

**Analyse der temporären Neuroblastenbildung
und der segmentalen Spezifizierung des
Neuroblasten 6-4 im embryonalen zentralen
Nervensystem von *Drosophila melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

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

Christian Berger
geboren am 13.März 1972 in Trier

Mainz, August 2004

„Wissen und Wissenschaft ist nicht dasselbe.

Wissen ist das Ganze, Wissenschaft ein Teil.“

Leo N. Tolstoi, Tagebücher, 1910

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die embryonale Neurogenese bei <i>Drosophila</i>	2
1.2. Fragestellungen der Arbeit.....	7
1.2.1. Hat die zeitliche Abfolge der Neuroblastenentstehung einen Einfluss auf ihre Identität?.....	7
1.2.2. Wie entwickeln seriell homologe Neuroblasten tagmaspezifische Zellstammbäume?	9
1.4. Zusammenfassung der Fragestellungen.....	12
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Chemikalien	14
2.2. Lösungen	14
2.3. Geräte.....	16
2.4. Gebrauchsmaterialien.....	17
2.5. Fliegenzucht	17
2.6. Fliegenstämme	18
2.7. Balancieren von Mutationen	20
2.8. Kreuzungen	21
2.9. Ektopische Genexpression mithilfe des UAS/Gal4-Systems	21
2.10. Apfelagarplatten für Eiablage.....	22
2.11. Eiablagen.....	23
2.12. Antikörperfärbung	23
2.12.1. Verwendete Antikörper.....	23
2.12.2. Fixierung der Embryonen für Antikörperfärbung und <i>in-Situ</i> Hybridisierung	24
2.12.3. Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern	25
2.12.3.1. Fluoreszenzfärbung	26
2.12.3.2. Biotin- oder alkalische Phosphatase Färbung	26
2.13. <i>In-Situ</i> Hybridisierung.....	27
2.13.1. Verwendete Riboproben und deren Herstellung	27
2.13.2. Hybridisierung	28
2.13.3. Signaldetektion.....	29

2.14. Mikromanipulation.....	29
2.14.1. Kapillaren	30
2.14.2. Vorbereitung der Embryonen	31
2.14.3. Einzelzelltransplantation.....	33
2.14.4. Dil-Markierung einzelner Neuroektodermalzellen.....	34
2.14.5. Weiterbehandlung der Embryonen.....	36
2.15. Dokumentation.....	38
2.16. Computer und Software	38
3. Ergebnisse	39
A. Die zeitliche Spezifizierung verschiedener Neuroblastenpopula- tionen im embryonalen Bauchmark von <i>Drosophila</i>	39
3.1. Späte Neuroektodermalzellen behalten die Kompetenz auf extrinsische Signale zu reagieren und frühes Neuroblastenschicksal zu erlangen.....	42
3.2. Die Zeitdauer im Neuroektoderm beeinflusst nicht die Bildung später Neuroblasten	46
3.3. Die Determination auf ein spätes Neuroblastenschicksal ist nicht von einer vorherigen Teilung im Neuroektoderm abhängig.....	47
B. Entstehung tagmaspezifischer Neuroblastenzellstammbäume im embryonalen Bauchmark von <i>Drosophila</i>	51
3.4. Der NB6-4 als Modellzellstammbaum.....	52
3.4.1. Bestandteile der NB6-4 Zellgenealogie	53
3.4.2. Identifizierbarkeit der Zellen	53
3.4.3. Entstehung des glialen Anteils	55
3.5. Homöotische Gene legen die Segmentspezifität fest	62
3.5.1. <i>Antennapedia</i> wird im thorakalen NB6-4 exprimiert, hat aber keinen Einfluss auf die Tagmaspezifität.....	63
3.5.2. <i>Ultrabithorax</i> wird nicht im NB6-4 Zellstammbaum exprimiert.....	64
3.5.3. <i>abdominal-A</i> und <i>Abdominal-B</i> spezifizieren den abdominale NB6-4 – thorakales Schicksal ist eine Grundidentität.....	65
3.6. Zellzyklus und Zellzykluskontrollgene	69
3.7. Der NB6-4 entwickelt sich unter dem Einfluss von <i>CyclinE</i> zum Neuroglioblasten.....	72

3.8. Ektopisches <i>CyclinE</i> ist ausreichend, um den abdominalen NB6-4 in die thorakale Variante zu transformieren.....	75
3.9. Auswirkung ektopischer <i>CyclinE</i> Expression auf andere abdominale Neuroblastenzellstammbäume	80
3.10. Einfluss weiterer positiver Zellzyklusregulatoren auf die Entstehung der NB1-1 Neurone aCC und pCC	84
3.11. Koexpression von <i>CyclinE</i> und <i>string</i> führt zu einer vermehrten Zellzahl, die durch Zelltod reguliert wird	87
3.12. <i>CyclinE</i> wird differenziell im NB6-4 exprimiert	92
3.13. Mit <i>CyclinE</i> interagierende Faktoren zeigen korrespondierende Effekte	93
3.13.1. Einfluss von <i>dacapo/p21</i> auf den NB6-4	93
3.13.1.b. Einfluss einer <i>dacapo</i> ⁴⁴⁵⁴ -Funktionsverlustmutation	94
3.13.1.b. Ektopische Expression von <i>dacapo</i> vermindert die Anzahl der Neurone	95
3.13.2. Auswirkung der <i>dacapo</i> ⁴⁴⁵⁴ -Funktionsverlustmutante auf andere Neuroblastenzellstammbäume	96
3.14. <i>dE2F</i> als S-Phase Faktor zeigt abgeschwächtere Effekte im NB6-4	99
3.15. Die Manipulation der G2-M-Transition hat keinen Effekt auf das NB6-4 Zellschicksal	102
3.16. <i>CyclinE</i> wird von <i>abdominal-A</i> im NB6-4a reprimiert	104
3.16.1. Gene des Proteasom-Komplexes regulieren die Proliferation der Gliazellen im NB6-4a durch Degradierung des maternalen CycE	105
3.16.2. <i>Abdominal-A</i> reprimiert <i>CyclinE</i> , um abdominales Schicksal zu determinieren	107
4. Diskussion.....	112
4.1. Irreversible und reversible Effekte während der Determination neuroektodermaler Vorläuferzellen.....	114
4.2. Das Neuroblastenschicksal ist unabhängig von einer Teilung der neuroektodermalen Vorläuferzelle.....	115
4.2. Extrinsische Signale sind an der Spezifizierung temporärer Neuroblastenpopulationen beteiligt.....	116
4.3. Das gliale Schicksal des NB6-4 ist ein frühes Schicksal.....	118
4.4. Abhängigkeit des glialen Schicksals von Prospero und dem Zellzyklus	120
4.5. <i>CyclinE</i> fördert die Bildung von Neuronen	124

4.6. Die neuronfördernde Funktion von <i>CyclinE</i> scheint unabhängig von seiner Funktion als Zellzyklusgen zu sein	127
4.7. Homöotische Gene reprimieren die <i>CyclinE</i> -Expression, um tagmaspezifische NB6-4 Zellstammbäume zu erzeugen	128
5. Zusammenfassung und Ausblick	132
6. Literaturverzeichnis.....	134
7. Anhang	145
Auflistung der Experimente.....	145
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	146
Abkürzungsverzeichnis	148
Versicherung gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung	161
Lebenslauf	162

1. Einleitung

Das Nervensystem ist das oberste Kontroll- und Koordinationssystem aller tierischen Organismen. Durch die Verschaltungsvielfalt der Zellen untereinander erreicht es eine Komplexität, die weit über allen anderen Organen liegt. Im Wesentlichen gibt es zwei Grundbausteine, die am Aufbau des Nervensystems beteiligt sind: Neurone und Gliazellen.

Neurone lassen sich in drei funktionelle Gruppen unterteilen: (a) sensorische Neurone, die optische, mechanische oder chemische Reize empfangen und weiterleiten, (b) Interneurone, die Informationen zu anderen Neuronen leiten und (c) motorische Neurone (Motoneurone), die Impulse an Muskelzellen leiten und das Bindeglied zwischen Informationsverarbeitung und resultierender Reaktion darstellen. Die Weiterleitung an sich erfolgt über lange Fortsätze, die Dendriten und Axone. Die Verschaltung der Neurone untereinander leisten spezifische Kontakte, die Synapsen – oder, im Falle von motorischen Neuronen, so genannte motorische Endplatten, die Impulse letztendlich auf den Muskel übertragen.

Gliazellen haben viele verschiedene Funktionen. Neben der Versorgung der Neurone mit Nährstoffen bilden sie eine Isolationsschicht zwischen den Neuronen. Darüber hinaus können sie im Verlauf der Entwicklung als Matrix für ein zielgerichtetes Auswachsen der Axone dienen.

Die komplexe Verschaltung und das genaue Zusammenspiel aller Komponenten des Nervensystems ist die Voraussetzung für alle kognitiven Leistungen. Hierbei wird jedes Neuron ein Knotenpunkt in diesem neuronalen Netzwerk.

Die Erforschung des Aufbaus und der Entwicklung des Nervensystems ist eine der großen Herausforderungen der Biologie. So ist es zum Beispiel von großem Interesse zu verstehen, wie in einer multipotenten Vorläuferzelle während der Neurogenese die Entscheidung getroffen wird, ob sie Neurone oder Gliazellen produziert. Dabei ist es sinnvoll, Modellsysteme zu untersuchen, die viele verschiedene methodische Ansätze erlauben (wie zum Beispiel morphologische, genetische, molekulare, experimentelle und/oder physiologische Ansätze). Die Fruchtfliege

Drosophila melanogaster, im Folgenden nur noch *Drosophila* genannt, hat sich neben anderen Modellsystemen in den letzten hundert Jahren als bedeutendes Forschungsobjekt bewährt. Als herausragende Vorteile dieses Modells seien beispielhaft nur die kurze Generationsdauer und die relativ einfache genetische Manipulierbarkeit des Organismus genannt.

Diese Vorteile, kombiniert mit einer Vielzahl bereits existierender mutanter Fliegenstämmen und der Menge an molekulargenetischen Methoden, ermöglicht eine effiziente Erforschung grundlegender Mechanismen. Dass diese Mechanismen ebenfalls auf höhere Organismen übertragbar sind, hat sich neben anderen Forschungsgebieten auch für die Neurobiologie gezeigt (Arendt und Nubler-Jung, 1999).

So kann ein fundamentales Verständnis der prinzipiellen Mechanismen, die zum Aufbau des Fliegengehirns führen, auch Aufschluss über die Neurogenese bei Vertebraten liefern. Letztlich kann dies sogar zu möglichen Therapiemethoden im Bereich der Krankheitsbekämpfung führen. Um einen Einblick in das Modellsystem *Drosophila* zu geben, werde ich die embryonale Neurogenese im Folgenden kurz zusammenfassen.

1.1. Die embryonale Neurogenese bei *Drosophila*

Das Nervensystem von *Drosophila* besteht aus dem ventralen Nervensystem (vNS, im Folgenden Bauchmark genannt), das zusammen mit dem Gehirn zum zentralen Nervensystem (ZNS) gehört, und dem peripheren Nervensystem (PNS). Alle Bereiche des Nervensystems werden von multipotenten, neuralen Vorläuferzellen gebildet. Das Bauchmark geht aus der ventralen neurogenen Region (vNR) des Ektoderms hervor, das Gehirn entsteht aus der procephalen neurogenen Region (pNR, Abb. 1-1); das PNS geht aus verschiedenen Anlagen des Embryos hervor (zusammengefasst in: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Zwei ektodermale Bereiche des Embryos bilden das Bauchmark: Die ventrale Mittellinie (Mesektoderm, ML, Poulson, 1950), aus der die Zellklone der Mittellinie hervorgehen und die beiderseits der Mittellinie angrenzende vNR (Neuroektoderm; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Technau und Campos-Ortega, 1987). In dorsoventraler (DV) Richtung erstreckt sich die vNR bis zur Mitte des Embryos (50%

DV-Perimeter; siehe Anlagekarte Abb. 1-1; Hartenstein und Campos-Ortega, 1984; Technau und Campos-Ortega, 1985).

Die Zellen der Mittellinie werden bereits vor Beginn der Gastrulation durch die Expression des Gens *single-minded (sim)* determiniert (Nambu *et al.*, 1991). Pro

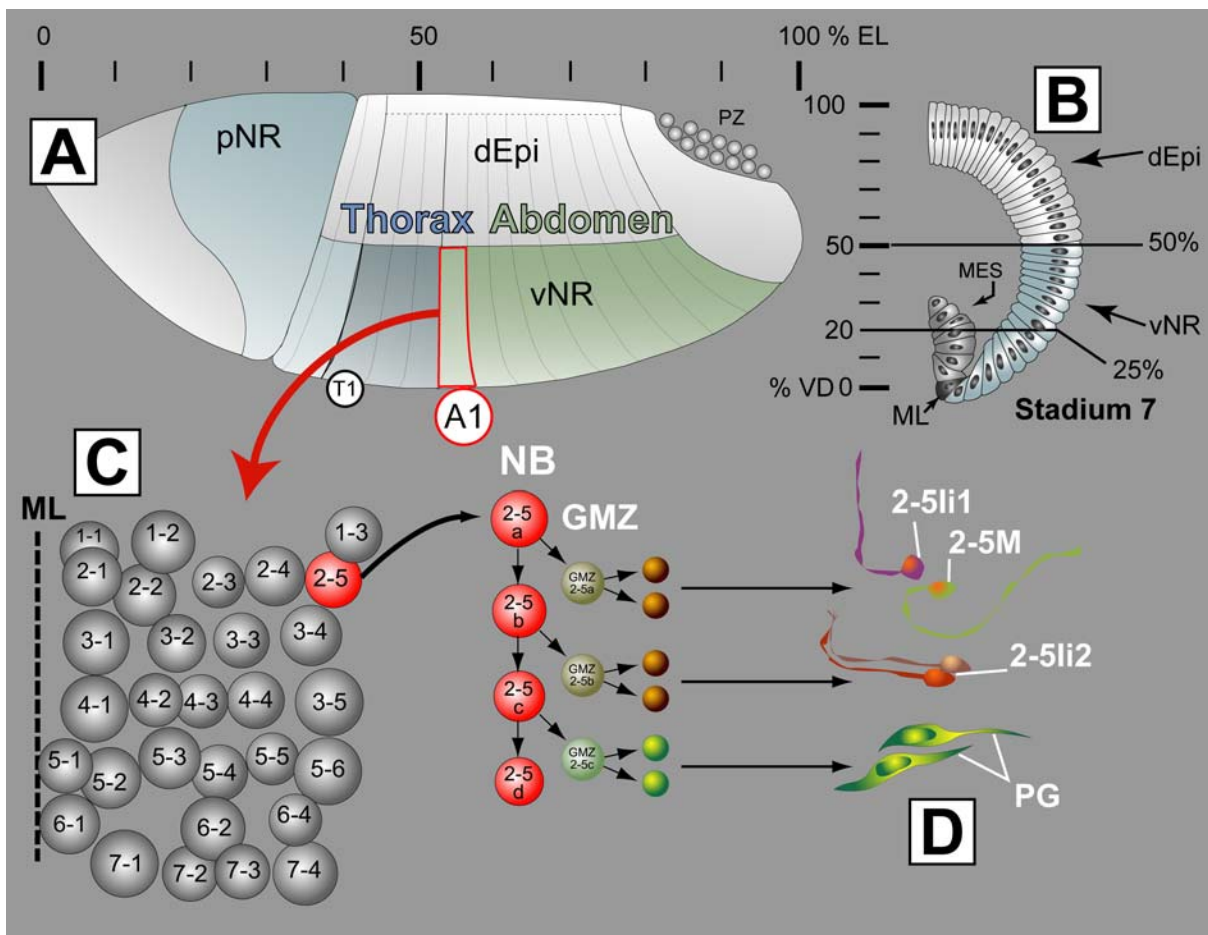


Abb. 1-1: Die *Drosophila* Anlagenkarte - Neuroblastenbildung und -stammbaumentwicklung.

A. Die ventrale neurogene Region (vNR) des frühen Gastrulaembryos umfasst sowohl den ventralen thorakalen (dunkelblau, z.B. T1) als auch abdominalen (grün, z.B. A1) Bereich. Sie erstreckt sich bis circa 50% ventrodorsalen (VD)-Perimeters beiderseits der Mittellinie (ML). Die Neuroblasten (NB) des Gehirns entstehen aus der procephalen neurogenen Region (pNR).

In B. ist ein halber Embryo desselben Stadiums im Querschnitt gezeigt. Die dorsale Epidermis (dEpi) ist in hellgrau markiert.

C. In einem repetitiven, segmental reproduzierbaren Muster delaminieren circa 30 NBs pro Hemisegment in das Innere des Embryos. Die NBs beginnen sich in einem Stammzellmodus zu teilen, wobei der NB neben dem selbsterneuerten NB (2-5a, b, c, d in rot) eine Gangliemutterzelle (GMZ) abschnürt, die sich ihrerseits noch ein Mal teilt und so Neurone und/oder Gliazellen bildet. Auf diese Weise wird der für jeden NB eigenen Zellstammbaum generiert. Dies ist hier exemplarisch für den NB2-5 dargestellt.

D. Die entstehenden Neurone haben spezifische Projektionen (2-5Ii1, 2-5M, 2-5Ii2 usw.), zwei Periphere Gliazellen (PG) werden produziert.

Anterior ist links; EL, Eilänge; MES, Mesektoderm; A verändert nach Technau und Campos-Ortega (1985).

Segment entstehen acht Mittellinienvorläuferzellen, deren Zellstammbäume vollständig beschrieben sind (Bossing und Technau, 1994).

Das embryonale Bauchmark ist aus vierzehn bilateral symmetrischen segmentalen Ganglien, den Neuromeren, aufgebaut. Diese lassen sich nach den Körperregionen in drei gnathale (G1-3), drei thorakale (T1-T3) und acht abdominale (A1-A8) Segmente unterscheiden. Gebildet wird jedes Hemineuromer von ca. 30 neuronalen Vorläuferzellen, den Neuroblasten (NB; Wheeler, 1891). Diese NBs delaminieren während der Gastrulation in fünf aufeinander folgenden Segregationswellen (S1-S5, siehe Abb. 1-2) aus dem Neuroektoderm in das Innere des Embryos. In den jeweiligen Segregationswellen entstehen immer die gleichen Neuroblasten (im Folgenden als Neuroblastenpopulation bezeichnet; siehe Abb. 1-2 und 3-1). Auf diese Weise wird ein segmental reproduzierbares, subepidermales Muster an NBs aus dem einschichtigen Neuroektoderm gebildet. Zellablationsexperimente bei der Heuschrecke (Doe und Goodman, 1985) und Zelltransplantationsexperimente bei *Drosophila* (Technau und Campos-Ortega, 1986; Technau und Campos-Ortega,

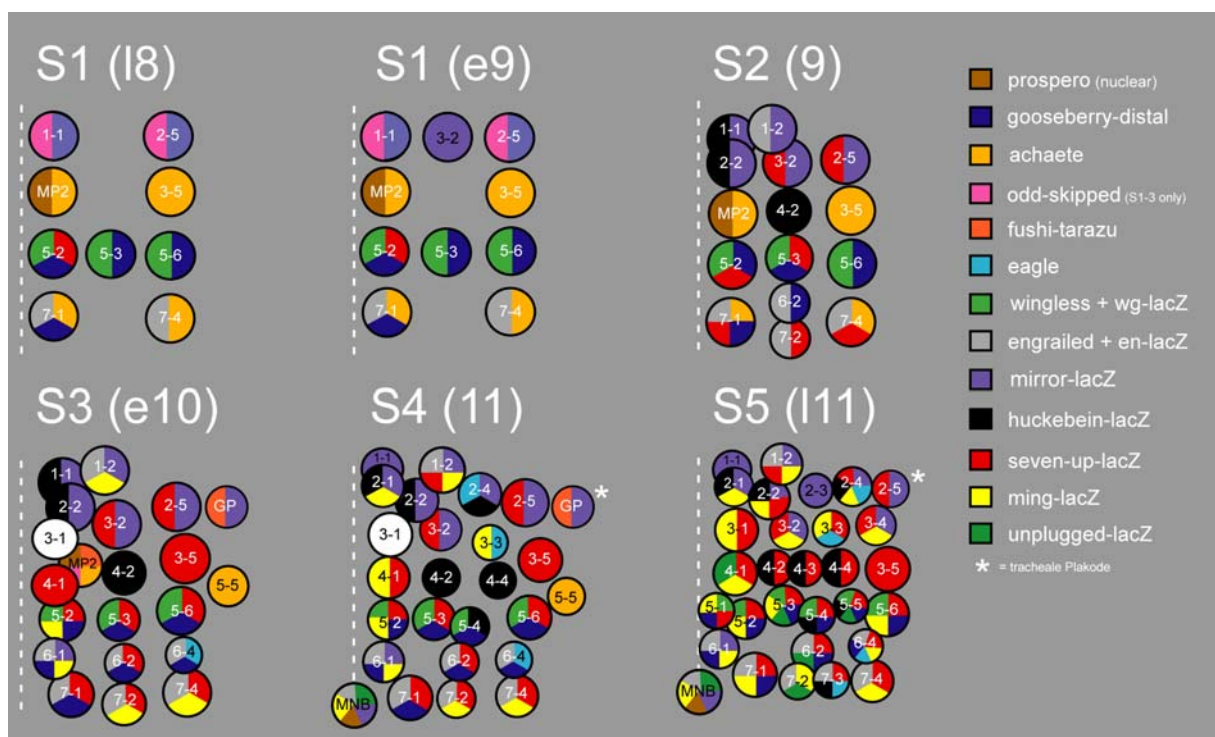


Abb. 1-2: Die Neuroblastenkarte nach Doe (1992) und Broadus und Doe (1995).

Die dynamische Expression verschiedener Gene ist in einem Farbcode wiedergegeben. Jeder NB, der zu einer bestimmten Zeit (S1-S5) delaminiert, exprimiert eine spezifische Kombinatorik an Genen. Somit kann jeder NB anhand seiner Position, dem Zeitpunkt der Delamination und dem spezifischen Set an Markergenen identifiziert werden. Jeweils ein Hemisegment ist dargestellt; Anterior ist oben, die gestrichelte Linie markiert die Mittellinie; Der Stern markiert die Position der trachealen Plakode (entspricht der Segmentgrenze).

1987) haben gezeigt, dass dies ein auf Zell-Zell-Interaktion beruhender Prozess ist. Die Entscheidung, ob eine neuroektodermale Zelle Neuroblast wird oder im Ektoderm als Epidermoblast verbleibt, wird im Wesentlichen von zwei Gengruppen reguliert: den proneuralen (Campuzano und Modolell, 1992; Romani *et al.*, 1987) und den neurogenen Genen (Bourouis *et al.*, 1989; Lehmann *et al.*, 1981).

Durch die Aktivität der proneuralen Gene werden bestimmte kompetente Domänen innerhalb der vNR definiert. Diese aus vier bis sechs Zellen bestehenden Domänen bezeichnet man als proneurale Cluster (Abb. 1-3). Die Zellen der proneuralen Cluster exprimieren Gene des *achaete-scute-complexes* (AS-C; Cabrera, 1987; Martin-Bermudo *et al.*, 1991; Skeath und Doe, 1996). Die proneuralen Gene ihrerseits werden zum Beispiel durch die Aktivität der Paarregelgene und der DV-Mustergene reguliert (Skeath *et al.*, 1992; Skeath *et al.*, 1994; siehe Abb. 1-3).

Innerhalb der so definierten proneuralen Cluster wird als nächster Schritt der Neurogenese je eine Zelle als NB ausgesondert. Dies wird durch den Prozess der laterale Inhibition bewirkt, bei dem die neurogenen Gene *Notch* und *Delta* eine entscheidende Rolle spielen (Campos-Ortega, 1993 und zusammengefasst in: Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1991; Seugnet *et al.*, 1997). *Delta* ist der membranständige Ligand von *Notch*. Man geht davon aus, dass alle Zellen des proneuralen Clusters ursprünglich dieselbe Aktivität beider Gene besitzen. Im weiteren Verlauf tritt ein Ungleichgewicht innerhalb des Clusters auf, wobei eine Zelle, der spätere NB, eine erhöhte Delta-Aktivität aufweist. Diese Zelle bewirkt eine erhöhte Notch-Aktivität in den anderen Zellen des Clusters, wodurch neurales Schicksal unterdrückt wird. Die Zelle, die als NB segregiert, hat somit die höchste Delta-Aktivität und die niedrigste intrazelluläre Notch-Aktivität der Zellen des proneuralen Cluster (Abb. 1-3 und zusammengefasst in: Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1991).

Nach der Delamination teilen sich die NBs in einem Stammzellmodus. Dabei wird durch asymmetrische Teilung neben dem sich selbsterneuernden Neuroblasten in jedem Teilungsschritt eine Ganglienmutterzelle (GMZ) abgeschnürt. Die GMZ ihrerseits kann sich einmal teilen und generiert so zwei Zellen, die zu Neuronen und/oder Gliazellen differenzieren (Abb. 1-1C; Udolph *et al.*, 2001 und zusammengefasst in: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Durch Dil-Markierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass ein bestimmter NB immer denselben Zellstammbaum (im Folgenden auch Zellklon oder Klon

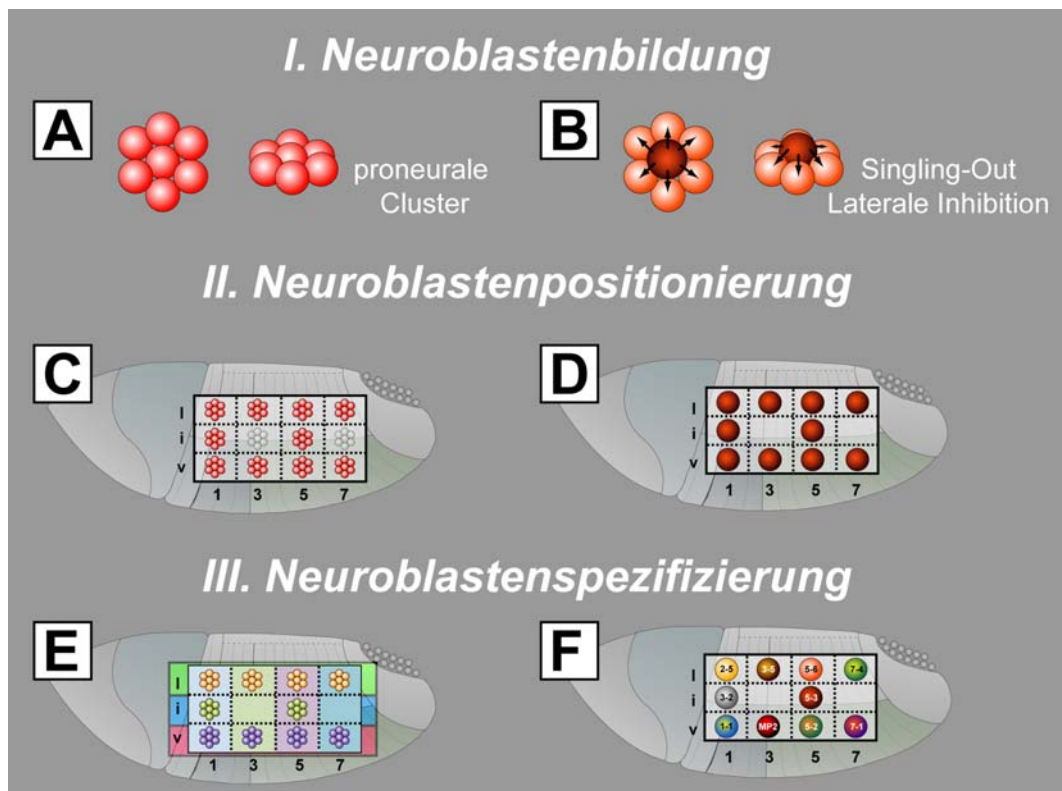


Abb. 1-3: Neuroblastenbildung, -positionierung im Embryo und -spezifizierung.

I. Neuroblastenbildung

A. Durch die Funktion der proneuralen Gene werden Gruppen kompetenter Zellen gebildet, proneurale Cluster, aus denen der NB hervorgeht. Neurogenen Gene bestimmen eine Zelle (singling-out), die als NB in das Innere delaminiert. Diese Zelle hindert, über den Mechanismus der lateralen Inhibition, alle anderen Zellen des proneuralen Clusters daran, ebenfalls NB zu werden. Diese Zellen verbleiben in der Epidermis und werden Epidermoblasten.

II. Neuroblastenpositionierung

In C. und D. sind jeweils ein Hemisegment gezeigt. Die Anordnung der proneuralen Cluster erfolgt in einem stereotypen Muster, wodurch vier Reihen (1, 3, 5 und 7) und drei Spalten (v, ventral; i, intermediär und l, lateral) gebildet werden. Die NBs der S1-Phase sind in diesem Muster angeordnet (D.).

III. Neuroblastenspezifizierung

E., F. Die Spezifizierung der NBs wird zu einem wesentlichen Teil über die Expression der Segmentpolaritätsgene beeinflusst, die in Streifen entlang der anterior-posterioren Achse dynamisch exprimiert werden. In Kombination mit den entlang der dorsoventralen Achse exprimierten Mustergenen und dem Zeitpunkt der Delamination wird so das Neuroblastenschicksal spezifiziert (F.). Die Genexpressionen werden durch die verschiedenen Farben angedeutet (E.). Jedes einzelne Neuroblastenschicksal (F.) wird durch einen Farbcode dargestellt.

Anterior ist links. Verändert nach Skeath (1999).

genannt) generiert – die Zellklone der meisten embryonalen NBs konnten bereits eindeutig beschrieben werden (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Während viele NBs nur Neurone generieren (zum Beispiel NB3-5), gibt es auch Vorläuferzellen, die sowohl Neurone als auch Gliazellen produzieren (Neuroglioblasten, NGB, zum Beispiel NGB6-4t). Des Weiteren gibt es Glioblasten (GB), aus denen nur Gliazellen hervorgehen (zum Beispiel LGB, der longitudinale Glioblast). Ob Neurone und/oder Gliazellen generiert werden, entscheidet sich auf Ebene der Vorläuferzellen

(Jacobs und Goodman, 1989; Klämbt *et al.*, 1991). Untersuchungen einiger Zellstammbäume haben gezeigt, dass sich bestimmte Eigenschaften zwischen den einzelnen Neuroblastenzellklonen konserviert haben. Zum Beispiel konnte mithilfe von Antikörperfärbungen (Isshiki *et al.*, 2001) und Ablationsexperimenten (persönliche Mitteilung von Christof Rickert, unveröffentlichte Daten) gezeigt werden, dass das Zellschicksal „Motoneuron“ innerhalb der Neuroblastenstammbäume immer durch die ersten Generationen von GMZs gebildet wird. Das Schicksal der GMZ scheint somit ausschlaggebend für die Spezifizierung der aus ihr hervorgehenden Zellen zu sein (Buescher *et al.*, 1998). Kambadur *et al.* (1998) konnten eine Reihe von Genen identifizieren, die sequenziell in Neuroblastenstammbäumen exprimiert werden. Dies sind zum Beispiel der Zinkfingertranskriptionsfaktor *hunchback* (*hb*), das POU-Domänenprotein-1/2 (*pdm-1* oder *pdm-2*) und der Zinkfingertranskriptionsfaktor *castor* (*cas*). Durch Brody und Odenwald (2000) und Isshiki *et al.* (2001) konnten zwei weitere Gene beschrieben werden, die ebenfalls in einer temporalen Weise in Neuroblastenzellklonen exprimiert werden (*Krüppel*, *Kr* und *grainyhead*, *grh*). Weitere Untersuchungen dieser Gene zeigten, dass sie tatsächlich an der temporalen Spezifizierung der sequenziell gebildeten Nachkommenzellen beteiligt sind (zum Beispiel Isshiki *et al.*, 2001; Novotny *et al.*, 2002).

So werden im Laufe der embryonalen Neurogenese ca. 350 Neurone und Gliazellen pro Hemineuromer gebildet. Im späteren Verlauf der embryonalen Entwicklung werden einige NBs ausgesondert, die postembryonal am Aufbau des adulten Nervensystems beteiligt sind (Prokop und Technau, 1991). Diese NBs durchlaufen eine larvale Ruhephase, um dann im spät larvalen Stadium erneut mitotisch aktiv zu werden (Ebens *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1997; Voigt *et al.*, 2002).

1.2. Fragestellungen der Arbeit

1.2.1. Hat die zeitliche Abfolge der Neuroblastenentstehung einen Einfluss auf ihre Identität?

Zum Zeitpunkt der Neuroblastenbildung hat jeder einzelne NB ein festes Schicksal und jeder NB, der zu einer bestimmten Zeit an einer gegebenen Position entsteht, hat immer dieselbe Identität (zum Beispiel Bossing *et al.*, 1996; Campos-

Ortega und Hartenstein, 1997; Doe, 1992; Luer und Technau, 1992; Schmidt *et al.*, 1997). Genetische Untersuchungen und Zelltransplantationsexperimente deuten darauf hin, dass die Neuroblastenidentität bereits im Neuroektoderm, also vor Delamination, vermittelt wird (Desphande *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 1998; Prokop und Technau, 1994; Skeath *et al.*, 1995; Udolph *et al.*, 1995 und zusammengefasst in: Bhat, 1998; Bhat, 1999; Skeath, 1999). Positionsinformationen entlang der anteriorposterioren (AP) und der dorsoventralen Achse scheinen hierbei ausschlaggebend zu sein (zusammengefasst in: Bhat, 1998; Bhat, 1999; Skeath, 1999). So vermitteln die Segmentpolaritätsgene diese Positionsinformationen entlang der AP-Achse, wodurch die Identität der einzelnen Neuroblastenreihen spezifiziert wird. In Kombination mit den Positionsinformationen der DV-Mustergene scheint letztendlich die spezifische Neuroblastenidentität festgelegt zu werden (Abb. 1-3 und Chu *et al.*, 1998; Desphande *et al.*, 2001; Isshiki *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1998; Skeath *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1998 und zusammengefasst in: Bhat, 1998; Bhat, 1999; Skeath, 1999).

Obwohl viel über die Entstehung einzelner Neuroblasten und deren Determination bekannt ist, konnten bisher nur wenige Einblicke in die Mechanismen der Spezifizierung der zu bestimmten Zeitpunkten generierten Neuroblastenpopulationen gewonnen werden. Wie bereits oben erwähnt, wurde der Prozess der Delamination in fünf Segregationswellen (S1-S5) aufgeteilt. In jeder dieser Segregationswellen delaminiert eine feste Population an NBs, die immer die gleiche Identität haben (Broadus und Doe, 1995; Doe, 1992). Ist dies eine Eigenschaft der spezifizierten NBs? Oder ist dies eine Konsequenz aus der fortschreitenden Entwicklung des Embryos? Anders gesagt: Ist die Neuroblastenidentität gemeinsam mit dem entsprechenden Delaminationszeitpunkt bereits früh in der Neurogenese irreversible festgelegt? In einem solchen Fall würden diese Eigenschaften in der weiteren Entwicklung nur noch zellautonom exprimiert werden. Oder ist es möglich, dass die Identität neuraler Vorläuferzellen sequenziell über zeitspezifische extrinsische Signale beeinflusst wird?

Um diese zeitliche Dimension der Spezifizierung der NBs zu untersuchen, habe ich im ersten Teil meiner Arbeit, als Fortsetzung meiner Diplomarbeit, heterochrone Zelltransplantationsexperimente durchgeführt.

Ich konnte zeigen, dass neuroektodermale Zellen bis mindestens Stadium 10 die Fähigkeit behalten, auf gegebene Signale innerhalb des Neuroektoderms

spezifisch zu reagieren. So können frühe neuroektodermale Zellen (Stadium 7) nach Transplantation in einen späteren Spenderembryo (Stadium 10) Neuroblastenzellklone generieren, die spezifisch für die spät entstehenden Neuroblastenpopulationen (S3-S5) sind. Umgekehrt können späte Zellen des Neuroektoderms, transplantiert in frühe Embryonen, auch auf die neue Umgebung reagieren und Neuroblastenklone produzieren, die spezifisch für frühe NBs (S1-S2) sind. Ich konnte so zeigen, dass

- 1.) induktive Signale während der Neurogenese existieren, die den Zellen des Neuroektoderms ein stadiumspezifisches Neuroblastenschicksal vermitteln;
- 2.) diese induktiven Signale zumindest bis zum Stadium 10 der Entwicklung existieren;
- und 3.) die neuroektodermalen Zellen (bis mindestens Stadium 10) die Kompetenz behalten, jegliches Neuroblastenschicksal zu generieren (früh versus alt).

Die Neuroblastenspezifizierung ist somit letztlich sowohl von den Positionsinformationen innerhalb des Neuroektoderms abhängig (vermittelt durch frühe Musterbildungsgene (zusammengefasst in: Bhat, 1999; Skeath, 1999) als auch vom Zeitpunkt der Delamination (Berger *et al.*, 2001).

1.2.2. Wie entwickeln seriell homologe Neuroblasten tagmaspezifische Zellstammbäume?

Ist der NB einmal spezifiziert, so wird seine weitere Entwicklung hauptsächlich von einem intrinsischen Programm gesteuert (Brody und Odenwald, 2000; Prokop und Technau, 1994; Udolph *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass NBs in Zellkultur tatsächlich mit den durch Dil-Markierung bekannten Zellklonen vergleichbare Klone generierten (Luer und Technau, 1992). Diese Eigenschaften werden durch die spezifische Kombinatorik an exprimierten Genen bestimmt (Doe, 1992; Isshiki *et al.*, 2001). Das durch die Expression der Segmentpolaritätsgene und der DV-Musterbildungsgene gebildete Kartesische Koordinatensystem ist nahezu identisch in jedem thorakalen und abdominalen Hemisegment – dementsprechend haben NBs, die in korrespondierenden Quadranten segregieren, die gleiche Neuroblastenidentität (Bhat, 1999; Skeath, 1999). Tatsächlich zeigen diese seriell

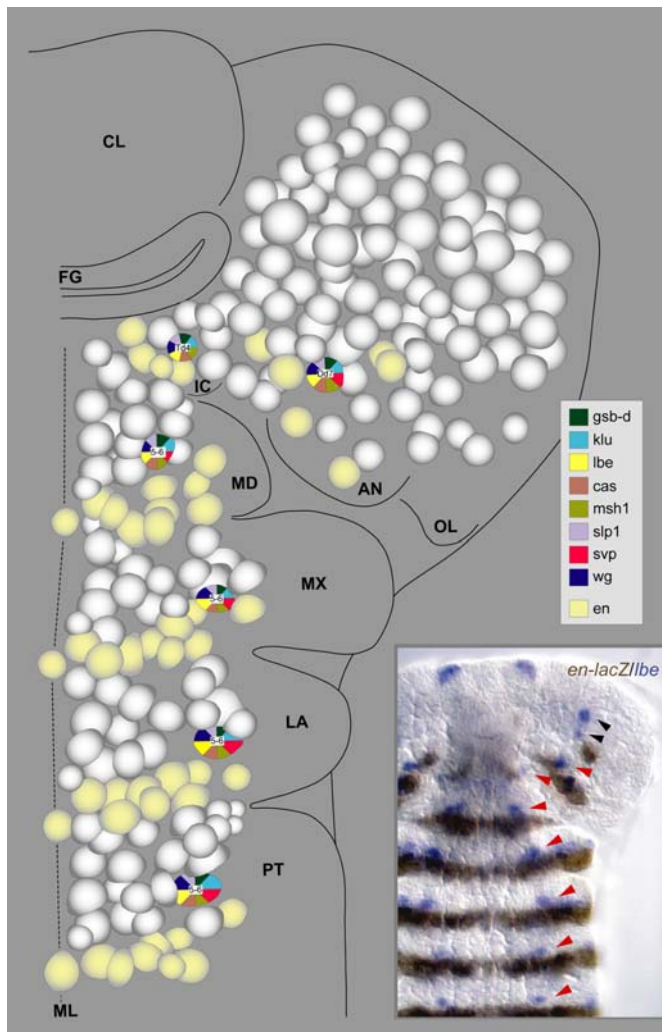


Abb. 1-4: Die embryonalen NBs von *Drosophila* sind serielle Homologe.

Durch Genexpressionstudien (Broadus und Doe, 1995; Doe, 1992; Urbach und Technau, 2003) konnte gezeigt werden, dass die NBs, die an entsprechender Stelle in unterschiedlichen Segmenten entstehen dieselbe Identität und dasselbe Set an Genen exprimieren. Dies ist exemplarisch für den NB5-6 dargestellt. Dieser NB exprimiert bis in die Kopfsegmente hinein (auch in nicht gezeigten abdominalen Segmenten siehe Abb. 1-3) dieselben Gene (markiert durch den Farbcode). Somit sind NBs, die an gleicher Stelle in unterschiedlichen Segmenten entstehen serielle Homologe.

Das kleine Inset zeigt eine *engrailed*-LacZ-Färbung (*en-lacZ*) und eine Färbung gegen Ladybird (*lbe*). Mit dieser Kombination kann der NB5-6 eindeutig identifiziert werden.

AN, IC, LA, MD, MX, PT, Antennal-, Intercalar-, Labial-, Mandibular-, Maxillarkalsegment; FG, Vorderdarm; CL, Clypeolabrum; ML, Mittellinie; OL, optischer Lobus.

Grafik freundlicherweise von Rolf Urbach zur Verfügung gestellt.

homologen NBs die Expression der gleichen Gene (Abb. 1-4; Broadus und Doe, 1995; Doe, 1992; Urbach und Technau, 2003) und generieren fast identische Zellklone (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Verantwortlich dafür könnten ähnliche regulatorische Interaktionen während ihrer Entwicklung sein. Trotzdem konnte für einige dieser seriell homologen NBs gezeigt werden, dass sie neben identischen Anteilen des Zellklons auch unterschiedliche, segmentspezifische (tagmaspezifische, Vergleich Thorax und Abdomen, Abb. 1-5) Klonanteile generieren. Dies kann sich sowohl auf die Anzahl der

Zellen als auch auf unterschiedliche Zelltypen (Glia/Neurone) beziehen (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Urbach und Technau, 2003). Die Mechanismen, die zu diesen segmentalen Unterschieden in den Neuroblastenzellstambäumen führen, sind bisher wenig untersucht. Einen entscheidenden Einfluss in diesem Prozess scheinen die Homöotischen Gene zu haben, die Segmentidentitäten vermitteln (Gould *et al.*, 1990; Graba *et al.*, 1992; Jiménez und Campos-Ortega, 1981; Prokop *et al.*, 1998; Prokop und Technau, 1994). Weiter bleibt aber ungeklärt, wie die

Funktion der Homöotischen Gene innerhalb der Stammbaumentwicklung zu divergierenden Klonanteilen führen kann. Um dieses Problem weitergehend zu untersuchen, habe ich mich im zweiten Teil meiner Arbeit hauptsächlich mit der segmentalen Spezifizierung eines Neuroblasten befasst. Als Modellzellstammbaum habe ich den NB6-4 gewählt. Methodische Ansätze geben mir jedoch ebenfalls die Möglichkeit, auch Aussagen über Zellklone andere NBs zu treffen.

Der Zellstammbaum des NB6-4 hat auffällige Unterschiede zwischen Thorax und Abdomen (siehe Abb. 1-5). Der thorakale NB6-4t bildet einen gemischten Zellstammbaum, bestehend aus Neuronen und Gliazellen. Der abdominale NB6-4a teilt sich nur einmal und generiert zwei Gliazellen – Neurone entstehen im Abdomen

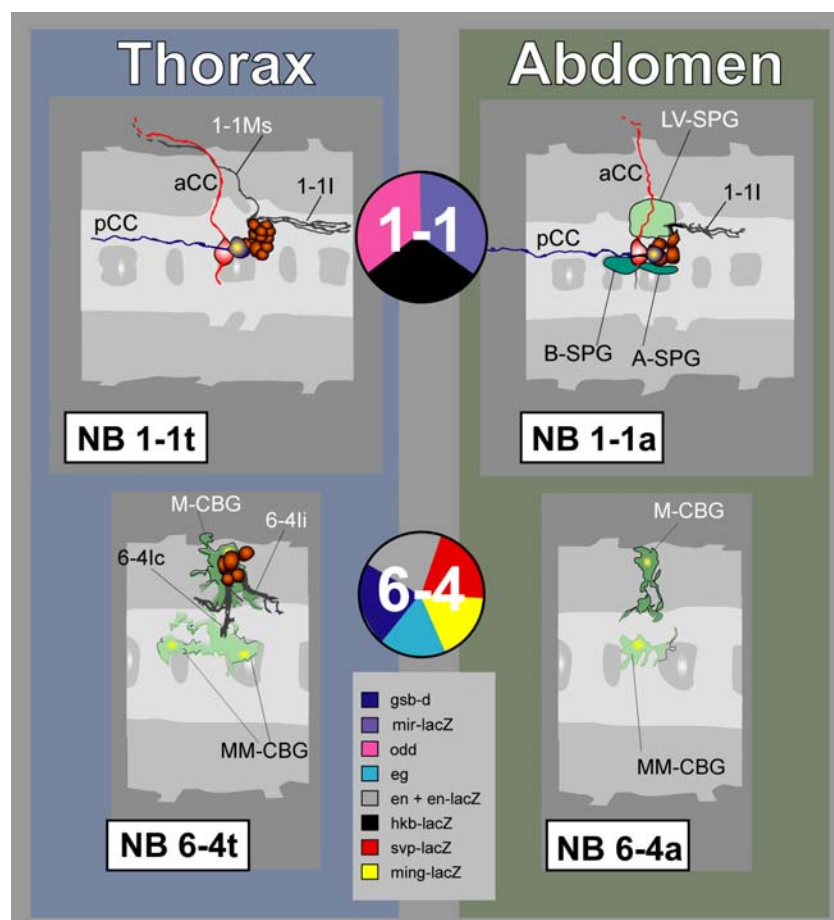


Abb. 1-5: Einige Neuroblasten generieren segmentspezifische Zellstammbäume.

Obwohl die NBs im embryonalen ZNS als seriell homologe Vorläufer angelegt werden (Farbcode der Genexpression für Thorax und Abdomen gleich, Abb. 1-4), generieren einige NBs im späteren Verlauf der Entwicklung tagmaspezifische Zellstammbäume. So zum Beispiel die NBs 1-1 und 6-4. Die segmentspezifischen Unterschiede betreffen sowohl Zelltypen (Neuron/Glia) als auch Anzahl der Zellen (Proliferationsverhalten).

Anterior ist links, Projektionen sind beschriftet mit aCC, pCC, 1-1Ms, 1-1I, 6-4Ic, 6-4Ii. Gliazellen: A-, B-SPG, A- bzw. B-Superineuralgia; M-CBG, Medial Cell Body Glia; MM-CBG, Medial Most-CBG. Für Genmarker siehe Abb. 1-3.

Beschriftung und Illustrationen entnommen aus Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997).

nie. Der gemeinsame Anteil beider Zellstammbäume beschränkt sich somit auf zwei Gliazellen (Schmidt *et al.*, 1997). Neben den zusätzlichen Neuronen weist der NB6-4t ebenfalls eine erheblich höhere mitotische Aktivität auf. Hier werden durch ca. neun Teilungen vier bis sechs Neurone und drei Gliazellen gebildet.

In einer ersten Reihe von Experimenten untersuchte ich den Einfluss der Homöotischen Gene auf die Tagmaspezifität des NB6-4. Hierbei zeigte sich, dass die thorakale Identität eine Grundidentität darstellt, die keine Wirkung der Homöotischen Gene benötigt. Abdominales Schicksal wird durch die Aktivität der beiden *Bithorax*-Komplexgene *abdominal-A* (*abd-A*) und *Abdominal-B* (*Abd-B*) bewirkt. In weiteren Experimenten untersuchte ich nun, welche Gene durch *abd-A* und *Abd-B* beeinflusst werden könnten, um diese Veränderung zu erzielen.

Da ein deutlicher Unterschied zwischen dem thorakalen und dem abdominalen Zellstammbaum die mitotische Aktivität der Vorläufer darstellt, habe ich den Einfluss Zellzyklus steuernder Gene auf das Entwicklungsschicksal des NB6-4 getestet. Ich konnte zeigen, dass eine spezifische Aktivität von *CycE* (*CyclinE*), einem G1 Zyklin, während der ersten thorakalen Teilung und in der weiteren Entwicklung des Zellstammbaums notwendig ist, um neuronales Schicksal zu erzeugen. Mit Hilfe genetischer Untersuchungen konnte ich zeigen, dass *abd-A* in abdominalen Segmenten *CycE* reprimiert und so abdominales Schicksal spezifiziert (*Abd-B* wurde nur peripher weiter untersucht).

Die Tagmaspezifität des NB6-4 wird somit über Homöotische Gene reguliert, die ihrerseits sowohl Einfluss auf die Proliferation als auch auf das jeweilige Zellschicksal haben, indem sie die Expression von *CycE* regulieren. Darüber hinaus ist die Entscheidung ob Neurone neben Gliazellen gebildet werden, von der Funktion von *CycE* im multipotenten Vorläufer NB6-4t abhängig. Diese Aktivität von *CycE* bei der Spezifizierung von neuronalem Zellschicksal, scheint eine vom Zellzyklus unabhängige Funktion zu sein.

1.4. Zusammenfassung der Fragestellungen

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei wichtigen Aspekten der embryonalen Neurogenese von *Drosophila melanogaster*. Im ersten Teil wird der Einfluss der Zeitachse auf die Spezifizierung der Neuroblastenidentität untersucht.

Hierzu wurden heterochrone Einzelzelltransplantationsexperimente durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass neben den durch Genexpression bereits bekannten Positionsinformationen entlang der Körperachsen ebenfalls zeitspezifische induktive Signale im Neuroektoderm existieren, die heterochron implantierten Zellen das zeitlich richtige Entwicklungspotenzial vermitteln.

Ist der NBs auf diese Weise spezifiziert, generiert er einen für seine Identität einzigartigen Zellstammbaum. Der segmentale Aufbau des Tieres spiegelt sich ebenfalls auf Ebene des Nervensystems wieder. So konnte gezeigt werden, dass NBs die an korrespondierenden Stellen in unterschiedlichen Segmenten entstehen, die gleiche Identität besitzen, und ähnliche Zellstammbäume generieren. Jedoch wurden ebenfalls NBs identifiziert, die segmental unterschiedliche Zellstammbäume bilden. Für einen dieser NBs (NB1-1a) konnte von Prokop und Technau (1994) beobachtet werden, dass die jeweilige tagmaspezifische Identität von der Funktion der Homöotischen Gene abhängt. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen, die aus seriell homologen NBs segmentspezifische Zellstammbäume entstehen lassen untersucht. Hierzu wurde als Modellsystem der NB6-4 benutzt. Neben der genauen Kenntnis des thorakalen und abdominalen Zellstammbaums dieses NBs besteht mithilfe eines Antikörpers gegen das Protein Eagle die Möglichkeit, alle Zellen diese NBs eindeutig zu identifizieren.

In Expressions- und Funktionsverlustmutationsstudien konnte gezeigt werden, dass das G1-Phase Zyklin *CycE* in Thorakalsegmenten notwendig ist, damit sich dieser NBs als Neuroglioblast teilen kann. In Abdominalsegmenten ist dieses Gen ausreichend, einen rein glialen Vorläufer in einen thorakalen Neuroglioblasten zu transformieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zygotisches *CycE* im Verlauf der Neurogenese differenziell nur im neuronalen Anteil des thorakalen NB6-4t exprimiert wird, und dass diese unterschiedliche Expression von der Funktion der Homöotischen Gene *abdominal-A* und *Abdominal-B* abhängt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Für diese Arbeit wurden alle Chemikalien in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen: MBI Fermentas, Merck, Roche oder Sigma-Aldrich. Abweichungen hiervon werden gesondert erwähnt.

2.2. Lösungen

DAB-Färbelösung

Für Antikörperfärbung und Transplantation: 1 Tablette (10mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) auf 20 ml PBS.

Für Photokonversion der Dil-Markierung: 2-3 mg DAB/ml wird bei 40-50°C unter ständigem Rühren in Tris-HCl gelöst (DABT).

Detektionspuffer für alkalische Phosphatasefärbung

H ₂ O	412 ml
5 M NaCl	10 ml
1 M MgCl	25 ml
1 M Tris pH 9,5	50 ml
Tween20	0,5 ml

Färbelösung des TSA-Kit

12 µl Fluorophore-Cy5 Tyramide in 900 µl Amplification Reagent

Fixative zur Antikörperfärbung und *in-Situ* Hybridisierung

PBS	425 ml
Heptan	500 ml
Formaldehyd (37 %)	75 µl

Fixative zur Mikromanipulation

37 %-iges Formaldehyd Verhältnis 2:9 mit 1xPBS verdünnt.

Fluoreszenzfarbstoff Dil

Ungefähr 1 mg/ml des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanidperchlorat (Molecular Probes; Produkt-Nr.: D282) wird in handelsüblichem Salatöl bei 65°C auf dem Schüttler über Nacht gelöst. 10 µl Aliquots werden für bis zu 6 Monate bei -20°C gelagert.

Heptankleber

Als Rohmasse dient der Kleber Cello 31.39 (Firma Beiersdorf), der mit Heptan verdünnt wird.

Hybridisierungspuffer für die *in-Situ* hybridisierung

Formamid	25 ml
Tween20	50 µl
DEPC-Wasser	12,5 ml
20X SSC-Puffer	12,5 ml
(Saline Sodium Citrate Buffer)	

Injektionslösung zur Transplantation

6 % HRP (horse redish peroxidase, Meerrettischperoxidase, Firma Boehringer) und 4 % Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran in 0,2 M KCl.

Kalbserum

Unverdünntes Kalbserum der Firma Gibco, 1 ml Aliquots gelagert bei -20°C.

NBT / X-Phosphat-Färbe-Lösung

Detektionspuffer	1 ml
NBT (Nitroblau-tetrazoliumchlorid; 50 mg/ml in 70 % DMF)	4,5 µl
BCIP (X-Phosphat; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat; 50 mg/ml in 70 % DMF)	3,6 µl
(DMF: Dimethylformamid)	

20x PBS (pH 7,4)

H ₂ O	500 ml
NaCl	75,97 g
Na ₂ HPO ₄	4,14 g
NaH ₂ PO ₄	9,94 g

Im Folgenden wird 1x PBS als PBS bezeichnet.

PBTween

0,1 % Tween (Firma Riedel-de Haën) wird mit PBS versetzt.

TNT-Puffer für das TSA-Kit

TRIS-HCl, pH 7,5	1 M
NaCl	0.15 M
Tween20	0.05 %

Weiter Chemikalien

Aceton (Summenformel C₃H₆O), Chromschwefelsäure (CrO₃+H₂SO₄), Ethanol (EtOH), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glycerol (50 % und 70 %), Heptan (Summenformel C₇H₁₆), Lithiumchlorid (LiCl), Nagellack, Natriumborhydrid (NaBH₄), Vectashield Mounting Medium H-1000 (Firma Vectashield), Voltalef 10S Öl (Firma Lehmann und Voss), Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

2.3. Geräte

Binokular	MS5	Leica
	M8	Wild
Durchlichtmikroskop	Axioplan	Zeiss
	Axiophot	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	BX 50 WI	Olympus
Gelkamera	Quickstore	MS Laborgeräte
Inverses Mikroskop	Fluovort	Leica
Heizblock	TB 1 Thermoblock	Biometra
Inkubatoren	Fricocell	MMM Medcenter
	WTB Binder	Labotec

Horizontalpuller	Modell P97	Sutter
Vertikalpuller	P-30	Sutter
Kapillarenschleifgerät	Typ 462	Bachhofer
Kamera	ProgRes 3012	Kontron Elektronik
	Axiocam	Zeiss
Konfokales Lasermikroskop	TCS SPII	Leica
Magnetrührer	MR3001	Heidolph
Mikromanipulator	Leica M	Leica
Minigelapparatur	HE33 Gel Circle	Hoeter
Netzteil	GPS 200/400	Pharmacia
PCR Maschine	TGradient	Biometra
pH-Meter	CG840	Schott
Waage	PM 4600	Mettler
	AM50	Mettler

2.4. Gebrauchsmaterialien

Objektträger, Deckgläser (Größen: 18x18, 22x22 und 24x60 mm), doppelseitiges Klebeband, Pinzetten Nr.5 (Firma Dumont), Skalpell, Buchbinderfolie, 1ml Einwegspritzen, Polyethylenschlauch (Ø 5 mm), Pasteur- und Eppendorfpipetten, handelsübliche Laborflaschen, mit Knetgummi ausgekleidete große Petrischalen zur Aufbewahrung der Glaskapillaren, Eppendorfreaktionsgefäße (0,5 und 1,5 ml SafeLock), Dreierblockschälchen, Wägeschälchen, Schere.

2.5. Fliegenzucht

Die Fliegen werden auf *Drosophila*-Standardmedium in Kulturgefäßen (Ø 50 mm) bei 25°C gehalten. Zur Verbreiterung der Fliegen werden die Kulturgefäße alle drei Tage abgeschüttelt und die Fliegen auf neue Gefäße gesetzt. Die Generationsdauer unter diesen Bedingungen beträgt 220 Stunden (Ashburner *et al.*, 1982). Bei geplanten Versuchen werden die Fliegen drei Tage vor der gewünschten Eiablage mit Trockenhefe (Kaufhausware) angefüttert.

Fliegen, die nicht für Experimente benutzt werden (so genannte Stammsammlung) werden bei 18°C gehalten. Dadurch verlängert sich die Generationsdauer auf circa 440 Stunden.

2.6. Fliegenstämme

Folgende Fliegenstämme wurden zur Anfertigung dieser Arbeit benutzt:

Wildtyp

OregonR

CantonS

Referenz

Bloomington;
Lindsley und Zimm, 1992
Bloomington

Mutante Stämme

abdominal-A^{MX1} (abd-A^{MX1})

Abdominal-B^M (Abd-B^{M2})

Abd-B^{D5}

abd-A^{D24}, Abd-B^{D18}

abd-A^{M1}, Abd-B^{M8}

archipelago¹ (ago¹)

archipelago³ (ago³)

Antp²⁵

Df(3R)Ubx109 (Def109; Ubx;abd-A)

Cyclin E^{AR95} (CycE^{AR95})

Referenz

Bloomington
Sanchez-Herrero *et al.*, 1985b
E. Sanchez-Herrero
Sanchez-Herrero *et al.*, 1985b
Bloomington
Sanchez-Herrero *et al.*, 1985b
Bloomington
Sanchez-Herrero *et al.*, 1985b
E. Sanchez-Herrero
Sanchez-Herrero *et al.*, 1985b
K. Moberg
Moberg *et al.*, 2001
K. Moberg
Moberg *et al.*, 2001
AG Technau
Wakimoto *et al.*, 1984
AG Technau
Sanchez-Herrero *et al.*, 1985b
Bloomington
Knoblich *et al.*, 1994

<i>CycA</i> ³	C. Lehner Lehner und O'Farrell, 1989
<i>cdc2</i> ^{B47}	Bloomington Clegg <i>et al.</i> , 1993
<i>Cullin-1 (lin-19)</i>	Bloomington
<i>Cullin-4 (Cul-4)</i>	Bloomington
<i>dacapo</i> ⁴⁴⁵⁴ (<i>dap</i> ⁴⁴⁵⁴)	Bloomington
<i>dE2F1</i> ⁷¹⁷²	Bloomington de Nooij <i>et al.</i> , 1996
<i>eagle-lacZ (eg-lacZ; P289)</i>	AG Technau Dittrich <i>et al.</i> , 1997
<i>miranda</i> ^{L44} (<i>mira</i> ^{L44})	AG Technau Ikeshima-Kataoka <i>et al.</i> , 1997
<i>mira</i> ^{RR127}	AG Technau Ikeshima-Kataoka <i>et al.</i> , 1997
<i>prospero</i> ¹⁷ (<i>pros</i> ¹⁷)	AG Technau Doe <i>et al.</i> , 1991
<i>string (stg)</i>	C. Lehner Edgar und O'Farrell, 1989
<i>Ultrabithorax</i> ¹ (<i>Ubx</i> ¹)	AG Technau Sanchez-Herrero <i>et al.</i> , 1985b
<i>Ubx</i> ^{MX12} , <i>abd-A</i> ^{M1} , <i>Abd-B</i> ^{M8}	Bloomington Sanchez-Herrero <i>et al.</i> , 1985b

Gal4-Stämme

<i>eg-Gal4</i>	AG Technau Dittrich <i>et al.</i> , 1997
<i>even-skipped</i> ^{RRK} -Gal4/TM6b (<i>eve</i> ^{RRK} -Gal4)	N. Sanchez-Soriano Baines <i>et al.</i> , 1999
<i>scabrous-Gal4 (sca-Gal4)</i>	AG Technau; Uwe Hinz

UAS-Stämme

UAS- <i>abd-A</i>	A. Michelson
-------------------	--------------

UAS- <i>CycE</i> II und III	Lehner, C.
UAS- <i>dap</i>	Lehner, C.
UAS- <i>dE2F</i> + <i>DP</i>	Bloomington
UAS- <i>prosL</i>	Vaessin, H.
UAS- <i>prosK</i>	Vaessin, H.
UAS- <i>p21</i>	Hariharan, I.
UAS- <i>stg</i>	Bloomington

Tab. 2-1 : Fliegenstämme dieser Arbeit

2.7. Balancieren von Mutationen

Da viele Mutationen homozygot letal sind und somit im Laufe mehrerer Generationen verloren gehen würden, werden so genannte Balancerchromosome eingesetzt (zum Beispiel *CyO*; Lindsley und Zimm, 1992). Diese verhindern durch vielfältige Aberrationen Rekombination, tragen aber gleichfalls Letalfaktoren, sodass nur heterozygote Kombinationen überleben können. Durch dieses System können Mutationen langfristig in heterozygotem Zustand gehalten werden. Gleichzeitig tragen viele Balancer Markergene, wie zum Beispiel *wingless-lacZ*. Hierbei wird im balancierten Tier β -Galaktosidase im gleichen Muster wie das Gen *wingless* exprimiert. Mittels Antikörperfärbung kann dieser Marker nachgewiesen werden, wodurch eindeutig homozygot mutante Tiere von heterozygoten Tieren unterschieden werden können. Weiterhin werden für Dil-Markierungsexperimente so genannte „Greenbalancer“ eingesetzt. Hierbei wurde statt eines *lacZ* eine GFP-Variante (Green Fluorescence Protein, aus der Qualle) eingesetzt. Bei den vorliegenden Fällen handelt es sich um Balancer, die ein *Krüppel-Gal4/UAS-CD8-GFP* Konstrukt tragen. Somit wird GFP, als membranständiges Protein (Fusionsprotein mit CD8, humaner Oberflächenrezeptorprotein des Immunsystems), im Expressionsmuster des Gens *Krüppel* exprimiert. Alle heterozygoten oder homozygot balancierten Tiere leuchten somit im Fluoreszenzlicht.

2.8. Kreuzungen

Für Kreuzungsexperimente müssen von einem der beiden Ausgangsstämme jungfräuliche Fliegen gesammelt werden. Hierfür lässt man die Parentalfliegen einige Tage in frische Röhrchen Eier legen und entfernt die Fliegen danach wieder. Nach Verpuppung und anschließendem Schlüpfen werden die Tiere der neuen Generation mit CO₂ betäubt und mithilfe eines Binokulars die weiblichen von den männlichen Fliegen getrennt. Damit die weiblichen Fliegen jungfräulich sind, also keine Besamung durch die gleichzeitig schlüpfenden männlichen Fliegen stattfinden kann, wird das Absammeln in Intervallen von sechs Stunden bei Haltung auf 25°C oder alternativ alle 12 Stunden bei 18°C wiederholt. Hat man so genug jungfräuliche Fliegen des einen Stammes gesammelt, können diese nun mit männlichen Fliegen des zweiten Stammes vereinigt werden.

2.9. Ektopische Genexpression mithilfe des UAS/Gal4-Systems

Zur ektopischen Genexpression habe ich das UAS/Gal4-System nach Brand und Perrimon (1993) benutzt (siehe Abb. 2-1). Hierbei werden transgene Fliegenstämme, die transposoninduzierte Insertionen tragen benutzt. Bei einem Stamm, dem Gal4-Stamm (auch Treiber-Stamm, oder –linie genannt), wurde das Gen für Galaktosidase (Gal), einem Transkriptionsfaktor aus der Hefe, durch Insertion unter die Kontrolle eines Enhancers gebracht. Hierdurch wird nun das *Gal4*-Gen in dem gewebe-, zell- und zeitspezifischen Muster des Enhancers exprimiert. Der zweite Stamm trägt ein P-Element (transposables Element) mit dem zu exprimierenden Gen, das unter der Kontrolle mehrerer UAS-Sequenzen (upstream activating sequence) steht. Verkreuzt man nun diese beiden Stämme, so kann die spezifisch gebildete Galaktosidase an die UAS-Sequenzen binden, und somit die Expression des Zielgens in Abhängigkeit des Gal4-regulierenden Enhancers aktivieren. Durch Auswahl geeigneter Gal4-Stämme können so Genfunktionen in zeit- und gewebespezifischer Auswirkung untersucht werden. Die Gal4-Stämme und die UAS-Stämme, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind im Abschnitt 2.6. (Tab. 2-1) aufgelistet.

