



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

„Untersuchungen zur frühembryonalen
Musterbildung und Neurogenese in den
gnathalen und prägnathalen
Gehirnanteilen von
Drosophila melanogaster“

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

David Jussen

geb. am 05.11.1983 in Lahnstein

Mainz, Januar 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 27.04.2017

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Embryonalentwicklung des Bauchmarks von <i>Drosophila</i>	2
1.2. Regulation von <i>Epidermal growth factor receptor</i> -Aktivität im embryonalen Bauchmark	5
1.3. Embryonale Hirnentwicklung in <i>Drosophila</i>	7
1.4. Embryonalentwicklung der gnathalen Neuromere	12
1.5. Ziele dieser Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Verwendete Materialien	14
2.1.1. Kits	14
2.1.2. Lösungen und Medien	14
2.1.3. Sonstige Chemikalien	18
2.1.4. Gebrauchsmaterialien	18
2.1.5. Geräte	19
2.1.6. Software	19
2.2. Fliegenzucht	20
2.2.1. Stabilisierung letaler Mutationen durch Balancerchromosomen	20
2.2.2. Verwendete Fliegenstämme	21
2.2.3. Genetische Kreuzungen	23
2.3. Gewinnung und Fixierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	26
2.3.1. Eiablage	26
2.3.2. Dechorionisierung von Embryonen	27
2.3.3. Fixierung und Devitellinisierung von Embryonen	27
2.4. <i>in situ</i> -Hybridisierung	27
2.4.1. Synthese von RNA- <i>antisense</i> -Sonden	28
2.4.2. Hybridisierungsprotokoll	30
2.4.3. Verwendete RNA- <i>antisense</i> -Sonden	33
2.5. Antikörperfärbung	34
2.5.1. Präabsorption von Antiseren	34
2.5.2. Färbeprotokoll	34
2.5.3. Verwendete Antikörper	36
2.6. Präparation von <i>Drosophila</i> -Embryonen	38
2.6.1. <i>whole-mount</i> -Präparation	38

2.6.2. Filetpräparation.....	39
2.7. Auswertung und Dokumentation.....	39
2.7.1. Differentialinterferenzkontrastmikroskopie	39
2.7.2. Konfokale Laserscanningmikroskopie	40
2.7.3. Bildbearbeitung.....	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Regulation und Funktion des Epidermal growth factor-Rezeptor in der embryonalen Hirnanlage	41
3.1.1. EGFR folgt im pNE einem dynamischen, segment-spezifischen Aktivierungsmuster	41
3.1.2. EGFR kontrolliert die <i>ind</i> -Expression im DC durch die Phosphorylierung des Co-Repressors Groucho	43
3.1.3. EGFR wird transient in Hirnneuroblasten aktiviert	44
3.1.4. EGFR unterdrückt Apoptose im procephalen Neuroektoderm	46
3.1.5. EGFR reguliert die Bildung von Hirnneuroblasten nicht nur durch die Unterdrückung von Apoptose im procephalen Neuroektodem	48
3.1.6. EGFR ist notwendig für die Bildung ventraler Hirnneuroblasten.....	49
3.1.7. EGFR reguliert die Expression des proneuralen Gens <i>lethal of scute</i> im procephalen Neuroektoderm.....	51
3.1.8. EGFR reguliert Zellteilungen der frühen Hirnanlage	54
3.1.9. Zusammenfassung: Funktionen des EGFR in der frühen Hirnentwicklung.....	55
3.1.10. Die Verteilung von EGFR-Ligandenquellen in der frühen Hirnanlage zeigt deutliche segmentspezifische Unterschiede.....	55
3.1.11. <i>rhomboid</i> wird zur EGFR-Aktivierung in allen Hirnneuromeren benötigt, <i>vein</i> jedoch nur im Deutocerebrum und ventralen Protocerebrum.....	58
3.1.12. Der EGFR-Antagonist <i>argos</i> wird außergewöhnlich stark im dorsalen Tritocerebrum exprimiert.....	59
3.1.13. <i>argos</i> begrenzt EGFR-Aktivität im procephalen Neuroektoderm und beeinflusst die dorsoventrale Musterbildung im Tritocerebrum	61
3.1.14. Das DV-Gen <i>vnd</i> wird für <i>vein</i> -Expression in der frühen Hirnanlage benötigt.....	62
3.1.15. Die EGFR-abhängigen DV-Gene <i>vnd</i> , <i>ind</i> und <i>Nkx6</i> kontrollieren die Expression von <i>argos</i> im Tritocerebrum	63
3.1.16. Vnd kontrolliert die EGFR-Aktivität in der frühen Hirnanlage	65
3.1.17. Das cephalo Lückengen <i>tailless</i> wird für die Expression von <i>rhomboid</i> und <i>vein</i> im Protocerebrum benötigt	66
3.1.18. Single-minded wird für die <i>rhomboid</i> - und <i>vein</i> -Expression im procephalen Mesektoderm und somit für die EGFR-Aktivierung im angrenzenden Tritocerebrum benötigt.....	68

3.1.19. Zusammenfassung: Regulation der EGFR-Aktivität in der frühen Hirnanlage	70
3.2. Identifikation und molekulare Charakterisierung von gnathalen NBs.....	72
3.2.1. Darstellung der segmentalen Neuroblastenpopulation in den gnathalen Neuromeren..	74
3.2.2. Charakterisierung der segmentalen NB-Population in den gnathalen Neuromeren.....	75
3.2.3. Expressionsmuster molekularer Marker in gnathalen Neuroblasten	80
3.2.3.1. Temporale Spezifizierungsfaktoren.....	80
3.2.3.2. Dorsoventrale Musterbildungsgene.....	82
3.2.3.3. Segmentpolaritätsgene	85
3.2.3.4. Lückengene.....	87
3.2.3.5. Homöotische Gene	89
3.2.3.6. Andere Gene.....	91
3.2.3.7. Zellstammbaum-Marker.....	93
3.2.4. Der Mittellinienvorläufer MP2 in den gnathalen Neuromeren	97
4. Diskussion.....	99
4.1. Funktion und Regulation des EGFR in der frühen Hirnentwicklung.....	99
4.1.1. EGFR beeinflusst die Bildung von Hirn-NBs durch Unterdrückung von Apoptose im pNE99	
4.1.2. EGFR beeinflusst die Ausdehnung des pNE durch die Regulation früher Mitosen.....	100
4.1.3. EGFR reguliert die Bildung von Hirn-NBs durch die Expressionskontrolle proneuraler Gene	100
4.1.4. EGFR wird in mehreren Entwicklungsschritten für die Bildung spezifischer Hirn-NBs benötigt.....	101
4.1.5. EGFR ermöglicht die Expression von <i>ind</i> im DC durch die Phosphorylierung des Co- Repressors Groucho	102
4.1.6. EGFR-Aktivität hängt in der embryonalen Hirnanlage von einer segment-spezifischen Verteilung von Liganden ab.....	102
4.1.7. Tailless wird für die Sekretion von EGFR-Liganden aus dem protocerebralen Neuroektoderm benötigt	105
4.1.8. DV-Gene kontrollieren die EGFR-Aktivität durch die Regulation von <i>vein</i> und <i>argos</i>	106
4.1.9. Phylogenetische Betrachtung der EGFR-Funktion bei der Musterbildung der Hirnanlage	107
4.2. Identifikation und molekulare Charakterisierung gnathaler Neuroblasten.....	107
4.2.1. Die individuelle Charakterisierung embryonaler NBs im ZNS von <i>Drosophila</i> wurde durch die Charakterisierung gnathaler NBs vervollständigt.....	107
4.2.2. Gnathale Neuroblasten sind homolog zu Rumpfneuroblasten, zeigen jedoch Modifikationen in ihrem Entstehungsmuster und Expressionsprofil	108

4.2.3. Neuroblastenzellstammbäume werden in den gnathalen Neuromeren segmentspezifisch modifiziert	111
5. Zusammenfassung/Summary.....	112
5.1. Zusammenfassung.....	112
5.2. Summary	112
6. Referenzen	114
7. Anhang	125
7.1. Abbildungen	125
7.2. Tabellen	127
7.3. Abbildungsverzeichnis.....	131
7.4. Tabellenverzeichnis	132
7.5. Abkürzungsverzeichnis	133
7.6. Lebenslauf	138
7.7. Publikationsleistungen	139
7.8. Eidesstattliche Erklärung.....	139
7.9. Danksagungen	140

1. Einleitung

Das Gehirn leistet erstaunliche Aufgaben, die sich von der Koordination lebenswichtiger Körperfunktionen bis hin zu höheren Funktionen wie Bewusstsein, Lernen oder Erinnerung erstrecken. Der Schlüssel zu diesen Hirnleistungen liegt im Verschaltungsmuster von Neuronen zu anspruchsvollen neuronalen Schaltkreisen (Kandel et al., 2013). Um die Funktion solcher Schaltkreise zu gewährleisten ist es unerlässlich, dass während der Entwicklung aus der Vielzahl existierender Klassen das jeweils richtige Neuron an der vorgesehenen Position und zum passenden Zeitpunkt gebildet wird. Neurone gehen aus frühembryonal angelegten neuronalen Vorläuferzellen hervor (zusammengefasst in Technau et al., 2006; Paridaen und Huttner, 2014). In diesen laufen präzise genetische Musterbildungs- und Spezifizierungsmechanismen ab, welche den Vorläuferzellen ihrer Position im Embryo entsprechende Identitäten verleihen. Unterschiedliche Identitäten spiegeln sich in der Aktivierung verschiedener Genexpressionsprofile wieder, die wiederum zur Bildung spezifischer Neurone führen (zusammengefasst in Briscoe und Ericson, 2001; Urbach und Technau, 2004; Kiecker und Lumsden, 2005; Lupo et al., 2006; Technau et al., 2006; Dessaud et al., 2008; O'Leary und Sahara, 2008; Le Dreau und Marti, 2012; Technau et al., 2014).

Die Entstehung eines funktionalen Nervensystems hängt also fundamental von genetischen Kontrollmechanismen ab. Solche wurden in den vergangenen Jahrzehnten intensiv am embryonalen Bauchmark von *Drosophila melanogaster* (kurz *Drosophila*) erforscht. Grund dafür ist eine Reihe an Vorzügen, die *Drosophila* als Modellorganismus in der Neuroentwicklungsbiologie bietet. Durch die über 100-jährige Tradition als Labororganismus¹ liegen detaillierte Kenntnisse über Aufbau und Entwicklung von *Drosophila* vor. Diese reichen bis zur Beschreibung des embryonalen Bauchmarks auf Einzelzellebene (Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Ito et al., 1995; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Durch die umfangreiche Verfügbarkeit von Methodenprotokollen und mutanten/transgenen Fliegenstämmen sind daher in *Drosophila* – insbesondere in Anbetracht der kurzen Generationszeit – präzise genetische Manipulationen möglich (zusammengefasst in Venken und Bellen, 2005; del Valle Rodriguez et al., 2011; Venken et al., 2011; Gratz et al., 2013). Die Rolle einzelner Gene und Genprodukte während der Neurogenese kann so in beispiellosem Detail untersucht werden. Die dabei erlangten Erkenntnisse werden zunehmend auf die Entwicklung des wesentlich komplexer aufgebauten Gehirns angewandt und sind auf Grund der hohen evolutionären Konservierung von Entwicklungsprozessen und den beteiligten Genen zudem vielfach auf die Entwicklung höherer Organismen anwendbar (z.B. Arendt und Nübler-Jung, 1999; Cornell und Ohlen, 2000; Lichtneckert und Reichert, 2005; Bellen et al., 2010).

¹ *Drosophila* wurde erstmalig zu Beginn des 20. Jahrhunderts in der Harvard University von W. E. Castle als genetischer Modellorganismus im Rahmen einer Studie zur Inzucht genutzt (Castle, 1906).

1.1. Embryonalentwicklung des Bauchmarks von *Drosophila*

Das zentrale Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* besteht aus Gehirn und Bauchmark. Es geht aus definierten Anteilen des Ektoderms hervor, die frühembryonal beidseitig der ventralen Mittellinie angelegt werden. Diese werden als neurogene Regionen oder Neuroektoderm (NE) bezeichnet und lassen sich grob in ventrales (vNE) und procephales NE (pNE) unterteilen (**Abb. 1-1 A**) (Poulson, 1950; Hartenstein und Campos-Ortega, 1984). Aus dem vNE geht das ventrale Nervensystem (VNS) (auch Bauchmark genannt) hervor, welches sich über den Rumpf und den posterioren (gnathalen) Kopfabschnitt erstreckt. Das pNE bildet hingegen den wesentlichen, prägnathalen Hirnabschnitt (auch Cerebrum genannt). Da das Bauchmark vergleichsweise einfach aufgebaut ist, sind frühe Neurogeneseprozesse insbesondere im vNE des Rumpfes umfassend beschrieben (zusammengefasst in Skeath und Thor, 2003; Technau et al., 2006; Technau et al., 2014).

Durch die Aktivität von Segmentierungsgenen (maternale Koordinatengene, Lückengene und Paarregelgene) wird das vNE des Rumpfes entlang der AP-Achse in 13 Segmente unterteilt (drei Thorakal- und zehn Abdominalsegmente; T1-T3 bzw. A1-A10), was zu einer Untergliederung des vNE in segmentale Einheiten (sog. Neuomere) führt (zusammengefasst in Skeath und Thor, 2003; Technau et al., 2014). Jedes Segment bzw. Neuomer lässt sich auf Grund der bilateralsymmetrischen Anordnung des NE weiter in zwei identische Hemisegmente bzw. -neuomere unterteilen, welche durch die mesektodermalen Zellen der ventralen Mittellinie voneinander getrennt sind (zusammengefasst in Scott und Carroll, 1987; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). In jedem Hemineuomer werden durch die Aktivität proneuraler Gene des *achaete-scute*-Komplexes (AS-C) (*achaete* (*ac*), *scute* (*sc*) und *lethal of scute* (*l'sc*)) ektodermale Zellcluster definiert, welche ein neurales Zellschicksal annehmen können (sog. proneurale Cluster) (**Abb. 1-1 A**) (zusammengefasst in Skeath und Carroll, 1994). Durch einen lateralen Inhibitionsmechanismus wird innerhalb jedes proneuralen Clusters eine Zelle selektiert, welche aus dem NE delaminiert, und sich zu einer neuronalen Stammzelle entwickelt (in Insekten Neuroblast (NB) genannt). In den übrigen Zellen wird das neurale Zellschicksal zugunsten eines epidermalen Schicksals unterdrückt (**Abb. 1-1 B**) (Skeath und Carroll, 1992). Jeder NB erhält eine einzigartige, seiner Position im Neuomer und dem Delaminationszeitpunkt entsprechende Identität. Diese spiegelt sich durch ein charakteristisches Expressionsprofil molekularer Marker sowie die Produktion eines spezifischen Zellstammbaums wieder (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984; Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Birkholz et al., 2013a). Da die frühen Musterbildungsmechanismen zwischen den Rumpfsegmenten weitestgehend identisch ablaufen, wird in jedem Rumpf-Hemineuomer eine stereotype, segmental repetitive Population von ~30 NBs gebildet², die in fünf aufeinanderfolgenden Segregationswellen (S1-S5) aus dem NE delaminiert (**Abb. 1-2**) (Doe, 1992; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

² Eine Ausnahme stellen die terminalen abdominalen Neuomere A8-A10 dar, in welchen die Bildung bestimmter Neuroblasten durch die Aktivität des Hox-Gens *Abdominal-A* in Kooperation mit dem ParaHox-Gen *caudal* unterdrückt wird (Birkholz et al., 2013b).

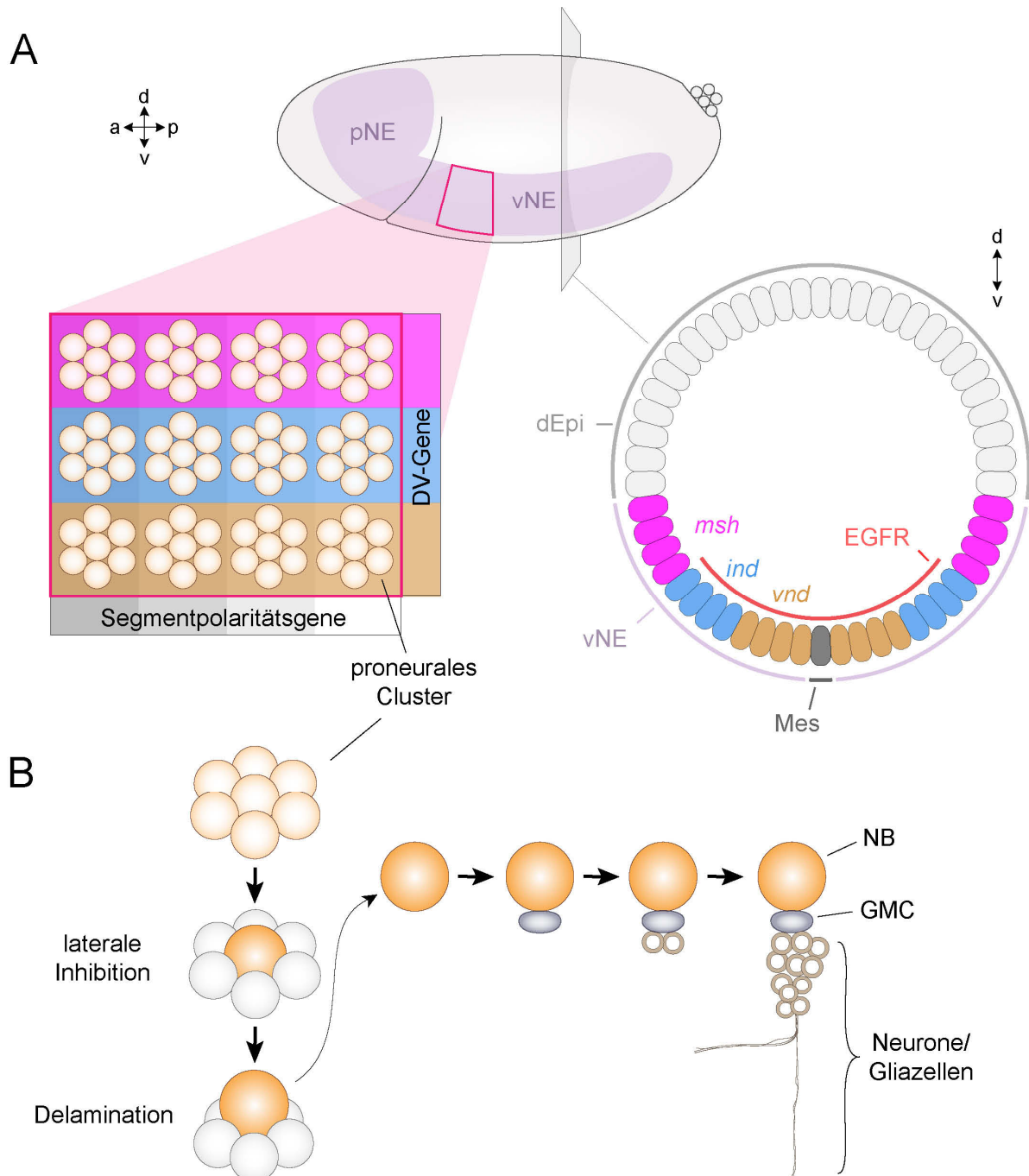


Abb. 1-1: Frühe Neurogenese in *Drosophila*

Schematische Darstellung der Musterbildungsmechanismen im Neuroektoderm (NE) (A) und der Neuroblasten (NB)-Entwicklung (B). (A) Lateralansicht eines frühen *Drosophila*-Embryos zu Beginn der Gastrulation. Das Neuroektoderm (violett) lässt sich in ventrales NE (vNE) und procephales NE (pNE) unterteilen. Im vNE wird jedes Neuromer (roter Kasten) durch DV- und Segmentpolaritätsgene entlang der anterioposterior (AP)- und dorsoventral (DV)-Achse unterteilt, wodurch proneuralen Clustern unterschiedliche Positionsinformationen zugeteilt werden. Im Transversalschnitt (unten rechts) ist die Unterteilung des Ektoderms entlang der DV-Achse in die Anlage der dorsalen Epidermis (dEpi; grau), vNE (violett) und Mesektoderm (Mes; entspricht der ventralen Mittellinie; dunkelgrau) dargestellt (auf die Darstellung des Mesoderms wurde verzichtet). Die DV-Gene *vnd* (braun), *ind* (blau) und *msh* (pink) sowie der EGFR-Signalweg (rot) unterteilen das vNE entlang der DV-Achse. (B) Innerhalb jedes proneuralen Clusters wird durch laterale Inhibition eine Zelle selektiert, welche durch starke Expression proneuraler Gene (orange) charakterisiert ist und proneurale Genexpression in den übrigen Zellen inhibiert (grau). Diese delaminiert als NB und generiert daraufhin eine Reihe Gangliengmutterzellen (GMCs), welche sich jeweils in ein Paar postmitotischer Neurone und/oder Gliazellen teilen. a=anterior; p=posterior; d=dorsal; v=ventral. Darstellungen basieren auf Hartenstein und Campos-Ortega (1984), Skeath (1999), Skeath und Thor (2003) und R. Urbach (unveröffentlicht).

