashirt und Homothorax, auf die Expression von *CycE*. Gleichzeitiger Funktionsverlust des Effektors Yorkie gemeinsam mit *Abl⁴Dfd¹⁶* oder mit *lab¹Dfd¹²* kann die Transformationsrate des NB6-4max auf 65% retten. Gleichzeitiger Funktionsverlust von *CycE*

gemeinsam mit *Dfd¹¹* oder mit *Abl⁴Dfd¹⁶* rettet die wildtypische Identität des NB6-4max in rund 80%, was eindeutig die Regulation von CycE durch Dfd und Abl, sowie die Funktion von CycE auf Neuronentstehung im NB6-4max belegt.

In dieser Arbeit ist es gelungen, einen bisher nicht bekannten nicht-zellautonomen Regulationsweg von räumlich entfernt exprimierten *Antp*-Komplex Genen auf die segmentale Identität einer Zelllinie im VNS zu identifizieren. Eine Verbindung von Hoxgenfunktion mit dem sezernierten Faktor Ama oder Abl und dem Hippo Signalweg wurde bisher nicht vermutet, und eröffnet neue Möglichkeiten für die Regulationen von Hoxgenfunktion über weitreichende Distanzen. Weiterführend bildet sie neue Verknüpfungen von Hoxgenfunktionen mit Phänomenen wie Zellwachstum und Zellproliferation.

6. Literaturverzeichnis

Aad, G. Abbott, B. Abdallah, J. Abidinov, O. Aben, R. Abolins, M. AbouZeid, O. S. Abramowicz, H. Abreu, H. Abreu, R. et al. (2015) 'Determination of the Ratio of b-Quark Fragmentation Fractions in pp Collisions at TeV with the ATLAS Detector', *Phys Rev Lett* 115(26): 262001.

Abbott, M. K. und Kaufman, T. C. (1986) 'The relationship between the functional complexity and the molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 114(3): 919-42.

Abu-Shaar, M., Ryoo, H. D. und Mann, R. S. (1999) 'Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals', *Genes Dev* 13(8): 935-45.

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(5461): 2185-95.

Aerne, B. L., Gailite, I., Sims, D. und Tapon, N. (2015) 'Hippo Stabilises Its Adaptor Salvador by Antagonising the HECT Ubiquitin Ligase Herc4', *PLoS One* 10(6): e0131113.

Affolter, M., Percival-Smith, A., Muller, M., Leupin, W. und Gehring, W. J. (1990) 'DNA binding properties of the purified Antennapedia homeodomain', *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11): 4093-7.

Ahern-Djamali, S. M., Comer, A. R., Bachmann, C., Kastenmeier, A. S., Reddy, S. K., Beckerle, M. C., Walter, U. und Hoffmann, F. M. (1998) 'Mutations in *Drosophila* enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains', *Mol Biol Cell* 9(8): 2157-71.

Akam, M. (1987) 'The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo', *Development* 101(1): 1-22.

Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. und Hotta, Y. (1999) 'Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*', *Development* 126(9): 1967-74.

Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S. und Oda, H. (2000a) 'Distinct mechanisms triggering glial differentiation in *Drosophila* thoracic and abdominal neuroblasts 6-4', *Dev Biol* 222(2): 429-39.

Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S. und Oda, H. (2000b) 'Mechanism of glia-neuron cell-fate switch in the *Drosophila* thoracic neuroblast 6-4 lineage', *Development* 127(16): 3513-22.

Andrew, D. J., Horner, M. A., Petitt, M. G., Smolik, S. M. und Scott, M. P. (1994) 'Setting limits on homeotic gene function: restraint of Sex combs reduced activity by teashirt and other homeotic genes', *EMBO J* 13(5): 1132-44.

Artavanis-Tsakonas, S., Delidakis, C. und Fehon, R. G. (1991) 'The *Notch* locus and the cell biology of neuroblast segregation', *Annual Review Cell Biology* 7: 457-452.

- Ashburner, M., Carson, H. L. und Thompson Jr., J. N. (1982) 'The Genetics and Biology of *Drosophila*', V3b: 1-59.
- Azpiazu, N. und Morata, G. (1998) 'Functional and regulatory interactions between Hox and extradenticle genes', *Genes Dev* 12(2): 261-73.
- Bachiller, D., Macias, A., Duboule, D. und Morata, G. (1994) 'Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes', *EMBO J* 13(8): 1930-41.
- Badenhorst, P. (2001) 'Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS', *Development* 128(20): 4093-101.
- Bahri, S. M., Chia, W. und Yang, X. (2001) 'The *Drosophila* homolog of human AF10/AF17 leukemia fusion genes (Dalf) encodes a zinc finger/leucine zipper nuclear protein required in the nervous system for maintaining EVE expression and normal growth', *Mech Dev* 100(2): 291-301.
- Baker, N. E. (1987) 'Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos', *EMBO J* 6(6): 1765-73.
- Bandura, J. L., Beall, E. L., Bell, M., Silver, H. R., Botchan, M. R. und Calvi, B. R. (2005) 'humpty dumpty is required for developmental DNA amplification and cell proliferation in *Drosophila*', *Curr Biol* 15(8): 755-9.
- Bantignies, F., Goodman, R. H. und Smolik, S. M. (2002) 'The interaction between the coactivator dCBP and Modulo, a chromatin-associated factor, affects segmentation and melanotic tumor formation in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2895-900.
- Barmina, O. und Kopp, A. (2007) 'Sex-specific expression of a HOX gene associated with rapid morphological evolution', *Dev Biol* 311(2): 277-86.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A. und Raff, J. W. (2006) 'Flies without centrioles', *Cell* 125(7): 1375-86.
- Bennett, R. L. und Hoffmann, F. M. (1992) 'Increased levels of the *Drosophila* Abelson tyrosine kinase in nerves and muscles: subcellular localization and mutant phenotypes imply a role in cell-cell interactions', *Development* 116(4): 953-66.
- Berger, C., Kannan, R., Myneni, S., Renner, S., Shashidhara, L. S. und Technau, G. M. (2010) 'Cell cycle independent role of Cyclin E during neural cell fate specification in *Drosophila* is mediated by its regulation of Prospero function', *Dev Biol* 337(2): 415-24.
- Berger, C., Pallavi, S. K., Prasad, M., Shashidhara, L. S. und Technau, G. M. (2005) 'A critical role for cyclin E in cell fate determination in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*', *Nat Cell Biol* 7(1): 56-62.
- Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J. L. und Giangrande, A. (1999) 'Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts', *Dev Biol* 216(1): 265-75.
- Bessa, J., Carmona, L. und Casares, F. (2009) 'Zinc-finger paralogues tsh and tio are functionally equivalent during imaginal development in *Drosophila* and maintain their expression levels through auto- and cross-negative feedback loops', *Dev Dyn* 238(1): 19-28.
- Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F. und Mann, R. S. (2002) 'Combinatorial control of *Drosophila* eye development by eyeless, homothorax, and teashirt', *Genes Dev* 16(18): 2415-27.

- Betschinger, J., Mechtler, K. und Knoblich, J. A. (2006) 'Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells', *Cell* 124(6): 1241-53.
- Bhojwani, J., Shashidhara, L.S., Sinha, P. (1997). Requirement of teashirt (tsh) function during cell fate specification in developing head structures in Drosophila. *Dev. Genes Evol.* 207(3): 137--146
- Bienz, M. (1996). Induction of the endoderm in Drosophila. *Semin. Cell Dev. Biol.* 7(1): 113--119.
- Bienz, M. (1997) 'Endoderm induction in Drosophila: the nuclear targets of the inducing signals', *Curr Opin Genet Dev* 7(5): 683-8.
- Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1992) 'deadpan, an essential pan-neural gene in Drosophila, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product', *Genes Dev* 6(11): 2137-51.
- Birkholz, O., Rickert, C., Berger, C., Urbach, R. und Technau, G. M. (2013a) 'Neuroblast pattern and identity in the Drosophila tail region and role of doublesex in the survival of sex-specific precursors', *Development* 140(8): 1830-42.
- Birkholz, O., Rickert, C., Nowak, J., Coban, I. C. und Technau, G. M. (2015) 'Bridging the gap between postembryonic cell lineages and identified embryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of Drosophila melanogaster', *Biol Open* 4(4): 420-34.
- Birkholz, O., Vef, O., Rogulja-Ortmann, A., Berger, C. und Technau, G. M. (2013b) 'Abdominal-B and caudal inhibit the formation of specific neuroblasts in the Drosophila tail region', *Development* 140(17): 3552-64.
- Boll, W. und Noll, M. (2002) 'The Drosophila Pox neuro gene: control of male courtship behavior and fertility as revealed by a complete dissection of all enhancers', *Development* 129(24): 5667-81.
- Bossing, T. and 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(7): 1895-906.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and 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(1): 41-64.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development* 118(2): 401-15.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2005) 'Principles of microRNA-target recognition', *PLoS Biol* 3(3): e85.
- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. and Doe, C. Q. (1995) 'New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the Drosophila central nervous system', *Mech Dev* 53(3): 393-402.
- Brown, S. J., Mahaffey, J. P., Lorenzen, M. D., Denell, R. E. and Mahaffey, J. W. (1999) 'Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects', *Evol Dev* 1(1): 11-5.
- Brumby, A., Secombe, J., Horsfield, J., Coombe, M., Amin, N., Coates, D., Saint, R. and Richardson, H. (2004) 'A genetic screen for dominant modifiers of a cyclin E hypomorphic mutation identifies novel regulators of S-phase entry in Drosophila', *Genetics* 168(1): 227-51.

- Brumby, A. M., Zrally, C. B., Horsfield, J. A., Secombe, J., Saint, R., Dingwall, A. K. and Richardson, H. (2002) 'Drosophila cyclin E interacts with components of the Brahma complex', *EMBO J* 21(13): 3377-89.
- Buescher, M., Svendsen, P. C., Tio, M., Miskolczi-McCallum, C., Tear, G., Brook, W. J. and Chia, W. (2004) 'Drosophila T box proteins break the symmetry of hedgehog-dependent activation of wingless', *Curr Biol* 14(19): 1694-702.
- Buescher, M., Tio, M., Tear, G., Overton, P. M., Brook, W. J. and Chia, W. (2006) 'Functions of the segment polarity genes midline and H15 in Drosophila melanogaster neurogenesis', *Dev Biol* 292(2): 418-29.
- Calhoun, V. C., Stathopoulos, A. and Levine, M. (2002) 'Promoter-proximal tethering elements regulate enhancer-promoter specificity in the Drosophila Antennapedia complex', *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9243-7.
- Calvo, K. R., Sykes, D. B., Pasillas, M. P. and Kamps, M. P. (2002) 'Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1', *Oncogene* 21(27): 4247-56.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1997) *The embryonic development of Drosophila melanogaster.*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Capovilla, M. and Botas, J. (1998) 'Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp', *Development* 125(24): 4949-57.
- Carroll, S. B., Laymon, R. A., McCutcheon, M. A., Riley, P. D. and Scott, M. P. (1986a) 'The localization and regulation of Antennapedia protein expression in Drosophila embryos', *Cell* 47(1): 113-22.
- Carroll, S. B., Winslow, G. M., Schupbach, T. and Scott, M. P. (1986b) 'Maternal control of Drosophila segmentation gene expression', *Nature* 323(6085): 278-80.
- Casares, F. and Mann, R. S. (1998) 'Control of antennal versus leg development in Drosophila', *Nature* 392(6677): 723-6.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. and Akam, M. (1994) 'Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function', *Development* 120(7): 1983-95.
- Celniker, S. E., Keelan, D. J. and Lewis, E. B. (1989) 'The molecular genetics of the bithorax complex of Drosophila: characterization of the products of the Abdominal-B domain', *Genes Dev* 3(9): 1424-36.
- Chadwick, R. and McGinnis, W. (1987) 'Temporal and spatial distribution of transcripts from the Deformed gene of Drosophila', *EMBO J* 6(3): 779-89.
- Chan, S. K. and Mann, R. S. (1996) 'A structural model for a homeotic protein-extradenticle-DNA complex accounts for the choice of HOX protein in the heterodimer', *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11): 5223-8.
- Chen, H., Chung, S. and Sukumar, S. (2004) 'HOXA5-induced apoptosis in breast cancer cells is mediated by caspases 2 and 8', *Mol Cell Biol* 24(2): 924-35.