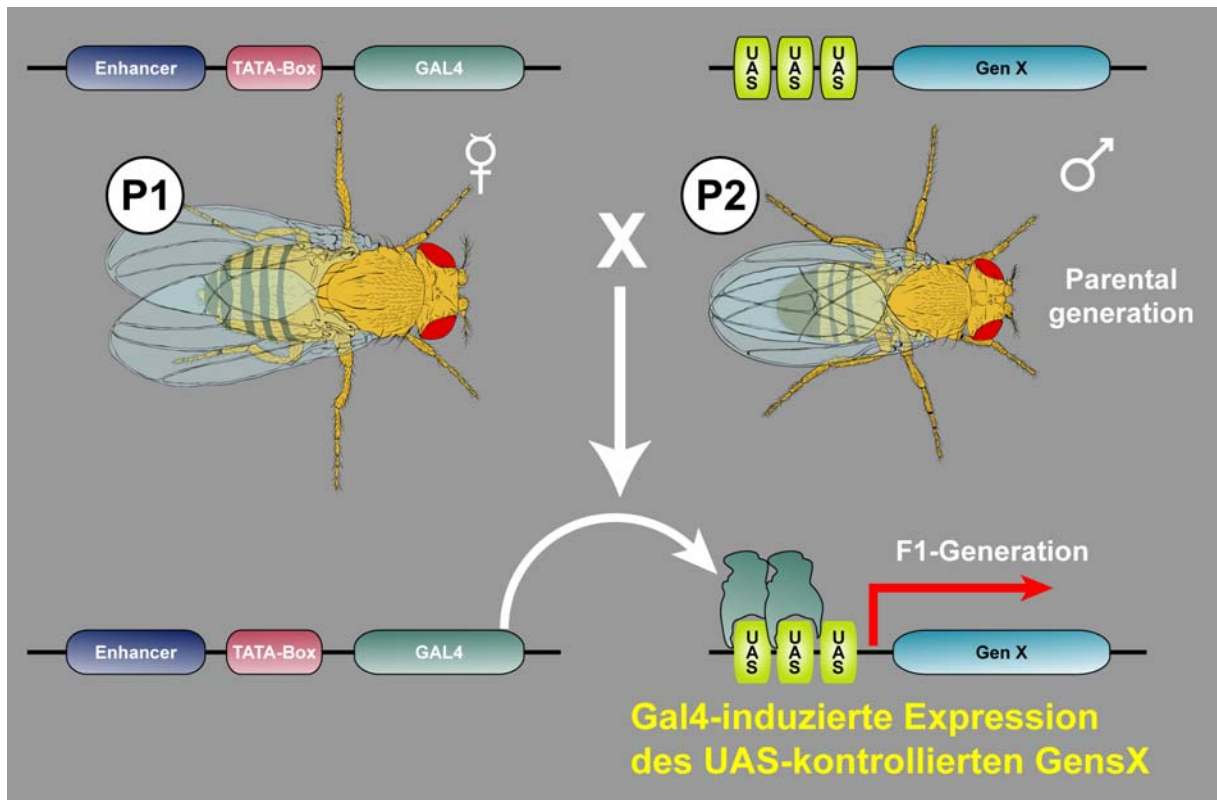


Abb. 2-1: Das UAS/Gal4-System zur ektopischen Expression eines GenX in *Drosophila* nach Brand und Perrimon (1993).

Im ersten Stamm (P1), dem *Gal4*-Stamm, wurde das Gen für Galactosidase (GAL4), einem Transkriptionsfaktor aus der Hefe, durch Insertion unter die Kontrolle eines Enhancers gebracht. Hierdurch wird nun das *Gal4*-Gen in dem gewebe-, zell- und zeitspezifischen Muster des Enhancers exprimiert. Der zweite Stamm (P2) trägt ein P-Element (transposables Element) mit dem zu exprimierenden Gen X, das unter der Kontrolle mehrerer UAS-Sequenzen (upstream activating sequence) steht. Verkreuzt man nun diese beiden Stämme, so kann in der Tochtergeneration (F1) die spezifisch gebildete Galactosidase (grün) an die UAS-Sequenzen (gelb) binden, und die Expression des Zielgens (türkis) in Abhängigkeit des Gal4-regulierenden Enhancers (blau) aktivieren. Durch Auswahl geeigneter *Gal4*-Stämme können so Genfunktionen in zeit- und gewebespezifischer Auswirkung untersucht werden.

Beispiel: Man möchte das Gen *CycE* in allen Zellen ektopisch exprimieren, die wildtypisch das Gen *eagle* exprimieren. Man benutzt also die *eg-Gal4* Linie und kreuzt diese mit der UAS-*CycE* Linie. Somit wird *CycE* durch *eg-Gal4* getrieben.

2.10. Apfelagarplatten für Eiablage

Zur Herstellung, der für die Eiablagen benutzten Ablageplatten, werden 27-28 g Agar-Agar in 1 Liter handelsüblichem Apfelsaft erhitzt und gelöst. Die Mischung wird nach kurzem Aufkochen in Petrischalen von 50 mm Durchmesser ausgegossen. Nach Erkalten können die Platten benutzt werden, oder bei 4° C ca. eine Woche gelagert werden.

2.11. Eiablagen

Es werden nur Fliegen zur Eiablage benutzt, die nicht jünger als eine halbe Woche und nicht älter als zwei Wochen sind. Hierzu werden die Tiere in Ablageröhrchen überführt und mit der Öffnung auf eine Apfelagarplatte gestellt. Die Agarplatte wurde vorher mit etwas Hefe bestreut. Zur Ventilation des Ablageröhrchens ist an der oberen Öffnung ein Drahtnetz angebracht. Damit die gelegten Eier im selben Entwicklungsstadium sind, wird das Zeitintervall der Eiablage kurz gewählt. Für die mikromanipulativen Experimente wurden Ablagen von 60 bzw. 45 Minuten Dauer verwendet. Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden entweder Übernachtsablagen oder sechsstündige Ablagen benutzt. Die erste Ablage eines Tages wird nicht genutzt, da die Eier in der Regel in heterogenem Alter sind.

2.12. Antikörperfärbung

2.12.1. Verwendete Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Primärantikörper benutzt:

Antikörper	Konzentration	Hersteller/Referenz
anti- Abdominal-A aus Maus	1:50	Duncan, I.
anti- Abdominal-B aus Maus	1:50	DSHB
anti- Antennapedia aus Maus	1:20	DSHB
anti- Archipelago aus Meerschwein	1:500	Moberg, K.
anti- β - Galaktosidase aus Kaninchen	1:2000	Cappel
anti- β - Galaktosidase aus Maus	1:500	Cappel
anti- Digoxigenin -POD	1:500	Roche
anti- Digoxigenin -AP	1:1000	Roche
anti- Eagle aus Kaninchen	1:1000	Dittrich <i>et al.</i> (1997)
anti- Eagle aus Maus	1:10	Freeman, M.

anti- Even-skipped aus Kaninchen	1:1500	Frasch, M.
anti- Fasziklin2 aus Maus	1:10	DSHB
anti- Hunchback aus Meerschwein	1:1000	Urban, J.
anti- Prospero aus Maus	1:10	Doe, C.Q.
anti- Pdm-1 aus Kaninchen	1:500	Chia, B.
anti- Reversed polarity aus Maus	1:5	DSHB
anti- Reversed polarity aus Kaninchen	1:200	Halter <i>et al.</i> (1995)
anti- Sex combs reduced aus Maus	1:20	DSHB
anti- Ultrabithorax aus Maus	1:20	White, R.

Folgende Sekundärantikörper wurden in der Konzentration 1:250 eingesetzt:

Antikörper	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen-FITC-gekoppelt	Jackson
Ziege-anti-Kaninchen-Cy5-gekoppelt	Jackson
Ziege-anti-Maus-Alexa488-gekoppelt	Molecular Probes
Ziege-anti-Maus-FITC-gekoppelt	Jackson
Ziege-anti-Maus-Cy3-gekoppelt	Jackson
Ziege-anti-Maus-Cy5-gekoppelt	Jackson
Ziege-anti-Maus-Biotin-gekoppelt	Jackson

Tab. 2-2 : Verwendete Antikörper dieser Arbeit.

2.12.2. Fixierung der Embryonen für Antikörperfärbung und *in-Situ* Hybridisierung

Zur Antikörperfärbung oder *in-Situ* Hybridisierung werden Eier entweder über Nacht oder über einen definierten Zeitraum gesammelt. Zum Beispiel werden zur

Untersuchung der Phänotypen im embryonalen Stadium 11/12 Eier über einen Zeitraum von sechs bis sieben Stunden gesammelt.

Diese Embryonen werden anschließend in 6%iger Chlorbleiche für circa zwei Minuten dechorionisiert und danach mit Wasser in einen Trichter mit Auffangnetz gespült. Nach mehrmaligem Spülen mit Wasser werden die Embryonen in ein EppendorfCap (Reaktionsgefäß) mit vorbereiteter Fixierlösung überführt. Nach 25-30 minütiger Fixierung wird die untere wässrige Phase, in der Formaldehyd gelöst ist, abgezogen und durch Methanol ersetzt. Anschließendes starkes Schütteln (vortexen) führt zur Devitellinisierung der fixierten Embryonen an der Phasengrenze Heptan/Methanol, wodurch diese auf den Boden des Caps sinken. Diese Prozedur wird mehrere Male wiederholt und schließlich die gesamte Lösung durch Methanol ersetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit Methanol können die so fixierten Embryonen zum einen bei -20°C mehrere Monate gelagert werden oder direkt weiter benutzt werden (im Folgenden beschrieben). Für *in-Situ* Hybridisierung siehe 2.13. Das Methanol wird nun durch PBT ersetzt. Mehrmaliges Waschen für insgesamt circa 15 Minuten entfernt sämtliche Reste des Methanols.

2.12.3. Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern

Die Inkubation mit den Primärantikörpern (Tab. 2-2) verdünnt in PBT erfolgt bei 4° C über Nacht auf einem Schüttler. Die niedrige Temperatur führt erfahrungsgemäß zu einem guten Bindungsverhalten der Antikörper. Am nächsten Morgen werden die Antikörper entfernt und Reste durch mehrmaliges Waschen mit PBT beseitigt. Die Antikörper werden bei 4°C gelagert und können mehrfach verwendet werden. Zur längeren Lagerung der Antikörper wird der Lösung 0,01 % Natriumazid hinzugefügt. Somit wird einer Kontamination, zum Beispiel durch Schimmelpilze, vorgebeugt.

Nach ausreichendem Waschen erfolgt die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (Tab. 2-2) verdünnt in PBT entweder für 2-3 h bei Raumtemperatur (RT) oder ebenfalls über Nacht bei 4°C.

2.12.3.1. Fluoreszenzfärbung

Die Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten, sekundären Antikörpern erfolgt im Dunkeln. Nach mehrmaligem Waschen mit PBT und PBS werden die Embryonen in einem "Mounting Medium" der Firma Vectashield entweder bei 4°C im Dunkeln gelagert oder direkt filetpräpariert (filetiert). Eine Lagerung ist jedoch nicht unbegrenzt möglich, da Fluoreszenzfärbungen im Laufe der Zeit ausbleichen. Fluoreszierende Antikörper tragen Konjugate, die durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge zur Emission längerwelligeren Lichts angeregt werden. Verwendet wurden hier Antikörper die FITC- oder Alexa-488- (Anregungswellenlänge: 488 nm), Cy3- (543 nm; Cyanin3) oder Cy5-gekoppelt (633 nm) sind. Die Auswertung erfolgt am konfokalen Laserscan Mikroskop.

2.12.3.2. Biotin- oder alkalische Phosphatase Färbung

In der vorliegenden Arbeit wurden zum immunhistochemischen Nachweis mit einer sichtbaren Färbereaktion entweder biotinylierte oder mit alkalischer Phosphatase (AP-Färbung) gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt.

Nach Inkubation mit den Sekundärantikörpern (verdünnt in PBT) werden diese mit PBT abgewaschen. Gleichzeitig wird eine AB-Komplex-Lösung (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) bestehend aus Streptavidin und Avidin (gekoppelt mit Meerrettichperoxidase) angesetzt und für 45 Minuten auf dem Schüttler durchmischt. Streptavidin komplexiert mit Avidin und bindet an Biotin, wodurch eine hoch sensitive Verstärkung erzielt wird. Nach einstündiger Inkubation mit der AB-Lösung wird diese ebenfalls mit PBT abgewaschen. Danach folgt die Nachweisreaktion mit DAB, das durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aktiviert wurde. Hierbei wird das DAB durch die Peroxidaseaktivität in einen braunen Niederschlag umgesetzt. Die Stärke der Färbung hängt von der Länge der Enzymreaktion ab, weshalb die Färbung unter dem Binokular beobachtet wird. Durch mehrmaliges Waschen mit PBT wird die Reaktion abgebrochen.

Ersetzen des PBT durch den Detektionspuffer schafft das erforderliche alkalische Milieu für die anschließende AP-Färbung. Durch Zugabe von 4,5 μ l NBT und 3,6 μ l BCIP wird die enzymatische Reaktion aktiviert. Auch hier wird die Stärke

der Reaktion unter dem Binokular beobachtet und durch Waschen mit PBT abgebrochen. Danach wird mit PBS gewaschen. Abschließend werden die Embryonen in 70 % Glycerol aufbewahrt und gegebenenfalls filetiert.

2.13. *In-Situ* Hybridisierung

Zum spezifischen Nachweis von mRNA (messenger, Botenribonukleinsäure) Transkripten wurden komplementäre RNA-Sonden hergestellt. Alle Arbeitsschritte wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt, d.h. mit Handschuhen, autoklavierte Spitzen und Glasgefäßen und RNase freien EppendorfCaps. Alle Lösungen werden mit kommerziell erhältlichem Diethyl-pyrocbonat (DEPC) behandeltem Wasser hergestellt. Jegliche Kontamination mit RNA-abbauenden Proteinen ist zu verhindern.

2.13.1. Verwendete Riboproben und deren Herstellung

In dieser Arbeit wurde eine Riboprobe zum Nachweis des *glial cells missing*-mRNA (*gcm*; Freundlicherweise von Y. Hotta zur Verfügung gestellt.) Transkripts und des zygotischen *CyclinE*-mRNA (TypI *CycE*; Freundlicherweise von C. Lehner zur Verfügung gestellt.) Transkripts benutzt.

Durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *SacI* wurde das Plasmid linearisiert, danach aufgereinigt, gefällt und anschließend mit DEPC-behandeltem Wasser (in diesem Abschnitt: Wasser) aufgenommen. Die Sonden wurden mit T3-Polymerase synthetisiert. Die Markierung der RNA erfolgte mit Digoxigenin (DIG)-markiertem UTP durch *In-vitro*-Transkription mit T3-RNA-Polymerase (Protokoll DIG-RNA Labeling Mix von Boehringer). Hierzu wurden 1 µl linearisierte Plasmid-DNA, 2 µl DIG-RNA Markierungsgemisch (10x) und 2 µl Transkriptionspuffer (10x) auf Eis zusammen pipetiert. Dies wurde mit 18 µl Wasser aufgefüllt, 2 µl T3-RNA-Polymerase hinzu gegeben und für mindestens 2 Stunden im 37°C-Wärmeschrank inkubiert. Anschließende Zugabe von 2 µl DNaseI und 15 minütiger Inkubation entfernte die Plasmid-DNA-Matrize und stoppte somit die Reaktion. Zur endgültigen Entfernung sämtlicher Enzymaktivität der RNA-Polymerase wurden 2 µl 0,2M EDTA (pH 8,0) zugegeben. EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure) ist ein Chelatbildner für

zweiwertige Kationen und stört somit die Enzymtätigkeit. Zur aufreinigung der markierten RNA, wurden 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eiskaltes Ethanol hinzu gegeben, kurz durch gemischt und dann für 1 Stunde bei -20°C ruhen gelassen. Die Lösung wurde anschließend bei 4°C für 30 Minuten mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Pellet mit 70 % eiskaltem EtOH gewaschen und für weitere 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß zum Trocknen des Pellets mit offenem Deckel bei RT für ca. 20 Minuten stehen gelassen. Die getrocknete RNA wurde mit 100 µl Wasser aufgenommen.

Zur Überprüfung der Sonde und zur Ermittlung der geeigneten Verdünnung wurden Probehybridisierungen an wildtypischen Embryonen durchgeführt, bei denen das Signal durch eine sichtbare AP-Färbung (anti-DIG-AP mit anschließender AP-Färbereaktion beschrieben in 2.12.3.2.) nachgewiesen wurde. Als geeignete Verdünnung wurde für beide Sonden 1:100 ermittelt.

2.13.2. Hybridisierung

Die Fixierung der Embryonen erfolgte wie bereits unter 2.12.2. beschrieben. Nachdem die Embryonen mit PBT gewaschen wurden, wird zur Vorbereitung auf eine Fluoreszenz *in-Situ* Hybridisierung (FISH) ein Reduktionsschritt gemacht, indem durch die Fixierung gebildete Mehrfachbindungen aufgebrochen werden und somit eine starke Autofluoreszenz verhindert wird. Hierzu werden die Embryonen für 10 Minuten mit Natriumborhydrid (0,001 mg/1ml PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen intensiv mit PBT gewaschen.

Nun wurden die Embryonen für 15 Minuten in einem Gemisch aus PBT/Hybridisierungspuffer (1:1) bei 55°C im Thermoblock (mit Schüttlerfunktion) inkubiert. Die Lösung wird durch reinen Hybridisierungspuffer ersetzt und ebenfalls für 15 Minuten bei 55°C geschüttelt. In dieser Zeit wurde eine Prähybridisierungslösung vorbereitet, bestehend aus 1 ml Hybridisierungspuffer und 10 % ssDNA (single-stranded (einzelsträngige) Herrings-Sperma-DNA). Diese Lösung wurde in kochendem Wasser für 1 Minute denaturiert. Danach wurden die Embryonen für 90 Minuten mit der Lösung prähybridisiert, wodurch unspezifische mögliche Bindungspartner blockiert werden sollten. In dieser Zeit wurde die eigentliche Hybridisierungslösung vorbereitet. Hierzu wurden 3 µl RNA-Sonde in 300

µl Hybridisierungspuffer gelöst und ebenfalls mit kochendem Wasser für 1 Minute denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde die Lösung sofort auf die Embryonen gegeben und diese über Nacht bei 63°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Sonde abpipettiert und kann, gelagert bei -20°C, mehrfach verwendet werden. Nun wurden die Embryonen für jeweils 1 Stunde in Hybridisierungspuffer, Hybridisierungspuffer/PBT (1:1) und PBT bei 63°C gewaschen. Nach kurzem Waschen in PBT bei RT folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern, entweder für 3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Ich habe in der vorliegenden Arbeit kombinierte *in-Situ* Hybridisierung und Antikörperfärbung gemacht. Daher wurden die jeweiligen Primärantikörper gemeinsam inkubiert (zum Beispiel anti-DIG-POD (für die *in-Situ* Hybridisierung) mit anti-Eg und anti-Repo).

2.13.3. Signaldetektion

Nach Inkubation mit den Primärantikörpern wurden die Embryonen gründlich mit PBT gewaschen. Anschließend wurde zuerst die FISH-Detektion (TSA Kit der Firma Perkin Elmar) durchgeführt. Hierzu wurden die Embryonen mit TNT-Puffer gewaschen. Nun wurden die Embryonen für 10 Minuten mit der Färbelösung (Cy5/Reaktionslösung 1:50; siehe auch Anleitung Perkin Elmar FISH Kit) inkubiert. Erneutes Waschen mit TNT-Puffer stoppte die Reaktion. Anschließend wurde in PBT gewaschen und mit den zweiten Antikörpern, für den Nachweis der zusätzlichen Marker (im Beispiel Eg und Repo), inkubiert (siehe auch 2.12.3.1.) Die gefärbten Embryonen wurden in „Mounting Medium“ gelagert und filetiert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscan Mikroskop. Diese Färbungen sind lichtsensitiv, weshalb alle Arbeitsschritte wenn möglich im Dunkeln durchgeführt wurden (zum Beispiel Caps mit Alufolie umwickeln).

2.14. Mikromanipulation

Als mikromanipulative Methoden habe ich sowohl die Zelltransplantation als auch die Dil-Markierung einzelner Neuroektodermalzellen benutzt. Zelltransplantation wurde im Wesentlichen durchgeführt wie beschrieben in Prokop und Technau (1993), Dil-Markierung wie beschrieben in Bossing und Technau (1994). Für

sämtliche Experimente wird ein inverses Mikroskop der Firma Leica mit Leica Mikromanipulator benutzt.

Die Methode der Zelltransplantation beruht auf der Möglichkeit alle Zellen eines Embryos, durch Injektion eines Vitalfarbstoffs in das syncytiale Blastoderm zu markieren. Benutzt werden wässrige Farbstoffe. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gemisch aus 4 % HRP und 6 % FITC gelöst in 0,2 M KCl-Lösung verwendet. Dieses Gemisch diffundiert und verteilt sich im gesamten Embryo. Nach Zellschluss (Stadium 6 nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) ist der Farbstoff in allen Zellen. Jede Zelle ist somit markiert. Entnimmt man nun eine Zelle und implantiert diese in einen unmarkierten Empfänger, so kann man diese Zelle und deren Nachkommen durch geeignete histochemische Farbreaktionen sichtbar machen.

Bei der Methode der Dil-Markierung werden mithilfe eines lipophilen Farbstoffs direkt einzelne Zellen im Embryo markiert. Der Farbstoff inkorporiert in die Zellmembran. Dies ist jedoch nur in frühen Stadien möglich (bis ca. Stadium 9), da die sich bildende Glykokalyx der Zellen ein weiteres Aufnehmen des Farbstoffs verhindert. Der Farbstoff wird an alle Nachkommenzellen der markierten Zelle weitergegeben, verbleibt aber nur in den Zellen dieses Zellklons.

Mit beiden Methoden können also klonale Analysen betrieben werden. Die Transplantation bietet die Möglichkeit zellautonome Effekte zu prüfen (im wildtypischen Hintergrund), während die Dil-Methode die Untersuchung der Zellklone in mutanten Embryonen erleichtert.

2.14.1. Kapillaren

Für die mikromanipulative Arbeit werden verschiedene Kapillaren zur Injektion, Transplantation, Markierung von Zellen und zur Filet-Präparation benötigt. Hierzu werden Borosilikat-Glaskapillaren (Meterware Firma Hilgenberg; Außen- \varnothing : 1 mm; Innen- \varnothing : 0,8 mm) mit einem vertikalen oder horizontalen Mikropipetten-Puller ausgezogen und anschließend auf einem Kapillarenschleifer geschliffen. Die jeweilige Form der Kapillare kann durch spezifische Einstellung am Puller erreicht werden. Dil-Markierungskapillaren werden am horizontalen Puller ausgezogen. Injektions- und Transplantationskapillaren können bei entsprechender Reinigung mit Chromschwefelsäure und Aceton mehrfach benutzt werden. Der Außendurchmesser der Injektions- und Transplantationskapillare wird am Mikroskop mithilfe eines

Messokulars bestimmt. Die Injektionskapillaren sollten eine Öffnung von ca. 3-5 μm Außendurchmesser haben. Dies wird durch Schleifen der Kapillare in einem Winkel von ca. 30° erreicht. Transplantationskapillaren haben eine optimale Größe bei ca. 10-12 μm Außendurchmesser. Die Dil-Markierungskapillare werden nur ganz kurz auf das Schleifgerät aufgesetzt, sodass eine Öffnung von <1 μm entsteht. Die Kapillaren werden anschließend in Aceton ausgewaschen. Präparationskapillare müssen nicht geschliffen werden.

2.14.2. Vorbereitung der Embryonen

Die Vorbereitung der Embryonen ist für beide Versuche gleich und in Abb. 2-2 dargestellt. Für Transplantation werden 1 Stunden Eiablagen benutzt, für die Dil-Markierung 45 Minuten Ablagen. Die Embryonen werden mithilfe eines Skalpell auf ein, mit einem doppelseitigen Tesafilmstreifen beklebtes, Deckgläschen gelegt, kurz antrocknen gelassen und anschließend mit einer etwas gebogenen Nadel durch leichtes Hin- und Herrollen mechanisch dechorionisiert. Sie werden mit der Nadel auf ein glattes Agarblöckchen überführt und hier in Reihen mit entsprechender Orientierung angeordnet. Ein bereits vorbereitetes, mit Heptankleber beschichtetes, großes Deckglas (24x60 mm) wird vorsichtig auf die Embryonenreihen gelegt, sodass die Embryonen am Deckglas kleben bleiben. Die so aufgeklebten Embryonen haben nun spiegelverkehrte Orientierung, verglichen mit den vorher angeordneten Reihen, was beim Aufreihen der Embryonen bedacht werden sollte.

Für die Spenderembryonen der Transplantation ergibt sich die Orientierung aus der Wahl des Entnahmeortes. Dieser sollte immer so gewählt sein, dass er auf der gegenüberliegenden Seite des Injektionsortes liegt (siehe Abb. 2-3; Kapillaren werden immer von rechts eingespannt). So werden die Zellen immer von Geweben entnommen, die noch nicht manipuliert wurden, wie zum Beispiel durch die Injektion. Die Orientierung der Spenderembryonen ist umgekehrt. Hier sollte der Implantationsort immer zur Kapillareenseite sein.

Die Embryonen zur Dil-Markierung werden immer mit der ventralen Seite zur Klebefläche orientiert. Die Mittellinie bildet die rechte Außenseite der Klebefläche, sodass ebenfalls mediale Zellen auf einer Hälfte des Embryos markiert werden können.

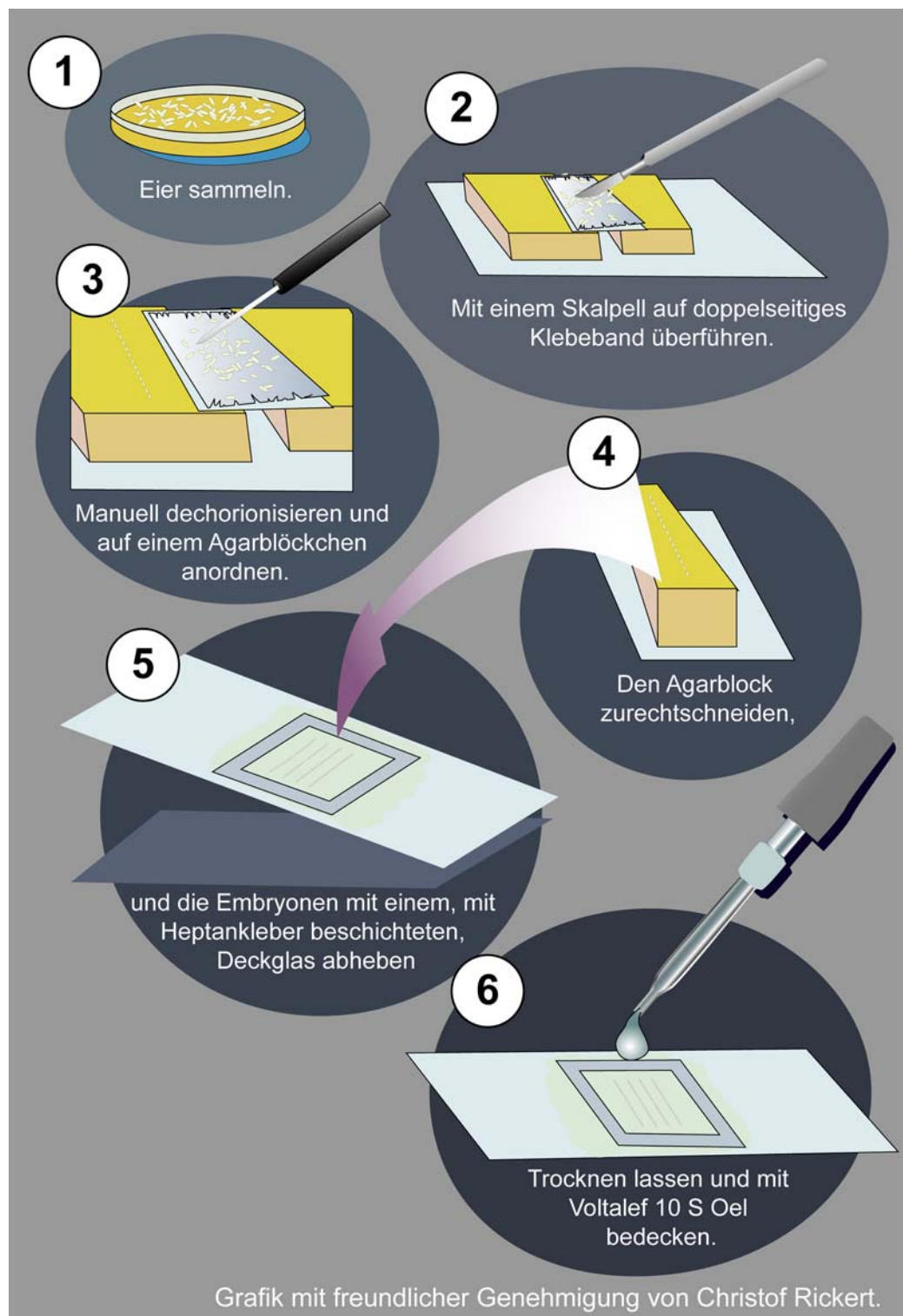


Abb. 2-2: Vorbereitung der Embryonen für mikromanipulative Experimente.
Näheres siehe Text Abschnitt 2.14.2.

Nachdem die Embryonen so aufgereiht sind, müssen sie den richtigen Trocknungsgrad erhalten, da jede mikromanipulative Arbeit ein Zuführen von Material bedeutet, was durch den Eigenturgor der Embryonen nicht möglich ist. Je nach Menge des zugeführten Materials variiert die Stärke der Trocknung. Daher müssen die Spenderembryonen am längsten, die Empfänger etwas weniger und die Embryonen zur Dil-Markierung nur kurz getrocknet werden. Da jeder

Trocknungsvorgang individuell abläuft, ist hier ein Beobachten unter dem Binokular unbedingt notwendig. Während des Trocknens wird ein kleines Rähmchen aus Buchbinderfolie um die Embryonen geklebt, das später ein Verlaufen des Öls verhindert. Haben die Embryonen den richtigen Trocknungszustand, werden sie mit 10S Voltaleföl beschichtet, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern. Die Entwicklung der Embryonen wird durch das Öl nicht weiter beeinträchtigt.

2.14.3. Einzelzelltransplantation

Die verschiedenen, durchgeführten Transplantationsexperimente werden im Ergebnisteil an jeweiliger Stelle erklärt. Hier sei nur das Prinzip kurz erläutert am Beispiel einer isochronen (Spender und Empfänger im selben Stadium; Gegenteil heterochron), isotopen (Entnahme- und Implantationsort im selben Gewebe; Gegenteil heterotop) Transplantation (nach Technau, 1986). In Abb. 2-3 ist die Methode schematisch dargestellt.

Die Spenderembryonen werden im Stadium 6 (ca. 2 ½ Stunden nach Eiablage) mit dem Vitalfarbstoff markiert. Das HRP/FITC-Gemisch wird in die Mitte des Embryos injiziert. Nach Zellschluss haben somit alle Zellen den Farbstoff inkorporiert. Injektion des Farbstoffs und Entnahme der Zellen werden bei 25facher Vergrößerung durchgeführt.

Im Stadium 8 (beginnende Gastrulation) werden nun die zu transplantierenden Zellen entnommen. Dies wird mit der Transplantationskapillare gemacht, an der ein ausgezogener Plastikschlauch mit Spritze befestigt ist, wodurch ein Unter- bzw. Überdruck in der Kapillare erzeugt werden kann. Somit kann man Zellen aufsaugen oder absetzen. Je nach Versuch werden fünf bis zehn Zellen entnommen, wobei ein definierter Entnahmeort beachtet werden muss. Bei isotopen Experimenten entspricht der Implantationsort dem Entnahmeort. Die entnommenen Zellen, werden den Empfängerembryonen, die sich im selben Entwicklungsstadium befinden wie die Spender, an gleicher Stelle implantiert. Dabei führt man die Kapillare vorsichtig über den Implantationsort hinaus in den Embryo ein und setzt, während des langsamen Herausziehens der Kapillare, eine Zelle durch leichten Druck mithilfe der Spritze ab. Durch den Fluoreszenzfarbstoff kann sofort kontrolliert werden, wie viele Zellen abgesetzt wurden (manchmal ist die Zahl schwer zu bestimmen, oder der Druck war zu stark) und ob die Zelle gut in den Gewebeverband inkorporiert wurde. Die

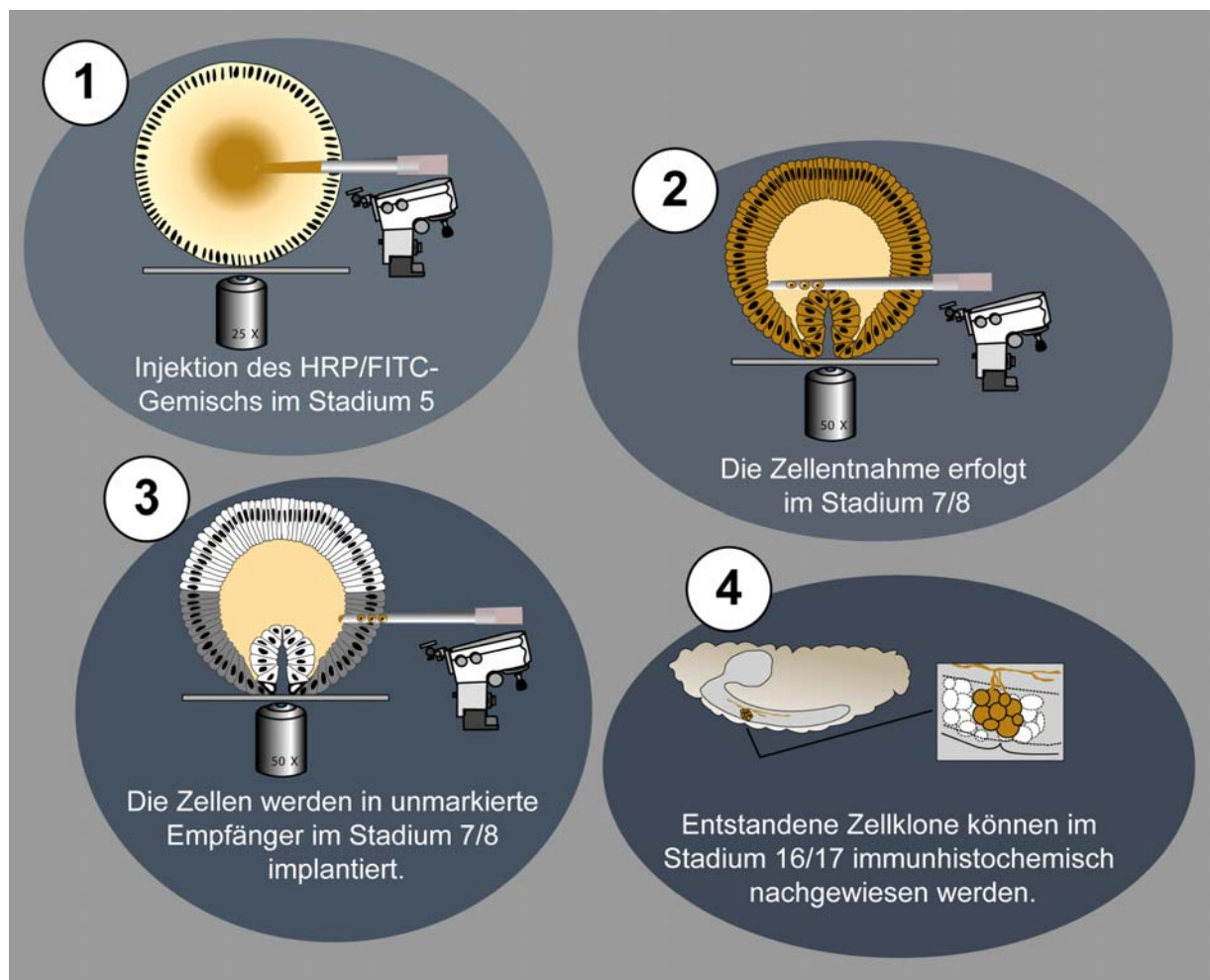


Abb. 2-3: Die Einzelzelltransplantationsmethode.

Näheres siehe Text Abschnitt 2.14.3.

Implantation der Zellen wird bei 50facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Genaue Protokollführung ist insbesondere bei mutanten Spendern wichtig.

Die so transplantierten Embryonen werden über Nacht bei 18°C weiterkultiviert. Die Weiterbehandlung der Embryonen entspricht in etwa der der Dil-markierten Embryonen, weshalb beide gemeinsam später erklärt werden (siehe 2.14.5.).

2.14.4. Dil-Markierung einzelner Neuroektodermalzellen

Für die Dil-Markierung einzelner neuroektodermaler Zellen müssen die Embryonen im Stadium 8 (beginnende Gastrulation) sein. Der optimale Zeitpunkt kann anhand der Mittellinienzellen bestimmt werden. Im Zuge der Gastrulation wandern die beiden ML-Reihen aufeinander zu. Liegen diese beiden Zellreihen eng aneinander, ist das richtige Stadium zur Markierung erreicht. Zur Illustration ist in Abb. 2-4 die Methode schematisch dargestellt.

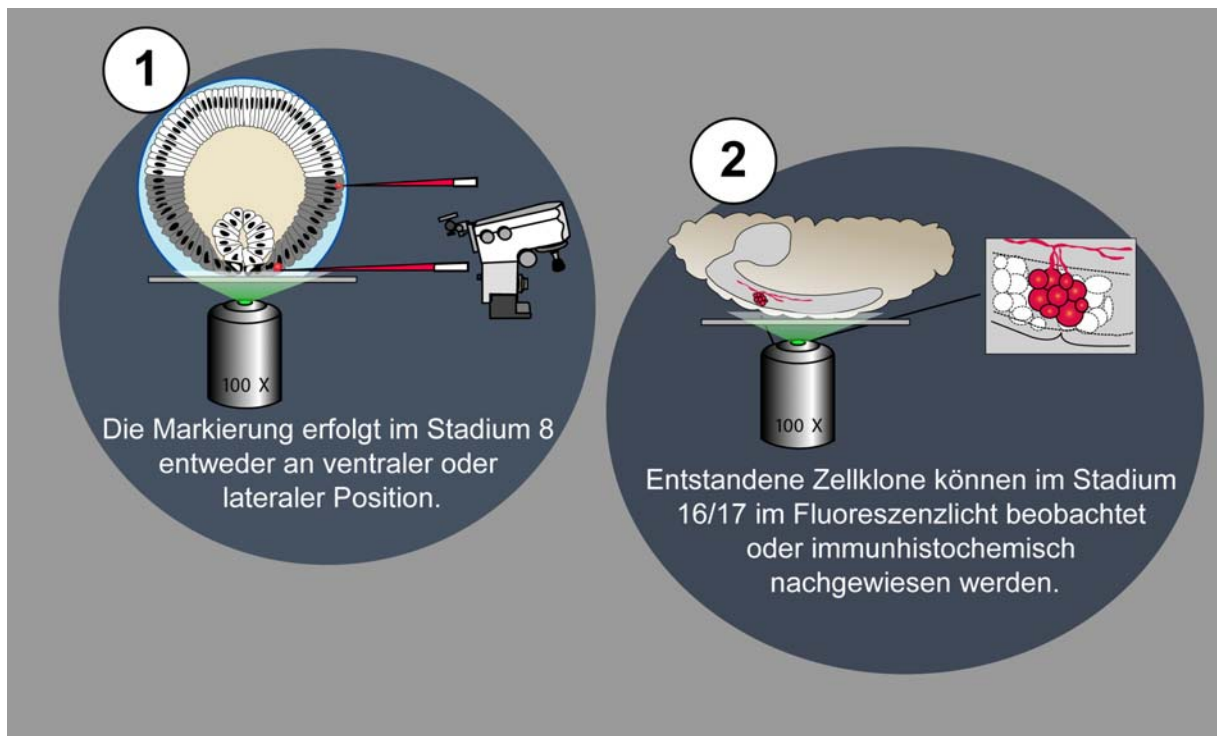


Abb. 2-4: Die DiI-Markierung neuroektodermaler Zellen.

Näheres siehe Text Abschnitt 2.14.4. Die Markierung und die Betrachtung der Klone erfolgt im grünen Fluoreszenzlicht.

Mithilfe des ausgezogenen Gummischlauchs mit angeschlossener Spritze, wird DiI-Farbstoff in die Kapillare aufgesogen. Nun wird die Kapillare auf die gewünschte Zellreihe eingestellt. Welche NBs aus welcher Zellreihe neuroektodermaler Zellen hervorgehen kann bei Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997) entnommen werden. Im Fluoreszenzlicht wird, durch Erzeugung von Druck mithilfe der Spritze, ein kleiner Tropfen des Farbstoffs auf die Zelle gesetzt. Man kann beobachten, wie der Tropfen von der Zelle inkorporiert wird. Auf diese Weise werden ca. fünf Markierungen im Abstand von vier bis sechs Zellen entlang der AP Achse vorgenommen. Hierbei wird lediglich der Kreuztisch des Mikroskops bewegt, während die Einstellungen des Mikromanipulators unverändert bleiben. Markiert wird mit einem Ölimmersionsobjektiv bei 100facher Vergrößerung.

DiI kann bei Anregungswellenlängen von 450-585 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Somit kann eine *in vivo* Beobachtung der markierten Zellen gemacht werden. Die markierten Embryonen werden über Nacht bei 18°C weiterkultiviert. Am nächsten Tag kann mithilfe der Fluoreszenz kontrolliert werden, ob die Markierung erfolgreich war. Des Weiteren werden mithilfe des Greenbalancers die mutanten Embryonen identifiziert. Je nach Fragestellung des Experiments werden nur bestimmte Embryonen weiter behandelt.

2.14.5. Weiterbehandlung der Embryonen

Die Weiterbehandlung der Embryonen ist in Abb. 2-5 dargestellt. Wenn die Embryonen das richtige Alter erreicht haben, wird das Voltaleföl mithilfe von Heptan vollständig entfernt. Es ist darauf zu achten, dass zum einen kein Öl zurückbleibt, und zum anderen nicht zu lange mit Heptan gewaschen wird, da der Kleber selbst heptangelöst ist, dieser sich also langsam auflöst. Nachdem das restliche Heptan verdampft ist, werden die Embryonen mit PBS überschichtet. Nun werden die gewünschten Embryonen mithilfe der Präparierkapillare filetpräpariert. Hierzu wird die Kapillare dorsal in den Embryo gestochen und dieser von Posterior nach Anterior aufgeschlitzt. Danach wird der Embryo neben der verbleibenden Vitellinmembran wieder auf den Kleber geklebt, die laterale Epidermis aufgespannt und das Darmgewebe entfernt. Jetzt hat man direkte Aufsicht auf das ventrale Nervensystem. Sind alle Embryonen präpariert, wird das PBS durch eine Fixierlösung (2:9 Formaldehyd/PBS) ersetzt und für fünf Minuten anfixiert. Gründliches Waschen mit PBS entfernt das Fixativ.

Die Embryonen der Transplantation werden nun mit DAB (H_2O_2 aktiviert) überschichtet und die Färbereaktion am Binokular beobachtet. Entstehende Klone können als kleine braune Zellklumpen erkannt werden. Anschließendes Waschen mit PBS stoppt die Reaktion.

Die Embryonen der Dil-Markierung müssen nun photokonvertiert werden, wodurch die ursprüngliche Fluoreszenzfärbung in eine bleibende sichtbare DAB-Färbung umgewandelt wird. Dazu werden die Embryonen einzeln auf große Deckgläschen, vorbereitet mit Buchbinderfolienrähmchen und einem Tropfen PBS, gebracht. Heptankleber wird nicht mehr benötigt, da das anfixierte Gewebe an dem Glas haften bleibt. Die so vorbereiteten Embryonen werden mit Kalbserum überschichtet, wodurch eine unspezifische Färbereaktion eliminiert wird. Anschließend wird einmal mit PBS gewaschen und DABT (ohne H_2O_2 !) auf die Embryonen gegeben. Nun wird mithilfe einer 100-Watt-Quecksilberhöchstdrucklampe das DABT photooxidiert. Dabei entsteht ein brauner Niederschlag entlang der mit Dil-markierten Zellmembranen. Somit werden sowohl Zellkörper als auch deren Axone (bei Neuronen) sichtbar. Die Reaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit PBS abgestoppt.

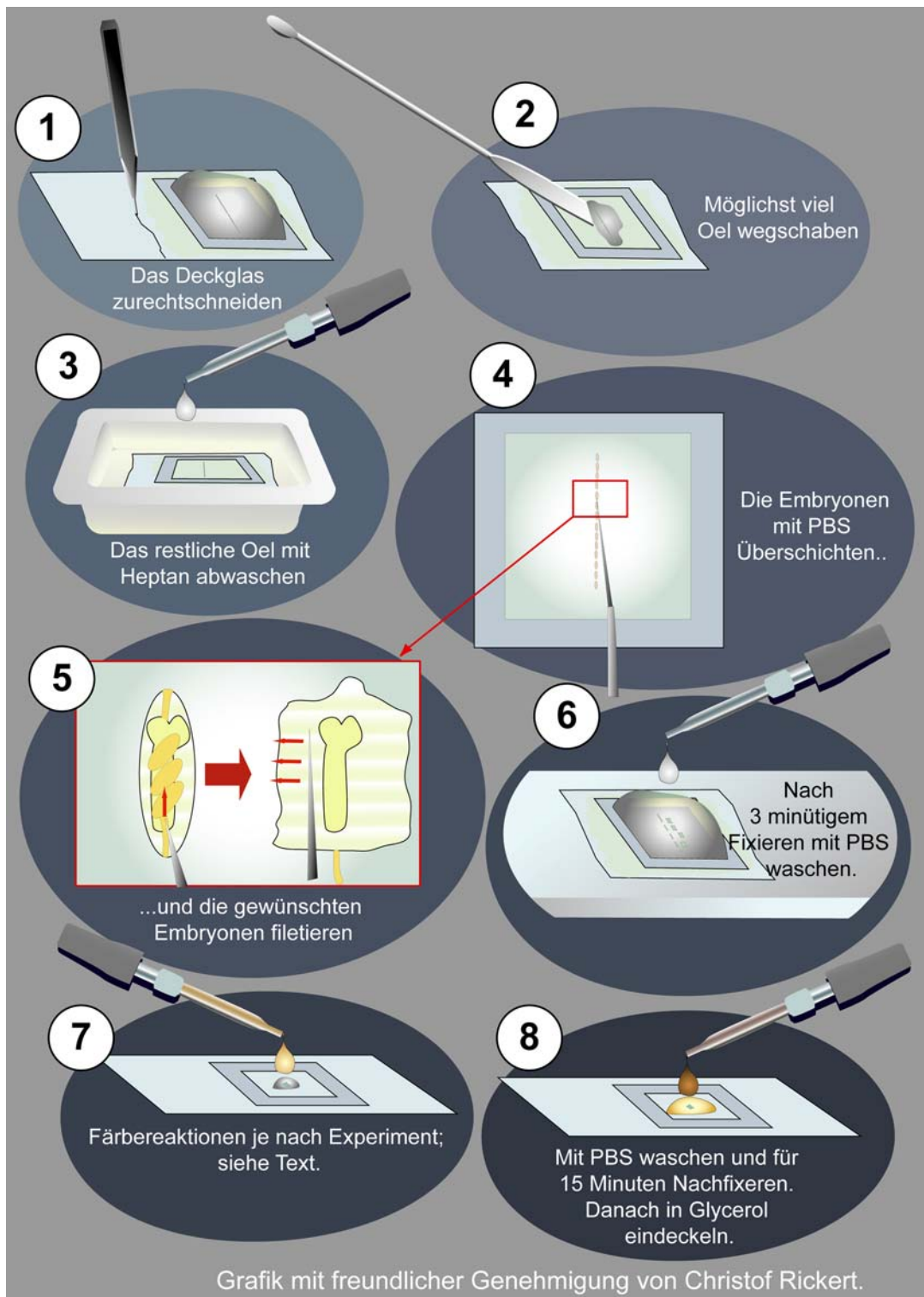


Abb. 2-5: Weiterbehandlung der Embryonen nach mikromanipulativen Experimenten.
Näheres siehe Text Abschnitt 2.14.5.

Bei beiden Versuchen ist ein Nachfixieren der gefärbten Embryonen für 15 Minuten erforderlich (dasselbe Fixativ). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS werden die Transplantationspräparate auf einem neuen Objektträger in Glycerol eingebettet.

Die Dil-Präparate verbleiben auf den Deckgläschen, das Rähmchen wird entfernt, und diese werden ebenfalls in Glycerol eingebettet. Mit einem Deckgläschen und Nagellack verschlossen, entsteht ein Dauerpräparat.

2.15. Dokumentation

Die Dokumentation von sichtbaren Färbungen erfolgt entweder an einem Mikroskop mit Kamera (Axiophot mit Kontron-Kamera) oder mit Kamera-Lucida-Einrichtung. Ersteres ergibt digitalisierte Fotografien, Zweiteres Zeichnungen der Präparate, die ihrerseits eingescannt werden und als Vorlage für Illustrationen im Programm Adobe Illustrator dienen.

Fluoreszenzfärbungen werden filetiert und die Qualität des Präparates an einem Olympus BX 50 WI mit Kamera Axiocam (notwendig für Cy5-Färbungen) beurteilt. Die eigentliche Auswertung und Dokumentation erfolgt an einem konfokalen Laserscan Mikroskop der Firma Leica (TCS SPII). So gewonnene Bilder können in Adobe Photoshop weiterbearbeitet werden - Zusammenstellungen einzelner Bilder zu Bildtafeln wird in Adobe Illustrator gemacht.

2.16. Computer und Software

Computer

Benutzt wurden verschiedene Apple McIntosh und PC Computersysteme.

Scanner Microtek ScanMaker E6

Software

Adobe Photoshop Versionen 5.0 bis 7.0; Adobe Illustrator 8.0 bis 10.0; ScanWizard 3.1.1.; ProgRes 3.03 und Version 4.0 (Kontron Elektronik); *Leica Confocal Software LCS Lite*; Amira 3D Image; Microsoft Word; Endnote; Internetexplorer.

3. Ergebnisse

A. Die zeitliche Spezifizierung verschiedener Neuroblastenpopulationen im embryonalen Bauchmark von *Drosophila*

Dieser Abschnitt der Arbeit beruht zum Teil auf Experimenten, die bereits während der Diplomarbeit angefertigt wurden. Ergänzt mit neuen Experimenten und beständig erweitert und verbessert entstand eine Publikation in der Zeitschrift *Development* 128 (17), 2001. Diese wird im Folgenden kompakt dargestellt.

Das embryonale ZNS von *Drosophila* entwickelt sich aus einem einschichtigen Neuroepithel aus dem die Neuroblasten in einem segmentalen Muster in das Innere des Embryos delaminieren. Untersuchungen der Neuroblastenentstehung haben gezeigt, dass bestimmte Neuroblastenpopulationen zu definierten Zeitpunkten gebildet werden. Der Prozess der Delamination wurde in fünf aufeinander folgende Segregationswellen (S1-S5) unterteilt. Auffällig war hierbei, dass zu ganz bestimmten Zeitpunkten immer ganz spezifische Neuroblasten entstanden (Abb. 3-1; Bossing *et al.*, 1996; Broadus und Doe, 1995; Doe, 1992; Schmidt *et al.*, 1997). So wandern in der zweiten Segregationswelle S2 die Neuroblasten 1-2, 2-2, 4-2, 6-2 und 7-2 in das Innere des Embryos. Die Delamination der einzelnen Neuroblastenpopulationen ist in Abb. 3-1 schematisch dargestellt. Obwohl viel über die Entstehung einzelner Neuroblasten und deren Determination bekannt ist, konnten bisher nur wenige Einblicke in die Mechanismen der Spezifizierung der zu bestimmten Zeitpunkten generierten Neuroblastenpopulationen gewonnen werden. Zum einen könnte die Neuroblastenidentität gemeinsam mit dem entsprechenden Delaminationszeitpunkt bereits früh in der Neurogenese irreversible festgelegt werden und so anschließend in der weiteren Entwicklung nur noch zellautonom exprimiert werden. Andererseits ist

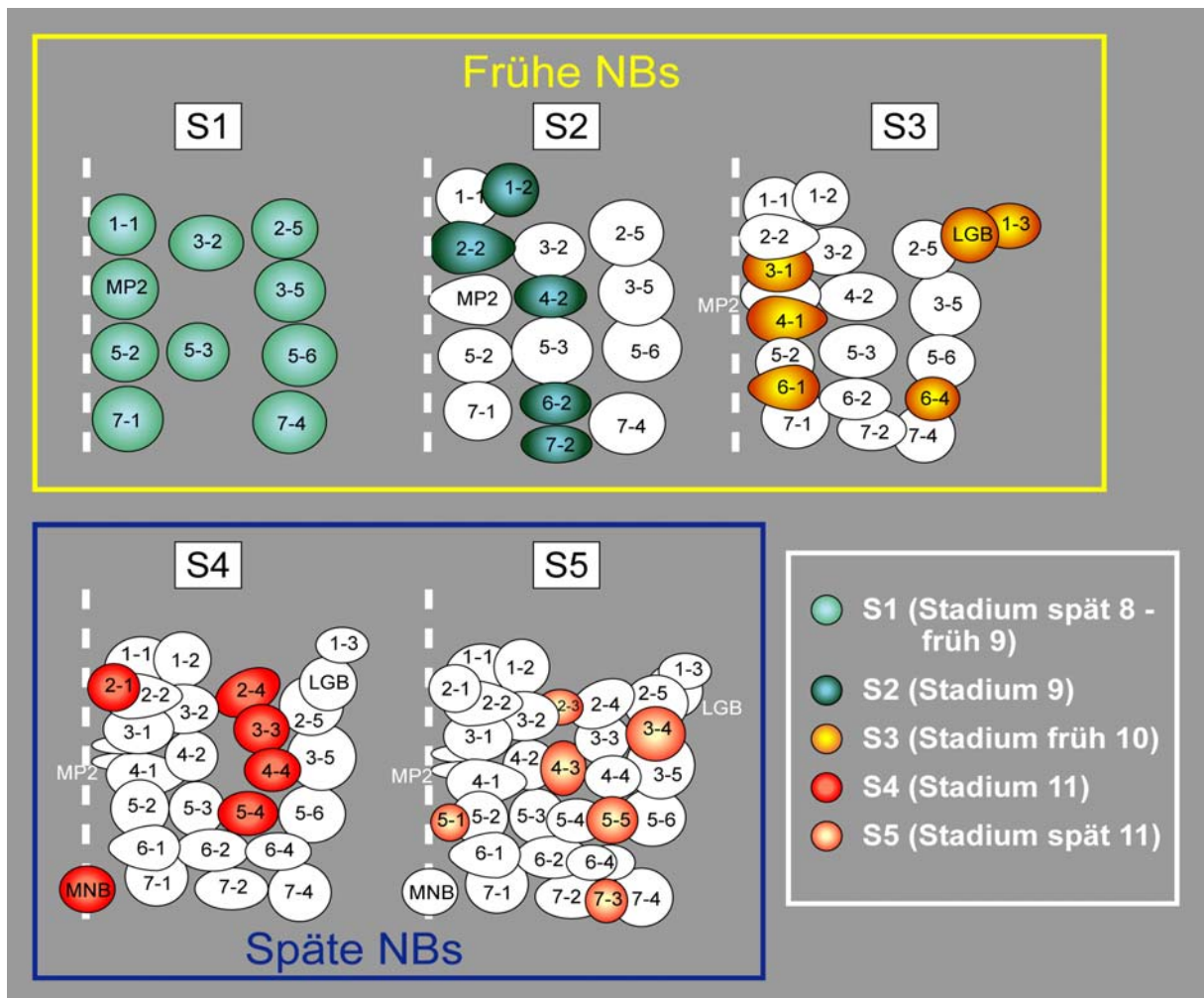


Abb. 3-1: Räumliche Anordnung und zeitliche Abfolge (S1-S5) der segregierenden Neuroblasten (verändert nach Bossing *et al.*, 1996; Doe, 1992).

Jede Teilabbildung repräsentiert ein Hemisegment, in dem diejenigen NBs farblich gekennzeichnet sind, die in dieser Segregationswelle delaminieren. Für die folgenden Experimente werden die NBs der Wellen S1-S3 als frühe NBs, und die der Wellen S4 und S5 als späte NBs bezeichnet. Anterior ist oben, die gestrichelte Linie markiert die ventrale Mittellinie.

es ebenfalls erdenklich, dass die Identität neuraler Vorläuferzellen sequenziell über zeitspezifische, extrinsische Signale vermittelt wird.

Um festzustellen, ob das Entwicklungspotential neuroektodermaler Vorläuferzellen früh determiniert wird, oder ob induktive Signale an der sequentiellen Determination spezifischer Neuroblastenpopulation beteiligt sind, wurden heterochrone Zelltransplantationsexperimente (siehe Abschnitt 2.14.) durchgeführt, die in Abb. 3-2 schematisch dargestellt sind. Beispielsweise wurden einzelne HRP-markierte neuroektodermale Zellen (NEZ) des Embryonalstadiums 7 (frühe Gastrula, vor S1) in Empfängerembryonen des Stadiums 10 (nach S2, Exp. V) transplantiert und *vice versa* (Exp. I). Das Entwicklungsschicksal der transplantierten Zellen wurde, anhand

der bekannten von ihnen gebildeten Zellklone (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997), im Stadium 16/17 bestimmt.

Nachfolgend werden NBs, die in den Segregationswellen S1 und S2 delaminieren, als „frühe NBs“ und solche, die in den Segregationswellen S3, S4 und S5 delaminieren, als „späte NBs“ bezeichnet werden. In Abb. 3-1 wird dies noch einmal zusammengefasst dargestellt. Weiterhin sind die einzelnen Neuroblastenpopulationen farblich gekennzeichnet und die embryonalen Stadien der Delamination hinzugefügt.

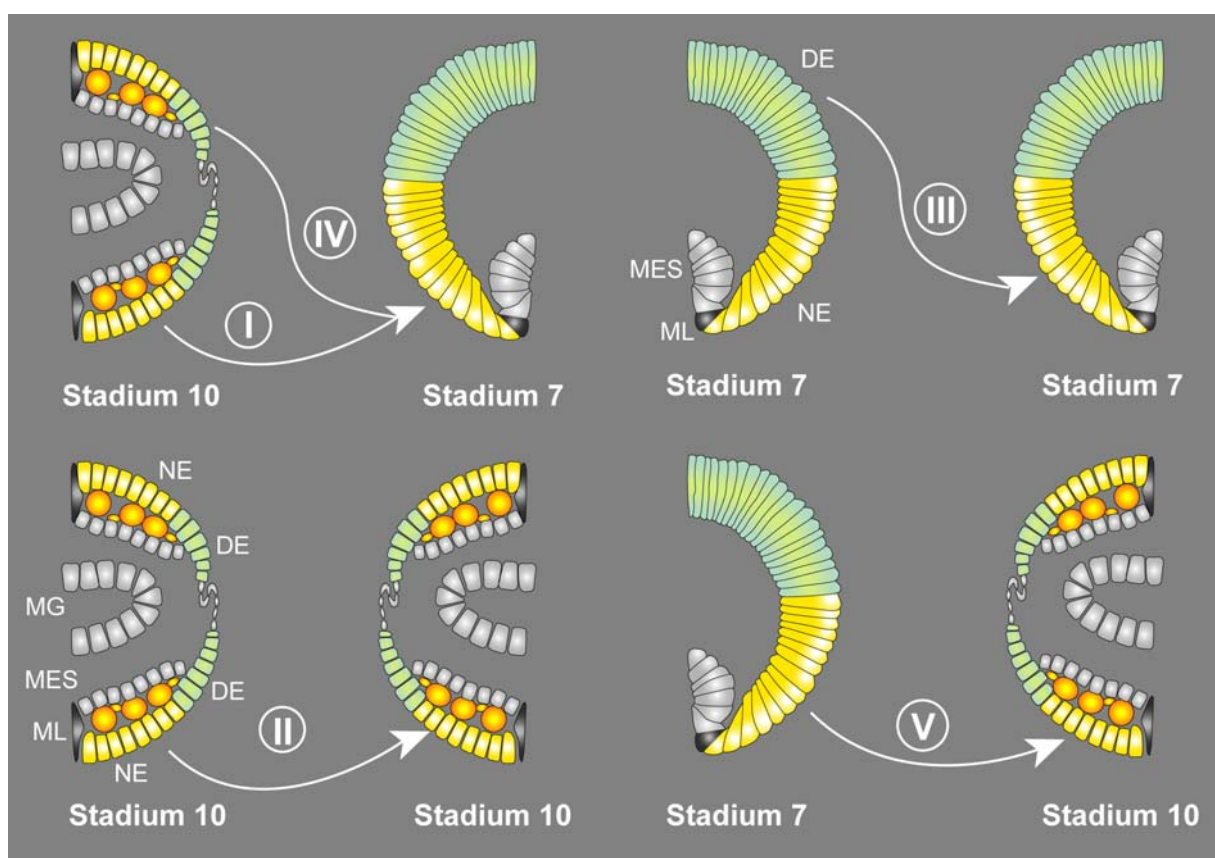


Abb. 3-2: Die Transplantationsexperimente des Abschnitts 3.A.

Gezeigt sind halbe Querschnitte gastrulierender Embryonen (Stadium 7) und Embryonen im Stadium 10 (verlängerter Keimstreif). Durch die Keimstreifverlängerung erscheinen die jeweiligen Anlagen abdominalen Segmente doppelt. Die Zellen wurden isochron isotop (Experiment I, Stadium 10 nach 10), isochron heterotop (Experiment III, Stadium 7 nach Stadium 7), heterochron heterotop (Experiment IV, Stadium 10 nach Stadium 7) oder heterochron isotop (Experiment II, Stadium 10 nach Stadium 7 oder Experiment V, Stadium 7 nach Stadium 10) transplantiert. Das Neuroektoderm (NE) ist in gelb markiert, dorsales Ektoderm (DE) in grün, Mesoderm (MES) und Mitteldarm (MG) in grau und die ventrale Mittellinie (ML) in dunkelgrau. Bereits delaminierte S1 und S2 NBs (und deren erste Gangliemutterzellen) im Stadium 10 sind orange gefärbt.

3.1. Späte Neuroektodermalzellen behalten die Kompetenz auf extrinsische Signale zu reagieren und frühes Neuroblastenschicksal zu erlangen

In einer ersten Serie von Experimenten wurden NEZ von Embryonen des Stadiums 10 heterochron in zwei Stunden jüngere Gastrula-Embryonen transplantiert (Stadium 7; siehe Exp. I in Abb. 3-2). Die transplantierten Zellen entwickelten sich zu neuronalen Zellklonen (im Folgenden auch vereinfacht als Klone bezeichnet), epider-

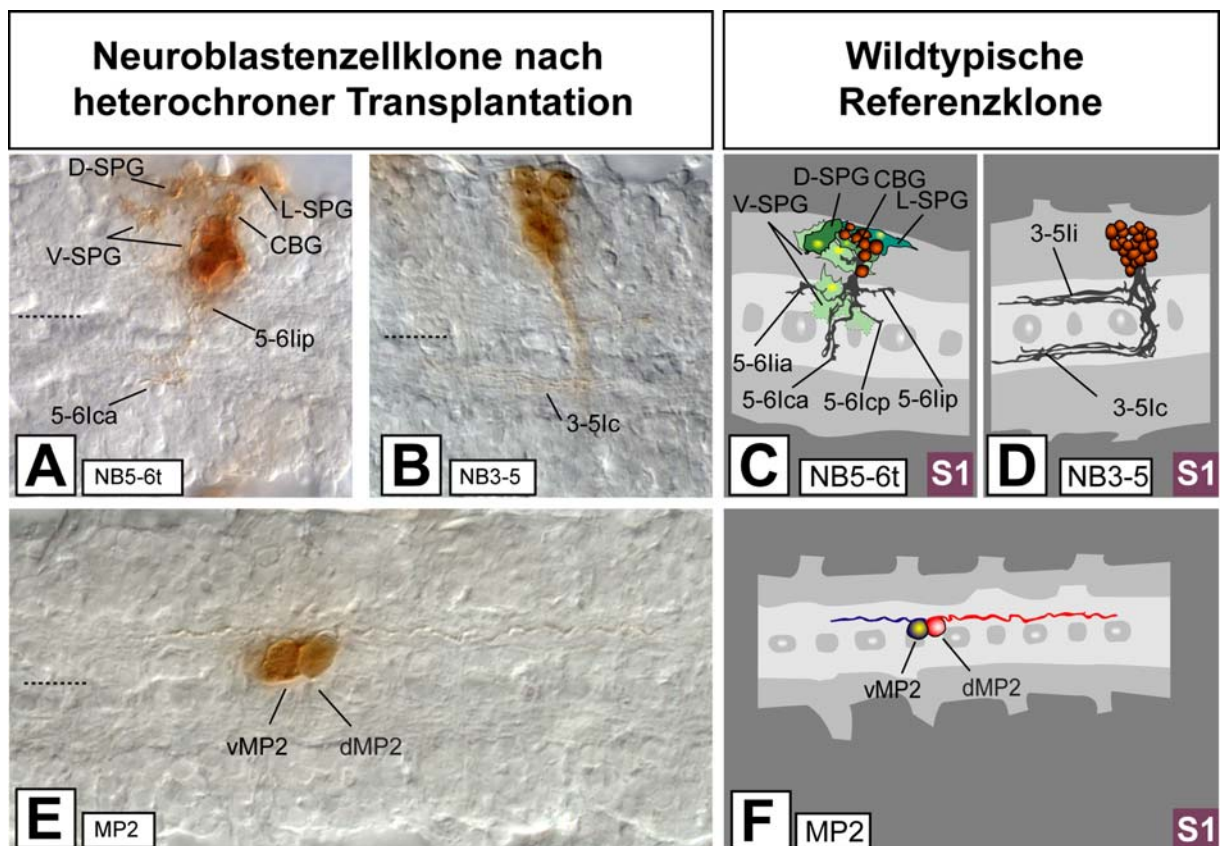


Abb. 3-3: Neuroektodermalzellen von Spenderembryonen im Stadium 10 können nach heterochroner Transplantation in Empfängerembryonen des Stadium 7 frühes Neuroblastenschicksal annehmen (Experiment siehe Abb. 3-2).

Horizontale Ansicht von HRP-gefärbten Zellklonen im Stadium 16/17 (A., B. und E.); Anterior ist links, die ventrale Mittellinie wird durch die gestrichelte Linie markiert. Schematische Illustrationen der wildtypischen Referenzklone (C., D. und F.) wurden entnommen aus Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997).

A. Der thorakale Klon des NB5-6t zeigt ein Zellcluster von circa sechs Neuronen mit kontralateralen Projektionen durch die anteriore Kommissur (5-6Ica) und kurzen ipsilateralen Projektionen (5-6lip, nicht im Fokus). Darüber hinaus können drei Subperineuralglia- (V-, D-, L-SPG) und eine Cell Body Gliazelle (CBG) beobachtet werden.

B. Der NB3-5 Zellklon hat ein Neuronencluster von ungefähr 22 Zellen, die kontralateral durch die posteriore Kommissur (3-5Ic) projizieren. Die im wildtypischen Referenzklon (D.) zu sehende ipsilaterale Projektion (3-5Ii) erscheint erst in späteren Stadien.