Korrespondierende NBs verschiedener Rumpfsegmente haben dabei vergleichbare Identitäten und werden als seriell homologe NBs bezeichnet (zusammengefasst in Skeath und Thor, 2003; Technau et al., 2006). Nach der Delamination generiert jeder NB durch etwa 5-10 asymmetrische Teilungen im Stammzellmodus eine Reihe von Gangliennutterzellen (GMCs), welche durch eine weitere symmetrische Teilung je zwei postmitotische Neurone und/oder Gliazellen hervorbringen (**Abb. 1-1 B**). So entstehen in jedem Rumpf-Hemisegment von T1-A7 etwa 350 Neurone und 30 Gliazellen, aus welchen sich das metamere Bauchmark zusammensetzt (Ito et al., 1995; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997).

Im NE sind Musterbildungsgene aktiv, welche entstehende NBs entsprechend ihrer Position im Neuomer spezifizieren (**Abb. 1-1 A**) (zusammengefasst in Skeath, 1999; Skeath und Thor, 2003). Dazu gehören Segmentpolaritätsgene, die in jedem Rumpfsegment in aneinandergrenzenden Transversalstreifen exprimiert werden, wodurch sie Positionsinformationen entlang der anterior-posterioren (AP) Körperachse vermitteln. Die Unterteilung des NE entlang der dorso-ventralen (DV) Körperachse wird durch die DV-Musterbildungsgene (DV-Gene; auch bekannt als Kolumnargene) *ventral nervous system defective (vnd)*, *intermediate neuroblasts defective (ind)* und *muscle segment homeobox (msh; Drop [Dr] – FlyBase)* bewerkstelligt (Jiménez et al., 1995; Mellerick und Nirenberg, 1995; D'Alessio und Frasch, 1996; Buescher und Chia, 1997; Isshiki et al., 1997; Chu et al., 1998; Weiss et al., 1998). Diese Homeobox-Transkriptionsfaktoren werden im Rumpf in benachbarten, longitudinalen Streifen im ventralen (*vnd*-exprimierenden), intermediären (*ind*-exprimierenden) und dorsalen (*msh*-exprimierenden) NE exprimiert (**Abb. 1-1 A**). Die aneinandergrenzenden, sich gegenseitig ausschließenden Expressionsdomänen kommen dabei zustande, da DV-Gene ihre Expression gegenseitig reprimieren (Cowden und Levine, 2003; Seibert, 2010). Entsprechend des Bildungsortes in *vnd*-, *ind*- oder *msh*-exprimierendem NE werden NBs ventrale, intermediäre oder dorsale Identitäten zugewiesen (Buescher und Chia, 1997; Chu et al., 1998; McDonald et al., 1998; Weiss et al., 1998; Shao et al., 2002). Darüber hinaus kontrollieren *vnd* und *ind* die Expression proneuraler Gene und werden für die Bildung ventraler bzw. intermediärer Neuroblasten benötigt (Jiménez und Campos-Ortega, 1990; Skeath et al., 1994; Chu et al., 1998; Weiss et al., 1998; Buescher et al., 2002).

Die Expression der DV-Gene im NE wird durch dorsoventrale Gradienten des Bone Morphogenetic Protein (BMP)-Homologs Decapentaplegic (Dpp), des NF- κ B-Homologs Dorsal (DI) und Aktivität des Epidermal growth factor-Rezeptors (EGFR) reguliert (Skeath, 1998; von Ohlen und Doe, 2000). Neben Induktion und Aufrechterhaltung der DV-Genexpression regulieren diese Faktoren die Ausdehnung derer Expressionsdomänen entlang der DV-Achse des Embryos, wobei EGFR eine zentrale Rolle spielt. EGFR-Aktivität wird zusammen mit DI benötigt, um *ind*-Expression zu induzieren und die dorsale Grenze der *ind*-Domäne zu definieren (von Ohlen und Doe, 2000). Dies bewerkstelligt EGFR durch die räumlich begrenzte Inaktivierung des *ind*-Repressors Capicua (Cic) und des Co-Repressors Groucho (Gro) (Cinnamon et al., 2008; Ajuria et al., 2011). Zusätzlich ist EGFR-Aktivität notwendig, um durch DI induzierte *vnd*-Expression im NE aufrechtzuerhalten (von Ohlen und Doe, 2000; Zhao und Skeath, 2002). Auch die regionalisierte Expression proneuraler Gene des AS-C wird von EGFR mitbestimmt (Skeath, 1998). Als Resultat der Regulation von DV- und

proneuralen Genen zeigen EGFR-Mutanten deutliche Defekte bei der frühen NB-Entwicklung. So werden im EGFR-mutanten VNS keine intermediären NBs gebildet und ventrale NBs mit dorsalen Identitäten mis-spezifiziert (Skeath, 1998). Auf Grund des direkten (durch die Kontrolle der *vnd* und *ind*-Expression) und indirekten (durch die gegenseitige Regulation von DV-Genen) Einflusses von EGFR auf die dorso-ventrale Unterteilung des Rumpf-NE, und damit auf die Spezifizierung und Bildung von NBs, stellt die präzise räumlich-zeitliche Regulation der EGFR-Aktivität einen kritischen Punkt in der frühen Neurogenese dar.

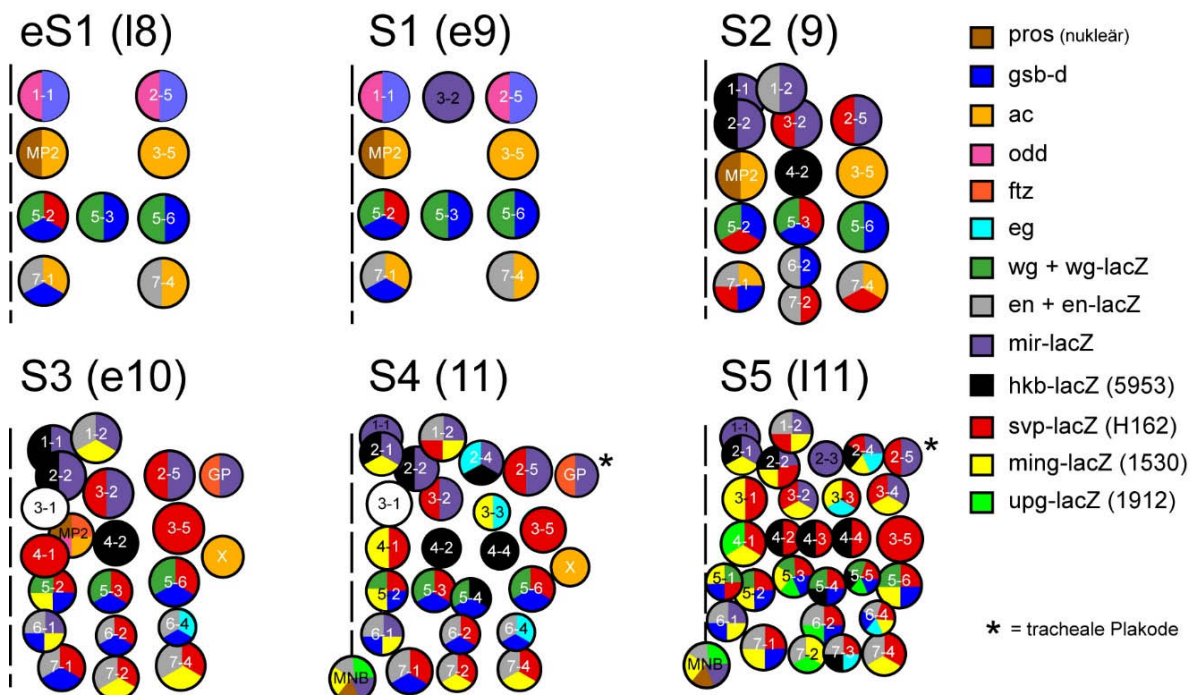


Abb. 1-2: Entstehungsmuster und Expressionsprofil von Rumpf-Neuroblasten

Dargestellt ist die NB-Population eines Rumpf-Hemisegments in den fünf aufeinanderfolgenden Segregationswellen S1-S5. Anterior ist oben; gestrichelte Linie indiziert die ventrale Mittellinie; Angaben in Klammern indizieren das jeweilige Embryonalstadium. Jeder NB ist durch die Lage und ein spezifisches Expressionsprofil molekularer Marker entsprechend des rechts indizierten Farbcodes charakterisiert (Abb. aus Doe, 1992; Broadus et al., 1995).

1.2. Regulation von *Epidermal growth factor receptor*-Aktivität im embryonalen Bauchmark

Die Regulation der EGFR-Aktivität im Rumpf-NE wurde in der Vergangenheit recht umfassend erforscht. EGFR selbst wird ubiquitär im Ektoderm exprimiert (Zak und Shilo, 1990). Im frühen Embryo wird EGFR jedoch spezifisch im ventralen und intermediären Rumpf-NE aktiviert und im Verlauf der Gastrulation im intermediären NE herunterreguliert (Skeath, 1998). Dies resultiert vorübergehend in einer graduellen EGFR-Aktivierung (stark im ventralen NE, schwach im intermediären NE), wodurch mutmaßlich unterschiedliche Zielgene im ventralen bzw. intermediären NE induziert werden (Golembo et al., 1999). Das dynamische EGFR-Aktivierungsmuster im Rumpf-NE hängt von der räumlich begrenzten Sekretion der Liganden Spitz (*Spi*) und Vein (*Vn*) ab (zusammengefasst in Shilo, 2003; Shilo, 2005).

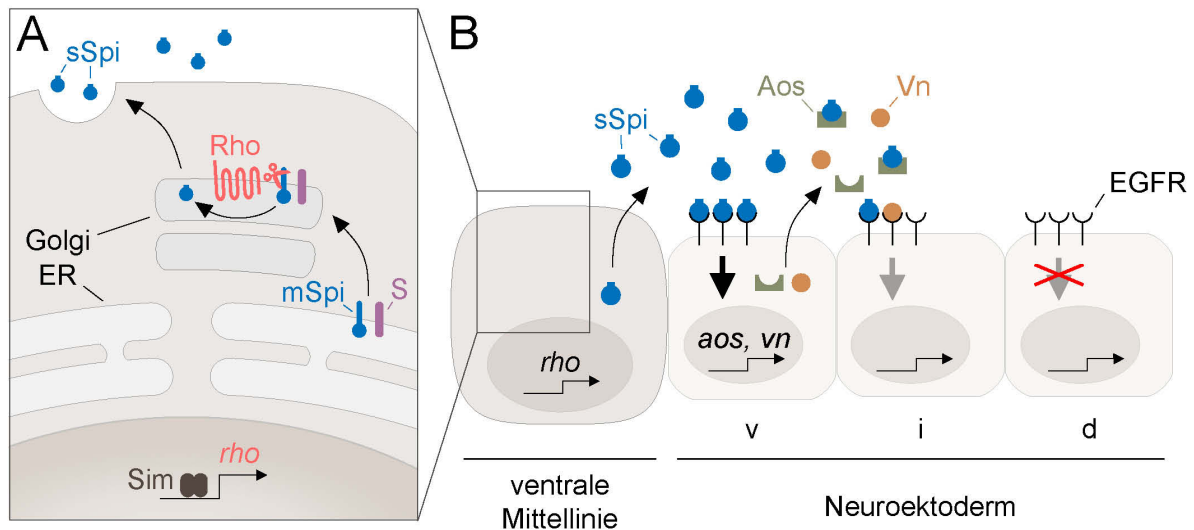


Abb. 1-3: Regulation der EGFR-Aktivität im embryonalen VNS

(A) Intrazelluläre Vorgänge in Zellen der ventralen Mittellinie, die zur Sekretion von Spitz (Spi) führen. Der mesektodermale Transkriptionsfaktor Single-minded (Sim) ist spezifisch in der ventralen Mittellinie aktiv und reguliert die Expression der Transmembranprotease *rhombid* (*rho*). Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) liegt Spi als membranboundener Vorläufer vor (mSpi) vor. Mit Hilfe des Chaperons Star (S) wird mSpi in den Golgi-Apparat transportiert. Dort reguliert Rho die proteolytische Spaltung von mSpi (Schere), wodurch Spi freigesetzt und sekretiert wird (sSpi). (B) Schematischer Querschnitt durch die ventrale Mittellinie und das angrenzende ventrale (v), intermediäre (i) und dorsale (d) Neuroektoderm eines Rumpf-Hemisegments. Die ventrale Mittellinie sekretiert den EGFR-Liganden sSpi, welcher im benachbarten ventralen Kompartiment EGFR aktiviert. Downstream des EGFR wird dort die Expression von *argos* (*aos*) und *vein* (*vn*) induziert. Nach Sekretion bindet und inaktiviert AOS sSpi, weshalb wenig sSpi zur EGFR-Aktivierung im intermediären Neuroektoderm zur Verfügung steht. Zusammen mit dem schwachen, sekretierten EGFR-Liganden Vn wird dort dennoch ein schwaches EGFR Signal induziert. Im dorsalen Neuroektoderm steht kein EGFR-Ligand zur Verfügung, und EGFR wird nicht aktiviert. In den dorso-ventralen Kompartimenten (v, i, d) entstehen so unterschiedliche Stärken an EGFR-Aktivität, die zur Induktion unterschiedlicher Zielgene führen. (Abb. abgeändert nach Golembo et al., 1996a; Golembo et al., 1999; Shilo, 2005)

Das TGF α -Homolog Spi stellt in diesem Zusammenhang den Hauptliganden dar, während Vn eine untergeordnete Rolle bei der EGFR-Aktivierung zukommt (siehe unten) (Schnepp et al., 1996; Skeath, 1998; Golembo et al., 1999). Spi wird als inaktiver membranständiger Vorläufer (mSpi) exprimiert. Die Aktivierung von Spi benötigt den Transport von mSpi in den Golgi-Apparat durch das Chaperon Star (S), wo es durch die Transmembranprotease Rhomboid (Rho) proteolytisch gespalten und sekretiert wird (Rutledge et al., 1992; Kolodkin et al., 1994; Schweitzer et al., 1995b; Tsruya et al., 2002) (Abb. 1-3 A). Das räumlich-zeitliche Spi-Sekretierungsmuster wird dabei auf Ebene der *rho*-Expression reguliert, die im Gegensatz zu den relativ umfangreich exprimierten *spi* und *S* streng kontrolliert wird (Bier et al., 1990; Heberlein et al., 1993; Kolodkin et al., 1994; Golembo et al., 1996a; Gabay et al., 1997a). Im frühen Blastodermstadium wird *rho* unter Kontrolle des DL-Gradienten im ventralen NE exprimiert (Ip et al., 1992; Stathopoulos et al., 2002), jedoch mit fortschreitender Gastrulation auf die mesektodermalen Zellen der ventralen Mittellinie (vML) begrenzt, wo *rho* in Abhängigkeit des mesektodermalen Transkriptionsfaktors Single-minded (Sim) exprimiert wird (Chang et al., 2001). In dieser Phase stellt die vML die exklusive Spi-Sekretionsquelle und somit wichtigste EGFR-Ligandenquelle im embryonalen VNS dar (Golembo et al., 1996a; Gabay et al., 1997a).

Im Gegensatz zu Spi wird das Neuregulin-Homolog Vn als sekretierter Ligand im ventralen Rumpf-NE exprimiert und bedarf keiner weiteren Prozessierung (Schnepf et al., 1996). Während die Aktivierung der *vn*-Expression vermutlich ebenso vom DI-Gradienten abhängt, wird die weitere Expression vom Transkriptionsfaktor PointedP1 (PntP1) reguliert, welcher durch Spi-abhängige EGFR-Aktivität im ventralen NE induziert wird (Golembo et al., 1999; Markstein et al., 2004). Vn ist somit ein positiver *feedback*-regulator des EGFR-Signalwegs. Im Vergleich zu Spi verursacht Vn jedoch inhärent eine schwächere Aktivierung des EGFR (Schnepf et al., 1998). Auch in Bezug auf die Aktivierung EGFR-abhängiger Musterbildungsgene spielt Vn im Vergleich zu Spi eine untergeordnete Rolle. So verläuft die Aktivierung von EGFR und dessen Zielgenen im Rumpf-NE auf Grund der Redundanz von Spi und Vn in *vn*-Mutanten weitgehend normal. Da *vn*-Expression im Rumpf-NE jedoch von Spi/EGFR abhängt, weisen *rho* bzw. *spi*-Mutanten diesbezüglich deutliche Defekte auf (Skeath, 1998; Golembo et al., 1999). Vn spielt somit im Rumpf-NE lediglich eine Rolle als redundanter EGFR-Ligand, welcher bei beeinträchtigter Spi-Aktivität eine hinreichend starke Rezeptoraktivierung sicherstellen soll (Golembo et al., 1999).

Neben den aktivierenden Liganden Spi und Vn wird das EGFR-Aktivierungsmuster im vNE durch den sekretierten EGFR-Antagonisten Argos (Aos) reguliert (Freeman et al., 1992; Schweitzer et al., 1995a). Aos inhibiert EGFR Aktivität durch Sequestrierung des EGFR-Liganden Spi (Klein et al., 2004; Klein et al., 2008). Ähnlich wie Vn ist auch Aos ein EGFR-Feedback-Regulator, welcher *downstream* von EGFR durch PntP1 im ventralen NE induziert wird (Golembo et al., 1996b). Aos sorgt so einerseits dafür, dass EGFR nach Induktion wieder inaktiviert wird, und andererseits für eine räumliche Begrenzung der EGFR-Aktivität, welche in *aos*-Mutanten umfangreicher ausfällt und verlängert aufrechterhalten wird (Schweitzer et al., 1995a; Golembo et al., 1996b; Gabay et al., 1997a).