- Chen, H. J., Wang, C. M., Wang, T. W., Liaw, G. J., Hsu, T. H., Lin, T. H. and Yu, J. Y. (2011) 'The Hippo pathway controls polar cell fate through Notch signaling during *Drosophila* oogenesis', *Dev Biol* 357(2): 370-9.
- Chu, M. C., Selam, F. B. and Taylor, H. S. (2004) 'HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells', *Cancer Biol Ther* 3(6): 568-72.
- Coiffier, D., Charroux, B. and Kerridge, S. (2008) 'Common functions of central and posterior Hox genes for the repression of head in the trunk of *Drosophila*', *Development* 135(2): 291-300.
- Comer, A. R., Ahern-Djamali, S. M., Juang, J. L., Jackson, P. D. and Hoffmann, F. M. (1998) 'Phosphorylation of Enabled by the *Drosophila* Abelson tyrosine kinase regulates the in vivo function and protein-protein interactions of Enabled', *Mol Cell Biol* 18(1): 152-60.
- Cotter, D., Honavar, M., Lovestone, S., Raymond, L., Kerwin, R., Anderton, B. and Everall, I. (1999) 'Disturbance of Notch-1 and Wnt signalling proteins in neuroglial balloon cells and abnormal large neurons in focal cortical dysplasia in human cortex', *Acta Neuropathol* 98(5): 465-72.
- Couch, J. A., Chen, J., Rieff, H. I., Uri, E. M. and Condrón, B. G. (2004) 'robo2 and robo3 interact with eagle to regulate serotonergic neuron differentiation', *Development* 131(5): 997-1006.
- Couso, J. P. and Martínez Arias, A. (1994) 'Notch is required for wingless signaling in the epidermis of *Drosophila*', *Cell* 79(2): 259-72.
- Crews, S. T., Thomas, J. B. and Goodman, C. S. (1988) 'The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product', *Cell* 52(1): 143-51.
- Cribbs, D. L., Pultz, M. A., Johnson, D., Mazzulla, M. and Kaufman, T. C. (1992) 'Structural complexity and evolutionary conservation of the *Drosophila* homeotic gene proboscipedia', *EMBO J* 11(4): 1437-49.
- Crowner, D., Le Gall, M., Gates, M. A. and Giniger, E. (2003) 'Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway', *Curr Biol* 13(11): 967-72.
- Culi, J., Aroca, P., Modolell, J. and Mann, R. S. (2006) 'jing is required for wing development and to establish the proximo-distal axis of the leg in *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 173(1): 255-66.
- Daftary, G. S. and Taylor, H. S. (2006) 'Endocrine regulation of HOX genes', *Endocr Rev* 27(4): 331-55.
- Dambly-Chaudière, C., Jamet, E., Burri, M., Bopp, D., Basler, K., Hafen, E., Dumont, N., Spielmann, P., Ghysen, A. and Noll, M. (1992) 'The paired box gene *pox neuro*: a determinant of poly-innervated sense organs in *Drosophila*', *Cell* 69(1): 159-72.
- De Graeve, F., Jagla, T., Daponte, J. P., Rickert, C., Dastugue, B., Urban, J. and Jagla, K. (2004) 'The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells', *Dev Biol* 270(1): 122-34.
- de Zulueta, P., Alexandre, E., Jacq, B. and Kerridge, S. (1994) 'Homeotic complex and teashirt genes co-operate to establish trunk segmental identities in *Drosophila*', *Development* 120(8): 2287-96.
- Deshpande, N., Dittrich, R., Technau, G. M. and Urban, J. (2001) 'Successive specification of *Drosophila* neuroblasts NB 6-4 and NB 7-3 depends on interaction of the segment polarity genes wingless, gooseberry and naked cuticle', *Development* 128(17): 3253-61.

- Diano, M., Piovant, M. (1995). Spatial expression of Amalgam in *Drosophila* mutant undwildtype embryos undlarvae. *Europ. Dros. Res. Conf.* 14 : 274.
- Diederich, R. J., Merrill, V. K., Pultz, M. A. and Kaufman, T. C. (1989) 'Isolation, structure, and expression of labial, a homeotic gene of the Antennapedia Complex involved in *Drosophila* head development', *Genes Dev* 3(3): 399-414.
- Diederich, R. J., Pattatucci, A. M. and Kaufman, T. C. (1991) 'Developmental and evolutionary implications of labial, Deformed and engrailed expression in the *Drosophila* head', *Development* 113(1): 273-81.
- DiNardo, S., Kuner, J. M., Theis, J. and O' Farrell, P. H. (1985) 'Development of embryonic pattern in *Drosophila melanogaster* as revealed by accumulation of the nuclear *engrailed* protein', *Cell* 43: 59-69.
- Dittrich, R., Bossing, T., Gould, A. P., Technau, G. M. and 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 Hucklebein', *Development* 124(13): 2515-25.
- Djiane, A., Zaessinger, S., Babaoglan, A. B. and Bray, S. J. (2014) 'Notch inhibits Yorkie activity in *Drosophila* wing discs', *PLoS One* 9(8): e106211.
- Doe, C. Q. (1992) 'Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system', *Development* 116(4): 855-63.
- Dormand, E. L. and Brand, A. H. (1998) 'Runt determines cell fates in the *Drosophila* embryonic CNS', *Development* 125(9): 1659-67.
- Doyle, H. J., Harding, K., Hoey, T. and Levine, M. (1986) 'Transcripts encoded by a homoeo box gene are restricted to dorsal tissues of *Drosophila* embryos', *Nature* 323(6083): 76-9.
- Duboule, D. and Morata, G. (1994) 'Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes', *Trends Genet* 10(10): 358-64.
- Duncan, I. (1987) 'The bithorax complex', *Annu Rev Genet* 21: 285-319.
- Ebner, A., Cabernard, C., Affolter, M. and Merabet, S. (2005) 'Recognition of distinct target sites by a unique Labial/Extradenticle/Homothorax complex', *Development* 132(7): 1591-600.
- Ekker, S. C., Jackson, D. G., von Kessler, D. P., Sun, B. I., Young, K. E. and Beachy, P. A. (1994) 'The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins', *EMBO J* 13(15): 3551-60.
- Elkins, T., Zinn, K., McAllister, L., Hoffmann, F. M. and Goodman, C. S. (1990) 'Genetic analysis of a *Drosophila* neural cell adhesion molecule: interaction of fasciclin I and Abelson tyrosine kinase mutations', *Cell* 60(4): 565-75.
- Enright, A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D. S. (2003) 'MicroRNA targets in *Drosophila*', *Genome Biol* 5(1): R1.
- Erkner, A., Gallet, A., Angelats, C., Fasano, L. and Kerridge, S. (1999) 'The role of Teashirt in proximal leg development in *Drosophila*: ectopic Teashirt expression reveals different cell behaviours in ventral and dorsal domains', *Dev Biol* 215(2): 221-32.

- Fasano, L., Roder, L., Core, N., Alexandre, E., Vola, C., Jacq, B. and Kerridge, S. (1991) 'The gene *teashirt* is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs', *Cell* 64(1): 63-79.
- Florence, B. and McGinnis, W. (1998) 'A genetic screen of the *Drosophila* X chromosome for mutations that modify *Deformed* function', *Genetics* 150(4): 1497-511.
- Foe, V. E. (1989) 'Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos', *Development* 107(1): 1-22.
- Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L. and Sanchez-Herrero, E. (2006) 'Requirement of Abdominal-A and Abdominal-B in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule', *Development* 133(1): 117-27.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H. and Levine, M. (1987) 'Characterization and localization of the *even-skipped* protein of *Drosophila*', *EMBO J* 6(3): 749-759.
- Freeman, M. R. and Doe, C. Q. (2001) 'Asymmetric Prospero localization is required to generate mixed neuronal/glial lineages in the *Drosophila* CNS', *Development* 128(20): 4103-12.
- Fremion, F., Darboux, I., Diano, M., Hipeau-Jacquotte, R., Seeger, M. A. and Piovant, M. (2000) 'Amalgam is a ligand for the transmembrane receptor neurotactin and is required for neurotactin-mediated cell adhesion and axon fasciculation in *Drosophila*', *EMBO J* 19(17): 4463-72.
- Frohnhofer, H.G., Nusslein-Volhard, C. (1986). Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene *bicoid*. *Nature* 324(6093)
- Fuerstenberg, S., Broadus, J. and Doe, C. Q. (1998a) 'Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS', *Int. J. Dev. Biol.* 42: 379-383.
- Fuerstenberg, S., Peng, C. Y., Alvarez-Ortiz, P., Hor, T. and Doe, C. Q. (1998c) 'Identification of Miranda protein domains regulating asymmetric cortical localization, cargo binding, and cortical release', *Mol Cell Neurosci* 12(6): 325-39.
- Gailite, I., Aerne, B. L. and Tapon, N. (2015) 'Differential control of Yorkie activity by LKB1/AMPK and the Hippo/Warts cascade in the central nervous system', *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(37): E5169-78.
- Gallet, A., Angelats, C., Kerridge, S. and Therond, P. P. (2000) 'Cubitus interruptus-independent transduction of the Hedgehog signal in *Drosophila*', *Development* 127(24): 5509-22.
- Gallet, A., Erkner, A., Charroux, B., Fasano, L. and Kerridge, S. (1998) 'Trunk-specific modulation of wingless signalling in *Drosophila* by *teashirt* binding to *armadillo*', *Curr Biol* 8(16): 893-902.
- Garcia-Bellido, A. (1975) 'Genetic control of wing disc development in *Drosophila*', *Ciba Found Symp* 0(29): 161-82.
- Gates, J., Mahaffey, J. P., Rogers, S. L., Emerson, M., Rogers, E. M., Sottile, S. L., Van Vactor, D., Gertler, F. B. and Peifer, M. (2007) 'Enabled plays key roles in embryonic epithelial morphogenesis in *Drosophila*', *Development* 134(11): 2027-39.
- Gaziova, I. and Bhat, K. M. (2009) 'Ancestry-independent fate specification and plasticity in the developmental timing of a typical *Drosophila* neuronal lineage', *Development* 136(2): 263-74.

- Gellon, G., Harding, K. W., McGinnis, N., Martin, M. M. and McGinnis, W. (1997) 'A genetic screen for modifiers of Deformed homeotic function identifies novel genes required for head development', *Development* 124(17): 3321-31.
- Gertler, F. B., Bennett, R. L., Clark, M. J. and Hoffmann, F. M. (1989) 'Drosophila abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled', *Cell* 58(1): 103-13.
- Gertler, F. B., Doctor, J. S. and Hoffmann, F. M. (1990) 'Genetic suppression of mutations in the Drosophila abl proto-oncogene homolog', *Science* 248(4957): 857-60.
- Gertler, F. B., Hill, K. K., Clark, M. J. and Hoffmann, F. M. (1993) 'Dosage-sensitive modifiers of Drosophila abl tyrosine kinase function: prospero, a regulator of axonal outgrowth, and disabled, a novel tyrosine kinase substrate', *Genes Dev* 7(3): 441-53.
- Gibson, G., Gehring, W.J. (1988). Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of Antennapedia during Drosophila development. *Development* 102(4): 657--675.
- Giniger, E. (1998) 'A role for Abl in Notch signaling', *Neuron* 20(4): 667-81.
- Giniger, E., Tietje, K., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994) 'lola encodes a putative transcription factor required for axon growth and guidance in Drosophila', *Development* 120(6): 1385-98.
- Gonzalez-Reyes, A. and Morata, G. (1990) 'The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products', *Cell* 61(3): 515-22.
- Govind, S. and Steward, R. (1991) 'Dorsoventral pattern formation in Drosophila: signal transduction and nuclear targeting', *Trends Genet* 7(4): 119-25.
- Graves, H. K., Woodfield, S. E., Yang, C. C., Halder, G. and Bergmann, A. (2012) 'Notch signaling activates Yorkie non-cell autonomously in Drosophila', *PLoS One* 7(6): e37615.
- Grevengoed, E. E., Fox, D. T., Gates, J. and Peifer, M. (2003) 'Balancing different types of actin polymerization at distinct sites: roles for Abelson kinase and Enabled', *J Cell Biol* 163(6): 1267-79.
- Grevengoed, E. E., Loureiro, J. J., Jesse, T. L. and Peifer, M. (2001) 'Abelson kinase regulates epithelial morphogenesis in Drosophila', *J Cell Biol* 155(7): 1185-98.
- Grier, D. G., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G. J., Halliday, H. L. and Lappin, T. R. (2005) 'The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer', *J Pathol* 205(2): 154-71.
- Gummalla, M., Maeda, R. K., Castro Alvarez, J. J., Gyurkovics, H., Singari, S., Edwards, K. A., Karch, F. and Bender, W. (2012) 'abd-A regulation by the iab-8 noncoding RNA', *PLoS Genet* 8(5): e1002720.
- Guruharsha, K. G., Rual, J. F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D. Y., Cenaj, O. et al. (2011) 'A protein complex network of Drosophila melanogaster', *Cell* 147(3): 690-703.
- Gutjahr, T., Patel, N. H., Li, X., Goodman, C. S. and Noll, M. (1993) 'Analysis of the gooseberry locus in Drosophila embryos: gooseberry determines the cuticular pattern and activates gooseberry neuro', *Development* 118(1): 21-31.