E. zeigt einen Zellklon des MP2 mit seinen typischen Interneuronen (vMP2, dMP2), die ipsilateral nach anterior (dMP2) und nach posterior (vMP2) projizieren.

malen Klonen oder zu gemischten epidermal/neuralen Klonen (siehe Tab. 3-1). Dies ist übereinstimmend mit früheren Daten (Technau *et al.*, 1988) und zeigt, dass die Zellen trotz ihres fortgeschrittenen Entwicklungsalters weiterhin an den Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind, durch welche die Entscheidung zwischen epidermalem und neuralem Schicksal bestimmt wird. Im Ergebnis zeigte sich, dass 50% der Zellen welche neurales Schicksal annehmen, Zellklone typisch für frühe S1- und S2-Neuroblasten bilden, wie zum Beispiel NB1-1, MP2 („midline precursor“), NB2-2 oder NB4-2 (siehe Tab. 3-2 und Abb. 3-3). Dies spricht dafür, dass NEZ des Embryonalstadiums 10, die normalerweise nur späte NBs bilden, die Kompetenz frühes Neuroblastenschicksal anzunehmen nicht verloren haben.

Transplantationsexperiment	Neurale Zellklone			
	(Zellklone von ML)	(Zellklone von NB)	Gemischte neurale/epider. Zellklone	Epidermale Zellklone
I. isotop (V), isochron (St. 10)	--	n = 16 (n = 16 (43%))	n = 1 (3%)	n = 20 (54%)
II. isotop (V), heterochron (St. 10 → St. 7)	(n = 13 (20%))	n = 44 (n = 31 (48%))	n = 4 (6%)	n = 17 (26%)
III. heterotop (D → V), isochron (St. 7)	(n = 5 (20%))	n = 16 (n = 11 (44%))	--	n = 9 (36%)
IV. heterotop (D → V), heterochron (St. 10 → St. 7)	(n = 2 (20%))	n = 6 (n = 4 (40%))	n = 4 (40%)	--
V. isotop (V), heterochron (St. 7 → St. 10)	--	n = 18 (n = 18 (14%))	n = 6 (5%)	n = 108 (81%)
* isotop (V), isochron (St. 7)		(61%)	(16%)	(23%)

D, dorsal; n, Anzahl der identifizierten Zellklone der jeweiligen Kategorie (% bzgl. der Gesamtanzahl); St., Stadium; V, ventral. Transplantationsexperimente I.-V. siehe Abb. 3-2. *Zum Vergleich Daten für isotope (v), isochrone (st. 7) Transplantation (entnommen aus Technau und Campos-Ortega, 1987).

Tab. 3-1 : Neurale und epidermale Zellklone nach Transplantation ektodermaler Zellen.

Hieraus ergab sich die Frage, warum alte NEZ unter den gegebenen experimentellen Bedingungen diese Kompetenz behalten? Es könnte hierfür mehrere Erklärungen geben: Zum einen ist es möglich, dass die Zellen willkürlich ein Neuroblastenschicksal annehmen. Andererseits könnten diese Zellen ein frühes

Schicksal autonom exprimieren, da die Zellentnahme sie von inhibierenden Signalen des späten Neuroektoderms befreit, die normalerweise zu diesem Zeitpunkt frühes Schicksal unterdrückt. Ferner könnten induktive Signale des frühen Neuroektoderms auch frühes Neuroblastenschicksal determinieren. Implantierte Zellen wären dann weiterhin kompetent, diese Signale zu interpretieren und somit frühes Schicksal zu generieren. Die verschiedenen Möglichkeiten wurden mit den nachfolgenden Experimenten getestet.

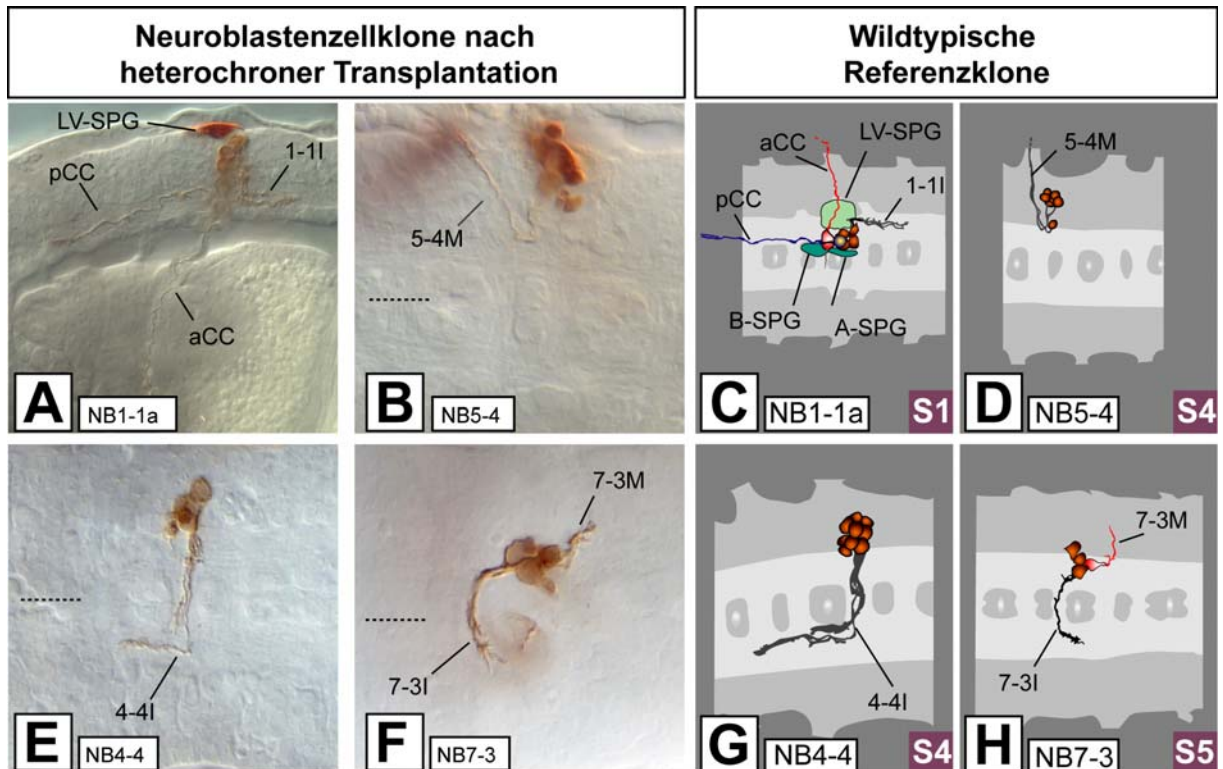


Abb. 3-4: Neuroektodermalzellen von Spenderembryonen im Stadium 7 können nach heterochroner Transplantation in Empfängerembryonen des Stadium 10 spätes (B., E. und F.) oder frühes Neuroblastenschicksal (A.) annehmen (Experiment siehe Abb. 3-2).

Horizontale (B., E., und F.) und laterale (A.) Ansicht von HRP-gefärbten Zellklonen im Stadium 16/17 (A., B., E. und F.); Anterior ist links, die ventrale Mittellinie wird durch die gestrichelte Linie markiert. Schematische Illustrationen der wildtypischen Referenzklone (C., D., G. und H.) entnommen aus Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997).

A. Der Klon des NB1-1a besteht aus einem Interneuronencluster von acht Zellen, die ipsilateral nach posterior projizieren (1-1I), dem ipsilateralen aCC Motoneuron und dem ipsilateral nach anterior projizierenden pCC Interneuron. Von den drei Superineuralgliazellen (LV-, A- und B-SPG) ist nur die LV-SPG vorhanden.

B. Der thorakale NB5-4 Klon hat ein laterales Cluster von sechs Neuronen und ein medial gelegenes Neuron. Die typische ipsilateral, anterior verlaufend Motoprojektion (5-4M) verlässt das ZNS durch den Segmentalnerv.

E. Der NB4-4 Klon besteht aus 10 Interneuronen im ventrolateralen Kortex, die kontralateral durch die posteriore Kommissur (4-4I) nach anterior projizieren.

F. Der Klon des NB7-3 besteht aus drei Interneuronen mit kontralateraler durch die posteriore Kommissur verlaufenden faszikulierenden Projektionen (7-3I) und einem posterioren Motoneuron (7-3M).

Zuerst transplantierte ich NEZ des Stadiums 10 isochron in Empfängerembryonen des Stadiums 10 (Exp. II Abb. 3-2). Bis auf eine Ausnahme (ein S2 NB) entwickelten sich neurale Klone (n=17) von späten NBs (siehe Tab. 3-2). Werden zum Vergleich NEZ isochron von Spendern im Stadium 7 in Empfänger im Stadium 7 transplantiert, so erhält man Klone über das komplette temporäre Spektrum der möglichen Neuroblastenschicksale (S1 bis S5; Udolph *et al.*, 1995; Udolph *et al.*, 1998). Hierdurch konnte ein willkürliches Neuroblastenschicksal durch methodische Einflüsse ausgeschlossen werden. Stattdessen zeigte dieses Experiment, dass die implantierten Zellen auf das neue, sie umgebende Gewebe in einer stadiumsspezifischen Weise reagieren.

Im nächsten Schritt wurden dorsale Ektodermzellen, welche normalerweise kein neurales Schicksal annehmen, heterotop in die ventrale neurogene Region transplantiert. Hierbei waren die Spender entweder im Stadium 7 (Exp. III Abb. 3-2) oder im Stadium 10 (Exp. IV Abb. 3-2); Empfänger befanden sich im Stadium 7. In beiden Fällen konnte beobachtet werden, dass die Zellen neurales Schicksal annehmen können (ebenfalls in Stüttem und CamposOrtega, 1991; Technau *et al.*, 1988; Technau und Campos-Ortega, 1986). Dieser transdeterminierende Prozess verläuft unter dem Einfluss des Neuroektoderms, da dorsale ektodermale Zellen in Kultur niemals autonom Neuroblastenschicksal annehmen (Luer und Technau, 1992). Weiterhin zeigte die Auswertung der neuralen Klone aus heterotoper, heterochroner Transplantation, dass dorsale Ektodermalzellen kompetent sind, ein frühes Neuroblastenschicksal anzunehmen (Tab. 3-2).

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass späte NEZ nicht irreversibel spezifiziert sind, sondern vielmehr auf induktive Signale des frühen Neuroektoderms (Stadium 7) reagieren und so frühes Neuroblastenschicksal annehmen können. Die zeitspezifische Determination auf frühes Neuroblastenschicksal scheint daher eher von extrinsischen induktiven Signalen des frühen Neuroektoderms abhängig zu sein, anstatt von einer zellautonomen Eigenschaft der NEZ.

Transplantationsexperimente	Neuroblastenzellklone				
	S1	S2	S3	S4	S5
I. isotop (V), isochron (St. 10)		n = 1 (6%)	n = 8 (47%)	n = 8 (47%)	
		7-2 (1)	1-3 (3), 3-1 (1), 6-4 (4)	2-1 (1), 2-4 (3), 3-3 (2), 4-4 (1), 5-4 (1)	
II. isotop (V), heterochron (St. 10 → st. 7)	n = 8 (23%)	n = 11 (31%)	n = 8 (23%)	n = 6 (17%)	n = 2 (6%)
	1-1 (1), 3-2 (1), 3-5 (1), MP2 (2), 5-6 (2), 7-1 (1)	1-2 (1), 2-2 (6), 4-2 (2), 6-2 (1), 7-2 (1)	3-1 (1), 6-1 (1), 6-4 (6)	2-1 (3), 3-3 (1), 4-4 (1), 5-4 (1)	5-1 (1), 7-3 (1)
III. heterotop (D → V), isochron (St. 7)	n = 2 (18%)	n = 1 (9%)	n = 8 (73%)		
	2-5 (1), 7-4 (1)	2-2 (1)	1-3 (5), 6-4 (3)		
IV. heterotop (d → v), heterochron (St. 10 → St. 7)	n = 2 (25%)	n = 6 (75%)			
	MP2 (1), 5-6 (1)	1-2 (1), 2-2 (2)			
V. isotop (V), heterochron (St. 7 → St. 10)	n = 3 (12,5%)	n = 2 (8%)	n = 6 (25%)	n = 10 (42%)	n = 3 (12,5%)
	1-1 (2), MP2 (1)	6-2 (2)	1-3 (1), 3-1 (1), 6-4 (4)	2-1 (4), 3-3 (1), 4-4 (2), 5-4 (3)	4-3 (1), 7-3 (2)
* isotop (V), isochron (st. 7)	(49%)	(39%)	(7%)	(2%)	(3%)

D, dorsal; n, Anzahl der identifizierten Zellklone der jeweiligen Kategorie (% bzgl. der Gesamtanzahl); St., Stadium; V, ventral. Die Neuroblastenidentitäten werden mit der Anzahl der erhaltenen Klone in Klammern angegeben. Transplantationsexperimente I.-V. siehe Abb. 3-2.
*Zum Vergleich Daten für isotope (v), isochrone (st. 7) Transplantation (entnommen aus Udolph *et al.*, 1998).

Tab. 3-2 : Identitäten der Neuroblastenklone nach Transplantation ektodermaler Zellen.

3.2. Die Zeitdauer im Neuroektoderm beeinflusst nicht die Bildung später Neuroblasten

Nachdem gezeigt wurde, dass an der Bildung der frühen NBs stadiumspezifische Signale beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob ein spätes Neuroblasten-

schicksal ebenfalls von extrinsischen Signalen im späten Neuroektoderm abhängig ist. Hierzu wurden frühe NEZ (Stadium 7) heterochron in das Neuroektoderm später Empfängerembryonen transplantiert (Stadium 10; siehe Exp. V Abb. 3-2). Von 132 identifizierbaren Klonen waren 24 (19%) neuralen und 108 (81%) epidermalen Ursprungs (Tab. 3-1). Weitere Analysen der neuralen Klone zeigte, dass ungefähr 80% (n=19) von späten NBs abstammten, wie zum Beispiel die NBs 2-1, 5-4, 6-4a oder 7-3. Nur circa 20% (n=5) wurden von frühen NBs gebildet (Tab. 3-2 und Abb. 3-4). Daher scheinen die transplantierten Zellen sich dem neuen, sie umgebenden älteren Gewebe anzupassen. Obwohl diese Zellen den Einflüssen des Neuroektoderms ungefähr zwei Stunden kürzer ausgesetzt waren, konnte eine signifikante Anzahl von ihnen diesen Zeitunterschied kompensieren. Das zeigt, dass die transplantierten Zellen an kein zeitliches intrinsisches Programm gebunden sind, um spätes Neuroblastenschicksal anzunehmen. Vielmehr konnte ich zeigen, dass die Zellen spezifisch auf induktive Signale des späten Neuroektoderms reagieren können.

Die restlichen 20% der Zellen, die frühes Schicksal exprimiert haben, könnten zum einen unterschiedlich starke Determinationszustände von Zellen im frühen Neuroektoderm widerspiegeln oder aber eine nicht ausreichende Zeit im späten Neuroektoderm verblieben sein, um unter diesen experimentellen Bedingungen auf ein spätes Schicksal determiniert zu werden.

3.3. Die Determination auf ein spätes Neuroblastenschicksal ist nicht von einer vorherigen Teilung im Neuroektoderm abhängig

Im Gegensatz zu frühen Neuroblastenklonen haben die Klone der S4- und S5-NBs immer einen epidermalen Schwesterklon. Die Zellklone der S3-NBs zeigen in einigen Fällen einen epidermalen Schwesterklon (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Dies ist abhängig von einer postblastodermalen Teilung im Neuroektoderm (Foe, 1989; Hartenstein *et al.*, 1994). Da S1- und S2-NBs zu diesem Zeitpunkt bereits delaminiert sind, teilen sich nur die Vorläuferzellen (neben den Epidermoblasten teilweise die S3-NB und alle S4- und S5-NBs), die zu dieser Zeit noch im Neuroektoderm sind. Nur eine der beiden resultierenden Zellen delaminiert

und bildet einen neuralen Zellklon. Die andere verbleibt in der Peripherie und generiert einen epidermalen Zellklon. Es stellt sich die Frage, ob diese postblastodermale Teilung eine Voraussetzung für die Determination des späten Neuroblastenschicksal ist.

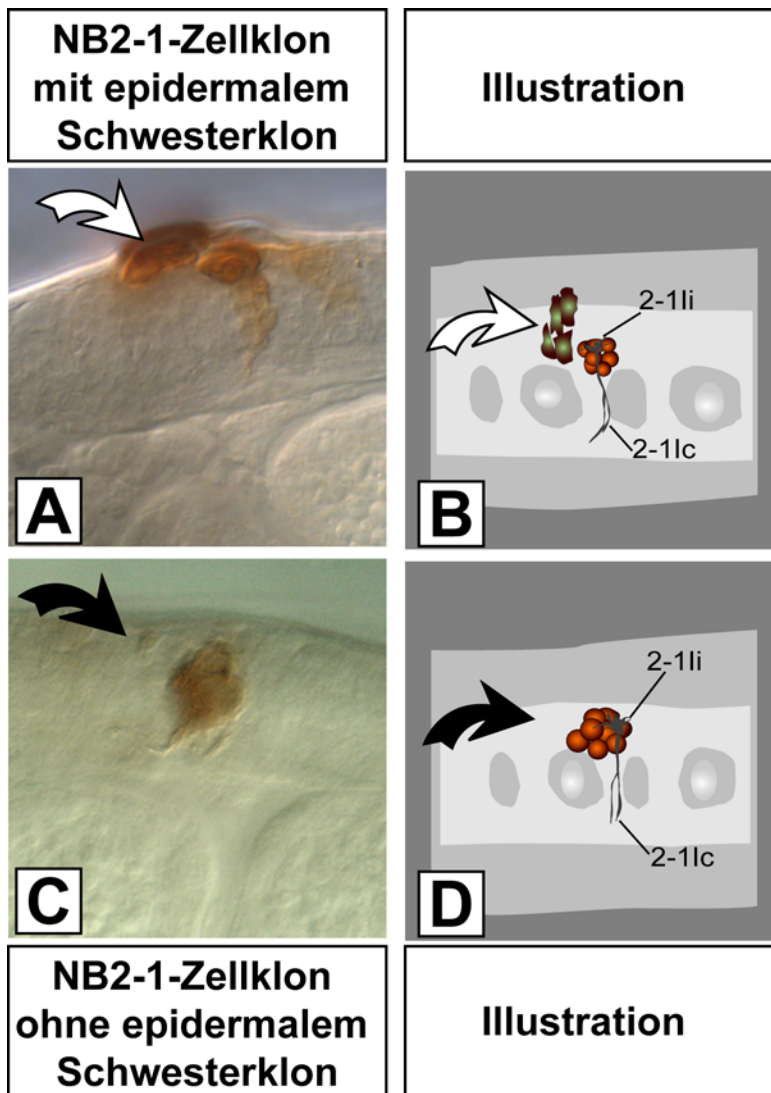
Transplantationsexperiment	Späte Neuroblastenklone mit epidermalem Schwesteklon	Späte Neuroblastenklone ohne epidermalem Schwesteklon
II. isotop (V), heterochron (St. 10 → St. 7)	n = 4 2-1, 7-3, 5-4t, 5-1	n = 4 2-1 (2), 3-3 (1), 4-4 (1)
V. isotop (V), heterochron (St. 7 → St. 10)	n = 6 2-1, 4-4, 3-3, 5-4t, 7-3 (2)	n = 11 2-1 (3), 4-4 (1), 6-4 (4), 5-4 (2), 4-3 (1)

Im Normalfall haben folgende NB immer einen epidermalen Schwesterklon NBs 1-3, 2-1, 2-4, 3-3, 4-3, 4-4, 5-1, 5-4, 5-5, 7-3. NB6-4 hat optional einen epi. Zellklon. Epidermale Schwesterklone bestehen aus 2 bis 4 Zellen (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997).

n, Anzahl der identifizierten Zellklone der jeweiligen Kategorie (% bzgl. der Gesamtanzahl); St., Stadium; V, ventral. Die Neuroblastenidentitäten werden mit der Anzahl der erhaltenen Klone in Klammern angegeben. Transplantationsexperimente siehe Abb. 3-2.

Tab. 3-3 : Späte Neuroblastenklone mit oder ohne epidermalem Schwesteklon.

Im Experiment V (Abb. 3-2) wurden NEZ aus dem Stadium 7 in das Neuroektoderm von Spendern des Stadiums 10 transplantiert. So wird die Phase, in der die postblastodermale Teilung stattfindet umgangen. Wie oben bereits dargestellt wurden die meisten Zellen in diesem Experiment auf spätes Neuroblastenschicksal determiniert. Unter normalen Verhältnisse würden also die entstandenen S4- und S5-NBs immer einen epidermalen Schwesterklon besitzen. Die experimentellen Bedingungen zeigten jedoch ein anderes Bild (siehe Tab. 3-3). Zum Beispiel hat der S4-Neuroblastenklon 2-1 immer einen epidermalen Schwesterklon bestehend aus zwei bis vier Zellen (Bossing *et al.*, 1996). Fig. 3-5 zeigt zwei Klone des NB2-1 nach heterochroner Transplantation von jungen Spendern (Stadium 7) in alte Empfänger (Stadium 10; Exp. V, Abb. 3-2). Ein Zellklon hat einen epidermalen Schwesterklon von vier Epidermalzellen (Abb. 3-5A), der andere Zellklon hat keinen epidermalen Schwesterklon (Abb. 3-5C).



Diese Ergebnisse zeigen:

(1) Das Proliferationsverhalten der einzelnen Vorläuferzellen kann vom umgebenden Gewebe beeinflusst werden.

(2) Späte NBs können aus dem Neuroektoderm delaminieren ohne eine vorherige Zellteilung zu vollziehen.

(3) Die individuelle Identität eines späten NBs und die Fähigkeit seine komplette, spezifische Zellgenealogie zu generieren ist nicht von einer vorherigen Teilung abhängig.

Abb. 3-5: Spätes Neuroblastenschicksal bedarf keiner vorherigen postblastodermalen Teilung (epidermaler Schwesterklon) um spezifiziert zu werden.

Laterale Ansicht von HRP-gefärbten Zellklonen im Stadium 16 (A. und C.); Anterior ist links, die ventrale Mittellinie wird durch die gestrichelte Linie markiert. In B. und D. sind schematische Illustrationen in horizontaler Ansicht der jeweiligen Klone gezeigt.

Die Klone entstanden nach heterochroner Transplantation von Neuroektodermalzellen des Stadiums 7 in Spenderembryonen des Stadiums 10. Beide Zellen wurden als später NB 2-1 (S4) determiniert, und haben circa acht Zellen, die kontralateral durch die anteriore Kommissur (2-1Ic) projizieren und kurze ipsilaterale, dendritische Verzweigungen (2-1Ii) haben. Dieser NB hat normalerweise immer einen epidermalen Schwesterklon, der durch eine postblastodermale Zellteilung des Vorläufers im Neuroektoderm generiert wird (Bossing *et al.*, 1996). Der Zellklon in A. zeigt diesen epidermalen Schwesterklon, der Klon in C. hat diesen jedoch nicht.

Zusammenfassend konnte mithilfe von heterochronen Zelltransplantationsexperimenten gezeigt werden, dass extrinsische induktive Signale die Spezifizierung temporärer Neuroblastenpopulationen kontrollieren. NEZ, die in ein neues, heterochrones Umfeld transplantiert werden, können ihr Schicksal entsprechend der

extrinsischen Signale anpassen. Weiterhin ist eine postblastodermale Zellteilung, die normalerweise im Neuroektoderm (circa Stadium10) geschieht bevor späte NBs delaminieren, keine notwendige Voraussetzung für die Spezifizierung von spätem Neuroblastenschicksal.

B. Entstehung tagmaspezifischer Neuroblastenzellstammbäume im embryonalen Bauchmark von *Drosophila*

Die embryonalen NBs des ZNS von *Drosophila* entstehen in einem subepidermalen, segmental reproduzierbaren Muster: NBs, die an korrespondierenden Stellen in unterschiedlichen Segmenten (Thorax versus Abdomen) gebildet werden, haben die gleiche Identität. Dies wird zum einen durch das gleiche Set exprimierter Gene (Broadus und Doe, 1995; Doe, 1992; Urbach und Technau, 2003 und Abb. 1-2 und 1-4), als auch durch die fast identischen Zellstammbäume (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997) der NBs erkenntlich. Für eine Reihe von NBs zeigte sich allerdings, dass sie in verschiedenen Segmenten unterschiedliche Zellstammbäume produzieren (tagmaspezifische Zellstammbäume, Abb. 1-5). Ausgehend von einem segmental gemeinsamen Anteil konnten Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997) entweder eine unterschiedliche Anzahl an Zellen oder auch unterschiedliche Zelltypen (zum Beispiel Motoneurone, Glia oder Neurone) finden. Die Mechanismen, die aus seriell homologen NBs segmental divergierende Zellstammbäume entstehen lassen, sind weitgehend unbekannt. In einer früheren Arbeit aus unserem Labor konnte gezeigt werden, dass Tagmaspezifität offensichtlich von der Funktion Homöotischer Gene abhängt (Prokop und Technau, 1994). So wird die abdominale Variante des NBs 1-1a beispielsweise durch die Gene *Ultrabithorax (Ubx)* und *abdominal-A (abd-A)* determiniert. Auf welche Weise die Homöotischen Gene allerdings diese tagmaspezifischen Unterschiede regulieren, wurde nicht geprüft. Ich habe den NB6-4 als Modell gewählt, um dieses Thema weiter zu untersuchen. Er wird im Folgenden beschrieben.

Dieser Teil der Arbeit wurde in Kollaboration mit **Dr. L.S. Shashidhara** vom *Center for Cellular and Molecular Biology (CCMB)* in Hyderabad/Indien erarbeitet. Eine genaue Aufstellung der Experimente befindet sich am Ende der Arbeit (siehe Anhang 7)

3.4. Der NB6-4 als Modellzellstammbaum

Durch Dil-Markierungsexperimente konnten Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997) fast alle embryonalen Neuroblastenzellklone eindeutig und vollständig identifizieren. Damals beschrieben sie bereits diejenigen NBs, die thorakal und abdominal unterschiedliche Zellklone generieren. Einer dieser NBs ist der NB6-4 (Abb. 3-6). Dieser NB wird für die weiteren Untersuchungen benutzt, da er eine Reihe wichtiger Voraussetzungen eines idealen Modellsystems erfüllt (zum Beispiel molekularer Marker zur Identifikation der gesamten Klonbestandteile).

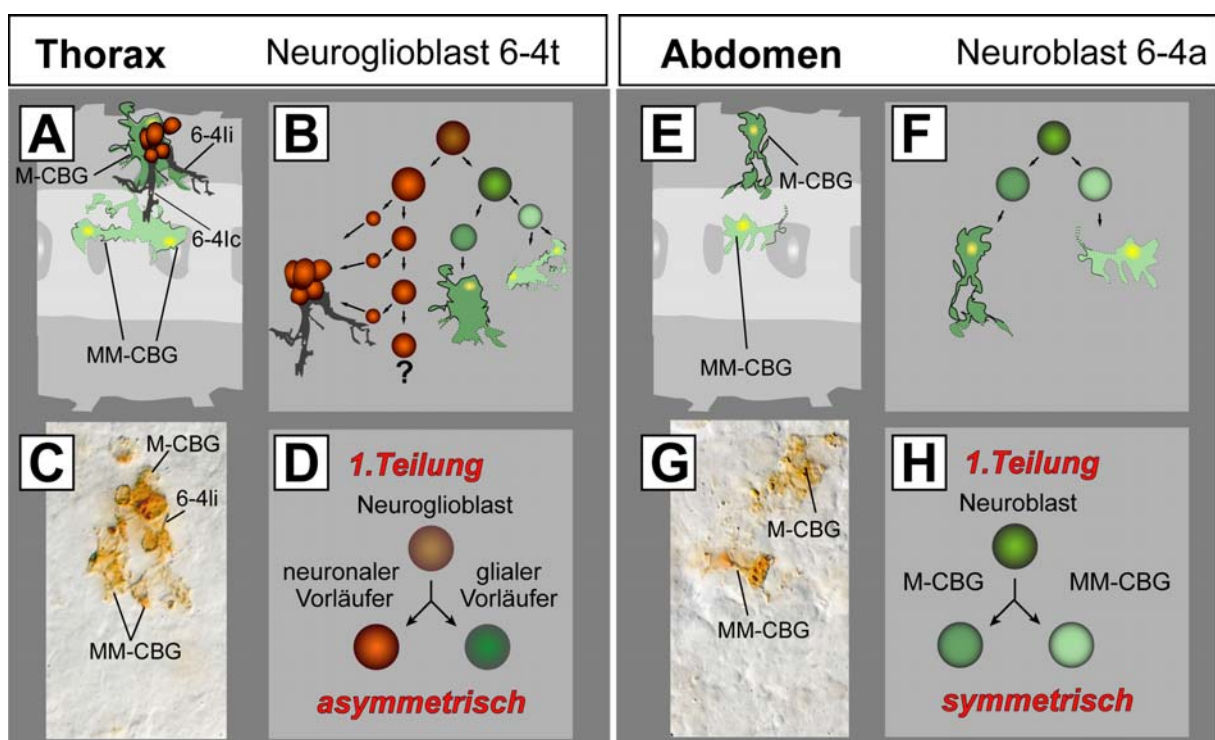


Abb. 3-6: Der NB6-4 als Modellsystem.

Der NB6-4 ist ein segmentspezifischer NB, der im Thorax als Neuroglioblast (NGB) und im Abdomen als glialer Vorläufer wirkt.

A, C. Der thorakale Zellstammbaum besteht aus sechs Neuronen mit kurzer ipsilateralen (6-4Ii) und kontralateralen (6-4Ic) Projektion. Drei „Cell Body“ Gliazellen (CBG) werden generiert. Zwei mediale „Medial Most“- (MM-CBG), die zur Mittellinie wandern, und eine „Medial“ CBG (M-CBG), die in mediolateraler Position verbleibt. Der NGB6-4t separiert den neuronalen vom glialen Anteil in einer ersten asymmetrischen Teilung (B. und D.), wobei circa neun Zellteilungen vollzogen werden (B.). Durch die erste Teilung entsteht ein NB6-4t und eine GB6-4t (D.).

E., G. Der abdominale NB6-4a generiert zwei CBG, eine mediale MM-CBG und eine mediolaterale M-CBG. Diese Zellen werden durch eine symmetrische Teilung produziert (F. und H.).

Alle Gliazellen liegen in ventraler Position.

In A., C., E. und G. ist Anterior links. C. und G. zeigt DiI-markierte Zellklone nach Photokonversion. Klone und Illustrationen entnommen aus Schmidt *et al.* (1997).

3.4.1. Bestandteile der NB6-4 Zellgenealogie

Der NB6-4 delaminiert im Embryonalstadium 10 in mediolateraler Position aus dem Neuroektoderm (Abb. 1-2 oder 3-1). Er generiert einen einfach aufgebauten Zellstammbaum (siehe Abb. 3-6; Schmidt *et al.*, 1997). In thorakalen Segmenten entsteht ein gemischter Zellklon mit neuronalen und glialen Anteilen (Neuroglia-blasten 6-4t, NGB6-4t). Diese beiden Zelltypen werden in einer ersten asymmetrischen Teilung voneinander getrennt (Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001; Ragone *et al.*, 2001). Freeman und Doe (2001) konnten zeigen, dass diese Teilung in apical-basaler Orientierung geschieht, wobei der basale gliale Vorläufer anschließend nach medial wandert. Der neuronale Vorläufer verbleibt in dorso-lateraler Position. Diese beiden Zellen können daher anhand ihrer Positionen nach der ersten Teilung sehr gut identifiziert werden. Der gliale Vorläufer teilt sich erneut in intermediärer Position. Eine der Zellen verbleibt an dieser Stelle – sie bildet die Medial Cell-Body-Glia (M-CBG). Die andere wandert weiter nach medial und teilt sich ein weiteres Mal – die resultierenden Zellen liegen dann entlang der Mittellinie und bilden zwei Medialmost CBG (MM-CBG; anteriore und posteriore, Abb. 3-6).

Der neuronale Vorläufer teilt sich mehrere Male (genaue Anzahl nicht bekannt) und produziert so eine Reihe neuronaler GMZ. Diese teilen sich erneut und generieren 5-6 Neurone in dorsolateraler Position. Die Neurone zeigen kurze ipsilaterale und contralaterale Projektionen (Abb. 3-6; und Schmidt *et al.*, 1997).

Der abdominale NB6-4 generiert durch eine symmetrische Teilung eine rein gliale Zelllinie, die aus einer intermediären M-CBG und einer medialen MM-CBG besteht (ebenfalls an der ML in anteriorer Position; Abb. 3-6; und Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001; Ragone *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1997).

Der segmental gleichbleibende Anteil der Zelllinie des NB6-4 besteht also aus zwei Gliazellen: der intermediären M-CBG und der an der ML liegenden MM-CBG (anteriore der beiden MM-CBG im Thorax).

3.4.2. Identifizierbarkeit der Zellen

Neben der Kenntnis über den genauen Aufbau der thorakalen und der abdominalen Zellgenealogie des NB6-4 gibt es einen weiteren Grund, warum dieser

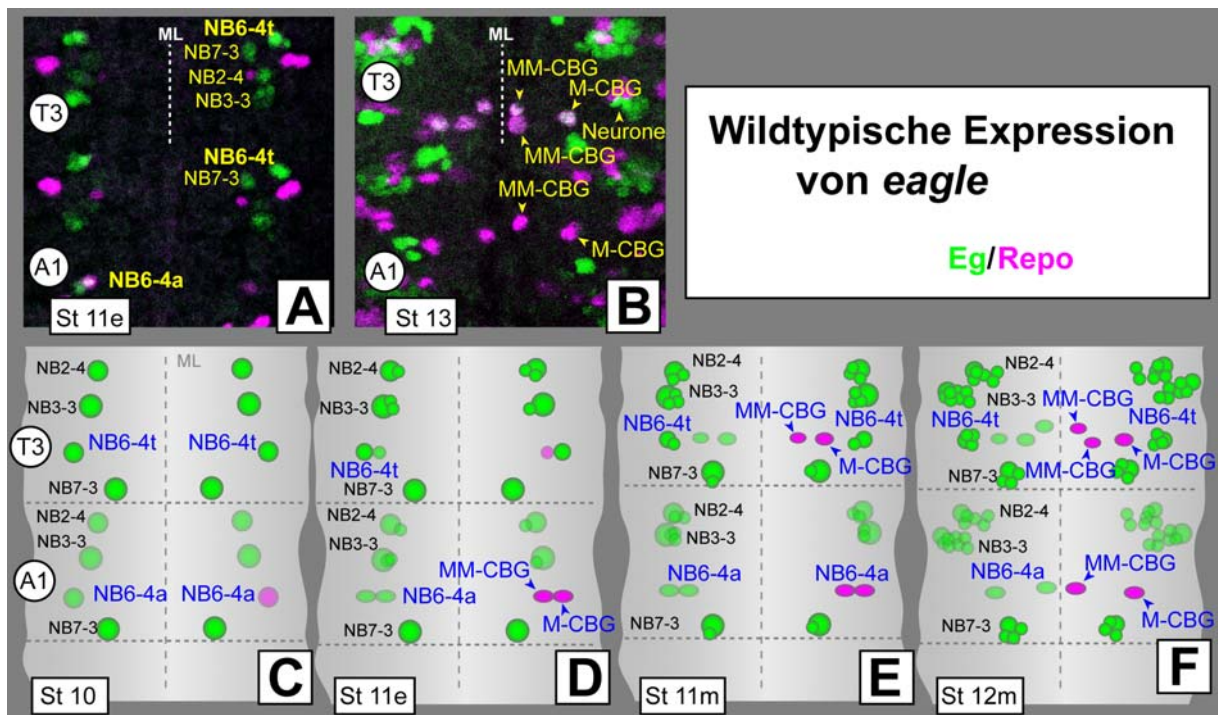


Abb. 3-7: Eagle markiert alle Zellen des NB6-4.

A. und B. zeigen Antikörperdoppelfärbungen gegen Eagle (Eg, grün) und den Gliazellmarker Reversed polarity (Repo, magenta).

In thorakalen Segmenten exprimieren vier NBs das Gen *eagle*, NB2-4, 3-3, 6-4 und 7-3. Im frühen Stadium 11 (St11e) liegen alle vier NBs an typischen Positionen (A.). In späteren Stadien (B., St13) sind dorsolateral die Eg-positiven Neurone (nur grün) und weiter ventromedial die drei Gliazellen zu erkennen, die mit Repo ebenfalls angefärbt werden können (Doppelfärbung weiß). Mit der Kombination Eg/Repo kann daher zum einen der gesamte Zellstammbaum des NB6-4 angefärbt werden, und zum anderen die Neurone eindeutig von den Gliazellen unterschieden werden. In abdominalen Segmenten exprimiert der NB6-4 nur anfänglich in geringen Konzentrationen *eagle*. Hier werden die beiden Gliazellen anhand ihrer typischen ventralen Position und der Doppelfärbung mit Repo identifiziert.

C. bis F. zeigt eine schematische Illustration des *eagle*-Expressionsmuster (grün). In den rechten Hälften ist die Expression von Repo (magenta) eingearbeitet. Die horizontalen, graugestrichelten Linien stellen Segmentgrenzen dar, die gestrichelten, vertikalen grauen Linien die ventrale Mittellinie. Jeder NB und seine Nachkommenzellen können anhand ihrer Position und der Genexpression identifiziert werden. Schwächere Färbung spiegelt eine schwächere Expression wieder. So zeigen die NBs 2-4 und 3-3 in abdominalen Segmenten fast keine Expression von *eagle*, während der NB7-3 in allen Segmenten stark *eagle* exprimiert.

Anterior ist oben. A1, abdominales Segment 1; T3, thorakales Segment 3; ML, Mittellinie (gestrichelte Linie); St, Stadium; e, früh; m, mittleres Stadium.

NB ein besonders geeignetes Modellsystem ist: Alle Zellen können eindeutig identifiziert werden. Dies geschieht mithilfe des Markergens *eagle* (*eg*). Im embryonalen *Drosophila* Bauchmark exprimieren vier NBs pro Hemisegment dieses Gen, NBs 2-4, 3-3, 6-4 und 7-3 (Abb. 3-7; Higashijima *et al.*, 1996). Um das Expressionsmuster von *eagle* darzustellen, wird sowohl mit einem Antikörper gegen Eagle, als auch mit einer *eg-LacZ*-Linie (P289; Higashijima *et al.*, 1996) gearbeitet (Abb. 3-7). Die Expression ist jedoch segmental unterschiedlich. In thorakalen Segmenten wird *eg* in allen vier NBs deutlich exprimiert, während in abdominalen Segmenten nur die Zellen des NB7-3 eine starke Expression zeigen. Die Gliazellen

des thorakalen glialen Vorläufer exprimieren zwar *eg*, allerdings nur in geringer Konzentration, so dass für diese Zellen meist kein gutes Signal erhalten werden kann. Dasselbe gilt in abdominalen Segmenten für die Gliazellen des NB6-4a – sie haben nur eine schwache anfängliche Expression (Abb. 3-7). Aus diesem Grund habe ich als weiteren Marker, *reversed polarity (repo)* eingesetzt. Dieses Gen ist ein molekularer Marker für alle sich differenzierenden Gliazellen des embryonalen ZNS (bis auf die Mittellinienglia; Halter *et al.*, 1995). Repo ist in Magenta in der rechten Hälfte der Abb. 3-7C-F eingearbeitet. Neben der Möglichkeit, die Gliazellen über eine Eg/Repo Doppelfärbung darzustellen, kann auch ihre typisch ventrale Lage im ZNS als Identifikationsmerkmal gelten.

Der komplette Zellstammbaum des NB6-4 kann somit sowohl im Thorax als auch im Abdomen mithilfe von Antikörperfärbung einfach dargestellt werden. Darüber hinaus ermöglicht die Kombination Eg/Repo, die vom NGB6-4 stammenden Gliazellen (Eg und/oder nur Repo) von den Neuronen (nur Eg) zu unterscheiden. Dies ist besonders im Hinblick auf mögliche Zellschicksalveränderungen wichtig. Die Gliazellen können zusätzlich anhand ihrer spezifischen ventralen Lage eindeutig identifiziert werden.

3.4.3. Entstehung des glialen Anteils

Frühere Arbeiten konnten bereits viele interessante Einblicke in die Mechanismen der Spezifizierung der unterschiedlichen Zellschicksale im NB6-4 geben (Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001; Ragone *et al.*, 2001). Neben Repo und Eagle fanden sich weitere molekulare Marker, mit deren Hilfe man segmentspezifische Charakteristika dokumentieren kann. Verschiedene Arbeiten konnten nachweisen, dass während der ersten Teilung des NGB6-4t Prospero (Pros) und *glial cell missing (gcm)* asymmetrisch in den glialen Vorläufer verteilt werden (Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001; Ragone *et al.*, 2001). *gcm*, das Masterregulatorgen der Gliadetermination (Jones *et al.*, 1995), ist bereits im NGB6-4t exprimiert. Die mRNA wird zunächst in der ersten Teilung an beide Tochterzellen weitergegeben. Danach baut sich die *gcm*-mRNA im neuronalen Vorläufer sehr schnell ab, während die Expression im glialen Anteil durch Pros stabilisiert und verstärkt wird (Freeman und Doe, 2001). Pros, ein Homöodomain-Transkriptions-

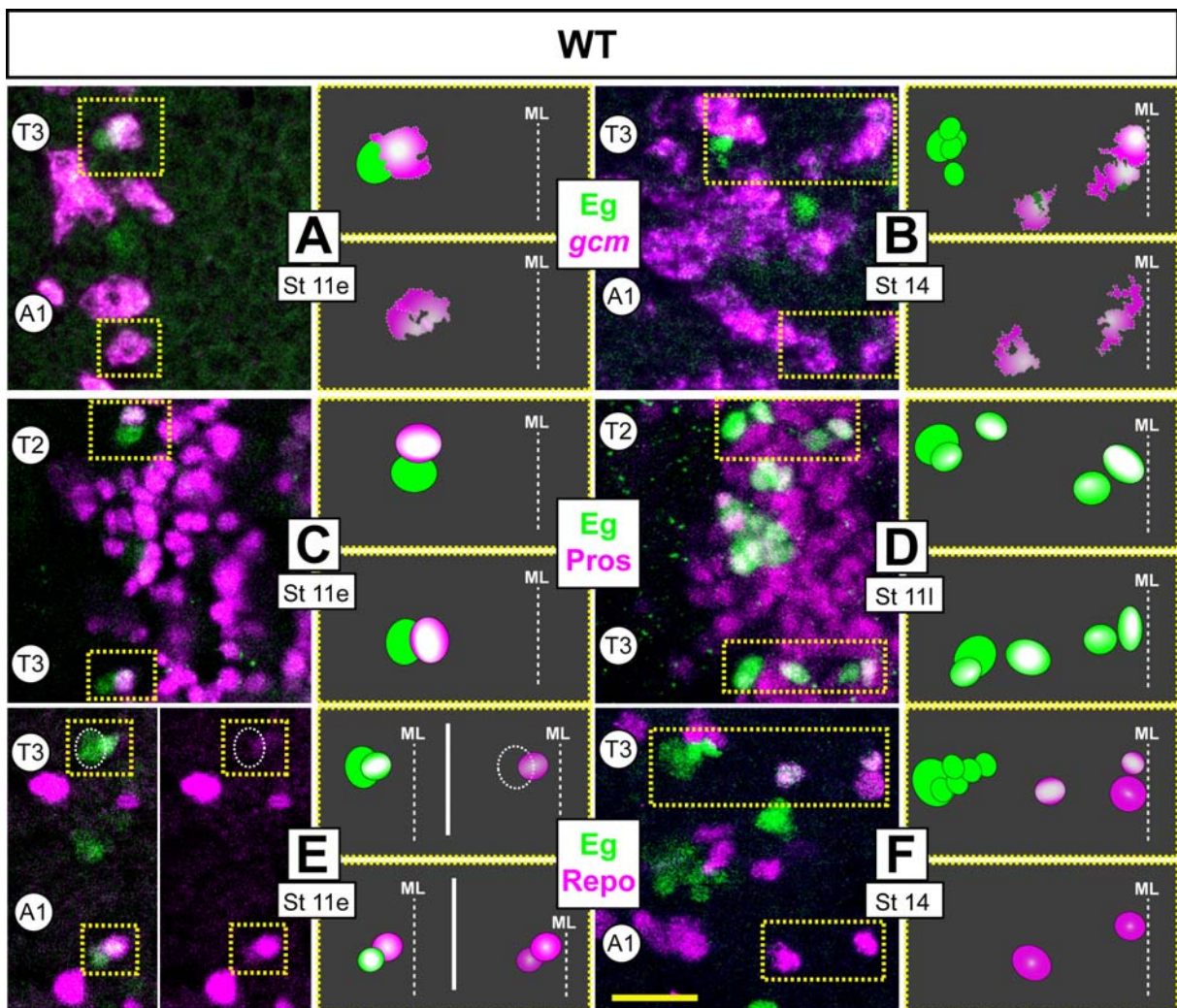


Abb. 3-8: Die Expression der Marker *glial cells missing* (*gcm*), *Prospero* (*Pros*) und *Reversed-polarity* (*Repo*) im wildtypischen Zellstammbaum des NB6-4.

A., B. Nachweis der *gcm*-mRNA (magenta) mit Fluoreszenz *in-Situ* Hybridisierung. In thorakalen Segmenten wird *gcm* nach der ersten Teilung im medialen Gliavorläufer exprimiert (A.). Beide Zellen in abdominalen Segmenten haben *gcm* Expression (A.). In späteren Stadien (B.) sind in abdominalen Segmenten weiterhin zwei Zellen *gcm*-positiv, während in thorakalen Segmenten nur die Gliazellen *gcm* Expression zeigen. Die lateralen neuronalen Zellen sind nur Eg-positiv.

C., D. *Pros* (magenta) wird während der ersten thorakalen Teilung asymmetrisch in den glialen Vorläufer verteilt (C.). In Abdominalsegmenten zeigen beide Zellen ein *Pros*-Signal in. Neben den Gliazellen exprimieren auch in späteren Stadien die dorsolateral gelegenen neuronalen Gangliemutterzellen (D.) *Pros*.

E., F. *Repo* (magenta) wird nur im glialen Anteil des NB6-4 exprimiert. In frühen Stadien (E.) ist in thorakalen Segmenten der mediale Gliavorläufer positiv, während in abdominalen Segmenten beide Zellen *Repo*-positiv sind. In späteren Stadien (F.) zeigen die Gliazellen *Repo* Expression, die dorsolateral gelegenen neuronalen Zellen sind nur Eg-positiv.

In dieser und in allen weiteren Abbildungen gilt: Anterior ist oben. In allen Bildern wird Eg-Antikörperfärbung (immer grün) benutzt, um die Zellen des NB6-4 zu identifizieren. Die schematischen Illustrationen in der rechten Seite der Bilder stellt den ausgewählten Bereich dar (gelbes Viereck). Nur die Zellen, die zum NB6-4 gehören, werden illustriert dargestellt. A1, abdominales Segment 1 (oder andere Zahl, 1 bis 8); T3, thorakales Segment 3 (oder 1 bis 3); ML, Mittellinie (gestrichelte Linie); St, Stadium; e, früh; m, mittleres; l, spätes Stadium; WT, Wildtyp. Messbalken entsprechen immer 20 μ m.

faktor, verteilt sich während dieser ersten Teilung unter dem Einfluss von Miranda (Mira) asymmetrisch in den glialen Vorläufer (Matsuzaki *et al.*, 1998). Nach der

Teilung wird Pros dann in den Kern transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor verschiedene Gene reguliert – unter anderem die Expression von *gcm*. In Abb. 3-8A bis D sind die Expressionsmuster von *gcm* durch Fluoreszenz *in-Situ* Hybridisierung (FISH) und von Pros als Antikörperfärbung im wildtypischen NB6-4 dargestellt. In allen nun folgenden Abbildungen wurde zur Identifizierung der NB6-4 Zellen immer Eg benutzt. Deutlich ist zu erkennen, dass in thorakalen Segmenten nur eine der beiden Tochterzellen nach der ersten Teilung doppelt gefärbt ist (Abb. 3-8A, C.) Diese Zelle liegt medial. Die Färbung mit Repo zeigt, dass dies der thorakale gliale Vorläufer ist (Abb. 3-8E, F). In späteren Stadien wird deutlich, dass alle Tochterzellen des glialen Vorläufers Pros und Repo exprimieren (Abb. 3-8D, F).

Die thorakalen Gliazellen sind von *gcm*, Pros und *hunchback* abhängig

Für die Faktoren *gcm* und Pros (frühe Expression) konnte gezeigt werden, dass sie für die Bildung der thorakalen Glia des NB6-4 notwendig sind. Akiyama-Oda *et al.* (2000b) und Freeman und Doe (2001) zeigten überdies, dass in *pros*-Funktionsverlustmutanten die Anzahl der Gliazellen signifikant verringert ist. In Abb. 3-9B ist eine Eg/Repo Färbung in einem Fliegenstamm einer *pros*-Funktionsverlustmutation (*pros*¹⁷) zu sehen. Hier werden in ca. 95% (n=63) aller untersuchten thorakalen Hemisegmente (tHS) keine NGB6-4 Gliazellen gebildet. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit in sehr späten Stadien (16/17) ein Anstieg der dorsolateralen Eg-positiven Neurone beobachtet werden (von fünf bis sechs im WT auf acht bis zehn; Abb. 3-9C).

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Embryonen bestimmter *miranda*-Funktionsverstärkungsmutationen. Miranda wurde als wichtiger Faktor für die basale Verankerung des Pros Proteins während der Neuroblastenteilung beschrieben (Ikeshima-Kataoka *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 1998). In Abb. 3-9D ist die *mira*-Funktionsverstärkungsmutation (*mira*^{RR127}) gezeigt. Dieses mutante Allel bewirkt, dass Pros während der Teilung zwar basal lokalisiert, aber nach der Teilung nicht mehr von Mira freigegeben wird und Pros daher nicht in den Kern transloziert (Ikeshima-Kataoka *et al.*, 1997). Dies kommt einer *pros*-Funktionsverlustmutation gleich – und dementsprechend werden in *mira*^{RR127} mutanten Embryonen keine Gliazellen, aber zusätzliche dorsolaterale Neuronen generiert (Abb. 3-9D). Akiyama-Oda *et al.* (2000b) und Freeman und Doe (2001) beschrieben dies ebenfalls.

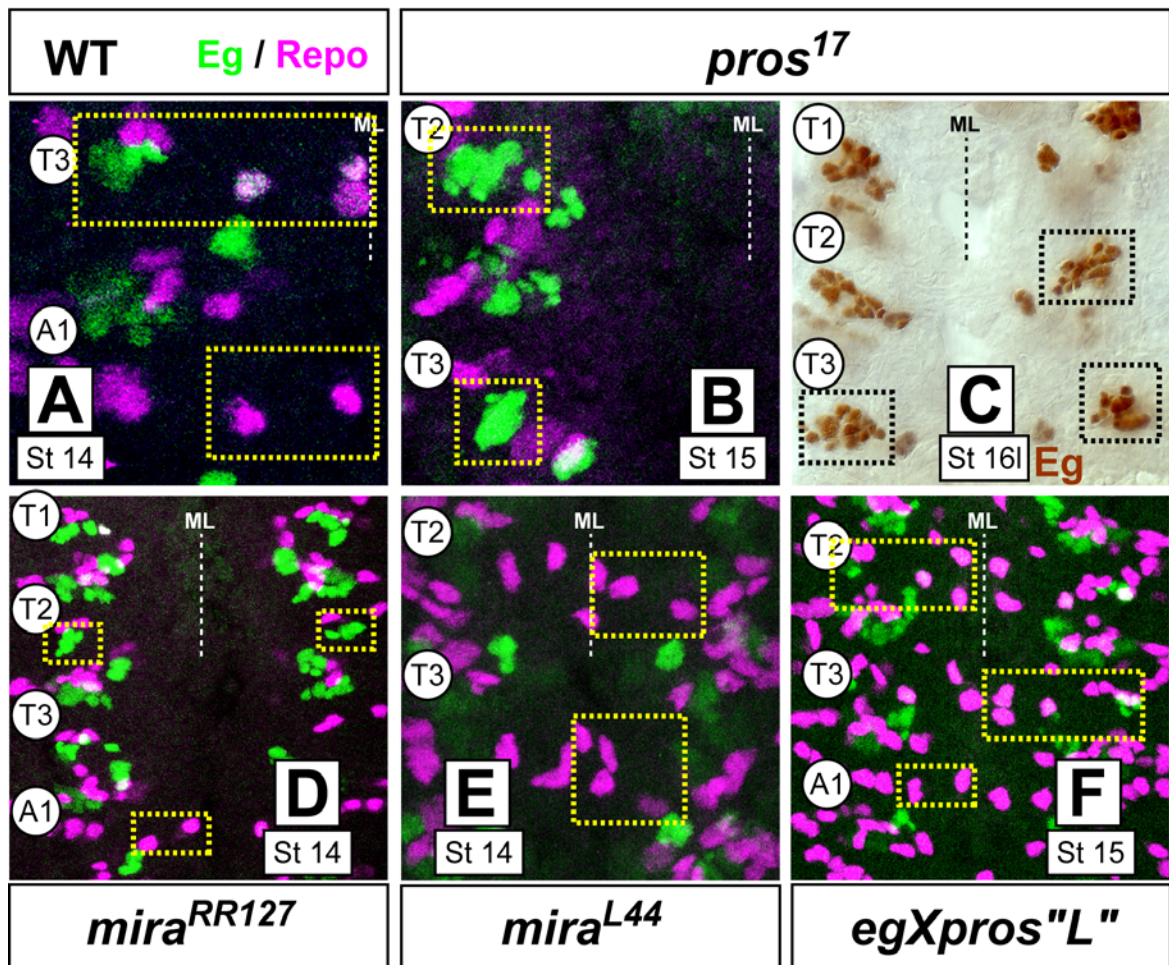


Abb. 3-9: Die Bildung der Gliazellen im NB6-4 ist abhängig von *prospero*.

A. Wildtypische Färbung gegen Eg (grün) und Repo (magenta). In thorakalen Segmenten entstehen drei Repo-positive Gliazellen, in abdominalen nur zwei.

B., C. In *pros*¹⁷-Funktionsverlustmutationen sind keine Gliazellen mehr zu erkennen. Die Anzahl der dorsolateralen Eg-positiven Neurone ist stark erhöht. (von 5-6 im Wildtyp (WT) auf bis zu 12).

C. zeigt eine Eg-Biotin-Färbung (siehe Abschnitt 2.12.3.2.) in der *pros*¹⁷-Funktionsverlustmutante im späten Stadium 16. Auch hier sind zusätzliche dorsolaterale Neurone zu beobachten (schwarze Vierecke)

D. In *miranda*^{RR127}-Funktionsverstärkungsmutationen ist der gleiche Effekt zu beobachten. Pros wird durch Mira kortikal verankert. In dieser Funktionsverstärkungsmutation wird Pros nach der Teilung nicht freigegeben. Somit entspricht dies einer *pros*-Funktionsverlustmutation, keine Gliazellen werden gebildet, jedoch steigt die Anzahl der dorsalen Neurone auf bis zu 12 an.

E. In *miranda*^{L44}-Funktionsverlustmutationen wird Pros symmetrisch in beide Zellen nach der ersten Teilung lokalisiert. Hierdurch werden nur Gliazellen gebildet. Dorsale Neurone können nicht beobachtet werden.

D. Eine ektopische Expression von *pros* mithilfe der *eg*-Gal4-Linie zeigt jedoch Neurone in dorsaler Position. Die Anzahl der Neurone ist allerdings geringer im Vergleich zum WT.

Eine andere *miranda*^{L44}-Funktionsverlustmutation verdeutlicht die Rolle von Pros bei der Bildung der Gliazellen (Abb. 3-9E). In dieser Mutante kann das entstehende Miranda-Protein Pros nicht mehr binden und kortikal verankern. Deshalb wird Pros in der ersten Teilung nicht asymmetrisch, sondern gleichmäßig in beide Zellen (neuronaler und glialer Vorläufer) verteilt (Ikeshima-Kataoka *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*,

1998). Dadurch werden keine Neuronen gebildet. Weiterhin konnte ich in einigen Fällen zusätzliche Gliazellen beobachten (Abb. 3-9E; vier bis fünf statt drei, 42% tHS; n=35). Dies wurde ebenfalls von Akiyama-Oda *et al.* (2000b) und Freeman und Doe (2001) berichtet. Diese beschrieben darüber hinaus eine ektopische Expression von *gcm* im Stadium 13, einem Zeitpunkt, in dem normalerweise nur noch Neurone generiert werden. Offensichtlich wirkt *Pros* in dieser Situation nicht nur im glialen Vorläufer auf die *gcm*-Expression, sondern ebenfalls im neuronalen Vorläufer, wodurch dieser seine neuronale Identität verliert und ebenfalls Gliazellen produziert.

Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, ob eine ektopische Expression von *pros* im neuronalen Vorläufer denselben Effekt hat, wie die symmetrische Verteilung von *Pros* in der *mira*^{L44}-Funktionsverlustmutation. Die *eg-Gal4*-Linie wurde benutzt, um ein UAS-*pros*-„L“-Konstrukt ektopisch im NGB6-4t zu exprimieren. Unter diesen experimentellen Umständen war kein Effekt zu beobachten (Abb. 3-9F). Eventuell könnte eine ektopische Expression mit einer früheren und stärkeren Gal4-Linie (zum Beispiel *sca-Gal4*) hilfreich sein. Dieses Experiment steht jedoch noch aus.

Neben *Pros* und *gcm* fand sich in anderen Arbeiten mit *hunchback* (*hb*) noch ein weiterer Faktor, der für die Entwicklung der thorakalen Gliazellen des NGB6-4t notwendig ist (Isshiki *et al.*, 2001). *hunchback* gehört zu einer Reihe von Genen, für die gezeigt wurde, dass sie an der temporären Determination bestimmter Subpopulationen während der Neuroblastenzellstammbaumentwicklung beteiligt sind. Solche Gene zeigen eine zeitlich aufeinander folgende Expression mit vielseitigen Interaktionen. Dabei ist *hunchback* in den ersten Stammbaumanteilen exprimiert und bestimmt frühes Zellschicksal (Brody und Odenwald, 2000; Brody und Odenwald, 2002; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998; Novotny *et al.*, 2002, Pearson und Doe, 2003). In Abb. 3-10 ist eine Antikörperfärbung gegen die Proteine zweier dieser Gene, *Hunchback* und *PDM-1*, im NB6-4 gezeitigt. Deutlich ist zu erkennen, dass *Hb* im glialen Anteil des Zellstammbaums (Abb. 3-10 A, C; weiße Kreise) und *PDM-1* im neuronalen Anteil exprimiert ist (Abb. 3-10B; gelbe Kreise). Zumindest die ersten beiden neuronalen GMZs sind *PDM-1*-positiv. Bezüglich einer möglichen Funktion im NB6-4 Zellstammbaum wurden bisher nur *Hb* näher untersucht. So zeigten Isshiki *et al.* (2001), dass in *hb*-Funktionsverlustmutationen

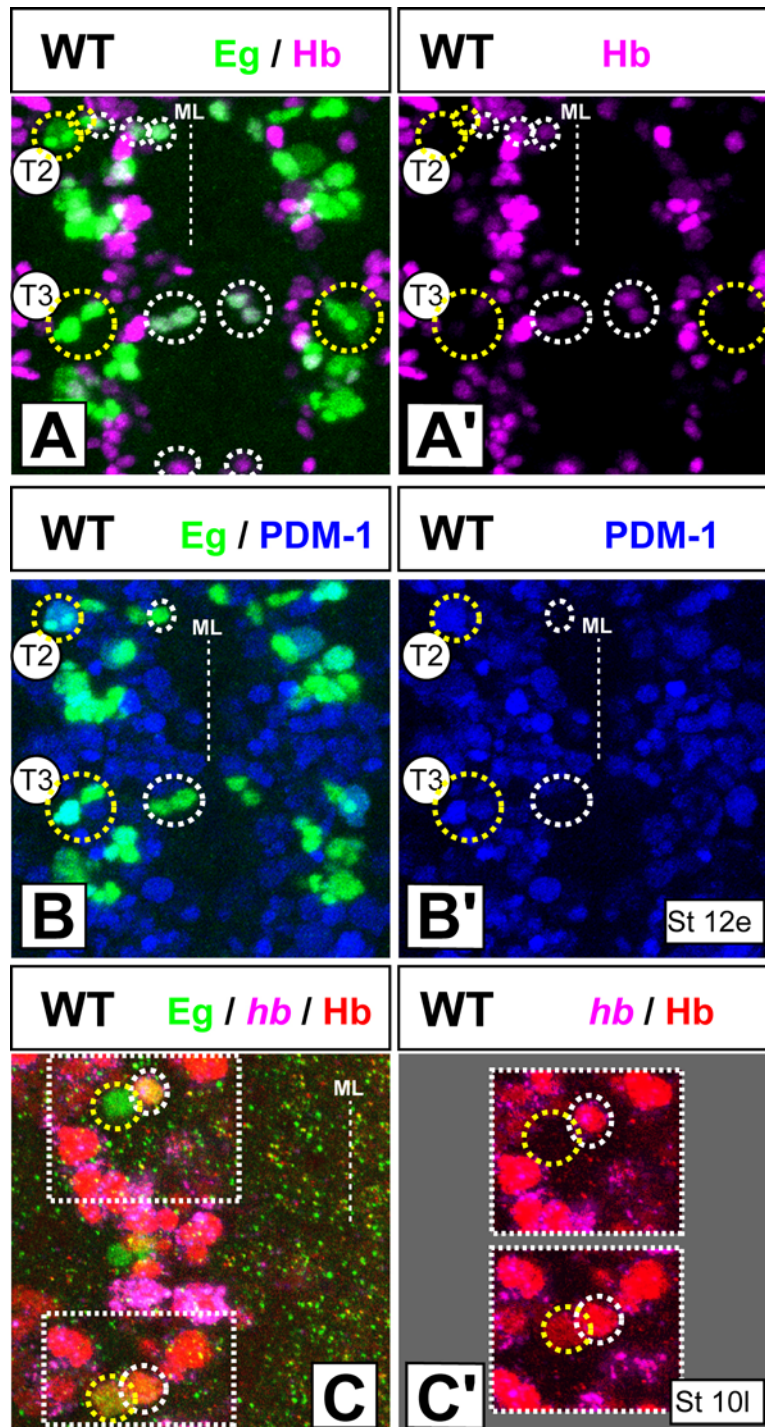


Abb. 3-10: Wildtypische Expression von *hunchback* und *pdm-1* im NB6-4.

A. *Hunchback* (magenta) ist in allen thorakalen Gliazellen (weiße Kreise) exprimiert. In der M-CBG jedoch nur kurz (T2 links). In abdominalen Segmenten ist *Hb* in der MM-CBG zu finden. A' zeigt nur die *Hb* Färbung.

B. *PDM-1* (blau) ist nur im neuronalen Anteil (gelbe Kreise) des thorakalen Zellstammbaums exprimiert. Die ersten beiden neuronalen Gangliennutterzellen haben eine deutliche Färbung (B T2). B' zeigt nur die *PDM-1* Färbung. A. und B. Stadium früh 12.

C. Die *hb*-mRNA (magenta) lokalisiert während der ersten Teilung asymmetrisch in den glialen Vorläufer. *Hb*-Protein (rot) ist in beiden Zellen zu finden (unteres Hemisegment), wird jedoch im neuronalen Anteil schnell abgebaut (oberes Hemisegment). Spätes Stadium 10.

die beiden MM-CBG in thorakalen Segmenten fehlen. Eine ektopische Expression von *hb* resultierte in zusätzlichen Gliazellen. Über den neuronalen Anteil des Zellstammbaums wurde keine Aussage gemacht. In der vorliegenden Arbeit konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass auch die medial gelegene M-CBG *hb* exprimiert (Abb. 3-10 A, T2 linkes HS). Der Einfluss von PDM-1 auf den NB6-4 Zellstammbaum und das Schicksal der Neurone in *hb*-Funktionsverlustmutationen wurden in dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht.

Aus diesen Ergebnissen wird klar, dass für die Spezifikation der thorakalen Gliazellen ein Zusammenspiel der Faktoren *gcm*, Pros und Hb notwendig ist. Hierbei wird *gcm* und *hb*-mRNA bereits im NGB exprimiert und in der ersten asymmetrischen Teilung, genauso wie Pros und Hb (Protein und mRNA, Abb. 3-10C), präferentiell in den glialen Vorläufer lokalisiert. Pros und Hb wirken nun zusammen, wodurch die *gcm* Expression stabilisiert und die Gliadifferenzierung eingeleitet wird – Repo wird als Gliadifferenzierungsgen exprimiert. Im neuronalen Vorläufer verbleibende *gcm*- und *hb*-mRNA (Freeman und Doe, 2001) und Hb Protein (Abb. 3-10C) werden nach der Teilung schnell abgebaut.

Die abdominalen Gliazellen sind nur von *gcm* abhängig

Der abdominale NB6-4a teilt sich nur einmal. Beide Zellen exprimieren nach der ersten Teilung *gcm*, Pros und Repo (Abb. 3-8 und Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Akiyama-Oda *et al.*, 2000b; Freeman und Doe, 2001). Sowohl in der *pros*¹⁷-Funktionsverlustmutation als auch in den verschiedenen *mira*-Mutationen konnten keine Veränderungen in abdominalen Segmenten beobachtet werden. Es bildeten sich immer zwei Gliazellen pro abdominales Hemisegment (Abb. 3-9 und Akiyama-Oda *et al.* (2000b). Für die *hb*-Expression erkannte ich ein deutliches Signal in der MM-CBG (Abb. 3-10A). Expression von *pdm-1* fehlte (Abb. 3-10B). Im NB6-4a scheint die Expression von *gcm* und die daraus resultierende Bildung der Gliazellen nicht von der Expression von Pros abhängig zu sein. Der Einfluss von *hb* wurde nicht weiter untersucht. Dies steht in Übereinstimmung mit der Arbeit von Jones *et al.* (2004). Die Autoren untersuchten cis-regulatorische Elemente, welche die *gcm*-Expression steuern. Sie fanden ein Element, das spezifisch die Expression von *gcm* im abdominalen NB6-4a reguliert. Dies spricht für eine unterschiedliche Expressionskontrolle von *gcm* im NB6-4a im Vergleich zum thorakalen NB6-4.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Entstehung der Gliazellen einige entscheidende Faktoren bereits beschrieben sind. Diese Faktoren können auch als Marker für die produzierten Gliazellen im NB6-4 benutzt werden.