1.3. Embryonale Hirnentwicklung in *Drosophila*

Das Gehirn von *Drosophila* wird traditionell in Proto- (PC), Deuto- (DC) und Tritocerebrum (TC) (von anterior nach posterior) unterteilt. Zusammen mit den gnathalen Neuromeren (siehe Kapitel 1.4) bilden diese prägnathalen Hirnabschnitte das adulte Gehirn (Ito et al., 2014). Die prägnathalen Hirnabschnitte gehen aus dem pNE hervor, welches im procephalen Kopfbereich des Embryos liegt (Poulson, 1950; Hartenstein und Campos-Ortega, 1984). Im Vergleich zum Rumpf-Ektoderm ist dieser weniger deutlich segmentiert, lässt sich jedoch basierend auf der Expression von Segmentpolaritätsgenen dennoch bereits im frühen Embryo in die Anlagen des Labral-, Okular-, Antennal- und Interkalarsegments unterteilen (Schmidt-Ott und Technau, 1992; Urbach und Technau, 2003b) (**Abb. 1-4 A**). Das PC wird dabei aus den Neuromeren des Labral- und Okularsegments gebildet, während DC und TC jeweils aus den Neuromeren des Antennal- bzw. Interkalarsegments hervorgehen (Schmidt-Ott und Technau, 1992; Urbach und Technau, 2003b).

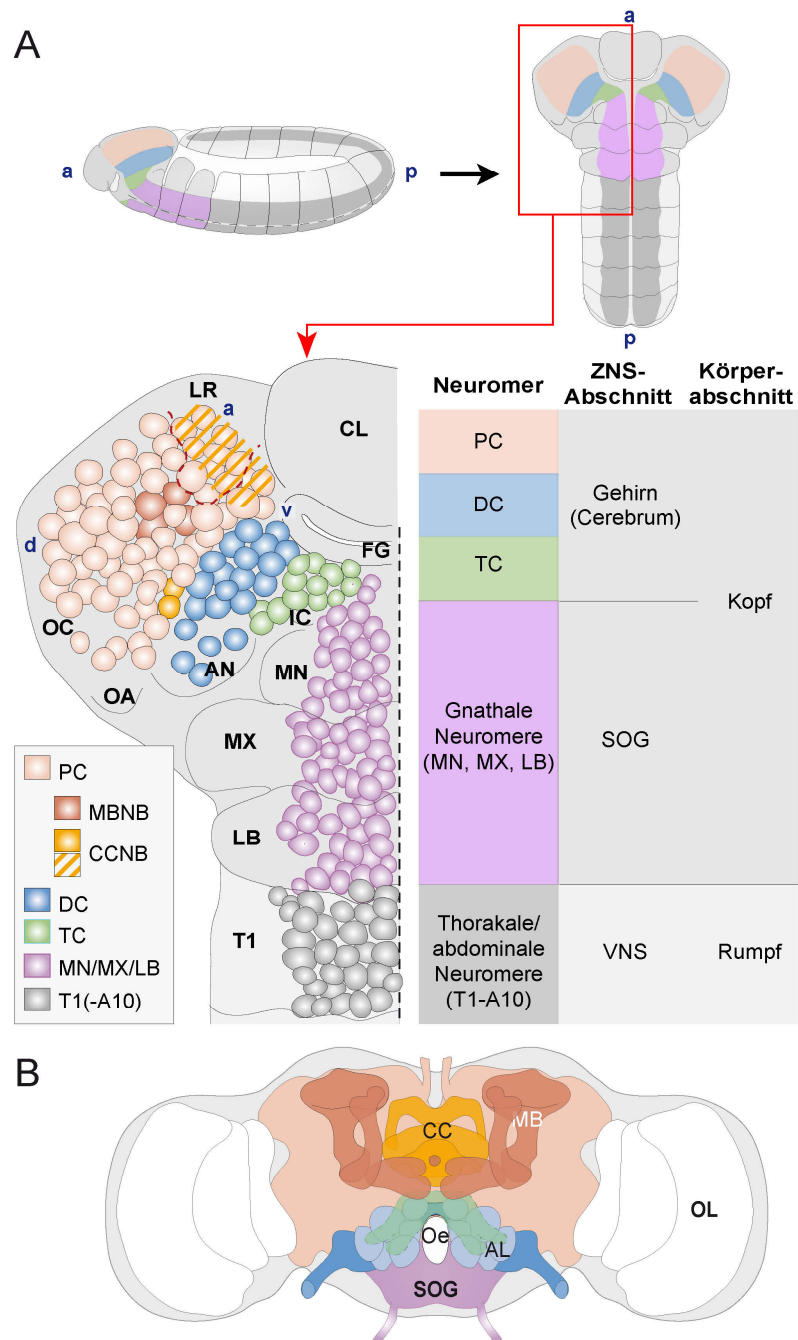


Abb. 1-4: Embryonalanlagen der prägnathalen und gnathalen Hirnabschnitte in *Drosophila*

(A) Schematische Darstellung des zentralen Nervensystems (ZNS) in Stadium 11 im *whole-mount*-Embryo (oben links) und nach Filetpräparation (oben rechts). Die Neuromere des ZNS sind entsprechend des angegebenen Farbcodes koloriert (apricot=Protocerebrum (PC); blau=Deutocerebrum (DC); grün=Tritocerebrum (TC); lila=gnathale Neuromere; dunkelgrau=thorakale/abdominale Neuromere (T1-A10)). In der Vergrößerung ist die Anordnung der Neuroblasten (NBs) in diesen Neuromeren gezeigt, welche sich bestimmten Segmenten zuordnen lassen (LR=Labralsegment; OC=Okularsegment; AN=Antennalsegment; IC=Interkalarsegment; MN=Mandibularsegment; MX=Maxillarsegment; LB=Labialsegment; T1=Prothorakalsegment (stellvertretend für thorakale/abdominale Rumpfsegmente)). Protocerebrale NBs sind entsprechend der Hirnstrukturen, die aus ihnen hervorgehen, farblich unterteilt (siehe B). a=anterior; p=posterior; d=dorsal; v=ventral; OA=Optische Anlagen; FG= foregut (Vorderdarmanlage); CL=Clypeolabrum, SOG=Subösophagealganglion; VNS=ventrales Nervensystem; MBNB=*mushroom body neuroblasts* (Pilzkörper-NBs); CCN=*central complex neuroblasts* (Zentralkomplex-NBs) (B) Schematische Darstellung des adulten Gehirns (Aufsicht von anterior). Die Hirnneuromere bzw. spezifische Hirnstrukturen sind entsprechend ihres Ursprungs koloriert (vgl. A). MB=*mushroom bodies* (Pilzkörper; dunkelrot); CC=*central complex* (Zentralkomplex); AL=Antennallobus; Oe=Oesophagus; SOG=Subösophagealganglion; OL=optische Loben (gehen aus den OA hervor; siehe A) (Abb. abgeändert nach Urbach und Technau, 2004)

Ähnlich wie im vNE wird die Bildung von Hirn-NBs durch die Expression proneuraler Gene des AS-C reguliert. Im Gegensatz zum VNS werden Hirn-NBs jedoch in erster Linie in Abhängigkeit von *I'sc* gebildet, wohingegen *ac* und *sc* eine untergeordnete Rolle spielen (Younossi-Hartenstein et al., 1997; Urbach et al., 2003). *I'sc* wird im pNE in ausgedehnten proneuralen Domänen exprimiert (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003). Innerhalb dieser wirken laterale Inhibitionsmechanismen nur in eingeschränktem Maße, so dass sich benachbarte Neuroektodermalzellen zu NBs entwickeln können (Urbach et al., 2003; Kunz et al., 2012), was die Bildung relativ vieler NBs in der Hirnanlage erklärt.

Insgesamt delaminieren etwa 100 NBs aus dem pNE, wobei sich deren Anzahl zwischen den Hirnneuromeren deutlich unterscheidet (72 im PC, 21 im DC, 13 im TC) (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003). Jeder Hirn-NB ist durch die Expression einer spezifischen Kombination molekularer Marker charakterisiert (**Abb. 1-5**) (Urbach und Technau, 2003a). Die deutlichen intersegmentalen Unterschiede in Anzahl und Identität von Hirn-NBs stehen im Gegensatz zur segmental repetitiven Anordnung seriell homologer NBs im VNS, und führen zur Bildung komplexer, hirn-spezifischer Neuropilstrukturen. Dazu zählen Pilzkörper, Zentralkomplex oder Antennalloben (**Abb. 1-4 B**), welche in der adulten Fliege zentrale Aspekte des Verhaltens wie Lernen, Gedächtnis, Entscheidungsfindung und Bewegungskontrolle steuern (z.B. Strauss und Heisenberg, 1993; Strauss, 2002; Strausfeld et al., 2009; Davis, 2011; Buchanan et al., 2015; Solanki et al., 2015).

Die hohe Diversität von Hirn-NBs im Vergleich zu Rumpf-NBs zeigt, dass die Expression von Musterbildungsgenen im pNE hirnspezifischen Regulationsmechanismen unterliegen muss. Dies spiegelt sich in den segmentspezifischen Expressionsmustern von AP/DV-Musterbildungsgenen in der frühen Hirnanlage wieder (Schmidt-Ott und Technau, 1992; Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003b). Beispielsweise werden die DV-Gene *vnd*, *ind* und *msh* im pNE in einem dynamischen, segmentspezifischen Muster exprimiert (**Abb. 1-6 A'-C'**) (Urbach et al., 2006; Seibert und Urbach, 2010), welches im Gegensatz zum stereotypen Expressionsmuster im vNE steht. Während das Expressionsmuster dieser DV-Gene im TC zwar räumlich einige Gemeinsamkeiten mit dem vNE aufweist, werden sie in DC und PC zunehmend in einer abgewandelten Weise exprimiert. So werden die gegenseitigen Repressoren *vnd* und *ind* im DC beispielsweise co-exprimiert. Insbesondere im PC ist die Abweichung von der klassischen DV-Regionalisierung des NE deutlich, da *ind* und *vnd* nicht länger in angrenzenden Expressionsdomänen exprimiert werden und *msh*-Expression gänzlich fehlt (Urbach et al., 2003; Seibert und Urbach, 2010).

Ein relativ großer Anteil des PC exprimiert demnach keines der klassischen DV-Gene, wodurch insbesondere im PC die zwingende Existenz hirnspezifischer Musterbildungsfaktoren deutlich wird. Auch wenn die Regulation von DV-Genen im pNE nicht umfassend verstanden ist, konnten diesbezüglich in den vergangenen Jahren wichtige Erkenntnisse erlangt werden.

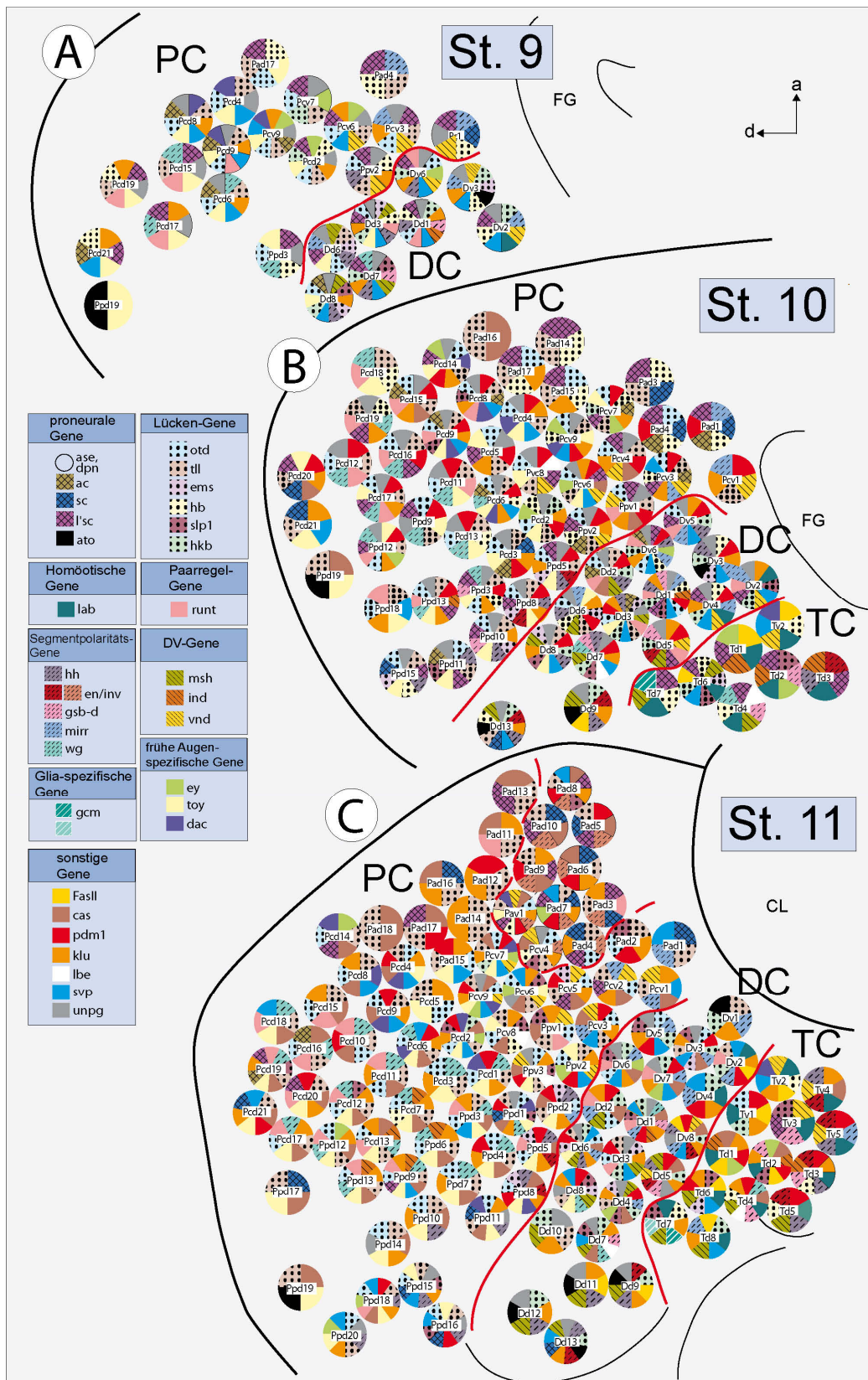


Abb. 1-5: Expression molekularer Marker in Hirn-Neuroblasten

Schematische Darstellung einer linken Hirnhemisphäre nach Filetpräparation. Gezeigt ist die typische Anordnung der Hirn-NBs in Stadium 9 (A), Stadium 10 (B) und zum Abschluß der NB-Bildung in Stadium 11 (C). Jeder NB besitzt eine individuelle Identität, die durch seine Lage und ein einzigartiges Expressionsprofil molekularer Marker (links indizierter Farbcode) charakterisiert ist. Rote Linien indizieren Grenzen zwischen den Hirnneuromeren Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC). Gestrichelte rote Linie (C) indiziert die Grenze zwischen Labral- und Okularsegment. a=anterior, d=dorsal, FG=Vorderdarmanlage (von engl. *foregut*), CL=Clypeolabrum. (Abb. nach Urbach und Technau, 2003a)

Die Expressionsmuster von *vnd*, *ind* und *msh* im pNE werden durch segmentspezifische Interaktionen mit dem hirnspezifischen DV-Musterbildungsgen *Nkx6* und AP-Musterbildungsgenen wie *engrailed* und *empty-spiracles* mitbestimmt (Seibert et al., 2009; Seibert und Urbach, 2010). Ähnlich wie im embryonalen Bauchmark konnte Seibert (2010) zudem eine zentrale Rolle des EGFR bei der Regulation der DV-Genexpression im pNE demonstrieren.

Es wurde gezeigt, dass EGFR im pNE einem dynamischen, segmentspezifischen Aktivierungsmuster folgt, welches weitestgehend die Expressionsdomänen der DV-Gene *vnd*, *ind* und *Nkx6* umfasst und für deren Aktivierung (*ind* in DC und PC) bzw. Aufrechterhaltung (*Nkx6* in TC und DC; *vnd* in TC, DC und PC) benötigt wird (Abb. 1-6) (Seibert, 2010). Durch die Expressionsanalyse dieser Faktoren nach Verlust und ektoptischer Aktivierung des EGFR wurde deutlich, dass die regionalisierte Expression von DV-Genen in der Hirnanlage maßgeblich von der segmentspezifischen Ausdehnung der EGFR-Aktivität abhängt.

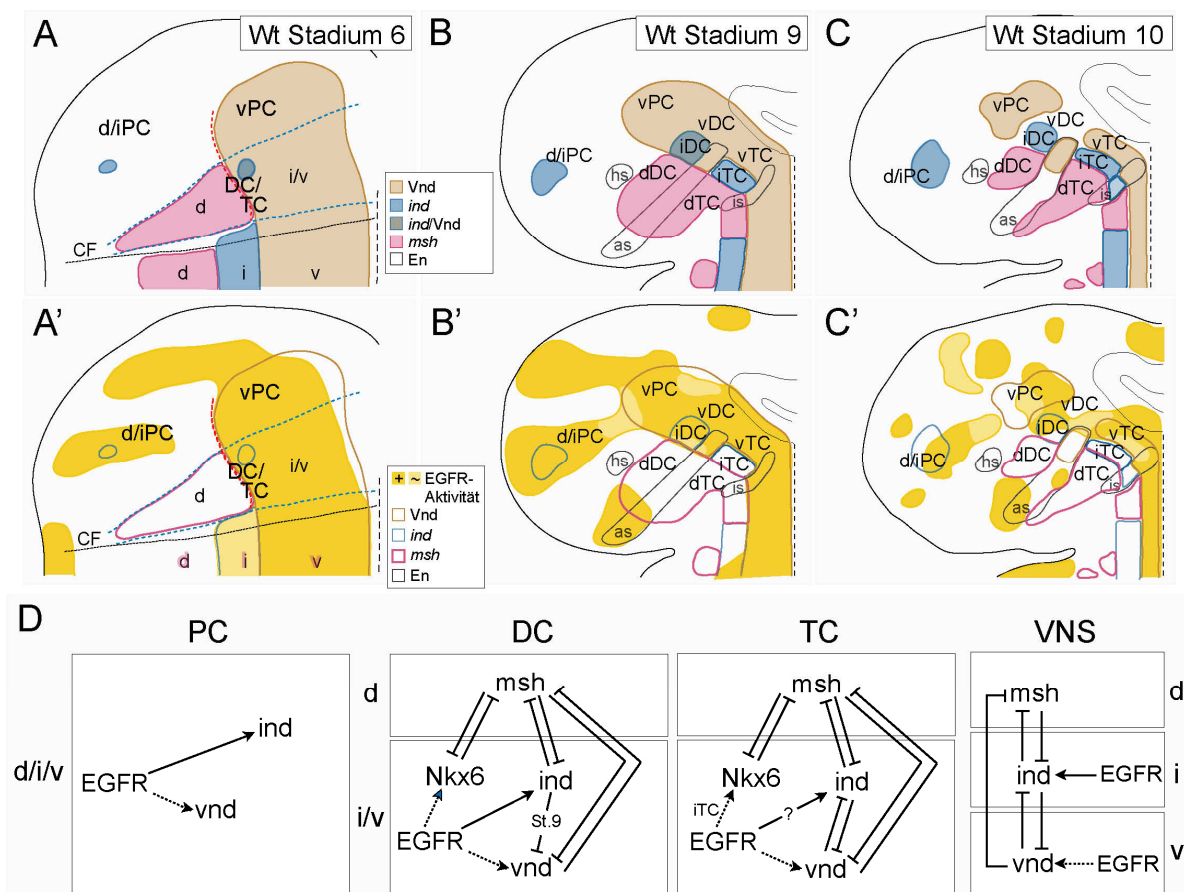


Abb. 1-6: Expression und regulatorische Interaktion von EGFR und DV-Genen im pNE
 (A-C) Schematische Darstellung des pNE linker Hirnhemisphären nach Filetpräparation in Stadium 6 (A, A'), Stadium 9 (B, B') und Stadium 10 (C, C') (anterior ist oben). Gezeigt ist die Expression der DV-Gene *vnd*, *ind* und *msh* (A-C'; für *Nkx6* siehe Seibert, 2010) im Kontext des wildtypischen EGFR-Aktivitätsmusters (A'-C') und des segmentalen Markers *Engrailed* (*En*) (A-C') (siehe Farbcode). Anterior ist oben; gestrichelte Linien indizieren die ventrale Mittellinie. (D) Genetische Interaktionen zwischen EGFR und DV-Genen in den Hirnneuomeren PC, DC und TC, sowie dem ventralen Nervensystem (VNS). Schwarze Pfeile indizieren die Aktivierung und gestrichelte schwarze Pfeile die Aufrechterhaltung von Genexpression. Ein direkter Einfluss von EGFR auf die *ind*-Expression im TC ist umstritten. v=ventral, i=intermediär, d=dorsal, PC=Protocerebrum, DC=Deutocerebrum, TC=Tritocerebrum, CF=cephale Furche, hs=engrailed head spot; as=engrailed antennal stripe, is=engrailed intercalary stripe. (Abb. abgeändert nach Seibert, 2010; Seibert und Urbach, 2010)

Die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen der EGFR-Aktivität in den Hirnneuromeren sind jedoch weitestgehend unbekannt. Ebenso wenig ist über das Ausmaß bekannt, in welchem EGFR weitere frühe Neurogeneseprozesse in den Hirnneuromeren reguliert. Dazu zählen beispielsweise die Kontrolle proneuraler Genexpression und die damit verbundene Bildung von Hirn-NBs, welche im embryonalen VNS von EGFR abhängen (Skeath, 1998), und welche EGFR im pNE auf Grund des Aktivierungsmusters segmentspezifisch beeinflussen könnte.