- Hafen, E., Levine, M. and Gehring, W. J. (1984) 'Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*', *Nature* 307(5948): 287-9.
- Halder, G. and Johnson, R. L. (2011) 'Hippo signaling: growth control and beyond', *Development* 138(1): 9-22.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. and Technau, G. M. (1995) 'The homeobox gene *reversed-polarity* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*', *Development* 121(2): 317-332.
- Harden, N. (2002) 'Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*', *Differentiation* 70(4-5): 181-203.
- Harding, K., Wedeen, C., McGinnis, W. and Levine, M. (1985) 'Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*', *Science* 229(4719): 1236-42.
- Harding, K. W., Gellon, G., McGinnis, N. and McGinnis, W. (1995) 'A screen for modifiers of Deformed function in *Drosophila*', *Genetics* 140(4): 1339-52.
- Harris, K. P. and Tepass, U. (2008) 'Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis', *J Cell Biol* 183(6): 1129-43.
- Hartmann, B., Hirth, F., Walldorf, U. and Reichert, H. (2000) 'Expression, regulation and function of the homeobox gene empty spiracles in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*', *Mech Dev* 90(2): 143-53.
- Harvey, K. and Tapon, N. (2007) 'The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network', *Nat Rev Cancer* 7(3): 182-91.
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M. R., Bartley, C. M., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Sestan, N. and Rakic, P. (2008) 'Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex', *Neuron* 60(2): 273-84.
- Heilig, J. S., Freeman, M., Laverty, T., Lee, K. J., Campos, A. R., Rubin, G. M. and Steller, H. (1991) 'Isolation and characterization of the disconnected gene of *Drosophila melanogaster*', *EMBO J* 10(4): 809-15.
- Henderson, K. D., Isaac, D. D. and Andrew, D. J. (1999) 'Cell fate specification in the *Drosophila* salivary gland: the integration of homeotic gene function with the DPP signaling cascade', *Dev Biol* 205(1): 10-21.
- Henkemeyer, M., West, S. R., Gertler, F. B. and Hoffmann, F. M. (1990) 'A novel tyrosine kinase-independent function of *Drosophila* abl correlates with proper subcellular localization', *Cell* 63(5): 949-60.
- Heuer, J. G., Li, K. and Kaufman, T. C. (1995) 'The *Drosophila* homeotic target gene *centrosomin* (*cnn*) encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis', *Development* 121(11): 3861-76.
- Higashijima, S., Shishido, E., Matsuzaki, M. and Saigo, K. (1996) '*eagle*, a member of the steroid receptor gene superfamily, is expressed in a subset of neuroblasts and regulates the fate of their putative progeny in the *Drosophila* CNS', *Development* 122(2): 527-36.

- Hill, K. K., Bedian, V., Juang, J. L. and Hoffmann, F. M. (1995) 'Genetic interactions between the *Drosophila* Abelson (Abl) tyrosine kinase and failed axon connections (fax), a novel protein in axon bundles', *Genetics* 141(2): 595-606.
- Hirth, F., Hartmann, B. and Reichert, H. (1998) 'Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*', *Development* 125(9): 1579-89.
- Hoey, T., Doyle, H. J., Harding, K., Wedeen, C. and Levine, M. (1986) 'Homeo box gene expression in anterior and posterior regions of the *Drosophila* embryo', *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13): 4809-13.
- Hoffmann, F. M. (1991) '*Drosophila* abl and genetic redundancy in signal transduction', *Trends Genet* 7(11-12): 351-5.
- Howell, B. W., Gertler, F. B. and Cooper, J. A. (1997) 'Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development', *EMBO J* 16(1): 121-32.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. and Pan, D. (2005) 'The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP', *Cell* 122(3): 421-34.
- Hueber, S. D., Bezdán, D., Henz, S. R., Blank, M., Wu, H. and Lohmann, I. (2007) 'Comparative analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*', *Development* 134(2): 381-92.
- Hurlbut, G. D., Kankel, M. W. and Artavanis-Tsakonas, S. (2009) 'Nodal points and complexity of Notch-Ras signal integration', *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7): 2218-23.
- Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J. B., Nabeshima, Y., Doe, C. Q. and Matsuzaki, F. (1997) 'Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions', *Nature* 390(6660): 625-9.
- Ingham, P. W. and Martinez-Arias, A. (1986) 'The correct activation of Antennapedia and bithorax complex genes requires the fushi tarazu gene', *Nature* 324(6097): 592-7.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. and Doe, C. Q. (2001) '*Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny', *Cell* 106(4): 511-21.
- Isshiki, T., Takeichi, M. and Nose, A. (1997) 'The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm', *Development* 124(16): 3099-109.
- Ito, K., Urban, J. and Technau, G. M. (1995) 'Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord', *Roux's Arch. Dev. Biol.* 204: 284-307.
- Jack, T.P., Regulski, M., McGinnis, W. (1988). Pair-rule segmentation genes regulate the expression of the homeotic selector gene, Deformed. *Genes und Dev.* 2: 635-65
- Jagla, K., Jagla, T., Heitzler, P., Dretzen, G., Bellard, F. and Bellard, M. (1997) 'ladybird, a tandem of homeobox genes that maintain late wingless expression in terminal and dorsal epidermis of the *Drosophila* embryo', *Development* 124: 91-100.
- Joshi, R., Passner, J. M., Rohs, R., Jain, R., Sosinsky, A., Crickmore, M. A., Jacob, V., Aggarwal, A. K., Honig, B. and Mann, R. S. (2007) 'Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure', *Cell* 131(3): 530-43.

- Joshi, R., Sun, L. and Mann, R. (2010) 'Dissecting the functional specificities of two Hox proteins', *Genes Dev* 24(14): 1533-45.
- Juergens, G. (1987) 'Segmental organisation of the tail region in the embryo of *Drosophila melanogaster*', *Roux's Arch Dev Biol* 196: 141-157.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. and Odenwald, W. F. (1998) 'Regulation of POU genes by *castor* and *hunchback* establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS', *Genes Dev* 12(2): 246-60.
- Kammermeier, L., Leemans, R., Hirth, F., Flister, S., Wenger, U., Walldorf, U., Gehring, W. J. and Reichert, H. (2001) 'Differential expression and function of the *Drosophila* Pax6 genes *eyeless* and *twin* of *eyeless* in embryonic central nervous system development', *Mech Dev* 103(1-2): 71-8.
- Kang, K. H. and Reichert, H. (2015) 'Control of neural stem cell self-renewal and differentiation in *Drosophila*', *Cell Tissue Res* 359(1): 33-45.
- Kannan, R., Berger, C., Myneni, S., Technau, G. M. and Shashidhara, L. S. (2010) 'Abdominal-A mediated repression of Cyclin E expression during cell-fate specification in the *Drosophila* central nervous system', *Mech Dev* 127(1-2): 137-45.
- Karcavich, R. and Doe, C. Q. (2005) '*Drosophila* neuroblast 7-3 cell lineage: a model system for studying programmed cell death, Notch/Numb signaling, and sequential specification of ganglion mother cell identity', *J Comp Neurol* 481(3): 240-51.
- Kaufman, T. C., Lewis, R. and Wakimoto, B. (1980) 'Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: The Homoeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84A-B', *Genetics* 94(1): 115-33.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. and Olsen, G. (1990) 'Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*', *Adv Genet* 27: 309-62.
- Kearney, J. B., Wheeler, S. R., Estes, P., Parente, B. and Crews, S. T. (2004) 'Gene expression profiling of the developing *Drosophila* CNS midline cells', *Dev Biol* 275(2): 473-92.
- Kellerman, K. A., Mattson, D. M. and Duncan, I. (1990) 'Mutations affecting the stability of the *fushi tarazu* protein of *Drosophila*', *Genes Dev* 4(11): 1936-50.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. (1998) 'Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that *frizzled* and *frizzled-2* Act in the WINGLESS Pathway', *Cell* 95: 1017-1026.
- Kennison, J. A. (1995) 'The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function', *Annu Rev Genet* 29: 289-303.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. and Klambt, C. (1994) 'The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS', *Cell* 78(1): 149-60.
- Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. and Lehner, C. F. (1994) 'Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation', *Cell* 77(1): 107-20.
- Kosman, D., Mizutani, C. M., Lemons, D., Cox, W. G., McGinnis, W. and Bier, E. (2004) 'Multiplex detection of RNA expression in *Drosophila* embryos', *Science* 305(5685): 846.

- Kosman, D., Small, S. and Reinitz, J. (1998) 'Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins', *Dev Genes Evol* 208(5): 290-4.
- Kurant, E., Pai, C. Y., Sharf, R., Halachmi, N., Sun, Y. H. and Salzberg, A. (1998) 'Dorsotons/homothorax, the *Drosophila* homologue of *meis1*, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS', *Development* 125(6): 1037-48.
- Kurata, S., Go, M. J., Artavanis-Tsakonas, S. and Gehring, W. J. (2000) 'Notch signaling and the determination of appendage identity', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5): 2117-22.
- Kuzina, I., Song, J. K. and Giniger, E. (2011) 'How Notch establishes longitudinal axon connections between successive segments of the *Drosophila* CNS', *Development* 138(9): 1839-49.
- Kuziora, M. A. and McGinnis, W. (1988a) 'Autoregulation of a *Drosophila* homeotic selector gene', *Cell* 55(3): 477-85.
- Kuziora, M. A. and McGinnis, W. (1988b) 'Different transcripts of the *Drosophila* Abd-B gene correlate with distinct genetic sub-functions', *EMBO J* 7(10): 3233-44.
- Lacin, H., Zhu, Y., Wilson, B. A. and Skeath, J. B. (2009) 'dbx mediates neuronal specification and differentiation through cross-repressive, lineage-specific interactions with *eve* and *hb9*', *Development* 136(19): 3257-66.
- Lamka, M. L., Boulet, A. M. and Sakonju, S. (1992) 'Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during *Drosophila* embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression', *Development* 116(4): 841-54.
- Lasky, J. L. and Wu, H. (2005) 'Notch signaling, brain development, and human disease', *Pediatr Res* 57(5 Pt 2): 104R-109R.
- Laugier, E., Yang, Z., Fasano, L., Kerridge, S. and Vola, C. (2005) 'A critical role of teashirt for patterning the ventral epidermis is masked by ectopic expression of tiptop, a paralog of teashirt in *Drosophila*', *Dev Biol* 283(2): 446-58.
- Lawrence, H. J. and Largman, C. (1992) 'Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia', *Blood* 80(10): 2445-53.
- Le Gall, M., De Mattei, C. and Giniger, E. (2008) 'Molecular separation of two signaling pathways for the receptor, Notch', *Dev Biol* 313(2): 556-67.
- Le Gall, M. and Giniger, E. (2004) 'Identification of two binding regions for the suppressor of hairless protein within the intracellular domain of *Drosophila* notch', *J Biol Chem* 279(28): 29418-26.
- Le, N. and Simon, M. A. (1998) 'Disabled is a putative adaptor protein that functions during signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase', *Mol Cell Biol* 18(8): 4844-54.
- Leal, S. M., Qian, L., Lacin, H., Bodmer, R. and Skeath, J. B. (2009) 'Neuromancer1 and Neuromancer2 regulate cell fate specification in the developing embryonic CNS of *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 325(1): 138-50.
- Lee, K. J., Freeman, M. and Steller, H. (1991) 'Expression of the disconnected gene during development of *Drosophila melanogaster*', *EMBO J* 10(4): 817-26.