Der NB6-4 eignet sich somit besonders als Modellsystem für die Untersuchung der Mechanismen, die zu segmentspezifischen Unterschieden innerhalb eines seriell homologen Neuroblastenzellstammbaums führen. Der Aufbau der embryonalen Zellklone des NB6-4 ist bekannt. Außerdem sind Marker verfügbar, die zum einen alle Zellen des NB6-4 Zellstammbaums darstellen (*eg*) und zum anderen eine Unterscheidung der entstehenden Zellschicksale zulassen (zum Beispiel die Kombination *Eg/Repo* oder *Eg/gcm*).

3.5. Homöotische Gene legen die Segmentspezifität fest

Im Folgenden wurde untersucht, welche Gene für die Spezifizierung der Tagmaidentität notwendig sind.

Homöotische Gene legen die Eigenschaften der einzelnen Segmente fest. Dementsprechend verursachen ihre Funktionsverlustmutationen Transformationen der betroffenen Segmente in die Identität eines anderen Segments. Die Homöotischen Gene werden innerhalb eines genetischen Netzwerkes exprimiert, in dem weiter posterior exprimierte Gene die anterior exprimierten Gene reprimieren (Lewis, 1978; Sanchez-Herrero *et al.*, 1985a; Shimell *et al.*, 1994).

Wie bereits durch Prokop und Technau (1994) beschrieben, haben die Homöotischen Gene ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Ausbildung segmentspezifischer Neuroblastenzellstammbäume. So konnte für den NB1-1 gezeigt werden, dass die abdominale Variante von der Wirkung zweier Gene des *Bithorax*-Komplexes abhängig ist: *Ultrabithorax (Ubx)* und *abdominal-A (abd-A)*. Funktionsverlustmutationen oder ektopische Expression dieser beiden Gene führen zur Abdomen in Thorax (beziehungsweise Thorax in Abdomen) Transformation des Zellstammbaums (Prokop und Technau, 1994).

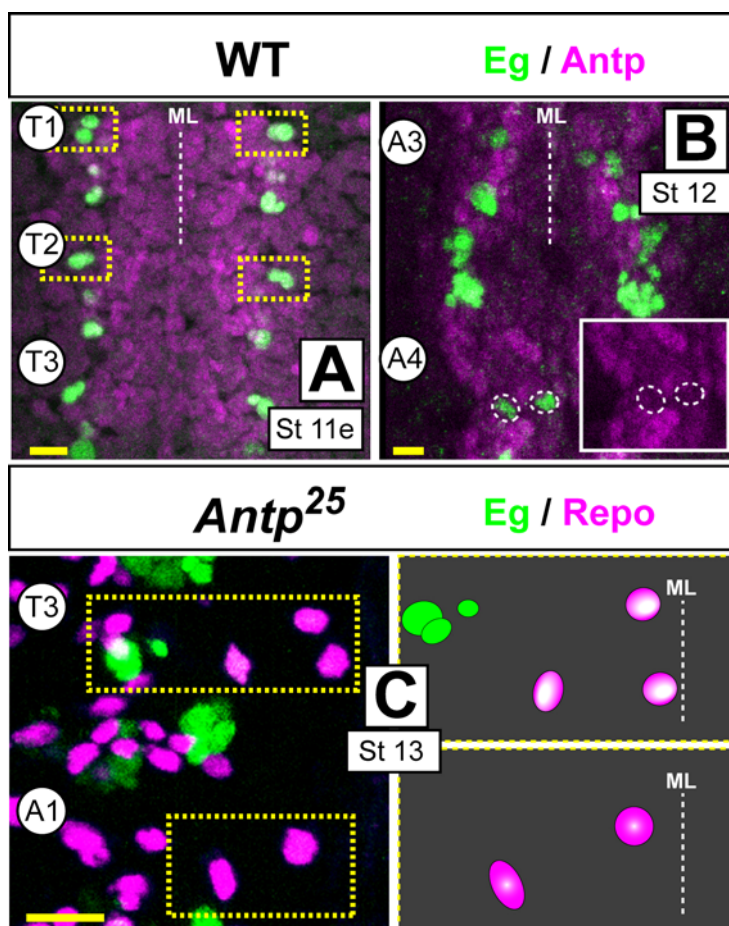
Um die Einflussnahme Homöotischer Gene auf die Tagmaspezifität des NB6-4 zu dokumentieren, habe ich sowohl Expressionsstudien als auch eine Analyse verschiedener Funktionsverlustmutationen durchgeführt. Bisher wurde die

Expression Homöotischer Gene im ZNS nur im späten Stadium 16 untersucht (Hirth *et al.*, 1998), so dass keine Expressionsdaten auf Einzelzellebene vorliegen.

3.5.1. *Antennapedia* wird im thorakalen NB6-4 exprimiert, hat aber keinen Einfluss auf die Tagmaspezifität

Zunächst wurden die Expressionsmuster von *sex combs reduced* (*scr*) und *Antennapedia* (*Antp*), zweier Gene des *Antennapedia*-Komplexes, untersucht (Abbott und Kaufman, 1986; Lewis, 1978). *scr* ist hauptsächlich in gnathalen Segmenten

exprimiert (Hirth *et al.*, 1998; Mahaffey und Kaufman, 1987). Da der gnathale Zellklon sich nicht vom thorakalen Zellklon unterscheidet (eigene Beobachtung; Daten nicht gezeigt), habe ich dieses Gen nicht weiter untersucht.



Antp wird im gesamten ventralen Bauchmark exprimiert, die Expression ist jedoch in thorakalen Segmenten deutlich stärker als in abdominalen (Abb. 3-11; Beachy *et al.*, 1985; Hirth *et al.*, 1998). Der NGB6-4t zeigt nach der ersten Teilung eine deutliche Expression von

Abb. 3-11: *Antennapedia* bestimmt keine Tagmaidentität im NB6-4.

A. *Antennapedia* (*Antp*, magenta) wird in Thorakalsegmenten stärker exprimiert als in Abdominalsegmenten. Im frühen Stadium 11 wird *Antp* in den ersten beiden Zellen des thorakalen NB6-4 exprimiert.

B. In den Gliazellen des Abdominalen NB6-4 ist keine Expression zu beobachten. Zum Beispiel weiße Kreise in A4.

C. *Antp*²⁵-Funktionsverlustmutanten zeigen keine Transformation im NB6-4. Sowohl in Thorakal- als auch in Abdominalsegmenten sind die für diese Tagmata spezifischen Zelltypen zu beobachten. Auftretende Phänotypen, wie zum Beispiel eine geringere Neuronenanzahl in T3, wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. C. zeigt einen Embryo im Stadium 13.

Antp in beiden Zellen (Abb. 3-11A). In abdominalen Segmenten war hingegen keine Expression in den sich differenzierenden Gliazellen zu beobachten (Abb. 3-11B). *Antp* könnte also die thorakale Identität des NGB6-4t festlegen. Bei der Untersuchung der *Antp*-Funktionsverlustmutationen (*Antp*²⁵; Abb. 3-11C) ließen sich unterschiedliche Phänotypen beschreiben: So war in einigen Fällen die Anzahl der Gliazellen und/oder der Neurone reduziert, es fanden jedoch keine Transformationen statt. Sowohl in thorakalen als auch in abdominalen Segmenten entwickelten sich ohne Ausnahme die für diese Tagmata spezifischen NB6-4 Zelltypen (Abb. 3-11C). Daraus schlussfolgerte ich, dass *Antp* keinen Einfluss auf die Tagmaidentität des NB6-4 hat.

3.5.2. *Ultrabithorax* wird nicht im NB6-4 Zellstammbaum exprimiert

Prokop und Technau (1994) konnten eine Abhängigkeit des abdominalen NB1-1 von der Funktion des *Ubx*-Gens feststellen. Expressionsmuster und die Funktion von *Ubx* im NB6-4 sind in Abb. 3-12A, B dargestellt. *Ubx* wird in den Thorakalsegmenten T2 und T3 und in den abdominalen Segmenten exprimiert (Abb. 3-12A. und Hirth *et al.*, 1998). Jedoch konnte ich weder in thorakalen noch in abdominalen Segmenten zu irgendeinem Zeitpunkt der embryonalen Neurogenese eine Expression in den NB6-4 Zellstammbäumen beobachten (Abb. 3-12A, B) oder einen Transformationsphänotyp in der *Ubx*-Funktionsverlustmutation dokumentieren (*Ubx*¹; Abb. 3-12C). Lediglich in einigen abdominalen Hemisegmenten (aHS) war eine zusätzliche Gliazelle zu beobachten (Abb. 3-12C linkes Hemisegment A2), deren Entstehung hier aber nicht weiter verfolgt wurde. Somit war im Gegensatz zu den Daten für den NB1-1 kein Einfluss von *Ubx* auf die Segmentspezifität des NB6-4 festzustellen.

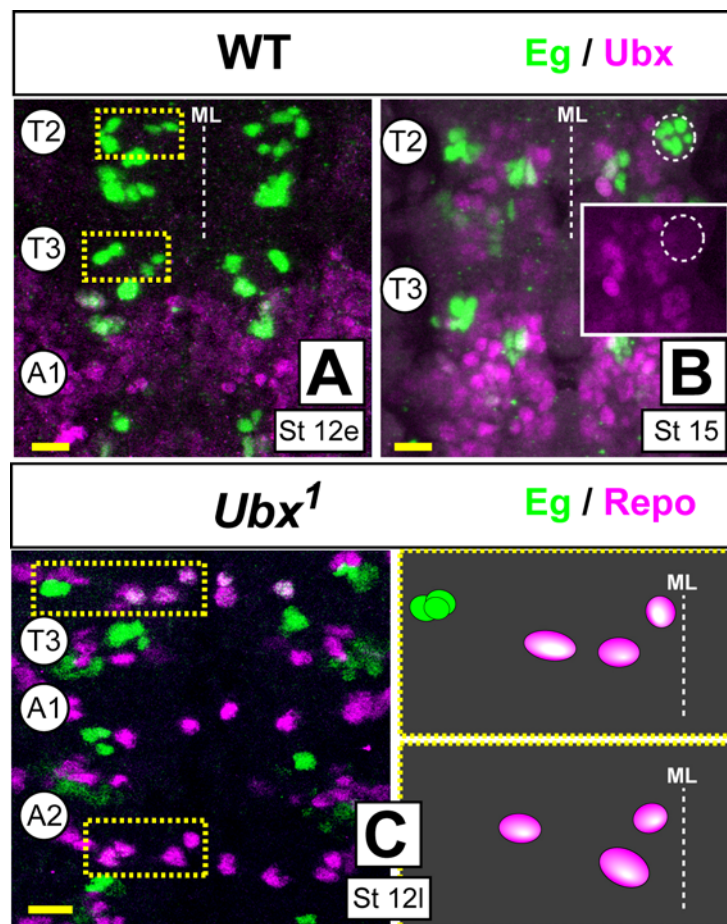


Abb. 3-12: Ultrabithorax ist nicht im NB6-4 exprimiert.

- A. Im frühen Stadium 12 ist keine Expression von Ultrabithorax (Ubx, magenta) im thorakalen NB6-4 zu sehen.
 B. In späteren Stadien (St15) zeigen die dorsolateralen Neuronen im Thorax kein Signal.
 C. Eine *Ubx*¹-Funktionsverlustmutante hat keinen Einfluss auf die Tagmaspezifität des NB6-4. In einigen Fällen konnte eine zusätzliche Gliazelle in abdominalen Segmenten beobachtet werden (A2).

3.5.3. *abdominal-A* und *Abdominal-B* spezifizieren den abdominale NB6-4 – thorakales Schicksal ist eine Grundidentität

Nachdem sowohl Gene des *Antennapedia*-Komplexes als auch *Ubx* als beeinflussende Faktoren des segmentspezifischen Verhaltens des NB6-4 ausgeschlossen werden konnten, untersucht ich nun *abd-A* und *Abdominal-B* (*Abd-B*). Die Doppelfunktionsverlustmutation der beiden Gene (*abd-A*^{M1}, *Abd-B*^{M8}) zeigte einen deutlichen Transformationsphänotyp (Abb. 3-13B). In allen abdominalen Segmenten ist der NB6-4 in thorakales Schicksal transdeterminiert. Da dies ein erster Hinweis für die Festlegung abdominalen Schicksals war, wurden nun die Expressionsmuster dieser beiden Gene untersucht.

abd-A ist im NB6-4a in den Segmenten A1 bis A6 und *Abd-B* in den Segmenten A7 und A8 exprimiert (Abb. 3-13C, D, F und G). In späteren Stadien nimmt die

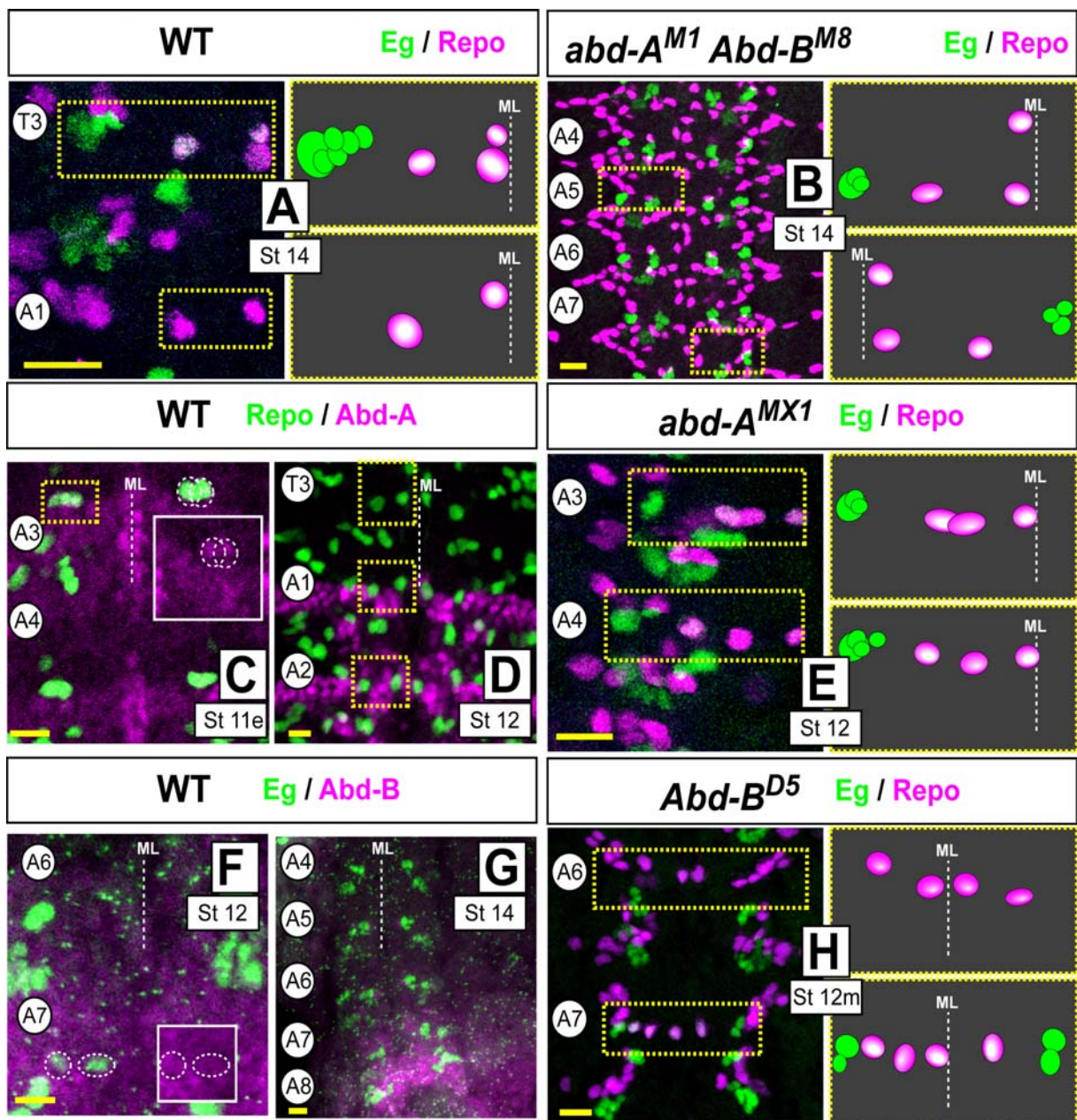


Abb. 3-13: Die abdominale Identität des NB6-4 wird durch die Funktion von *abdominal-A* und *Abdominal-B* bestimmt.

A. Zwei wildtypische Hemisegmente (T3 und A1) zum Vergleich mit Eg/Repo-Doppelfärbung (Eg in allen Bildern (außer C. und D.) in grün; Repo, magenta).

B. Eine Doppelfunktionsverlustmutante für *abdominal-A* ($abd-A^{M1}$) und *Abdominal-B* ($Abd-B^{M8}$) zeigt eine homöotische Transformation des abdominalen NB6-4 in die thorakale Variante. Dies kann in allen abdominalen Segmenten beobachtet werden.

C. Im frühen Stadium 11 ist Abd-A (magenta, Repo in grün) in den abdominalen Gliazellen exprimiert. Dies ist in den Segmenten A1 bis A6 der Fall.

D. In Thorakalsegmenten ist keine Expression zu beobachten (Abd-A in magenta, Repo in grün).

E. Durch eine $abd-A^{MX1}$ -Funktionsverlustmutation wird der NB6-4a in den Segmenten A1 bis A6 in einen thorakalen Neuroglioblasten transformiert. Es sind drei Gliazellen (Eg/Repo, weiß oder grün und magenta) und dorsolaterale Neurone (Eg, grün) zu erkennen.

F. Abd-B ist in den Gliazellen des NB6-4a der Segmente A6 bis A8 exprimiert.

G. In späteren Stadien (14) erstreckt sich die Expressionsdomäne von Abd-B weiter nach Anterior bis in das Segment A5 hinein.

H. Die $Abd-B^{D5}$ -Funktionsverlustmutation zeigt, dass die abdominale Identität des NB6-4 in den Segmenten A7 und A8 von der Funktion von *Abd-B* abhängt. Funktionsausfall führt zu einer Transformation in thorakale Identität – Neurone und Gliazellen werden gebildet.

Expression von *abd-A* in den Gliazellen des NB6-4a ab. In thorakalen Segmenten ist *Abd-A* zu keinem Zeitpunkt nachweisbar (Abb. 3-13D). Mit fortschreitender Entwicklungsdauer ist *Abd-B* ebenfalls weiter anterior in A5 und A6 zu finden (Abb. 3-13G). Die Untersuchung der Einzelfunktionsverlustmutationen zeigten, dass *abd-A* die Segmente A1 bis A6 determiniert (*abd-A^{MX1}*, Abb. 3-13E), während für die Ausbildung des abdominalen Schicksals des NB6-4a in den Segmenten A7 und A8 die Funktion von *Abd-B* notwendig ist (*Abd-B^{D8}*; Abb. 3-12H). Der Funktionsverlust beider Gene führt zu einer Transformation des abdominalen in thorakales Schicksal.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass

(1.) thorakales Schicksal des NB6-4 nicht von Homöotischen Genen abhängig ist. Der NGB6-4t stellt eine Art Grundidentität dar. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass T2 ein Grundsegment ist (in der Epidermis und den adulten Anhängen; Carroll *et al.*, 1995; Lewis, 1978; Struhl und Brower, 1982);

(2.) abdominales Schicksal des NB6-4 ist von der Funktion der beiden *Bithorax*-Gene *abdominal-A* und *Abdominal-B* abhängig, wobei *abd-A* die Segmente A1-A6 und *Abd-B* die Segmente A7 und A8 determiniert.

Um diese Ergebnisse noch einmal zu verdeutlichen, wurden eine weitere Doppelfunktionsverlustmutation (*abd-A^{D24}*, *Abd-B^{D18}*) eine Tripelfunktionsverlustmutation (*Ubx^{MX12}*, *abd-A^{M1}*, *Abd-B^{M8}*) und die Funktionsverlustmutante *Def109* (*Ubx/abd-A*-Doppelfunktionsverlustmutation; *Df(3R)Ubx109*; Karch *et al.*, 1985; Sanchez-Herrero *et al.*, 1985b) mittels Antikörperfärbung untersucht (Abb. 3-14A bis D). Die Ergebnisse dieser Färbungen bestätigten die oben stehenden Schlussfolgerungen.

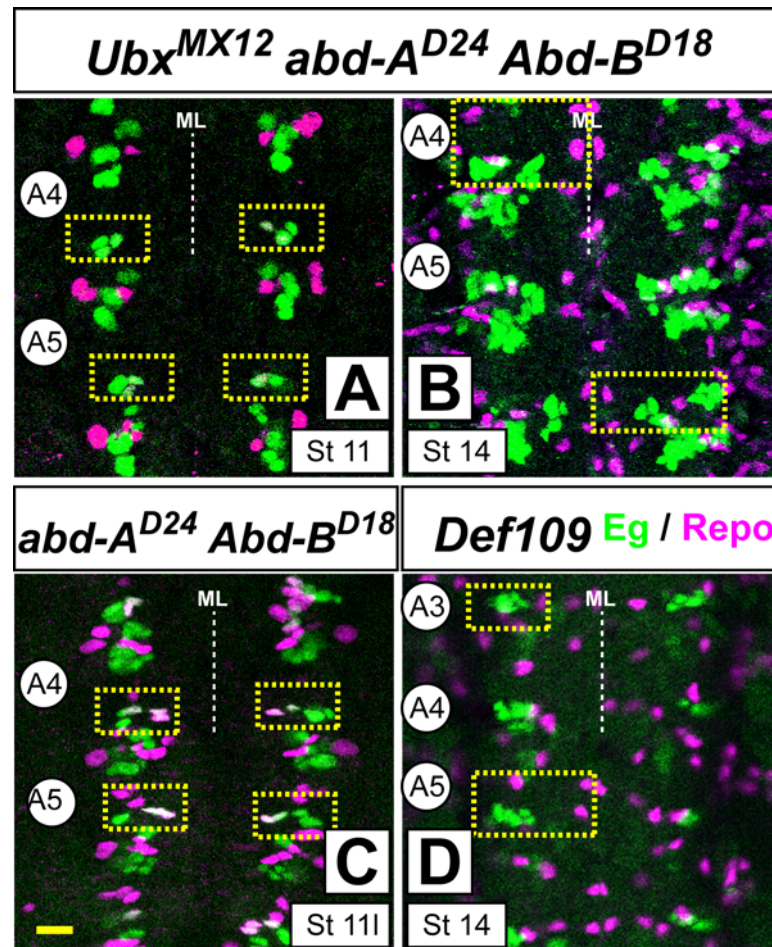


Abb. 3-14: Andere Homöotischen Funktionsverlustmutanten, die ebenfalls eine Transformation des NB6-4a in einen thorakalen Neuroglioblasten zeigen.

A. und B. zeigen die Tripelfunktionsverlustmutation für *Ubx^{MX12}*, *abd-A^{D24}* und *Abd-B^{D18}*. In allen abdominalen Segmenten ist der NB6-4a in einen thorakalen NB6-4 transformiert (A im Stadium 11 und B im Stadium 14).

C. Eine andere Doppelfunktionsverlustmutation für *abd-A^{D24}* und *Abd-B^{D18}* bestätigt den Transformationsphänotyp, der bereits in Abb. 3-13 dokumentiert wurde. Der NB6-4a hat in allen Abdominal-segmenten thorakales Schicksal angenommen.

D. Die Defizienz109 (*Df(3R)UBX109*) ist eine Doppelfunktionsmutante für die Gene *Ubx* und *abd-A*. Diese Doppelfunktionsmutante zeigt eine Transformation der Segmente A1 bis A6. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen der *abd-A*-Funktionsverlustmutation.

Als Nächstes versuchte ich, mögliche Mechanismen aufzuklären, durch die *abd-A* die Segmentspezifität reguliert. Die Funktionsweise der Homöotischen Gene kann sowohl eine aktivierende, als auch eine reprimierende sein. So wäre es möglich, dass *abd-A* als Repressor eines Gens fungiert, welches thorakales Schicksal hervorruft. Die offensichtlichsten Unterschiede zwischen dem abdominalen und dem thorakalen Zellstammbaum des NB6-4 sind zum einen die unterschiedliche Komposition des Zellstammbaums (im Thorax Neurone und Glia versus Abdomen nur Glia) und zum anderen das unterschiedliche Proliferationsverhalten der beiden Vorläuferzellen. Letzteres stellt für mich einen interessanten Ausgangspunkt für

weitere Untersuchungen dar, weshalb ich zunächst Gene, die an der Regulation der Mitose beteiligt sind, geprüft habe. Könnten diese Zellzyklusgene ebenfalls Zellschicksale regulieren und einen Einfluss auf die Symmetrie einer Teilung haben? Könnte eine mögliche Veränderung der Symmetrie das Zellschicksal beeinflussen?

Um solche Fragen in den Kontext des Problems „Segmentspezifität“ zu stellen, wurden für einige wichtige Faktoren der Zellzykluskontrolle verschiedene Funktionsverlustmutations- und ektopische Genexpressionsstudien vorgenommen. Im Folgenden soll aber zunächst der Zellzyklus mit seinen wichtigsten Kontrollpunkten aufgezeigt werden.

3.6. Zellzyklus und Zellzykluskontrollgene

Die embryonale Entwicklung von *Drosophila* charakterisieren vier verschiedene Zellzyklustypen (inklusive DNA-Replikation), die nach der Fertilisation sukzessive aufeinander folgen. Diese vier Typen sind: a) frühe meroblastische, superfizielle Furchungen (13 Kernteilungen), b) Mitosen im zellulären Blastoderm (drei postblastodermale Teilungen), c) Mitosen der Neurogenese und d) die Endoreplikation (Foe, 1989 und zusammengefasst in: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Im Folgenden liegt der Schwerpunkt auf dem Zellzyklustyp der Neurogenese.

Die schnellen Kernteilungen des syncytialen Blastoderms und die drei weiteren Teilungen im zellulären Blastoderm charakterisieren die ersten 16 Zellteilungen des *Drosophila* Embryos. Nach der Mitose 16 werden die meisten Zellen in der G2 Phase arretiert. Nur die Neuroblasten, die Zellen der Imaginalscheiben, der Malpighischen Gefäße und des Darms teilen sich weiter (Richardson *et al.*, 1993).

Der Zellzyklus der NBs startet mit der Transition von der G1-Phase, dem Ruhezustand nach der Mitose, zur S-Phase, in der die DNA synthetisiert wird (Abb. 3-15). Dieser komplex regulierte Initiationspunkt wird als START bezeichnet. Zellen, die diesen Punkt überschreiten, vollenden einen ganzen Zellzyklus. Einer der wichtigsten Faktoren dieses Kontrollpunktes ist das G1 spezifische Zyklin *Cyclin E* (*CycE*), das für verschiedene Aspekte der Transition von der G1- zur S-Phase benötigt wird (Richardson *et al.*, 1993). Während der ersten 13 Teilungen geschieht dies durch maternales *CycE* (Typ II). Ab Zellzyklus 14 wird *CycE* zygotisch

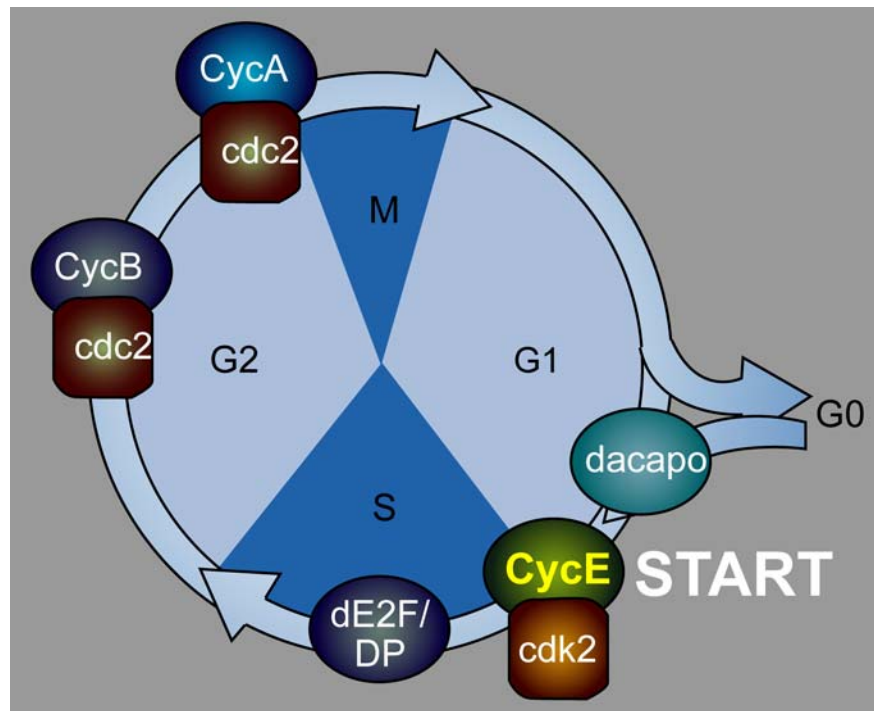


Abb. 3-15: Der Zellzyklus und einige Zellzyklusregulatoren.

Der Zellzyklus von *Drosophila* hat spezifische Regulationspunkte. Der Übergang von der G1- zur S-Phase (START) wird von dem Kinasekomplex *CycE/cdk2* reguliert. *dE2F* ist zusammen mit seinem Dimerisierungspartner *DP* für die Transkription S-Phase spezifischer Gene verantwortlich. Während den Phasen G2 und M sind die Zykline *CycA* und *CycB* aktiv, die mit der *cdc2*-Kinase interagieren. Zellen, die sich nicht weiter teilen, werden in der G0-Phase arretiert. *Dacapo* reguliert einige Aspekte dieser Arretierung, wie zum Beispiel die Expression von *CycE*.

transkribiert (Typ I), wobei die mRNA-Level in nicht neuronalen Zellen während der Mitosen 14 bis 16 keine zellzyklus-abhängigen Variationen zeigen.

In den Zellen des ZNS scheint die Expression stark an den Zellzyklus gekoppelt zu sein. Mithilfe von Bromodeoxyuridin-Inkorporationsexperimenten (Thymidinanalogon, das während der DNA-Replikation eingebaut wird) konnte gezeigt werden, dass während der Initiation des Zellzyklus (in der G1-Phase, also kurz nach der letzten Mitose) die Expression startet und kurz vor der S-Phase wieder stoppt (Richardson *et al.*, 1993). Nach der letzten mitotischen Teilung wird *CycE* herunter reguliert. Die Inaktivierung von *CycE* und seiner assoziierten Kinase *cdc2c* (CDK2, Cyclin-dependent-Kinase) erfolgt normalerweise in der G2-Phase (Knoblich *et al.*, 1994).

Für die S-Phase wird der Transkriptionsfaktor *dE2F* als wichtigster Regulator beschrieben (Abb. 3-15). *dE2F* ist gemeinsam mit seinem Dimerisierungspartner *DP* für die transkriptionelle Aktivierung einer Reihe von Genen in proliferierenden Zellen verantwortlich (Duronio *et al.*, 1998; Duronio *et al.*, 1995; Dynlacht *et al.*, 1994a;

Dynlacht *et al.*, 1994b). Durch ektopische Expression von *dE2F* und *DP* kann sogar in postmitotischen Zellen erneut eine S-Phase stattfinden (Du *et al.*, 1996).

In den meisten nichtneuronalen Zellen scheint die *CycE* Expression während der G1-S Transition von *dE2F* abhängig zu sein. Eine ektopische Expression von *CycE* kann allerdings das Vorhandensein von *dE2F* substituieren und ebenfalls eine S-Phase induzieren (Knoblich *et al.*, 1994). Hieraus kann man schließen, dass *CycE* von *dE2F* reguliert wird. In den sich schnell teilenden Zellen des ZNS scheint diese Hierarchie jedoch umgekehrt zu sein: Hier aktiviert *CycE* *dE2F*, weshalb angenommen wird, dass diese Zellen keine G1 Phase durchlaufen (Duronio und O'Farrell, 1995; Duronio *et al.*, 1995).

Nach der S-Phase werden die beiden G2 Zykline *CycA* und *CycB* transkribiert (Abb. 3-15). Diese ermöglichen den Eintritt und die erfolgreiche Beendigung der Mitosephase. Knoblich und Lehner (1993) hatten gezeigt, dass in einer *CycA*-Funktionsverlustmutation ein Zellteilungsstopp zu beobachten ist, nachdem die maternalen Anteile von *CycA* aufgebraucht sind.

Zuletzt sei *dacapo* als zellzyklusregulierendes Gen genannt. Dieses *Drosophila*-Homologon gehört zur Familie der in Vertebraten bereits bekannten *p21/p27-Cip/Kip* Kinaseinhibitoren (de Nooij *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1996). Solche Proteine zeichnen sich durch eine N-terminale Domäne aus, die spezifisch an CDK/Zyklin-Komplexe bindet und diese inhibieren. Für *dacapo* ist bekannt, dass es spezifisch mit *CycE*/CDK2-Komplexen interagiert. So ist *dacapo* im ZNS in GMZs vor ihrer terminalen Teilung exprimiert (de Nooij *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1996), was auf eine mögliche Rolle in der Entstehung unterschiedlichen Zellschicksals in Neuroblastenzellstammbäumen hinweist. Über die hier erwähnten Beispiele hinaus gibt es noch weitere Gene, die zum einen den Zellzyklus steuern und zum anderen spezifische Interaktionen und Regulationen der Gene untereinander koordinieren (zum Beispiel *Rbf*, *string* usw.). Auf diese Gene soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Um mögliche Einflüsse der genannten Gene auf die Zellstammbaumentwicklung des NB6-4 im zu untersuchen, habe ich verschiedene Ansätze gewählt. Neben Studien der Expression, Funktionsverlustmutationen und ektopischer Expression mithilfe von Antikörperfärbungen und *in-Situ* Hybridisierung führte ich mikromanipulative Experimente durch (Dil-Markierung einzelner NEZ und Einzelzelltransplantation). Diese Methoden werden im Abschnitt 2.14. genauer beschrieben.

3.7. Der NB6-4 entwickelt sich unter dem Einfluss von *CyclinE* zum Neuroglioblasten

Das G1 Zyklin *CycE* ist für die Transition von der G1-Phase zur S-Phase notwendig. Die frühen embryonalen Zellteilungen werden von maternalen Depots an *CycE* reguliert. In zygotischen Funktionsverlustmutationen vollziehen sich bis zu 16 Mitosen, so dass die meisten Zellen in der G1-Phase von Zyklus 17 arretiert sind (Richardson *et al.*, 1993). Für eine ektopische Expression von *CycE* konnte Knoblich *et al.* (1994) zeigen, dass epidermale Zellen – normalerweise teilungsaktiv bis einschließlich Mitose 16 – erneut die S-Phase durchlaufen.

Um eine mögliche Rolle von *CycE* im NB6-4 zu untersuchen, wurden zunächst Antikörperfärbungen in einer zygotischen Funktionsverlustmutation (*CycE^{AR95}*) gemacht, wobei zur eindeutigen Identifizierung der Zellen des NB6-4 der mutante *CycE^{AR9}*-Fliegenstamm mit der *eg-lacZ* Linie, P289, verkreuzt wurde. Es zeigte sich, dass der thorakale NB6-4t sich ein bis zweimal teilt. In einigen Fällen entstanden drei Zellen (zwei Teilungen), in den meisten Fällen (94%, n=431 tHS) jedoch nur zwei (Abb. 3-16). Die Teilungsaktivität des thorakalen NB6-4 lässt sich in dieser Situation mit der des abdominalen NB6-4 vergleichen.

Durch den Nachweis der *gcm*-mRNA wird die Bildung der Gliazellen untersucht. In wildtypischen Fliegen (im Folgenden Wildtyp, WT) verteilt sich *gcm* in der ersten thorakalen Mitose auf beide Tochterzellen. Danach erhält jedoch nur der mediale gliale Vorläufer die Expression aufrecht, während der neuronale Vorläufer die mRNA schnell abbaut. In abdominalen Segmenten, in denen nur zwei Gliazellen entstehen, wird *gcm* symmetrisch verteilt (Abb. 3-16E und Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001).

In Abb. 3-16A sind zwei thorakale Segmente der zygotischen *CycE^{AR95}*-Funktionsverlustmutation zu sehen. Der NGB6-4t hat sich nur einmal geteilt, in allen Hemisegmenten sind zwei Zellen zu sehen. In einigen Fällen ist eine *gcm*-negative lateral gelegene Zelle und eine *gcm*-positive mediale Zelle vorhanden. Hier ist die Teilung wildtypisch abgelaufen. In 63% (n=167 tHS) aller Fälle sind beide Zellen *gcm*-positiv. Das Signal der *gcm* Expression ist auch in späteren Stadien noch erkennbar, so zum Beispiel im Stadium 14, einem Zeitpunkt, zu dem normalerweise nur noch Neurone entstehen (Abb. 3-16A). Um das Entwicklungsschicksal der gebildeten Zellen weiter zu untersuchen, wurden Färbungen gegen Pros gemacht.

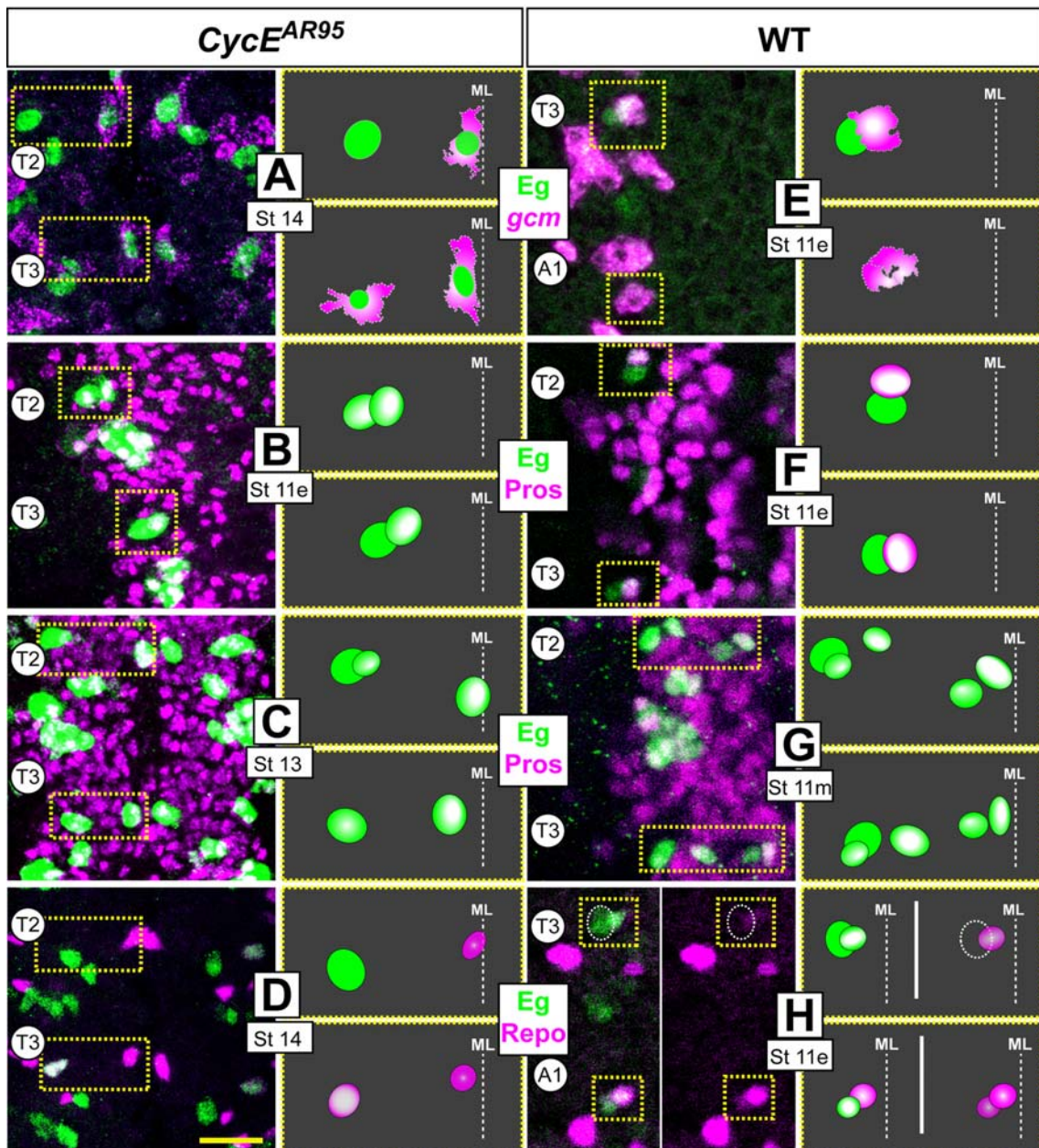


Abb. 3-16: Eine zygotische $CycE^{AR95}$ -Funktionsverlustmutation zeigt eine Transformation des thorakalen NB6-4 Zellstammbaums in einen abdominalen Zellstammbaum.

A.-D. zeigt die Verteilung der Faktoren Eagle (Eg, grün) *glial cells missing* (*gcm*), Prospero (Pros) und Reversed-Polarity (Repo, alle in magenta) in Thorakalsegmenten der $CycE^{AR95}$ -Funktionsverlustmutation. E.-H. zum Vergleich in wildtypischen Embryonen.

A. In $CycE^{AR95}$ -Embryonen wird *gcm* in einigen Fällen nach der Teilung nur in einer Zelle exprimiert (T2). In 64% aller Fälle konnte ein *gcm*-Signal in Stadium 14 in beiden Zellen beobachtet werden. Normalerweise wird *gcm* in thorakalen Segmenten nur im medialen glialen Vorläufer exprimiert (E.).
 B. Nach der Teilung zeigen beide Zellen eine klare kernständige Pros-Färbung in $CycE^{AR95}$ -Embryonen. In wildtypischen thorakalen Segmenten wird Pros nur im glialen Vorläufer exprimiert (F.).
 C. Die Expression von Pros ist auch in späteren Stadien zu beobachten. In den Fällen, in denen der NB6-4t zwei Teilungen vollzogen hat und somit drei Zellen entstanden sind (C., T2 links), liegt eine Pros-positive Zelle medial und eine Pros-positive und eine Pros-negative Zelle in dorsolateraler Position. Diese Zellen sind vermutlich eine neuronale GMZ (da diese ebenfalls in wildtypischen Segmenten Pros exprimieren (G.)) und der neuronale Vorläufer (größere Zelle), der seinerseits kein Pros exprimiert (in G. ebenfalls).

D. Eine Färbung der $CycE^{AR95}$ -Embryonen gegen den Gliadifferenzierungsmarker Repo zeigt, dass in 64% aller thorakalen Hemisegment nur Gliazellen entstanden sind: beide Zellen zeigen Repo Expression. In wildtypischen Segmenten ist nur der mediale Gliavorläufer Repo-positiv (H.).

Im WT lokalisiert Pros in der ersten Teilung im NGB6-4t asymmetrisch in die Gliavorläuferzelle (Abb. 3-16F und Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001). Die Gliazellen behalten die Pros Expression bei – in späteren Stadien exprimieren ebenfalls die lateral entstehenden neuronalen GMZ Pros (Abb. 3-16G).

Nur in einigen Hemisegmenten von Embryonen der *CycE*^{AR95}-Funktionsverlustmutation trat ein wildtypisches Teilungsmuster mit einer asymmetrischen medialen Lokalisation von Pros auf (37%). In späteren Stadien zeigten beide Zellen weiterhin eine Pros Expression. In den Fällen, in denen sich der NGB6-4t zweimal teilte und drei Zellen entstanden, war in lateraler Position eine große Pros-negative Zelle (vermutlich die neuronale Vorläuferzelle) und eine dorsaler gelegene, kleinere Pros-positive Zelle (vermutlich eine neuronale GMZ) zu erkennen (Abb. 3-16C). Dies entspricht dem wildtypischen Bild (Abb. 3-16F). Jedoch in 63% aller tHS (n=126) konnte eine symmetrische Verteilung von Pros nach der ersten Teilung beobachtet werden (Abb. 3-16B). Sowohl die Pros- als auch die *gcm*-Expressionsdaten in der *CycE*^{AR95}-Funktionsverlustmutation sprechen demnach für eine Veränderung des Zellschicksals im NB6-4t. Färbungen gegen Repo sollen nun verdeutlichen, ob die entstehenden Zellen tatsächlich Gliazellen sind (Abb. 3-16D)

In diesem Experiment teilte sich der NGB6-4t in 26% aller tHS (n=128) zweimal (drei Zellen), wobei eine Zelle kein Repo exprimierte und zwei Repo-positive Zellen in medialer Position zu beobachten waren. In 10% der Fälle teilte sich der NGB6-4t im wildtypischen Muster und es entstanden eine Repo-positive und eine Repo-negative Zelle. In 64% aller tHS konnten jedoch zwei Repo-positive Gliazellen dokumentiert werden (Abb. 3-16D). In diesen Fällen hat der NGB6-4t eine symmetrische Teilung vollzogen, wobei sowohl *gcm* als auch Pros symmetrisch verteilt wurden (siehe oben), was schließlich zur Bildung zweier Gliazellen führte.

Hieraus folgere ich, dass zygotisches *CycE* im NGB6-4t für eine Teilung als Neuroglioblast notwendig ist. Ein Funktionsverlust von *CycE* führt zu einer Transformation einer ursprünglichen asymmetrischen, thorakalen Teilung in eine symmetrische, abdominale Teilung und folglich zu einem Verlust von neuronalem Schicksal. Somit wird der thorakale Zellstammbaum in eine abdominale, rein gliale Zellgenealogie transformiert.

3.8. Ektopisches *CyclinE* ist ausreichend, um den abdominalen NB6-4 in die thorakale Variante zu transformieren

Als Nächstes soll geprüft werden, ob die ektopische Expression von *CycE* im abdominalen Vorläufer des NB6-4 einen gegensätzlichen Effekt hat, diesen also in einen thorakalen Neuroglioblasten transformiert. Als Treiberlinie wird die *sca-Gal4*-Linie (rekombiniert mit der *eg-lacZ*-Linie) benutzt, mit der eine möglichst frühe Expression von *CycE* bereits im Neuroektoderm erzielt werden kann. Im Folgenden werden Embryonen, die ein GenX ektopisch exprimieren, auch GenX⁺⁺-Embryonen genannt (zum Beispiel ektopische Expression von *CycE*: *CycE*⁺⁺-Embryonen).

Zunächst wird die Verteilung von Pros untersucht (Abb. 3-17). Wie bereits oben erwähnt, lokalisiert Pros in thorakalen Segmenten asymmetrisch in den glialen Vorläufer (Abb. 3-17F), während es im abdominalen NB6-4a in beiden Zellen zu finden ist. Pros wird im thorakalen Segmenten benötigt, um die Expression von *gcm* aufrecht zu erhalten und zu verstärken (Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001). In *CycE*⁺⁺-Embryonen konnte in abdominalen Segmenten eine erhöhte Proliferation des NB6-4 beobachtet werden. Färbungen gegen Pros im Stadium 10/11 zeigten eine asymmetrisch Lokalisation (Abb. 3-17A, 41%; n=144 aHS). Aufgrund der erhöhten Teilungsrate des NB6-4a waren in späteren Stadien bis zu fünf zusätzliche Zellen zu erkennen. Einige dieser Zellen wanderten wie die Gliazellen des NB6-4 nach medial, andere blieben in einer dorsolateralen Position und exprimierten ebenfalls Pros ähnlich der neuronalen GMZs des thorakalen NB6-4 (Abb. 3-17B und G (WT); 41%; n = 422 aHS).

Um das Zellschicksal dieser zusätzlichen Zellen zu bestimmen, wurde eine Färbung gegen den Gliadifferenzierungsmarkers Repo analysiert (Abb. 3-17C bis E). In ungefähr 35% aller aHS (n=182) zeigte sich nach der ersten Teilung eine Repo-positive und eine Repo-negative Zelle (Abb. 3-17C). Dies entspricht dem Bild einer solchen Färbung in wildtypischen Thorakalsegmenten (Abb. 3-17H). In späteren Stadien variierte die Anzahl der Zellen (etwa zwei bis vier Repo-positiven Gliazellen und zwei bis vier lateral gelegener Repo-negativer Zellen; Abb. 3-17D, 39%; n=233).

Eine ähnliche Situation entsteht im Thorax von *CycE*⁺⁺-Embryonen. Obwohl in den meisten Fällen drei Gliazellen gebildet wurden, waren manchmal auch ein oder zwei zusätzliche Gliazellen zu beobachten, was mit einer Reduktion der Neurone einherging (Abb. 3-17E). Ein Grund dafür könnte der ungewöhnlich hohe *CycE* Level sein.

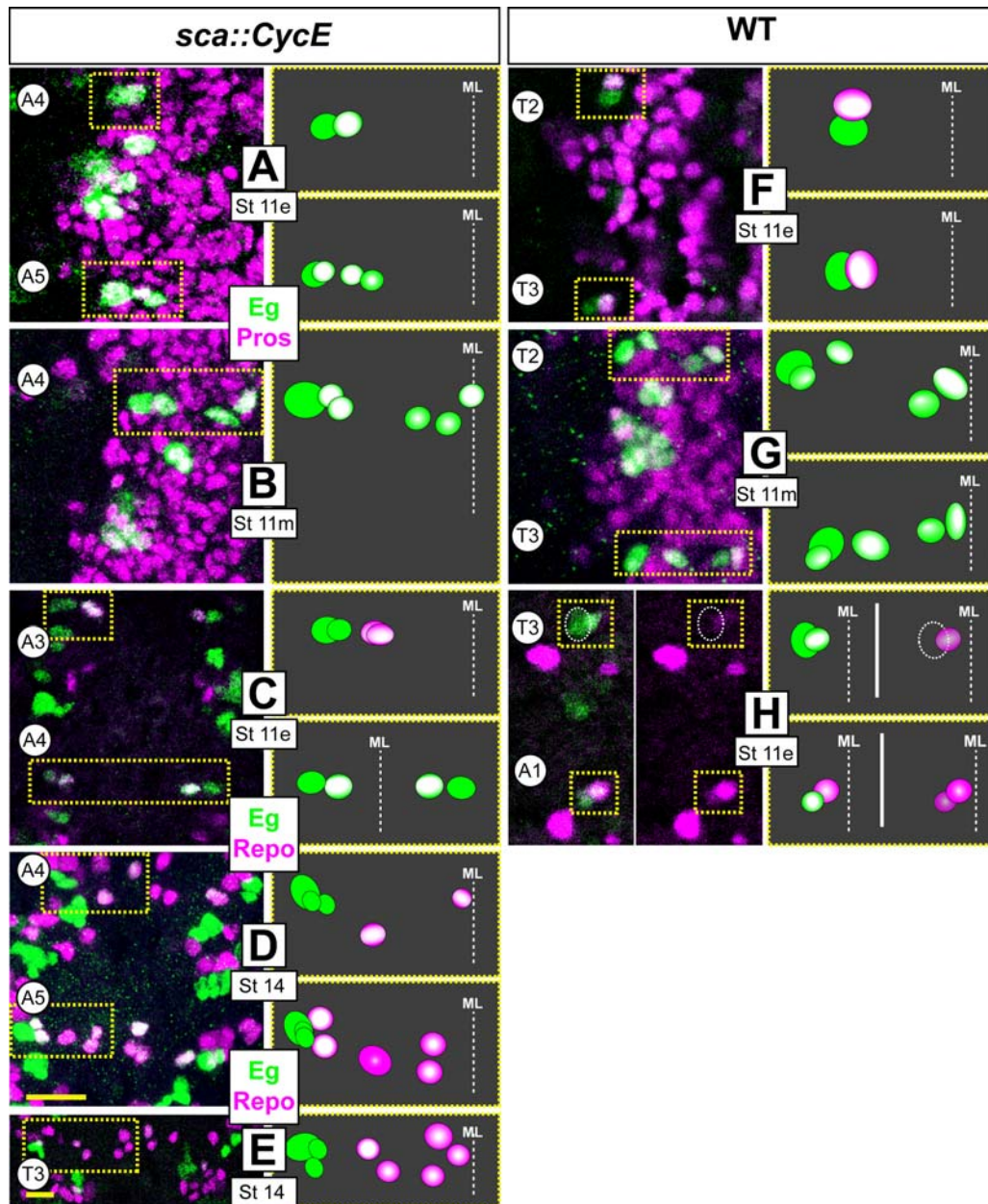


Abb. 3-17: Ektopische Expression von *CycE* in abdominalen Segmenten ist ausreichend, den NB6-4a in einen thorakalen Neuroglioblasten zu transformieren.

A.-E. zeigt die Verteilung der Faktoren Eagle (Eg, grün) und Prospero (Pros) und Reversed-Polarity (Repo, alle in magenta) in Segmenten von *CycE*⁺⁺-Embryonen. F.-H. zum Vergleich im Wildtyp.

A. Der abdominale NB6-4 zeigt eine vermehrte Teilungsaktivität (A5) nach ektopischer Expression von *CycE*. Pros wird während der ersten Teilung asymmetrisch in die medial gelegene Zelle verteilt (A4). Dies ist normalerweise in thorakalen Segmenten der Fall (F.).

B. In späteren Stadien wandern einige Zellen nach medial und behalten die Pros Expression, wie die Gliazellen in wildtypischen Embryonen (G.). Andere Zellen verbleiben in lateraler Position und exprimieren ebenfalls Pros, wie die neuronalen Gangliemutterzellen (G.).

C. Färbungen gegen Repo zeigen, dass durch die erste Teilung das gliale vom neuronalen Schicksal in abdominalen Segmenten von *CycE*⁺⁺-Embryonen getrennt wird. Der abdominale NB6-4a ist in einen thorakalen Neuroglioblasten transformiert worden. (siehe Wildtyp H.)

D. In späteren Stadien sind Gliazellen in typischer thorakaler Anordnung und laterale Neurone (kein Repo, aber Eg) zu erkennen. Aufgrund der ektopischen Expression von *CycE* ist ein gemischter thorakaler Zellstammbaum entstanden. Hier konnten zum Teil mehr als drei Gliazellen (wildtypische Zahl) beschrieben werden. In diesen Fällen waren circa drei bis vier Neurone zu beobachten.

E. Thorakalsegmente von *CycE*⁺⁺-Embryonen zeigen ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Gliazellen und verminderte Neuronenzahl. Dies kommt vermutlich durch die anomal hohen Level an *CycE* zustande.

Wie bereits in Abschnitt 3.4.3. beschrieben, ist Hb ein weiterer Faktor, der zum einen für die Bildung der Gliazellen im NB6-4t notwendig ist und zum anderen als Marker für diese Zellen benutzt werden kann. Im WT wird bereits in der ersten Teilung die *hb*-mRNA in den glialen Anteil des NB6-4t verteilt. Das Hb-Protein ist präferentiell im Gliavorläufer zu finden und wird im neuronalen Vorläufer schnell abgebaut (siehe Abschnitt 3.4.3. und Abb. 3-10). Als Marker in *CycE*⁺⁺-Embryonen eingesetzt, kann mit dem Hb-Protein untersucht werden, ob im abdominalen NB6-4 ein neuronales Zellschicksal entstanden ist, da nur Gliazellen ein Hb-Signal haben. Abb. 3-18 zeigt eine solche Hb-Antikörperfärbung. Es ist zu erkennen, dass nach der ersten Teilung nur die medial gelegene Zelle Hb-positiv ist. Dasselbe Verteilungsmuster zeigen wildtypische thorakale Segmente (Abb. 3-10C). In späteren Stadien sind nur die beiden medial gelegenen Zellen, die Gliazellen also, Hb-positiv. Folglich weist auch die Verteilung von Hb deutlich auf eine Transformation des NB6-4a in einen Neuroglioblasten hin.

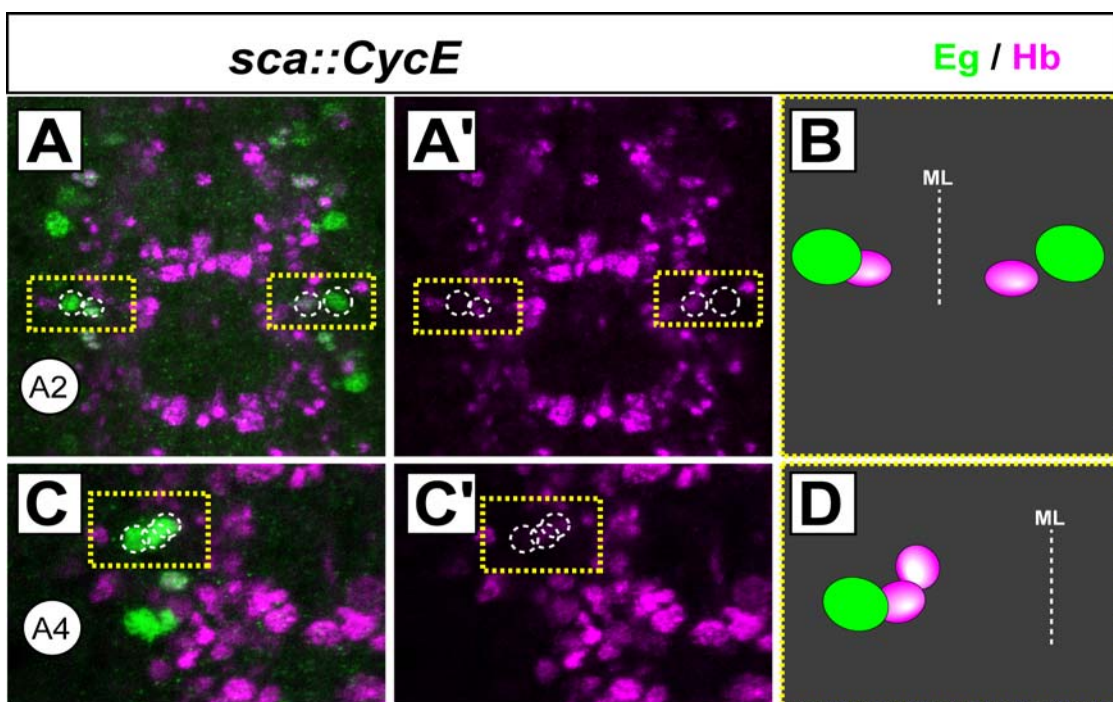


Abb. 3-18: Nach ectopischer Expression von *CycE* bestätigt die Expression von Hunchback die Transformation des NB6-4a in einen thorakalen Neuroglioblasten.

A. Nach der ersten Teilung ist die Hunchback (Hb, magenta) Expression nur in der medialen Zelle zu beobachten. A' zeigt dasselbe Bild, jedoch nur das Hb Signal. Dies wurde ebenfalls in wildtypischen thorakalen Segmenten beschrieben (Abb. 3-10C)

B. Illustration der Bilder A. und A'.

C. Nach der zweiten Teilung ist Hb nur in den medialen Gliazellen exprimiert. C' zeigt das Hb Signal.

D. Illustration der Bilder B. und B'.

Einzelzelltransplantation bestätigen die Transformation

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die ektopische Expression von *CycE* im abdominalen Vorläufer des NB6-4 ausreichend ist, diesen in eine thorakale Variante zu transformieren. Um definitiv feststellen zu können, ob die lateralen Repo-negativen Zellen Neurone sind, wurden Einzelzelltransplantationen durchgeführt.

Abdominale NEZ von markierten *CycE*⁺⁺-Embryonen (Stadium 7) implantierte ich an entsprechender Stelle ins abdominale Neuroektoderm von unmarkierten wild-typischen Empfängerembryonen (Stadium 7; für weitere methodische Aspekte siehe Abschnitt 2.14. und 2.14.3.). Zunächst sollen die Transplantationsklone besprochen werden, die vom NB6-4 abstammen (Tab. 3-4). In Abb. 3-19 sind exemplarisch zwei dieser Transplantationsklone gezeigt.

Insgesamt konnten fünf Zellklone dem NB6-4 eindeutig zugeordnet werden. Einer dieser Zellklone war wildtypisch und entwickelte zwei Gliazellen. Die anderen vier Zellklone ließen Transformationsphänotypen unterschiedlicher Ausprägung erkennen. Wie in den beiden Zellklonen der Abb. 3-19 zu sehen ist, entstehen bis zu

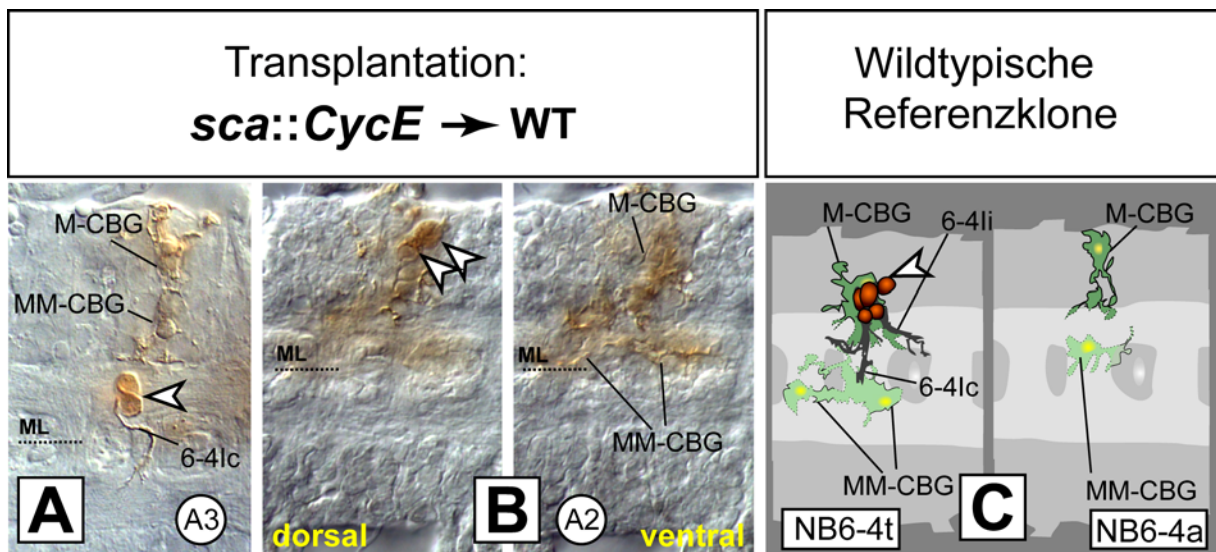


Abb. 3-19: Die transformierende Funktion von *CycE* im NB6-4a ist zellautonom.

A. und B. Zwei Zellklone des NB6-4 nach Transplantation. Es wurden Neuroektodermzellen von *CycE* ektopisch exprimierenden Spenderembryonen des Stadium 7 in das Neuroektoderm wildtypischer Empfängerembryonen des selben Stadiums transplantiert.

A. Der Zellklon des NB6-4 zeigt zwei medial gelegene Neurone mit kurzer kontralateraler Projektion durch die posteriore Kommissur. Weiterhin sind zwei Gliazellen zu beobachten (M-CBG und MM-CBG).

B. Linkes Bild: Dorsale Ansicht eines zweiten Zellklons des NB6-4. Hier liegen zwei sphärisch abgerundete Zellen (Neurone) in dorsolateraler Position. Projektionen sind nicht zu sehen. In der ventralen Ansicht (rechtes Bild) sind drei Gliazellen in typischer thorakaler Anordnung zu erkennen.

In C. sind zum Vergleich Illustrationen des wildtypischen thorakalen und abdominalen Zellklons gezeigt (entnommen aus Schmidt *et al.*, 1997).

zwei Neurone, die in unterschiedlichen Positionen liegen. Der Zellklon in Abb. 3-19B zeigt darüber hinaus drei CBG, die in einer typischen thorakalen Anordnung liegen. Dies belegt, dass *CycE* in einer zellautonomen Weise agiert. Außerdem bestätigt dieses Experiment, dass *CycE* ausreichend ist, den abdominalen NB6-4 in einen thorakalen NGB6-4 zu transformieren: Es bilden sich sowohl Neurone als auch Gliazellen (vergleiche Abb. 3-17).

<i>Zelltransplantation</i>		<i>DiI-Markierung</i>	
Wildtypische Zellklone	Veränderte Zellklone	Wildtypische Zellklone	Veränderte Zellklone
1x 2-1 1x 3-2 1x 3-5 1x 4-2 1x 4-3 1x 5-1 1x 5-4a 2x 6-1 1x 6-4a 1x 7-3	4x MP2 3x 1-1a 1x 4-1 3x 5-4a 4x 6-4a	2x MP2 1x 2-1 1x 2-2t 5x 2-2a 1x 3-1a 2x 3-2 1x 3-3a 2x 5-1 1x 5-2 1x 5-3 3x 6-1 2x 6-2 1x 7-3	2x MP2 2x 1-1a 1x 5-4a 1x 7-3

Tab. 3-4 : Transplantations- und DiI-Markierungsexperimente in *CycE++*Embryonen

Wie Tab. 3-4 verdeutlicht, wurden auch Klone anderer NBs dokumentiert. Sie werden im Folgenden beschrieben. Darüber hinaus sollen DiI-Markierungsexperimente in *CycE++*-Embryonen weitere Aussagen über andere Neuroblastenklone ergeben. Einzelne Neuroektodermalzellen der *CycE++*-Embryonen wurden hierzu direkt angefärbt (Methodik siehe Abschnitt 2.14. und 2.14.4.). Die Ergebnisse dieser Experimente sind ebenfalls in Tab. 3-4 zusammengefasst.

3.9. Auswirkung ektoptischer *CyclinE* Expression auf andere abdominale Neuroblastenzellstammbäume

Für die Mehrzahl der NBs konnte kein Einfluss einer ektoptischen Expression von *CycE* beschrieben werden (Tab. 3-4). Eine Ausnahme war der NB1-1a, der ebenfalls einen Transformationsphänotypen aufwies. In Abb 3-20A ist ein solcher Zellklon gezeigt. Alle Klonbestandteile des wildtypischen Referenzklons (Abb. 3-20B) sind vorhanden. Darüber hinaus gibt es eine zusätzliche motoneuronale Projektion (1-1Ms), die nicht von der Zelle aCC („anterior corner cell“) stammt. Vielmehr entspringt diese Projektion dem posterior und lateral gelegenen Neuronencluster. Im WT ist das nur in der thorakalen Variante des NB1-1t zu beobachten. Das zusätzliche Motoneuron konnte sowohl in allen Transplantationsklonen (drei Klone), als auch in zwei durch Dil-Markierung erhaltenen NB1-1a Klone (Tab. 3-4, kein Bild) beschrieben werden.