1.4. Embryonalentwicklung der gnathalen Neuomere

Neben den bereits beschriebenen ZNS-Abschnitten (thorakales/abdominales Bauchmark und prägnathale Hirnneuomere) umfasst das ZNS von *Drosophila* die gnathalen Neuomere, aus welchen das adulte Subösophagealganglion hervorgeht (**Abb. 1-4**). Die gnathalen Neuomere stellen gewissermaßen eine Übergangsstruktur zwischen Bauchmark und Gehirn dar, welche an der Steuerung der Nahrungsaufnahme und Geschmacksverarbeitung beteiligt ist (z.B. Scott et al., 2001; Gendre et al., 2004; Melcher und Pankratz, 2005). Sie gehen aus anterioren Anteilen des deutlich segmentierten vNE hervor, welche sich über die gnathalen Kopfsegmente (von anterior nach posterior Mandibular- (MN oder C1), Maxillar- (MX oder C2) und Labialsegment (LB oder C3)) erstrecken (Poulson, 1950; Technau und Campos-Ortega, 1985) (**Abb. 1-4 A**). Sie stellen also Anteile des embryonalen VNS dar, welche im Laufe der Entwicklung mit den prägnathalen Hirnanteilen fusionieren und daher als posteriorer Anteil des adulten Gehirns angesehen werden (Ito et al., 2014). Die frühe Neurogenese der gnathalen Neuomere wurde erst kürzlich in einer Studie von Urbach et al. (2016) detailliert beschrieben, welche unter der Einbeziehung von Ergebnissen aus dieser Arbeit entstanden ist. Dort wurde gezeigt, dass die frühe Neurogenese in den gnathalen Neuomeren im Vergleich zum prägnathalen Hirnabschnitt deutliche Parallelen zum übrigen vNE aufweist. Die Expression von Musterbildungs- und proneuralen Genen und das räumlich-zeitliche NB-Entstehungsmuster zeigen insbesondere im posterioren LB eine hohe Ähnlichkeit zu den angrenzenden Rumpfsegmenten T1-A7. In den weiter anterior gelegenen Gnathalsegmenten (MX und MN) können jedoch zunehmend Abwandlungen dieser frühen Neurogeneseprozesse beobachtet werden. Dies spiegelt sich in einem in LB, MX und MN zunehmend reduzierten Satz an NBs wieder. Ähnlich wie in den terminalen Abdominalneuromeren, in welchen das homöotische Gen *abdominal-B* die Bildung spezifischer NBs unterdrückt, konnte in den gnathalen Neuomeren gezeigt werden, dass das homöotische Gen *deformed* zur Bildung bestimmter NBs benötigt wird (Birkholz et al., 2013b; Urbach et al., 2016). Trotz des reduzierten NB-Satzes impliziert die hohe Ähnlichkeit früher Neurogeneseprozesse und des NB-Entstehungsmusters zumindest im LA und MX zu den Rumpfsegmenten T1-A7, dass die segmentale NB-Population der gnathalen Neuomere ein gewisses Maß an serieller Homologie zum Grundzustand der metamer angelegten NB-Population der Rumpfsegmente aufweist (Urbach et al., 2016).

1.5. Ziele dieser Arbeit

Der EGFR stellt einen zentralen Regulator früher Neurogeneseprozesse im vNE dar (Raz und Shilo, 1993; Schweitzer et al., 1995b; Skeath, 1998; Udolph et al., 1998; Yagi et al., 1998; von Ohlen und Doe, 2000). Die von Seibert (2010) demonstrierte umfangreiche Aktivierung des EGFR in der frühen Hirnanlage lässt vermuten, dass EGFR auch dort eine wichtige Rolle bei der Regulation früher Neurogeneseprozesse spielt. Über die Funktionen des EGFR in der frühen Hirnanlage ist jedoch vergleichsweise wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle des EGFR bei der Regulation früher Neurogeneseprozesse im pNE zu untersuchen. Basierend auf Erkenntnissen aus den Embryonalanlagen des VNS (Skeath, 1998), des visuellen Systems (Dumstrei et al., 2002), und anderen Entwicklungszusammenhängen (z. B. Jiang und Edgar, 2009; Li et al., 2015) wurde dabei ein besonderes Augenmerk auf die Regulation von Proliferation, Zelltod und proneuraler Genexpression in der frühen Hirnanlage, sowie die durch diese Prozesse beeinflusste Bildung von Hirn-NBs, gelegt.

Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Regulation von Musterbildungsgenen und der damit verbundenen Spezifizierung von Neuroblasten zeigen, dass die EGFR-Aktivität im NE räumlich und zeitlich präzise reguliert werden muss (Raz und Shilo, 1993; Skeath, 1998; Udolph et al., 1998; Yagi et al., 1998; von Ohlen und Doe, 2000; Seibert, 2010). Das segmentspezifische EGFR-Aktivierungsmuster in der Hirnanlage (Seibert, 2010) impliziert zudem, dass EGFR fundamental an der Entstehung neuromerspezifischer Unterschiede bei der Hirnentwicklung beteiligt ist. Es stellt sich somit die Frage nach den unterschiedlichen Regulationsmechanismen der EGFR-Aktivität in den frühembryonalen Anlagen der Hirnneuomere, welche jedoch bisher weitestgehend unbekannt sind. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die Verteilung von EGFR-Liganden und Antagonisten und deren Rolle bei der segmentspezifischen Aktivierung des EGFR in der frühen Hirnanlage zu untersuchen, sowie Faktoren zu identifizieren, welche das Verteilungsmuster dieser Liganden und Antagonisten in der frühen Hirnanlage bestimmen.

Neben der Funktion und Regulation des EGFR in der frühembryonalen Hirnentwicklung wurde zudem die frühe Neurogenese in den Neuomeren der gnathalen Kopfsegmente untersucht, aus welchen mit dem Subösophagealganglion der posteriore Hirnabschnitt des adulten Gehirns hervorgeht. Die gnathalen Neuomere stellen im Gegensatz zu den thorakalen, abdominalen und prägnathalen Neuomeren (Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003a; Birkholz et al., 2013a) bis zuletzt den einzigen Bereich des embryonalen ZNS von *Drosophila* dar, deren embryonale NB-Population nicht genauer beschrieben wurde. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit im Rahmen einer von R. Urbach und G. M. Technau konzipierten Studie (Urbach et al., 2016) eine umfassende Untersuchung der Expression molekularer Marker in gnathalen NBs durchgeführt mit dem Ziel, gnathale NBs auf Einzelzellebene zu identifizieren und näher zu charakterisieren, um so einen Grundstein für weitere Untersuchungen zur Entwicklung des gnathalen ZNS zu legen.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

2.1.1. Kits

Folgende Kits wurden verwendet:

- QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)
- TSA® Biotin System (Perkin Elmer)
- TSA® Cyanine 3 System (Perkin Elmer)
- VECTASTAIN® ABC-Kit (Vector Laboratories)

2.1.2. Lösungen und Medien

Zum Ansetzen der Lösungen und Medien wurden Chemikalien in Analysequalität der Firmen Carl Roth, Merck Millipore, Perkin Elmer, Qiagen, Roche Life Science, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher und Vector Laboratories verwendet.

AB-Komplex

4 µl	Reagenz A (Avidin)
4 µl	Reagenz B (Biotinylierte Meerrettichperoxidase)
300 µl	PBT

Die Lösung wurde eine Stunde vor Verwendung angesetzt und bis dahin bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Reagenz A und B stammen aus dem VECTASTAIN® ABC Kit.

AP-Puffer

41,2 ml	ddH ₂ O
1 ml	5 M NaCl
2,5 ml	1 M MgCl ₂
5 ml	1 M Tris-HCl
50 µl	Tween®20

Der pH wurde vor Zugabe von Tween®20 auf 9,5 eingestellt.

Apfelsaftagar

28 g Agar
1 l Apfelsaft

Der Ansatz wurde in einer Mikrowelle unter gelegentlichem Rühren erhitzt, bis sich der Agar vollständig gelöst hat. Fliegenzuchtgefäße wurden etwa 0,5 cm hoch mit heißem Apfelsaftagar befüllt. Nach Abkühlen und Erhärten des Agar wurden die Zuchtgefäße bei 4 °C gelagert.

BCIP-Stammlösung

10 ml Dimethylformamid (100%)
500 mg BCIP

Die Lösung wurde in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Chlorbleichlauge (6%)

Natriumhypochlorit (12% Cl)

Natriumhypochlorit wurde vor Gebrauch 1:1 mit Wasser verdünnt.

DAB-Färbelösung

600 µl PBT
400 µl DAB-Stammlösung
2 µl H₂O₂

Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

DAB-Stammlösung

10 mg 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)
35 ml PBT

DAB wurde unter Rühren in PBT gelöst und die Lösung in 400 µl Aliquots bei -20 °C gelagert.

***Drosophila*-Nährmedium**

230 g Agar-Agar
700 g Hefeflocken
250 g Sojamehl
1500 g Maismehl
2200 g Malzextrakt
1100 g Zuckerrübensaft
70 g Nipagin
130 ml Propionsäure
42 l H₂O

Die Zutaten wurden unter Rühren aufgekocht und bei etwa 80 °C in Fliegenzuchtbehälter abgefüllt. Nach dem Abkühlen wurde das Medium bei 4 °C gelagert.

Fixativ

600 µl n-Heptan
450 µl PBT
70 µl Formaldehyd (37%)

Das Fixativ wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

Glycerol (70%)

70 ml Glycerol
30 ml PBS

Bei Verwendung für Fluoreszenzfärbungen wurde das Glycerol zusätzlich mit VECTASHIELD Mounting Medium (Perkin Elmer) versetzt (1 Tropfen/ml).

Hybridisierungslösung

12,5 ml SSC (20x)
12,5 ml H₂O_{DEPC}
25 ml Formamid
50 µl Tween®20

H₂O_{DEPC}

1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)
1 l ddH₂O

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

NBT-Stammlösung

10 ml Dimethylformamid (70%)
500 mg NBT

Die Lösung wurde in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

NBT/BCIP-Färbelösung

3 µl NBT-Stammlösung
1,5 µl BCIP-Stammlösung
1 ml AP-Puffer

Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

PBS (20x Stammlösung)

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

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Die Stammlösung wurde mit ddH₂O verdünnt, um eine 1x Gebrauchslösung zu erhalten. Zur Herstellung von PBS_{DEPC} wurde H₂O_{DEPC} verwendet.

PBT (0,3%)

47,5 ml	ddH ₂ O
2,5 ml	PBS (20x)
150 µl	Triton™ X-100

PBTween (0,1%)

47,5 ml	ddH ₂ O
2,5 ml	PBS (20x)
50 µl	Tween® 20

Zur Herstellung von PBTween_{DEPC} wurde PBS_{DEPC} und H₂O_{DEPC} verwendet.

Prähybridisierungslösung

12,5 ml	SSC (20x)
12,5 ml	H ₂ O _{DEPC}
25 ml	Formamid
50 µl	Tween®20
500 µl	ssDNA (10mg/ml)

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

Streptavidin-HRP-Lösung

1,7 µl	Streptavidin-HRP
500 µl	TNB-Puffer

Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt. Streptavidin-HRP stammte aus dem TSA™ Biotin System-Kit (Perkin Elmer).

TNB-Puffer (TSA Blockierpuffer)

10 ml	1 M Tris-HCl
3 ml	5 M NaCl
87 ml	ddH ₂ O
0,5 g	<i>Blocking reagent</i>

Der pH wurde vor Zugabe des *Blocking reagent* auf 7,5 eingestellt. *Blocking reagent* stammte aus dem TSATM Biotin-System-Kit (Perkin Elmer).

TNT-Puffer (TSA Waschpuffer)

10 ml 1 M Tris-HCl
7,5 ml 2 M NaCl
82,5 ml ddH₂O
50 µl Tween[®]20

Der pH wurde vor Zugabe von Tween[®]20 auf 7,5 eingestellt.

Tyramid-Biotin-Lösung

2 µl Tyramid-Biotin
140 µl Amplification Diluent

Die Reagenzien stammten aus dem TSA[®] Biotin System-Kit (Perkin Elmer).

Tyramid-Cy3-Lösung

2 µl Tyramid-Cy3
100 µl Amplification Diluent

Die Reagenzien stammten aus dem TSA[®] Cyanine3 System-Kit (Perkin Elmer).

2.1.3. Sonstige Chemikalien

Neben den Chemikalien aus Kapitel 2.1.2 wurden Ethanol, LiCl und Methanol verwendet (jeweils in Analysequalität von Carl Roth).

2.1.4. Gebrauchsmaterialien

Aluminiumfolie (Dicke 20-30 µM), Bechergläser, Deckgläschen (18 × 18 mm, 22 × 22 mm, 24 × 60 mm), Dreierblockschälchen (weiß), Erlenmeyerkolben, Hohlschliffobjektträger, Klarlack, Klebeetiketten, Messzylinder, Minutiennadeln (Rostfreier Stahl, Ø 0,1 mm), Nylongaze (120 µm), Objektträger, Pipettenspitzen (mit und ohne Filter), Präpariernadelhalter, Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml Falcon-Gefäße; 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Eppendorf-Gefäße), Rührfische, Schleifstein, Skalpell, Wägeschälchen (weiß, 41 × 41 mm)

2.1.5. Geräte

Tab. 2-1: Liste verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller/Modell
Binokular	Leica MZ7.5
CCD-Kamera	Kontron Elektronik ProgRes3012 Zeiss AxioCam MRm
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX50WI
Geldokumentationssystem	Vilber E-Box VX5
Gelkammer (Netzteil)	Hoefer HE 33 (Pharmacia GPS200/400)
Heizblock	Biometra TB1
Heizschüttler	Eppendorf Thermomixer compact
Inkubator	MMM Medcenter Friocell WTB Binder
Kaltlichtquelle	Schott KL1500 Electronic
Konfokales Laserscanningmikroskop	Leica TCS SP5 II
Lichtmikroskop	Zeiss Axioplan
Magnetrührer	Heidolph MR3001
PCR-Cycler	Biometra TGradient Biometra TPersonal
pH-Meter	WTW inoLab pH 7110
Pipettensatz	Eppendorf Research
Schüttler	Heidolph Rotamax120 Sarstedt TPM2
Spektrophotometer	Thermo Scientific NanoDrop2000
Vortexer	Janke & Kunkel VF2
Waage	Mettler AM50 Mettler PM4600
Zentrifuge	Eppendorf 5417 R Eppendorf 5424 R

2.1.6. Software

Tab. 2-2: Liste verwendeter Software

Software	Hersteller/Referenz
AxioVision 4.1.1.	Zeiss
Creative Suite 4 Illustrator CS4 Photoshop CS4	Adobe
EndNote X7	Thomson Reuters
Fiji	Schindelin et al. (2012)
FileMaker Pro 7	FileMaker, Inc.

Software	Hersteller/Referenz
GenePalette	Rebeiz und Posakony (2004)
LAS AF	Leica
NEBCutter	Vincze et al. (2003)
Office Professional Plus 2013 Excel 2013 OneNote 2013 Word 2013	Microsoft
OligoCalc	Kibbe (2007)
QuickCalcs	GraphPad
ProgRes Plugin 4.0	Jenoptik

2.2. Fliegenzucht

Die in dieser Arbeit verwendeten *Drosophila*-Fliegenstämme wurden in Zuchtgefäßen auf einem Standard-Nährmedium bei 25°C oder 18°C gehalten. Die Zuchttemperatur beeinflusst die Generationszeit von *Drosophila* (etwa neun Tage bei 25°C und etwa 18 Tage bei 18°C) und wurde entsprechend der Bedürfnisse gewählt. Sobald die Nachkommengeneration in einem Zuchtgefäß geschlüpft ist, wurde diese zum Erhalt des Fliegenstamms in ein frisches Zuchtgefäß gegeben. Zum Verbreitern eines Fliegenstamms wurden Fliegen mehrfach innerhalb einer Generation zur Eiablage auf frische Zuchtgefäße gegeben und die Eiablagen bis zum Schlüpfen aufbewahrt. Zum Überprüfen phänotypischer Marker, der Selektion einzelner Individuen oder zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes wurden Fliegen mit CO₂ betäubt und unter einem Binokular untersucht.

2.2.1. Stabilisierung letaler Mutationen durch Balancerchromosomen

Bei der Fliegenzucht können homozygot letale Mutationen nur im heterozygoten Zustand gehalten werden. Auf Grund des Selektionsdrucks würden diese Mutationen ohne weiteres jedoch innerhalb weniger Generationen aus dem Fliegenstamm eliminiert. In *Drosophila* existieren Balancerchromosomen, welche die stabile Haltung rezessiver Letalmutationen erlauben. Das von der Mutation betroffene Chromosom wird dazu mit einem homologen Balancerchromosom kombiniert. Da Balancerchromosomen ihrerseits rezessive Letalfaktoren tragen, ist nur ein Überleben der trans-heterozygoten Individuen möglich.