- Leemans, R., Loop, T., Egger, B., He, H., Kammermeier, L., Hartmann, B., Certa, U., Reichert, H. and Hirth, F. (2001) 'Identification of candidate downstream genes for the homeodomain transcription factor Labial in *Drosophila* through oligonucleotide-array transcript imaging', *Genome Biol* 2(5): RESEARCH0015.
- Lemons, D. and McGinnis, W. (2006) 'Genomic evolution of Hox gene clusters', *Science* 313(5795): 1918-22.
- Lemons, D., Pare, A. and McGinnis, W. (2012) 'Three *Drosophila* Hox complex microRNAs do not have major effects on expression of evolutionarily conserved Hox gene targets during embryogenesis', *PLoS One* 7(2): e31365.
- Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N. and Shaul, Y. (2008) 'Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage', *Mol Cell* 29(3): 350-61.
- Lewis, E. B. (1978) 'A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*.', *Nature* 276: 565-570.
- Lewis, E. B. (1982) 'Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex', *Prog Clin Biol Res* 85 Pt A: 269-88.
- Lewis, R. A., Kaufman, T. C., Denell, R. E. and Talerico, P. (1980) 'Genetic Analysis of the Antennapedia Gene Complex (Ant-C) and Adjacent Chromosomal Regions of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. I. Polytene Chromosome Segments 84b-D', *Genetics* 95(2): 367-81.
- Li, M., Belozarov, V. E. and Cai, H. N. (2010) 'Modulation of chromatin boundary activities by nucleosome-remodeling activities in *Drosophila melanogaster*', *Mol Cell Biol* 30(4): 1067-76.
- Liebl, E. C., Forsthoefel, D. J., Franco, L. S., Sample, S. H., Hess, J. E., Cowger, J. A., Chandler, M. P., Shupert, A. M. and Seeger, M. A. (2000) 'Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding', *Neuron* 26(1): 107-18.
- Liebl, E. C., Rowe, R. G., Forsthoefel, D. J., Stammer, A. L., Schmidt, E. R., Turski, M. and Seeger, M. A. (2003) 'Interactions between the secreted protein Amalgam, its transmembrane receptor Neurotactin and the Abelson tyrosine kinase affect axon pathfinding', *Development* 130(14): 3217-26.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. (1992) 'The genome of *Drosophila melanogaster*.', *Academic Press, San Diego, CA*.
- Liu, W., Wu, J., Xiao, L., Bai, Y., Qu, A., Zheng, Z. and Yuan, Z. (2012) 'Regulation of neuronal cell death by c-Abl-Hippo/MST2 signaling pathway', *PLoS One* 7(5): e36562.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. and McGinnis, W. (2002) 'The *Drosophila* Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper', *Cell* 110(4): 457-66.
- Lundell, M. J. and Hirsh, J. (1998) 'eagle is required for the specification of serotonin neurons and other neuroblast 7-3 progeny in the *Drosophila* CNS', *Development* 125(3): 463-72.
- Lundell, M. J., Lee, H. K., Perez, E. and Chadwell, L. (2003) 'The regulation of apoptosis by Numb/Notch signaling in the serotonin lineage of *Drosophila*', *Development* 130(17): 4109-21.
- Mahaffey, J. W., Diederich, R. J. and Kaufman, T. C. (1989) 'Novel patterns of homeotic protein accumulation in the head of the *Drosophila* embryo', *Development* 105(1): 167-74.

- Mahaffey, J. W., Griswold, C. M. and Cao, Q. M. (2001) 'The *Drosophila* genes disconnected and disco-related are redundant with respect to larval head development and accumulation of mRNAs from deformed target genes', *Genetics* 157(1): 225-36.
- Mahaffey, J. W. and Kaufman, T. C. (1987) 'Distribution of the *Sex combs reduced* gene products in *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 117(1): 51-60.
- Mann, R. S. and Chan, S. K. (1996) 'Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins', *Trends Genet* 12(7): 258-62.
- Martinez-Arias, A., Ingham, P. W., Scott, M. P. and Akam, M. E. (1987) 'The spatial and temporal deployment of Dfd and Scr transcripts throughout development of *Drosophila*', *Development* 100(4): 673-83.
- Mathies, L. D., Kerridge, S. and Scott, M. P. (1994) 'Role of the teashirt gene in *Drosophila* midgut morphogenesis: secreted proteins mediate the action of homeotic genes', *Development* 120(10): 2799-809.
- Matsuzaki, M. and Saigo, K. (1996) 'hedgehog signaling independent of engrailed and wingless required for post-S1 neuroblast formation in *Drosophila* CNS', *Development* 122(11): 3567-3575.
- McCormick, A., Core, N., Kerridge, S. and Scott, M. P. (1995) 'Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the teashirt gene', *Development* 121(9): 2799-812.
- McDonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C. Q. and Mellerick, D. M. (1998) 'Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity', *Genes Dev* 12(22): 3603-12.
- McGinnis, N., Ragnhildstveit, E., Veraksa, A. and McGinnis, W. (1998) 'A cap 'n' collar protein isoform contains a selective Hox repressor function', *Development* 125(22): 4553-64.
- McGinnis, W., Jack, T., Chadwick, R., Regulski, M., Bergson, C., McGinnis, N. and Kuziora, M. A. (1990) 'Establishment and maintenance of position-specific expression of the *Drosophila* homeotic selector gene Deformed', *Adv Genet* 27: 363-402.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992) 'Homeobox genes and axial patterning', *Cell* 68(2): 283-302.
- Merrill, V. K., Diederich, R. J., Turner, F. R. and Kaufman, T. C. (1989) 'A genetic and developmental analysis of mutations in labial, a gene necessary for proper head formation in *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 135(2): 376-91.
- Merrill, V. K., Turner, F. R. and Kaufman, T. C. (1987) 'A genetic and developmental analysis of mutations in the Deformed locus in *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 122(2): 379-95.
- Mettler, U., Vogler, G. and Urban, J. (2006) 'Timing of identity: spatiotemporal regulation of *hunchback* in neuroblast lineages of *Drosophila* by Seven-up and Prospero', *Development* 133: 429-437.
- Miao, J., Wang, Z., Provencher, H., Muir, B., Dahiya, S., Carney, E., Leong, C. O., Sgroi, D. C. and Orsulic, S. (2007) 'HOXB13 promotes ovarian cancer progression', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43): 17093-8.
- Miller, D. F., Rogers, B. T., Kalkbrenner, A., Hamilton, B., Holtzman, S. L. and Kaufman, T. (2001) 'Cross-regulation of Hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo', *Mech Dev* 102(1-2): 3-16.

- Misquitta, L. and Paterson, B. M. (1999) 'Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation', *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1451-6.
- Moehring, A. J. and Mackay, T. F. (2004) 'The quantitative genetic basis of male mating behavior in *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 167(3): 1249-63.
- Mohler, J., Mahaffey, J. W., Deutsch, E. and Vani, K. (1995) 'Control of *Drosophila* head segment identity by the bZIP homeotic gene *cnc*', *Development* 121(1): 237-47.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M. (1996) 'Sternopleural is a regulatory mutation of *wingless* with both dominant and recessive effects on larval development of *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 142(4): 1147-55.
- Newsome, T. P., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A. and Dickson, B. J. (2000) 'Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*', *Cell* 101(3): 283-94.
- Noordermeer, J. N., Kopczynski, C. C., Fetter, R. D., Bland, K. S., Chen, W. Y. and Goodman, C. S. (1998) 'Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in *Drosophila*', *Neuron* 21(5): 991-1001.
- Novotny, T., Eiselt, R. and Urban, J. (2002) 'Hunchback is required for the specification of the early sublineage of NB7-3 in the *Drosophila* central nervous system.', *Development* 129: 1027-1036.
- Oh, H. and Irvine, K. D. (2008) 'In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization', *Development* 135(6): 1081-8.
- Ozkan, E., Carrillo, R. A., Eastman, C. L., Weiszmann, R., Waghay, D., Johnson, K. G., Zinn, K., Celniker, S. E. and Garcia, K. C. (2013) 'An extracellular interactome of immunoglobulin and LRR proteins reveals receptor-ligand networks', *Cell* 154(1): 228-39.
- Pallavi, S. K., Kannan, R. and Shashidhara, L. S. (2006) 'Negative regulation of Egfr/Ras pathway by Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*', *Dev Biol* 296(2): 340-52.
- Pan, D. (2010) 'The hippo signaling pathway in development and cancer', *Dev Cell* 19(4): 491-505.
- Pantalacci, S., Tapon, N. and Leopold, P. (2003) 'The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*', *Nat Cell Biol* 5(10): 921-7.
- Papagiannouli, F., Schardt, L., Grajcarek, J., Ha, N. and Lohmann, I. (2014) 'The Hox gene *Abd-B* controls stem cell niche function in the *Drosophila* testis', *Dev Cell* 28(2): 189-202.
- Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. and Goodman, C. S. (1989) 'Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates', *Cell* 58(5): 955-68.
- Pattatucci, A. M., Otteson, D. C. and Kaufman, T. C. (1991) 'A functional and structural analysis of the Sex combs reduced locus of *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 129(2): 423-41.
- Peel, A. D., Chipman, A. D. and Akam, M. (2005) 'Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm', *Nat Rev Genet* 6(12): 905-16.
- Peifer, M., Rauskolb, C., Williams, M., Riggleman, B. and Wieschaus, E. (1991) 'The segment polarity gene *armadillo* interacts with the *wingless* signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation', *Development* 111(4): 1029-43.

- Peifer, M. and Wieschaus, E. (1990) 'Mutations in the *Drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity', *Genes Dev* 4(7): 1209-23.
- Peng, H. W., Slattery, M. and Mann, R. S. (2009) 'Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA *bantam* in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc', *Genes Dev* 23(19): 2307-19.
- Percival-Smith, A., Teft, W. A. and Barta, J. L. (2005) 'Tarsus determination in *Drosophila melanogaster*', *Genome* 48(4): 712-21.
- Perrin, L., Demakova, O., Fanti, L., Kallenbach, S., Saingery, S., Mal'ceva, N. I., Pimpinelli, S., Zhimulev, I. and Pradel, J. (1998) 'Dynamics of the sub-nuclear distribution of Modulo and the regulation of position-effect variegation by nucleolus in *Drosophila*', *J Cell Sci* 111 (Pt 18): 2753-61.
- Perrin, L. and Dura, J. M. (2004) 'Molecular genetics of the Alhambra (*Drosophila* AF10) complex locus of *Drosophila*', *Mol Genet Genomics* 272(2): 156-61.
- Pinsonneault, J., Florence, B., Vaessin, H. and McGinnis, W. (1997) 'A model for *extradenticle* function as a switch that changes HOX proteins from repressors to activators', *EMBO J* 16(8): 2032-42.
- Poeck, B., Hofbauer, A. and Pflugfelder, G. O. (1993) 'Expression of the *Drosophila* *optomotor-blind* gene transcript in neuronal and glial cells of the developing nervous system', *Development* 117(3): 1017-29.
- Poulson, D. F. (1950) Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* Meigen. in M. Demerec (ed.) *Biology of Drosophila*. New York: Wiley.
- Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., Kurata, S. and Gehring, W. J. (2008) 'The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery', *Development* 135(9): 1669-79.
- Pultz, M. A., Diederich, R. J., Cribbs, D. L. and Kaufman, T. C. (1988) 'The proboscipedia locus of the Antennapedia complex: a molecular and genetic analysis', *Genes Dev* 2(7): 901-20.
- Qian, L., Liu, J. and Bodmer, R. (2005) 'Neuromancer Tbx20-related genes (H15/midline) promote cell fate specification and morphogenesis of the *Drosophila* heart', *Dev Biol* 279(2): 509-24.
- Ragone, G., Bernardoni, R. and Giangrande, A. (2001) 'A novel mode of asymmetric division identifies the fly neuroglioblast 6-4T', *Dev Biol* 235(1): 74-85.
- Raman, V., Martensen, S. A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J. and Sukumar, S. (2000) 'Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours', *Nature* 405(6789): 974-8.
- Randazzo, F. M., Cribbs, D. L. and Kaufman, T. C. (1991) 'Rescue and regulation of proboscipedia: a homeotic gene of the Antennapedia Complex', *Development* 113(1): 257-71.
- Randazzo, F. M., Seeger, M. A., Huss, C. A., Sweeney, M. A., Cecil, J. K. and Kaufman, T. C. (1993) 'Structural changes in the antennapedia complex of *Drosophila pseudoobscura*', *Genetics* 134(1): 319-30.
- Reddy, B. V. and Irvine, K. D. (2011) 'Regulation of *Drosophila* glial cell proliferation by Merlin-Hippo signaling', *Development* 138(23): 5201-12.