Es ist offensichtlich, dass durch die ektoptische Expression von *CycE* ein neues Zellschicksal in abdominalen Segmenten entstanden ist, welches in wildtypischen Klonen nur in Thorakalsegmenten vorkommt. Für den NB1-1 ist kein immunhistochemischer Marker bekannt, der alle Zellen dieses NBs anfärbt. Deshalb gibt es auch keine Möglichkeit, dieses einzelne Motoneuron mit Antikörperfärbung zu markieren. Es konnte also keine weiteren Untersuchungen vorgenommen werden. Wünschenswert wäre es, wenn Marker gefunden würden, die einen Zugang zu dieser Zelle und dem Entstehungsmechanismus möglich machen.

Ein weiterer Zellklon mit möglichem Transformationsphänotyp ist der in Abb. 3-20C gezeigte Klon des NB5-4a. Im WT besteht dieser Klon aus einem dorsomedial und drei bis vier dorsolateral gelegenen Motoneuronen (Abb. 3-20D und Schmidt *et al.*, 1997). Durch die ektoptische Expression von *CycE* treten hauptsächlich zwei Phänotypen auf. Zum einen kann es zu einer Duplikation des dorsomedialen Motoneurons kommen, zum andern können in einigen Klonen bis zu zehn dorsolaterale Motoneurone entstehen. Der Klon in Abb. 3-20C zeigt beide Phänotypen. Diese Phänotypen konnten auch in einem Klon nach Dil-Markierung beobachtet werden (Abb. 3-21J linker Klon). In Bezug auf die Tagmaspezifität ist besonders die Anzahl der dorsolateralen Motoneurone interessant, da im WT für die thorakale Variante des NB5-4t bis zu neun dorsolaterale Motoneurone beschrieben wurden (Abb. 3-20D und Schmidt *et al.*, 1997, abdominaler Zellklon hat drei bis vier dorsale Neurone). Dies war in den hier gezeigten Klonen ebenfalls der Fall war.

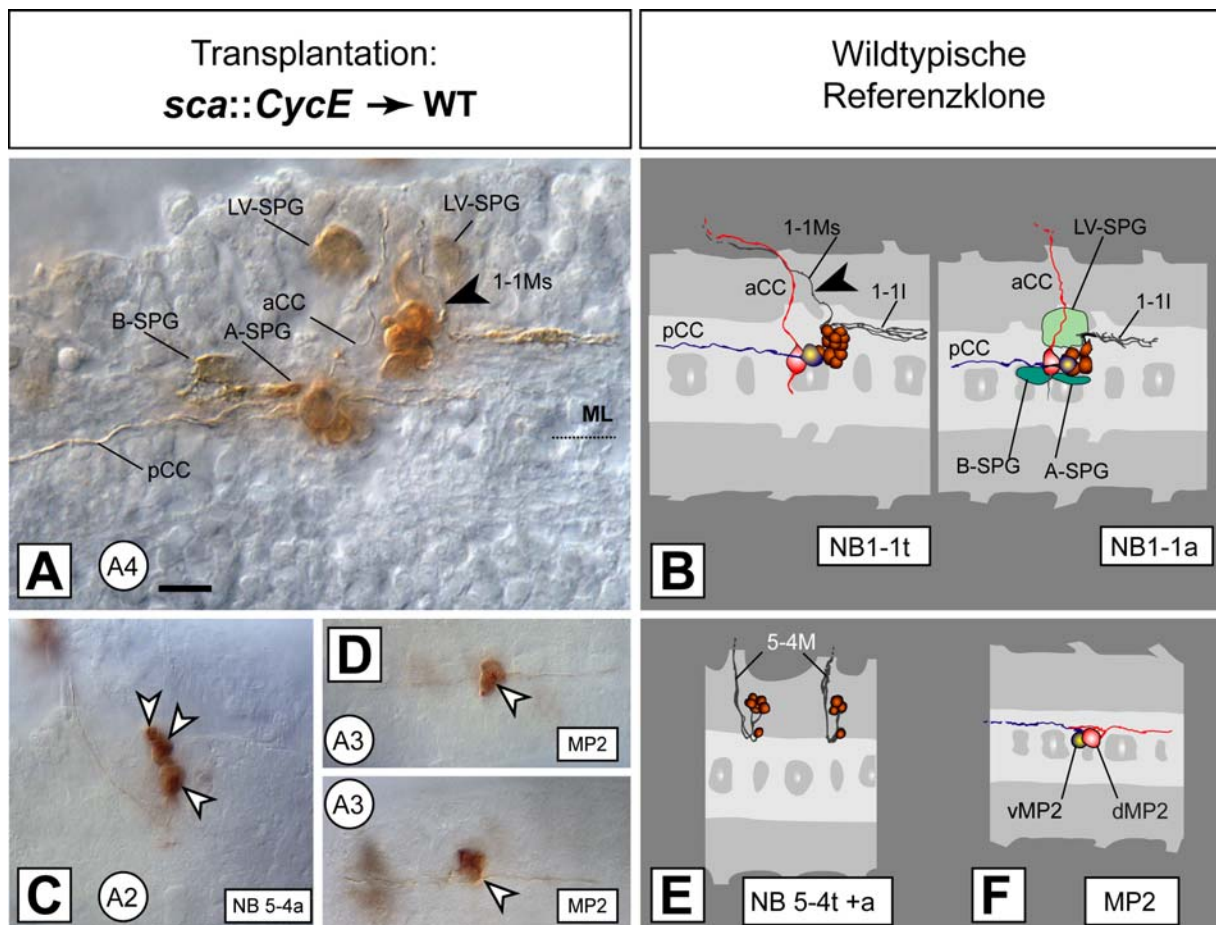


Abb. 3-20: Andere Neuroblastenzellklone zeigen ebenfalls Transformationen nach ektopischer Expression von *CycE*.

A. Nach ektopischer Expression von *CycE* ist im NB1-1a eine Transformation erkennbar. Der abgebildete Zellklon hat alle Bestandteile eines abdominalen Zellstammbaums (siehe zum Vergleich B.), jedoch ein zusätzliches Motoneuron (1-1MS, schwarzer Pfeil), das normalerweise nur im thorakalen Stammbaum zu finden ist (siehe B.).

B. Wildtypische Referenzklone entnommen aus Bossing *et al.* (1996).

C: Der Zellklon des NB5-4a zeigt zum einen eine Duplikation des medialen Neurons und zum anderen eine Zunahme der dorsolateralen Neurone (von drei bis vier auf circa neun, weiße Pfeile). Dies entspricht in etwa dem wildtypischen thorakalen Zellstammbaum (E.).

D. Der MP2 Zellklon hat einen Duplikationsphänotyp - der gesamte Zellstammbaum wird mehrfach gebildet (weiße Pfeile).

E. und F Wildtypische Referenzklone der NBs 5-4 und MP2 entnommen aus Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997).

Leider gibt es für den NB5-4 keinen immunhistochemischen Marker, so dass ich keine weiteren Aussagen treffen kann.

Einen Duplikationsphänotyp, wie im Falle des dorsomedial gelegenen Motoneurons des NB5-4, konnte ebenfalls für den Klon des MP2 festgestellt werden. Hier zeigten sowohl die Klone aus den Transplantationen als auch die Klone der Dil-Markierung einfache bis vierfache Duplikationen (Abb. 3-20D, Abb3-21M und Tabs. 3-4, 3-5). Im Falle des MP2 scheint eine ektopische Expression von *CycE* weitere

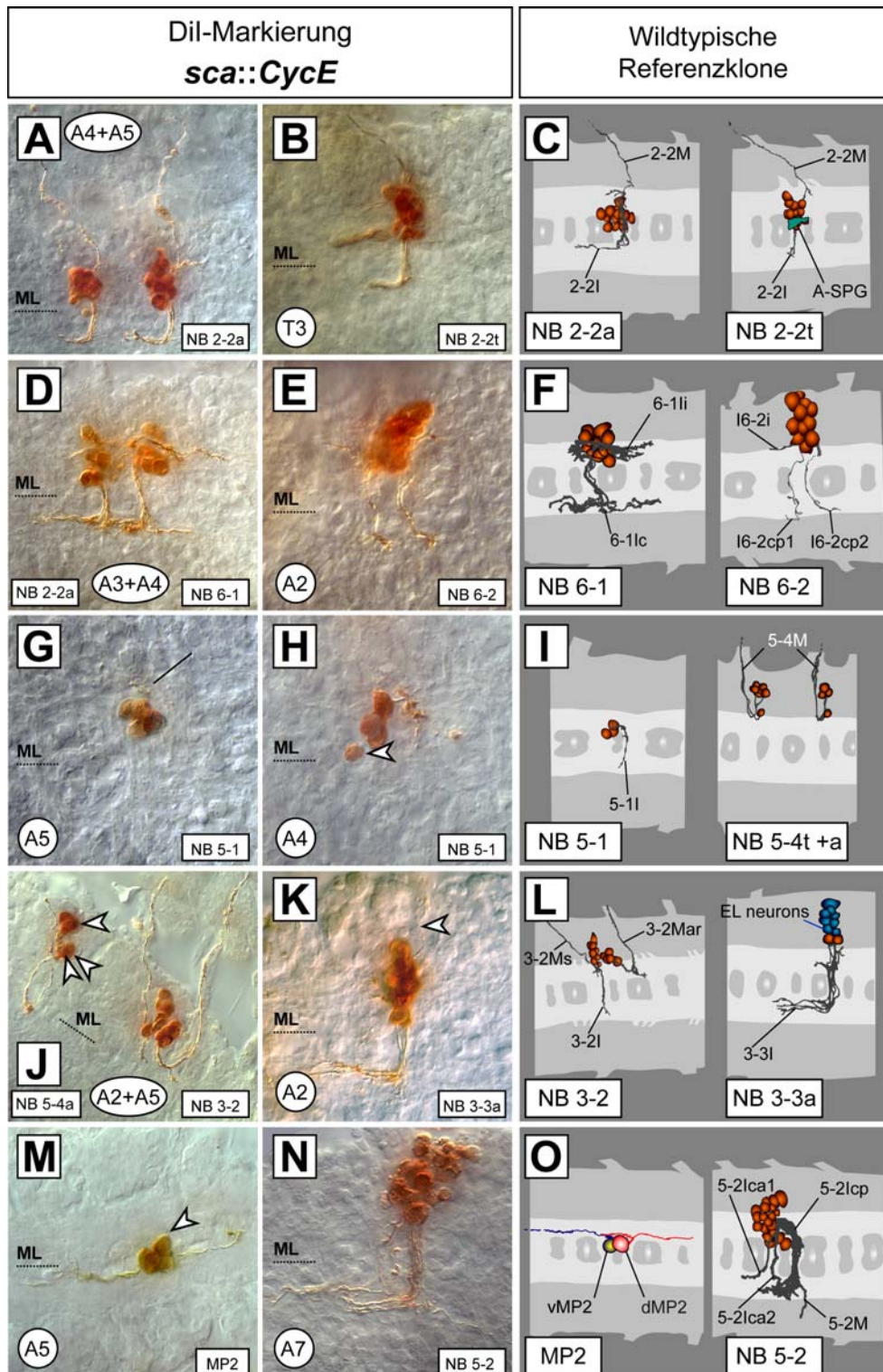


Abb. 3-21: Viele Neuroblastenzellklone zeigen keine Transformationen nach ektopischer Expression von *CycE* und haben wildtypische Phänotypen.

Abgebildet sind Zellklone nach DiI-Markierung einzelner neuroektodermaler Zellen in *CycE* ektopisch exprimierenden Embryonen.

Der Klon des NB5-4 in J. hat zusätzliche Neurone, der des NB3-3a in K. eine zusätzliche Motoprojektion und der des MP2 in M. einen Duplikationsphänotyp. Alle anderen abgebildeten Zellklone haben wildtypische Zellzahlen und zeigen keine Veränderungen.

Wildtypische Referenzklone entnommen aus Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997).

Teilungen entweder des Vorläufers oder der beiden entstehenden Zellen hervorzurufen, wodurch mehrfach dasselbe Zellschicksal entsteht.

In den Dil-Markierungsexperimenten wurde darüber hinaus ein Klon des NB7-3 beschrieben, der eine zusätzliche Zelle generierte. In einem weiteren Zellklon, sowie den Antikörperfärbungen mit Eg (siehe zum Beispiel Abb. 3-17D, der NB7-3 liegt etwas medial und posterior vom im Bild umrandeten NB6-4; Lage zueinander siehe Abb. 3-7) konnte jedoch keine Veränderung aufgrund einer erhöhten Expression von *CycE* beobachtet werden.

Viele Neuroblastenzellstambäume entwickeln wildtypische Zellklone

Viele der in Abb. 3-21 gezeigten Klone der Dil-Markierungsexperimente sind wildtypisch. Auffällig ist jedoch, dass die Zellzahlen bei einer Vielzahl der Klone an der oberen Grenze der durch Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997) beschriebenen natürlichen Varianz waren. Zum Beispiel haben die beiden Klone des NB2-2a in Abb. 3-21A jeweils 16 Neurone. Bossing *et al.* (1996) beschrieben den Klon mit 12-16 Zellen. Besonders auffällig war dies in kleinen Klonen wie dem des NB5-1, der mit zwei bis vier Zellen beschrieben wurde (Bossing *et al.*, 1996). Dieser hatte in den Experimenten immer vier Zellen (Abb. 3-21G, H). Jedoch bleibt aufgrund der geringen Anzahl der erhaltenen Klone fraglich, ob dies tatsächlich ein Effekt der ektopischen Expression von *CycE* ist oder hier nur Klone dokumentiert wurden, die aus anderen Gründen an der oberen Grenze der natürlichen Varianz sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine ektopische Expression von *CycE* einen Transformationsphänotypen im NB1-1a und wahrscheinlich im NB5-4a hervorruft. Eine genauere Charakterisierung der beiden Zellklone ist nur schwer möglich, da keine ausreichenden molekularen Marker vorhanden sind. Weiterhin konnten Duplikationsphänotypen beschrieben werden, die besonders auffällig im MP2-Zellklon waren: Er vervierfachte sich in einigen Fällen. Für die meisten erhaltenen Zellklone wurden jedoch wildtypische Phänotypen beschrieben. Im Folgenden wird der NB1-1 etwas eingehender untersucht.

3.10. Einfluss weiterer positiver Zellzyklusregulatoren auf die Entstehung der NB1-1 Neurone aCC und pCC

Eine ektopische Expression von *CycE* zeigte ein zusätzliches Motoneuron in der abdominalen Variante des NB1-1a. Dieses Motoneuron entspringt dem dorsolateralen Neuronencluster (siehe Abschnitt 3.9. und Abb. 3-20A). Da sich diese Aussage jedoch nur aufgrund der visuellen Beobachtung des Mikromanipulationspräparates stützt und kein molekularer Marker für diese Zelle vorhanden ist, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass dieses Neuron nicht aufgrund einer Duplikation des normalerweise einzigen Motoneurons des NB1-1a, des aCC Neurons, entstanden ist. Duplikationsphänotypen konnten in diesen Experimenten auch für andere Neurone beschrieben werden (siehe Abschnitt 3.9., zum Beispiel MP2). Die Neurone aCC und pCC („posterior corner cell“) entstehen aus der ersten GMZ des NB1-1: aCC ist ein Motoneuron, pCC ein Interneuron (Udolph *et al.*, 1993). Mit einem Antikörper gegen das Genprodukt Even-skipped (Eve) ist ein Marker für die Neurone aCC und pCC vorhanden (Broadus und Doe, 1995; Thomas *et al.*, 1984). Daher wurde im Folgenden das Schicksal dieser beiden Zellen in ektopischen Expressionsexperimenten verschiedener positiver Zellzyklusregulatoren untersucht. In Abb. 3-22 sind Eve-Antikörperfärbungen von wildtypischen, *CycE*⁻, *CycE* und *string*- (*stg*, Koexpression) und *stg*-ektopisch exprimierenden Embryonen gezeigt. *string* ist das homologe Fliegengen zur *cdc25* Phosphatase bei Vertebraten. Dieses Gen aktiviert den CycB/*cdc2* Kinase-Komplex und ist somit ein wichtiger Initiator der Mitose (Edgar *et al.*, 1994). Für *stg*-Funktionsverlustmutante Embryonen konnte gezeigt werden, dass NBs zwar gebildet werden, diese sich aber nicht mehr teilen, weshalb eine mögliche Funktion von *stg* innerhalb der Entwicklung des Neuroblastenzellstammbaums vermutet werden kann.

In wildtypischen Embryonen werden Zellen von vier verschiedenen NBs mit dem Eve-Antikörper angefärbt. Diese sind die lateral gelegenen Neurone des NB3-3, die medial gelegenen Motoneurone des NB7-1 (U oder CQ-Neurone), das RP2 („Royal Prawn“) Neuron des NB4-2 und die aCC und pCC Neurone des NB1-1 (siehe Abb. 3-22A, B). Zur besseren Verständlichkeit der Färbungen wurde mithilfe der Amira Software 3D-Rekonstruktionen eines Segmentes gemacht, die in den Abb. 3-22A, D, G und J zu sehen sind.

In Abb. 3-22D und E ist ein Segment eines *CycE*⁺⁺-Embryos zu sehen. In beiden Abbildungen ist nur ein aCC und ein pCC Neuron zu erkennen. Wird hin

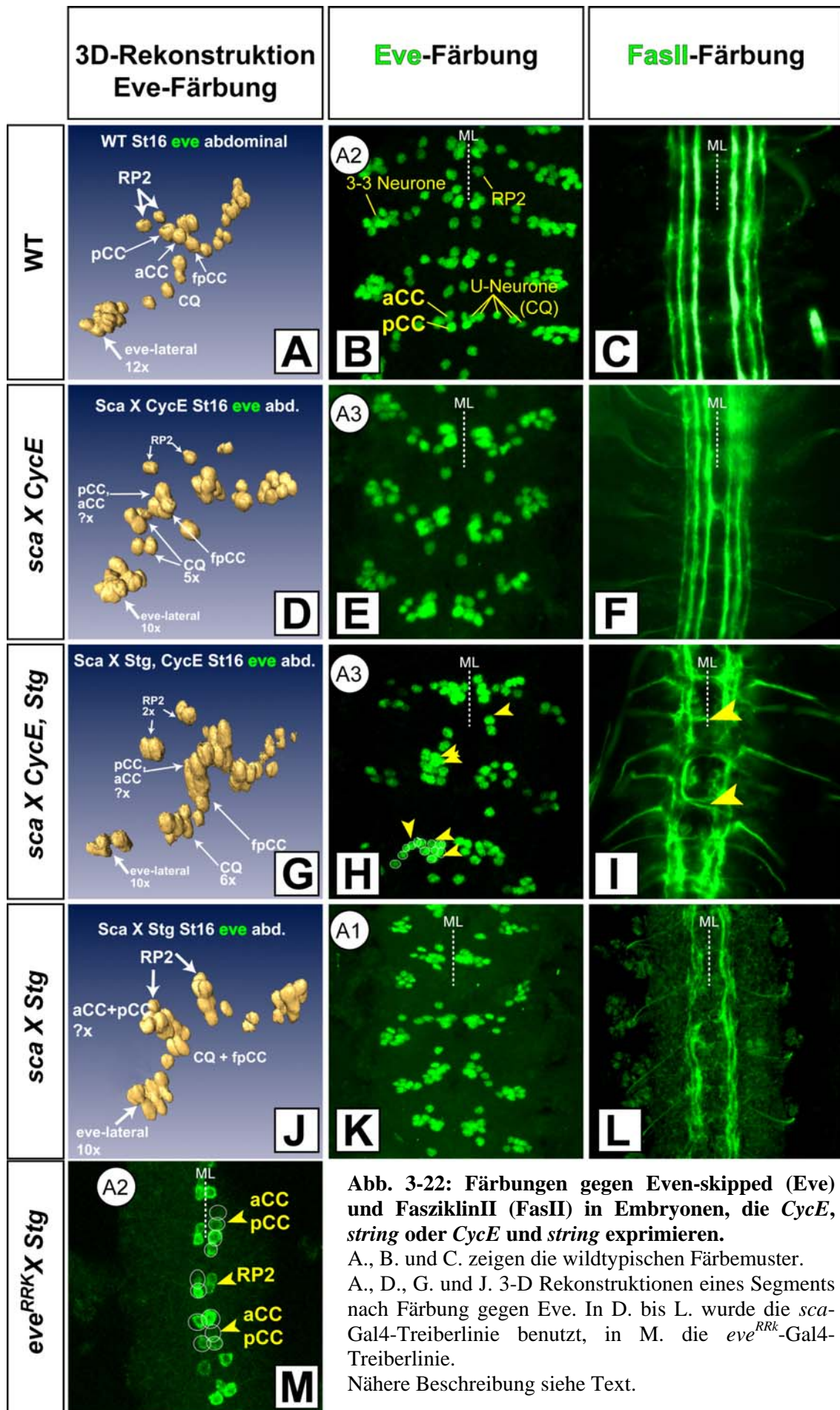


Abb. 3-22: Färbungen gegen Even-skipped (Eve) und FasziklinII (FasII) in Embryonen, die *CycE*, *string* oder *CycE* und *string* exprimieren.

A., B. und C. zeigen die wildtypischen Färbemuster.

A., D., G. und J. 3-D Rekonstruktionen eines Segments nach Färbung gegen Eve. In D. bis L. wurde die *sca*-Gal4-Treiberlinie benutzt, in M. die *eve^{RRK}*-Gal4-Treiberlinie.

Nähere Beschreibung siehe Text.

gegen zu *CycE* gleichzeitig *stg* ektopisch exprimiert, so tritt ein Duplikationsphänotyp auf (Abb. 3-22G, H, gelbe Pfeile). Neben aCC und pCC ist ebenfalls das RP2 Neuron verdoppelt und mehr U-Neurone zu beobachten. Wird *stg* hingegen alleine ektopisch exprimiert, so ist dieser Duplikationsphänotyp nur schwer zu erkennen (Abb. 3-22J, K). Um den Effekt einer ektopischen Expression von *stg* weiter zu untersuchen, wurde eine andere Treiberlinie, *eve^{RRK}*-Gal4, benutzt. Durch diese Treiberlinie wird *stg* nur in den GMZ1 der NBs 1-1 und 4-2 exprimiert (Baines *et al.*, 1999). Ein Effekt kann also nur in den Neuronen aCC, pCC und RP2 entstehen. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 3-22M gezeigt. Die ektopische Expression von *stg* führt zu einem Duplikationsphänotyp dieser Neurone.

Aus diesen Experimenten konnte ich schließen, dass das Zusammenwirken von erhöhtem Level an *CycE* (G1-S-Phase) und *string* (M-Phase) zu einem Duplikationsphänotypen der Neurone aCC, pCC, RP2 und den U-Neuronen führt. Eine alleinige ektopische Expression von *CycE* ruft jedoch keine Duplikation des aCC-Motoneuron hervor. Diese Daten unterstützen die Erkenntnisse, dass das zusätzliche Motoneuron des NB1-1a nach ektopischer Expression von *CycE* ein neues Zellschicksal im dorsolateral gelegenen Zellcluster ist. Es handelt sich nicht um eine Duplikation des aCC-Motoneurons.

Koexpression von *CycE* und *stg* führt zu stark veränderten axonalen Muster

Da eine gleichzeitige Expression von *CycE* und *stg* dramatische Auswirkungen auf die Gesamtzellzahl im ZNS zu haben scheint (siehe oben), sollte eine Färbung gegen FasziklinII (FasII) einen Einblick in das axonale Muster solcher Embryonen geben. FasziklinII ist ein Oberflächenadhäsionsmolekül, das auf Axonen exprimiert wird (Halpern *et al.*, 1991). In Abb. 3-22C ist das Muster im WT gezeigt. In späten Stadien sind longitudinal verlaufende Axonbündel gefärbt. Diese überqueren nie die Mittellinie. In *CycE*⁺⁺-Embryonen hingegen verlaufen einige Axone über die Mittellinie hinweg (Abb. 3-22F). Dies steht in Übereinstimmung mit den wenig veränderten Zellklonen und den wenigen potentiell zusätzlichen Neuronen, die in den Transplantations- oder Dil-Markierungsexperimenten beobachtet werden konnten (siehe Abschnitt 3.9.). In Embryonen, die sowohl *CycE* als auch *stg* ektopisch exprimieren, sieht das axonale Muster dagegen stark verändert aus (Abb. 3-22I, gelbe Pfeile). Hier sind große Löcher und zahlreiche, die Mittellinie kreuzende Axone

zu beobachten. Der gezeigte Embryo ist im Stadium 15, einem etwas jüngeren Stadium als die Embryonen der Abb. 3-22C oder F.

Da diese Ergebnisse eine dramatische Veränderung der entstehenden Zellstammbäume vermuten lassen, sollte mit den folgenden Transplantations- und Dil-Markierungsexperimenten der möglicher Einfluss einer Koexpression von *CycE* und *stg* untersucht werden.

3.11. Koexpression von *CyclinE* und *string* führt zu einer vermehrten Zellzahl, die durch Zelltod reguliert wird

Wie bereits in Abschnitt 3.10. beschrieben, konnte durch die gleichzeitige Überexpression von *CycE* und *stg* sowohl ein Duplikationsphänotyp (Eve-Färbungen) als auch ein stark verändertes axonales Muster (FasII-Färbungen) im Stadium 15 beschrieben werden. Dies lässt einen erheblichen Einfluss beider Gene auf die Gesamtzellzahl des ZNS vermuten. Weiter Transplantationen und Dil-Markierungsexperimente sollten hierüber Auskunft geben.

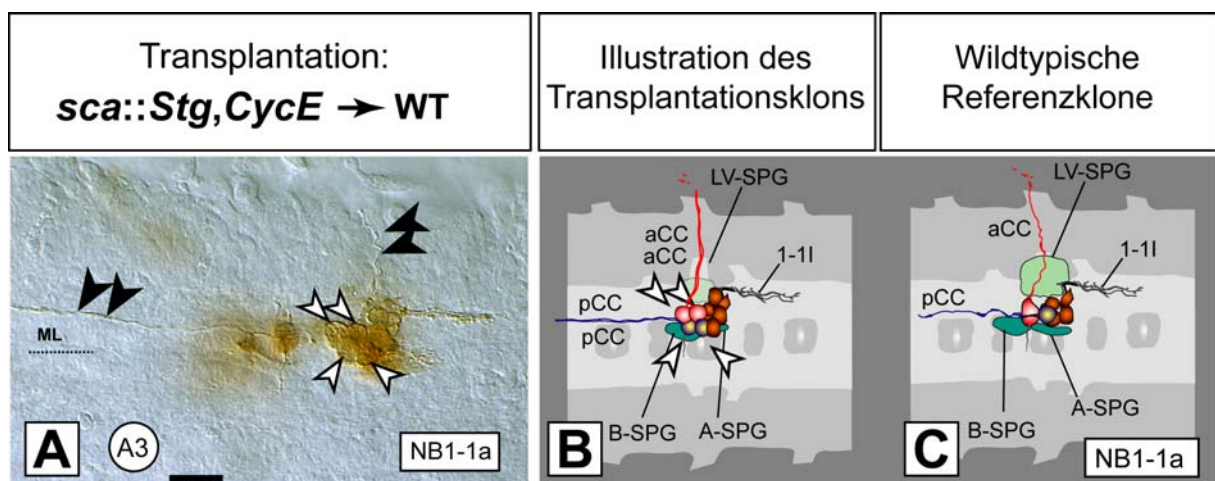


Abb. 3-23: Nach ektopischer Koexpression von *CycE* und *string* zeigt der Neuroblastenzellklon des NB1-1a eine Duplikation der aCC und pCC Neurone.

A. Neuroblastenzellklon des NB1-1a nach Transplantation neuroektodermaler Zellen aus *CycE*, *stg++*-Embryonen in wildtypische Empfängerembryonen (Stadium 7 in Stadium 7). Die Neurone der ersten Gangliennutterzelle, aCC und pCC, sind verdoppelt (weiße Pfeile). Ebenfalls sind deren Axone verdoppelt (schwarze Pfeile).

B. Illustration des Transplantationsklons.

C. Wildtypischer Referenzklone entnommen aus Bossing *et al.* (1996)

Die Ergebnisse sind in Tab. 3-5 aufgelistet.

Auffällig ist, dass kaum ein Klon einen veränderten Phänotyp aufweist. Einer der NBs, die tatsächlich Unterschiede zum WT zeigen, ist der NB1-1a, dessen Zellklon in Abb. 3-23A dargestellt ist. Abb. 3-23B stellt eine Illustration des Transplantationsklons dar. Wie bereits bei der Eve-Färbung beschrieben (siehe Abschnitt 3.10., Abb. 3-22), zeigt der NB1-1a einen Duplikationsphänotypen der ersten GMZ: aCC und pCC sind verdoppelt. Dies war in allen erhaltenen Zellklonen des NB1-1a der Fall.

<i>Zelltransplantation</i>		<i>DiI-Markierung</i>	
Wildtypische Zellklone	Veränderte Zellklone	Wildtypische Zellklone	Veränderte Zellklone
1x 1-2 5x 1-3 2x 2-4a 1x 2-5 1x 3-1 4x 3-2 3x 3-3a 3x 3-5 6x 4-2 4x 4-3 5x 4-4 1x 5-5 4x 5-6a 1x 6-2 1x 6-4a 1x 7-2 1x 7-3 1x 7-4	1x MP2 3X1-1a 4x 2-5 3x 5-2 1x 5-4 2x 6-4a 1x 7-4	3x 1-3 2x 2-4 4x 2-5 3x 3-2 1x 3-3 8x 3-5 3x 4-2 1x 5-2 2x 5-3 1x 5-5 4x 5-6 4x 7-4	1x 6-4a more glia cells

Tab. 3-5 : Transplantations- und DiI-Markierungsexperiment in *CycE, stg++* Embryonen

Weitere Klone die einen Duplikationsphänotyp zeigten, waren die Klone der NBs 2-5, 5-2 und 5-4. Die Klone der NBs 2-5 (C) und 5-6 (A, B) sind in Abb. 3-24 gezeigt. Ob der NB5-6 ebenfalls einen Duplikationsphänotyp zeigt bleibt fraglich. Deutlich zu erkennen ist, dass der Klon mehr Zellen (sechs Neurone und fünf bis sechs Gliazellen) hat als wildtypische Zellklone (vier Neurone, vier Gliazellen). In Abb. 3-24B ist ein weiterer Klon des NB5-6 zu erkennen. Dieser zeigt eine erhöhte Anzahl der Neurone.

Der Klon des NB2-5 zeigt gleichfalls eine Duplikation der Zellen, die aus der ersten GMZ entstehen (Abb. 3-24C, 2-5M und 2-5Ic1, persönliche Mitteilung von

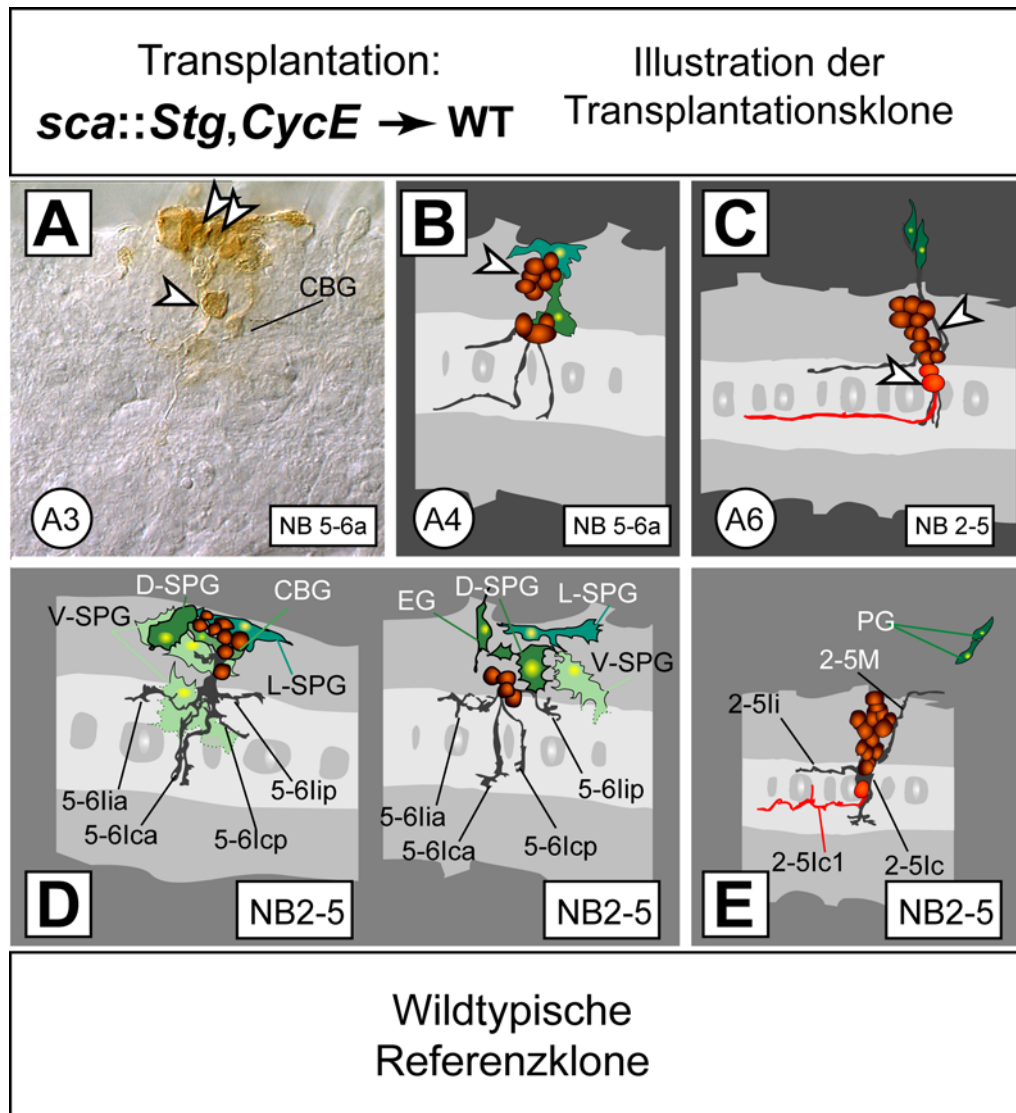


Abb. 3-24: Nach ektopischer Koexpression von *CycE* und *string* zeigen einige Neuroblastenzellklone eine Duplikation der ersten Gangliengmutterzelle.

A. zeigt den Neuroblastenklon des NB5-6a nach Transplantation neuroektodermaler Zellen aus *CycE*, *stg*⁺⁺-Embryonen in wildtypische Empfängerembryonen (Stadium 7 in Stadium 7).

B. zeigt die Illustration des Transplantationsklons. Im Vergleich zum wildtypischen Zellklon (D. rechts) sind zu viele Neurone entstanden (weiße Pfeile).

C. zeigt die Illustration eines Transplantationszellklons des NB2-5. Dieser zeigt eine Duplikation des prominenten medialen Interneurons (rot) und des Motoneurons (weißer Pfeil).

E. zeigt den wildtypischen Referenzklon des NB2-5.

Wildtypischen Referenzklone entnommen aus Schmidt *et al.* (1997)

Christof Rickert). Dies war auch in den drei anderen Klonen des NB2-5 der Fall. Eine ebensolche Duplikation der ersten GMZ generierte der Klon des NB5-2 (nicht gezeigt): Hier trat ein zusätzliches Motoneuron auf. Dies bedeutet, dass einige Klone durch ektopische Koexpression von *CycE* und *stg* eine Verdopplung der ersten GMZ zeigen. Jedoch handelt es sich um keinen penetranter Phänotyp - das zeigten die Dil-Markierungsexperimente. Hier wiesen beispielsweise die NBs 2-5 und 5-2 keine Verdopplung auf (in insgesamt fünf erhaltenen Klonen).

Bisher konnten Verdoppelungen nur für GMZs beschrieben werden, die Motoneurone generieren. Daher könnte dies ein spezifischer Effekt motoneuronaler GMZs sein. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da der NB4-2 sowohl in Transplantations- als auch in Dil-Markierungsexperimenten keinen Phänotyp zeigt (GMZ1 generiert das RP2 Motoneuron, siehe Tab. 3-5, insgesamt neun Klone). Festzuhalten ist, dass nur in einigen wenigen Klonen deutliche Veränderungen im Vergleich zum WT erkennbar sind. Die meisten Klone waren wildtypisch.

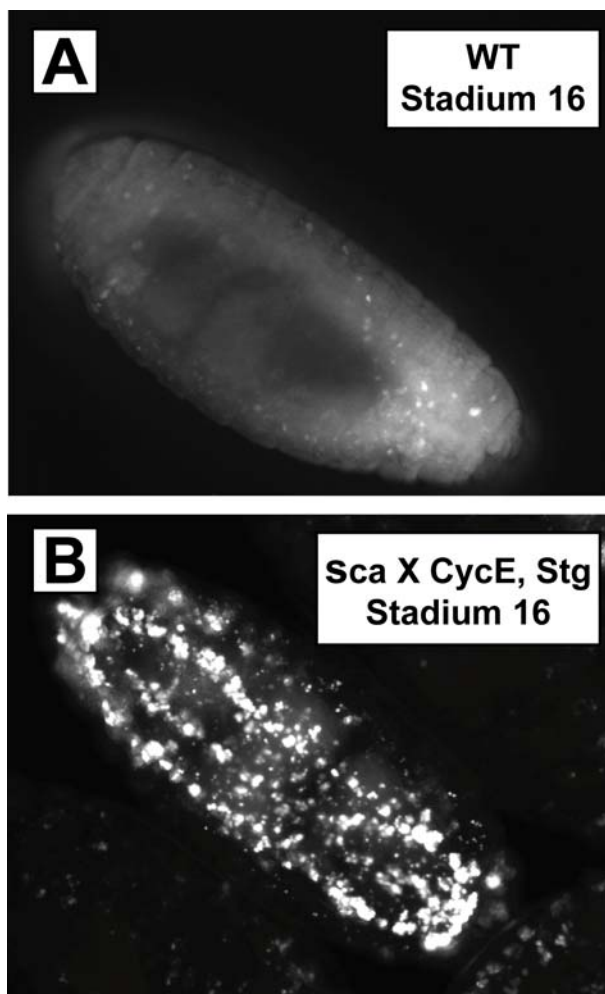


Abb. 3-25: Durch ektopische Koexpression von *CycE* und *string* zusätzlich entstandene Zellen werden im Stadium 16 durch Apoptose entfernt.

A. Übersicht über die apoptotischen Zellen des Wildtyps im Stadium 16 angefärbt durch Acridine-Orange.

B. Nach ektopischer Koexpression von *CycE* und *string* ist die Zahl der apoptotischen Zellen stark erhöht.

Zusätzliche Zellen werden durch Apoptose eliminiert

Obwohl die meisten NBs bis Stadium 16/17 (Stadium der Dokumentation der Mikromanipulationsklone) wildtypische Zellklone generierten, zeigte die FasII-Färbung im Stadium 15 ein stark verändertes axonales Muster. Dies deutet auf eine erhöhte Neuronenzahl mit zusätzlichen Projektionen hin (siehe Abschnitt 3.10. Abb. 3-22I). Wie ist diese Beobachtung zu erklären? Eine Möglichkeit wäre, dass zusätzlich generierte Zellen bis zum Stadium 16/17 durch Apoptose eliminiert werden. Das tatsächlich solche Regulationsmechanismen im Embryo existieren, konnte bereits in der Epidermis von *Drosophila* gezeigt werden (Li *et al.*, 1999). Hier führt eine erhöhte *CycE* Funktion zu einer erhöhten Teilungsaktivität und somit zur Verdoppelung der Zelldichte in der Epidermis. Jedoch wurden diese zusätzlichen Zellen durch Apoptose beseitigt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch im Bereich des

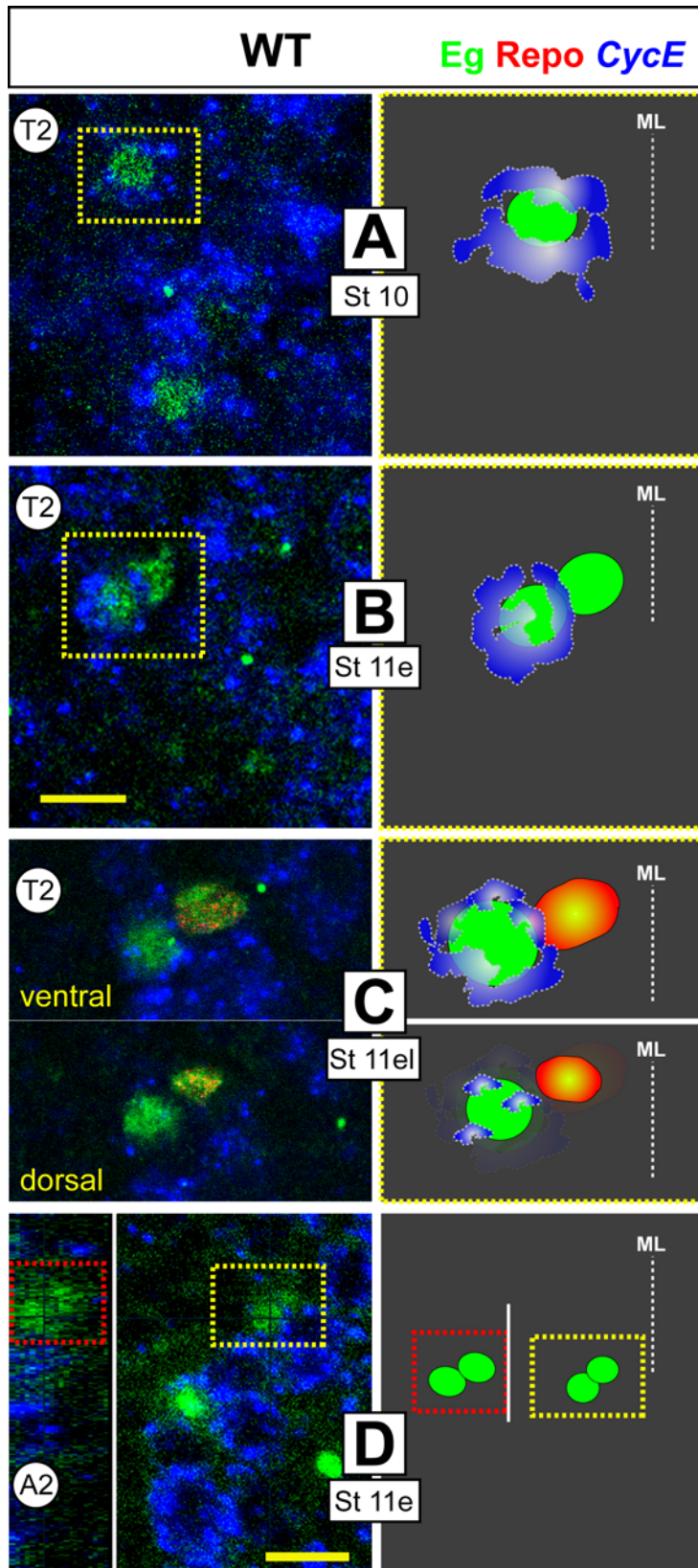
Bauchmarks nach ektopischer Expression von *CycE* eine erhöhte Apoptoseaktivität auftrat (Li *et al.*, 1999). Dies könnte auch im ZNS von *CycE*, *stg*⁺⁺-Embryonen der Fall sein. Um dies zu untersuchen wurden Acridine-Orange-Färbungen gemacht. Der Farbstoff interkaliert mit der fragmentierten DNA sterbender Zellen und färbt auf diese Weise spezifisch apoptotische Zellen an (Abrams *et al.*, 1993). In Abb. 3-25 ist eine solche Färbung sowohl im WT (A) als auch in ektopisch *CycE* und *stg* exprimierenden Embryonen (B) im Stadium 16 abgebildet. Deutlich sichtbar ist eine starke Zunahme der Apoptose im Vergleich zum WT. Es ist anzunehmen, dass das stark veränderte axonale Muster (FasII- Färbung) im Stadium 15 tatsächlich aufgrund einer erhöhten Teilungsaktivität und daraus resultierenden zusätzlichen Zellen entsteht. Diese Zellen werden jedoch durch programmierten Zelltod eliminiert, wodurch die Klone im Stadium 16/17 wildtypisch aussehen. Die dokumentierten Phänotypen, wie Duplikation von GMZ1 des NB1-1a, stellen offensichtlich einen spezifischen, bleibenden Effekt dar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine ektopische Expression von *CycE* ebenfalls zu Transformationsphänotypen in den NBs 1-1a und 5-4a führen kann. Dass dies ein spezifischer durch *CycE* hervorgerufener Effekt ist, konnte ich mit weiteren Experimenten mit *stg* zeigen. Hier waren die Transformationsphänotypen nicht zu beobachten. Vielmehr führte ein erhöhter Level an String zu einer schnelleren Teilungsaktivität und somit zu einer Duplikation bestimmter Zellen in anderen Neuroblastenzellstammbäumen. Die meisten dieser zusätzlichen Zellen werden in späteren Stadien durch Apoptose eliminiert.

Da *CycE* ein entscheidender Faktor in der Entscheidung zwischen thorakalem und abdominalem Schicksal im NB6-4 Zellstammbaum zu sein scheint, wurde als nächstes das Expressionsmuster von *CycE* im NB6-4 untersucht.

3.12. *CyclinE* wird differenziell im NB6-4 exprimiert

Ein Funktionsverlust von *CycE* transformiert den NGB6-4t in einen abdominalen NB. *Vice versa* führt eine ektopische Expression von *CycE* im NB6-4a zu einer



Transformation in einen NGB. Es ist daher von Interesse herauszufinden, wie *CycE* im NB6-4 exprimiert ist. Hierzu wurden Fluoreszenz *in-Situ* Hybridisierungen mit einer Digmarkierten RNA Probe gegen die zygotische *Typ1*-mRNA durchgeführt.

In Abb. 3-26A ist der thorakale NGB6-4 kurz nach Delamination im Stadium 10 abgebildet. Deutlich ist zu erkennen, dass die kernständige Eagle Färbung von einem Kranz blauer Färbung umge-

Abb. 3-26: Expression von *CycE* im NB6-4.

A. *CycE* ist im NGB in Thorakalsegmenten vor der ersten Teilung exprimiert.

B. Nach der ersten Teilung zeigt nur der lateral gelegene neuronale Vorläufer eine Expression von *CycE*.

C. In glialen Bestandteilen (*Repo*, rot) ist *CycE* nie nachweisbar. Die neuronalen GMZ zeigen geringe Expression (dorsal).

D. Die Gliazellen in abdominalen Segmenten zeigen keine *CycE* Expression. Die Teilung ist gerade erst vollzogen, da die Zellen apikobasal übereinander liegen.

ben wird - dem cytoplasmatische FISH-Signal der *CycE*-mRNA. Der NGB zeigt somit vor der ersten Teilung eine sehr starke *CycE*-Expression. Abb. 3-26B zeigt ein thorakales Hemisegment im frühen Stadium 11 - der NGB6-4t hat sich bereits einmal geteilt. Es sind zwei Eg-positive Zellen zu sehen: der mediale Gliavorläufer und die laterale neuronale Vorläuferzelle (zur Bestimmung der Zellen siehe Abschnitt. 3.4.1. und Abb. 3-8E). Nur eine der Zellen - die weiter lateral gelegene - zeigt ein deutliches *CycE*-mRNA Signal. Im medialen, glialen Vorläufer kann keine *CycE*-mRNA nachgewiesen werden. Auch in den folgenden Teilungen lässt sich in den glialen Zellen (doppelgefärbt mit Repo, rot) kein Signal detektieren, während die neuronalen Zellen fortwährend *CycE*-mRNA aufweisen (Abb. 3-26C).

In abdominalen Segmenten kann der NB aufgrund der schwächeren *eg* Expression direkt nach der Delamination nicht identifiziert werden, wohl aber nach seiner ersten Teilung. In Abb. 3-26D ist ein abdominales Segment dargestellt, in dem der NB6-4a die Teilung gerade vollzogen hat. Das rote Viereck im rechten Teil der Abbildung stellt den Querschnitt dar. Beide Zellen liegen in apikal-basaler Ausrichtung übereinander. Das gelbe Viereck gibt eine Ansicht von dorsal - nur eine Zelle ist zu erkennen. Bezüglich der Expression von *CycE*-mRNA konnte nie ein Signal in abdominalen Segmenten im NB6-4a detektiert werden.

Somit wird *CycE* ausschließlich im thorakalen NGB6-4t, nicht aber im abdominalen NB6-4 exprimiert. In nachfolgenden Teilungen zeigte nur der neuronale Anteil des thorakalen Zellstammbaums eine deutliche *CycE* Expression. Im abdominalen NB6-4 sowie in den thorakalen Gliazellen konnte nie *CycE* nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Daten, dass *CycE* neuronales Schicksal im NB6-4 fördert (siehe 3.7. und 3.8.).

3.13. Mit CyclinE interagierende Faktoren zeigen korrespondierende Effekte

3.13.1. Einfluss von *dacapo/p21* auf den NB6-4

CycE scheint ein entscheidender Faktor zur Generierung neuronalen Schicksals im NGB6-4t zu sein. Mit den unten aufgeführten Experimenten soll

untersucht werden, ob Faktoren, die mit CycE interagieren, ähnliche Effekte auf die Komposition des NB6-4 Zellstammbaums haben.

3.13.1.b. Einfluss einer *dacapo*⁴⁴⁵⁴-Funktionsverlustmutation

Zunächst wurde *dacapo* (*dap*), das *Drosophila* homologe Gen der Vertebraten *p21/p27-Cip/Kip* Kinase-Inhibitoren, untersucht. Für das ZNS von *Drosophila* konnte bisher gezeigt werden, dass *dap* in GMZs exprimiert wird. Es wird benötigt, um die Mitoseaktivität auf eine terminale Teilung zu reduzieren, indem es spezifisch CycE/cdk-Komplexe blockiert (de Nooij *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1996).

In Abb. 3-27 sind Färbungen einer *dap*⁴⁴⁵⁴-Funktionsverlustmutation zu sehen. Auffällig ist eine zusätzliche Gliazelle im NB6-4 (Abb. 3-27A, B). In abdominalen Segmenten ist dies durch Repo-Färbungen dargestellt (Abb. 3-27A). Ein tHS und ein aHS mit einer FISH gegen *gcm* sind in Abb. 3-27B zu sehen. Deutlich zu erkennen sind die zwei thorakalen medialen MM-CBGs und lateral zwei M-CBGs (74%, n=188 tHS). In abdominalen Segmenten sind drei Gliazellen zu sehen: zwei MM-CBGs und eine M-CBGs (66%, n=360 aHS). Alle Gliazellen exprimieren außerdem Pros in verschiedenen starken Konzentrationen (Abb. 3-27C).

Diese zusätzlichen Gliazellen scheinen aufgrund einer weiteren Teilung einer glialen GMZ entstanden zu sein. Jedoch konnte in den glialen Zellen des Thorax und des Abdomens kein zygotisches CycE nachgewiesen werden (siehe 3.12.). Dieser Effekt könnte daher durch maternales CycE verursacht sein, das normalerweise in wildtypischen NB6-4 Gliazellen durch Dacapo inhibiert werden könnte. Durch diesen Mechanismus würde dann die Anzahl der Gliazellen reguliert werden. In Embryonen einer *dap*⁴⁴⁵⁴-Funktionsverlustmutation scheint diese Inhibierung aufgehoben zu sein, wodurch eine weitere Teilung erfolgt und eine zusätzliche Gliazelle entsteht. Dieses Ergebnis konnte durch Dil-Markierungsexperimenten in Embryonen einer *dap*⁴⁴⁵⁴-Funktionsverlustmutation bestätigt werden (Tab. 3-6). Hier entwickelten sich drei NGB6-4t Klone, die jeweils eine zusätzliche Gliazelle zeigten. Leider konnten diese Klone nicht photokonvertiert und keine Bilder gemacht werden.

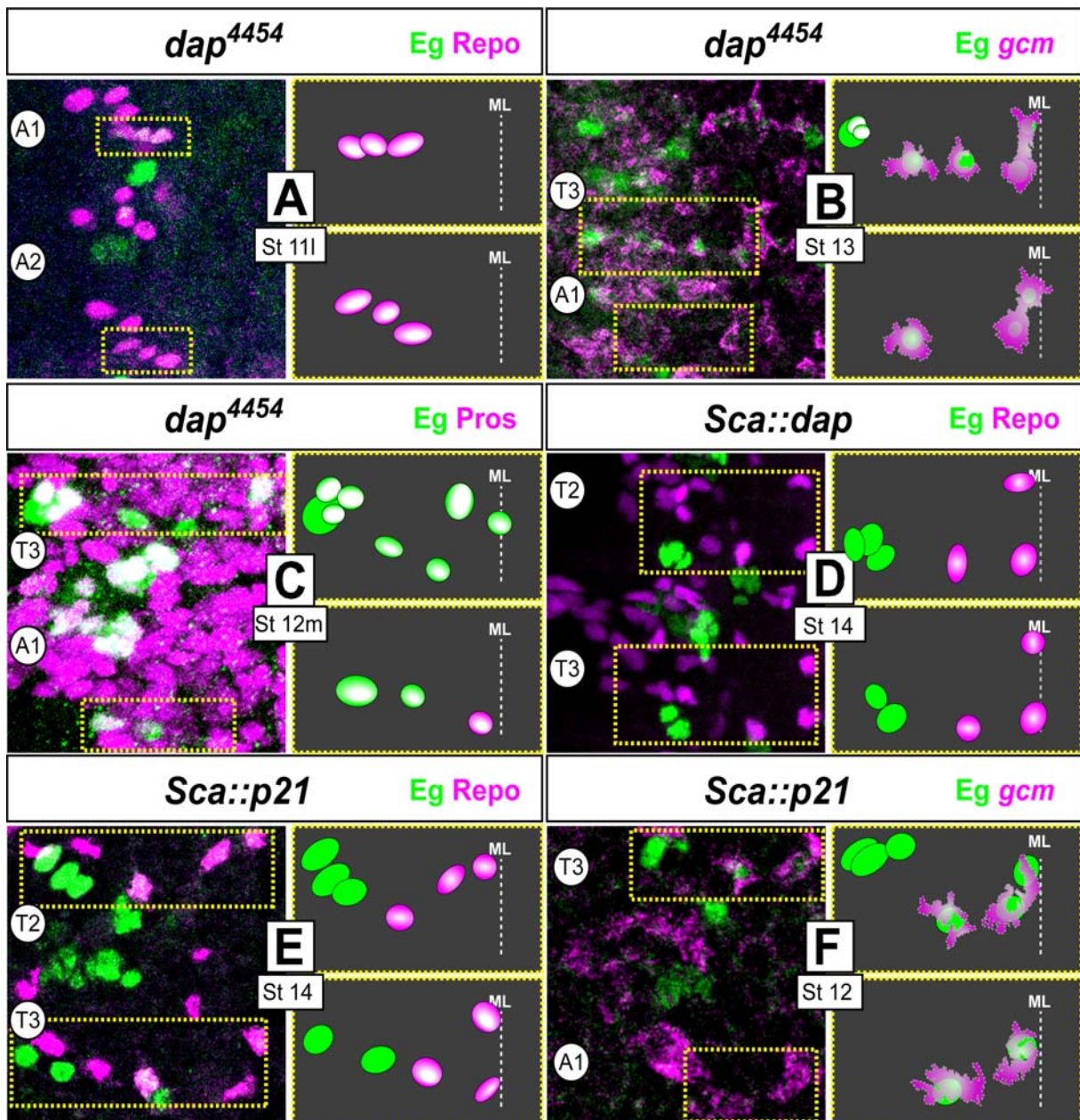


Abb. 3-27: Einfluss von *dacapo/p21* auf den NB6-4.

A., B. und C. Effekte einer *dap*⁴⁴⁵⁴-Funktionsverlustmutation mithilfe der Marker Repo, Pros und *gcm* (alle magenta, Eg in grün). Sowohl in thorakalen (B.), als auch in abdominalen (A.) Segmenten entsteht eine zusätzliche Gliazelle.

D. Ektopische Expression von *dacapo* führt zu einer Reduktion der Neurone im thorakalen NB6-4.

E. Ektopische Expression von *p21* führt ebenfalls zu einer Reduktion der Neurone im thorakalen NB6-4.

F. Dasselbe Ergebnis erhält man bei einer Färbung gegen *gcm*.

Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.13.1.b. Ektopische Expression von *dacapo* vermindert die Anzahl der Neurone

Als nächstes wurde durch ektopische Expression von *dap* untersucht, ob eine gezielte Inhibierung von CycE einen Einfluss auf die Zellschicksale im NGB6-4t hat (Abb. 3-27D, *sca*-Gal4, rekombiniert mit P289, wurde als Treiberlinie benutzt).

Auffällig war, dass keine komplette Inhibierung von CycE erreicht werden konnte. Alle dokumentierten NB6-4t zeigten sowohl Gliazellen als auch Neurone. Jedoch konnte eine signifikante Reduktion der Neurone in thorakalen Segmenten beobachtet werden. In Abb. 3-27D ist eine Repo/Eg-Färbung in *dap++*-Embryonen gezeigt. Es sind drei Gliazellen zu sehen, und zwei beziehungsweise drei Neurone. In 81% aller tHS konnte eine Reduktion der Neurone von sechs auf zwei bis vier verzeichnet werden (n=165 tHS). Die Anzahl der Gliazellen war hingegen sowohl im Thorax als auch im Abdomen nie verändert. Um zu prüfen, ob das Vertebraten homologe Gen *p21* (Chen *et al.*, 1996; de Nooij und Hariharan, 1995; Harper *et al.*, 1993) einen ähnlichen oder vielleicht stärkeren Effekt verursacht, wurde ein UAS-Konstrukt mit der *sca*-Gal4 Linie (rekombiniert mit P289) exprimiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-27E und F gezeigt. Deutlich zu erkennen sind die korrespondierenden Phänotypen. Die Anzahl der Gliazellen ist unverändert, wohin gegen die Neurone in 66% aller tHS von sechs auf drei bis fünf reduziert waren (n=42 tHS).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Embryonen einer *dap*-Funktionsverlustmutation eine zusätzliche Gliazelle entsteht. Da die wildtypischen Gliazellen jedoch keine zygotische Expression von *CycE* zeigen, scheint dieser Effekt auf einer Aktivität des maternalen *CycE* zu beruhen. Eine Transformation des abdominalen Zellstammbaums war in dieser Mutante nicht zu beobachten. Dies schließt eine Aktivität des zygotischen *CycE* aus. Die Überexpression von *dap* hat ergeben, dass die *CycE*-Funktion nicht vollständig blockiert werden kann. Jedoch zeigte sich eine spezifische Reduktion der Anzahl der thorakalen Neurone, die bestätigt, dass *CycE* spezifisch neuronales Schicksal im NB6-4 fördert.

3.13.2. Auswirkung der *dacapo*⁴⁴⁵⁴-Funktionsverlustmutante auf andere Neuroblastenzellstammbäume

Wie bereits erwähnt, wird *dap* im ZNS in GMZs exprimiert, um dort die finale Teilung zu regulieren (de Nooij *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist es ebenso von Interesse andere Neuroblastenzellstammbäume in einer *dap*-Funktionsverlustmutation zu untersuchen. In den Transplantations- und Dil-Markierungsexperimenten (Tab. 3-6) sind Zellklone anderer NBs dokumentiert worden, die hier besprochen werden sollen. Dabei erläutere ich hauptsächlich die Dil-Markierungsexperimente, da nur wenige Transplantationen durchgeführt wurden.

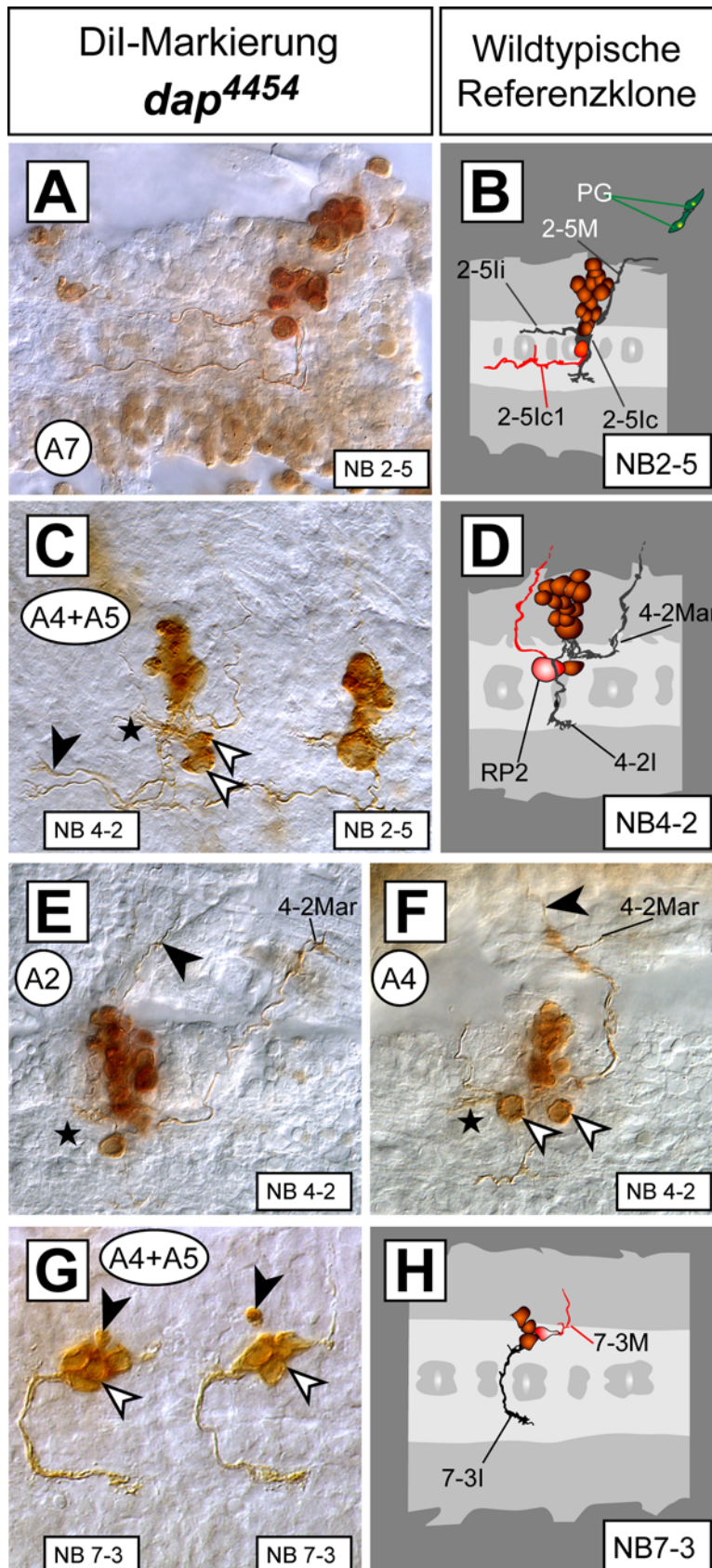
Neben den bereits besprochenen Klonen des NB6-4, wurden auch Effekte in den Klonen des NB5-4a beobachtet. Hier war eine deutliche Zunahme der Zellzahl erkennbar. So konnten zwei Klone beschrieben werden, die circa sechs bis acht Zellen in einem lateralen Cluster hatten. Dies ist normalerweise nur in thorakalen Segmenten der Fall und konnte ebenfalls bei der ektopischen Expression von *CycE* beobachtet werden.

<i>Zelltransplantation</i>		<i>DiI-Markierung</i>	
Wildtypische Zellklone	Veränderte Zellklone	Wildtypische Zellklone	Veränderte Zellklone
1x 4-2 3x 5-5 1x 7-3 1x 7-4	1x 5-6a	1x 2-4a 2x 2-5 4x 3-2 1x 3-3 1x 4-3 1x 4-4 1x 5-3 1x 5-6a 1x 7-2 1x 7-4	3x 4-2 2x 5-4a 3x 6-4t 4x 7-3

Tab. 3-6 : Transplantations- und DiI-Markierungsexperiment in Embryonen einer *dap*⁴⁴⁵⁴- Funktionsverlustmutationen

In Abb. 3-28A und C sind zwei Klone des NB2-5 zu sehen. Diese Klone haben keinen abweichenden Phänotyp und sind hier als Beispiel für wildtypische Klone aufgeführt. Die Klone des NB4-2 (n=3) zeigten hingegen unterschiedliche Phänotypen (Abb. 3-28C, E und F). Bei den Klonen in E und F ist das RP2sib-Neuron anormal vergrößert. In Zellklonen des WT (Abb. 3-28D) ist dieses Neuron viel kleiner als die Geschwisterzelle RP2 (Bossing *et al.*, 1996). Ob diese Zelle in der mutanten Situation ein anderes Schicksal angenommen hat, kann jedoch nicht gesagt werden. Im Klon E und F ist weiterhin ein zusätzliches Motoneuron zu erkennen (anteriore Lage E; posterior Lage im Klon F; schwarzer Pfeil in Abb. 3-28E und F). Beide Neurone projizieren in die Region der Dorsalmuskeln, also in die Region, die von RP2, dem prominenten Motoneuron dieses Klons, innerviert wird. Im Klon F faszikuliert dieses zusätzliche Axon mit der posterioren 4-2Mar-Projektion. Woher dieses Axon stammt, bleibt ungewiss. Im Klon C ist ebenfalls eine zusätzliche

Projektion zu sehen (schwarzer Pfeil in Abb. 3-28C). Diese verläuft jedoch contralateral nach anterior, folgt also der Projektion 4-2I. Eine weitere Auffälligkeit aller Klone ist, ein durch einen schwarzen Stern gekennzeichnetes dendritisches Feld auf



der anterioren, ipsilateralen Seite des Klons. Dieses dendritische Feld wurde bisher noch nicht beschrieben (Löhr *et al.*, 2002).