Zusätzlich tragen Balancerchromosomen mehrfache Inversionen, welche die Paarung der Chromosomen während der Meiose, und somit den Austausch genetischen Materials durch *crossing-over* verhindern. So wird sichergestellt, dass die Mutationen nicht durch meiotische Rekombination von dem betroffenen Chromosom entfernt werden. Zudem tragen Balancerchromosomen Mutationen mit dominanten Phänotypen, welche leicht erkennbar sind, um die Identifikation balancierter Individuen ermöglichen. So kann der Verlauf genetischer Kreuzungen verfolgt, oder eine

Kontamination von Fliegenstämmen mit anderen Genotypen erkannt werden. In dieser Arbeit wurden folgende Balancerchromosomen verwendet:

Tab. 2-3: Liste verwendeter Balancer

Balancer	Chromosom	Dominanter Marker (Phänotyp)
CyO	2	<i>Cy¹</i> (gebogene Flügel)
CxD	3	<i>D¹</i> (abstehende Flügel)
TM3, Sb	3	<i>Sb¹</i> (kurze Borsten)
TM6b	3	<i>Ant^{Hu}</i> (überzählige Humeralborsten)

Zur Analyse embryonaler Phänotypen wurden Varianten dieser Balancerchromosomen genutzt, in welche ein *lacZ*-Gen unter Kontrolle eines embryonal aktiven Enhancers inseriert wurde (sog. *Blue Balancer*). Heterozygote (balancierte) Embryonen konnten somit nach einer Antikörperfärbung gegen β -Galaktosidase durch das charakteristische Expressionsmuster leicht von homozygoten Mutanten unterschieden werden.

2.2.2. Verwendete Fliegenstämme

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme aufgelistet.

Tab. 2-4: Liste verwendeter Fliegenstämme

Wildtyp		
Bezeichnung	Genotyp	Herkunft (Referenz)
WT	OregonR	Institut für Genetik, Mainz
Mutanten		
Bezeichnung	Genotyp	Herkunft (Referenz)
<i>aos^{Δ7}</i>	<i>aos[Delta7]/TM3, Sb, ftz-lacZ</i>	BDSC (Freeman et al., 1992)
<i>EGFR^{f2}</i>	<i>cn[1] Egfr[f2] bw[1] sp[1]/CyO, twi-lacZ</i>	BDSC (Clifford und Schüpbach, 1994)
<i>EGFR^{f2}; Df(3L)H99</i>	<i>cn[1] Egfr[f2] bw[1] sp[1]/CyO, twi-lacZ</i> ; <i>Df(3L)H99, kni[ri-1] p[p]/TM3, abdA-lacZ</i>	eigene Kreuzung
<i>Df(3L)H99</i>	<i>Df(3L)H99, kni[ri-1] p[p]/TM6b, iab2-lacZ, Ant^{Hu}, e</i>	Ana Rogulja-Ortmann (White et al., 1994)
<i>rho^{PΔ5}</i>	<i>rho[PDelta5]/TM3, Sb, ftz-lacZ</i>	Marta Llimargas-Casanova (Freeman et al., 1992)
<i>sim^{H9}</i>	<i>sim[2] kar[1]/TM3, P{ry[+t7.2]=ftz/lacZ}SC1, Sb[1] ry[RK]</i>	BDSC (Thomas et al., 1988)

<i>tll⁴⁹</i>	<i>cu[1] tll[49]/TM3, P{ry[+t7.2]=ftz/lacZ}SC1, Sb[1] Ser[1] ry[RK]</i>	BDSC (Pignoni et al., 1990)
<i>vn^{RG436}</i>	<i>vn[RG436]/TM3, Sb, ftz-lacZ</i>	Amanda Simcox (Wurst et al., 1984)

Balancerstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft (Referenz)
Vierfach Doppelblau-Balancer	<i>w; CyO, twi-lacZ/Pm; TM6b, iab2-lacZ, Ant^{Hu}, e/CxD</i>	Olaf Vef
<i>CyO, twi-lacZ</i>	<i>CyO, twi-lacZ/Gla, Bc</i>	Olaf Vef
<i>TM3, ftz-lacZ</i>	<i>TM3, Sb, ftz-lacZ/DTS</i>	Olaf Vef

Gal4-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft (Referenz)
CQ2-Gal4	CQ2-Gal4	Matthias Landgraf (Landgraf et al., 2003)
<i>eve^{RRK}</i> -Gal4	UAS- <i>CD8::GFP</i> ; <i>eve^{RRK}</i> -Gal4/TM6b	Matthias Landgraf (Fujioka et al., 2003)
Mz97-Gal4	Mz97-Gal4	Institut für Genetik, Mainz (Ito et al., 1995)
NGT40-Gal4	<i>y¹ w[*]; P{w^{+mC}=GAL4-nos.NGT}40</i>	BDSC (Tracey et al., 2000)
<i>sca</i> -Gal4	<i>sca</i> -Gal4	Uwe Hinz

UAS-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft (Referenz)
UAS- <i>Gro^{AA}</i>	UAS- <i>Gro^{AA}</i>	Ze'ev Paroush (Hasson et al., 2005)
UAS- <i>Gro^{DD}</i>	UAS- <i>Gro^{DD}</i>	Ze'ev Paroush (Hasson et al., 2005)
UAS- <i>mGFP</i>	UAS- <i>mGFP</i>	Institut für Genetik, Mainz
UAS- <i>nGFP</i>	UAS- <i>nGFP</i>	Institut für Genetik, Mainz
UAS- <i>sSpi</i>	<i>w;;UAS-sSpi</i>	James Skeath (Zhao et al., 2007)
UAS- <i>vnd</i>	<i>y,w;UAS-vnd</i>	Simon Sprecher (Chu et al., 1998)

lacZ-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft (Referenz)
<i>seven-up-lacZ</i>	<i>svp-lacZ^{H162}/TM3, Sb</i>	Chris Q. Doe (Doe, 1992)
<i>huckebein-lacZ</i>	<i>hkb-lacZ⁵⁹⁵³</i>	Chris Q. Doe (Doe, 1992)
<i>mirror-lacZ</i>	<i>mirr-lacZ/TM3</i>	Chris Q. Doe (Doe, 1992)
<i>unplugged-lacZ</i>	<i>unpg-lacZ¹⁹¹²/CyO</i>	Chris Q. Doe (Doe, 1992)
<i>gooseberry-lacZ</i>	<i>gsb-d-lacZ⁰¹¹⁵⁵</i>	Fernando Diaz-Benjumea
<i>H15-lacZ</i>	<i>H15-lacZ</i>	Laura Nilson (Brook und Cohen, 1996)

2.2.3. Genetische Kreuzungen

Genetische Kreuzungen wurden durchgeführt, um Genprodukte mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems in spezifischen Geweben oder Zelltypen ektopisch zu exprimieren, Mutanten mit geeigneten Balancerchromosomen zu kombinieren, oder Doppelmutanten zu erzeugen (siehe Kapitel 2.2.3.2 ff.). Im Vorfeld einer Kreuzung wurden Männchen und Weibchen der erforderlichen Genotypen gesammelt. Das Geschlecht wurde dabei anhand der Geschlechtsorgane bestimmt. Es wurden ausschließlich jungfräuliche Weibchen gesammelt, um eine Befruchtung im Vorfeld der geplanten Kreuzung auszuschließen. Männchen und jungfräuliche Weibchen wurden zur Paarung in ein gemeinsames Zuchtgefäß gegeben und die Nachkommen den Bedürfnissen entsprechend weiterbehandelt.

2.2.3.1. Sammeln von Jungfrauen

Zum Sammeln jungfräulicher Weibchen wurden Fliegen des gewünschten Stamms in ein frisches Zuchtgefäß gegeben. Nach erfolgter Eiablage wurden die Fliegen wieder entfernt. Fliegen der Nachkommengeneration wurden im Abstand von drei Stunden abgesammelt und nach Geschlecht sortiert. Da Männchen bei 25 °C frühestens vier Stunden nach dem Schlüpfen ihre Geschlechtsreife erhalten (Weigmann et al., 2003), handelte es sich bei den gesammelten Weibchen ausschließlich um Jungfrauen. Als zusätzliches Selektionskriterium diente das typische Erscheinungsbild jungfräulicher Individuen (glatte und transparente Cuticula auf der Unterseite des Abdomens, durch welche das Meconium als dunkler Fleck im Darm erkennbar ist).

2.2.3.2. Gal4/UAS-System

Das Gal4/UAS-System (Brand und Perrimon, 1993) wurde genutzt, um Gene in spezifischen Geweben oder Zelltypen ektopisch zu exprimieren. Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher dort Zielgene aktiviert, die unter der Kontrolle eines UAS-Enhancers (von engl. *upstream activating sequence*) stehen. In *Drosophila* werden transgene Fliegenstämme verwendet, die Gal4 unter Kontrolle eines bestimmten *Drosophila*-Genenhancers in einem definierten Muster exprimieren. Daneben existieren sogenannte UAS-Linien, die ein beliebiges Zielgen unter Kontrolle eines UAS-Enhancers tragen, welcher zunächst inaktiv ist. Erst durch die Verkreuzung von Gal4- und UAS-Linien und die dadurch erfolgende Zusammenführung beider Komponenten wird der UAS-Enhancer in Gal4-exprimierenden Zellen aktiviert, was zu einer ektopischen Aktivierung des Zielgens entsprechend des Gal4-Expressionsmusters führt.

Die große Anzahl frei verfügbarer und nach Wunsch kombinierbarer Gal4- und UAS-Stämme macht das System zu einem wertvollen genetischen Werkzeug, das vielfältige Anwendung findet. In dieser Arbeit wurde das Gal4/UAS-System genutzt, um Musterbildungsgene ektopisch zu aktivieren oder Reportergene als Marker in bestimmten Zelltypen zu exprimieren. Dazu wurden jungfräuliche

Weibchen der Gal4-Treiberlinien gesammelt und mit Männchen der jeweiligen UAS-Linie in ein gemeinsames Zuchtgefäß gegeben. Die Eiablagen wurden gesammelt und entsprechend Kapitel 2.3 ff. prozessiert. Die verwendeten Treiber- und UAS-Linien sind in Kapitel 2.2.2 aufgeführt.

2.2.3.3. Umbalancieren von Fliegenstämmen mit Blue-Balancern

An Stelle herkömmlicher Balancerchromosomen wurden Blue-Balancer in Mutanten eingekreuzt, um eine Unterscheidung homozygot-mutanter von heterozygoten Embryonen zu ermöglichen. Da das Balancerchromosom des mutanten Fliegenstamms dabei ausgetauscht wird, spricht man von „Umbalancieren“. Fliegenstämme wurden entweder durch herkömmliche Kreuzung oder unter Verwendung dominant temperatursensitiver (DTS-) Allele (Suzuki, 1970) umbalanciert. DTS-Balancerstämme tragen auf dem zum Balancer homologen Chromosom ein DTS-Allel, welches bei 29°C embryonal letal ist, adulte Individuen jedoch nicht beeinträchtigt. Nach der Verkreuzung von Mutanten mit DTS-Balancerstämmen wurden die Kreuzungsansätze bei 29°C inkubiert. Unter den Nachkommen überlebten somit nur Individuen, die das gewünschte Balancerchromosom und nicht das homologe DTS-Chromosom trugen, wodurch das Umbalancieren um eine Generation verkürzt werden konnte.

Im Folgenden sind die angewandten Kreuzungsschemata exemplarisch für das Umbalancieren einer drittchromosomalen Mutation mit dem Balancerchromosom *TM3, Sb, ftz-lacZ* gezeigt.

Umbalancieren durch herkömmliche Kreuzung:

Kreuzung 1: ♀ $\frac{\textit{Mutation}}{\textit{TM3}}$ × $\frac{\textit{TM3,Sb,ftz-lacZ}}{\textit{TM6b,iab2-lacZ}}$ ♂

F1-Nachkommen (Selektion für *Sb*, gegen *Ant^{Hu}*):

$\frac{\textit{Mutation}}{\textit{TM3,Sb,ftz-lacZ}}$ → Kreuzung 2 (*Sb, Ant^{Hu}*)

$\frac{\textit{Mutation}}{\textit{TM6b,iab2-lacZ}}$ → verwerfen (~~*Sb*~~, *Ant^{Hu}*)

$\frac{\textit{TM3}}{\textit{TM6b,iab2-lacZ}}$ → verwerfen (*Sb*, *Ant^{Hu}*)

$\frac{\textit{TM3}}{\textit{TM3,Sb,ftz-lacZ}}$ → letal

Kreuzung 2: ♀ $\frac{Mutation}{TM3,Sb,ftz-lacZ}$ × $\frac{Mutation}{TM3,Sb,ftz-lacZ}$ ♂

F2-Nachkommen (keine Selektion nötig):

$\frac{Mutation}{TM3,Sb,ftz-lacZ}$	→	Fliegenstamm
$\frac{TM3,Sb,ftz-lacZ}{Mutation}$	→	Umbalancierter Fliegenstamm
$\frac{Mutation}{Mutation}$	→	letal
$\frac{TM3,Sb,ftz-lacZ}{TM3,Sb,ftz-lacZ}$	→	letal

Umbalancieren mit DTS-System:

Kreuzung 1: ♀ $\frac{Mutation}{TM3}$ × $\frac{TM3,Sb,ftz-lacZ}{DTS}$ ♂ → Inkubation 29°C

F1-Nachkommen (keine Selektion nötig):

$\frac{Mutation}{TM3,Sb,ftz-lacZ}$	→	Umbalancierter Fliegenstamm
$\frac{Mutation}{DTS}$	→	letal bei 29°C
$\frac{TM3}{DTS}$	→	letal bei 29°C
$\frac{TM3}{TM3,Sb,ftz-lacZ}$	→	letal

2.2.3.4. Kombinationskreuzungen

In dieser Arbeit wurde eine Kombinationskreuzung verwendet, um aus *EGFR^{f2}*-Mutanten (2. Chromosom) und der Defizienz *Df(3L)H99* (3. Chromosom) *EGFR^{f2}; Df(3L)H99* Doppelmutanten zu erzeugen. Der mehrere Generationen umfassende Kreuzungsverlauf wurde über die dominanten Phänotypen der verwendeten Balancerchromosomen verfolgt und die Nachkommen entsprechend selektiert. Neben den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Phänotypen für *CyO* (gebogene Flügel), *CxD* (abstehende Flügel) und *TM6b* (überzählige Humeralborsten) kam dabei ein dominantes *Pm*-Allel auf Chromosom 2 zum Einsatz, welches eine dunkelrote Augenfarbe verursacht. Im Folgenden ist der Kreuzungsverlauf dargestellt. Zur besseren Übersicht sind unter den Nachkommen nur die jeweils selektierten Genotypen aufgeführt.

Erzeugung von *EGFR^{f2}*; *Df(3L)H99*-Doppelmutanten:

Kreuzung 1a: ♀ $\frac{EGFR[f2]}{CyO,twi-lacZ}; \frac{+}{+}$ × $\frac{CyO,twi-lacZ}{Pm}; \frac{TM6b,iab2-lacZ}{CxD}$ ♂

F1-Nachkommen (Selektion für *Pm* und *Ant^{Hu}*, gegen *CyO* und *CxD*):

$\frac{EGFR[f2]}{Pm}; \frac{+}{TM6b,iab2-lacZ}$ → Kreuzung 2 (*CyO*, *Pm*, *Ant^{Hu}*, ~~*CxD*~~)

Kreuzung 1b: ♀ $\frac{+}{+}; \frac{Df(3L)H99}{TM6b,iab2-lacZ}$ × $\frac{CyO,twi-lacZ}{Pm}; \frac{TM6b,iab2-lacZ}{CxD}$ ♂

F1-Nachkommen (Selektion für *CyO* und *CxD*, gegen *Pm* und *Ant^{Hu}*):

$\frac{+}{CyO,twi-lacZ}; \frac{Df(3L)H99}{CxD}$ → Kreuzung 2 (*CyO*, ~~*Pm*~~, *Ant^{Hu}*, *CxD*)

Kreuzung 2 (reziprok):

$\frac{EGFR[f2]}{Pm}; \frac{+}{TM6b,iab2-lacZ}$ × $\frac{+}{CyO,twi-lacZ}; \frac{Df(3L)H99}{CxD}$

F2-Nachkommen (Selektion für *CyO* und *Ant^{Hu}*, gegen *Pm* und *CxD*):

$\frac{EGFR[f2]}{CyO,twi-lacZ}; \frac{Df(3L)H99}{TM6b,iab2-lacZ}$ → Kreuzung 3 (*CyO*, ~~*Pm*~~, *Ant^{Hu}*, ~~*CxD*~~)

Kreuzung 3 (reziprok):

$\frac{EGFR[f2]}{CyO,twi-lacZ}; \frac{Df(3L)H99}{TM6b,iab2-lacZ,Ant[Hu]}$ × $\frac{EGFR[f2]}{CyO,twi-lacZ}; \frac{Df(3L)H99}{TM6b,iab2-lacZ,Ant[Hu]}$

F3-Nachkommen:

$\frac{EGFR[f2]}{CyO,twi-lacZ}; \frac{Df(3L)H99}{TM6b,iab2-lacZ,Ant[Hu]}$ → Doppelmutanter Fliegenstamm

2.3. Gewinnung und Fixierung von *Drosophila*-Embryonen

Die folgenden Protokolle wurden, falls nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.1. Eiablage

Zum Sammeln von Embryonen wurden Fliegen des jeweiligen Stammes auf ein Ablagegefäß gegeben, dessen Boden mit Apfelsaftagar bedeckt war. Die Fliegen wurden mit Trockenhefe angefüttert, zur Eiablage bei 25°C auf dem Gefäß gehalten, und nach erfolgter Eiablage wieder

entfernt. Durch die Dauer der Eiablage wurde das Alter der gesammelten Embryonen beeinflusst. In dieser Arbeit wurden i.d.R. 3h-Ablagen zusammen mit über-Nacht-Ablagen verwendet, wodurch eine recht gleichmäßige Verteilung der relevanten Embryonalstadien (Stadien 5-15) erzielt wurde. Bei Bedarf wurden bevorzugt 3h-Ablagen, über-Nacht-Ablagen oder 24h-Ablagen verwendet, um gezielt jüngere bzw. ältere Embryonalstadien anzureichern.

2.3.2. Dechorionisierung von Embryonen

Zunächst wurde das Chorion der gesammelten Embryonen chemisch entfernt. Dazu wurden Eiablagen gesammelt und der Boden der Ablagegefäße mit Chlorbleichlauge überschichtet. Unter gelegentlichem Schwenken lösten sich die Embryonen so zunehmend aus dem Apfelsaftagar. Nach dreiminütiger Inkubation wurde die Chlorbleichlauge zusammen mit den Embryonen in ein Auffanggefäß gespült. Dieses bestand aus einem abgeschnittenen Falcon-Röhrchen, welches an einem Ende mit Nylongaze verschlossen wurde. Die Nylongaze diente als Sieb, in dem die Embryonen zurückgehalten wurden. Nach mehrmaligem Spülen mit Wasser wurden die Embryonen mit einem feinen Skalpell von der Nylongaze aufgenommen und in das Fixativ überführt.