- Regulski, M., McGinnis, N., Chadwick, R. and McGinnis, W. (1987) 'Developmental and molecular analysis of Deformed; a homeotic gene controlling Drosophila head development', *EMBO J* 6(3): 767-77.
- Reichert, H. and Bello, B. (2010) 'Hox genes and brain development in Drosophila', *Adv Exp Med Biol* 689: 145-53.
- Reim, I. and Frasch, M. (2005) 'The Dorsocross T-box genes are key components of the regulatory network controlling early cardiogenesis in Drosophila', *Development* 132(22): 4911-25.
- Richardson, H., O'Keefe, L. V., Marty, T. and Saint, R. (1995) 'Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern formation in the Drosophila eye imaginal disc', *Development* 121(10): 3371-9.
- Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M. and Mann, R. S. (1997) 'Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein', *Cell* 91(2): 171-83.
- Riley, P. D., Carroll, S. B. and Scott, M. P. (1987) 'The expression and regulation of Sex combs reduced protein in Drosophila embryos', *Genes Dev* 1(7): 716-30.
- Robertson, L. K., Bowling, D. B., Mahaffey, J. P., Imiolczyk, B. and Mahaffey, J. W. (2004) 'An interactive network of zinc-finger proteins contributes to regionalization of the Drosophila embryo and establishes the domains of HOM-C protein function', *Development* 131(12): 2781-9.
- Robertson, L. K., Dey, B. K., Campos, A. R. and Mahaffey, J. W. (2002) 'Expression of the drosophila gene disconnected using the UAS/GAL4 system', *Genesis* 34(1-2): 103-6.
- Roder, L., Vola, C. and Kerridge, S. (1992) 'The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in Drosophila', *Development* 115(4): 1017-33.
- Rogers, B. T., Peterson, M. D. and Kaufman, T. C. (1997) 'Evolution of the insect body plan as revealed by the Sex combs reduced expression pattern', *Development* 124(1): 149-57.
- Rogulja-Ortmann, A., Luer, K., Seibert, J., Rickert, C. and Technau, G. M. (2007) 'Programmed cell death in the embryonic central nervous system of Drosophila melanogaster', *Development* 134(1): 105-16.
- Rogulja-Ortmann, A., Renner, S. and Technau, G. M. (2008) 'Antagonistic roles for *Ultrabithorax* and *Antennapedia* in regulating segment-specific apoptosis of differentiated motoneurons in the Drosophila embryonic central nervous system', *Development* 135(20): 3435-3445.
- Rogulja-Ortmann, A. and Technau, G. M. (2008) 'Multiple roles for Hox genes in segment-specific shaping of CNS lineages', *Fly (Austin)* 2(6): 316-9.
- Ruby, J. G., Stark, A., Johnston, W. K., Kellis, M., Bartel, D. P. and Lai, E. C. (2007) 'Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of Drosophila microRNAs', *Genome Res* 17(12): 1850-64.
- Rusch, D. B. and Kaufman, T. C. (2000) 'Regulation of proboscipedia in Drosophila by homeotic selector genes', *Genetics* 156(1): 183-94.
- Ryoo, H. D. and Mann, R. S. (1999) 'The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle', *Genes Dev* 13(13): 1704-16.

- Ryoo, H. D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M. and Mann, R. S. (1999) 'Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex', *Development* 126(22): 5137-48.
- Saller, E., Kelley, A. and Bienz, M. (2002) 'The transcriptional repressor Brinker antagonizes Wingless signaling', *Genes Dev* 16(14): 1828-38.
- Sanchez-Herrero, E., Casanova, J., Kerridge, S. and Morata, G. (1985a) 'Anatomy and function of the bithorax complex of *Drosophila*', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50: 165-72.
- Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. and Morata, G. (1985b) 'Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex', *Nature* 313(5998): 108-13.
- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q. (1999) 'Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets', *Development* 126(21): 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and 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(2): 186-204.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G. (2007) 'Genome regulation by polycomb and trithorax proteins', *Cell* 128(4): 735-45.
- Seeger, M. A., Haffley, L. and Kaufman, T. C. (1988) 'Characterization of amalgam: a member of the immunoglobulin superfamily from *Drosophila*', *Cell* 55(4): 589-600.
- Seibert, J., Volland, D. and Urbach, R. (2009) 'Ems and Nkx6 are central regulators in dorsoventral patterning of the *Drosophila* brain', *Development* 136(23): 3937-47.
- Shah, N. and Sukumar, S. (2010) 'The Hox genes and their roles in oncogenesis', *Nat Rev Cancer* 10(5): 361-71.
- Shanower, G. A., Muller, M., Blanton, J. L., Honti, V., Gyurkovics, H. and Schedl, P. (2005) 'Characterization of the grappa gene, the *Drosophila* histone H3 lysine 79 methyltransferase', *Genetics* 169(1): 173-84.
- Shen, C. P., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1997) 'Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*', *Cell* 90(3): 449-58.
- Shimell, M. J., Simon, J., Bender, W. and O'Connor, M. B. (1994) 'Enhancer point mutation results in a homeotic transformation in *Drosophila*', *Science* 264(5161): 968-71.
- Singh, A., Kango-Singh, M., Choi, K. W. and Sun, Y. H. (2004) 'Dorso-ventral asymmetric functions of teashirt in *Drosophila* eye development depend on spatial cues provided by early DV patterning genes', *Mech Dev* 121(4): 365-70.
- Sirvent, A., Benistant, C. and Roche, S. (2008) 'Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells', *Biol Cell* 100(11): 617-31.
- Skeath, J. B. (1999) 'At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system', *Bioessays* 21(11): 922-31.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B. (1994) 'The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system', *FASEB J* 8(10): 714-21.

- Smith, J.A., Liebl, E.C. (2005). Identification of the molecular lesions in alleles of the Drosophila Abelson tyrosine kinase. *D.I.S.* 88:20--22
- Song, J. K. and Giniger, E. (2011) 'Noncanonical Notch function in motor axon guidance is mediated by Rac GTPase and the GEF1 domain of Trio', *Dev Dyn* 240(2): 324-32.
- Song, J. K., Kannan, R., Merdes, G., Singh, J., Mlodzik, M. and Giniger, E. (2010) 'Disabled is a bona fide component of the Abl signaling network', *Development* 137(21): 3719-27.
- Speicher, S., Garcia-Alonso, L., Carmena, A., Martin-Bermudo, M. D., de la Escalera, S. and Jimenez, F. (1998) 'Neurotactin functions in concert with other identified CAMs in growth cone guidance in Drosophila', *Neuron* 20(2): 221-33.
- Spencer, F. A., Hoffmann, F. M. and Gelbart, W. M. (1982) 'Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in Drosophila melanogaster', *Cell* 28(3): 451-61.
- St Johnston, D. and Nusslein-Volhard, C. (1992) 'The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo', *Cell* 68(2): 201-19.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003) 'Identification of Drosophila MicroRNA targets', *PLoS Biol* 1(3): E60.
- Steller, H., Fischbach, K. F. and Rubin, G. M. (1987) 'Disconnected: a locus required for neuronal pathway formation in the visual system of Drosophila', *Cell* 50(7): 1139-53.
- Stevens, N. R., Raposo, A. A., Basto, R., St Johnston, D. and Raff, J. W. (2007) 'From stem cell to embryo without centrioles', *Curr Biol* 17(17): 1498-503.
- Stevens, T. L., Rogers, E. M., Koontz, L. M., Fox, D. T., Homem, C. C., Nowotarski, S. H., Artabazon, N. B. and Peifer, M. (2008) 'Using Bcr-Abl to examine mechanisms by which abl kinase regulates morphogenesis in Drosophila', *Mol Biol Cell* 19(1): 378-93.
- Stobe, P., Stein, M. A., Habring-Muller, A., Bezdan, D., Fuchs, A. L., Hueber, S. D., Wu, H. and Lohmann, I. (2009) 'Multifactorial regulation of a hox target gene', *PLoS Genet* 5(3): e1000412.
- Struhl, G. (1982) 'Genes controlling segmental specification in the Drosophila thorax', *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(23): 7380-4.
- Struhl, G. and White, R. A. (1985) 'Regulation of the Ultrabithorax gene of Drosophila by other bithorax complex genes', *Cell* 43(2 Pt 1): 507-19.
- Taghli-Lamalle, O., Gallet, A., Leroy, F., Malapert, P., Vola, C., Kerridge, S. and Fasano, L. (2007) 'Direct interaction between Teashirt and Sex combs reduced proteins, via Tsh's acidic domain, is essential for specifying the identity of the prothorax in Drosophila', *Dev Biol* 307(1): 142-51.
- Taniguchi, Y. (2014) 'Hox transcription factors: modulators of cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion', *Biomed Res Int* 2014: 591374.
- Taylor, D. C., Falconer, M. A., Bruton, C. J. and Corsellis, J. A. (1971) 'Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy', *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34(4): 369-87.
- Technau, G. M. (2008) 'Advances in Experimental Medicine and Biology. Brain development in Drosophila melanogaster. Preface', *Adv Exp Med Biol* 628: v-vi.
- Technau, G. M., Berger, C. and Urbach, R. (2006) 'Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of Drosophila', *Dev Dyn* 235(4): 861-9.

- Technau, G. M. and Campos-Ortega, J. A. (1987) 'Cell autonomy of expression of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(13): 4500-4.
- Thompson, B. J. and Cohen, S. M. (2006) 'The Hippo pathway regulates the bantam microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*', *Cell* 126(4): 767-74.
- Tsuji, T., Hasegawa, E. and Isshiki, T. (2008) 'Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors', *Development* 135(23): 3859-69.
- Udolph, G., Rath, P. and Chia, W. (2001) 'A requirement for Notch in the genesis of a subset of glial cells in the *Drosophila* embryonic central nervous system which arise through asymmetric divisions', *Development* 128(8): 1457-66.
- Umemiya, T., Takeichi, M. and Nose, A. (1997) 'M-spondin, a novel ECM protein highly homologous to vertebrate F-spondin, is localized at the muscle attachment sites in the *Drosophila* embryo', *Dev Biol* 186(2): 165-76.
- Umesono, Y., Hiromi, Y. and Hotta, Y. (2002) 'Context-dependent utilization of Notch activity in *Drosophila* glial determination', *Development* 129(10): 2391-9.
- Urbach, R., Jussen, D. and Technau, G. M. (2016) 'Gene expression profiles uncover individual identities of gnathal neuroblasts and serial homologies in the embryonic CNS of *Drosophila*', *Development* 143(8): 1290-301.
- Urbach, R. and Technau, G. M. (2003a) 'Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*', *Development* 130(16): 3621-37.
- Urbach, R. and Technau, G. M. (2003b) 'Segment polarity and DV patterning gene expression reveals segmental organization of the *Drosophila* brain', *Development* 130: 3607-3620.
- Urbach, R. and Technau, G. M. (2004) 'Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*', *Bioessays* 26(7): 739-51.
- Urbach, R. and Technau, G. M. (2008) 'Dorsoventral patterning of the brain: a comparative approach', *Adv Exp Med Biol* 628: 42-56.
- Van De Bor, V. and Giangrande, A. (2001) 'Notch signaling represses the glial fate in fly PNS', *Development* 128(8): 1381-90.
- Van Etten, R. A. (1999) 'Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl', *Trends Cell Biol* 9(5): 179-86.
- Veraksa, A., McGinnis, N., Li, X., Mohler, J. and McGinnis, W. (2000) 'Cap 'n' collar B cooperates with a small Maf subunit to specify pharyngeal development and suppress deformed homeotic function in the *Drosophila* head', *Development* 127(18): 4023-37.
- Von Ohlen, T., Moses, C. and Poulson, W. (2009) 'Ind represses msh expression in the intermediate column of the *Drosophila* neuroectoderm, through direct interaction with upstream regulatory DNA', *Dev Dyn* 238(11): 2735-44.
- Wadsworth, S. C., Vincent, W. S., 3rd and Bilodeau-Wentworth, D. (1985) 'A *Drosophila* genomic sequence with homology to human epidermal growth factor receptor', *Nature* 314(6007): 178-80.

- Wakimoto, B. T., Turner, F. R. and Kaufman, T. C. (1984) 'Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 102(1): 147-72.
- Walldorf, U. and Gehring, W. J. (1992) '*Empty spiracles*, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development', *EMBO J* 11(6): 2247-2259.
- Waltzer, L., Vandel, L. and Bienz, M. (2001) 'Teashirt is required for transcriptional repression mediated by high Wingless levels', *EMBO J* 20(1-2): 137-45.
- Wang, B. B., Muller-Immergluck, M. M., Austin, J., Robinson, N. T., Chisholm, A. and Kenyon, C. (1993) 'A homeotic gene cluster patterns the anteroposterior body axis of *C. elegans*', *Cell* 74(1): 29-42.
- Wang, J. Y. (2000) 'Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase', *Oncogene* 19(49): 5643-50.
- Wang, W., Tindell, N., Yan, S. and Yoder, J. H. (2013) 'Homeotic functions of the Teashirt transcription factor during adult *Drosophila* development', *Biol Open* 2(1): 18-29.
- Wasik, B. R., Rose, D. J. and Moczek, A. P. (2010) 'Beetle horns are regulated by the Hox gene, *Sex combs reduced*, in a species- and sex-specific manner', *Evol Dev* 12(4): 353-62.
- Wedeen, C., Harding, K. and Levine, M. (1986) 'Spatial regulation of Antennapedia and bithorax gene expression by the Polycomb locus in *Drosophila*', *Cell* 44(5): 739-48.
- Weiss, J. B., Von Ohlen, T., Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. and Scott, M. P. (1998) 'Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *intermediate neuroblasts defective* homeobox gene specifies intermediate column identity', *Genes Dev* 12(22): 3591-602.
- Wharton, K. A., Cook, J. M., Torres-Schumann, S., de Castro, K., Borod, E. and Phillips, D. A. (1999) 'Genetic analysis of the bone morphogenetic protein-related gene, *gbb*, identifies multiple requirements during *Drosophila* development', *Genetics* 152(2): 629-40.
- Wheeler, S. R., Kearney, J. B., Guardiola, A. R. and Crews, S. T. (2006) 'Single-cell mapping of neural and glial gene expression in the developing *Drosophila* CNS midline cells', *Dev Biol* 294(2): 509-24.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994) 'Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*', *Science* 264(5159): 677-83.
- White, R. A. and Wilcox, M. (1984) 'Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*', *Cell* 39(1): 163-71.
- Wieschaus, E., Nusslein-Volhard, C., Jurgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Roux Arch. Dev. Biol.* 193: 296—307
- Wirz, J., Fessler, L. I. and Gehring, W. J. (1986) 'Localization of the Antennapedia protein in *Drosophila* embryos and imaginal discs', *EMBO J* 5(12): 3327-34.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E. (2000) '*Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts', *J Cell Biol* 150(6): 1361-74.
- Wu, J. and Cohen, S. M. (1999) 'Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less', *Development* 126(1): 109-17.