Zusätzlich wurden Klone des NB7-3 beobachtet, die fünf Zellen hatten (WT vier Zellen). Zwei dieser Klone sind in Abb. 3-28G abgebildet. Es kann jedoch ebenfalls nicht gesagt werden, welches Schicksal diese fünfte Zelle angenommen hat. Zusätzlichen Axone wurden nicht dokumentiert.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass nur in einigen Fällen eine offensichtliche Auswirkung auf die Zellzahl und

Abb. 3-28: Neuroblastenzellklone nach DiI-Markierung neuroektodermaler Zellen in einer *dap*⁴⁴⁵⁴-Funktionsverlustmutation.

B., D. und H. Referenzklone (entnommen aus Bossing *et al.* (1996) und Schmidt *et al.* (1997)) der in A., C., E., F. und G. gezeigten Zellklone.

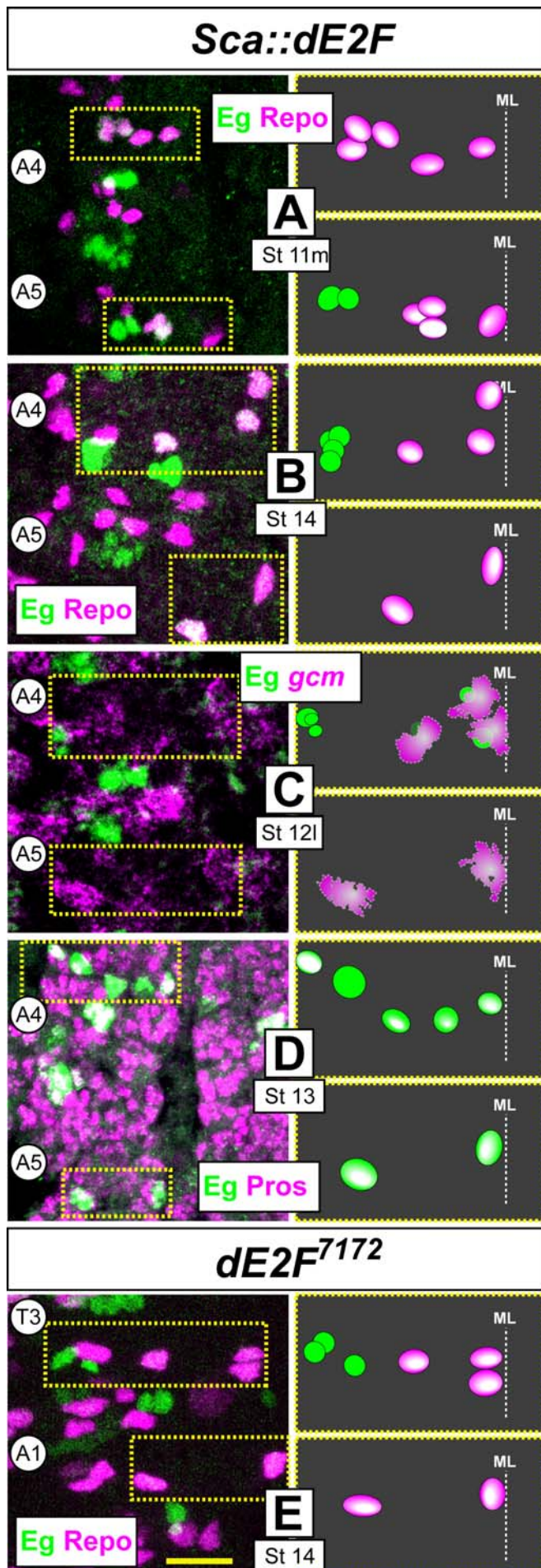
Erläuterung der Phänotypen siehe Text.

das Projektionsmuster in *dap*-Funktionsverlustmutationen zu beobachten ist. Auffällig war, dass der Phänotyp des NB5-4a dem Phänotyp nach ektopischer Expression von *CycE* gleicht. Andere beschriebene Phänotypen sind nur schwer zu erklären. Hier sind weitere Untersuchungen mithilfe von molekularen Markern notwendig.

3.14. *dE2F* als S-Phase Faktor zeigt abgeschwächtere Effekte im NB6-4

Nachdem eine ektopische Expression von *CycE* im NB6-4 zusätzliche Zellen hervorruft, soll mit den nächsten Experimenten ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen durch ektopische S-Phasen ausgelösten, generellen Effekt handelt. Deshalb wird als weiterer S-Phase regulierender Faktor *dE2F* untersucht (Duronio *et al.*, 1998; Duronio und O'Farrell, 1995; Duronio *et al.*, 1995). Ektopische Expression von *dE2F* und seines Dimerisierungspartners *DP* kann ebenfalls ektopische S-Phasen in postmitotischen Zellen der Augenanlage hervorrufen (Du *et al.*, 1996). Daher wurde das Proliferationsverhalten des NB6-4 nach ektopischer Expression von *dE2F* getestet (*sca*-Gal4, rekombiniert mit P289, wurde als Treiberlinie benutzt). Abb. 3-29A-D zeigt Färbungen in *dE2F*⁺⁺-Embryonen. Tatsächlich konnten eine bis vier zusätzliche Zellen im abdominalen NB6-4 beobachtet werden (37%, n=780 aHS). In manchen Fällen lagen diese Zellen entlang der Mittellinie (wie die MM-CBG), in anderen in dorsolateraler Position (wie die Neurone des NGB6-4) und in einigen Ausnahmen traten diese Zellen an beiden Positionen auf. Eine Färbung gegen Repo (Abb. 3-29A, B) zeigte, dass diese Zellen meist rein glialen Ursprungs sind (24%, n=420 aHS). In 13% aller aHS werden Zellen in dorsolateraler Position gebildet, die weder Repo noch *gcm* exprimieren (Repo: Abb. 3-29A, B; n=420 aHS; *gcm*-mRNA: Abb. 3-29C; 11% n=126 aHS). Diese Zellen haben somit wahrscheinlich neuronales Schicksal angenommen. Einige zeigten in späteren Stadien eine Expression von Pros (Abb. 3-29D), wie es bereits für die neuronalen GMZs gezeigt wurde.

Eine Überexpression von *dE2F* kann also in abdominalen Segmenten zu neuronalem Schicksal im NB6-4 führen. Jedoch waren die Effekte weniger signifikant, verglichen mit der ektopischen Expression von *CycE* (*dE2F* circa 13% –



CycE circa 40% der Fälle). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass, obwohl die *dE2F* Expression im ZNS abhängig ist von CycE (Duronio und O'Farrell, 1995), die ektopische Expression von *dE2F* die Notwendigkeit von CycE für die Bildung von Neuronen im NB6-4 nicht ersetzen kann. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen in *dE2F*-Funktionsverlustmutationen (Abb. 3-29E). Mutationen im *dE2F*-Genlocus haben, wie beschrieben überdies keinen direkten Effekt auf die Zellzyklen der frühen Proliferationsphase des ZNS (Duronio und O'Farrell, 1995). Diese Hypothese unterstreichend, zeigt eine Eg/Repo-Doppelfärbung (Abb. 3-29E) in *dE2F*-Funktionsverlustmutationen, dass das Proliferationsverhalten des NGB6-4t zumindest bis Stadium 13 normal ist. In späteren Stadien hingegen,

Abb. 3-29: *dE2F* als S-Phase Faktor zeigt abgeschwächtere Effekte im NB6-4.

A. bis D. Einfluss einer ektopischen Expression von *dE2F* im abdominalen NB6-4.

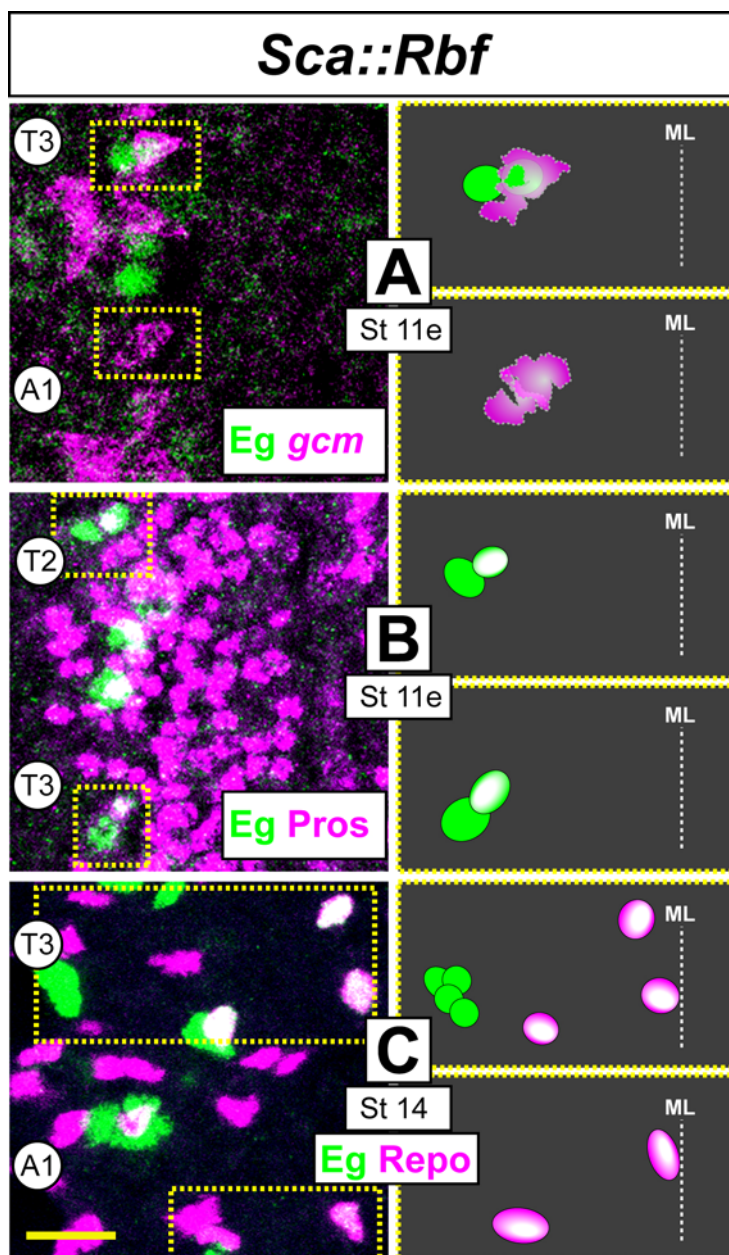
E. Effekt einer *dE2F⁷¹⁷²*-Funktionsverlustmutation im thorakalen NB6-4.

Eg in grün; Repo, Pros oder *gcm* in magenta.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

ist die Zahl der Neurone reduziert, von wildtypischen fünf bis sechs auf zwei bis vier (85%; n=84 tHS).

Dieser Effekt kann ebenfalls erreicht werden, wenn *Rbf*, ein potenter Inhibitor der *dE2F*-abhängigen Transkription (Du und Dyson, 1999), mit der *sca*-Gal4 Linie überexprimiert wird (Abb. 3-30, rekombiniert mit P289). In dieser Situation sind im NB6-4t nach der ersten Teilung die Faktoren *gcm* und *Pros* weiterhin asymmetrisch verteilt (Abb. 3-30A, B). In späteren Stadien reduziert sich die Anzahl der Neurone jedoch auf drei bis vier (45%, n=156 tHS, Abb. 3-30C).



Die Anzahl der Gliazellen in *dE2F*-Funktionsverlustmutationen (Abb. 3-29E) und *Rbf*^{+/+}-Embryonen (Abb. 3-30C) ist sowohl im Thorax als auch im Abdomen unverändert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der S-Phasefaktor *dE2F* nur bedingt den gleichen Effekt im NB6-4 hervorrufen kann wie *CycE*. Zwar entsteht neuronales Schicksal im abdominalen NB6-4 in *dE2F*^{+/+}-Embryonen, jedoch war dies in einer

Abb. 3-30: Ektopische Expression von *Rbf* führt zu verminderter Neuronenanzahl im thorakalen NB6-4.

A. Die erste Teilung in thorakalen Segmenten verläuft wildtypisch – nur eine Zelle exprimiert *gcm*.

B. *Pros* wird ebenfalls nur in einer Zelle nach der ersten Teilung exprimiert.

C. In späteren Stadien sind weniger dorsolaterale Neurone zu beobachten.

Eg, grün; *Pros*, *Repo* oder *gcm* in magenta.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

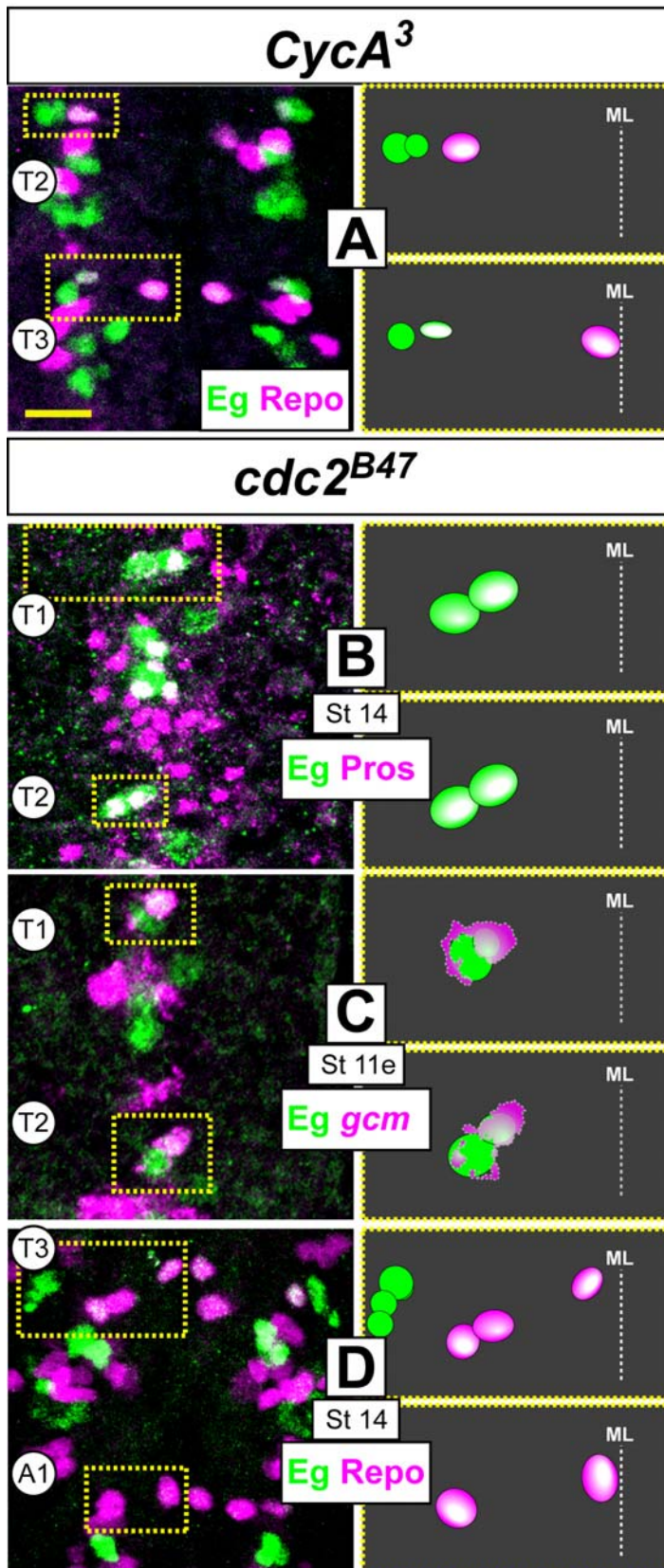
signifikant geringeren Anzahl an aHS der Fall (circa 13%). Somit ist der durch *CycE* hervorgerufene Phänotyp nicht aufgrund ektopischer S-Phasen zu erklären. Vielmehr zeigten die Experimente der *dE2F*-Funktionsverlustmutation, dass in *CycE*-abhängiger Weise spezifisch neuronale Zellen verloren gehen.

3.15. Die Manipulation der G2-M-Transition hat keinen Effekt auf das NB6-4 Zellschicksal

Da die Manipulation eines entscheidenden Faktors (*CycE*) in der G1-S Transition eine tagmaspezifische Transformation des NB6-4 hervorruft, stellte sich die Frage, ob dies ebenfalls der Fall sein könnte, wenn Faktoren der G2-M Transition verändert werden. Im Folgenden werden daher die beiden Gene *CycA* und *cdc2* untersucht.

Eine *CycA*-Funktionsverlustmutation hat verschiedene Auswirkungen auf die embryonalen NBs des ZNS. Manche NBs teilen sich nur einmal, andere jedoch öfter (Wai *et al.*, 1999). Für den NB6-4 konnte gezeigt werden, dass er sich abhängig von der Menge maternaler *CycA*-mRNA ein bis zweimal teilt (Akiyama-Oda *et al.*, 2000a). Jedoch folgt das Muster der ersten Teilung dem wildtypischen: die Teilung erfolgt asymmetrisch und separiert den neuronalen vom glialen Anteil (Abb. 3-31A, 97%, n=78 tHS). Dies entspricht bereits gewonnener Daten durch Akiyama-Oda *et al.* (2000a).

Die *cdc2* Kinase heterodimerisiert mit *CycA* und *CycB* und wird kurz vor der Mitosephase aktiviert (Hayashi, 1996). Diese *cdc2/CycA*-Komplexe haben einen Einfluss auf die asymmetrische Lokalisation bestimmter apikaler Faktoren während der NB-Teilungen. So ist ein hoher Level an *cdc2* nötig, um die Asymmetrie im NBs aufrecht zu erhalten (Tio *et al.*, 2001). In Funktionsverlustmutationen konnte gezeigt werden, dass Pros symmetrisch verteilt wird. Dies konnte für den NGB6-4t in der ersten Teilung von *cdc2^{B47}*-Funktionsverlustmutationen bestätigt werden (Abb. 3-31B, 93%, n=73 tHS). Jedoch zeigte der Nachweis der *gcm*-mRNA, dass diese nur im medialen Gliavorläufer lokalisiert wird (Abb. 3-31C). Hieraus kann gefolgert werden, dass, obwohl Pros symmetrisch in beiden Zellen vorhanden ist, im NB verbleibende *gcm*-mRNA abgebaut wird. Weiterhin konnte mit einer Eg/Repo-Doppelfärbung gezeigt werden, dass in späteren Stadien der Zellstammbaum des



NGB6-4t wildtypisch erscheint, mit drei Gliazellen (zwei MM-CBG und einer M-CBG) und lateralen Neuronen.

Folglich zeigt sich, dass die Manipulation der G2-M Transition keinen Effekt auf die Komposition des NB6-4 Zellstammbaums hat. Obwohl eine untypische Verteilung von Pros in *cdc2* mutanten Embryonen gezeigt werden konnte, haben sich alle thorakalen NB6-4 als Neuroglioblast entwickelt.

Abb. 3-31: Die Manipulation der G2-M-Transition hat keinen Effekt auf das NB6-4 Zellschicksal.

A. In einer *CycA³*-Funktionsverlustmutationen sind sowohl Gliazellen als auch Neurone in thorakalen Segmenten zu beobachten.

B. Pros wird in einer *cdc2*-Funktionsverlustmutante in der ersten Teilung symmetrisch verteilt.

C. *gcm*-mRNA wird präferenziell in den glialen Vorläufer verteilt.

D. In späten Stadien sind sowohl Neurone als auch Gliazellen zu erkennen.

Eg in grün; Pros, Repo oder *gcm* in magenta.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass *CycE* der entscheidende Faktor für neuronales Zellschicksal im NB6-4 ist. Ein Funktionsverlust von *CycE* führt zu einer Transformation des thorakalen in einen abdominale Zellstammbaum, während eine

ektopische Expression im abdominalen Vorläufer diesen zum Neuroglioblasten transformiert, der einen gemischten, thorakalen Zellstammbaum generiert. Faktoren, die während des Zellzyklus mit CycE interagieren (*dE2F*, *dap*, *Rbf*), zeigen abgeschwächte oder korrespondierende Phänotypen. Die Manipulation der M-Phase hatte keine Auswirkungen auf die Tagmaspezifität. Weiterhin konnte ich zeigen, dass *CycE* differenziell nur im neuronalen Teil im Thorax exprimiert wird. Die Gliazellen im Thorax und des abdominalen Zellstammbaums zeigten keine zygotische Expression. Daher stellt sich als nächstes die Frage, welche Faktoren diese segmental differenzielle Expression von *CycE* regulieren.

3.16. CyclinE wird von *abdominal-A* im NB6-4a reprimiert

Zwei hypothetische Ansätze sind denkbar: Zum einen könnten Faktoren aktiv sein, die *CycE*-mRNA und das gebildete Protein in abdominalen Segmenten und den thorakalen Gliazellen schnell abbauen. Andererseits könnte eine differenzielle Transkriptionskontrolle stattfinden, wobei Faktoren, die nur im Abdomen vorkommen *CycE* Transkription hemmen, oder Faktoren des Thorax *CycE* Transkription dort aktivieren.

Bekannt ist, dass Komponenten des Zellzyklus nur eine kurze Lebensdauer haben, so dass ihre Regulation oft sehr dynamisch, gekoppelt an das Fortschreiten des Zellzyklus ist. Diese Proteine werden dann normalerweise durch Faktoren des Ubiquitin-Ligase Komplexes markiert und durch das Proteasom zerstört (Murray, 1995). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass das Gen *archipelago* (*ago*) an CycE bindet und somit seine Degradation einleitet (Moberg *et al.*, 2001). Andere Proteine wie Nedd8 oder Proteine der Cullin-Familie sind ebenfalls am Prozess der regulierten Protein-Degradation beteiligt (Filippov *et al.*, 2000; Ou *et al.*, 2002). Diese Proteine sind gleichfalls für die geordnete Regulation des Zellzyklus unabdingbar. Deshalb wurden im Folgenden verschiedene Gene, die an der durch Ubiquitin vermittelten Proteindegradation beteiligt sind, auf mögliche Zellschicksalsänderung im NB6-4 getestet.

3.16.1. Gene des Proteasom-Komplexes regulieren die Proliferation der Gliazellen im NB6-4a durch Degradierung des maternalen CycE

Wie bereits in der Augenimaginalscheibe von Moberg *et al.* (2001) gezeigt, kann Ago CycE direkt binden und somit für den Proteindegredationsweg markieren. Aufgrund dieser Tatsache habe ich untersucht, ob eine mögliche Interaktion zwischen Ago und CycE im NB6-4 segmentale Unterschiede hervorrufen kann. Mit Hilfe einer Antikörper gegen Ago wird das Expressionsmuster im Embryo untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3-32 zusammengestellt. In frühen Stadien ist Ago im gesamten Embryo ubiquitär exprimiert, so zum Beispiel auch in der subepidermalen Neuroblastenschicht (Abb. 3-32A). Betrachtet man nun das Expressionsmuster in den Zellen des NB6-4, dann zeigt sich, dass im Abdomen und im Thorax sowohl in neuronalen als auch in glialen Zellen Ago exprimiert wird (Abb. 3-32B-D). Durch dieses Expressionsmuster scheint Ago kein guter Kandidat zur Beeinflussung der Tagmaspezifität zu sein. Dennoch wurden zwei unterschiedliche Funktionsverlustmutationen von *ago* untersucht (*ago*¹, *ago*³; Moberg *et al.*, 2001). Beide zeigten den gleichen Phänotyp (exemplarisch gezeigt für *ago*³ in Abb. 3-32E). Zwei abdominale Segmente im ventralen Bereich sind gegen Repo gefärbt. Zu erkennen ist, dass in einigen Segmenten eine zusätzliche Gliazelle produziert wurde. Neurone, wie man bei einer stark erhöhten CycE-Aktivität vermuten würde, sind jedoch niemals sichtbar gewesen. Eine zygotische Expression von *CycE* konnte in abdominalen Segmenten ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abschnitt 3.12.). Deshalb ist zu vermuten, dass Ago benötigt wird, um mögliche Reste maternalen CycEs zu degradieren. Bleibt dies aus – zum Beispiel in einer *ago*-Funktionsverlustmutation – so kommt es zu einer weiteren Teilung und im Abdomen wird eine zusätzliche Gliazelle gebildet. Ein vergleichbares Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit bereits für eine *dap*-Funktionsverlustmutation beschrieben wurde (siehe Abschnitt 3.13. und Abb. 3-27).

Ein ganz ähnliches Ergebnis, wie für die Ago-Funktionsverlustmutationen dokumentiert, zeigen andere Gene des Ubiquitin-vermittelten Proteinzerstörungsmechanismus: wie zum Beispiel die *Cullin*-Gene. In Abb. 3-33 sind Färbungen in zwei *Cullin*-Funktionsverlustmutationen zu sehen, *Cul-1* und *Cul-4*. Für *Cul-1* wurde deutlich, dass es für die Zerstörung der CycE/cdk-Komplexe in der Augenimaginalscheibe notwendig ist (Ou *et al.*, 2002). Im ZNS scheint *Cul-1* überdies an der Degradierung von CycE beteiligt zu sein. Sowohl für eine

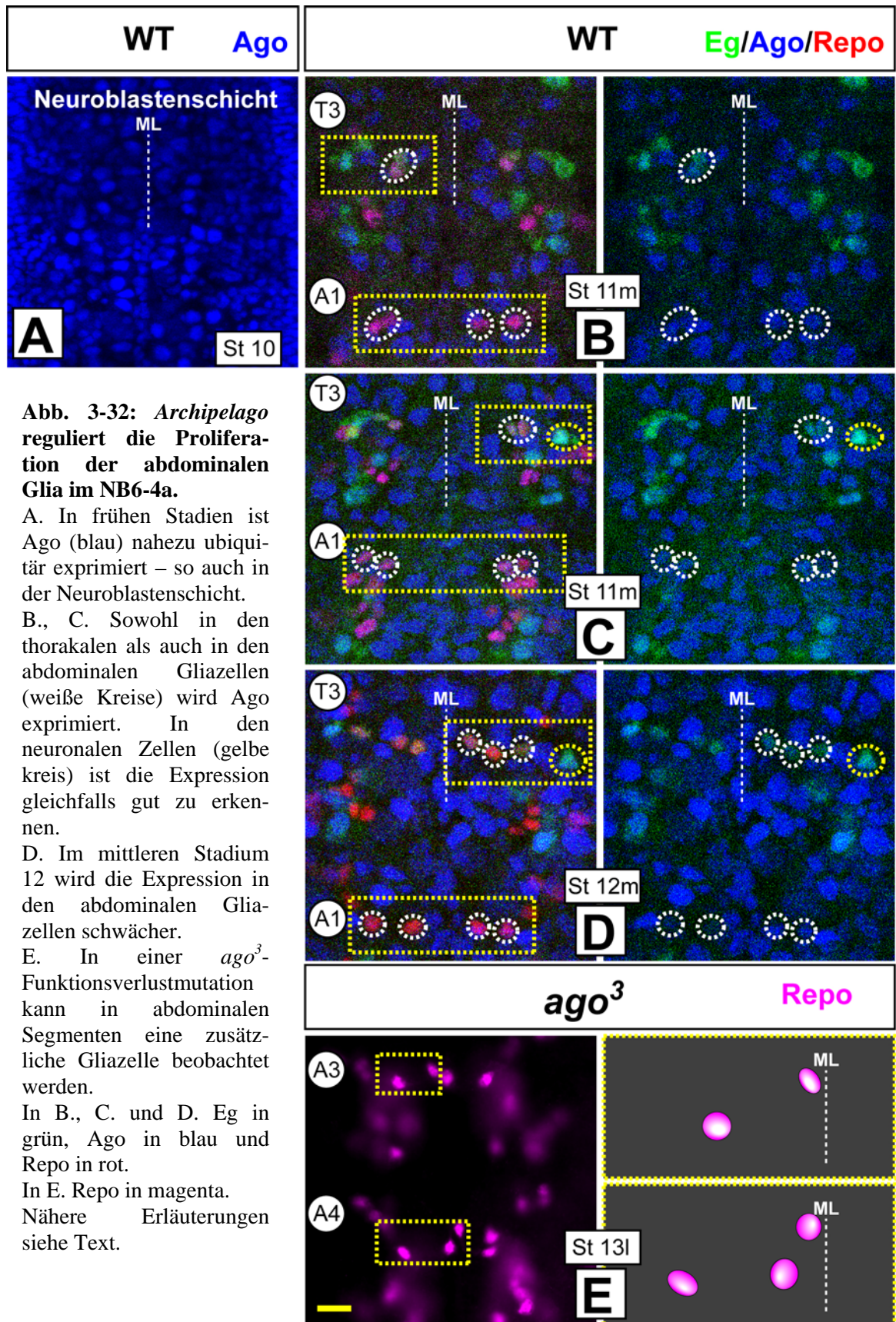


Abb. 3-32: Archipelago reguliert die Proliferation der abdominalen Glia im NB6-4a.

A. In frühen Stadien ist Ago (blau) nahezu ubiquitär exprimiert – so auch in der Neuroblastenschicht.

B., C. Sowohl in den thorakalen als auch in den abdominalen Gliazellen (weiße Kreise) wird Ago exprimiert. In den neuronalen Zellen (gelbe Kreise) ist die Expression gleichfalls gut zu erkennen.

D. Im mittleren Stadium 12 wird die Expression in den abdominalen Gliazellen schwächer.

E. In einer *ago³*-Funktionsverlustmutation kann in abdominalen Segmenten eine zusätzliche Gliazelle beobachtet werden.

In B., C. und D. Eg in grün, Ago in blau und Repo in rot.

In E. Repo in magenta.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

Cul-4-Funktionsverlustmutation zeigte eine Eg/Repo-Doppelfärbung, dass eine zusätzliche Gliazelle im Abdomen produziert wird (Abb. 3-33A, B).

Somit scheint der Prozess der durch Ubiquitinierung vermittelten Protein-degradation von CycE notwendig zu sein, um das Proliferationsverhalten des abdominalen Neuroblasten zu regulieren. Der Funktionsverlust einiger beteiligter Gene führte zu einer zusätzlichen Gliazelle im Abdomen. Da in den Expressionsuntersuchung keine zygotische Expression von CycE im Abdomen gefunden werden konnte, scheint diese Regulation das maternale CycE zu betreffen. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die segmentspezifische Aktivität von CycE, die zu den

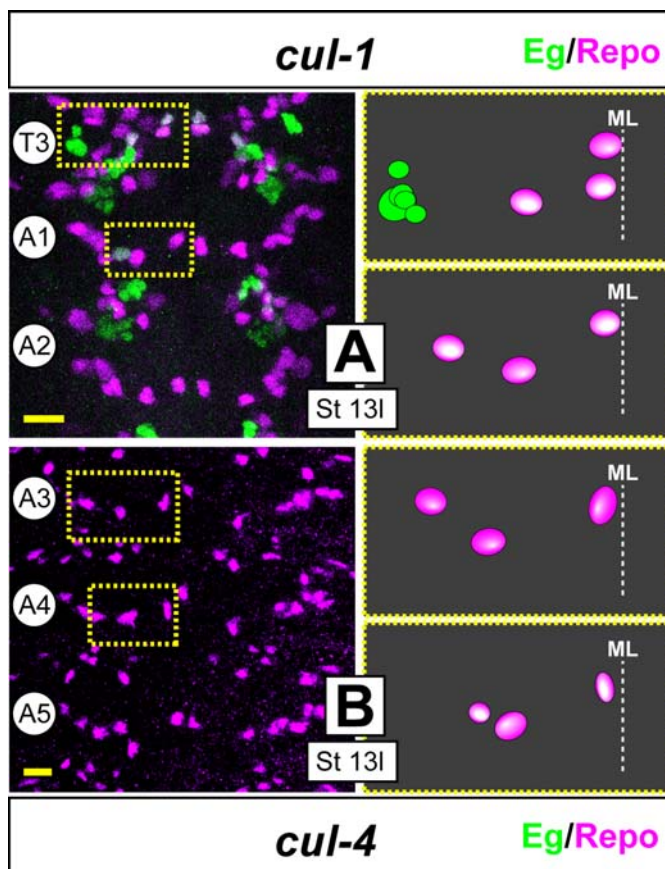


Abb. 3-33: *Cullin*-Gene sind auch an der Proliferationskontrolle der NB6-4 Gliazellen beteiligt.

A., B. Funktionsverlustmutationen für *Cullin*-Gene zeigen eine Beteiligung dieser Gene an der koordinierten Degradation maternalen CycEs. Wie bereits für *ago*-Funktionsverlustmutanten beschrieben kann eine zusätzliche Gliazelle beobachtet werden.

Eg in grün, Repo in magenta.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

unterschiedlichen Teilungsmustern führt, aufgrund einer unterschiedlichen Proteindegradation von CycE zustande kommt. Vielmehr scheint eine Kontrolle auf transkriptioneller Ebene wahrscheinlich, da die FISH-Experimente eine differenzielle Expression der zygotischen mRNA im NB6-4 zeigen. Dies wird in den folgenden Experimenten weitergehend untersucht.

Dies wird in den folgenden Experimenten weitergehend untersucht.

3.16.2. Abdominal-A reprimiert *CyclinE*, um abdominales Schicksal zu determinieren

Wie bereits im Abschnitt 3.5. gezeigt, haben die Homöotischen Gene einen direkten Einfluss auf die Segmentspezifität der NBs. Für den NB6-4 konnte ich zeigen, dass *abd-A* und *Abd-B* im abdominalen NB6-4 exprimiert sind und so

abdominale Eigenschaften spezifizieren (siehe Abschnitt 3.5.3.). Eine Funktionsverlustmutante dieser beiden Gene führte im Abdomen zu einer Transformation des NB6-4 in thorakales Schicksal. Weiterhin konnte ich in Abschnitt 3.12. zeigen, dass *CycE* nur in den neuronalen Zellen der Thorakalsegmente exprimiert wird. Im Folgenden untersuchte ich daher, ob Abd-A *CycE* im Abdomen reprimiert und so eine thorakale Grundidentität in eine abdominale Identität transformiert.

Zuerst sollte mittels FISH das Expressionsmuster des zygotischen *CycEs* in einer *abd-A*-Funktionsverlustmutation beschrieben werden. In Abb. 3-34C ist ein abdominales Hemisegment der *abd-A^{MX1}*-Funktionsverlustmutation dargestellt. Der NB6-4 hat sich bereits geteilt, beide Zellen liegen in apical-basaler Ausrichtung übereinander. Eine Eg/Repo-Färbung erleichtert die Identifizierung des aufgrund der Homöotischen Mutation entstandenen, neuronalen (Repo-negativ) und glialen Vorläufer (Repo-positiv). Die FISH gegen die *CycE*-mRNA zeigt, dass ein starkes *CycE*-mRNA Signal in abdominalen Segmenten zu sehen ist. Dies ist jedoch nur im Repo-negativen neuronalen Vorläufer der Fall. In den darauf folgenden Teilungen ist in den Repo-positiven Gliazellen keine *CycE* Expression zu finden, während der neuronale Anteil ein deutliches *CycE* Signal aufweist (Abb. 3-34D). Da dies ein erster Hinweis auf eine mögliche Repression von *CycE* durch *abd-A* ist, wurde als nächstes getestet, ob eine ektopische Expression von *abd-A* im Thorax den NGB6-4t in einen abdominalen NB6-4 transformieren kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob diese Transformation durch einen Verlust der *CycE* Expression zustande kommt. Hierzu wurde die *sca-Gal4* Linie benutzt. In Abb. 3-34E ist zu erkennen, dass durch die ektopische Expression von *abd-A* zwei Gliazellen gebildet werden. Die Eg/Repo-Doppelfärbung zeigte keine Eg-positiven Neurone in dorsolateraler Position. Somit führt eine ektopische Expression von *abd-A* zu einer Transformation des thorakalen NGB6-4 in die abdominale, gliale Variante. Mittels *CycE*-FISH sollte ein möglicher Verlust der *CycE* Expression im Thorax nachgewiesen werden. Abb. 3-34F zeigt ein thorakales Hemisegment, doppelgefärbt mit Repo. Deutlich zu sehen sind zwei Zellen, die in der apical-basalen Achse übereinander liegen. Beide Zellen zeigen keine Expression von *CycE*. Somit führt eine ektopische Expression von *abd-A* zu einer Repression von *CycE* im Thorax, wodurch der thorakale NGB6-4t in einen abdominalen NB6-4a transformiert wird.

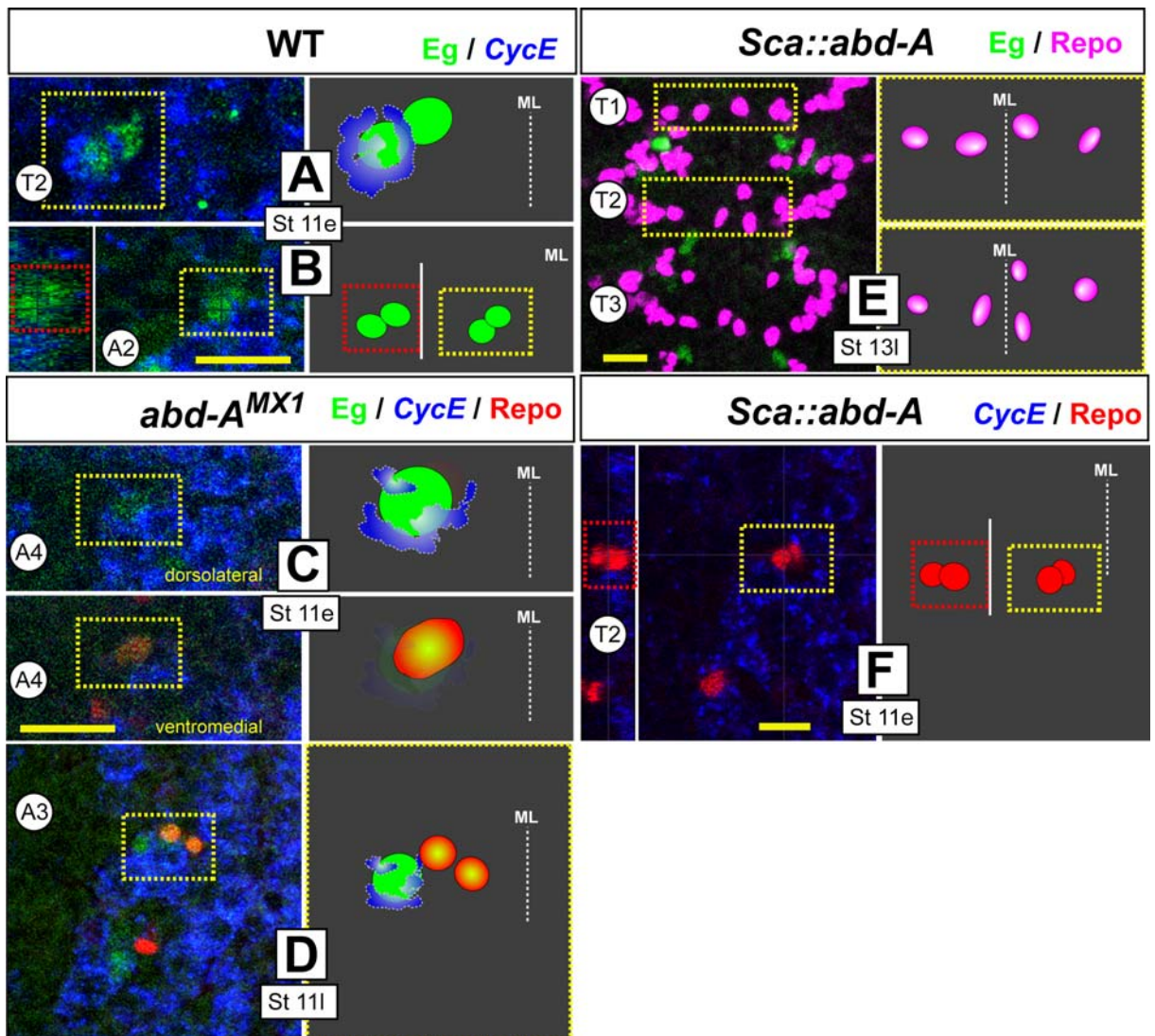


Abb. 3-34: Abdominal-A reprimiert *CycE* im abdominal NB6-4a.

A.,B. Wildtypische differenzielle Expression von *CycE* im NB6-4. In thorakalen Segmenten wird *CycE* nur im neuronalen Anteil exprimiert. Die thorakalen und abdominalen Gliazellen zeigen keine Expression.

C. In einer *abd-A*^{MX1}-Funktionsverlustmutation ist der abdominale NB6-4 in einen thorakalen NB6-4 transformiert. Nach der ersten Teilung wird nun im neuronalen Anteil (kein *Repo* in rot) *CycE* in abdominalen Segmenten exprimiert.

D. In der folgenden Teilung ist weiterhin keine *CycE* Expression in den *Repo*-positiven Gliazellen zu erkennen.

E. Eine ektopische Expression von *abd-A* im thorakalen NB6-4 (*sca*-Gal4-Treiberlinie) transformiert diesen in einen abdominalen NB6-4, der nun zwei Gliazellen generiert.

F. Diese Transformation kommt durch eine Inhibierung der *CycE* Expression zustande. Keine *CycE* Expression ist im thorakalen NB6-4 nach ektopischer Expression von *abd-A* zu beobachten.

Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurde ein genetisches Epistase Experiment mit einer *abd-A*^{MX1}/*CycE*^{AR95}-Doppelfunktionsverlustmutante gemacht. In einer *abd-A*^{MX1}-Funktionsverlustmutante ist der abdominale NB6-4 in einen thorakalen NB6-4 transformiert. *CycE* wird in dieser Situation im Abdomen exprimiert. In einer *CycE*-Funktionsverlustmutanten nimmt der thorakale NB6-4

abdominales Schicksal an. Wenn *abd-A* im Abdomen *CycE* direkt reprimiert und *CycE* der entscheidende Faktor für thorakales Schicksal ist, so dürfte in einer *abd-A^{MX1}/CycE^{AR95}*-Doppelfunktionsverlustmutanten kein Transformationsphänotyp (Abdomen zu Thorax) im Abdomen zu sehen sein. Die Identität des NB6-4 müsste zweimal verändert werden. Aufgrund der *abd-A*-Mutante eine Abdomen-zu-Thorax und zusätzlich durch die *CycE*-Mutante eine Thorax-zu-Abdomen Transformation. Somit müssten die abdominalen Segmente wildtypisch aussehen. In Abb. 3-35 ist

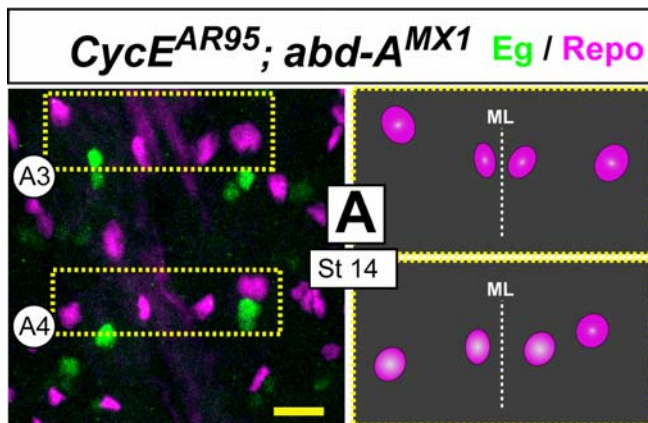


Abb. 3-35: Eine Doppelfunktionsverlustmutation für *CycE* und *abd-A* zeigt die epistatische Interaktion der beiden Gene.

In dieser Doppelmутanten behält der NB6-4a seine abdominale Identität bei. Durch die *abd-A*-Funktionsverlustmutation wird der NB6-4a in eine thorakale Variante transformiert. Dieser wird wiederum durch die *CycE*-Funktionsverlustmutation in eine abdominale Variante transformiert: nur Gliazellen entstehen.

Nähere Erläuterungen siehe Text.

eine solche Doppelfunktionsverlustmutante mit einer Eg/Repo-Doppelfärbung zu sehen. Deutlich zu erkennen ist, dass der abdominale NB6-4 nur Gliazellen generiert hat. Es sind keine dorsolateralen Neurone sichtbar.

Diese Experimente weisen auf eine mögliche direkte Interaktion zwischen *Abd-A* und *CycE* hin. Daher wurde die Enhancer-Region des *CycE*-Gens auf mögliche *Abd-A*-Bindestellen untersucht. Eine frühere Arbeit zeigte, dass ein bestimmtes 1.0kb großes Enhancerfragment für die Expression von *CycE* im ZNS verantwortlich ist (Abb. 3-36, ent-

nommen aus Jones *et al.*, 2000). Diese Region ist in Abb. 3-37 innerhalb eines 6.45kb Fragments (Grün) in einem 8kb großen DNA-Fragment markiert. In Rot sind potentielle *Abd-A*-Bindestellen dargestellt. Insgesamt konnten neun Bindestellen, welche alle die Sequenzen TTAATGG, TTAATGA, TTAATTG oder TTAATTA haben, innerhalb des 6.45kb Fragments gefunden werden. Eine weitere liegt direkt vor Beginn des ersten zygotische Exons (Exons sind Türkis unterlegt). Weitere neun Bindestellen liegen in dem Bereich vor der regulatorischen Region (nicht gezeigt in Anhang 7-1 und 7-2). Diese Region wurde bisher keiner Expressionsdomäne eindeutig zugeordnet (Abb. 3-36). Für eine *Abd-A*-Bindestelle konnte bereits gezeigt werden, dass diese Sequenz zur Repression der Genexpression genutzt wird. Dies

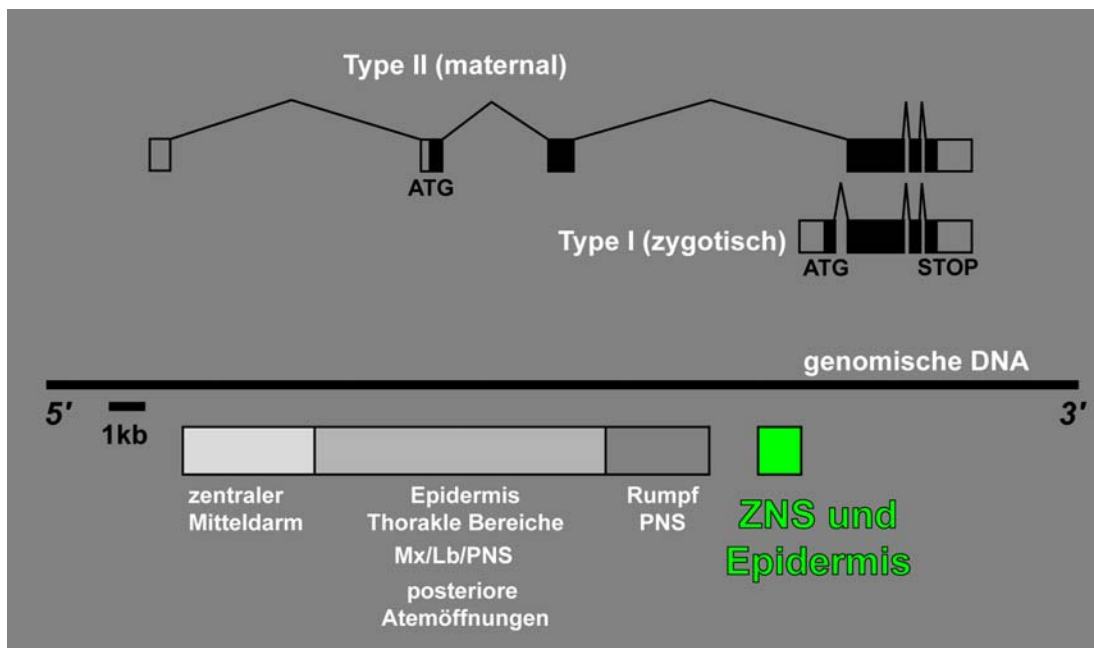


Abb. 3-36: Genomische Region des Gens *CycE*.

Oben: Intron-Exon Struktur des maternalen und zygotischen *CycE* Gens.

Unten: Identifizierte Enhancerregion für die Bereiche zentraler Mitteldarm, Epidermis/thorakale Bereiche/Maxillarsegment (Mx)/Labialsegment (Lb)/peripheres Nervensystem (PNS)/posteriore Atemöffnungen, Rumpf/PNS sowie der Region für die Expression im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Epidermis, hier markiert in grün.

Grafik entnommen aus Jones *et al.* (2000).

ist die Bindestelle mit der Sequenz TTAATGG (Manak *et al.*, 1994), die ebenfalls in dem in Anhang 7-1 und 7-2 gezeigten Enhancerfragment gefunden wurde.

Ein Genomvergleich mit derselben genomischen Region der Fliege *Drosophila pseudoobscura* zeigte, dass vier der neun Bindestellen konserviert geblieben sind. Zusätzlich konnten bei *Drosophila pseudoobscura* zwei weitere potentielle Abd-A-Bindestellen identifiziert werden (Anhang 7-2).

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die differentielle Expression von *CycE* im NB6-4 transkriptionell kontrolliert wird. Diese transkriptionelle Regulation wird von den Homöotischen Genen *abd-A* und *Abd-B* (*Abd-B* Bindestellen ebenfalls vorhanden, Anhang 7-1 in magenta) ausgeübt. Ein Verlust der Genfunktion von *abd-A* führt zur Expression von *CycE* und zur Transformation des abdominalen NB6-4 in einen thorakalen NGB6-4. Ektopische Expression von *abd-A* hingegen zum Verlust der *CycE* Expression und somit zu einer Transformation Thorax-zu-Abdomen. Weiterhin scheint eine direkte Interaktion zwischen *Abd-A* und *CycE* zu bestehen, da mehrere Bindestellen in der ZNS-Enhancerregion von *CycE* gefunden werden konnte.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Aspekte der Entwicklung des embryonalen Nervensystems von *Drosophila melanogaster* erforscht werden. Der erste Teil bearbeitete einen möglichen Einfluss der zeitlichen Entwicklung auf die Determination der Neuroblastenidentität. Bisher war bekannt, dass räumliche Faktoren (Genprodukte), die entlang der anterioposterioren und der dorsoventralen Achse exprimiert werden, das Neuroblastenschicksal bestimmen (zusammengefasst in: Bhat, 1999; Skeath, 1999). Die Beobachtung, dass Neuroblasten (NB), die zu bestimmten Zeitpunkten in fünf aufeinander folgenden Segregationswellen in das Innere des Embryos delaminieren, immer das gleiche Schicksal haben, wurde jedoch bisher nur unzureichend in den Prozess der Neuroblastenspezifizierung integriert. In dieser Arbeit zeigte ich nun, dass die Neuroektodermalzellen (NEZ) auf induktive, extrinsische Signale reagieren, die zu bestimmten Zeitpunkten im Neuroektoderm vorhanden sind. Diese extrinsischen Signale determinieren das korrekte zeitliche Neuroblastenschicksal. Späte NEZ, transplantiert in junge Empfängerembryonen sind in der Lage sich dem neuen, jüngeren Gewebe anzupassen und ein entsprechendes Neuroblastenschicksal anzunehmen. Umgekehrt konnten junge NEZ, die in ein zwei Stunden älteres Gewebe implantiert werden, diesen zeitlichen Unterschied überspringen und ihrerseits spätes Neuroblastenschicksal annehmen. Somit muss neben dem räumlichen spezifischen Set exprimierter Gene ebenfalls der Zeitpunkt der Entstehung des NBs als wichtiger integrativer Faktor der Neuroblastenspezifizierung angesehen werden, da extrinsische, induktive Signale zu gegebenem Zeitpunkt an der Neuroblastenspezifizierung beteiligt sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Problem untersucht, wie aus segmental homolog angelegten NBs an die jeweiligen Tagmata angepasste, divergierende Neuroblastenzellstammbäume hervorgehen können. Bekannt war, dass die tagmaspezifische Identität durch die Homöotischen Gene festgelegt wird (Lewis, 1978; Sanchez-Herrero *et al.*, 1985a; Shimell *et al.*, 1994). Dementsprechend zeigte eine frühere Arbeit, dass die Segmentspezifität eines NB-Zellstammbaums (NB1-1a)

direkt von der Funktion der Homöotischen Gene abhängt (Prokop und Technau, 1994). Weitere Einblicke in die regulierenden Mechanismen wurden keine gegeben.

Diese Mechanismen habe ich anhand des Modellsystems NB6-4 in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht. Der gewählte NB-Zellstammbaum generiert in tHS einen gemischten Neuron/Gliazellklon (neun Zellen), während der abdominale Vorläufer zwei Gliazellen produziert. Ein erheblicher Unterschied besteht somit auch im Proliferationsverhalten der beiden Varianten dieses Neuroblasten. Der abdominale NB teilt sich nur einmal, während der thorakale bis zu neun Teilungen vollzieht. In einem ersten Set an Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Identität des thorakalen NBs einen Grundzustand darstellt, der keiner Funktion Homöotischer Gene bedarf. Die abdominale Variante wird durch die Funktion der Gene *abdominal-A* und *Abdominal-B* determiniert. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Zellzyklus regulierende Gene untersucht, um einen möglichen Einfluss dieser Gene auf die Zellschicksale im NB6-4 Zellstammbaum festzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass das G1-Zyklus *CycE* notwendig und ausreichend ist, neuronales Schicksal im NB6-4 zu generieren. Eine Funktionsverlustmutation transformierte den thorakalen Vorläufer in einen abdominalen, während die ektopische Expression von *CycE* im abdominalen NB6-4 diesen in einen thorakalen Neuroglioblasten transformiert. Weitere Experimente machten deutlich, dass *CycE* differenziell im thorakalen, neuronalen Anteil des NB6-4 exprimiert wird. Diese Expression wird im abdominalen NB6-4 durch die Gene *abd-A* und *Abd-B* reprimiert. So zeigten Funktionsverlustmutationen dieser Gene eine Transformation abdominalen zu thorakalem Schicksal aufgrund einer starken Expression von *CycE*. Genetische Epistase Experimente sowie die Suche nach potenziellen Bindungsstellen für die Proteine dieser Gene in einer regulatorischen Region von *CycE*, die ebenfalls die spezifischen Regulationselemente des ZNS beinhaltet, zeigten, dass dieser Interaktion eine direkte Inhibierung der Transkription zugrunde liegt.

Damit konnte diese Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass Homöotische Gene Zellzyklusgene direkt regulieren, um segmentspezifische Unterschiede in seriell homologen NBs zu bewirken. Weiterhin wurde deutlich, dass, unabhängig von seiner Rolle im Zellzyklus, *CycE* notwendig und ausreichend ist, neuronales Zellschicksal im NB6-4 zu generieren. Somit werden zum einen wichtige Einblicke in die Funktionsweise der Homöotischen Gene gegeben, als auch ein essenzieller Beitrag

zum Verständnis der Entscheidung zwischen der Generierung von neuronalem oder glialen Zellschicksal in einer multipotenten Vorläuferzelle.

4.1. Irreversible und reversible Effekte während der Determination neuroektodermaler Vorläuferzellen

Mithilfe der Transplantationstechnik kann analysiert werden, wann und zu welchem Grad eine Vorläuferzelle auf einen bestimmten Aspekt ihres Zellschicksals determiniert wird. Darüber hinaus können zellautonome von nicht-zellautonomen Einflüssen auf diese Determination unterschieden werden. Durch heterotope Transplantationsexperimente konnten verschiedene Effekte der Positionsinformationen auf den Grad der Determination neuroektodermaler Vorläuferzellen bestimmt werden. Zum Beispiel sind die NEZ entlang der anterior-posterioren Achse bereits zu Beginn der Gastrulation (Stadium 7) irreversible in Bezug auf die Segmentidentität festgelegt. Werden Zellen aus der thorakalen in die abdominale Anlage transplantiert, so behalten sie ihre thorakale Identität (Prokop *et al.*, 1998; Prokop und Technau, 1994). Entlang der dorsoventralen Achse sind die ventralen Zellen ebenfalls bereits zu diesem Zeitpunkt stark determiniert – transplantiert nach dorsal wandern diese Zellen zurück zu ventralen Positionen und behalten ihre ventrale Identität (Udolph *et al.*, 1995). Somit vermitteln die Positionsinformationen in diesen Fällen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt irreversible Effekte auf die Zellidentitäten, die in späteren Stadien zellautonom weiter verfolgt werden. Jedoch können dorsale NEZ im Stadium 7 ihre Identität noch ändern und, transplantiert an ventrale Positionen, ventrales Zellschicksal annehmen (Udolph *et al.*, 1995; Udolph *et al.*, 1998). Die heterochronen Transplantationen der vorliegenden Arbeit zeigen eine solche Plastizität des Zellschicksals entlang der zeitlichen Achse. Die NEZ können ihre Identität der neuen Umgebung in beide Richtungen anpassen – beispielsweise generieren frühe Zellen transplantiert in altes Gewebe spätes Neuroblastenschicksal. In diesen Fällen behalten die Zellen die Kompetenz, extrinsische Signale zu empfangen und korrekt zu interpretieren.

So scheint die Spezifizierung der NBs von der Kombination der Faktoren abhängig zu sein, die das Neuroektoderm mit spezifischen räumlichen und zeitlichen Eigenschaften ausstatten. Einige dieser Eigenschaften werden früh in das

Entwicklungsprogramm der neuroektodermalen Vorläuferzellen aufgenommen, während andere die Zellen beeinflussen, ohne ihr Entwicklungspotenzial einzuschränken.

4.2. Das Neuroblastenschicksal ist unabhängig von einer Teilung der neuroektodermalen Vorläuferzelle

Hat sich der Neuroblast einmal gebildet, so werden abhängig von sequenziell exprimierten Genen (Brody und Odenwald, 2000; Goodman und Doe, 1993; Kambadur *et al.*, 1998) und der asymmetrischen Verteilung verschiedener determinierender Faktoren (zusammengefasst in: Fuerstenberg *et al.*, 1998) unterschiedliche Tochterzellen generiert. Diese Prozesse sind eng mit dem Zellzyklus verbunden. Späte NBs (S4, S5) haben schon eine erste postblastodermale Teilung vollzogen, bevor sie aus dem Neuroektoderm delaminieren (Foe, 1989; Hartenstein *et al.*, 1994). Diese Teilung führt zu zwei verschiedenen Zelltypen: einem Epidermoblasten und einem Neuroblasten (Schmidt *et al.*, 1997). Dies ist ein deutlicher Unterschied zu frühen NBs (S1, S2), die ohne vorherige Teilung delaminieren. Daher könnte man annehmen, dass diese erste postblastodermale Zellteilung eine Voraussetzung ist, spätes Neuroblastenschicksal zu produzieren.

Die hier gezeigten Daten sprechen aber dagegen. NEZ, die diese Teilung nicht vollziehen (jung nach alt), können trotzdem spätes Neuroblastenschicksal annehmen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass späte NEZ (bereits einmal geteilt), nachdem sie in ein frühes Neuroektoderm implantiert wurden, eine weitere Teilung vollziehen können. Diese zusätzliche Teilung hatte keinen Einfluss auf das Zellschicksal, da sich ein Epidermoblast und ein später NB bilden (Tab. 3-3). Daher kann man annehmen, dass die Zellteilungen des Neuroektoderms keinen Einfluss auf die Neuroblastenspezifizierung haben. Diese Separierung der Zellspezifizierung vom Teilungsmuster des Vorläufers konnte ebenfalls in der sich entwickelnden Augenimaginalscheibe beschrieben werden. In diesem System erweitert eine zweite mitotische Teilungswelle den Pool an Zellen, aus denen die Photorezeptorzellen rekrutiert werden. Wird diese zweite mitotische Teilung geblockt (durch ektopische Expression von *p21*), so werden trotz der Reduktion der Zellen alle Zelltypen gebildet (de Nooij und Hariharan, 1995). Im Vertebraten ZNS beginnt die Differenzierung der

Oligodendrozyten nach einer spezifischen Zeitdauer der Proliferation. Diese Periode wird durch extrinsische und intrinsische Faktoren präzise reguliert. Ein intrinsischer Zeitmesser misst die verstrichene Zeit, ist aber gleichzeitig abhängig von der Anzahl der Teilungen, die in dieser Zeitperiode stattfinden. Extrinsische Signale werden benötigt, um die Zellteilung zu stoppen und die Differenzierung zum richtigen Zeitpunkt zu starten (Durand und Raff, 2000). In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten, ist die Separierung von frühem und spätem Neuroblastenschicksal zwar unabhängig von den postblastodermalen Zellteilungen, aber ein intrinsischer Messmechanismus kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Falls ein solcher Mechanismus in den NEZ existiert, müsste dieser aber extrinsische Signale als Trigger benötigen.

4.2. Extrinsische Signale sind an der Spezifizierung temporärer Neuroblastenpopulationen beteiligt

Wie bereits beschrieben, haben die Positionsinformationen, vermittelt durch die frühen Segmentierungsgene und die dorsoventralen Mustergene, einen entscheidenden Einfluss auf die Spezifizierung der Neuroblastenidentität (zusammengefasst in: Bhat, 1999; Skeath, 1999). Ein Teil dieser Information wird vor der Neurogenese in das zellautonome Programm dieser Zellen integriert. Ein anderer Teil wird jedoch sukzessive durch extrinsische Faktoren vermittelt. Zum Beispiel wird das Segmentpolaritätsgen *wingless* (*wg*) in einer einzigen Reihe NEZ exprimiert – das sezernierte Wg Protein wird jedoch für die Bildung und Spezifizierung der NBs in den anterioren und posterioren Nachbarzellen benötigt (Chu-LaGriff und Doe, 1993). Entlang der dorsoventralen Achse sind die sezernierten Proteine Spitz und Vein an der Neuroblastenspezifizierung beteiligt (Skeath, 1998; Udolph *et al.*, 1998).

Die hier vorgestellten heterochronen Transplantationsexperimente zeigen, dass die Spezifizierung des Neuroblastenschicksals entlang der zeitlichen Achse der Entwicklung ebenfalls von extrinsischen Signalen abhängt. Obwohl NEZ im Stadium 10 normalerweise niemals NBs der S1 oder S2 Phase generieren, machen sie dies nach Transplantation in das Stadium 7 Neuroektoderm. Dass dies kein zellautonomes Programm darstellt, das anläuft, nachdem die Zellen möglichen inhibierenden Faktoren des späten Neuroektoderms nicht mehr ausgesetzt sind, zeigte folgender

Versuch. Zellen des dorsalen (nicht neuralen) Ektoderms können ebenfalls nach heterotoper Transplantation ins Neuroektoderm neurales Schicksal annehmen (Stüttem und CamposOrtega, 1991; Technau *et al.*, 1988) und darüber hinaus auch frühes Neuroblastenschicksal generieren (Berger *et al.*, 2001). Dies können sie jedoch nicht als zellautonomes Schicksal in Zellkultur (Luer und Technau, 1992). Somit müssen die implantierten Zellen auf spezifische Signale reagieren und ihr Schicksal diesen entsprechend anpassen. Dies scheint auch in die andere Richtung möglich. Nach heterochroner Transplantation früher NEZ (Stadium 7) ins Neuroektoderm von Stadium 10 Empfängern, wurden präferenziell Neuroblastenklone der späten NBs gebildet (Tab. 3-2).

Eine ähnliche Situation wie in *Drosophila* haben heterochrone Transplantationsexperimente ergeben, bei denen das sich entwickelnde Frettschengehirn untersucht wurde. Hier ergab sich für die sequenzielle Entwicklung neuraler Zelltypen von Vorläuferzellen der Ventrikularzone ebenfalls ein Szenario zwischen extrinsischen Faktoren und sich ändernden intrinsischen Eigenschaften (Frantz und McConnell, 1996; McConnell und Kaznowski, 1991). Vorläuferzellen sehr früher Embryonen konnten ihr Zellschicksal entsprechend dem älteren Empfängergewebe anpassen. Im Gegensatz dazu, konnten ältere Zellen in jüngerem Gewebe nur Zellschicksale entsprechend ihrem Alter generieren. Dieses Experiment zeigte eine irreversible intrinsische Veränderung des Entwicklungspotenzials in älteren Zellen. Diese intrinsischen Veränderungen könnten ebenfalls in den Zellen des Neuroektoderms von *Drosophila* auftreten. Jedoch sind diese reversibel, unter dem Einfluss spezifischer, extrinsischer Signale. Ob dies ebenfalls für bereits delaminierte NBs der Fall ist, sollten Experimente in der näheren Zukunft zeigen.

Zusammenfassend zeigen die Experimente des ersten Teils dieser Arbeit, dass die temporale Sequenz der Neuroblastenpopulationen nicht bereits im frühen Neuroektoderm festgelegt ist, sondern vielmehr von dynamisch exprimierten, stadiumsspezifischen, extrinsischen Signalen abhängt. Segmentpolaritätsgene spielen eine zentrale Rolle bei der Bildung und Spezifizierung der NBs (zusammengefasst in: Bhat, 1999). Sie werden segmental in bestimmten Reihen der NEZ exprimiert. Da die Expressionsmuster einiger dieser Gene sich dynamisch entwickeln, also auch von Stadium zu Stadium unterscheiden, sind diese Gene ebenfalls gute Kandidaten für die temporäre Neuroblastenbildung und Spezifizierung. Eine weitere Arbeit aus unserem Labor hat deutlich gemacht, dass die Spezifizierung

der beiden späten NBs 6-4 (S3) und 7-3 (S5) im Wesentlichen durch das Zusammenspiel der beiden Segmentpolaritätsgene *naked (nkd)* und *gooseberry (gsb)* kontrolliert wird (Desphande *et al.*, 2001). Mutationen in eines dieser beiden Gene führten zu einer Transformation des einen NBs in den anderen. Interessanterweise bleibt jedoch die zeitliche Sequenz der Delamination bestehen, ist also unabhängig von diesen Genen. Dies impliziert, dass die Bildung und die Spezifizierung dieser beiden NBs von unterschiedlichen Faktoren abhängen.

Weitere Arbeiten müssen zeigen, ob dies auch für andere NBs gilt und versuchen, die Faktoren, die für die Kontrolle der zeitlichen Muster der Neuroblastenbildung verantwortlich sind, zu identifizieren.

Ist der NB einmal spezifiziert, generiert er einen für seine Identität eigenen Zellstammbaum. Aus den segmental homolog angelegten NBs gehen jedoch tagmaspezifische Zellstammbäume hervor. Die Mechanismen, die zu diesem segmental divergierendem Verhalten der seriell homologen NBs führt, sind nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem gewählt, das neben unterschiedlichen Zelltypen auch ein unterschiedliches Proliferationsverhalten zwischen den Tagmata Abdomen und Thorax aufweist. Im Thorax ist der NGB6-4t eine multipotente Vorläuferzelle, die sowohl Glia als auch Neurone generiert, während der abdominale NB nur Gliazellen generiert. Wie kommt es zu diesem unterschiedlichen Verhalten?