2.3.3. Fixierung und Devitellinisierung von Embryonen

Im Vorfeld der Fixierung wurden Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit einem zweiphasigen Fixativ aus einer wässrigen Formaldehydlösung und n-Heptan vorbereitet (siehe Kapitel 2.1.2). Dechorionisierte Embryonen wurden in das Fixativ überführt und der Ansatz für 20 min bei 900 rpm geschüttelt. Daraufhin wurde die untere Phase des Fixativs abgezogen (möglichst ohne Embryonen aus dem Ansatz zu entfernen) und durch 500µl Methanol (MeOH) ersetzt. Die Embryonen sammeln sich dabei bevorzugt an der Phasengrenze zwischen MeOH und n-Heptan. Anschließend wurde der Ansatz zwei Minuten auf einem Vortexer kräftig geschüttelt. Die dabei entstehenden Scherkräfte an der Phasengrenze wurden genutzt, um die Vitellinmembran der Embryonen zu zerstören. Die untere Phase des Fixativs wurde daraufhin erneut durch 500µl Methanol ersetzt und der Ansatz für eine weitere Minute auf einem Vortexer geschüttelt. Nach Absinken der Embryonen wurde der Überstand abgezogen und die Embryonen mehrfach mit MeOH gespült. Anschließend wurden die Embryonen in MeOH bei -20°C gelagert oder direkt für *in situ*-Hybridisierungen (Kapitel 2.4.2) oder Antikörperfärbungen (Kapitel 2.5.2) eingesetzt.

2.4. *in situ*-Hybridisierung

In situ-Hybridisierungen wurden in dieser Arbeit allein oder in Kombination mit Antikörperfärbungen (Kapitel 2.5.2) zum Nachweis von *mRNA*-Expression im embryonalen ZNS genutzt. Dazu wurden gegen spezifische *mRNAs* gerichtete, Digoxigenin (DIG)-markierte *RNA-antisense*-Sonden

verwendet. Diese wurden anschließend mit immunfluoreszenten oder -histochemischen Methoden nachgewiesen.

2.4.1. Synthese von RNA-*antisense*-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten RNA-*antisense*-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription synthetisiert. Als *template* dienten dabei Exonsequenzen bestimmter mRNAs, die entweder in Form klonierter cDNAs (als vollständige cDNA oder EST-Klon) oder als PCR-Amplifikate von genomischer DNA vorlagen. Eine detaillierte Liste der verwendeten Sonden mit Daten zur Herstellung (verwendete Vektoren, RNA-Polymerasen, Restriktionsenzyme und PCR-Primer) befindet sich in Kapitel 2.4.3 (Tab. 2-5).

Klonierung und Restriktion von EST-Klonen und cDNAs

EST-Klone und cDNAs lagen als Inserts in Vektoren vor, welcher unmittelbar *downstream* des Inserats eine SP6, T3 oder T7 RNA-Polymerase-Promotersequenz trugen. Diese war entgegen des Inserats (also 3'-5') orientiert. Bei der *in vitro*-Transkription durch die RNA-Polymerase wurden so zum Insert komplementäre *antisense*-Sonden synthetisiert, die bei der *in situ*-Hybridisierung spezifisch an die entsprechende (*sense*-)mRNA binden können. Zusätzlich trugen die Vektoren ein Ampicillin- oder Chloramphenicol-Resistenzgen zur Selektion im Zuge der Klonierung.

Die Vektoren wurden durch chemische Transfektion in *E.coli* DH5 α -Bakterienzellen gebracht. Nach der Antibiotikaselektion erfolgreich transformierter Bakterien wurden über-Nacht-Kulturen einzelner Klone in je 3 ml LB-Medium angesetzt. Aus diesen wurden die Vektoren unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert. Durch einen anschließenden Restriktionsverdau wurde die Plasmid-DNA innerhalb des Inserats an einer geeigneten Stelle geschnitten. Die Schnittstelle bestimmt die Länge der bei der *in vitro*-Transkription entstehenden RNA-Sonde und liegt optimaler Weise zwischen 500 und 1000bp *downstream* des jeweiligen RNA-Polymerase-Promoters. Geeignete Restriktionsenzyme wurde im Vorfeld durch die bioinformatische Sequenzanalyse mit Hilfe des Programms NEB-Cutter (Vincze et al., 2003) ausgewählt (siehe Tab. 2-5 für verwendete Restriktionsenzyme).

Der Restriktionsverdau wurde gelelektrophoretisch kontrolliert. Erfolgreich restringierte Plasmid-DNA wurde durch Fällung aufgereinigt und nach Lösung in 20 μ l H₂O_{DEPC} für die *in vitro*-Transkription eingesetzt (siehe unten).

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung von RNA-Sonden aus PCR-Produkten wurden zunächst für die *in situ*-Hybridisierung geeignete Exonbereiche der jeweiligen mRNA durch die bioinformatische Sequenzanalysen ausgewählt. Es wurden ausschließlich einmalige Exonbereiche von 500-1000bp Länge ausgewählt,

die möglichst keine repetitiven Sequenzabschnitte beinhalten. Entsprechend dieser Kriterien wurden 5' und 3'-Primer zur PCR-Amplifikation des gewählten Bereichs gestaltet. Primersequenzen wurden nach gängigen Kriterien (siehe Dieffenbach et al., 1993) mit Hilfe der Software OligoCalc (Kibbe, 2007) gestaltet. Unmittelbar vor der 3'-Primersequenz wurde die Sequenz des SP6- oder T7-RNA-Polymerasepromoters eingefügt, welche zur späteren Synthese einer *antisense*-RNA-Sonde benötigt wurde. Mit dem jeweiligen Primerpaar wurde eine Standard-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

PCR-Ansatz:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Genomische DNA	x μ l	1 ng-1 μ g/Ansatz
5'-Primer (10 μ M)	1 μ l	200 nM
3'-Primer (10 μ M)	1 μ l	200 nM
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 μ l	je 200 μ M
KCl-Puffer (10x)	5 μ l	1x
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l	1,5 mM
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U/Ansatz
ddH ₂ O	ad 50 μ l	

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	T _m -5 °C*	1 min
Elongation	72 °C	1 min/kb
Finale Elongation	72 °C	10 min

← x35

* Als T_m wurde der Mittelwert der mit OligoCalc (Kibbe, 2007) berechneten T_m-Werte des Primerpaars verwendet. SP6- und T7-Promotersequenzen wurden dabei nicht berücksichtigt.

Der Erfolg der PCR-Amplifikation wurde gelelektrophoretisch überprüft und der PCR-Ansatz durch Verwendung eines QIAquick® PCR-Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Zur Elution des Amplifikats wurden 35 μ l H₂O_{DEPC} verwendet. 1 μ l des Ansatzes wurde verwendet, um mit einem NanoDrop-Spektrophotometer die DNA-Konzentration zu bestimmen. Der übrige Ansatz wurde für die *in vitro*-Transkription eingesetzt.

in vitro-Transkription

Die folgenden Schritte wurden unter Verwendung von DEPC-behandelten Lösungen, Nitrilhandschuhen und Filter-Pipettenspitzen durchgeführt, um RNase-Kontaminationen zu

vermeiden. Zur *in vitro*-Transkription wurde, je nach *template* (siehe Tab. 2-5), eine SP6, T3 oder T7 RNA-Polymerase verwendet. Als *template* dienten zuvor aufgereinigte Vektoren oder PCR-Amplifikate (siehe oben). Die benötigten Nukleotide stammten aus einem DIG-*labelling mix*, welcher neben den Nukleotiden ATP, GTP und CTP (je 10 mM) ein Gemisch aus UTP (6,5 mM) und DIG-11-UTP (3,5 mM) enthielt. So wurden bei der *in vitro*-Transkription DIG-Gekoppelte Nukleotide in die Sonde inkorporiert, die nach einer *in situ*-Hybridisierung zum immunhistochemischen Sondennachweis mit anti-DIG-Antikörpern genutzt wurden. *In vitro*-Transkriptionen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

in vitro-Transkriptionsansatz:

Reagenz	Volumen	Konzentration
Aufgereinigte DNA	x µl	500 ng – 3 µg/Ansatz
Transkriptionspuffer (10x)	2 µl	1x
DIG- <i>labelling mix</i> (10 mM je NTP*)	2 µl	500 mM je NTP*
RNA-Polymerase (SP6, T3 oder T7) (≥20 U/µl)	2 µl	≥20 U/Ansatz
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	20 U/Ansatz
H ₂ O _{DEPC}	ad 20µl	

* ATP, CTP, GTP und Summe aus UTP und DIG-11-UTP

Der Ansatz wurde zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die *template*-DNA durch Zugabe von 2 µl DNaseI (2 U/µl) und erneuter 15 minütiger Inkubation bei 37 °C abgebaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA_{DEPC} (200 mM) gestoppt und die RNA-Sonde durch Zugabe von 2,5 µl LiCl_{DEPC} (4 M) und 70 µl Ethanol (EtOH; 100%) bei 4 °C über Nacht ausgefällt.

Die gefällte RNA-Sonde wurde am folgenden Tag für 45 min bei 14 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit 500 µl EtOH_{DEPC} (70%) überschichtet. Nach erneuter 15 minütiger Zentrifugation bei 14 000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl H₂O_{DEPC} gelöst und nach Zugabe von 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor bei -20 °C gelagert.

2.4.2. Hybridisierungsprotokoll

Die im Folgenden beschriebenen Protokolle zur Durchführung von *in situ*-Hybridisierungen in Kombination mit Antikörperfärbungen (siehe Kapitel 2.5.2) wurden im Rahmen dieser Arbeit in der Buchreihe *Brain Development – Methods and Protocols* veröffentlicht (siehe Jussen und Urbach, 2014).

Für *in situ*-Hybridisierungen wurden fixierte Embryonen verwendet (siehe Kapitel 2.3). Die Behandlung erfolgte unter Verwendung von DEPC-behandelten Lösungen, Nitril-Handschuhen und Filter-Pipettenspitzen, um RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Wasch- und Inkubationsschritte für 10 min auf einem Schüttler bei 100 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. Im Gegensatz zu Waschsritten wurden Embryonen bei Spülschritten kurz und ohne Schütteln im jeweiligen Puffer inkubiert.

Vorbehandlung bei histochemischem Sondennachweis

Das MeOH wurde abgezogen und die Embryonen mehrfach mit PBTween_{DEPC} gespült. Zur schrittweisen Überführung in die formamidhaltige Hybridisierungslösung wurden die Embryonen nacheinander für je 5 min in einem 1:1-Gemisch aus PBTween_{DEPC} und Hybridisierungslösung bzw. reiner Hybridisierungslösung inkubiert.

Vorbehandlung bei fluoreszentelem Sondennachweis

Embryonen wurden zunächst 10 min in 1 ml H₂O₂/MeOH (1:10) inkubiert. Dieser Schritt diente der Reduktion endogener Peroxidaseaktivität. Da der Fluoreszenznachweis von RNA-Sonden durch Peroxidase katalysiert wird, wurden so unspezifische Hintergrundsignale reduziert. Nach mehreren Spül- und Waschschritten mit PBTween_{DEPC} wurden die Embryonen für 10 min in 1 ml NaBH₄-Lösung (0,1mg/ml in PBTween_{DEPC}) inkubiert, um die Autofluoreszenz des Gewebes zu reduzieren. Das NaBH₄ wurde anschließend durch mehrere Spül- und Waschschrritte mit PBTween_{DEPC} entfernt. Zur schrittweisen Überführung in die formamidhaltige Hybridisierungslösung wurden die Embryonen anschließend nacheinander für je 5 min in einem 1:1-Gemisch aus PBTween_{DEPC} und Hybridisierungslösung bzw. reiner Hybridisierungslösung inkubiert.

Prähybridisierung

Bei der Prähybridisierung wird die unspezifische Bindung von RNA-Sonden durch die Absättigung potentieller Bindestellen mit Heringssperma-DNA (ssDNA) reduziert. Dazu wurden die Embryonen in 500µl Prähybridisierungslösung (10µg/ml ssDNA in Hybridisierungslösung) für 1 h bei 55 °C und 350 rpm auf einem Heizschüttler inkubiert. In dieser Zeit wurde die jeweilige mRNA-*antisense*-Sonde entsprechend der Angaben in Tab. 2-5 in Hybridisierungslösung verdünnt und für die anschließende Hybridisierung 5 min bei 100 °C denaturiert. Die Sonde wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert, um der Renaturierung entgegenzuwirken.

in situ-Hybridisierung

Die Prähybridisierungslösung wurde abgezogen und für die Hybridisierung gegen Sondenlösung ersetzt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 55 °C und 350 rpm durchgeführt. Anschließend wurde die Sonde abgezogen und die Embryonen wieder schrittweise in PBTween_{DEPC} überführt. Dazu wurden sie zunächst für 30 min bei 65 °C und 350 rpm in Hybridisierungslösung und anschließend unter gleichen Bedingungen in einem 1:1-Gemisch aus Hybridisierungslösung und PBTween_{DEPC} inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrritte mit PBTween_{DEPC} bei 65°C und 350 rpm und ein finaler Waschschrtritt mit PBTween bei Raumtemperatur und 100 rpm. Ab diesem Punkt wurde auf die Verwendung von DEPC-haltigen Lösungen, Nitrilhandschuhen und Filter-Pipettenspitzen verzichtet.

Histochemischer Sondennachweis

Der histochemische Sondennachweis erfolgte in dieser Arbeit durch die von alkalischer Phosphatase (AP) katalysierte Umsetzung von NBT/BCIP zu einem blauen Indigofarbstoff. Hierzu wurden die Embryonen nach der Hybridisierung und darauf folgenden Waschschritten für 2 h bei Raumtemperatur (alternativ über Nacht bei 4°C) in anti-DIG-AP-Antikörperlösung (1:1000 in PBTween) inkubiert. Der AP-gekoppelte Antikörper bindet spezifisch DIG-markierte RNA-*antisense*-Sonden. Nicht gebundene Antikörper wurden durch mehrfache Spül- und Waschschriffe mit PBTween aus dem Gewebe entfernt. Anschließend wurden die Embryonen in AP-Puffer inkubiert, um das notwendige alkalische Reaktionsmilieu zu schaffen. Durch die Inkubation mit NBT/BCIP-Färbelösung wurde die Färbereaktion gestartet und deren Verlauf unter dem Binokular verfolgt. Bei geeigneter Signalstärke wurde die Färbelösung verworfen, die Embryonen mehrfach mit PBTween gespült und die alkalische Phosphatase durch zehnmünütige Inkubation in MeOH unter Schütteln inaktiviert. Das MeOH wurde anschließend durch mehrfaches Spülen mit PBTween entfernt. In der Regel wurde an den gefärbten Embryonen nun eine zusätzliche Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.2). Andernfalls wurden die Embryonen an dieser Stelle durch Inkubation in Formaldehyd (3,7% in PBTween) nachfixiert und nach mehrfachem Spülen in PBTween und PBS in Glycerin (70% in PBS) eingebettet.

Fluoreszenter Sondennachweis

Für den fluoreszenten Sondennachweis wurde ein Tyramid-Cy3 Signalamplifikationssystem (Perkin Elmer) verwendet. Das Fluorophor Cy3 ist dabei an ein lösliches Tyramid gekoppelt, welches durch die Peroxidase (POD)-katalysierte Umsetzung präzipitiert und somit immobilisiert wird. Dazu wurde die Embryonen zunächst zur Reduktion von Hintergrundsignalen für 30 min in TNB-Puffer inkubiert. Anschließend wurde für 2h mit POD-gekoppelten anti-DIG-Antikörper (1:500 in TNB) inkubiert (alternativ über Nacht bei 4°C). Nach mehreren Spül- und Waschschriffen mit PBTween wurden die Embryonen zwei Mal für je 5 min in TNT-Puffer inkubiert. Es folgte die fünfminütige Inkubation in Tyramid-Cy3-Lösung (1:50 in Amplifikationslösung). Ab diesem Schritt wurden die Embryonen dunkel gehalten, um das Ausbleichen des lichtsensitiven Fluorophors Cy3 zu vermeiden. Anschließend wurde die Tyramid-Cy3-Lösung durch mehrfache Spül- und Waschschriffe mit TNT-Puffer entfernt. Der Färbeerfolg wurde an dieser Stelle mit einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Bei erfolgreicher Färbung wurden die Embryonen nach mehreren Spülschriffen mit PBTween für anschließende Antikörperfärbungen eingesetzt (Kapitel 2.5.2).

2.4.3. Verwendete RNA-*antisense*-SondenTab. 2-5: Liste verwendeter RNA-*antisense*-Sonden

Sonde	Verdünnung	Matrize (Quelle)	Vektor	Restriktions- enzym	Poly- merase	5'-primer (5'-3')	3'-primer (5'-3')*
<i>l'sc</i>	1:1000	EST-Klon RE59335 (DGRC)	pFLC1	PstI	T3	-	-
<i>ind</i>	1:800	cDNA (E.Bier)	pBS SKII(+)	XhoI	T7	-	-
<i>msh</i>	1:1000	cDNA (E.Bier)	pBS SKII(+)	HindIII	T7	-	-
<i>hkb</i>	1:1000	EST-Klon RE60512 (DGRC)	pFLC1	BglII	T3	-	-
<i>vnd</i>	1:1000	cDNA (E.Bier)	pBS SKII(+)	SacI	T7	-	-
<i>Nkx6</i>	1:2500	EST-Klon RE18506 (DGRC)	pFLC1	SphI	T3	-	-
<i>rho</i>	1:500	EST-Klon LD06131 (DGRC)	pBS SKII(-)	SwaI	T3	-	-
<i>S</i>	1:500	EST-Klon AT04225 (DGRC)	pOTB7	BclI	T7	-	-
<i>vn</i>	1:1000	EST-Klon IP15007 (DGRC)	pOT2	BglII	T7	-	-
<i>tll</i>	1:1000	EST-Klon IP01133 (DGRC)	pOT2	HindIII	T7	-	-
<i>cnc</i>	1:1000	cDNA (PCR- Produkt)	pGem T- Easy	BamHI	SP6	CAATAGT GCGGCT ACCAATG	AGAACCGT GGTGTGTG TGCT
<i>aos</i>	1:1000	PCR-Produkt	-	-	SP6	GACGAG GTCAACA TTAACTC	<u>ATTTAGGT</u> <u>GACACTAT</u> <u>AGAAGAG</u> TTTGACGT TTGCTGCG TTGC
<i>btd</i>	1:500	PCR-Produkt	-	-	T7	GATTATT ACGGCA ATGCGGT GG-	<u>TAATACGA</u> <u>CTCACTAT</u> <u>AGGGAGA</u> <u>CCACTTTC</u> TCTCATT TATATGGT ATGGC
<i>cenG1A</i>	1:1000	PCR-Produkt	-	-	SP6	CGA TCT GAA GCG TTG CTC C	<u>ATTTAGGT</u> <u>GACACTAT</u> <u>AGAAGAG</u> GGTATGG AACGTCCA CTGC

Sonde	Verdünnung	Matrize (Quelle)	Vektor	Restriktions- enzym	Poly- merase	5'-primer (5'-3')	3'-primer (5'-3')*
<i>chrB</i>	1:1000	PCR-Produkt			SP6	CCTCCTT CCGTCGC AATAGC	<u>ATTTAGGT</u> <u>GACACTAT</u> <u>AGAAGAG</u> TTGAATCG TGACAAAC GACATG
<i>slp1</i>	1:1000	PCR-Produkt	-	-	SP6	AGTCCCG AGCAGC GGTTG	<u>ATTTAGGT</u> <u>GACACTAT</u> <u>AGAAGAG</u> GCTGGGCT TGTTCTG CG

* unterstrichene Abschnitte repräsentieren die zur *in vitro*-Transkription benötigten RNA-Polymerase-Promotersequenzen

2.5. Antikörperfärbung

Antikörperfärbungen wurden zum Nachweis von Proteinen oder bestimmten Proteinmodifikationen (wie Phosphorylierung von MAPK oder Histon H3) alleine oder in Kombination mit *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Antikörper wurden dazu entsprechend der Angaben in Tab. 2-6 (primäre Antikörper) und Tab. 2-7 (sekundäre Antikörper) in PBT verdünnt. Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Wasch- und Inkubationsschritte für 10 min auf einem Schüttler bei 100 rpm und Raumtemperatur durchgeführt.