- Wu, J. and Cohen, S. M. (2000) 'Proximal distal axis formation in the Drosophila leg: distinct functions of *teashirt* and *homothorax* in the proximal leg', *Mech Dev* 94(1-2): 47-56.
- Xiong, W., Morillo, S. A. and Rebay, I. (2013) 'The Abelson tyrosine kinase regulates Notch endocytosis and signaling to maintain neuronal cell fate in Drosophila photoreceptors', *Development* 140(1): 176-84.
- Yao, L. C., Liaw, G. J., Pai, C. Y. and Sun, Y. H. (1999) 'A common mechanism for antenna-to-Leg transformation in Drosophila: suppression of *homothorax* transcription by four HOM-C genes', *Dev Biol* 211(2): 268-76.
- Yasin, S. A., Latak, K., Becherini, F., Ganapathi, A., Miller, K., Campos, O., Picker, S. R., Bier, N., Smith, M., Thom, M. et al. (2010) 'Balloon cells in human cortical dysplasia and tuberous sclerosis: isolation of a pathological progenitor-like cell', *Acta Neuropathol* 120(1): 85-96.
- Yekta, S., Tabin, C. J. and Bartel, D. P. (2008) 'MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence', *Nat Rev Genet* 9(10): 789-96.
- Zeev-Ben-Mordehai, T., Mylonas, E., Paz, A., Peleg, Y., Toker, L., Silman, I., Svergun, D. I. and Sussman, J. L. (2009a) 'The quaternary structure of *amalgam*, a Drosophila neuronal adhesion protein, explains its dual adhesion properties', *Biophys J* 97(8): 2316-26.
- Zeev-Ben-Mordehai, T., Paz, A., Peleg, Y., Toker, L., Wolf, S. G., Rydberg, E. H., Sussman, J. L. and Silman, I. (2009b) '*Amalgam*, an axon guidance Drosophila adhesion protein belonging to the immunoglobulin superfamily: over-expression, purification and biophysical characterization', *Protein Expr Purif* 63(2): 147-57.
- Zhai, Z., Fuchs, A. L. and Lohmann, I. (2009) 'Cellular analysis of newly identified Hox downstream genes in Drosophila', *Eur J Cell Biol* 89(2-3): 273-8.
- Zhang, Y., Ungar, A., Fresquez, C. and Holmgren, R. (1994) 'Ectopic expression of either the *Drosophila gooseberry-distal* or *proximal* gene causes alterations of cell fate in the epidermis and central nervous system', *Development* 120: 1151-1161.
- Zhao, B., Tumaneng, K. and Guan, K. L. (2011) 'The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal', *Nat Cell Biol* 13(8): 877-83.
- Zhou, L., Hashimi, H., Schwartz, L. M. and Nambu, J. R. (1995) 'Programmed cell death in the Drosophila central nervous system midline', *Curr Biol* 5(7): 784-90.
- Zhu, Z. and Bhat, K. M. (2011) 'The Drosophila Hem/Kette/Nap1 protein regulates asymmetric division of neural precursor cells by regulating localization of *Inscuteable* and *Numb*', *Mech Dev* 128(7-10): 483-95.
- zur Lage, P. I. and Jarman, A. P. (2010) 'The function and regulation of the bHLH gene, *cato*, in Drosophila neurogenesis', *BMC Dev Biol* 10: 34.

7. Anhang

7.1. Bindestellen-Analyse in der kodierenden Sequenz von Amalgam und der regulatorischen Sequenz 3 kb upstream von *Drosophila melanogaster* und Vergleich der Sequenzen mit *D. pseudoobscura* und *D. simulans*.

Das Dokument wurde in Zusammenarbeit mit Christian Berger erstellt. Die Genomsequenz von Ama ist in unterschiedlicher Farbcodierung angegeben:

schwarze Basen sind in allen *Drosophila* Spezies konserviert

rote Basen sind in allen Spezies mit Ausnahme von *Drosophila pseudoobscura* vorhanden

grüne Basen sind in allen Spezies mit Ausnahme von *Drosophila simulans* vorhanden

gelb unterlegt sind die codierenden Regionen von Ama

Folgende Bindemotive wurden analysiert, sie sind in der genomischen Sequenz mit entsprechender Farbmarkierung gekennzeichnet:

XXX Exd/Dfd TGATTAATGG (TG) (TA)

TCATTA ATCA

XXX Exd/Lab TGATGGATGG

TGATGCATTG

TGATCAATTA

XXX Scr ATTAATG ebenso Dfd.

XXX Antp CATTAGAG

CAATTACA

GCGAAGAGATGTAGAGATGgCACAAATTGGCGGCCcTcCCTCGATGTTCaTTCTTTTGAGTAATTTaAAAAATCAAT 75
 AAgCGTCTAcaATAcATTTtAGAcAaATatTTggacaTTTTATTTTAAATGTTtGCCTCTaATTTAAAAGTTtt 150
 TAaTCGAACAGTACGGCAaAGTCGCaAaCcGatTgAGTgCAGcAGcGTtTTCaCCAGgGGGCGtgaagAgAcAGCA 225
 gTagaGAGCCCCCTGTCGGGcTGtATTGaAAGGTTGTGCTCaCTGACaAAAGGTGAAtGTTCTAAaacGTCGgAG 300
 GTTTATTTATTtGtAGAgATTTGCATTGAGaTAATAATAAAaaaAAAGCTTGaATATTgTAACAAaTAAGTAGA 375
 aCCAATTAAAcTTaaactCTTTGctCTGtTtGGAACTTCATAATAtTaACAttTAAttAAcAAAcAGGCAcCcCA 450
 AATtTAGGAATcAATTtagacAAGTgTCGAAcCTTAAcTtTgaATTTTTgTAAATAtATAATcTAAATcTGCTcC 525
 AGTCcagttccagCCTGAATTGAACAAAATGTGCACCTTTGTAGTTTATTcTGTTACATACTTcCGCTATTaataac 600
 tacattattcaatcttaGTATCGCgagatatataaggacttGGGACAAAGAATAAGGATGgTGGAGaTCgAGTTT 675
 GTTTTtCCAAatgATCTCaAACGgCTAcgTACGAAAGAAAATATCATATAATCGTTtGTAAgAcAGCaTATAGT 750
 gcttgctatatgTACCTGttaGGCAGTGCATTATAAAATgTATtagAAgAATAAaAGGTAAcCAGTTGTGCGAGTT 825
 AaTTAgCTgtAGCGTTCgATTCTTTTgTtaATTTTTtttaagttggttctactcatttcTGATgTTAAGCTAGGAT 900
 TGGCaATTATTAttTtCAGGCTcATATTTGGAAAATTCGATATGTTTAGCGTtgAAGAATATTGTgtaaatatc 975
 tACAAgCATTAAAGTTGCTCAGTGCATTGcCCcAAGCTTTAAcATTTTAAAACACACCCAACGAGCCAGTTGACCT 1050
 TTAAGCAAGTGTcCAAGGCCTTAAGTGAATATTTTcTAAATGACATTgCCaAATAATGTCGTTGTTGCTTTT 1125
 GGGATcTGGCAAGGAGCTGTTGcCTGTTGcCGGGCCTTTGCTGCTTCTGCCGCTGCCAACTGGCAACAAAAGTCAA 1200
 TTCACAGAcACTCCAGTCGACGGAGTCCGAGTGCAGCAAAAGGCAACAAAATACGtTCGCATAGGCAAAGCCC 1275
 AAGGATACACACAAAGGTACAGTGGTTgCTCTGACTACAATAACAAATTAACAGGgcccagagctttaataccaa 1350
 Ttcgataaccattgcaacaacagcatttcaaagctacttttttatatcagataaagataggtagaaaaggctata 1425
 Tttacgttaaaggaagctgatatttttagaaatttatcaaaaaaaaattaattactttgacacataatattgt 1500
 attagtcatctgactagaaactagaaatctctgaatgtaacgaagttctgtgcattcttacAAATaTTAcAAAA 1575
 AGTATcgtctagaTACCACTGTGCGGAACtGGGCCACAAATTCAGcACGCAGTGTGTGACAAAGGACTTCTCCCTT 1650
 CCCCCTCGGGACCCCTGAATGCTGAATGCCCGGTGTGTGCCGCTGCTGAAGCGAAACACCCAAGAGTCACTG 1725
 ACAGAAACAGGATTcGGGTAATAAAATACAAAATTTGACATTTCTGTTTTGGATCCGCTTGCCTcCAATGCGA 1800
 GCGGCAGCCCTCTCTGTCGCACGCCGTCTAGCCGTCtCTTTCTGTTCCGTTTCGGTGTGTGTCCAGTTCCGGTCGGG 1875
 CCAAGTCGAGCGTTGCATGAAGCAGCCGGACCTGCCAGGACCTGGACCAGGACCTGAACCTGCATCCAAgAGGCA 1950
 TCGCCGCAATGGTCATAATGACGCTGCCGGGATGCAGCTGAGGCaCAAGGAGAGCCGtCaGTGGgcAGCGaGAAAG 2025
 GGACGGAAATAGAAGCGCCCTATGCGGTCCGttGATAGTTAACTGGAAATTTATTATTTTACACAATTTACAATTA 2100
 TCTGATTCGAATGTGCACTCAGcGACGAGGATTCGGCAGATGGGcAGTACGAGTGAGAGTGGGGggTCCaAGt 2175
 TCGGACGACAGATGCAGTTGtcCTCCATGGGAACGGCCTCATTTCAGCAGAAGTACCcAAACGATTTAAGATG 2250
 TGATTTAATTTCCAGAAACTGTGGCCATAGTTTCGTCGCTCTTCGGGGGAATTTCTTCGCCACACAGACAGCGT 2325
 CGTCATCAATCATCTcGCAGAGTAAAGCCGGTTAACCTCGATGGGTTTTAGGGGGAaACTTGGCCCGGGGCTGA 2400
 TCAGGAaTCaGGCTGGAATATGAAAATTAATGCGTTTGGGCaGCAGAAAGTTTTCGAATGGTTCCGGTGTATT 2475
 ACAACAAGTGAAaTTTtgCAcATcAAaCGgcccTTTGACCACaTTTAATCcTTAAATCAtCTgCCATAGgAACTAA 2550
 TTGATCGAGATCCAGACAcATAtAAAcATcAATATAtATacacaAATATAATCAAtATAgAaCTATGTTATAT 2625
 TTcgacgtttcctatcctcgtatgctgtGAGTACACATATTAACCtTCAGCCGTgTAAAGAAATTTCTAcGAACA 2700