4.3. Das gliale Schicksal des NB6-4 ist ein frühes Schicksal

Die erste Teilung des thorakalen NGB6-4t im späten Stadium 10 ist asymmetrisch. Hierdurch wird der neuronale Anteil vom glialen getrennt. Faktoren, die gliales Schicksal beeinflussen, werden in dieser Teilung in den Glioblasten verteilt. Der thorakale Gliavorläufer wandert zur Mittellinie hin und teilt sich erneut (Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Akiyama-Oda *et al.*, 2000a; Akiyama-Oda *et al.*, 2000b; Bernardoni *et al.*, 1999; Freeman und Doe, 2001; Schmidt *et al.*, 1997 und diese Arbeit). Erst wenn diese Teilung vollzogen ist, wird die erste neuronale Gangliennutterzelle generiert. In abdominalen Segmenten teilt sich der Vorläufer zum gleichen Zeitpunkt wie der thorakale gliale Vorläufer. Das gliale Schicksal wird daher früher produziert als das neuronale. In *Drosophila* konnten bereits einige Faktoren

identifiziert werden, die für die temporale Spezifizierung bestimmter Anteile der Neuroblastenzellstammbäume benötigt werden. So zeigten eine Reihe von Arbeiten, dass die Gene *hunchback*, *Krüppel*, *pmd-1/pdm-2*, *castor* und *grainyhead* sequenziell in den Neuroblastenzellstammbäumen exprimiert werden und so zeitlich abfolgende Zellschicksale bestimmen (Brody und Odenwald, 2000; Brody und Odenwald, 2002; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998; Novotny *et al.*, 2002). *hunchback* beispielsweise ist ein Gen, das frühes Zellschicksal bestimmt (Novotny *et al.*, 2002; Pearson und Doe, 2003). Für den NGB6-4t ist bereits bekannt, dass *hunchback* notwendig ist um die MM-CBG Gliazellen zu spezifizieren. In einer Funktionsverlustmutation fehlen diese Gliazellen. Expressionsuntersuchungen zeigten, dass eben diese Gliazellen *hunchback* exprimieren (Abb. 3-10 und Isshiki *et al.*, 2001). Für die Neurone wurden bisher nur in einer Arbeit temporäre Faktoren beschrieben (Isshiki *et al.*, 2001). Mit dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass zumindest die ersten beiden neuronalen GMZ PDM-1 exprimieren (Abb. 3-10). Isshiki *et al.* (2001) beschrieben eine Expression in der zweiten neuronalen GMZ. Ferner konnte in dieser Arbeit eine Expression von *Hunchback* in allen Gliazellen sowohl thorakaler als auch abdominaler Segmente des NB6-4 beschrieben werden. Somit wird im NB6-4 Zellstammbaum das gliale Schicksal als frühes Zellschicksal durch *Hunchback* bestimmt. Fällt die *Hb*-Funktion aus, fehlt zumindest im Thorax dieses frühe Zellschicksal (Isshiki *et al.*, 2001). Ein spätes Zellschicksal wird durch PDM-1 Expression markiert. Dies ist der neuronale Anteil des thorakalen NGB6-4t. Ähnliche Beobachtungen konnten in der Vertebraten Neurogenese gemacht werden. Hier wird als frühes Schicksal ebenfalls gliales Schicksal angelegt, die radialen Gliazellen. Trotz ihrer Eigenschaften als Stammzelle ebenfalls Neurone zu generieren, zeigen sie typische gliale Charakteristika, wie zum Beispiel die Expression der glialen Proteine GFAP (Glia-Fibrillary Acidic Protein) und GLAST (Astrocyte-specific Glutamate Transporter) oder funktionelle Eigenschaften als Hilfszellen (dienen als Matrix zur Migration der Neurone). Als sekundäres, „älteres“ Schicksal werden Neurone generiert (Anthony *et al.*, 2004; Malatesta *et al.*, 2003; Parnavelas und Nadarajah, 2001). Homologe Proteine von *Hunchback* und PDM-1 wurden ebenfalls in Vertebraten gefunden. So scheinen Gene der *Ikaros*-Familie die homologen Gene zu *hunchback* zu sein (Sun *et al.*, 1996). Für zwei dieser Gene wurde bereits eine Expression in neuralen Geweben gezeigt (*Ikaros* und *Eos*, Honma *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1996). Auch für POU Transkriptionsfaktoren (*pdm*-Gene) wurden mögliche

homologe Gene gefunden. Das Homologon von *pdm-1*, scheint das *oct-1* Gen zu sein (Verrijzer und Van der Vliet, 1993). Dieses Gen zeigt ebenfalls eine Expression in neuralen Geweben. Jedoch wurden bisher keine Untersuchungen hinsichtlich eines Einflusses dieser Gene auf die zeitliche Abfolge der Entstehung verschiedener Zellschicksale im Vertebraten ZNS gemacht. Dass tatsächlich eine Korrelation zwischen der fortschreitenden Entwicklungszeit und den entstehenden Zelltypen besteht, konnte an isolierten Stammzellen des cerebralen Kortex von Mäusen gezeigt werden. Ein intrinsisches Programm scheint in diesen Zellen den generierten Zelltyp zu bestimmen, während extrinsische Signale für die korrekte Anzahl der Zellen verantwortlich sind (Qian *et al.*, 2000).

Für den NB6-4 bei *Drosophila* bleibt jedoch abzuwarten, ob andere, ebenfalls temporär exprimierte Gene wie *castor* oder *Krüppel* einen Einfluss auf die sequenzielle Determination des Zellschicksals hat. So könnten eventuell unterschiedliche Neurontypen spezifiziert werden.

Weiterhin ist an dieser Stelle festzuhalten, dass das gliale Schicksal in *Drosophila* Neuroblastenzellstambäumen nicht generell ein frühes Schicksal ist. So machten Versuche mit dem NB1-1a deutlich, dass die erste GMZ die beiden Neurone aCC und pCC generiert, während die Gliazellen dieser Zellgenealogie als Geschwisterzellen der spät entstehenden Neurone produziert werden (Udolph *et al.*, 1993). Ob weitere NBs im embryonalen *Drosophila* Bauchmark entstehen, die denselben Teilungs-mechanismus und somit frühes, gliales Schicksal haben, sollten zukünftige Untersuchungen zeigen. Ein gute Kandidat wäre der NB1-3, der neben drei bis vier Neuronen circa acht Gliazellen generiert (Schmidt *et al.*, 1997)

4.4. Abhängigkeit des glialen Schicksals von Prospero und dem Zellzyklus

Neben einer Abhängigkeit von *hunchback* konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass die NB6-4 Glia nur produziert werden, wenn Pros in den glialen Vorläufer verteilt wird (Freeman und Doe, 2001). In den entsprechenden *pros*-Funktionsverlustmutationen werden keine Gliazellen gebildet. Dies zeigte die vorliegende Arbeit ebenfalls. Darüber hinaus wurde eine Zunahme der dorsolateralen Neuronen beobachtet. Für diesen Effekt gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Zum

einen könnten die präsumtiven Gliazellen infolge des Verlustes von Pros (und anderer glialer Faktoren) in Neurone transformiert werden und zum anderen könnte dieser Effekt infolge eines Verlustes der Pros-Funktion in neuronalen GMZ aufzutreten, die in späteren Stadien normalerweise ebenfalls Pros exprimieren (diese Arbeit).

Freeman und Doe (2001) beschrieben, dass die ursprüngliche *gcm*-Transkription im NGB6-4t von Pros unabhängig ist. Erst im glialen Vorläufer wird Pros zur Aufrechterhaltung der *gcm*-Expression benötigt. Fehlt Pros, wird das Gcm Protein schnell abgebaut. Die aus dem Gliavorläufer entstehenden drei Zellen exprimieren weder Repo noch neuronenspezifische Gene wie zum Beispiel *elav*. Für eine *gcm*-Funktionsverlustmutante (*gcm^{N7-4}*) wurde jedoch tatsächlich bereits beschrieben, dass präsumtive Gliazellen ohne Gcm in Neurone transformiert werden (Hosoya *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1996). Freeman und Doe (2001) schlossen aus ihren Beobachtungen allerdings, dass diese Zellen weder auf ein gliales noch ein neuronales Schicksal programmiert werden. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen einer Diplomarbeit in unserem Labor, in der das Entwicklungsschicksal präsumtiver Gliazellen in Embryonen einer *gcm*-Funktionsverlustmutation mithilfe von Dil-Markierungs- und Transplantationsexperimenten untersucht wurde. Transformationen traten auch hier nicht auf. In Zellklonen von NGBs, die normalerweise Gliazellen produzieren, konnten entweder nicht differenzierte, sphärisch abgerundete Zellen, oder aber lediglich Zellfragmente beobachtet werden, die auf Zelltod möglicher unspezifizierter „Glia“-Zellen schließen lassen. Daher scheint eine Transformation der präsumtiven Gliazellen in *pros*-Funktionsverlustmutationen nicht stattzufinden.

Somit könnten die zusätzlichen Neurone aufgrund eines Effektes in den neuronalen GMZs entstehen. Tatsächlich reguliert eine panneurale Expression von Pros das Proliferationsverhalten der GMZs (Li und Vaessin, 2000). Pros wirkt zum einen reprimierend auf Gene des Zellzyklus (zum Beispiel *CycA*, ein Zyklin, das die Mitosephase reguliert) und zum anderen aktivierend auf Gene, die ihrerseits den Zellzyklus blockieren und somit die Differenzierung einleiten (zum Beispiel *dacapo*, ein Inhibitor von *CycE*; Li und Vaessin, 2000). Geht diese Funktion von Prospero verloren, so könnte dies eine zusätzliche Teilungsaktivität dieser Zellen bewirken, wodurch weitere Neurone entstehen.

Für die Entstehung der thorakalen Gliazellen ist eine Zellteilung notwendig

Die Funktion von Pros alleine ist aber nicht ausreichend, gliales Schicksal hervorzurufen. Vielmehr scheint im NGB6-4 ebenfalls das Fortschreiten des Zellzyklus notwendig zu sein. So entstehen in *string*-Funktionsverlustmutanten gezeitigt keine Gliazellen (Akiyama-Oda *et al.*, 2000a). In diesen mutanten Tieren erfolgt keine Neuroblastenteilung und obwohl alle Faktoren zur Bildung von Gliazellen im NGB vorhanden sind (Pros, *gcm* und Hb), exprimiert die entstehende Zelle keine glialen Marker (Repo; Akiyama-Oda *et al.*, 2000a) – sie wird neuronal. Der abdominale Vorläufer hingegen nimmt gliales Schicksal an (Akiyama-Oda *et al.*, 2000b). Dies deutet auf zwei Dinge hin: Zum einen kann angenommen werden, dass ein neuronspezifischer Faktor im thorakalen NGB6-4 vorhanden ist. Dieser ist mit *CycE* in der vorliegenden Arbeit identifiziert worden. Zum anderen scheint eine Zellteilung notwendig zu sein, gliales Schicksal zu produzieren. Untersucht man *pebbles*-Funktionsverlustmutationen (keine Zytokinese, aber Karyokinese), wird nämlich der Gliadifferenzierungsmarker Repo im thorakalen NB6-4 exprimiert und die mehrkernige Zelle nimmt gliales Schicksal an (Akiyama-Oda *et al.*, 2000b). Hier scheinen nun beispielsweise Proteine wie Prospero nach der Zellteilung aktiv zu sein, wodurch gliales Schicksal entsteht. Zur Spezifizierung der Gliazellen im thorakalen NB6-4 ist somit eine asymmetrische Zellteilung notwendig, wobei auf der einen Seite gliale Faktoren wie *gcm* präferenziell in den glialen Vorläufer verteilt werden und zum anderen Proteine wie Pros aktiviert werden um den Glialen Schicksalsweg zu fördern.

Es war bemerkenswert, dass in der vorliegenden Arbeit in *cdc2*-Funktionsverlustmutationen ein relativ normaler NB6-4 Zellstammbaum gefunden wurde (Abb. 3-31). Bedenkt man, dass in diesem mutanten Hintergrund Pros nicht mehr korrekt asymmetrisch reguliert wird (Tio *et al.*, 2001) und Pros notwendig ist gliales Schicksal zu generieren (Freeman und Doe, 2001), deutet dies auf einen weiteren, in Gliazellen wirkenden Faktor hin. Dieser Faktor könnte das Gen *hunchback* sein, dessen Protein ebenfalls asymmetrisch in den Gliavorläufer verteilt wird. Ob Hunchback in *cdc2*-Funktionsverlustmutationen auch nicht asymmetrisch reguliert wird, ist bisher nicht untersucht worden.

Zusammenfassend kann für die Gliogenese im thorakalen NB6-4 folgendes Szenario beschrieben werden: In einer ersten asymmetrischen Teilung werden die Faktoren Hunchback und Prospero, sowie *gcm*-mRNA und *hb*-mRNA zu großen

Teilen in den Gliavorläufer asymmetrisch verteilt. Im neuronalen Vorläufer verbleibende mRNA wird schnell abgebaut. Nach der Zellteilung wird Pros von Miranda wieder freigegeben, in den Kern transloziert, und reguliert dort, eventuell zusammen mit Hunchback, gliale Gene wie zum Beispiel *gcm*. Der gliale Differenzierungsweg ist eingeschlagen. Pros wird in den gebildeten Gliazellen in unterschiedlicher Stärke exprimiert. So zeigt die anteriore MM-CBG die stärkste Expression (Beobachtungen dieser Arbeit). Ob dies ein qualitativer Unterschied in der Identität der Glia ausmacht, sollten zukünftige Experimente zeigen.

Für den neuronalen Entwicklungsweg wurde in dieser Arbeit mit *CycE* einer der entscheidenden Faktoren identifiziert.

Die *gcm*-Expression im abdominalen NB6-4a ist von *abd-A* abhängig

Im abdominalen NB6-4a scheint ein etwas anderer Mechanismus abzulaufen. Zum einen konnten keine Veränderung der glialen Bestandteile in *pros*-Funktionsverlustmutationen beobachtet werden (Akiyama-Oda *et al.*, 2000b; Freeman und Doe, 2001 und diese Arbeit). Außerdem ist die *gcm*-Expression hier wohl nicht von Pros abhängig. So konnten Jones *et al.* (2004) bei ihrer Untersuchung der cis-regulatorischen Elemente des *gcm*-Enhancers ein DNA-Fragment identifizieren, das – neben einigen Zellen im Maxillarsegment und in den Gehirnhemisphären – ausschließlich die *gcm*-Expression im abdominalen NB6-4a reguliert. Dieses Enhancerelement hatte keine *gcm*-Bindestelle, jedoch konnte eine Abhängigkeit von *abd-A* deutlich gemacht werden. In *abd-A*-Funktionsverlustmutationen war ein entsprechendes LacZ-Reporterkonstrukt nicht mehr exprimiert. Das korrespondierende thorakale Enhancerfragment konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Eine Abhängigkeit des abdominalen Schicksals des NB6-4a von *abd-A* konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden: *CycE*, der entscheidende Faktor für die Entstehung von Neurone im thorakalen NB6-4 wird in abdominalen Segmenten von *abd-A* reprimiert. Dies weist darauf hin, dass durch die Funktion der Homöotischen Gene viele verschiedene Regulationen eingeleitet werden, die letztendlich zur Spezifizierung der Tagmaidentität führen.

4.5. *CyclinE* fördert die Bildung von Neuronen

Während der glialen Anteil den segmental gemeinsamen Anteil des NB6-4 Zellstammbaums darstellt (M-CBG und eine MM-CBG), ist der neuronale Anteil nur in thorakalen Segmenten zu finden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *CycE* differenziell im NB6-4 exprimiert wird. Dabei sind hohe Transkriptionslevel in neuronalen Abkömmlingen und keine detektierbare zygotische Expression in dem Zellstammbaum des NB6-4a und den glialen Abkömmlingen des thorakalen NB6-4 zu beobachten. Ein Funktionsverlust von *CycE* eliminiert den neuronalen Anteil des thorakalen Zellstammbaums, der dann abdominales Schicksal annimmt. Umgekehrt führt eine ektopische Expression zur Bildung neuronaler Zellen im NB6-4a, der dadurch thorakales Schicksal exprimiert. *CycE* ist also notwendig und ausreichend, neuronales Schicksal im NB6-4 zu generieren.

Durch Einzelzelltransplantationen konnte gezeigt werden, dass dies ein zellautonomer Effekt von *CycE* ist. Einzelne abdominale Vorläuferzellen, die ektopisch *CycE* exprimieren, generierten in einem wildtypischen Hintergrund einen Zellklon, der sowohl gliale als auch neuronale Bestandteile enthält. Einen ähnlichen Effekt konnte für den Zellstammbaum des NB1-1a beschrieben werden, der ebenfalls tagmaspezifische Zellstammbaumanteile hat (Udolph *et al.*, 1993). Der NB1-1a generiert normalerweise drei Gliazellen und eine Reihe von Neuronen, unter anderem die prominenten Neurone aCC und pCC. Im Gegensatz dazu hat der Zellstammbaum des thorakalen NB1-1 nur Neurone und unter anderem eine zusätzliche Motoprojektion (1-1Ms) zum aCC-Motoneuron (Bossing *et al.*, 1996; Prokop und Technau, 1994; Udolph *et al.*, 1993). In den Transplantationsklonen der *CycE* ektopisch exprimierenden Neuroektodermalzellen konnten NB1-1a Zellstammbäume gefunden werden, die neben dem aCC-Motoneuron ein zusätzliches 1-1Ms-ähnliches Motoneuron haben (Abb. 3-20). Somit weist der NB1-1a nach ektopischer Expression von *CycE* ein neues zusätzliches Zellschicksal auf, das normalerweise nur in thorakalen Segmenten vorhanden ist. Im Gegensatz dazu konnten (Bhat und Apsel, 2004) unlängst zeigen, dass erhöhte Level an *CycE* (ektopische Expression von *CycE* mit der *fushi-tarazu*-Treiberlinie, *ftz-Gal4*) zu einer selbsterneuernden Teilung der ersten Ganglienmutterzelle (GMZ-1) des NB1-1 führt, wodurch eine Verdopplung der Neurone aCC und pCC zustande kommt. Diese werden normalerweise als Geschwisterneurone von der GMZ-1 produziert. Mit der *sca-Gal4*

Linie als Treiberlinie konnten ich diesen Effekt nicht beschreiben (zum Beispiel Abb. 3-22). Interessanterweise dokumentierte ich jedoch ähnliche Effekte, wenn *CycE* zusammen mit *string* oder *string* alleine exprimiert wurde (mit der *sca*-Gal4-Linie, Abb. 3-22, 3-23). Sowohl Antikörperfärbungen als auch Mikromanipulationsexperimente zeigten unter diesen Bedingungen eine Duplikation der GMZ-1 (Abb. 3-22, 3-23). Diese variablen Effekte können auf unterschiedliche Weisen erklärt werden: Zum einen sind vielleicht die unterschiedlich hohen Level an *CycE* der Grund für die unterschiedlichen Phänotypen. So könnte die *ftz*-Gal4-Treiberlinie, die spezifisch in Ganglienmutterzellen exprimiert, einen anderen Level an *CycE* in der GMZ-1 verursachen als die *sca*-Gal4-Treiberlinie. Weiterhin wird durch die *sca*-Gal4-Treiberlinie *CycE* bereits im Vorläufer, also im NBs produziert. Dies könnte, ähnlich wie beim NB6-4 bereits eine Auswirkung auf das entstehende Zellschicksal haben. Im NB6-4t detektierte ich ebenfalls eine Expression von *CycE* bereits im NGB nach Delamination. Eine Koexpression mit *stg* könnte ebenso einen unspezifischeren Effekt in der M-Phase bedeuten, wodurch das Schicksal der GMZ-1 verdoppelt wird. Ob dies ebenfalls durch eine selbsterneuernde Teilung der GMZ-1, so wie es Bhat und Apsel (2004) gezeigt haben, hervorgerufen wird, muss noch getestet werden. Bhat und Apsel (2004) zeigten weiterhin, dass die *CycE* Expression in der GMZ-1 von Transkriptionsfaktoren der POU-Familie abhängig ist. Bei einer ektopischen Expression von PDM-1 oder PDM-2 wurden ebenfalls erhöhte Level an *CycE* gefunden. Entsprechend beobachtete ich eine ausschließliche Expression von PDM-1 im neuronalen Anteil des thorakalen NB6-4 Zellstammbaums, was übereinstimmend mit der neuronenfördernden Wirkung von *CycE* ist.

Zusätzliche Hinweise für diese Neuronen fördernde Wirkung von *CycE* lieferte die Arbeit von Badenhorst (2001). Er zeigte, dass *tramtrack*, ein gliaspezifizierendes Gen, neben anderen neuronalen Genen wie *deadpan* oder *asense* auch spezifisch die Expression von *CycE* inhibiert. *tramtrack* wird ebenfalls in den Gliazellen des NB6-4 exprimiert (Badenhorst, 2001). Als weiterer gliaspezifizierender Faktor wurde auch für Pros gezeigt, dass dieser *CycE* herunterreguliert (Li und Vaessin, 2000). Letztlich konnte in einer genomweiten Suche nach potenziellen, durch *gcm* regulierten Zielgenen ebenfalls *CycE* gefunden werden (persönliche, unpublizierte Mitteilung von Benjamin Altenhein, AG Technau). Die Arbeit von B. Altenhein untersucht mithilfe der Mikroarray Methode sowohl *gcm*-Funktionsverlustmutationen, als auch eine ektopische Expression von *gcm*, nach differenziell regulierten Genen.

Dies geschieht im Vergleich zu wildtypischen Embryonen und zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Basierend auf dem kompletten, annotierten Genom von *Drosophila melanogaster* können so viele bekannte und unbekannte Gene identifiziert werden. Die Auswertung der Versuchsreihen ist noch nicht abgeschlossen, jedoch konnte für die *gcm*-Funktionsverlustmutante bereits eine deutliche Erhöhung der Expression von *CycE* beschrieben werden (persönliche, unpublizierte Mitteilung von Benjamin Altenhein, AG Technau). In einer anderen Arbeit, die ebenfalls auf dieser Methode beruhend mögliche *gcm*-regulierte Zielgene identifizierte, wurde eine ektopische Expression von *gcm* untersucht (Egger *et al.*, 2002). Hier konnte zumindest in späten Stadien (15/16) eine signifikante Erniedrigung der *CycE*-Expression beschrieben werden.

Auch in Vertebraten scheint *CycE* eine Rolle bei der Entstehung der Neurone zu spielen. In der sich entwickelnden Retina von *Xenopus* werden die unterschiedlichen Zellschicksale in einem zeitlich hoch geordneten Muster nacheinander gebildet. In diesem System werden die retinalen Ganglienzellen zuerst geboren, gefolgt von den amakrinen Neuronen, den Photorezeptorzellen, den bipolaren Zellen und den Müllerglia (Cepko, 1999; Edlund und Jessell, 1999; Harris, 1997). Die Festlegung der einzelnen Zellschicksale scheint hierbei abhängig von der Entscheidung zu sein, zu welchem Zeitpunkt eine Zelle den Zellzyklus beendet (Ohnuma *et al.*, 2002; Ohnuma *et al.*, 2001; Ohnuma *et al.*, 1999 und zusammengefasst in: Malicki, 2004). Die Funktion der Cyclin/CDK Komplexe wird benötigt, neuronales Schicksal zu generieren. Mit fortschreitender Entwicklungsdauer sammeln sich CDK-Inhibitoren (CDKI) an, was letztendlich zur Blockierung der Cyclin/CDK Komplexe führt und zur Differenzierung der späten Müllerglia. Wird der *Xenopus* CDKI *p27Xic1* ektopisch exprimiert, so steigt die Anzahl der Müllerglia auf Kosten der bipolaren Neurone (Ohnuma *et al.*, 2002; Ohnuma *et al.*, 1999). Weiterhin ist ein anderer CDKI, *p27Kip1*, spezifisch in der Müllerglia exprimiert, wodurch die Proliferation kontrolliert wird (Dyer und Cepko, 2001; Levine *et al.*, 2000). Ähnliches konnte in dieser Arbeit für das *Drosophila* CDKI-Gen *dacapo* gefunden werden. Zwar wurden keine Expressionsuntersuchungen zu *dacapo* gemacht, dennoch zeigte der Funktionsverlustphänotyp ausschließlich eine erhöhte Proliferation der Gliazellen des NB6-4. Hier scheint demnach ebenfalls eine Anreicherung der CDKI verantwortlich zu sein, eine kontrollierte Proliferation der Gliazellen zu gewährleisten.

Im Gegensatz zur Retinaentwicklung konnte bei der Bildung der Neurone der Neuralplatte von *Xenopus* beobachtet werden, dass hier *p27Xic1* stark in frühen Neuronen exprimiert ist und dass eine spezifische Blockierung der Cyclin/CDK Komplexe notwendig zur Bildung der Neurone ist (Vernon *et al.*, 2003). Zukünftige Arbeiten sollen untersuchen, ob weitere vergleichbare Mechanismen zwischen *Drosophila* und Vertebraten vorhanden sind.

4.6. Die neuronfördernde Funktion von *CyclinE* scheint unabhängig von seiner Funktion als Zellzyklusgen zu sein

Bisher wurde angenommen, dass Zellzyklusgene von *Drosophila* das Zellschicksal nur durch ihre Funktion während einer asymmetrischen Zellteilung beeinflussen können. Tio *et al.* (2001) konnten zum Beispiel zeigen, dass die Kinase Aktivität von *cdc2* während der M-Phase notwendig ist, um Faktoren wie beispielsweise Inscuteable am apikalen Kortex des NBs zu lokalisieren. In Funktionsverlustmutationen tauchten Zellduplikationen auf, die wahrscheinlich durch die abnormale Verteilung von spezifizierenden Faktoren hervorgerufen wurden. Dieser Effekt hängt direkt mit dem Zellzyklus zusammen. Neuere Arbeiten zeigen aber, dass eine Reihe von zellzyklusregulierenden Molekülen bifunktional agieren und oftmals über verschiedene Moleküldomänen sowohl den Zellzyklus als auch Differenzierungs- und Determinierungsvorgänge regulieren (Kroll *et al.*, 1998; McGarry und Kirschner, 1998; Ohnuma *et al.*, 1999; Zezula *et al.*, 2001). In einer Arbeit über die Entwicklung der Neuralplatte bei *Xenopus* konnte ebenfalls eine zellzyklusunabhängige, neuronfördernde Funktion des CDKI *p27Xic1* gezeigt werden (Vernon *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte jetzt zum ersten Mal für *Drosophila* dokumentiert werden, dass ein zellzyklusregulierendes Gen wie *CycE*, das in der Transition von der G1 zur S-Phase wirkt, wahrscheinlich unabhängig von seiner Funktion im Zellzyklus auch an der Determination von Zellschicksalen beteiligt ist. Wie bereits dargestellt, führt eine Funktionsverlustmutation von *CycE* zum Verlust der Neurone, wobei die Anzahl der Gliazellen gleich bleibt. Somit ist *CycE* notwendig für die Entwicklung der Neurone im NB6-4 Zellstammbaum. Jedoch ist das Zellschicksal Neuron nicht abhängig von der Zellteilung *per se*. In *CycE*-Funktionsverlustmutationen teilt sich der NB6-4t zwar, Neurone werden jedoch nicht

gebildet. Ist *CycE* jedoch präsent und aktiv, so werden Neurone generiert. Dies ist sogar in abdominalen NB6-4 der Fall, der normalerweise kein *CycE* exprimiert und niemals Neurone hervorbringt. Diese spezielle Funktion der Determination des Zellschicksals „Neuron“ von *CycE* wird durch andere Beobachtungen unterstützt: Zum einen kann *dE2F*, ein Gen, das im ZNS von *Drosophila* durch *CycE* aktiviert wird (Duronio *et al.*, 1998), ein Fehlen von *CycE* nicht kompensieren. Weiterhin zeigen *CycA*-Funktionsverlustmutationen (Zyclin der M-Phase), dass der NB6-4 sich zwar nur einmal teilt, in einem normalen Muster jedoch – eine neuronale und eine gliale Zelle entsteht (Akiyama-Oda *et al.*, 2000b und diese Arbeit). Letztlich wird in thorakalen Segmenten einer *string*-Funktionsverlustmutation nur der NB gebildet. Dieser teilt sich nicht und nimmt, obwohl sämtliche gliaspezifisierenden Faktoren wie beispielsweise *gcm*, *Pros* und *Hb* vorhanden sind, neuronales Schicksal an (Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Akiyama-Oda *et al.*, 2000a; Akiyama-Oda *et al.*, 2000b; Freeman und Doe, 2001). Dieser Effekt wird vermutlich von *CycE* erzielt, das wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in hohem Level im thorakalen NB6-4 exprimiert wird, jedoch nicht im abdominalen NB6-4. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass *CycE* notwendig und ausreichend ist, neuronales Schicksal im NB6-4 zu produzieren. Darüberhinaus ist diese Funktion unabhängig von der Zellzyklus regulierenden Funktion während der Transition der G1 zur S-Phase.

4.7. Homöotische Gene reprimieren die *CyclinE*-Expression, um tagmaspezifische NB6-4 Zellstammbäume zu erzeugen

Die Homöotischen Gene spezifizieren die Identitäten der Segmente. Funktionsverlustmutationen dieser Gene zeigen dementsprechend eine Transformation der betroffenen Segmente in die Identität eines anderen Segments. Dabei werden die Homöotischen Gene innerhalb eines genetischen Netzwerkes exprimiert, wobei weiter posterior exprimierte Gene die anterior exprimierten Gene reprimieren (Lewis, 1978; Sanchez-Herrero *et al.*, 1985a; Shimell *et al.*, 1994).

In einer früheren Arbeit durch Prokop und Technau (1994) konnte bereits gezeigt werden, dass die Homöotischen Gene auch einen direkten Einfluss auf die Ausbildung segmentspezifischer Neuroblastenzellstammbäume haben. Die Autoren konnten mithilfe von Transplantationsexperimente beobachten, dass die abdominale

Variante des NB1-1 abhängig von der Wirkung zweier Gene des *Bithorax*-Komplexes ist. Dies sind die Gene *Ultrabithorax (Ubx)* und *abdominal-A (abd-A)*. Mutationen in diesen beiden Genen führen zu einer Transformation des abdominalen in einen thorakalen Zellstammbaum. Umgekehrt hat die ektopische Expression eine Transformation des thorakalen in einen abdominalen Zellstammbaum zur Folge (Prokop und Technau, 1994). Ein genauerer Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen konnte zu dieser Zeit jedoch nicht gegeben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modellsystem NB6-4 benutzt um weitere Kenntnisse über diese Regulationen zu erlangen. Entsprechend den Ergebnissen für den NB1-1a konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der abdominalen Variante durch zwei *Bithorax*-Komplex Gene gezeigt werden. Dies waren jedoch die Gene *abd-A* für die Segmente A1 bis A6 und *Abdominal-B (Abd-B)* für die Segmente A7 und A8. Einen Einfluss von *Ubx* wurde nicht festgestellt. Eine Expression von *Ubx* wurde zu keinem Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung (bis Stadium 17) innerhalb des NB6-4 Zellstammbaums beschrieben. Dies war ungewöhnlich, da der NB6-4 zu den NBs gehört, die posterior im Segment liegen und somit in der Expressionsdomäne von *Ubx* (Irvine *et al.*, 1993). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die thorakale Variante des NB6-4 offensichtlich eine Art Grundidentität darstellt, die keinerlei Funktion Homöotischer Gene bedarf, da keine Transformationen in den thorakalen Segmenten beobachtet werden konnte. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Erkenntnissen, die zeigten, dass das Segment T2 eine Art Ursegment darstellt (zum Beispiel für die Epidermis und die adulten Anhänge) und alle anderen Identitäten über die Funktion zumindest eines Homöotischen Gens bestimmt werden (Carroll *et al.*, 1995; Lewis, 1978). Fraglich blieb jedoch, wie die Homöotischen Gene diese Unterschiede bewirken. Bisher war bekannt, dass Homöotischen Gene hauptsächlich eine reprimierende Funktion ausüben. So konnte zum Beispiel für die Spezifizierung der Haltere gezeigt werden, dass hier *Ubx* die Expression von *wingless* reprimiert, wodurch wiederum andere Genexpressionen reguliert werden, welche die morphologischen Unterschiede zwischen Haltere und Flügel ausmachen (Weatherbee *et al.*, 1998). Ähnliche reprimierende Mechanismen könnten auch zu unterschiedlichen tagmaspezifischen Eigenschaften im Nervensystem führen. Dass tatsächlich eine reprimierende Funktion im ZNS vorhanden ist, bewies die Regulation der Genexpression von *centrosomin*: Im ZNS wird die *centrosomin*-Expression von *Antennapedia* positiv und von *Ubx* und *abd-A* negativ reguliert (Heuer *et al.*, 1995).

Für die Tagmaspezifität des NB6-4 zeigte ich, dass *CycE* einer der entscheidenden Faktoren ist. Im Thorax wird *CycE* im NB6-4 exprimiert, wodurch neben dem segmental sich wiederholenden Anteil der Gliazellen auch Neurone entstehen. Im Abdomen wird *CycE* nicht exprimiert – Neurone sind also nicht vorhanden. Verlustmutationen sowie ektopische Expression von *CycE* zeigten, dass diese segmentalen Schicksale ähnlich einer Homöotischen Mutante transformiert werden können. Da diese Transformationen ebenfalls durch die Funktionsverlustmutationen von *abd-A* und *Abd-B* hervorgerufen wurden und diese beide Gene im abdominalen NB6-4 exprimiert werden, habe ich die Regulation von *CycE* in Abhängigkeit von *abd-A* untersucht. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass *Abd-A* das Zellzyklusgen *CycE* im Abdomen reprimiert. In *abd-A*-Funktionsverlustmutationen wird *CycE* im abdominalen NB6-4 exprimiert, während eine ektopische Expression von *abd-A* im thorakalen NB6-4 hier die *CycE*-Expression reprimiert. Da dies bereits starke Hinweise darauf waren, dass *Abd-A* *CycE* direkt reprimiert, wurde nach potenziellen Bindestellen für *Abd-A* in einem 6.45kb großen Enhancerbereich von *CycE* gesucht (siehe Anhang 7-1 und 7-2). Dieser Enhancerbereich beinhaltet ebenfalls eine ZNS-spezifische Regulationsdomäne (Jones *et al.*, 2000). Innerhalb dieses Bereiches wurden insgesamt 10 potenzielle Bindestellen für *Abd-A* gefunden, die alle die Sequenzen TTAATGG, TTAATGA, TTAATTG oder TTAATTA haben (Ekker *et al.*, 1991; Manak *et al.*, 1994). Durch den Genomvergleich mit *Drosophila pseudoobscura* zeigte sich, dass mindestens fünf dieser Bindestellen konserviert geblieben sind. Ebenso wurden Bindestellen für *Abd-B* gefunden. Somit ist *CycE* ein direktes Zielgen der Homöotischen Gene *abd-A* und *Abd-B*.

Durch Untersuchungen der *decapentaplegic*-Expression während der Mitteldarmentwicklung wurde für die Bindestelle von *Abd-A* mit der Sequenz TTAATGG eine reprimierende Funktion festgestellt (Manak *et al.*, 1994). Eben diese Bindestellenesequenz liegt innerhalb des Enhancerfragments, das für die ZNS-Expression verantwortlich ist (Anhang 7-1) und ist bei *Drosophila pseudoobscura* konserviert geblieben (Anhang 7-2).

Auch für Vertebraten wurden Mutationen gefunden, die in bestimmten *Hox*-Genen im Nervensystem nicht nur Transformationen hervorrufen, sondern auch einen Verlust an neuralen Geweben zur Folge haben (Carpenter, 2002). In der Entwicklung der Hämatopoietischen Stammzellen konnte sogar gezeigt werden, dass

in einer *Hoxb4*-Funktionsverlustmutante Zellzyklusgene differenziell exprimiert werden. So wird *p21* hoch reguliert (ein negativer Regulator) und *CycD* herunter (positiver Regulator, Brun *et al.*, 2004). Ob jedoch auch solche Regulationen bei der Entwicklung des Vertebraten ZNS eine Rolle spielen, muss durch zukünftige Experimente dargestellt werden. Der existierende Einfluss von Zellzyklusregulatoren auf die verschiedenen Zellschicksale im Vertebraten ZNS (zum Beispiel Cremisi *et al.*, 2003; Ohnuma *et al.*, 2001) stellt hier ein ideales Modellsystem dar, um diese Hypothese zu untersuchen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit gewährte neue, tiefe Einblicke in zwei fundamentale Vorgänge der frühen Neurogenese von *Drosophila melanogaster*. Der erste Teil untersuchte die zeitliche Spezifizierung der Neuroblastenidentitäten. Bisher wusste man, dass durch die Expression verschiedener Gene entlang der Dorsoventral- und der Anterioposteriorachse ein kartesisches Koordinatensystem aufgebaut wird, durch das ein NB, der in einem bestimmten Quadranten entsteht, eine spezifische Identität erhält. Die Delamination der NBs erfolgt in fünf Segregationswellen, wobei in jeder Welle die gleiche Population NBs gebildet wird.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es nicht nur einen räumlichen, sondern auch einen sehr wichtigen zeitlichen Aspekt bei der Entstehung von NBs gibt: So zeigten Transplantationsexperimente, dass sowohl im frühen als auch im späten Neuroektoderm extrinsische induktive Signale an der Spezifizierung der Neuroblastenidentität beteiligt sind. Die Natur dieser Signale bleibt noch unklar. Allerdings stellen die Segmentpolaritätsgene aufgrund ihrer dynamischen Expression eine potenzielle Kandidatengruppe dar. Hier müssen zukünftige Arbeiten deutlich machen, welche Proteine und Mechanismen für den zeitlichen Aspekt im Prozess der Neuroblastenspezifizierung verantwortlich sind.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der segmentalen Spezifizierung der Neuroblasten. Für diesen Prozess zeigten frühere Genexpressionsstudien, dass NBs, die zwar an korrespondierenden Positionen innerhalb des kartesischen Systems, aber in unterschiedlichen Segmenten gebildet werden, die gleichen Genexpressionsmuster aufweisen und fast identische Zellstammbäume hervorbringen.

Einige dieser seriell homologen NBs generieren jedoch segmentspezifische Zellstammbäume – ein solches Beispiel ist der NB6-4, der deshalb in dieser Arbeit als Modellsystem benutzt wurde. Für die thorakale Variante dieses NBs konnte ich zeigen, dass die Homöotischen Gene zur Spezifizierung nicht notwendig sind – thorakales Schicksal ist eine Grundidentität. Diese wird in abdominalen Segmenten jedoch durch die Funktion der Homöotischen Gene *abdominal-A* (*abd-A*) und *Abdominal-B* (*Abd-B*) in abdominales Schicksal transformiert. Dieser segmentale Unterschied wird durch die Regulation des Zellzyklusgens *CycE* bewerkstelligt.

Genauer: *CycE* ist notwendig, um neurogliales Schicksal in thorakalen Segmenten zu generieren und ausreichend, dieses Schicksal ebenfalls in abdominalen Segmenten zu erzeugen. Eine direkte Inhibierung der Expression von *CycE* durch Abd-A in abdominalen Segmenten führt dagegen zu einer differenziellen Expression von *CycE* im neuronalen thorakalen Anteil des Zellstammbaums. Weiterhin konnten in einem Enhancerelement, das für die Expression von *CycE* im Nervensystem verantwortlich ist, mehrere Bindestellen für Abd-A und Abd-B gefunden werden. Die gewonnenen Daten legen – in Verbindung mit bereits bekannten Ergebnissen – den Schluss nahe, dass diese neuronspezifisierende Funktion von *CycE* unabhängig von seiner Rolle im Zellzyklus ist.

Für die Zukunft wird wichtig sein, herauszufinden, welche nach geschalteten Faktoren von *CycE* das weitere Zellschicksal beeinflussen. Hierbei könnte die Mikroarray-Technik eine wichtige Rolle spielen. Mithilfe der *eg-Gal4*-Linie ist es möglich einzelne NBs auszusondieren, die RNA dieser Zellen zu amplifiziert und schließlich detaillierte Genexpressionsprofile zu erstellen. Werden NBs aus unterschiedlichen genetischen Hintergründen genommen (zum Beispiel *CycE*-Funktionsverlustmutanten im Vergleich zu wildtypischen Zellen), so ist es möglich spezifische Zielgene zu identifizieren und deren Rolle im Prozess der Zellspezifizierung weiter zu untersuchen. Diese Analysen würden somit weitere wichtige Beiträge zum Verständnis grundlegender entwicklungsbiologischer Fragen leisten.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, M. K. and Kaufman, T. C.** (1986). The relationship between the functional complexity and the molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **114**, 919-42.
- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. and Steller, H.** (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. and Hotta, Y.** (1999). Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*. *Development* **126**, 1967-74.
- Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S. and Oda, H.** (2000a). Distinct mechanisms triggering glial differentiation in *Drosophila* thoracic and abdominal neuroblasts 6-4. *Dev Biol* **222**, 429-39.
- Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S. and Oda, H.** (2000b). Mechanism of glia-neuron cell-fate switch in the *Drosophila* thoracic neuroblast 6-4 lineage. *Development* **127**, 3513-22.
- Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G. and Heintz, N.** (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* **41**, 881-90.
- Arendt, D. and Nubler-Jung, K.** (1999). Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development* **126**, 2309-25.
- Artavanis-Tsakonas, S., Delidakis, C. and 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. and Thompson Jr., J. N.** (1982). The Genetics and Biology of *Drosophila*. **V3b**, 1-59.
- Badenhorst, P.** (2001). Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **128**, 4093-101.
- Baines, R. A., Robinson, S. G., Fujioka, M., Jaynes, J. B. and Bate, M.** (1999). Postsynaptic expression of tetanus toxin light chain blocks synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **9**, 1267-1270.
- Beachy, P. A., Helfand, S. L. and Hogness, D. S.** (1985). Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *nature* **313**, 545-51.
- Berger, C., Urban, J. and Technau, G. M.** (2001). Stage-specific inductive signals in the *Drosophila* neuroectoderm control the temporal sequence of neuroblast specification. *Development* **128**, 3243-51.
- Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J. L. and Giangrande, A.** (1999). Gliogenesis depends on *glide/gcm* through asymmetric division of neuroglioblasts. *Dev Biol* **216**, 265-75.
- Bhat, K. M.** (1998). Cell-cell signaling during neurogenesis: some answers and many questions. *Int J Dev Biol* **42**, 127-39.

- Bhat, K. M.** (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* **21**, 472-85.
- Bhat, K. M. and Apse, N.** (2004). Upregulation of Mitimere and Nubbin acts through Cyclin E to confer self-renewing asymmetric division potential to neuronal precursor cells. *Development* **131**, 1123-1134.
- 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**, 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**, 41-64.
- Bourouis, M., Heitzler, P., ElMessal, M. and Simpson, P.** (1989). Mutant *Drosophila* embryos in which all cells adopt a neural fate. *nature* **341**, 442-444.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1995). Evolution of neuroblast identity: *seven-up* and *prospero* expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and *Schistocerca*. *Development* **121**, 3989-96.
- Brody, T. and Odenwald, W. F.** (2000). Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Dev Biol* **226**, 34-44.
- Brody, T. and Odenwald, W. F.** (2002). Cellular diversity in the developing nervous system: a temporal view from *Drosophila*. *Development* **129**, 3763-70.
- Brun, A. C., Bjornsson, J. M., Magnusson, M., Larsson, N., Leveen, P., Ehinger, M., Nilsson, E. and Karlsson, S.** (2004). *Hoxb4*-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* **103**, 4126-33.
- Buescher, M., Yeo, S. L., Udolph, G., Zavortink, M., Yang, X., Tear, G. and Chia, W.** (1998). Binary sibling neuronal cell fate decisions in the *Drosophila* embryonic central nervous system are nonstochastic and require *inscuteable*-mediated asymmetry of ganglion mother cells. *Genes Dev* **12**, 1858-70.
- Cabrera, C. V.** (1987). The expression of three members of the *achaete-scute* gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*. *Cell* **50**, 425-433.
- Campos-Ortega, J. A.** (1993). Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology* **24**, 1305-1327.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Campuzano, S. and Modolell, J.** (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends in Genetics* **8**, 202-208.
- Carpenter, E. M.** (2002). Hox genes and spinal cord development. *Dev Neurosci* **24**, 24-34.
- Carroll, S. B., Weatherbee, S. D. and Langeland, J. A.** (1995). Homeotic genes and the regulation and evolution of insect wing number. *nature* **375**, 58-61.

- Cepko, C. L.** (1999). The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 37-46.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B. D. and Dutta, A.** (1996). Cyclin-Binding Motifs Are Essential for the Function of *p21^{CIP1}*. *Mol Cell Biol* **16**, 4673-4682.
- Chu, H., Parras, C., White, K. and Jimenez, F.** (1998). Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by *vnd* in *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* **12**, 3613-24.
- Chu-LaGraff, Q. and Doe, C. Q.** (1993). Neuroblast specification and formation regulated by *wingless* in the *Drosophila* CNS. *Science* **261**, 1594-1597.
- Clegg, N. J., Whitehead, I. P., Williams, J. A., Spiegelman, G. B. and Grigliatti, T. A.** (1993). A developmental and molecular analysis of *cdc2* mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genome* **36**, 676-85.
- Cremisi, F., Philpott, A. and Ohnuma, S.** (2003). Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 26-33.
- de Nooij, J. C. and Hariharan, I. K.** (1995). Uncoupling cell fate determination from patterned cell division in the *Drosophila* eye. *Science* **270**, 983-5.
- de Nooij, J. C., Letendre, M. A. and Hariharan, I. K.** (1996). A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **87**, 1237-1247.
- Desphande, N., Dittrich, R., Technau, G. and Urban, J.** (2001). Successive specification of *Drosophila* NB6-4 and NB7-3 depends on interaction of the segment polarity genes *wingless*, *gooseberry* and *naked cuticle*. *Development* **128**, 3253-3261.
- 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**, 2515-25.
- Doe, C. Q.** (1992). The generation of neuronal diversity in the *Drosophila* embryonic central nervous system. In *Determinants of Neuronal Identity*, (ed. e. M. S. a. E. Macagno), pp. 119-154. Academic Press, New York.
- Doe, C. Q., ChuLaGraff, Q., Wright, D. M. and Scott, M. P.** (1991). The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* **65**, 451-464.
- Doe, C. Q. and Goodman, C. S.** (1985). Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Dev Biol* **111**, 206-19.
- Du, W. and Dyson, N.** (1999). The role of RBF in the introduction of G1 regulation during *Drosophila* embryogenesis. *Embo J* **18**, 916-25.
- Du, W., J.-E., X. and Dyson, N.** (1996). Ectopic expression of *dE2F* and *DP* induces cell proliferation and death in the *Drosophila* eye. *Embo J* **15**, 3684-3692.
- Durand, B. and Raff, M.** (2000). A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* **22**, 64-71.

- Duronio, R. J., Bonnette, P. C. and O'Farrell, P. H.** (1998). Mutations of the *Drosophila* *dDP*, *dE2F* and *cyclin E* genes reveal distinct roles for the *E2F-DP* transcription factor and *cyclin E* during the G1-S transition. *Mol Cell Biol* **18**, 141-51.
- Duronio, R. J. and O'Farrell, P. H.** (1995). Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Gen. & Dev.* **9**, 1456-1468.
- Duronio, R. J., O'Farrell, P. H., E.J., X., Brook, A. and Dyson, N.** (1995). The transcription factor *E2F* is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis. *Gen. & Dev.* **9**, 1445-1455.
- Dyer, M. A. and Cepko, C. L.** (2001). p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci* **21**, 4259-71.
- Dynlacht, B. D., Brook, A., Dembski, M., Yenush, L. and Dyson, N.** (1994a). DNA-binding and trans-activation properties of *Drosophila* E2F and DP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6359-63.
- Dynlacht, B. D., Flores, O., Lees, J. A. and Harlow, E.** (1994b). Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* **8**, 1772-86.
- Ebens, A. J., Garren, H., Cheyette, B. N. and Zipursky, S. L.** (1993). The *Drosophila* *anachronism* locus: a glycoprotein secreted by glia inhibits neuroblast proliferation. *Cell* **74**, 15-27.
- Edgar, B. A., Lehman, D. A. and O'Farrell, P. H.** (1994). Transcriptional regulation of *string* (*cdc25*): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development* **120**, 3131-43.
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 177-187.
- Edlund, T. and Jessell, T. M.** (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-24.
- Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U. and Reichert, H.** (2002). Gliogenesis in *Drosophila*: genome-wide analysis of downstream genes of *glial cells missing* in the embryonic nervous system. *Development* **129**, 3295-309.
- Ekker, S. C., Young, K. E., von Kessler, D. P. and Beachy, P. A.** (1991). Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *Embo J* **10**, 1179-86.
- Filippov, V., Filippova, M., Sehnal, F. and Gill, S. S.** (2000). Temporal and spatial expression of the cell-cycle regulator *cul-1* in *Drosophila* and its stimulation by radiation-induced apoptosis. *J Exp Biol* **203 Pt 18**, 2747-56.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**, 1-22.
- Frantz, G. D. and McConnell, S. K.** (1996). Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* **17**, 55-61.
- 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**, 4103-12.

- Fuerstenberg, S., Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1998). Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 379-383.
- Goodman, C. S. and Doe, C. Q.** (1993). Embryonic development of the *Drosophila* nervous system. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol. II (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1131-1206. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gould, A. P., Brookman, J. J., Strutt, D. I. and White, R. A. H.** (1990). Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *nature* **348**, 308-312.
- Graba, Y., Aragnol, D., Laurenti, P., Garazzino, V., Charmont, D., Berenger, H. and Pradel, J.** (1992). Homeotic control in *Drosophila*: the *scabrous* gene is an *in vivo* target of *Ultrabithorax* proteins. *Embo J* **11**, 3375-3384.
- Halpern, M. E., Chiba, A., Johansen, J. and Keshishian, H.** (1991). Growth cone behavior underlying the development of stereotypic synaptic connections in *Drosophila* embryos. *Journal of Neuroscience* **11**, 3227-3238.
- 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**, 317-332.
- Harper, W. J., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-Interacting protein Cip1 is a potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Harris, W. A.** (1997). Cellular diversification in the vertebrate retina. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 651-8.
- Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J. A.** (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* **193**, 308-325.
- Hartenstein, V., Younossi-Hartenstein, A. and Lekven, A.** (1994). Delamination and division in the *Drosophila* neuroectoderm: spatiotemporal pattern, cytoskeletal dynamics, and common control by neurogenic and segment polarity genes. *Developmental Biology* **165**, 480-499.
- Hayashi, S.** (1996). A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development* **122**, 1051-1058.
- 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**, 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**, 527-36.
- Hirth, F., Hartmann, B. and Reichert, H.** (1998). Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* **125**, 1579-89.
- Honma, Y., Kiyosawa, H., Mori, T., Oguri, A., Nikaido, T., Kanazawa, K., Tojo, M., Takeda, J., Tanno, Y., Yokoya, S. et al.** (1999). Eos: a novel member of the Ikaros gene family expressed predominantly in the developing nervous system. *FEBS Lett* **447**, 76-80.

- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. and Hotta, Y.** (1995). *glial cells missing*: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* **82**, 1025-1036.
- 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**, 625-9.
- Irvine, K. D., Botas, J., Jha, S., Mann, R. S. and Hogness, D. S.** (1993). Negative autoregulation by Ultrabithorax controls the level and pattern of its expression. *Development* **117**, 387-99.
- 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**, 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**, 3099-109.
- Jacobs, R. J. and Goodman, C. S.** (1989). Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *Journal of Neuroscience* **9**, 2402-2411.
- Jiménez, F. and Campos-Ortega, J. A.** (1981). A cell arrangement specific to thoracic ganglia in the CNS of the *Drosophila* embryo: Its Behaviour in Homeotic Mutants. *Roux's Arch Dev Biol* **190**, 370-373.
- Jones, B. W., Abeysekera, M., Galinska, J. and Jolicoeur, E. M.** (2004). Transcriptional control of glial and blood cell development in *Drosophila*: cis-regulatory elements of *glial cells missing*. *Dev Biol* **266**, 374-87.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S.** (1995). *glial cells missing*: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* **82**, 1013-23.
- Jones, L., Richardson, H. and Saint, R.** (2000). Tissue-specific regulation of *cyclin E* transcription during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Development* **127**, 4619-30.
- 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**, 246-60.
- Karch, F., Weiffenbach, B., Peifer, M., Bender, W., Duncan, I., Celniker, S., Crosby, M. and Lewis, E. B.** (1985). The abdominal region of the bithorax complex. *Cell* **43**, 81-96.
- Klämbt, C., Jacobs, J. R. and Goodman, C. S.** (1991). The midline of the *Drosophila* central nervous system: A model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* **64**, 801-815.
- Knoblich, J. A. and Lehner, C. F.** (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *Embo J* **12**, 65-74.
- 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**, 107-20.

- Kroll, K. L., Salic, A. N., Evans, L. M. and Kirschner, M. W.** (1998). Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* **125**, 3247-58.
- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F. and Vaessin, H.** (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87**, 1225-35.
- Lehmann, R., Dietrich, U., Jimenez, F. and CamposOrtega, J. A.** (1981). Mutations of early neurogenesis in *Drosophila*. *Roux's Archives of Developmental Biology* **190**, 226-229.
- Lehner, C. F. and O'Farrell, P. H.** (1989). Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell* **56**, 957-68.
- Levine, E. M., Close, J., Fero, M., Ostrovsky, A. and Reh, T. A.** (2000). p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev Biol* **219**, 299-314.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *nature* **276**, 565-570.
- Li, L. and Vaessin, H.** (2000). Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* **14**, 147-51.
- Li, Q. J., Pazdera, T. M. and Minden, J. S.** (1999). *Drosophila* embryonic pattern repair: how embryos respond to *cyclin E*-induced ectopic division. *Development* **126**, 2299-307.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, San Diego, C.A.*
- Löhr, R., Godenschwege, T., Buchner, E. and Prokop, A.** (2002). Compartmentalization of central neurons in *Drosophila*: a new strategy of mosaic analysis reveals localization of presynaptic sites to specific segments of neurites. *J Neurosci* **22**, 10357-67.
- Luer, K. and Technau, G. M.** (1992). Primary culture of single ectodermal precursors of *Drosophila* reveals a dorsoventral prepattern of intrinsic neurogenic and epidermogenic capabilities at the early gastrula stage. *Development* **116**, 377-85.
- Mahaffey, J. W. and Kaufman, T. C.** (1987). Distribution of the *Sex combs reduced* gene products in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **117**, 51-60.
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. and Gotz, M.** (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* **37**, 751-64.
- Malicki, J.** (2004). Cell fate decisions and patterning in the vertebrate retina: the importance of timing, asymmetry, polarity and waves. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 15-21.
- Manak, J. R., Mathies, L. D. and Scott, M. P.** (1994). Regulation of a *decapentaplegic* midgut enhancer by homeotic proteins. *Development* **120**, 3605-19.
- Martin-Bermudo, M. D., Martinez, A., Rodriguez, A. and Jimenez, J.** (1991). Distribution and function of the *lethal of scute* gene product during early neurogenesis in *Drosophila*. *Development* **113**, 445-454.

- Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H. and Izumi, H.** (1998). *miranda* localizes *staufen* and *prospero* asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* **125**, 4089-98.
- McConnell, S. K. and Kaznowski, C. E.** (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* **254**, 282-5.
- 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**, 3603-12.
- McGarry, T. J. and Kirschner, M. W.** (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**, 1043-53.
- Moberg, K. H., Bell, D. W., Wahrer, D. C., Haber, D. A. and Hariharan, I. K.** (2001). Archipelago regulates *Cyclin E* levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *nature* **413**, 311-6.
- Murray, A.** (1995). Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* **81**, 149-52.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T.** (1991). The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**, 1157-67.
- 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.
- Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K. C., Philpott, A. and Harris, W. A.** (2002). Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* **129**, 2435-46.
- Ohnuma, S., Philpott, A. and Harris, W. A.** (2001). Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 66-73.
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C. E. and Harris, W. A.** (1999). *p27Xic1*, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glia cells in *Xenopus* retina. *Cell* **99**, 499-510.
- Ou, C. Y., Lin, Y. F., Chen, Y. J. and Chien, C. T.** (2002). Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev* **16**, 2403-14.
- Park, Y., Caldwell, M. C. and Datta, S.** (1997). Mutation of the central nervous system neuroblast proliferation repressor *ana* leads to defects in larval olfactory behavior. *J Neurobiol* **33**, 199-211.
- Parnavelas, J. G. and Nadarajah, B.** (2001). Radial glial cells. are they really glia? *Neuron* **31**, 881-4.
- Pearson, B. J. and Doe, C. Q.** (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *nature* **425**, 624-8.
- Poulson, D. F.** (1950). Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* Meigen. In *Biology of Drosophila*, (ed. M. Demerec), pp. 168-274. New York: Wiley.

- Prokop, A., Bray, S., Harrison, E. and Technau, G.** (1998). Homeotic regulation of segment-specific differences in neuroblast numbers and proliferation in the *Drosophila* central nervous system. *Mech. Dev.* **74**, 99-110.
- Prokop, A. and Technau, G. M.** (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development* **111**, 79-88.
- Prokop, A. and Technau, G. M.** (1993). Cell transplantation. In *Cellular interactions in development*, (ed. D. A. Hartley), pp. 33-58. Oxford, New York, Tokio: IRL Press.
- Prokop, A. and Technau, G. M.** (1994). Early tagma-specific commitment of *Drosophila* CNS progenitor NB1-1. *Development* **120**, 2567-78.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A. and Temple, S.** (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* **28**, 69-80.
- Ragone, G., Bernardoni, R. and Giangrande, A.** (2001). A novel mode of asymmetric division identifies the fly neuroglioblast 6-4T. *Dev Biol* **235**, 74-85.
- Richardson, H. E., O'Keefe, L. V., Reed, S. I. and Saint, R.** (1993). A *Drosophila* G₁-specific cyclin E homolog exhibits different modes of expression during embryogenesis. *Development* **119**, 673-690.
- Romani, S., Campuzano, S. and Modolell, J.** (1987). The *achaete-scute* complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos. *EMBO Journal* **6**, 2085-2092.
- 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**, 108-113.
- 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**, 186-204.
- Seugnet, L., Simpson, P. and Haenlin, M.** (1997). Transcriptional regulation of *Notch* and *Delta*: requirement for neuroblast segregation in *Drosophila*. *Development* **124**, 2015-2025.
- 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**, 968-71.
- Skeath, J. B.** (1998). The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **125**, 3301-12.
- Skeath, J. B.** (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* **21**, 922-31.
- Skeath, J. B. and Doe, C. Q.** (1996). The *achaete-scute* complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the *Drosophila* CNS. *Curr Biol* **6**, 1146-52.

- Skeath, J. B., Panganiban, G., Selegue, J. and Carroll, S. B.** (1992). Gene regulation in two dimensions: the proneural *achaete* and *scute* genes are controlled by combinations of axis-patterning genes through a common intergenic control region. *Genes Dev* **6**, 2606-19.
- Skeath, J. B., Panganiban, G. F. and Carroll, S. B.** (1994). The *ventral nervous system defective* gene controls proneural gene expression at two distinct steps during neuroblast formation in *Drosophila*. *Development* **120**, 1517-24.
- Skeath, J. B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S. B. and Doe, C. Q.** (1995). Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by *gooseberry-distal*. *nature* **376**, 427-30.
- Struhl, G. and Brower, D.** (1982). Early role of the *esc+* gene product in the determination of segments in *Drosophila*. *Cell* **31**, 285-92.
- Stüttem, I. and CamposOrtega, J. A.** (1991). Cell commitment and cell interactions in the ectoderm of *Drosophila melanogaster*. *Development (Suppl.)* **2**, 39-46.
- Sun, L., Liu, A. and Georgopoulos, K.** (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J* **15**, 5358-69.
- Technau, G. and Campos-Ortega, J. A.** (1985). Fate-mapping in wildtype *Drosophila melanogaster*. II. Injection of horseradish peroxidase in cells of the early gastrula stage. *Roux's Arch Dev Biol* **194**, 196-212.
- Technau, G. M.** (1986). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*: I. The method. *Roux's Arch Dev Biol* **195**, 389-398.
- Technau, G. M., Becker, T. and CamposOrtega, J. A.** (1988). Reversible commitment of neural and epidermal progenitor cells during embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology* **197**, 413-418.
- Technau, G. M. and Campos-Ortega, J. A.** (1986). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*: II. Commitment and proliferative capabilities of neural and epidermal cell progenitors. *Roux's Arch Dev Biol* **195**, 445-454.
- 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**, 4500-4.
- Thomas, J. B., Bastiani, M. J., Bate, C. M. and Goodman, C. S.** (1984). From grasshopper to *Drosophila*: A common plan for neuronal development. *nature* **310**, 203-207.
- Tio, M., Udolph, G., Yang, X. and Chia, W.** (2001). *cdc2* links the *Drosophila* cell cycle and asymmetric division machineries. *nature* **409**, 1063-7.
- Udolph, G., Luer, K., Bossing, T. and Technau, G. M.** (1995). Commitment of CNS progenitors along the dorsoventral axis of *Drosophila* neuroectoderm. *Science* **269**, 1278-81.
- Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. and Technau, G. M.** (1993). A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. *Development* **118**, 765-75.
- 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**, 1457-66.

- Udolph, G., Urban, J., Rusing, G., Luer, K. and Technau, G. M.** (1998). Differential effects of EGF receptor signalling on neuroblast lineages along the dorsoventral axis of the *Drosophila* CNS. *Development* **125**, 3292-3299.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2003). Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**, 3621-3637.
- Vernon, A. E., Devine, C. and Philpott, A.** (2003). The cdk inhibitor *p27Xic1* is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. *Development* **130**, 85-92.
- Verrijzer, C. P. and Van der Vliet, P. C.** (1993). POU domain transcription factors. *Biochim Biophys Acta* **1173**, 1-21.
- Vincent, S., Vonesch, J.-L. and Giangrande, A.** (1996). *glide* directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* **122**, 131-139.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schafer, U. and Jackle, H.** (2002). *Perlecan* participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev Dyn* **224**, 403-12.
- Wai, P., Truong, B. and Bhat, K. M.** (1999). Cell division genes promote asymmetric interaction between Numb and Notch in the *Drosophila* CNS. *Development* **126**, 2759-70.
- 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**, 147-72.
- Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A. and Carroll, S.** (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev* **12**, 1474-82.
- 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**, 3591-602.
- Zezula, J., Casaccia-Bonnel, P., Ezhevsky, S. A., Osterhout, D. J., Levine, J. M., Dowdy, S. F., Chao, M. V. and Koff, A.** (2001). *p21cip1* is required for the differentiation of oligodendrocytes independently of cell cycle withdrawal. *EMBO Rep* **2** (1), 27-34.

7. Anhang

Auflistung der Experimente

Die Rekombination der mutanten Fliegenstämme und der *sca*-Gal4-Linie mit der *eg-lacZ*-Linie wurde von Mohit Prasad in Hyderabad durchgeführt.

CycE^{AR95}; *eg-lacZ*

dap⁴⁴⁵⁴; *eg-lacZ*

cdc2^{B47}; *eg-lacZ*

sca-Gal4; *eg-lacZ*

gcm-FISH und Pros-Färbungen an *CycE^{AR95}-*, *dap⁴⁴⁵⁴-*, *cdc2^{B47}-*, *CycE⁺⁺⁺-*, *dE2F⁺⁺⁺-*, *p21⁺⁺⁺-* und *Rbf⁺⁺⁺-* Embryonen wurden in Hyderabad durchgeführt. Teilweise von Christian Berger während eines 4-wöchigen Aufenthaltes (Januar 2002), oder von Pallavi Kshetrapal oder Mohit Prasad.

Alle anderen, hier nicht aufgelisteten Experimente wurden in Mainz durchgeführt.