2.5.1. Präabsorption von Antiseren

Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurden die verwendeten Antiseren im Vorfeld präabsorbiert. Dazu wurden Wildtyp-Embryonen nach mehrfachen Spül- und Waschschritten mit PBT mit unverdünnten oder gering verdünnten Antiseren (bis 1:50 in PBT) über Nacht bei 100 rpm und 4°C inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden anschließend bei 4°C gelagert und zur Verwendung mit PBT auf die jeweilige Endkonzentration weiterverdünnt.

2.5.2. Färbeprotokoll

Wasch- und Inkubationsschritte wurden, falls nicht anders erwähnt, für 10 min auf einem Schüttler bei 100 rpm und Raumtemperatur durchgeführt.

Inkubation mit primärem Antikörper

Embryonen wurden nach Fixierung oder bereits erfolgter *in situ*-Hybridisierung mehreren Spül- und Waschschritten mit PBT unterzogen. Daraufhin wurden die Embryonen für 2 h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert (alternativ über Nacht bei 4°C). Die Antikörperlösung wurde anschließend abgezogen und ungebundene Antikörper durch mehrfache Spül- und Waschschriffe aus dem Gewebe entfernt.

Immunhistochemischer Nachweis über Alkalische Phosphatase

Für den immunhistochemischen Nachweis mittels alkalischer Phosphatase (AP) wurden Embryonen nach Entfernen des ersten Antikörpers für 2 h mit einem AP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Dieser wurde anschließend abgezogen und ungebundene Antikörper durch mehrmalige Spül- und Waschschriffe mit PBT entfernt. Durch darauf folgende Spül- und Inkubationsschriffe in AP-Puffer wurde das für AP benötigte alkalische Reaktionsmilieu geschaffen. Der Verlauf der Färbereaktion und die weitere Behandlung der Embryonen erfolgte wie in Kapitel 2.4.2 (Histochemischer Sondennachweis) beschrieben. Nach erfolgter Färbung wurden die Embryonen entweder für den Nachweis eines weiteren Antikörpers weiterverwendet (siehe unten), oder durch Inkubation in Formaldehyd (3,7% in PBTween) nachfixiert und nach mehrfachem Spülen in PBTween und PBS in Glycerin (70% in PBS) eingebettet.

Immunhistochemischer Nachweis über Peroxidase

Beim immunhistochemischen Nachweis mittels Peroxidase (POD) wurde diese in einem mehrstufigen Prozess unter Verwendung von TSA Biotin-Signalverstärkung (Perkin Elmer) in räumlicher Nähe des primären Antikörpers immobilisiert, um dort die Umsetzung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Präzipitat zu katalysieren. Dazu wurden die Embryonen nach Entfernung des primären Antikörpers zunächst für 2 h mit einem Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Dieser wurde durch je einen Spül- und Waschschriff mit PBT entfernt. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurden die Embryonen mit TNB-Puffer gespült und anschließend für 30 min darin inkubiert. Daraufhin folgte eine 30 minütige Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter POD (Streptavidin-HRP-Lösung). Die POD bindet dabei über Straptavidin an die Biotinreste des sekundären Antikörpers. Nach mehreren Waschschriffen mit TNT-Puffer folgte eine fünfminütige Inkubation mit biotinyliertem Tyramid (1:70 in Amplification Diluent), welches durch POD zu einem unlöslichen Präzipitat umgewandelt wurde. Dies führt zu einer Akkumulation von Biotin in räumlicher Nähe des Antikörpers. Nach mehrfachen Spül- und Waschschriffen mit PBT wurden die Embryonen für 1 h mit AB-Komplex inkubiert. Dieser Komplex aus Avidin und biotinylierter POD bindet an die im Zuge der Signalamplifikation immobilisierten Biotinreste, und beinhaltet weitere POD zur Katalyse der DAB-Reaktion. Nach mehreren Spül- und Waschschriffen mit PBT wurden die Embryonen in DAB-Färbelösung inkubiert. Der Fortschritt der Färbereaktion

wurde unter einem Binokular verfolgt. Bei gewünschter Signalintensität wurden die Embryonen mehrfach mit PBT und anschließend mit PBS gespült und zur Untersuchung in Glycerin (70% in PBS) überführt.

Immunfluoreszenter Nachweis

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Embryonen nach Entfernung des primären Antikörpers für 2 mit einem fluorophorgekoppelten sekundären Antikörper (1:500 in PBT) inkubiert. Als Fluorophor dienten dabei Cy3, Cy5, DyLight405, Alexa488, Alexa546, Alexa568 oder Alexa647. Embryonen wurden auf Grund deren Lichtempfindlichkeit der Fluorophore ab diesem Zeitpunkt dunkel gehalten. Nach der Inkubation wurde der sekundäre Antikörper durch mehrfache Spül- und Waschschriffe mit PBT entfernt. Der Färbequalität wurde an dieser Stelle unter einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt, und die Embryonen nach erfolgreicher Färbung nach mehrfachem Spülen mit PBT und PBS in 1 ml Glycerol (70% in PBS) überführt. Um die Fluorophore zu stabilisieren wurde das Glycerol zuvor mit VectaShield Quenchingmedium (VectaLabs) (1 Tropfen/ml) versetzt.

2.5.3. Verwendete Antikörper

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper unter Angabe von Wirtsspezies, Verdünnungsfaktor (in PBT) und Herkunft aufgelistet. Im Falle unterschiedlicher Verdünnungsfaktoren bei immunhistochemischem oder immunfluoreszentem Nachweis sind diese mit IHC (Immunhistochemie) bzw. IF (Immunfluoreszenz) gekennzeichnet.

Tab. 2-6: Liste verwendeter primärer Antikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Verdünnung	Herkunft (Referenz)
anti-Ac	Maus	1:2	DSHB (Skeath und Carroll, 1991)
anti-Antp 8C11	Maus	1:20	DSHB (Condie et al., 1991)
anti-Cas	Kaninchen	1:500	Ward Odenwald (Kambadur et al., 1998)
anti-Col	Maus	1:100	Michèle Crozatier (Dubois et al., 2007)
anti-Cato	Schaf	1:1000	Andrew Jarman (zur Lage und Jarman, 2010)
anti-Dac 2-3	Maus	1:250	DSHB (Mardon et al., 1994)
anti-Dbx	Meerschweinchen	1:1500	James Skeath (Lacin et al., 2009)
anti-Dpn	Meerschweinchen	1:1000 (IF) 1:5000 (IHC)	Jürgen Knoblich (Homem et al., 2013)
anti-Dfd	Kaninchen	1:20	Santa Cruz Biotechnology (#sc-98593)
anti-DIG-AP	Schaf	1:1000	Roche Diagnostics (#11093274910)
anti-DIG-POD	Schaf	1:500	Roche Diagnostics (#11207733910)
anti-Dcp-1	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology (#9578)
anti-Eg	Kaninchen	1:500	Joachim Urban (Dittrich et al., 1997)

Antikörper	Wirtsspezies	Verdünnung	Herkunft (Referenz)
anti-Ems	Ratte	1:1000	Uwe Walldorf (Walldorf und Gehring, 1992)
anti-En	Kaninchen	1:100 (IF) 1:800 (IHC)	Santa Cruz Biotechnology (#sc-28640)
anti-Eve	Kaninchen	1:1000	Manfred Frasch (Frasch et al., 1987)
anti-Ey	Kaninchen	1:1000	Uwe Walldorf (Kammermeier et al., 2001)
anti-GFP	Huhn	1:500	Abcam (#AB16901)
anti-Gsb-d	Ratte	1:2	Robert Holmgren (Zhang et al., 1994)
anti-Gsb-p	Ratte	1:2	Robert Holmgren (Zhang et al., 1994)
anti-Hb	Meerschweinchen	1:1000	Joachim Urban (Mettler et al., 2006)
anti-Ind	Kaninchen	1:5000	Tonia von Ohlen (Von Ohlen und Moses, 2009)
anti-Inv 4D9	Maus	1:2 (IF) 1:7 (IHC)	DSHB (Patel et al., 1989)
anti-Kni	Meerschweinchen	1:400	Ralf Pflanz (Kosman et al., 1998)
anti-Lbe	Maus	1:2	Krzysztof Jagla (Jagla et al., 1997)
anti-Mid	Meerschweinchen	1:500	Laura Nilson (Fregoso Lomas et al., 2013)
anti-Msh	Ratte	1:200	Ze'ev Paroush (Moses et al., 2011)
anti-Odd	Meerschweinchen	1:200	Ralf Pflanz (Kosman et al., 1998)
anti-Otd	Meerschweinchen	1:500	Tiffany Cook (Xie et al., 2007)
anti-p44/42-MAPK	Kaninchen	1:500	Cell Signaling Technology
anti-Pdm1	Kaninchen	1:500	William Chia (Yeo et al., 1995)
anti-PH3	Kaninchen	1:500	Merck Millipore
anti-PoxN	Kaninchen	1:75	Markus Noll (Bopp et al., 1989)
anti-Pros MR1A	Maus	1:10	DSHB (Campbell et al., 1994)
anti-Repo	Meerschweinchen	1:5000	Benjamin Altenhein
anti-Run	Meerschweinchen	1:300	Ralf Pflanz (Kosman et al., 1998)
anti-Scr 6H4.1	Maus	1:20	DSHB (Glicksman und Brower, 1988)
anti-Sim	Meerschweinchen	1:500	Stephen Crews (Wheeler et al., 2008)
anti-Vnd	Kaninchen	1:2000	Marshall Nirenberg (Shao et al., 2002)
anti-Wg 4D4	Maus	1:15	DSHB (Brook und Cohen, 1996)
anti-Wor	Maus	1:1000	Yu Cai (Cai et al., 2001)
anti-β-Gal	Huhn	1:1000	Abcam (#ab9361)

Tab. 2-7: Liste verwendeter sekundärer Antikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Verdünnung	Herkunft
anti-Huhn-Cy5	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Kaninchen-Alexa488	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific
anti-Kaninchen-Alexa647	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific
anti-Kaninchen-AP	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Kaninchen-Biotin	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Kaninchen-546	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific
anti-Kaninchen-DyLight405	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Maus-Alexa488	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific
anti-Maus-Alexa568	Ziege	1:500	Thermo Fisher Scientific
anti-Maus-Alexa647	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific
anti-Maus-AP	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Maus-Biotin	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Meerschweinchen-Biotin	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Meerschweinchen-Cy3	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Ratte-Cy3	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch
anti-Schaf-Cy3	Esel	1:500	Jackson Immunoresearch

2.6. Präparation von *Drosophila*-Embryonen

Die im Folgenden beschriebenen Präparationsmethoden der embryonalen Hirnanlage wurden im Rahmen dieser Arbeit in der Buchreihe *Brain Development – Methods and Protocols* veröffentlicht (siehe Jussen und Urbach 2014).

Embryonen wurden im Vorfeld der Präparation in Glycerol auf einen Hohlschliffobjektträger transferiert und unter einem Binokular oder Fluoreszenzmikroskop nach gewünschten Stadien und Qualität der Färbung selektiert. Selektion und Präparation geschahen mit Hilfe eines Paars feiner Präpariernadeln (**Abb. 2-1 A**). Die Nadelspitzen wurden mit Hilfe eines Schleifsteins nach Bedarf bearbeitet, wobei eine Nadel zum Bewegen der Embryonen stumpf, und die anderen zum Schneiden des Gewebes scharf geschliffen wurde.

2.6.1. *whole-mount*-Präparation

Bei manchen Fragestellungen war es hinreichend, ganze Embryonen als *whole-mount* auf einem Objektträger für die Mikroskopie einzudeckeln. Dazu wurden zwei Deckgläschen (24 × 24 mm) als Abstandhalter mit Klarlack auf einem Objektträger fixiert. Dazwischen wurde ein Tropfen Glycerol platziert und ein Embryo in diesen überführt. Der Tropfen wurde mit einem weiteren Deckgläschen bedeckt, welches unter Sichtkontrolle leicht bewegt wurde, um den Embryo nach Wunsch auszurichten. Das Deckgläschen wurde mit Klarlack versiegelt, und das Präparat nach dessen Trocknung unter dem Mikroskop analysiert.

2.6.2. Filetpräparation

Für den Großteil der Analysen wurden Filetpräparationen des *Drosophila*-ZNS angefertigt. Die ZNS-Anlage wurde dabei flach auf dem Objektträger ausgebreitet, was die Analyse des frühen ZNS vor Allem in frühen bis mittleren Embryonalstadien (bis Stadium 11) deutlich erleichtert. Zu diesem Zeitpunkt besteht das ZNS weitestgehend aus der zweidimensionalen Neuroektodermalschicht und den darunter liegenden Neuroblasten, welche in Filetpräparaten nebeneinander auf dem Objektträger zu liegen kommen. So kann die Anlage des gesamten ZNS bei der Betrachtung leicht erfasst und in reproduzierbarer Weise dargestellt werden. Die Filetpräparation ist in **Abb. 2-1 B** schematisch dargestellt.

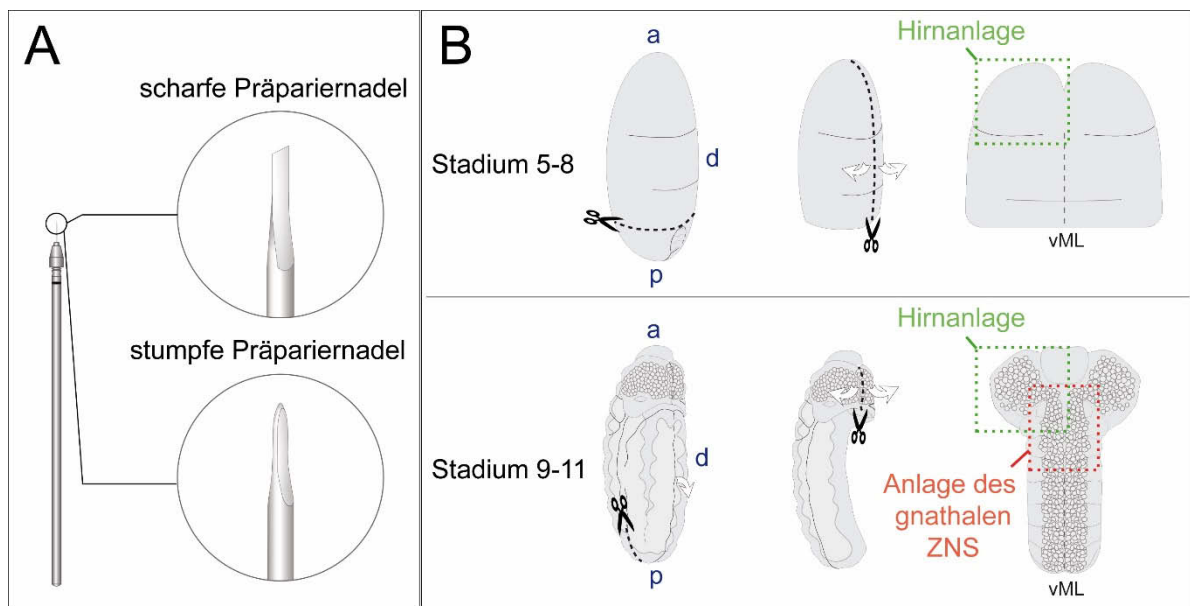


Abb. 2-1: Filetpräparation von *Drosophila*-Embryonen (nach Jussen und Urbach 2014)

(A) Zur Präparation wurden mit Hilfe eines Schleifsteins zwei unterschiedliche Präpariernadeln angefertigt. Eine scharfe Präpariernadel wurde verwendet, um das Gewebe zu schneiden, und eine stumpfe Präpariernadel um den Embryo zu bewegen bzw. beim Schneiden zu fixieren. (B) Schematische Darstellung der Präparationsvorgänge für frühe Embryonalstadien (Stadium 5-8; oben) und mittlere Embryonalstadien (Stadium 9-11; unten). Scheren deuten Schnitte entlang der gestrichelten Linien an. Nach den Schnitten wird der Embryo entsprechend der weißen Pfeile aufgeklappt. Zur Präparation wird der Keimstreif entfernt (links). Der Embryo wird dann entlang der dorsalen Mittellinie aufgeschnitten und aufgeklappt (Mitte), so dass er flach auf dem Objektträger zum Liegen kommt (rechts). Filetpräparationen wurden in dieser Arbeit zur Untersuchung der Hirnanlage (grün gestrichelter Kasten) bzw. der Anlage des gnathalen ZNS (rot gestrichelter Kasten) angefertigt. a=anterior, p=posterior, d=dorsal, vML=ventrale Mittellinie.

2.7. Auswertung und Dokumentation

2.7.1. Differentialinterferenzkontrastmikroskopie

Sichtbare Färbungen wurden unter einem Lichtmikroskop mit Differentialinterferenzkontrastfilter analysiert. Dieses war mit einer Camera lucida ausgestattet, womit im Rahmen der Auswertung maßstabsgetreue Zeichnungen angefertigt wurden, und einer CCD-Kamera, um Aufnahmen von Präparaten anzufertigen.

2.7.2. Konfokale Laserscanningmikroskopie

Fluoreszenzfärbungen wurden an einem konfokalen Laserscanningmikroskop des Typs Leica TCS SP5 II analysiert und dokumentiert. Die verwendeten Lasertypen, deren emittierte Wellenlänge und die dadurch angeregten Fluorophore sind in Tab. 2-8 aufgeführt. Zur nachträglichen Anpassung der Signalstärke und Auswertung der Aufnahmen wurden die Softwarepakete LAS AF (Leica) und Fiji (Schindelin et al., 2012) verwendet.

Tab. 2-8: Liste verwendeter Lasertypen und davon angeregter Fluorophore

Lasertyp	λ	Fluorophor
Diode	405 nm	DyLight405
Argon	488 nm	Alexa488
DPSS	561 nm	Cy3, Alexa546, Alexa568
He/Ne	633 nm	Cy5, Alexa647

2.7.3. Bildbearbeitung

Zur Dokumentation von Präparaten wurde eine Serie von Aufnahmen verschiedener Fokusse entlang der z-Achse angefertigt. Die Fokusse wurden mit Adobe Photoshop CS4 in einer Abbildung zusammengefügt, um das analysierte Gewebe (i.d.R. Neuroektoderm oder Neuroblastenschicht) in Gänze scharf abzubilden. Adobe Illustrator CS4 wurde verwendet, um das Bildmaterial im Rahmen der Erstellung von Bildtafeln zu arrangieren und zu beschriften, oder um schematische Darstellungen anzufertigen.