GCCAAGTTAAAGGTacCCAAATTTCCCGAATaCTGCTCTTAAATATCC TTCAGAA TTCCAGCATGGCTGAA C 2775

CAGGACTCGATTCAAGTtCCACCCAATGCCTTGTaCACACCCCgTTGTTTTGCTTTTCGGCATGCGCCCT 2850

GCTCCGGCGCAAAAGAGACAGCACTAA tGAGACGGCGCTGGGATCGTGGCATTCCA GAGCGGctAGGATATTC 2925

CAGGGACCGCTCGTaaTCGTTGCTGTTGTTGTTAGCCGCCAGCGGAAAGTAGtGCGCCATGCCATAAATCACACA 3000

AATGGGTAGAGTTC CAACTTTCCACCCcGCCGtGCTCCTTTaTTGTCTTCCACGAACCCC GAACGTTTA T 3075

GGCCAAATGGCGGCACgAATTTGAATTTGAATTTGCGACGCGGTCTCTCAGTTCGCCTGCGGCCGCTTTTCGCTGG 3150

CGCTTTGTTTTTTC AACTGACCCTTATCTTGGGGCGGGGGCTGTCAAGTGGGcgGGCAGGaGGCCA cAGGCA 3225

GAGGCA tAAAc aCAGCAGCGAGCAGCAAACAAATCAATTAAGACCAGAAGGAAAGTGCATTGATAA CTGAGC 3300

CCGAAGTCAAAC TACGCACAAGTAAACAATTTAAATACGAaCTaAAATGCAAACACAGATACAAAATACAGATA 3375

GAGATACTGAACAAACACAGATACAAATACTGTGAAGCGACAA tGTACATAACCGAGGGGTGATAAGATCCAAA 3450

ACGTCGATGACTTCTTCATCGGCAATACACTGAAAAAGCTGtTACTaATTATTAaAAATATGcAAATAATA 3525

AAAGGTAAAcTATTTTTtttactaaattttaactatttactaaactgcCATTATAAATCTTTTTTACATC c 3600

TTAACTACAaAAAAAtAA tTTAAATCAAATGATtCGTTTACCTGgCTATTCatTaaaAAAAAAAAtAAGTA 3675

tTGATATATCgGAAACtAAGTTATCTccgTTTTTaccAGTGTATCcATTAaGAAGCAACGTTGTCTAGACACAG 3750

CCGCGGTAATCAATCATAATGgTGTCTATCTGCTCATCTCGCGGTGTACAAATTTCCGGACTTTCCTTGAGAA 3825

ACCGAGCCaTCGACGTCGGCGCGTCAGGAAGAATACaAAAA tAAGAACcCGATTCTCAGaCCTCAGCAGAGATA 3900

CGGATTTTTGAGCCGAGCTCGGTCGCCCTTTCAATTCAGTCGAGTCCCGAACGGAAGTGAAGCGCATTGAACC 3975

CACAttgactgaGAGATAGTCGAGGAAAAGAGTCACAAAATCAACAGCAACATCCTGTAATAAACAGAAA tG 4050

TATGAATTATATTAATAAGACGATAAAgCTGAaAAGTGTGaCaAGCcTTATAAATGTTTCAAACGAGTGTG 4125

TGTGCAGAATTCCTTCcttcttatttacttttgaagatactttTAAAGATATACTTGTGAcCTtAAATTATTA 4200

TTCTATAaTTGAACcTAGTTTTAGTTTTATTATATGAATTCGAAGATGGGTtAAAaatgGCAGTTCTCATTACA 4275

TACGAAATATTTAGAATGGCTAAcGCGATCAAAGACTCAACATAAAGTGATACACTaaTAAATCTCAAATCTAT 4350

TTTGATTTCTTACAGACCAGACATGGCGCGTCTGCGGCTTCtAATCGGTCTTATA tCTGCCTTGGCATCAGC tT 4425

GGAtTCGGTGCTTgTGCCCCAGTGATCAGCCAaATCAcCAAGGACGTGGTGCCAGTGTGGGCGACTCTGTGGA 4500

GTTCACTGCACcGTGGAGGAGGTGGGgCAGCTCTCGGTGAGgTGGGCCAAGCGTCCCAGCGAGTCGGACACCAA 4575

CTCGGTGGTGCTCTCCATGCGGAATATcCTCAGTCTGCCGAcCAGCGcTACAACGTgACGGTcACCGgAGGACC 4650

CAAGAcGGAAcTGCCATtTAcACTTCCGCATTCAGAACATCGAAGTCAGTGAcATGGGTCCGTACGAGTGcCA 4725

GGTGCTgGTTTCGGCCACGGAGAAGGTcACCAAGAAGCTGAGcCTGCAGATCAAGACCCCGCCGGTGATTGCGGA 4800

GAAcACCCCAAGAGcACCCTGGTGACgGAGGgCAcAATCTGGAGCTGACcTGCCATGCCAATGGcTTTCCCAA 4875

GCCtAcGATcCTTGGGCCCGGAGcATAATGCgGTGATGCCgGCCGGgGCCATTGCTGGCgGAACcACTCT 4950

CCGATTCGTCcCGTGACCGcATGGATCGCGGcGGCTACTACTGcATCGCGcAGAAcGGAGAGGGCCAGCCGGA 5025

CAAGAGGTTCATCCGGTCTGAaGTGGAGTTCGTCCcCAGATTGCCGTcCAGAGcCCCAAGATCGCCCAcATGcT 5100

GTCCCAcTCGcGGAGcTGGAGTGCTCCGTcCAGGGCTACCCGcCTCCGACTGTAGTTTGGCACAGAAcGGcGT 5175

GCCCTGCAGTCTAGCCGCAcCAGAGGTGGCCAACACcGCCTCTCCTCGGGAACcACAACcCTGTGTGCTGCG 5250

CATCGAcAGcGTGcGCGAGGAGACTTgGGGACTACTACTGCAATGCCACCAATAGCTGGGgCACGCCGATGC 5325

CCGACTcCATCTCTCCAGAcGTCATcCCAGTGCCCTCCTcTCGTAATAGCCCTCAACGTCTGATTTCCATT 5400

Anhang

CCCACGCAACAAGACTGGAACCTCACTTTcCCTCTCGtCTCGCTTTTTCGGCAATTCGCCAGTCCGGATGCGG 5475

tCTGTGTTTATATTATTAATGATTCATTCAATTA GCTCCATT CAGACTTCATTATTTTCGGACACACTTGAGAT 5550

CGAGCCACCGCTTGTGCCTTATGAATTTGCTCTGCATCCGTGGCTtGTGCAAAACAACATTAATATGCTTAAG 5625

TAATAAAcGTTCTCTGATAAAgTTTAATCGGTCTTTTCCTATGTGGTTGGGTGGCTTGTATACGGtGTAAGTTA 5700

aATACCAtgAGAgAATAAAcACCTCTTgaAGCaACgaatTAAAGGGTTGTGCATTCAATAAAACTAAGCcAGGAG 5775

AcAAGgCATTGtCAAAAGT 5850

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1.: Neuroblastenkarte mit Markerkombinationen nach Doe 1992 und Broadus und Doe 1995.	4
Abb. 1-2.: Ausdifferenzierung von segmentalen Identitäten des Neuroblasten 6-4 aus der ventralen neurogenen Region des <i>Drosophila</i> Embryo.	5
Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Expressionsdomänen von <i>Antennapedia</i> - und <i>Bithorax</i> -Komplex Genen im WT im NB6-4 mit segmentalen Zelllinienidentitäten des NB6-4.	9
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der gnathalen Identitäten des NB6-4 im WT und bei Veränderung von <i>Antennapedia</i> -Komplex Gen Funktionen.	10
Abb. 2-1: Ektopische Expression mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems nach Brand und Perrimon (1993).	20
Abb. 3-1: Das gnathale Eagle Expressionsmuster in St11 im WT.	45
Abb. 3-2.: Markerexpressionsanalyse im gnathalen NB3-3.	47
Abb. 3-3.: Gnathale NB6-4 Linien.	48
Abb. 3-4.: <i>gcm</i> mRNA und Pros werden symmetrisch auf maxillare NB6-4 Nachkommenzellen verteilt.	49
Abb. 3-5: Engrailed und Gooseberry positive Neuroblasten des Maxillar- und Mandibularsegments.	51
Abb. 3-6: Im Mandibularsegment tritt keine Expression von Eg an Position eines möglichen NB6-4 auf.	52
Abb. 3-7: Gnathale NB7-3 Zelllinien.	54
Abb. 3-8: Eg Expression im WT ab St12 in zusätzlichen Zellclustern.	55
Abb. 3-9: Markerexpression für die Identifikation Eg positiver NB5-3 Nachkommenzellen.	56
Abb. 3-10: Lbe Expression in Gsb-negativen medial gelegenen Zellen in den Segmenten Lab bis T2.	57
Abb. 3-11: Expression von Dbx in den Eg positiven Nachkommenzellen der gnathalen NB5-3.	58
Abb. 3-12: Markeranalyse zur Identitätsbestimmung der Eg positiven MNB Nachkommenzellen des Mandibular- und Maxillarsegments.	59
Abb. 3-13: Darstellung der zeitlichen Veränderungen des gnathalen Eg Expressionsmusters.	61
Abb. 3-14: Dpn Expression in den Eg positiven Zelllinien im St14.	63
Abb. 3-15: Dpn positive Zellen in St14 sind keine Vorläuferzellen sensorischer Organe.	64
Abb. 3-16: Markeranalysen für die Bestimmung der Identitäten der ab St14 Eg positiv werdenden Neuroblastenlinien der gnathalen Segmente.	66
Abb. 3-17: Weitere Identitätsbestimmung und Lagebestimmung von NB6-2max.	68
Abb. 3-18.: Eagle Expression in Zellen des Tritocerebrum und des Deutocerebrum.	70
Abb. 3-19: Identifikation eines fünften Eg positiven Neuroblasten in allen drei thorakalen Segmenten.	71

Abb. 3-20: Weitere Differenzierung von NB3-3 und dem fünften Eg positiven Neuroblasten.	72
Abb. 3-21: Markeranalyse zur Bestimmung der Identität des fünften Eg positiven NB als NB3-2.	73
Abb. 3-22: Analyse des Projektionsmusters des Eg positiven Anteils des thorakalen NB3-2.	74
Abb. 3-23: Segmentale Identitäten der gnathalen NB3-3 sind von Hoxgenfunktion abhängig.	77
Abb. 3-24: Dfd besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.	79
Abb. 3-25: Gnathale segmentale Identitäten des NB7-3 sind von den Funktionen der Hoxgene abhängig.	80
Abb. 3-26: Abhängigkeit der Eg Expression in den spät Eg positiven Neuroblastenlinien von <i>Dfd</i> Funktion.	82
Abb. 3-27: Die Expression von Eg in thorakalen und abdominalen NB5-3 Nachkommenzellen wird durch die Funktion von Tsh verhindert.	83
Abb. 3-28: Funktionsverlust von <i>CycE</i> führt zum Verlust von Neuronen des labialen NB6-4 und zu verringerter Zellzahl.	85
Abb. 3-29: Ektopische Expression von <i>Dfd</i> , <i>Dfd</i> gemeinsam mit <i>CycE</i> und von <i>CycE</i> .	86
Abb. 3-30: <i>CycE</i> mRNA Expression im maxillaren und labialen NB6-4 im WT.	88
Abb. 3-31: Western Blot zum Test der primären und sekundären Antikörper.	89
Abb. 3-32: IP von AbdA, Dfd und CycE als Kontrolle mit Antikörperfärbung gegen das jeweilige gleiche Protein.	90
Abb. 3-33: IP von Dfd mit CycE und AbdA mit CycE zur Überprüfung von Protein-Protein Interaktion von CycE und Dfd, sowie CycE und AbdA.	91
Abb. 3-34: Transformationen des maxillaren NB6-4 in <i>Antp</i> -K Mutanten.	93
Abb. 3-35: Vermessung der wildtypischen Expressionsdomänen der <i>Antp</i> -K Gene im frühen Neuroektoderm.	96
Abb. 3-36.: Wildtypische Expression von <i>lab</i> und <i>Dfd</i> mRNA und Protein ist weitestgehend voneinander getrennt.	98
Abb. 3-37: Expressionsdomänen der jeweiligen <i>Antp</i> -K Gene bleiben bei Hoxgen-Funktionsverlust im Wesentlichen in ihren wildtypischen Grenzen erhalten.	101
Abb. 3-38: Expression von Scr oder Dfd Protein und <i>Scr</i> mRNA in <i>Dfd</i> ¹⁶ oder <i>Scr</i> ¹⁷ Mutanten.	102
Abb. 3-39: Auswirkungen von <i>wg</i> Funktionsverlust auf NB6-4max.	113
Abb. 3-40: Wildtypische Expression von Hd und Phänotyp von Funktionsverlust von <i>hd</i> auf NB6-4.	114
Abb. 3-41: Wildtypische Expression von Tsh im Vergleich zu Antp und Tio Expression.	117