Die Auswertung aller Experimente erfolgt in Mainz.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1-1:	Die <i>Drosophila</i> Anlagenkarte - Neuroblastenbildung und –stammbaumentwicklung.	3
Abb. 1-2:	Die Neuroblastenkarte nach Doe (1992) und Broadus und Doe (1995).	4
Abb. 1-3:	Neuroblastenbildung, -positionierung im Embryo und –spezifizierung.	6
Abb. 1-4:	Die embryonalen NBs von <i>Drosophila</i> sind serielle Homologe.	10
Abb. 1-5:	Einige Neuroblasten generieren segmentspezifische Zellstammbäume.	11
Abb. 2-1:	Das UAS/Gal4-System zur ektopischen Expression eines GenX in <i>Drosophila</i> nach Brand und Perrimon (1993).	22
Abb. 2-2:	Vorbereitung der Embryonen für mikromanipulative Experimente.	32
Abb. 2-3:	Die Einzelzelltransplantationsmethode.	34
Abb. 2-4:	Die Dil-Markierung neuroektodermaler Zellen.	35
Abb. 2-5:	Weiterbehandlung der Embryonen nach mikromanipulativen Experimenten.	37
Abb. 3-1:	Räumliche Anordnung und zeitliche Abfolge (S1-S5) der segregierenden Neuroblasten.	40
Abb. 3-2:	Die Transplantationsexperimente des Abschnitts 3.A.	41
Abb. 3-3:	Neuroektodermalzellen von Spenderembryonen im Stadium 10 können nach heterochroner Transplantation in Empfängerembryonen des Stadium 7 frühes Neuroblastenschicksal annehmen.	42
Abb. 3-4:	Neuroektodermalzellen von Spenderembryonen im Stadium 7 können nach heterochroner Transplantation in Empfängerembryonen des Stadium 10 spätes (B., E. und F.) oder frühes Neuroblastenschicksal (A.) annehmen.	44
Abb. 3-5:	Spätes Neuroblastenschicksal bedarf keiner vorherigen postblastodermalen Teilung (epidermaler Schwesterklon) um spezifiziert zu werden.	49
Abb. 3-6:	Der NB6-4 als Modellsystem.	52
Abb. 3-7:	Eagle markiert alle Zellen des NB6-4.	54
Abb. 3-8:	Die Expression der Marker <i>glial cell missing (gcm)</i> , Prospero (Pros) und Reversed-polarity (Repo) im wildtypischen Zellstammbaum des NB6-4.	56
Abb. 3-9:	Die Bildung der Gliazellen im NB6-4 ist abhängig von <i>prospero</i> .	58
Abb. 3-10:	Wildtypische Expression von <i>hunchback</i> und <i>pdm-1</i> im NB6-4.	60
Abb. 3-11:	<i>Antennapedia</i> bestimmt keine Tagmaidentität im NB6-4.	63
Abb. 3-12:	<i>Ultrabithorax</i> ist nicht im NB6-4 exprimiert.	65
Abb. 3-13:	Die abdominale Identität des NB6-4 wird durch die Funktion von <i>abdominal-A</i> und <i>Abdominal-B</i> bestimmt.	66
Abb. 3-14:	Andere Homöotischen Funktionsverlustmutanten, die ebenfalls eine Transformation des NB6-4a in einen thorakalen Neuroglioblasten zeigen.	68
Abb. 3-15:	Der Zellzyklus und einige Zellzyklusregulatoren.	70
Abb. 3-16:	Eine zygotische <i>CycE</i> ^{AR95} -Funktionsverlustmutation zeigt eine Transformation des thorakalen NB6-4 Zellstammbaums in einen abdominalen Zellstammbaum.	73
Abb. 3-17:	Ektopische Expression von <i>CycE</i> in abdominalen Segmenten ist ausreichend, den NB6-4a in einen thorakalen Neuroglioblasten zu transformieren.	76
Abb. 3-18:	Nach ektopischer Expression von <i>CycE</i> bestätigt die Expression von Hunchback die Transformation des NB6-4a in einen thorakalen Neuroglioblasten.	77

Abb. 3-19:	Die transformierende Funktion von <i>CycE</i> im NB6-4a ist zellautonom.	78
Abb. 3-20:	Andere Neuroblastenzellklone zeigen ebenfalls Transformationen nach ektopischer Expression von <i>CycE</i> .	81
Abb. 3-21:	Viele Neuroblastenzellklone zeigen keine Transformationen nach ektopischer Expression von <i>CycE</i> und haben wildtypische Phänotypen.	82
Abb. 3-22:	Färbungen gegen Even-skipped (<i>Eve</i>) und FasziklinII (<i>FasII</i>) in Embryonen, die <i>CycE</i> , <i>string</i> oder <i>CycE</i> und <i>string</i> exprimieren.	85
Abb. 3-23:	Nach ektopischer Koexpression von <i>CycE</i> und <i>string</i> zeigt der Neuroblastenzellklon des NB1-1a eine Duplikation der aCC und pCC Neurone.	87
Abb. 3-24:	Nach ektopischer Koexpression von <i>CycE</i> und <i>string</i> zeigen einige Neuroblastenzellklone eine Duplikation der ersten Gangliennutterzelle.	89
Abb. 3-25:	Durch ektopische Koexpression von <i>CycE</i> und <i>string</i> zusätzlich entstandene Zellen werden im Stadium 16 durch Apoptose entfernt.	90
Abb. 3-26:	Expression von <i>CycE</i> im NB6-4.	92
Abb. 3-27:	Einfluss von <i>dacapo/p21</i> auf den NB6-4.	95
Abb. 3-28:	Neuroblastenzellklone nach Dil-Markierung neuroektodermaler Zellen in einer <i>dap</i> ⁴⁴⁵⁴ -Funktionsverlustmutation.	98
Abb. 3-29:	<i>dE2F</i> als S-Phase Faktor zeigt abgeschwächtere Effekte im NB6-4.	100
Abb. 3-30:	Ektopische Expression von <i>Rbf</i> führt zu verminderter Neuronenanzahl im thorakalen NB6-4.	101
Abb. 3-31:	Die Manipulation der G2-M-Transition hat keinen Effekt auf das NB6-4 Zellschicksal.	103
Abb. 3-32:	<i>Archipelago</i> reguliert die Proliferation der abdominalen Glia im NB6-4a.	106
Abb. 3-33:	<i>Cullin</i> -Gene sind auch an der Proliferationskontrolle der NB6-4 Gliazellen beteiligt.	107
Abb. 3-34:	Abdominal-A reprimiert <i>CycE</i> im abdominal NB6-4a.	109
Abb. 3-35:	Eine Doppelfunktionsverlustmutation für <i>CycE</i> und <i>abd-A</i> zeigt die epistatische Interaktion der beiden Gene.	110
Abb. 3-36:	Genomische Region des Gens <i>CycE</i> .	111
Tab. 2-1:	Fliegenstämme dieser Arbeit.	20
Tab. 2-2:	Verwendete Antikörper dieser Arbeit.	24
Tab. 3-1:	Neurale und epidermale Zellklone nach Transplantation ektodermaler Zellen.	43
Tab. 3-2:	Identitäten der Neuroblastenklone nach Transplantation ektodermaler Zellen.	46
Tab. 3-3:	Späte Neuroblastenklone mit oder ohne epidermalen Schwesterklon.	48
Tab. 3-4:	Transplantations- und Dil-Markierungsexperiment in <i>CycE</i> ⁺⁺ Embryonen.	79
Tab. 3-5:	Transplantations- und Dil-Markierungsexperiment in <i>CycE</i> , <i>stg</i> ⁺⁺ Embryonen.	88
Tab. 3-6:	Transplantations- und Dil-Markierungsexperiment in Embryonen einer <i>dap</i> ⁴⁴⁵⁴ -Funktionsverlustmutation.	97

Abkürzungsverzeichnis

A1-A8	Abdominalsegmente eins bis acht
Abb.	Abbildung
aCC	anterior corner cell
aHS	abdominales Hemisegment
AP	anterioposterior
AP-Färbung	alkalische Phosphatasefärbung
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DABT	3,3'-Diaminobenzidin in Tris-HCl gelöst
BCIP	X-Phosphat; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
DEPC-H ₂ O	mit Diethylcarbonat behandeltes Wasser
DIG	Digoxigenin-markierte
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanidperchlorat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
DV	dorsoventral
bzgl.	bezüglich
et al.	und weitere
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Exp.	Experiment
FISH	Fluoreszenz <i>in-Situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
G1-G3	Gnathalsegmente eins bis drei
Gal	Galaktosidase
GB	Glioblast
GenX++-	ektopisch GenX exprimierende Embryonen
GFP	Green Fluorescence Protein
GMZ	Ganglienmutterzelle
HRP	horse redish peroxidase (Merrettichperoxidase)
LGB	longitudinaler Glioblast
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mykroliter
mm	Millimeter
M	Molar
M-CBG	medial cell body glia
MM-CBG	medial most cell body glia
ML	Mittellinie
MP	midline precursor (zum Beispiel MP2)
n	Anzahl
NB	Neuroblast
NEZ	Neuroektodermalzellen, neuroektodermale Zellen
NGB	Neuroglioblast
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
pCC	posterior corner cell
pNR	procephale neurogene Region
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S1-S5	Segregationswelle 1 bis 5
St	Stadium
ssDNA	singlestranded DNA, Herringssperma-DNA

T1-T3	Thorakalsegmente eins bis drei
Tab.	Tabelle
tHS	thorakales Hemisegment
UAS	upstream activating sequence
UTP	Uridintriphosphat
vNR	ventrale neurogene Region
vNS	ventrales Nervensystem, Bauchmark
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Anhang 7-1: Ein 8kb große DNA-Fragment, mit 6.45kb großem Enhancer-Fragment (grün, beinhaltet den ZNS-spezifischen Enhancer (Jones *et al.*, 2000), siehe Abb. 3-36), vor den Exons1 und 2 (türkis unterlegt) des zygotischen *CycE* zeigt potentielle Bindungsstellen für Abd-A (rot) und Abd-B (magenta). Mit Blau ist die CAT-Box des Promotorbereichs markiert.

```

TAATTTAAACATAAAAGCCAGACACAGCGCAGATAAGTTTTATGAATGAAG
TGCTTTATCATGTGCATGTGACCTCGTTGATTTTTGCAATCTTATCAGGGA
AATGGCAAGAGGCATTCTGGCATTCTAGGAAGCCGATGATTAGCTCTAGT
GTGTTTCAAAAAGTGCCTATGCATTTGAAAATAATTTAAATGTTTCTATTT
AACGAACTCTTGAACCTCTGGGAATTCTCTGTTCTCTAAAATTCTCGTCGAT
CAGTGATTGCCACTTTCATTTTAGCCTAAATAAGAACTTATTAATTTAAT
CTAATAATTGAAGTTAGGCTGTTTATAAGCTCAAAGATTTATTTCCAAG
CTGAATAATCTGATTTGCTTGTGAACTCTGTTAATAATAAATGTAATTT
TGAGATTATAACTAAACAATGTACATACATATTTGAACCGTGCAGGTGAT
ATTTCTTTTTGAAATTTGAGCAATAGCCATTTTATATATTTATCTATTTGA
TTATAGTTTTCCCAATTTGTTTTCAATTGATCAGCGATCGCTAAACAATTTCTC
CATTTTTATTATTTATGTTTGGCAAACGATCTTTTTATTTGTAAGTTTCTTG
GAATGGACAGCCCTTTGGTGGCTTCCACTCGTTTGGCTGCCGATCTTCAT
TTGATCTTTTCGCTGCTTGAGTTTTGGCCAAATAAGCCGTTGAGCAGGTAG
ACAGCTACTTCTTGGCACTTTTGGCGGGCACAATGCAAAGATGAGCCCA
AAAATAAACGCTACTTACTGAAAAGGGCTCATTTAGCAGCATCCTTGGAA
GCCTTGAAGTCAGATCTCCTCTCAAGTAGCTGCAATCAAGGCGGAGAAACA
ATGCTTCTCTCATCTCCTGGCGGCTCCTCACGATGGGCAGCTGTGTT
GGTGCAAAGGATTTTTTCTCCAGTGCCATATGAAATATGTATGTAGGGG
AGAGAAATTTCTCCTATACGTGCAATGAACTTGCAGAAATGTTTTCTTG
TTTGATAGTTTTGGTACCCTCTAGATGGGTATCTTTATCTTTGCAAGATTA
TGAATATCTATAAGTTTTTCATATATTAATCTTAGGCATGTTAAAAGGAC
TGTTTTAGAATCAGCATATCTTATTTGATAAAGTGGAAATATAGAAATTT
ATATTTTTATAAGGTGCCTTGGTTTGTACTGAGAATATATCTGTAATTT
AAAATGTAGTGACCAGGTATACAAAACAGTCTGTTGCCAAACAATGATA
TCTGCCTTGGTTATTTTTTTTTGCTGTTTTTTTTTTGAGTTTTTTGTTTTT
GCAATGGTTTTTGGCCTGCTTCCGTGCCAAACAATGTCAATCTGGTAC
GAAAAAAGTGGATGGCAAGGAAATGTCTGGCCCCCTCAGGCGAATTTT
GTTGAGTAAGGGAATTTCCCGAAGGGGTCTTTGGCAGTATGCCGAGCATA
TGCATGCCAGGACAAGGAGCCGACCAGAAGCAGGCGCAGGAGCAGGAG
ACGCAGAACAAAGGACAGAAGGCGTCTGTTGCGCATGCGCGCACACCTTGAG
TCCAAGTCCGAGTTCTCCAGGGTGGGTTTTTTCCAAAAGTCAAGGCGTCCG
GCAAAATGTCCGTTAGGGCCGTGGTAAGAATTTGAAATTTGCGATAGTTATA
GGTTAGCTTGAGGACAGAAGAACTAGATCAAGACAGTTTAAAGGATTTGGCA
TCGGGATGGGGGACGGTGATGGGTAAGGGATCGTGGTACTACCGGAAT
GGACAGAGCTGAAACCGCAACACACGAACGAACCGCAGGAGGGTTGAG
CAACGCCTTATCCTTTTCAAGGATCACTGGGCCGAGTTTTTCCCTTTTCT
TTTCGTCTCTAATTAAATATATTCATCGAGACGACATTTGCTTCTGCAGAA
ATTCGGAGCATAACAAAAAAATTTCTTTCCAATCGGGTTGCATTTTGCTA
CCCCGTTTCCGGGACATGTTATCCTTATGCAAAATGCCTTGGCCGATCTGC
GACGTCTGCTCATTAGATTTCCGTTAAACTTTTATGCAAAATCATCAGGCT
TTTCCTTCTTAAACTCTTGTGTATCTGCTTTTCCGGGACACGGAGAACG
CGTCTGCATCGGAATGCGGTCTTGAATATTTATACAATATTTGTTTTGCT
CTGGCACAGGATCAAAATATGTTATTTATTTTACCAATTTGTCTGTA
ATGTAAACCCCTTTTTCTTACTCCTTACATGGCAGGCATGAAATCGCCGA
AAGTTCCTTGTATTTTTTTTTTTTTGGGAAACTTCTTTGTTTCTTTTGTC
CCGAAAAGGGGAGTTGGGTTTGCCTTTCGCTCGGGTTTCTTTTCGATGCAA
TCAAGTGTGGGTCTTGATTTCTGTCAAGTCAGTATCGGGATATTGTGGGA
AACTGAATTCAGTTTCACTTTCCAGATTGCATCCCGATTTGGGATCAT
GCGTCGCCTGCTTTGTAATTCAAAGTTTTCTTTTTTCATTTTACAGAGGA
TTTTATTTAGCTGGAGGTAACAAGAGATAATGGTAAACTTTGGGCAGCGA
TCTGTTTTTCAGAATAATTACATTAAAGATTTCGACTGATAAGAAACTAGTTT
TTGAGCAGATAAATTTAAAAGGTAAATTTATAGATAAAAACAGGGGAAAAC
GTAATTTGAGTAAATATATCAAGAGATATTCAATTTATTAAGGCTTACAC
CTAAGAAGTTGGCATATCCCCTAAAGAAAATTTGCTTTCTGACAATTTAA
TCAAAATTTCTTTTTCGCATTTCAAAATTCATTCGCGGTTTTGCTTTTGTG
CACTTACCCTCCCTCCGTTTCCCAATGTGATATGCTTTAATTCGTTTTG
TCATGGATCTAACCAATTGCATGATAAATTTCATGTTCCCAAGCAATTTCAA
CGTCCCCCTGACCCACCGAATTTTCCATTTTCCGCGATGATAAAACCAGC
AATGTCCACCGCAAAGTGTGTGTTGGATTAACCCCTTTCTGGACTGACCA
GGGGTCAGTTGAAATGGTTTGAATATGAGTGTTTGTTATGGTCCCTFCGG
GGATTTGTCCACTGGCATGTTGTTTGCATATCATTTATTTAAAGCAGAGC
AGCAGCGATGTCCCAAAAAGTAGACAGGACTTTAGCTAATTTTGAACGAT
CATCAGACTTTTTATGAGTCTTTCATGAAAAATGAAATATCTGAAGAAAA
ACCTCTAGCTTGATCTGAATTTCAAGAAAATCATAATCTTTTCAAACCTG

```

TAAAAATATTAACAACTACCGCACATTGTAGTATGAAATTAATGTTATC
AAAGACTTGGGGGAGAATTGAAAAAAAAAGAAAAAACTGTAAGAAAAG
AAAAATAAATGGAAACAACAATGCAGCATATTACACGAAAAACAGCGGTGA
AAAAGTTACACCTGGACCCACGCCAAGGTCTGAAAACATAAGGCTGTTTCG
GTTTCGAGCAGACGGCCGTGAAAGATTACGACACATAAGCGCAGGACTT
TATAGGGTAGGCGAAAAGGAGAGGGAGAGCGACACAATGGGGCACCAGGA
CATCGAGTATTGAGGTGCGCGACGCAGCAGAGGTTGTGCGCTAACCAATCG
AATTGCTTCTGTCTGCTTTCTGTATGTACCCATAACTTGAGGAACTGCA
TCATCTGTGCGCCGGCGACCCATGGTCTCCCTCCCAGTGAGATTTGAGAG
ATGTTTTGGGTGCCCTTCTTGTGGGCTTCGATTTTGAAGGAGCTGATCGA
GATGCGAAGGACGATTGCAGCAGCTGCCTGCTTGGAGTTGAGACTTAAAT
CCTTGAAGGCAGCGGCACGGCGGTGGCTTAAGGGCAACCACCCAGTTTA
ACCCTTGTAAACTTGAATGCAACCCCTTCGGGTCCATATTGGTCCAGAT
TCCAGCCCACCTTACAGTTCACTAATTTCTCACACTCACTCCGACGATCT
TTCTCTTCAATCCGTCAAGTCGTTAAGTAAACTGAGAATTTTCGTGCAT
AATCTTTGTGATCCATAACGCTTGACCAAATCCAAACGGCAGATGCAAT
GTCACGCACCAAAGCAAAAATGAAGTGAATAATAAGGCTAGAGGAAC
GGAATTTCCATTGTCCAGGGAGATGGCTTCTTAGGCCATTGCACGCTTTG
ATT **TAATTA** CATTCATCTGGGTGCCCTTGACATGTGCCATGTCCATAT
CCATGTCCATTTTCATTTTCATTTTCATTCTACGATTGCCGTTCCCGGTT
ATACCTACATCATCTTCTCCTCCGAGGGTGTGTCAGTTTGTGTCAG
AAGAATGAGAAATTAATTTGTCAATGCGTCTTGACCTTCTGTCTTGCC
TGACAAAAAAGAAAAAAGTATTTATTCTCGACTTCAGGAGGGGATTT
CTGCTCGGTATGTTTGTGAGAGAAGGCAAACCTACTCAGA **CAATTAA** AA
TTGTACATAAATATCGCAATATTTCCCCCATTTCGCCCAAGAAAT
ATGTGAAAATCT **TAATGC** CCAGCAGGGTGGTTGATATTGTTAAGCTTT
TACGATGTGTGAGATTGACTGTTAAGAAAAGTTGACGAAATGCAGTCAGTA
TTTGATAAATATATGGTGTGCACTGCACACCTTTTCAATCAAAGAAGA
GATCAATTGCAATCGTAAACCAAAGGAAATGTAGAGAAACTGATGCGAA
TATATGTGGATTTTATATCTTTTGTATTGCTTAGTTTATGTGCAGATA
TTGGGCAATTTCAAATATTTTGTATGATATTTTTCATTCAAAGTATATA
TAAATGCAAATAATTTGTGCCAACATTTAAAACATGGAAATCCAAGCTTC
CAAACCTTTCAGATAGCTTTAAATGCTATTTTGTATATTTTCAGTATC
TTATAAATAAATATCTTTTACTATGCATTAAAAAAAGAGAAAGCCAA
GAAATATGGGTTTCTTGAGATAACTTTCAAACATTTCCCAATAGTTT
TAAGCGAAATACGTTCAATTTATGTATTT **TTATGC** TATCAGCAATCTCAG
ACATCTGTGTCCATGCTGACTACATTTTATTGTACT **TTATGC** ACTTTCT
GATTTTGGCTTCTGTTTCAATCATCTGTCTGCAAGAACAATGGTCA
AGGATCTCAATTTGATTTTCGATTTTTCGATTTTTCGGTTCCATTTTCTGTT
TTGTTTTGTCAATTTTGTGCTGTAATCTTATGAGGTTCCATTAGGATCG
CTCTACTTTTGGCTTTTGGCACCGCTCCATCCCTCTGATCAATGTCAA
GATAATTTATTTTGTAGTAGCTTTAAGATGCAGGAGATTCTTAATGCA
GCCGCTGGCAGCTCGAGCCAAAAGCTAGCAAATCGTAATTTATATACTTC
CTATGTAATAATATATGTGTGCTATTTTGGAGATTATGATGTAGGTAGT
GATTTTCAAACGCTTGTGCTACCTGAACGAAATGTTGACAA **AAATA**
ATG TAAAAAGGATCCAGGAGCCACAGCCGTCAGTGGGATTTGTTGTTGG
CCGATAAACACCCAGAGGCGAAAAATGCAATGCTGCTGCAAAGACAAAA
ACAACACAAGTTGTGCTCAAGATATACGGGGATATCTTAGGCAAGCAA
CCCCCGTTGGAAAGGGACGGCAGCTTAGTTTGGCGATCCTGTTTTTACCG
CTGTTGTTGTTGCAGAGAAAAGCAACCCCTATTTTCGAGACCGTTGCATT
CGTTGGGCAGGATAACGACGATCGGTAATCGGGGAATTCGGGGATCGGCG
ATCTGGAACGGAGAACGTCGAGCTCAGTTGCACAGCGCACGTCACCGGA
TTGGTACTCGATCAAGCCAAGAGCGGAGTTAGCCAAATAATAATACATAC
CCAGACAACTGAAACGAAATTCGAAATTCAAAAATTTCTGTTGCCAAG
TAGCAAATGTTAAGACTGATAAATATATTTATATAAACACCAAGAACGA
GTGCAAAGAATAATTAAGAACCGGATTTGCCAAGATCACCCACCAACA
ACAACAACAATACTGTTTGCACAATTTAATCATAACCAAGAGAA
CGACGCAACAAAATTTATTTCAAAGACTGCTACTAAATTTATAACATTA
AGTTAAAAGTGAATAACGATATCGTGTCTATATGTGATCATAACAAAA
ATATTTCAAAGAAACAAAGAGCAAAACGAAACCCGTTCCGTTCCCACGAGA
AAATCCAACCAAGTGCTATTGTCTTACCTCCATGCCATTCCATAGTCCTT
GATCTTTTGTGTGAAGTCTGGCTCCTCATTTTGTGCGGGTGCATTCGGT
CCAGCCAGCAGTCCATCTATCAAGGATTACCAATTTTGCAGGCGTGCCC
A **CAT** AAATTTCCCAACCTCCTTC **CTAATTAA** ATTCCGAGCAGCTTTC
TAATTCGGCAGTGTGATCCTGTTATTGTCTTGAGTATCCTCCTCAC
TCATTTGTTCAATGTTATT **ATGAAGTTGGAACGAGCGCAAATTTATGA**
AATGGTAATAATTGCTGACACCTTTGAGAAATATGAACTACTATTTAAGA
AAGTAATATCTGAATATAGCTTAGTAATATATTTGATTGTCTACTATCT
TAGTTCATTTCAAATTTAAAGCATTCACTTGTATGATTTACTTATTCAAAC
ATCTGTCTTCAATTTTCAG **GACCCTGAACTCGGTTTGTAGCCTCCATCAG**
CTAAGCGCCAGCAGGACTGCCCGTTTGTACGGCAGCGAGCAGGGCAAT
CTGTCACTCGGTTGCCCTCCTCGGTTACACCTCGCCGTTGTCTCGGTTGA
TGGCCAGAGTACCAGGAGCTGCTCAGCATACGTAGCTACCAGGAGG
ATCTGTGCGGAGGCCACACAGTCCGCTGCCGACAGCCGGACAGTCCG
CCGAGTCCGGATCGTGAAGCAAGCAGACGCCAGTGGTGGTGCCTACGC
TGCCGAGCAGGTGGTGACCAGTACGGTGGTCAAGCAGAAGACGGAGGAT
ATGACCTTTTGGACGACAGCTGCCAGGACTACTCGTACGACGAGGATGAT
GAGGATGACGTTGAGGAGGAGGACGACGCTGGAGATCTACTCTCCAC

AATTTCTCCAGCCTCCTCCGGCTGCAGCCAGCAGCAGGCAGGCGGTGAATGGAG
AGCGTACTCCCGGCTGCCAAAACATCAGGAGCAGATCCATCATCCGGTC
AGTGACCTGATGATTAACATGCGGACGCCCATGTCGCCGGCTGTGGAGAA
CGGTCTGCGCCAGTGCCACTTCTGCGCTCGCCTGGGCTAACGCCGCCG
ATGTTTGGCGCCTGATGTGTACCGGGATGAGCAGGACTCGCGTCTGCGC
AGCATTTCGATGCTGGAACAGCATCCCGGACTGCAACCACGTATGCGTGC
CATTCTCTTGGACTGGTTGATCGAGGTCTGTGAAGTTTACAAGCTGCATC
GGGAGACCTTCTACTTGGCCGTCGACTACCTGGATCGCTATTTGCATGTG
GCGCATAAGGTGCAGAAGACGCACTTGCAGTTGATCGGCATCACCTGCCT
GTTTGTGGCCGCAAGGTAGAGGAGATTTATCCGCCAAAGATCGGGGAGT
TTGCTTATGTGACGGATGGCGCCTGCACAGAGCGGGACATCCTTAACCAC
GAGAAGATTCTGCTGCAGGCGCTCGACTGGGACATCAGCCCCATCACCAT
TACCGGCTGGCTGGGCGTCTATATGCAACTGAATGTGAACAACCGCACTC
CGGCCTCGTTCTCCAGATTGGCAGGCAAAAGAGCGGGAGGCGGACGAT
GCCTTTATCTACCCGCAATTCTCTGGCTTTGAGTTTGTGCAAACCTCACA
GCTGCTAGATCTGTGCACCTGGACGTGGGCATGGCCAACTATTCCTACT
CGGTGCTGGCAGCGGCCCATCAGTCATACATTTAGTCGTAAGTTGGA

Anhang 7-2: Genomvergleich zwischen *Drosophila melanogaster* (Dmel) und *Drosophila pseudoobscura* (Dpseud). Bindestellensuche für Abd-A (rot) und Abd-B (magenta) im Enhancerbereich (grün, siehe Anhang 7-1) von *CycE* (Jones *et al.*, 2000). Dieser liegt vor den beiden Exons 1 und 2 (türkis). Konservierte Basen sind in der dritten Zeile durch einen Stern gekennzeichnet. Mit Blau ist die CAT-Box des Promotorbereichs markiert.

Dmel	GTAAACGGCGTTTAAGCAGCGATTCAAACGAGGTACGTAATCCAAAACGAATCGTAATTT	10556
Dpseud	CCTTG-GGCACGTAGTCAGCCAGCTCCTCCTGG-GCGCACACACGCACG---CACAAATGC	548
	*** ** ***** * * ** * * * * * * * * * * * * *	
Dmel	AAACATAAAGCCAGACACAGCGCAGATAAGTTTTATGAATGAAGTCTTTATCATGTTCAT	10616
Dpseud	CGAGATGAGCCAAAAATAA---ACGCTACTTATGCGGAAAAAGGCTCATTTGGCATCCT	605
	* *	
Dmel	GTGACCTCGTTGATTTTGTCAATCTTATCAGGGAAATGGCAAGAGGC-ATTCTGGCATTCT	10675
Dpseud	TGCCAGAAGTCAGATCTCTCCGTTCTGTGCCTTGGCTCTCAAGTAGCTGCAATCAAAGCC	665
	** *	
Dmel	TAGGAAGCCGATGATTAGCTCTAGTGTGTTTCAAAAAGTGCCTATGCATTTGAAATTAAT	10735
Dpseud	AATGGAACAATGGCTTCTCTCTGGCGGGTCTCCTGGAGTCTCCTGGCAGCT---CCTGG	721
	* *	
Dmel	TAATGTTTCTATTTAACGAACTCTTGAAGTCTGGGAATTTCTGTCTCTAAATTTCTCG	10795
Dpseud	CAGCTGTGTGGTGCAAAGGATTTTGTGAGAAGTAAGAAGCATGGCAGCAGCAG-----	774
	* *	
Dmel	TCGATCAGTGATTGGCCACTTTCATTTTAGCCTAAATAAGAATCTATTAATTTAATCTAAT	10855
Dpseud	-----CAGCAGCAGCAGCAGCTCCTCGACGTGCAATGAACTTGCAGAAATCGAGTTTG--	827
	*** ** *	
Dmel	AAATGAAAGTTAGGCTGTTTATAAGCTCAAAGATTTATTTCCAAGCTGAATAATCTGATT	10915
Dpseud	GGTTGTTTGTGCACTGTTTGCAGGCGGTTTGCCTTCCTGCCAAG--AAACAA---CAAAT	883
	* *	
Dmel	GCTTGTGAAGTCTGTTAATAATAATAATGTAATTTGAGATTATAACTAAACAATGTACA	10975
Dpseud	GTC-----ATTTTATCCAGGAAAAAAA-----AACTA-----AGGCAATGTCTG	922
	* *	
Dmel	TACATATTTGAACCGTGCAGGTGATATTTCTTTTGAATTTGAGCAATAGCCATTTTATA	11035
Dpseud	GCCCCCTTCATGCTGT--AGGGGA-ATTCCGAG--GGGTCTTGCCACTAGT-ATGTTGAG	976
	* ** *	
Dmel	TATTTATCTATTTGATTATAGTTTCCCAATGTTTTCATTGATCAGCGATCGCTA-AACA	11094
Dpseud	CATATGCACGAAAGGACAAAGGACAGCGA-----CAGCGACAGCTACAGCG	1022
	* *	
Dmel	ATTCTCCATTTTATTTATTTATGTTTGGCAAACGATCTTTTATTTGTAAGTCTTTCAT	11154
Dpseud	ACGTGCGCATGCGCGCACACCTTGTAGCAG-CGTCAATCTCTCTCTTCTGTCTGTGGAT	1081
	* *	
Dmel	GGACAGCCCTTTGGTGGCTTCCACTCGTTTGGCTGCCGATCTTCAT-TTGATCTTTTCGCT	11213
Dpseud	CACCAGG-----GGTGGTTTCCCAAGGAGAGG--ACGGACCTCAAAGTCAAGGCGCGCA	1134
	*** ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * *	
Dmel	---GCTTGAGTTTGGCCAAATAAGCCGTTGAGCAGCTAGACAGCTACTTCTTGGCACTT	11270
Dpseud	CAAGCGTCCGTTAGGCGGTAGGAAGTATTTGAAATGCGATAGTTATAGCTATGGCTT	1194
	* *	
Dmel	TTG-CGCGGGCACAATGCAAAGATGA-GCCCAAAAATAA---ACGCTACTTACTGAAAAGG	11326
Dpseud	GAGGCGCAGCAACTAGATCAAGACGATGGGTAAGGATGGTGAAGTGGGTACCGGAATGG	1254
	* *	
Dmel	GCTCATTTAGCAGCATCCTTGAAGCCTTGAAGTCAAGTCTCTCTCAAGTAGCTGCAAT	11386
Dpseud	G-----ACAGGGAGCTAACCACAAACACGAATGTGAG-----CCAGCGAACGAGTG-AGC	1303
	* *	

Dmel	CAAGGCGGAGAACAATGGCTTCCTTCTCATCTCCTGGCGGCTCCTCACGATGGGCAGCTG	11446
Dpseud	CGTGGAGGGGTTTCAGCAGCG-CCGCTTATCCTTTTCAAGGATCACTGGGTAGGCTGCCA	1362
	* * * * *	
Dmel	TGTTGGTGCAAAGGATTTTTTCTCCAGTGCATATGAAATATGTATGTAGGGGAGAGAA	11506
Dpseud	AGTTT-TCCAT----TTTTCTGCCTGCCTCCTTGCCGCTTCCCTAATT-----A	1409
	** *	
Dmel	TATTCTCCTATACGTGCAATGAACCTGCAGAAATGTTTTCTGTTGTATAGTTTGGTAC	11566
Dpseud	TATTCATCGAGACG-ACATTTG--CTGCAGAAGATGTTACC--GTTCCATAAA-AGTGG	1463
	***** *	
Dmel	CCTCTAGATGGGTATCTTTATCTTTGCAAGATTATGAATATCTATAAGTTTTTCATATATT	11626
Dpseud	TCGGTAGCTCGTTGCATTT-TGCTACCCCGTCTAGGGACAT-----TATCCTTATGC-	1514
	* *	
Dmel	AAATCTTAGGCATGTTAAAAGGACTGTTTTAGAATCAGCATATCTTATTGATAAAGTGG	11686
Dpseud	AAATGCGTGTCCCGTCCCGCTACCGATCCGGACTCCG-GTAT---GCTCATTAGATTT	1570
	**** *	
Dmel	AAATATAGAAATTTATATTATTTATAAGGTGCCTTGTTGTACTGAGAATATATCGTAA	11746
Dpseud	CCGT-TAACTTTTATGCAAAATCATCTTGCTCCTAGTCTCTCCTCCTCTCTCTCT--	1627
	* *	
Dmel	AATTAAAATGTAGTGACCAGGGTATACAAACAGTCTGTTGCCAAACAATGATATCTGCC	11806
Dpseud	-----TCTCCTGCTC-----CTGCT-CCTGTCCGGATGTCATCTGGG	1662
	* *	
Dmel	TTGGTTATTTTTTTTGTCTGTTTTTTTTTTGAGTTTTTTGTTTTTGGCA-ATGTTTTTGGC	11865
Dpseud	TTTGGGATGT--ATGCAGCCCTGCATTGGAATTCCTTGAAATATATACAATATTTGT-	1718
	** *	
Dmel	CCTGCTCCGTGCCAAACAATGTCATCTCGGTACGAAAAAGTGGATGGCAAG-GAAAT	11924
Dpseud	TTTGCTGCTG-GCAAAAGGATAAAAATTACGGTATATATTTACCAATTTGTCAGTGAAT	1777
	**** *	
Dmel	GTCTGGCCCCCTCTCAGGCGAACTTTGTTGAGTAAGGGAATTCCCGAAGGGGTCTTTGG	11984
Dpseud	GTAACCCCTTTTCTCTCTTCTCTGCTCCTGCTCGAAGC-----ATGAAATCGCTGA	1832
	** *	
Dmel	CAGTATGCCGAGCATATGCATGCCAGGACAAAGGAGCCGGACCAGAAGCAGGCGCAGGAG	12044
Dpseud	AAGTTT-CCTTCTCTTTTTTTGGGAAAACCTCATTGTTT--CTTTTTGCAGCACACAGAC	1889
	** *	
Dmel	CAGGAGACGCAGAACAAGGACAGAAGGCGTCTGTTGCCATGCCGCGCACACCTTGAGTCCA	12104
Dpseud	CAGGAGG-----GAGGGCAG-----TTGTTGTGTTTGGGATAGGA--TAGGGTTGA	1933
	***** *	
Dmel	AGTCCGAGTTCTCCAGGGTGGGTTTTTCCAAAAGTCAAGGCGTCGG-CAATGTCCGTT	12163
Dpseud	GGTTGAGGTTTGCCTGGGATGCAATCAAGTGCAGGCTTGATTTCTGTCAAGTCAGTTTC	1993
	** *	
Dmel	AGGGCCGTGGTAAGAATTTGAAATGCGATAGTTATAGTTAGCTTGAGGCAGAAGAACT	12223
Dpseud	CCGGCATTGTGGGAAATTGATTTCAAGTTTCCCCACGATACCCAGATTGCATCCCG	2053
	* *	
Dmel	AGATCAAGACAGTTAAGGATTTGCGATCGGGATGGGGGACGGTGTAGGGTAAGGGATC	12283
Dpseud	ACATGGGATGGATTCCACGGACTCTCAT-----GTTCTCTGTAATTCGAAGTTTCT	2105
	* *	
Dmel	GTGGTACTACCGGAATGGGACAGAGCTGAAACCGCAACACGAAACGAACCGA--CGGA	12341
Dpseud	CTAATTTTAAAGGGGATTTCAATTTAGC--GAACGGGTAAACAAGAGTTGACAGGACCGTT	2163
	* *	
Dmel	GGGGTTGAGCAACGCCTTATCTTTTCAAGGATCACTGGGCCGAGTTTTTCCCTTTTCTT	12401
Dpseud	CGGGATGCTTCTGTAAATGATCTGTTTTGAGCTGACAGATCCCATCCGTATGATAAGAAA	2223
	*** ** *	
Dmel	TTCTGCTCTAATTAA-TA--TTCATCGAGACGACATTTGCTTCTGCA--GAAGATTCG	12455
Dpseud	ACCAGTTTCAATTAAA-GACAGTTGATAGATTCATCAGCTCTCTATGTTATCGATGATCTG	2283
	* *	
Dmel	GAGCATAACAAAAAAATTTCTTCCAACCTGGGTTGCATTTTGTACCCCGTTTCGGGACA	12515
Dpseud	GAAAACAGTTAGTATAAATAAGAGCAACAATAGAGATTACGTCTACGTCTCTTCGGGTA	2343
	** *	

Dmel	TGTTATCCTTATGCAAATGCCTTGGCCGATCCTGCGACGTCTGCTCATTAGATTCCGTT	12575
Dpseud	ACAAATTATTGAAAATTCATATTTAGATGATGCTTAGC--GGCCTTCAATTGTTTATG	2401
	** *	
Dmel	AAACTTTTATGCAAATCATCAGGCTTTTCCTTCTTAAACTCTTGTGTCATCTGCTTTTC	12635
Dpseud	TTGCTCCCGGAGACATTCAGGCGCAG----AGAGGACTTTCG----CTGTGTTTC	2450
	* *	
Dmel	GGGACACGGAGAACGCGTCTGCATCGGAATGCGGTCTTGAATATTTATAACAATTTGTT	12695
Dpseud	AGATCTCTACATACTTTTTTGGGGGTACGTGCGCTCCTAACAGATCTGA-----	2499
	* *	
Dmel	TTGCTGCTGGCACAGGATCAAAATTATGGTATTATTTACCAATTTGTCAGTGTAATGTA	12755
Dpseud	TTGGAACCACAAAGGACTCTTAATAAACCTACTAT--GCCATACCTTCAATGGATCGTA	2556
	*** *	
Dmel	AACCCCTTTTCTTACTCCTTACATGGCAGGCATGAAATCGCCGAAAGTTCTTGTTATT	12815
Dpseud	AAGCAGTAGACAAAAATTTACACATACCTTCTCACATTCTCCTTA--CCCTCGATGTC	2613
	** *	
Dmel	TTTTTTTTTTGGGAAACTTCTTGTCTTCTTGTGCTCCCGAAAAGGGGAGTTGGGTTTGCTT	12875
Dpseud	CTTGCTCT---AAACATTTATCATTTTATGTTTTC-----GTATTCAAATTCATT	2661
	** *	
Dmel	TCGCTCGGGTTTCTTTCGATGCAATCAAGTGTGGGTCTTGATTTCTGTCAAGTCAGTAT	12935
Dpseud	TGGC---GGTTTATCCTTTGTCCACTTACGCTCCGATCCTG---CCCCTC---CGCCAA	2711
	* *	
Dmel	CGGGATATTGTGGGAACTGAATCAAGTTTCACTTTCCAGATTGCATCCCGATTGGG	12995
Dpseud	AGGGCTATGCTTT--AATTTACTTTTCGTATGATCTAACCAATTGCAT---GATTAATT	2766
	*** ** *	
Dmel	ATCATGCGTGCCTGCTTTGTAATTCAAAGTTTCTTTTTTCATTTTACAGAGGATTTTA	13055
Dpseud	CAATACGTCT-----GTCGAAGGGTTTCCCTCCCTCTCTGCAC---TCATA	2811
	* *	
Dmel	TTTAGCTGGAGGTAAACAAGAGATAATGGTAAACTTGGGCAGCGATCTGTTTTTCAGATTA	13115
Dpseud	TTTCTCAGACTTGATGAAGATTTTCTGCAAGTCACGGG-----CAGGACA	2859
	*** *	
Dmel	ATTA CATTAAAGATTCGACTGATAAGAACTAGTTTTGAGCAGATAATTTTAAAAGGTAA	13175
Dpseud	ACCGGAAAGGATTTGTGTTG--GATTAACCC--CCTTCCCCTGGACACTGACCAGAGGTCA	2916
	* *	
Dmel	ATTATTAGATAAAACAGGGGAAAACGTAATTCAGTAAATATATCAAGAGATATTCAAAT	13235
Dpseud	GTTTTTGGTTTGGTTGGAATATAGAGTGTGTTGTTATGTCTTCTGGGACATGCTTGCT	2976
	* *	
Dmel	ATTAAA-GGCTTACACCTAAGAAGTTGGCATATCCCCTAAAGAAAATTTGCTTTCTGAC	13294
Dpseud	CTCGTCTGGCATGTTGTTTGCATATCATTTATTACATGAAAGCAGGAGCAGTGTACAGG	3036
	* *	
Dmel	AATTAATCAAATTCATTTTTCGATTCAAATTCATTTCGCGGTTTGTCTTTGTCCACT	13354
Dpseud	CCTCGAGCTAATTTAGAATCTTGAAT--AATGACATTAGGAGAAATGTAATTTGTCAAAG	3094
	* *	
Dmel	TACCCTCCTCCGTTTCACCAATGTGATATGCTTTAATTCGTTTGTGTCATGGATCTAAC	13414
Dpseud	AAAGAA---AACAAGAAACGAGAGAGGT-TTCCATAACATATTTTGAAAGAACCCTCCAA	3150
	* *	
Dmel	AATTCATGA TTAATTA CATGTCCAAGCAATTTCAACGTCGCCCTGACCCACCGAATTTT	13474
Dpseud	AACAGTACGCAAAAACA-ACATACATGCGTGTGCATGATGCTC--GACTCGC--GATGCG	3205
	** *	
Dmel	CCATTTTCCGCGATGATAAAACCAGCAATGTCACCGCGAAAGTGTGTTGTTGGATTAAAC	13534
Dpseud	CAAGCGAATGC--TGCAAAAACAACGTACATTGC-GTGTGCTGACACCCACAATGATG	3262
	* *	
Dmel	CTTTCTGGACTGACCAGGGGTGAGTTGAATGGTTTGAATATGAGTGTGTTGTTATGGT	13594
Dpseud	CTCTCTGG--CTTCTCTGATAAGAGTT--TTGTTTGTGTTTCTGATTCCAGAAAT	3318
	** *	
Dmel	CTTCGGGGATTGTCCACTGGCATGTTGTTTGCATATCATTTATTAAGCAGAGCAGCA	13654
Dpseud	CTT--AATTTATCTCCAATCGAAAATTTCTTCTGTAAAATATTAACAAT---TTTCA	3372
	*** *	

Dmel	CGGATGTCCCAAAAAGTAGACAGGACTTTAGCTAATTTGAAACGATCATCAGACTTTTAT	13714
Dpseud	AAGATCCATTGAAGACCGGAAAAA---GACCAAATT--AAATGTTATCAAAA----- *** ** *	3420
Dmel	GAGTCCTTCATGAAAAATGAAATATCTGAAGAAAAACCTCTAGCTTGATCCTGAATTT	13774
Dpseud	AGGACCTTGGGGGAGAGTAAAAGAACGAAGGTAGAA-----ATAATAAAA--C * **** *	3467
Dmel	AAGAAAATCATAAT-CTTTTCAAACGTAAAAATATTAACAACCTACCGCACATTGTAGTA	13833
Dpseud	GAAACAACATATGCTGCATATTACACGGCAAAG---TTACACCTGGTCTGGTCCGGGTC *	3523
Dmel	TGAAATTAATGTTATCAAAGGACTTGGGGGAGAATTGAAAAAAAAGAAAAAACTGTA	13893
Dpseud	TGGGCCAGG-GACGGGGCAGACCACGCCAA---TGGTAAAACGATCGACGCGACGCA ** *	3579
Dmel	AGAAAAGAAAAATAAATGGAACAACAATGC-AGCATATTACAGCAAAACAGCGGTGAA	13952
Dpseud	GCGAAAAAAACTAAA-GGTGTTTCGGTTGCGAGCAGACGGCAGACGAAAGATTACGACA *	3638
Dmel	AAGTTACACCTGGACCCACGCCAAGGTCTGAAAACATAAAGGTG--TTTCGGTTTCGAGCA	14010
Dpseud	CA--TAAGCGCAGGACTTTGA-AGGTATGAGGGAGAGCAGTAAATGCCAGCACAGCAGC *	3695
Dmel	GACGGCCGTGAAAGATTACGACACATAAGCGCAGGACTTTATAGGGTAGCCGAAAAGGA	14070
Dpseud	GAGGGCGACTCAGAGAGAGAGAGCAGCAGCAGCAGCA---GGAGAGTAAGACCACACA ** *** *	3751
Dmel	GAGGGAGAGCGCACACA-ATGGGGCACCAGGACATCGAGTA--TTGAGGTCGGCGACGCGAG	14127
Dpseud	ATGGGGCATGAAGGAGATTGAGGTTGACGACTGCGACGAAGCCGACGACGACGACGACG *	3811
Dmel	CAGAGGTTGTCGCCTAACAAATCGAATTGCTTCTTGCTGCTTT--CTGTATGTACCATA	14185
Dpseud	ACGACTTTGTGCGCATAACAATGCTTT--TCTTGACTGTTTGTCTATATGTACCATA *	3868
Dmel	ACT-----TGAGGAATGCATCATC---TGTCCGGCGGACCCATGGT-CTCCCTC	14232
Dpseud	ACTGTGGAAGATGAGGACAGGGATTGTGGAATTGCATCATCTGCTCCTGCTGCTCCCTC *** *	3928
Dmel	CCAGTGAGATTTGAGAGATGTTTTGGGTGCCTTC-----CTTGTGGGCTTCG--ATTTT	14285
Dpseud	CCAGTGATATTTGAGATGATGTTTTGGGTGCCTTTAGCAGCAAGAGATCATCGTCAACTG ***** *	3988
Dmel	GAAGGAGCTG--ATCGAGATGCGAAGGACGATTGCAG---CAGCTGCCTGCTGGAGTTG	14340
Dpseud	CCATCAACTGCAATCGCAATAGCAGTCACTGGAGCAGGGACAGCTGCCACCATCG--TTG *	4046
Dmel	AGACTTAAATCCTTGAAGGCAGCGGCACGGCGG--TGGCTTAAGGGCAACCACCCAGTT	14398
Dpseud	ACTACTAGTCTTTGGGCAGAGGAGAAATCCTTGAATCGGCTTAAGGGCAACAACCCAGTT * ** *	4106
Dmel	TAACCCTTGTTAAACTTGAATGCAAC----CCTTCGGGTCC----ATATTGGTCCAGAT	14450
Dpseud	TAACCCTTGTTAAACTTGAATGCAAC----CCTTCGGGTCC----ATATTGGTCCAGAT ***** *	4166
Dmel	TC----CAGCCACTTTACAGTTCACTAATTTCTCACACTCACTCCGACGATCTTTCTC	14505
Dpseud	TCAGTTCAGCCACATTACAGTTCACTAATTTCTCACAC-----ATCATG-TC ** *	4214
Dmel	TTCGAATCCGTCAAGTCGTTAAGTAAACTGAGAATTTTCGTGCATAAATCTTTGTGATTCC	14565
Dpseud	ATAAAGTTCCCAAAGATGGGAAAAGGCCT---ATACTCTATCCACGCT-----TGACCAG *	4266
Dmel	ATAACGCTTGACCAATCCAACCGGCAGATGCAATGTCCACGCACCAAAA---AGCAAAA	14621
Dpseud	ATCCCGATCTACCCCAACCCCTGGCAGATGCAATGTCCACGTACCAAAGCGAAGCAATG ** *	4326
Dmel	ATGAAGTGAA-ATAATAAGGCTAGAGGAACGGAATTTCC--ATTGTCCAGGGAGAT-GG	14676
Dpseud	CCAAAGGGAACAGAACGGAATGTAATGTCCATTGTCTGTGGGATTGCCATTTGGCATTGG *	4386
Dmel	CTTCTTAGGCCATTGCACGCTTTGATTTTAATTACATTGCATCTGGG-TGCCTTGACATG	14735
Dpseud	CATCTTATGCCATTGCACGCTTTGATTTTAATTACATTGCATCTGGGTTCTTGACATG *	4446

Dmel	TGTCATGTCCATA-----TCCATGTCCATTTTCATTTTC-ATTTTCATTCTACGATTG	14788
Dpseud	TGTCCATTTCCATTACCAATTCCACATCCACTTCCATTGCGATTGCCATTCTCTCGGTC ***** *	4506
Dmel	CCGTTCCCGGTTA-----TACCTACATCATCTTCTCCTCC-----GGA	14826
Dpseud	TCGGTCTCGCTCTCGCTCTCGCTCTTCTGTACCTAAATCATCGTCCCTCAGAGCGGA *	4566
Dmel	GGGTG-TTGCAGTTGTTGG-----CCAGAA-GAATGAGAAATTAATT	14869
Dpseud	GGGTGCTTGTGTTGTTGTTACGTTACTGCAGTTCCCTCCAGAAAGAATAAGAAATTAATT ***** *	4626
Dmel	TGTCATGCGTCTTGGACCTTCTGTGTC--TTGCCTGAACAAAAAAAAAAAAAAAAAGTATTT-	14926
Dpseud	TGTCATGCGTCTTGGACCTTCTGTGTCCTGTCGTCGTCGATGCAAAAAAAAAAATTTATTACCTT ***** *	4686
Dmel	-----ATTCTCGACTTCAGAGGGGAGTTCTGCTCGGTATGTTTGTGAGAGAAGGCAA	14980
Dpseud	GGAAATGTATCTTCCCTCAGAGAGGGGAAGGAAGGAACGAACGGAAGGAAGGAAGGCAA *	4746
Dmel	ACCTACTCAGACAATTAAAAATGTGCACATAAATATCGCAATTTTCCCCCATTTTTCGCG	15040
Dpseud	ACCTACTCAACAATTAAAAATGTGCACATAAATATCGTAAATTT--CCCTCATTTT-AC ***** *	4803
Dmel	CCAAGAAATTATGTGAAATCTTTAATG-CCAGC-----AGGTTGGTTG--ATAT	15089
Dpseud	GCAACAAATTATGTGAAATCTTTAATGACCAGCCAAGAGGGAGGTTGGCTGTAATAT *	4863
Dmel	TGTTAAGCTTTTACGATGTGTGAGATTGACTGTTAAGAAAGTTGACGAAATGCGATCAGT	15149
Dpseud	TGTTAAGCTTTTACGATGTGTGAGATTGCCAGTTATGGAATCGAAC--ATTGAAAC--AT ***** *	4919
Dmel	ATTTGATAAATTATATGGTGTGCACTG-CACACCTTTTCAATCAAAGAAGATCAATT	15208
Dpseud	ATCCCCAGATTG-ATG-TGTGCAAAATTTGATAAAAGAATCAAGGGAAGATCAATT *	4977
Dmel	GCAATCGTAAACCAAGGAAATGTAGAGAACTGATCGCAATTTATGTGGATTTTATA	15268
Dpseud	TCAGTCGTA AAC-----TTGGGAAATTCCTTCAAGATAATA--GATTTTATT *	5023
Dmel	TCTTTGTATGTCTAGTTTATGTGCAGATATTGGCAATTTCAATATTTTGTATGTA	15328
Dpseud	GCTTGTGTCTTGGATATTTCTGTATG--ATATTTGATGA----AAGATTTTGAC--- *	5072
Dmel	TATTTTTCATTCAAAGTATATATAAATGCAATAATGTGCCAAACATTTAAACATGGA	15388
Dpseud	-----CCAATCA-----TGAGGATCATAG-GCTACACA-----AATATGCA *	5107
Dmel	AATCCAAGCTTCAAAACCTTCAGAATAGCTTTAAATGCTATTTTGTATATTTTCAGTA	15448
Dpseud	AAT-----AAATGACTGGAACGATCCTGAGAG--GCTTCAAATTTACT-CGGAA *	5153
Dmel	TCTTATAAATAAATATCTTTTACTATGCATTA AAAAAAAAAAGAGAAAGCCAAGAATTTAT	15508
Dpseud	CTTTGCA-----TTCTTGTATATGCACCTACATCCACAGAAATCC----- *	5195
Dmel	GGGTTTCTTGAGATAACTTTCAAACATTTCCAATAGTTTTTTAAGCGAAATACGTTTCA	15568
Dpseud	--TTCATT-----CTTTCGTAG-ATTTATACGGACTTTCTGATC-----TTGGC *	5237
Dmel	TTATGTATTTTATATGGTATCAGCAATCTCAGACATCTGTGTCCCATGCTGACTACATTT	15628
Dpseud	TTCTGTATTCG-----ATCAGCTGCCGAGGAGACAATGGTCAAGG----- *	5278
Dmel	TATTGTACTTTATGGACTTTCTGATTTTGGCTTCTGTTTTCAATCATCTGTCTGCAAGAA	15688
Dpseud	-----ATCTGCTGG-----GATCTTG-CTGCTGT----AATCTTATGACT-CACGAG *	5319
Dmel	GAACAATGGTCAAGGATCTCAATTTGTTTTCGATTTTTCGATTTTTCGGTTCCATTTTCGTTT	15748
Dpseud	GGACTCTGTGC-----GTTTTTG-----TGTTGGTTCCCATTAGCCTTG *	5357
Dmel	TTTTGTTTTTGTCAATTTTGTGCTGTAATCTTATGAGGTTCCATTAGGATCGCTCTACTT	15808
Dpseud	CTCTACATTGCAC-----TTTCGCAACGCCCCACACGATCTGTCCCATGG *	5402

```

Dmel      TTGGCTTTGGCACCCGCTCCATCCCTCTGATCAATGTCAAAGATAATTTATTATTGAG  15868
Dpseud    TCGTCTAC-----CCTCCAGCCGT-TGAT-AAAGATAAAAGATAAATAACTAGAGGAA  5453
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      TAGCCTTTAAGATGCAGGAGATTCTTAA--TGCAGCCGCT--GGCAGCTCGAGCCAAAAG  15924
Dpseud    TAGCTCCCAAGATTTAAAAGATTTTTCGCGCTGCAGCCGCTCTGGCAGCTCGAGCCAAAAG  5513
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      CTAGCAAATCGTAATTTATATACTTCTATGTACTATATTATGTGTGCTGATTTTGGAG  15984
Dpseud    CGGACA-----TAAATTATATAAGTACTCTCCGCAGATGTGTGTGACAGACACATACTC  5568
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      TTATGATGTAGGTAGTGATTTTCCAACGCTTTCGCTCTACCTGAAAC-----GAAA  16035
Dpseud    TGTCTGTCTAGGTAGTGATTTTCCAACGCTTTCGCTCTACCTGAAAC-----GAAA  5627
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      ATGTGACAAAATAATTTGTAATAAGGATCCAG--AGCCACA-----GCCGTCAGTGGGA  16089
Dpseud    TTGTTGACAAAATAATTTGTAATAAGGATCCAG--AGCCACA-----GCCGTCAGTGGGA  5687
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      TTTGTTGTTGGGCCGATAAACACCCAGAGGCGAAAATGCATGCTGCTGCAA-AGACAA  16148
Dpseud    TTTGTTGTTGGGCCGATAAACACCCAGAGGCGAAAATGCATGCTGCTGCAA-AGACAA  5747
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      AAACAA-----CACAGTGTG-----CGTCTCAAGATATACGGG  16182
Dpseud    GCACAGGCACAGGCACAGGCAGGCCCCACGGAATGAACGAACGTCTCAAGG-AAATAGC  5806
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      GATATCTTAGCAAGCAACCCCGTTGGAAGG-----GATATCTTAGCAAGCAACCCCGTTGGAAGG-----  16215
Dpseud    CAGATCTCCGGGAAGGAAGCTACCCCTAAAGCAGGCTAGAGCGGAGCTGGCACCAGAGCAGTA  5866
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      -----GACGGCACGTTAGT-TTGGCGATCCTGTTTTACCGCT-GTGTGTTGTTG  16263
Dpseud    GAGCAAGCGAGAGGGCAAGCTGCTGCTGGCCAGCCTTTTTCACCGTTCATCGTTGTTG  5926
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      AGAG-----AAAAGCAACCCCTATTTTCGAGACCGTTGCATTCTGTTGGGCAGGATAAC  16316
Dpseud    AACGTTATCTGTGAAAAGCAACCCCTATTTTC-AGGCCGTTGCATTCTGTTGGGCAGGATAAC  5985
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      GACGATCGGTAATCGGGGAATT-----CGGGGATC  16346
Dpseud    GACGATCAACGATCGGAGTGTGTTTCGGGGCTCTAGGGGTTCTCGGGGTTCTCGGGGATC  6045
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      GCGCATCTGGAACGGAGAAGCTCGAGCTCAGTTGCACAGCGCACGTCACACGCGATTGGTA  16406
Dpseud    GCGCATCTGGAACGGAGAAGCTCGAGCTCAGTTGCACAGCGCACGTCACACGCGATTGGTA  6105
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      CTCGATC-----AAGCC-----AAGAGCGGAG-TTAGCCAAA  16437
Dpseud    CACGATCCGCTCAATCCGGCTCTCATCTCGGAGTGACCAGAAGAACAAGACTATCTATA  6165
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      TA-ATAACATACCC--AGACAAACTGAAACGA--AATTCGAA-----ATTCCA  16482
Dpseud    TGTATAGCAGATATTCGTAATACCAACAAAAATATTAATTAATCAAAATAAACTCAAAACCAA  6225
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      AAATTATTCGTTGCCAAGTAGCAAAATGTTAAGACTGATAAATATATTATATAAAA--CCA  16540
Dpseud    AAATGATACGCTGCTAAAAGAGGAAGGGAAGCAGAGACTGAGACCAAAAAAGAAACTG  6285
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      CCAAGAACGAGTGCAAAGAATAAATTAAGAACCAGGATTGGCC--AAGATCACC-CACC  16596
Dpseud    TGTATTTTCGAGTGCAAAGAACCTAAATTAATAACCGGATTCGCGCAAGAGATCACCTCACC  6345
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      AAC-AACAACAA--CAACTACCAAAAAACAAAACGAAGCCAAAATTGTGTTA-AATGCTA  16652
Dpseud    AGCCAGCAACCAACCAACCAACAACAATAAACCACCAACCAACAATGTTTCCAATGTTA  6405
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      TAAC-CAAAAAATCTGTTTGACAAATATTTAATCATAACCAAGAG--AAACGACGCAAC  16709
Dpseud    TAGCACACGACATTTATTTGCACT---CTTACACATAACCAAGAATCAACCGAACAACC  6461
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dmel      AAAATTATTTCCAAAGACTGCTACTAAATTTATAA--CATTAAAGTTAAAGTGAATAA  16767
Dpseud    GAAATTTAAACCAAGACTGCCACCAGAAATCGAGAATCATCAAAGCAAAAAGTGAATAA  6521
* * * * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```


Dmel	GTGACCAGTA-----CGGTGGTCAC-----GCAGAAGACGGAGGATGATGACCTTTG	17661
Dpseud	GGCAGCAACAGTCTGGCAGCAGTGCACAGACGACGAGGATCAGGAGGATGATGATTTGCTG	7704
	* *	
Dmel	GACGACAGCTGCGAGGACTACTCGTACGACGAGGATGATGAGGATGACGTTGAGGAGGAG	17721
Dpseud	GACGACAGCTGCGAGGAGTATTCGTACGATGAGGA-----GGACGAACTGGAGGAGGAG	7758
	***** *	
Dmel	GACGACGACGTGGAGATCTACTCCTCCACAATTTCTCCAGCCTCCTCCGGCTGCAGCCAG	17781
Dpseud	GACGATGA--GGAGATTAACTCATCGAACATTTCCGCAGCCTCCTCGGGCTCCAACCCG	7815
	***** ** *	
Dmel	CAGCAGGCGGTGAATGGAGAGCGTACTCCCGCCTGCCAAAACATCAGGAGCAGATCCAT	17841
Dpseud	CCAATGACCGACTATGGGGCCAAAACCCACAGCTGACGC---TGAGCAACATCGTCAA	7871
	* *	
Dmel	CATCCGGTACGTCAGTGCCTGATGATTAAACATG--CGGACGCCATGTGCGCCGCTGTGGAGA	17899
Dpseud	GGACATGTCA-CAGCTCGAAGACTACTCGGGCCTGAATTGCATGTGCGCCGCGGTGGAGA	7930
	* *	
Dmel	ACGGTCTGCGCCAGTGCACCTTCTCGCTCGCCTGGGCTAACGCCCGCATGTTTGGC	17959
Dpseud	GCTCTCTGCGTCACTGCCCCCTTCCCGCCCTAGCCTGGGCCAATGCGGCAGATGTGTGGA	7990
	* *	
Dmel	GCCTGATGTGTCACCGGGATGAGCAGGACTCGCGTCTGCGCAGCATTTCGATGCTGGAAC	18019
Dpseud	AGCTGATGTGCCATCGGGACGATCAGGACTCGCGTCTGCGCAGCACCACCATGCTGGAGC	8050
	* *	
Dmel	AGCATCCCGACTGCAACCAGTATGCGTGCCATTCTCTGGACTGGTTGATCGAGGTCT	18079
Dpseud	AGCACCCCGCCTGCAGCCGCGATGCGGGCCATCCTTCTGGACTGGCTGATCGAGGTCT	8110
	*** *	
Dmel	GTGAAGTTTACAAGTGCATCGGGAGACCTTCTACTTGGCCGTCGACTACCTGGATCGCT	18139
Dpseud	GCGAGGTGTACAAGTGCACCGGGAGACCTTCTATCTGGCCGTTGACTACCTCGATCGCT	8170
	* *	
Dmel	ATTTGCATGTGGCGCATAAGGTGCAGAAGACGCCTTGCAGTTGATCGGCATCACCTGCC	18199
Dpseud	ATCTGCATGTGGCCACAAAGTGTAAAGACGCACCTGCAGCTGATTTGGCATCACCTGTC	8230
	** *	
Dmel	TGTTTGTTGGCCGCAAGGTAGAGGAGATTTATCCGCCAAGATCGGGAGTTTGCTTATG	18259
Dpseud	TGTTTGTTGGCCGCAAGGTAGAGGAAATCTACCCGCCAAGATTGGCAGTTTGCTTACG	8290
	***** *	
Dmel	TGACGGATGGCGCCTGCACAGAGCGGGACATCCTTAACCAGGAGAAGATTCTGCTGCAGG	18319
Dpseud	TCACCGATGGCGCCTGCACAGAGGGACATCCGGCAGCAGGAAAAGATCTGCTGCAGG	8350
	* *	
Dmel	CGCTCGACTGGGACATCAGCCCCATCACCATACCAGGCTGGCTGGGCGTCTATATGCAAC	18379
Dpseud	CCCTCGACTGGGACATCAGCCCCATCACCATACCAGGCTGGCTGGGCGTCTATATGCAGC	8410
	* *	
Dmel	TGAATGTGAACAACCGCACTCCGGCCTCGTTCTCCAGATTTGGCAGCAAAGAGCGCGG	18439
Dpseud	TGAATGTGAACAACCGCACCCCGCCTCGTTCTCATGAGATCGGCCAAGAGAACGCCACCG	8470
	***** *	
Dmel	AG-----GCGACGATGCCTTTCATCTACCAGCAATTCTCTGGCTTTGAGTTTGTCAAA	18493
Dpseud	AGAAGGCAGCCGATGATGCCTTTCATCTATCCCCAGTTCTCGGGCTTCGAGTTTGTCAGA	8530
	** *	
Dmel	CCTCACAGCTGCTAGATCTGTGCACCCCTGGACGTGGGCATGGCCAACTATTCTACTCGG	18553
Dpseud	CCTCGCAGCTGCTGGATCTGTGCACCCCTGACGTGGCCATGGCCAACTATTCTACTCGG	8590
	**** *	
Dmel	TGCTGGCAGCGCCGCCATCAGTCATAATTAGTCG GTAAAGTTGGAATGGAAGTTGCAT	18613
Dpseud	TGCTGGCTGCGGCCGCCATTAGTCATAATTAGTCGGTAAGTTTCGAA-GGCTCCTCCTC	8649
	***** *	

Versicherung gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung

- 1) Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.

- 2) Ich habe und hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

- 3) Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den

(Christian Berger)

Lebenslauf

Christian Berger (Dipl. Biologe)

Geburtstag 13.03.1972
Geburtsort Trier
Adresse privat Am Römerbrunnen 18
 60437 Frankfurt/Main
Telefon 0 160 – 71 22 583
e-Mail bergerc@uni-mainz.de

Beruflicher Werdegang

- Seit April 2000** Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit **Promotionsoption** am Institut für Genetik der Gutenberg-Universität in Mainz
 Arbeitsgruppe Prof. Dr. G.M. Technau
 Arbeitstitel der Promotion: „*Einfluss zellzyklus-steuernder Gene auf die Tagmaspezifität neuraler Vorläuferzellen im zentralen Nervensystem von Drosophila melanogaster*“
 Ende der Promotion: Dez 2004
- September 2000** **Einladung als Redner** bei der internationalen Tagung „*Neurofly*“ in Alicante (Spanien)
- Januar 2002** Mehrwöchiger **Auslandsaufenthalt** im „Center for Cellular and Molecular Biology - CCMB“ Hyderabad / Indien.
 Dieser Austausch erfolgte im Rahmen eines durch die **Volkswagen Stiftung** geförderten Projektes in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. L.S. Shashidara in Hyderabad.
 Während dieses Aufenthaltes **Einladung als Redner** bei der internationalen Tagung „*Annual Conference of the Indian Society of Developmental Biologists*“ Kanpur / Indien
- März 2004** **Einladung als Redner** bei der internationalen Tagung „*43th Annual Drosophila Meeting*“ in Washington (USA)
- September 2004** **Einladung als Redner** bei der internationalen Tagung „*Neurofly*“ in Neu-Chatel (Schweiz)
- Dezember 2004** **Teilnahme** am **EMBO** Workshop: "Cell Interactions in Development and Disease" in Hyderabad/Indien

Studium

- 1999 bis 2000** **Diplomarbeit** am Institut für Genetik der Universität Mainz
 Titel: „Experimentelle Analyse zeitlicher Aspekte der
 Determination von Vorläuferzellen des zentralen Nervensystem
 im *Drosophila-Embryo*“
 (Gesamtnote „sehr gut“)
- Dezember 1998** **Diplomprüfungen:**
 Genetik (Schwerpunkt: Entwicklungsgenetik)
 Zoologie (Schwerpunkt: Zellbiologie)
 Botanik (Schwerpunkt: Genetik)
 Immunologie (molekulare Immunologie/Immunogenetik)
 (Gesamtnote: „sehr gut“)
- Juli 1995** **Vordiplom**
 (Gesamtnote: „sehr gut“)
- Oktober 1992** Beginn des **Studiums der Biologie** (Diplom) an der Johannes
 Gutenberg-Universität in Mainz.
- Mai 1991** **Abitur** am Friedrich-Wilhelm Gymnasium Trier
- 1991 bis 1992** **Zivildienst** beim Arbeiter-Samariter Bund Trier.
-

Publikationen

Berger, C., Urban, J. and Technau, G. M. (2001).

Stage-specific inductive signals in the *Drosophila* neuroectoderm control the
 temporal sequence of neuroblast specification. *Development* **128**, 3243-51

**Berger, C., Pallavi, S.K., Prasad, Mohit, L.S. Shashidhara and Gerhard M.
 Technau** (2004).

A critical role for *Cyclin E* in cell fate determination in the central nervous system of
Drosophila
 In Vorbereitung.