Abb. 3-42: Analyse der Expression von Tsh im NB6-4.	118
Abb. 3-43: Tsh Funktion ist für die wildtypische segmentale Identität des labialen und thorakalen NB6-4 entscheidend.	119
Abb. 3-44: Tsh Expression breitet sich bei <i>Antp</i> -K Gen Funktionsverlust nicht in anteriore Regionen aus.	120
Abb. 3-45: Disco besitzt keine Funktion für die Identität von NB6-4.	123
Abb. 3-46: Expression von Hth und Exd im WT und <i>lab¹Dfd¹²</i> Mutanten.	125
Abb. 3-47: Zusammenfassende Darstellung der Effekte von Funktionsverlust der verschiedenen genauer analysierten Kandidaten mit Angabe der Transformationsrate des maxillaren NB6-4 als Ausblick auf die folgenden Untersuchungen.	126
Abb. 3-48: Funktionsverlust von <i>Ama</i> hat Auswirkungen auf die segmentale Identität des NB6-4max.	128
Abb. 3-49: <i>Ama</i> mRNA wird im WT nicht in der Scr Expressionsdomäne exprimiert.	130
Abb. 3-50: <i>Ama</i> mRNA Expression im WT im Vergleich zu <i>Antp</i> -K Mutanten.	131
Abb. 3-51: Veränderung der Expression von <i>Ama</i> durch ektopisch exprimierte Hoxgene.	133
Abb. 3-52: <i>Ama</i> Protein Expression im WT, in <i>Dfd</i> Einzel- und <i>lab¹Dfd¹²</i> , <i>Dfd¹⁶Antp⁷</i> und <i>Dfd¹⁶Scr⁴</i> Doppelmutanten.	136
Abb. 3-53: <i>Ama</i> Protein Expression im gnathalen NB6-4.	138
Abb. 3-54: <i>Nrt</i> besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.	140
Abb. 3-55: Apiko-basale Lokalisation von <i>Nrt</i> und <i>Ama</i> in sich teilenden Neuroblasten.	142
Abb. 3-56: <i>Dab</i> besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.	144
Abb. 3-57: <i>Abl</i> besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.	147
Abb. 3-58: Lokalisation von <i>Abl</i> Protein.	149
Abb. 3-59: Phänotyp der <i>Abl⁴Dfd¹⁶</i> Doppelmutante.	151
Abb. 3-60: Expression von <i>Abl</i> ist in <i>lab¹Dfd¹²</i> und <i>Ama^{R1}</i> Mutanten gleichermaßen reduziert.	152
Abb. 3-61: Voneinander unabhängige Expression von <i>Abl</i> und <i>Dfd</i> .	154
Abb. 3-62: Ektopische Expression von <i>Abl</i> und hitzeinduzierte Expression von <i>Ama</i> reduzieren die Transformationsraten in <i>lab¹Dfd¹²</i> bzw. in <i>Dfd¹⁶Antp⁷</i> Mutanten.	155
Abb. 3-63: Expression von <i>Ena</i> im WT und <i>lab¹Dfd¹²</i> Mutanten.	158
Abb. 3-64: <i>CycE</i> Expression im NB6-4max in <i>Dfd</i> und <i>Abl</i> Mutanten.	159
Abb. 3-65: Funktionsverlust von <i>CycE</i> reduziert die Entstehungsrate ektopischer NB6-4max Neurone in <i>Dfd¹¹</i> und <i>Abl⁴Dfd¹⁶</i> Mutanten.	161

Abb. 3-66: Ballonphänotyp und Proliferationsphänotyp in verschiedenen genetischen Hintergründen.	164
Abb. 3-67: Genauere Charakterisierung des Ballonphänotyps.	166
Abb. 3-68: Ballonphänotyp und Überproliferation bei Funktionsverlust von <i>lola</i> .	168
Abb. 3-69: Yki besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.	170
Abb. 3-70: Das Level an Sav ist in <i>Abl⁴</i> und <i>lab¹Dfd¹²</i> Mutanten reduziert.	171
Abb. 3-71: Gleichzeitiger <i>yki</i> Funktionsverlust kann den durch <i>Abl</i> Verlust induzierten NB6-4max Phänotyp retten.	172
Abb. 3-72: Die Expressionsdomänen von Tsh und Hth ändern sich in <i>Abl</i> Mutanten im Vergleich zum WT nicht.	174
Abb. 3-73: Wildtypische Expression von <i>mid</i> .	177
Abb. 3-74: Mid besitzt eine Funktion für die segmentale Identität des NB6-4max.	178
Abb. 3-75: Expression von Tsh in <i>mid¹Dfd¹⁶</i> Mutanten breitet sich nicht in das Maxillarsegment aus.	180
Abb. 3-76: <i>Ama</i> mRNA Expression ist in <i>mid¹</i> verändert.	181
Abb. 3-77: Entstehung eines Eg positiven mandibularen NB6-4 in verschiedenen Funktionsverlustmutanten.	183
Abb. 3-78: Entstehung von Neuronen des NB6-4 in abdominalen Segmenten.	186
Abb. 4-1: Schematische Übersicht der Mechanismen zur Identitätsfestlegung des NB6-4max.	190

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Verwendete Lösungen und Chemikalien.	14
Tab. 2-2: Verwendete Geräte.	17
Tab. 2-3: Verwendete Software.	18
Tab. 2-4: Verwendete Fliegenstämme.	21
Tab. 2-5: Verwendete RNAi Linien.	25
Tab. 2-7. Verwendete primäre Antikörper.	27
Tab. 2-8: Verwendete Sekundärantikörper.	31
Tab. 2-9: EST Klone, Vektoren und Restriktionsenzyme der hergestellten Sonden gegen Kandidatengene aus dem Screen von Hueber et al. 2007.	37
Tab. 2-10: Sonden Informationen für weitere Kandidaten von Chromosom 3R und bekannter Hoxgen Interaktionspartner.	39

Tab. 2-11: Primersequenzen der Sonden gegen <i>Deformed</i> und <i>Sex combs reduced</i> .	39
Tab. 3-1.: Kandidaten von Chromosom 3.	105
Tab. 3-2.: Kandidaten aus dem Screen von Hueber et al., 2007.	105
Tab. 3-3.: Kandidaten aus dem Screen von Leemans et al., 2001.	108
Tab. 3-4.: Auswahl bekannter Kofaktoren von Hoxgenen.	108
Tab. 3-5.: Genauer untersuchte Kandidaten ohne NB6-4 Phänotyp.	110

7.4. Abkürzungsverzeichnis

7.4.1. Allgemeine Abkürzungen

A1	abdominales Segment 1 (fortlaufend in der Nummerierung)
A. dest.	destilliertes Wasser
<i>Antp</i> -K	„ <i>Antennapedia</i> -Komplex“
A/P	anterior/posterior
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
<i>Bth</i> -K	„ <i>Bithorax</i> -Komplex“
CD8::GFP	Fusionsprotein aus dem Oberflächenprotein CD8 und GFP
cDNA	„complementary DNA“
CDS	„coding sequence“ proteinkodierende Sequenz
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DAB	3,3‘Diaminobenzidin Diethylpyrocarbonat
<i>Df</i>	Defizienz
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSHB	„Developmental Studies Hybridoma Bank“
D/V	dorso/ventral
EL	Eilänge
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	und weitere
FITC	Fluorescein
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMZ	Ganglienmutterzelle
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	Hemisegment
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lab	Labialsegment
LGB	Longitudinaler Glioblast
M	Molar
Mad	Mandibularsegment
Max	Maxillarsegment
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
ML	Mittellinie
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
MNB	Mittellinien Neuroblast

mRNA	„messenger“ RNA
n	Anzahl
NB	Neuroblast
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NE	Neuroektoderm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBT	PBS + Triton X-100
PBTween	PBS + Tween 20 in A. dest.DEPC
PCD	„programmed cell death“ (programmierter Zelltod)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
pNR	procephale neurogene Region
PS	Parasegment
RNAi	RNA-Interferenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse(n)	Ribonuklease(n)
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S1-S5	Segregationswelle 1-5
sec	Sekunde
St	Embryonalstadium
St11e	frühes Embryonalstadium 11
St11l	spätes Embryonalstadium 11
St11m	Mitte des 11. Embryonalstadiums
T1-T3	thorakale Segmente 1-3
UAS	„upstream activating sequences“
vNR	ventrale neurogene Region
vNS	ventrales Nervensystem
Vol.	Volumen

VUM	„ventral unpaired median“
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

7.4.2. Abkürzungen der Gennamen

<i>abd-A</i>	<i>abdominal-A</i>
<i>Abd-B</i>	<i>Abdominal-B</i>
<i>Abl</i>	<i>Ableson Tyrosin Kinase</i>
<i>Ama</i>	<i>Amalgam</i>
<i>Antp</i>	<i>Antennapedia</i>
<i>Beta-Gal</i>	<i>Beta-Galaktosidase</i>
<i>Bcd</i>	<i>bicoid</i>
<i>Cas</i>	<i>castor</i>
<i>CycE</i>	<i>Cyclin E</i>
<i>Dab</i>	<i>Disabled</i>
<i>Dfd</i>	<i>Deformed</i>
<i>disco</i>	<i>disconnected</i>
<i>dpn</i>	<i>deadpan</i>
<i>eg</i>	<i>eagle</i>
<i>ems</i>	<i>empty spiracles</i>
<i>Ena</i>	<i>Enabled</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>eve</i>	<i>even skipped</i>
<i>exd</i>	<i>extradenticle</i>
<i>ey</i>	<i>eyeless</i>
<i>gsb-d</i>	<i>gooseberry distal</i>
<i>gsb-p</i>	<i>gooseberry proximal</i>
<i>hpo</i>	<i>hippo</i>
<i>hth</i>	<i>homothorax</i>

<i>ind</i>	<i>intermediate neuroblasts defective</i>
<i>insc</i>	<i>inscuteable</i>
<i>lab</i>	<i>labial</i>
<i>Lam</i>	<i>Lamin</i>
<i>lbe</i>	<i>ladybird early</i>
<i>mid</i>	<i>midline</i>
<i>mira</i>	<i>miranda</i>
<i>mirr</i>	<i>mirror</i>
<i>msh</i>	<i>muscle segment homeobox</i>
<i>N</i>	<i>Notch</i>
<i>Nrt</i>	<i>Neurotactin</i>
<i>otd</i>	<i>orthodenticle</i>
<i>pH3</i>	<i>phospo Histon 3</i>
<i>pb</i>	<i>proboscipedia</i>
<i>Poxn</i>	<i>Pox neuro</i>
<i>repo</i>	<i>reversed polarity</i>
<i>run</i>	<i>runt</i>
<i>sav</i>	<i>salvador</i>
<i>sca</i>	<i>scabrous</i>
<i>Scr</i>	<i>Sex combs reduced</i>
<i>tio</i>	<i>tiptop</i>
<i>tsh</i>	<i>teashirt</i>
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
<i>vnd</i>	<i>ventral nervous system defective</i>
<i>wts</i>	<i>warts</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>yki</i>	<i>yorkie</i>
<i>zfh1</i>	<i>zink finger homeodomain 1</i>

Die Namen der verwendeten Gene und deren Abkürzungen werden im Text kursiv gesetzt, bei der Bezeichnung des Proteins fällt die kursive Schreibweise weg. Generell werden Proteinnamen mit großem Anfangsbuchstaben geschrieben, die Gennamen werden bei einem dominanten Allel mit großem, bei rezessivem Allel mit kleinem Anfangsbuchstaben geschrieben. Dabei wurde sich an der Datenbank „Flybase“ orientiert (McQuilton et al., 2012).

7.5. Curriculum Vitae

Die Angaben wurden aus Gründen des Datenschutzes gelöscht

Publikationen

„Cell-autonomous and non-cell-autonomous function of Hox genes specify segmental neuroblast identity in the gnathal region of the embryonic CNS of *Drosophila*“. Henrike Becker, Simone Renner, Gerhard M. Technau, Christian Berger ; 25. 03. 2016, *PLOS Genetics*

7.6. Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Absatz 3d der Promotionsordnung

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

Mainz, den

Henrike Becker

7.7. Danksagung

Die Zeit meiner Promotion war für mich eine Zeit mit sehr vielen verschiedenen Erfahrungen; über mich selbst, über Zusammenarbeit, über Glück und Freude, Frustration und Enttäuschung. Viele Dinge liefen anders als erwartet und hielten positive und negative Überraschungen bereit. Ich bin sehr froh, dass ich diesen Weg gehen konnte und so viele Dinge lernen durfte, auch wenn das nicht immer angenehm war.

Die Wunder der Entwicklung und des Lebens erwecken meine Neugierde und erfüllen mich mit einem großen Erstaunen und einer tiefen Faszination. Ich möchte allen Personen danken, die mich auf diesem Weg durch Gespräche, ihre Freundschaft und ihre Kompetenzen begleitet haben.

Weiterhin möchte ich allen bisher nicht genannten Personen des Instituts für Genetik für den fachlichen und persönlichen Austausch danken.

Ganz besonderer Dank auch an dieser Stelle an meine Familie und Freunde. Worte können hier meinen Gefühlen nicht gerecht werden.