3. Ergebnisse

3.1. Regulation und Funktion des Epidermal growth factor-Rezeptor in der embryonalen Hirnanlage

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse sind in zwei Abschnitte aufgeteilt. Die folgenden Kapitel beziehen sich auf die Funktion und Regulation des EGFR in der frühen Hirnentwicklung. Die Ergebnisse zur Identifikation und molekularen Charakterisierung gnathaler Neuroblasten werden in Kapitel 3.2 behandelt.

3.1.1. EGFR folgt im pNE einem dynamischen, segment-spezifischen Aktivierungsmuster

Um die Funktion und Regulation des EGFR in der frühen Hirnanlage zu untersuchen wurde zunächst das wildtypische EGFR-Aktivierungsmuster im pNE erfasst. Die EGFR-Aktivität wurde dabei mit einem Antikörper gegen doppel-phosphorylierte Mitogen activated protein kinase (p44/42-MAPK; im Folgenden MAPK) dargestellt, welche *downstream* des EGFR im kanonischen Ras/MAPK-Signalweg phosphoryliert und so aktiviert wird (Shilo, 2003). Obwohl MAPK prinzipiell auch durch weitere Rezeptoren wie FGF oder Torso aktiviert wird, ist die MAPK-Phosphorylierung im embryonalen Nervensystem ausschließlich auf EGFR zurückzuführen (Gabay et al., 1997a, b).

Das MAPK-Aktivierungsmuster im pNE wurde mit der Expression des DV-Gens *ind* verglichen. Das *ind*-Expressionsmuster im pNE ist genau beschrieben (Urbach et al., 2006; Seibert und Urbach, 2010). Als DV-Gen wird *ind* in segmentalen Domänen mit definierter Ausdehnung entlang der AP- und DV-Achse exprimiert und erlaubt somit präzise Rückschlüsse auf die Ausdehnung der MAPK-Aktivität in den Hirnneuromeren Trito- (TC), Deuto- (DC) und Protocerebrum (PC). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits eine ähnliche Untersuchung von Seibert (2010) durchgeführt, in welcher das MAPK-Aktivierungsmuster im pNE im Kontext der Expression des DV-Gens *vnd* und des segmentalen Markers *En* analysiert wurde. Durch die folgenden Ergebnisse wurden die von Seibert (2010) erlangten Erkenntnisse vertieft und erweitert.

MAPK wird bereits vor *ind* in Stadium 5 in einem breiten Streifen im ventralen NE der Hirnanlage aktiviert (**Abb. 3-1 A, B**). In Stadium 6 wird die deutocerebrale *ind*-Expression am dorsalen Rand dieser MAPK-Domäne initiiert (**Abb. 3-1 C**). Die Ausdehnung in Bezug auf die beginnende *ind*-Expression im DC zeigt, dass MAPK-Aktivität im frühen Embryo (Stadium 5/6) das ventrale und intermediäre TC und DC, sowie das ventrale PC umfasst. Ab Stadium 6 kann MAPK zusätzlich in zwei transversalen Streifen in der anterioren Hirnanlage detektiert werden (‘anteriorer Streifen’ und ‘posteriore Streifen’, nach Dumstrei et al., 2002), wobei innerhalb des posterioren Streifen die protocerebrale *ind*-Expression induziert wird (**Abb. 3-1 B, C**). Die MAPK-Streifen im anterioren pNE erstrecken sich somit über das dorsale/intermediäre PC.

Während der Bildung der ersten Hirn-NBs in Stadium 9 (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003) zeigt sich ein ausgeprägteres MAPK-Aktivierungsmuster mit deutlicheren intersegmentalen Unterschieden (**Abb. 3-1 D**). Im TC ist MAPK im ventralen NE aktiv, überlappt dort jedoch nicht mit der entstehenden *ind*-Expressionsdomäne und wurde somit inzwischen im intermediären TC herunterreguliert (**Abb. 3-1 D'**). Im DC ist MAPK jedoch weiterhin im ventralen und intermediären NE aktiv und wird dementsprechend mit *ind* co-exprimiert. Auch im PC ist MAPK wie in St6 im ventralen und dorsalen/intermediären NE aktiv, wobei die MAPK-Streifen in letzterem inzwischen deutlicher ausgeprägt sind (**Abb. 3-1 D**).

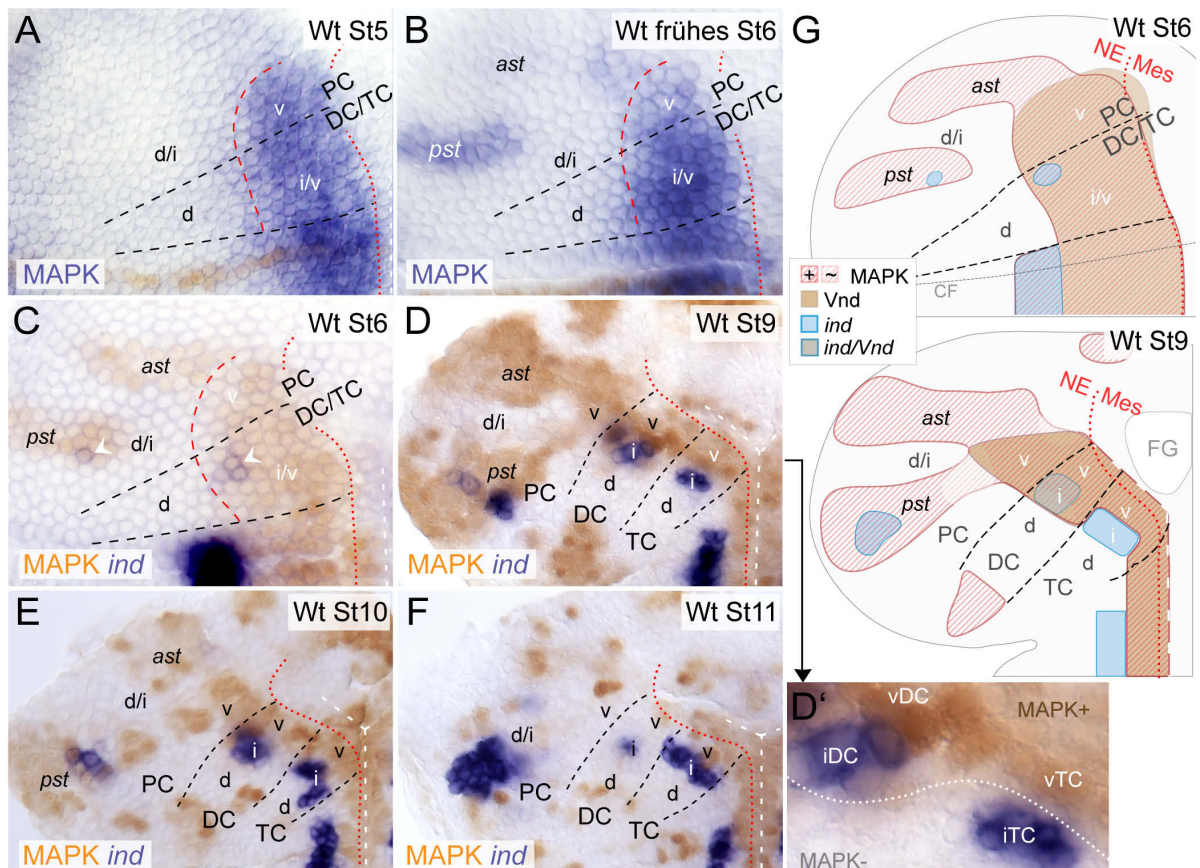


Abb. 3-1: Wildtypisches MAPK-Aktivierungsmuster im Neuroektoderm der frühen Hirnanlage

Gezeigt sind Aufsichten auf das procephale Neuroektoderm (pNE) linker Hirn-Hemisphären nach Filetpräparation; anterior ist oben; weiß gestrichelte Linie = ventrale Mittellinie; rot gepunktete Linie = Grenze zwischen pNE und Mesektoderm (Mes); schwarz gestrichelte Linien = Grenzen zwischen der Hirnneuromere Tritocerebrum (TC), Deutocerebrum (DC) und Protocerebrum (PC); rot gestrichelte Linien = Grenze zwischen ventralem (v)/intermediärem (i) und dorsalem (d) NE; Indizierung der Segment- und Kompartimentgrenzen erfolgte nach deren Lagebezug zu morphologischen Strukturen (ventrale Mittellinie, cephale Furche) bzw. zu den dargestellten MAPK/*ind*-Expressionsdomänen (vgl. Seibert, 2010; Seibert und Urbach, 2010). (**A-F**) Aktivierungsmuster von MAPK im Kontext der *ind*-Expression (C-F) im pNE wildtypischer Embryonen (Wt) der Stadien (St) 5-11 (entsprechend der Angaben). MAPK wird in St 5 im ventralen NE aller Hirnneuromere aktiviert (A) und ist ab St6 in zwei transversalen Streifen im d/iPC zu erkennen (*ast* und *pst* = anteriorer bzw. posteriorer Streifen; vgl. Dumstrei et al., 2002) (B, C). In St6 entstehen die *ind*-Expressionsdomänen des DC und PC innerhalb des MAPK-positiven NE (weiße Pfeilspitzen in C). Im St9 wurde MAPK im iTC herunterreguliert, so dass *ind*-Expression im TC außerhalb des MAPK-exprimierenden NE induziert wird (D, D') (D' zeigt eine Vergrößerung von D; weiß gepunktete Linie = Grenze zwischen MAPK-positivem und MAPK-negativem NE). Ab St 9 kann MAPK zudem im ventral an das pNE angrenzenden Mes der Hirnanlage detektiert werden (D). In St10 und St11 wird MAPK im pNE zunehmend herunterreguliert (E, F). (**G**) Schematische Repräsentationen der MAPK-Aktivität im Kontext der *ind*- und *Vnd*-Expression in St6 und St9 entsprechend des indizierten Farbcodes (für Expression von *Vnd* als Marker für ventrales NE siehe Seibert, 2010). CF = cephale Furche; FG = Vorderdarmanlage (von engl. *foregut*). (Schematisch Darstellung abgeändert nach Seibert, 2010)

Ab Stadium 10 wird MAPK im gesamten pNE zunehmend herunterreguliert und ist in Stadium 11 schließlich nur noch in einzelnen Zellclustern zu beobachten (**Abb. 3-1 E, F**).

MAPK wird in der frühen Hirnanlage demnach dynamisch aktiviert, wobei die Ausdehnung neuromerspezifisch reguliert wird (zusammengefasst in **Abb. 3-1 G**). Insbesondere während der Bildung der ersten Hirn-NBs in Stadium 9 (siehe Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003) zeigt MAPK im pNE ein ausgeprägtes Aktivierungsmuster, welches jedoch mit fortschreitender NB-Bildung zunehmend reduziert wird.

3.1.2. EGFR kontrolliert die *ind*-Expression im DC durch die Phosphorylierung des Co-Repressors Groucho

EGFR/MAPK ist ab Stadium 5 im intermediären DC aktiv (**Abb. 3-1 A-D**), und wird dort benötigt, um die *ind*-Expression im NE zu induzieren (Seibert, 2010). Neben der MAPK-Aktivität ist das *ind*-exprimierende intermediäre DC durch die Expression des DV-Gens *Vnd* gekennzeichnet (**Abb. 3-2 A**) (Urbach und Technau, 2003b). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass *Vnd* die Expression von *ind* üblicherweise reprimiert, weshalb die Expression beider Faktoren sich im übrigen ZNS gegenseitig ausschließt (McDonald et al., 1998; Weiss et al., 1998; Urbach et al., 2006; Seibert et al., 2009). In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass der EGFR-Signalweg den Co-Repressor Groucho (Gro) phosphorylieren und so inaktivieren kann (Hasson et al., 2005; Cinnamon et al., 2008; Helman et al., 2011). Da *Vnd* seine Zielgene in Abhängigkeit von Gro reprimiert (Yu et al., 2005) liegt es nahe, dass EGFR Gro im intermediären DC phosphoryliert, und so die *Vnd*/Gro-abhängige Repression von *ind* aufhebt. Um dies zu überprüfen wurde die Expression von *ind* nach der ektopischen Expression eines unphosphorylierbaren Gro-Konstrukts (*Gro^{AA}*) (Hasson et al., 2005) überprüft. Zur ektopischen Expression von *Gro^{AA}* wurden *scabrous (sca)*-Gal4 (Klaes et al., 1994) und NGT40-Gal4 (Tracey et al., 2000) Treiberlinien verwendet, welche beide im NE aktiv sind, wobei NGT40 eine frühere, jedoch schwächere Gal4-Expression als *sca*-Gal4 aufweist (nicht gezeigt). In beiden Fällen wurde in Stadium 9 eine signifikante Reduktion *ind*-exprimierender NE-Zellen im DC beobachtet, welche bei Verwendung der stärkeren, jedoch später aktiven Treiberlinie *sca*-Gal4 deutlicher ausfiel (**Abb. 3-2 B, D**). Als Kontrolle wurde zusätzlich ein pseudophosphoryliertes Gro-Konstrukt (*Gro^{DD}*) (Hasson et al., 2005) ektopisch exprimiert, in welchem die Gro-Phosphorylierungsstellen durch Glutamat-Reste ersetzt wurden (die negative Ladung der Glutamat-Reste imitiert dabei eine Phosphorylierung von Gro). In diesen *sca*>*Gro^{DD}*-Embryonen ist Anzahl *ind*-exprimierender Zellen nicht signifikant reduziert (**Abb. 3-2 C, D**).

Zusammengenommen lässt sich festhalten, dass sowohl EGFR-Aktivität, als auch Gro-Phosphorylierung für die *ind*-Expression im DC benötigt werden. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass EGFR durch die Phosphorylierung von Gro zur Inaktivierung von *Vnd*/Gro-Repressorkomplexen benötigt wird, wodurch *ind*-Expression im iDC ermöglicht wird.

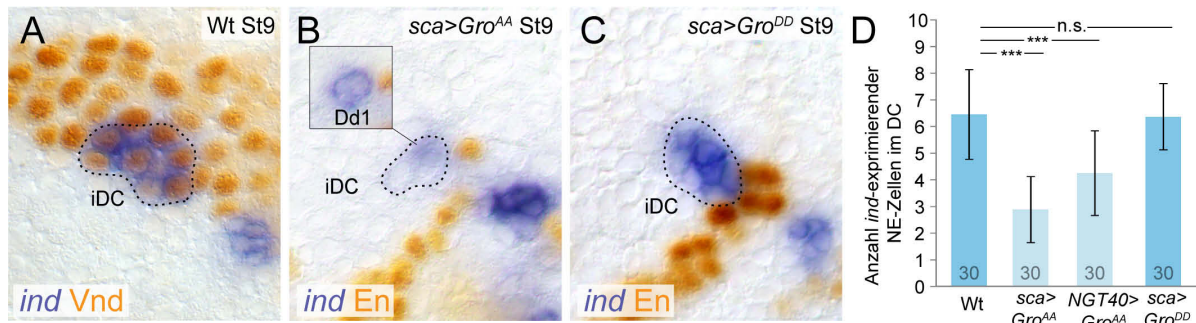


Abb. 3-2: Deutocerebrale *ind*-Expression in Abhängigkeit der Phosphorylierung des Co-Repressors Groucho

Gezeigt ist die Expression des DV-Gens *ind* im deutocerebralen NE im St9 des Wt und nach ektopischer Expression mutierter Groucho (*Gro*)-Konstrukte (*Gro^{AA}* = unphosphorylierbares, konstitutiv aktives *Gro*; *Gro^{DD}* = pseudophosphoryliert es, konstitutiv inaktives *Gro*; siehe Hasson et al., 2005). Engrailed (*En*)-Expression im posterioren Kompartiment des DC (B, C) markiert die Grenze zwischen DC und TC (Urbach et al., 2003). Gepunktete Umrandungen in A-C verdeutlichen die Ausdehnung neuroektodermaler *ind*-Expression. (A-C) *ind* wird in St9 des Wt im intermediären DC (iDC) mit *Vnd* co-exprimiert (A). Die ektopische Expression des unphosphorylierbaren (=konstitutiv aktiven) *Gro^{AA}*-Konstrukts durch die *sca*-Gal4-Treiberlinie (*sca>Gro^{AA}*) (B) führt zu einer deutlichen Reduktion der *ind*-Expression im NE des iDC, während die *ind*-Expression im darunter liegenden Neuroblasten *Dd1* nicht betroffen ist (Kasten; vgl. Urbach et al., 2003). Nach ektopischer Expression von *Gro^{DD}* durch *sca*-Gal4 (*sca>Gro^{DD}*) ist die Anzahl *ind*-exprimierender NE-Zellen im DC nicht reduziert. (D) Die durchschnittliche Anzahl *ind*-exprimierender NE-Zellen ist in St9 im DC von *sca>Gro^{AA}* (\bar{x} 2,8±1,2) und *NGT40>Gro^{AA}* (=ektopische Expression von *Gro^{AA}* im NE durch *NGT40-Gal4*; siehe Text) (\bar{x} 4,3±1,6) im Vergleich zum Wt (\bar{x} 6,5±1,7) signifikant reduziert, nicht jedoch in *sca>Gro^{DD}* (\bar{x} 6,4±1,3) (jeweils n=30 Hirnhemisphären); Fehlerbalken indizieren Standardabweichung; *** p<0,0001; n.s.=nicht signifikant; ungepaarter t-Test. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

3.1.3. EGFR wird transient in Hirnneuroblasten aktiviert

Als nächstes wurde untersucht, ob EGFR neben dem pNE auch in Hirn-NBs aktiviert wird. Dazu wurde das MAPK-Aktivierungsmuster in der Hirnanlage der Stadien 9 bzw. 11 im Kontext der Expression von Deadpan (*Dpn*) und Runt (*Run*) dargestellt. *Dpn* diente dabei als allgemeiner NB-Marker (Bier et al., 1992; Urbach et al., 2003), während das Paarregelgen *Run* in einer spezifischen Subpopulation von Hirn-NBs exprimiert wird (Urbach und Technau, 2003a) und somit die Identifikation einzelner NBs erleichterte.

Die ersten Hirn-NBs der S1- und beginnenden S2-Segregationswelle sind im frühen Stadium 9 anhand der *Dpn*-Expression, der typischen Lage unterhalb des Neuroektoderms und ihrer Morphologie (groß und abgerundet im Vergleich zu NE-Zellen) deutlich zu erkennen (Abb. 3-3 A) (vgl. Urbach et al., 2003). Zu diesem Zeitpunkt konnte MAPK-Aktivität in fünf Hirn-Neuroblasten nachgewiesen werden, welche durch ihre Lage und Expression des NB-Subpopulationsmarkers *Run* eindeutig identifiziert werden konnten. Es handelt sich um *Dv2* und *Dv3* im DC sowie *Pcd6*, *Pcd15* und *Pcd21* im PC (Abb. 3-3 A, A'). Diese MAPK-positiven NBs sind ausnahmslos in Bereichen lokalisiert, in welchen MAPK auch im darüber liegenden NE aktiv ist (Abb. 3-3 A, A''). Auffällig war nicht nur die enge Assoziation dieser NBs mit MAPK-positivem NE, sondern darüber hinaus mit *Dpn*-exprimierenden proneuralen Domänen des NE (Abb. 3-3 A'''). Daraus lässt sich folgern, dass sie kürzlich aus MAPK-positivem NE hervorgegangen sind, was mit den beschriebenen Bildungszeitpunkten dieser NBs übereinstimmt (siehe Urbach et al., 2003; auch für die Expression von *Dpn* in proneuralen Domänen des pNE).

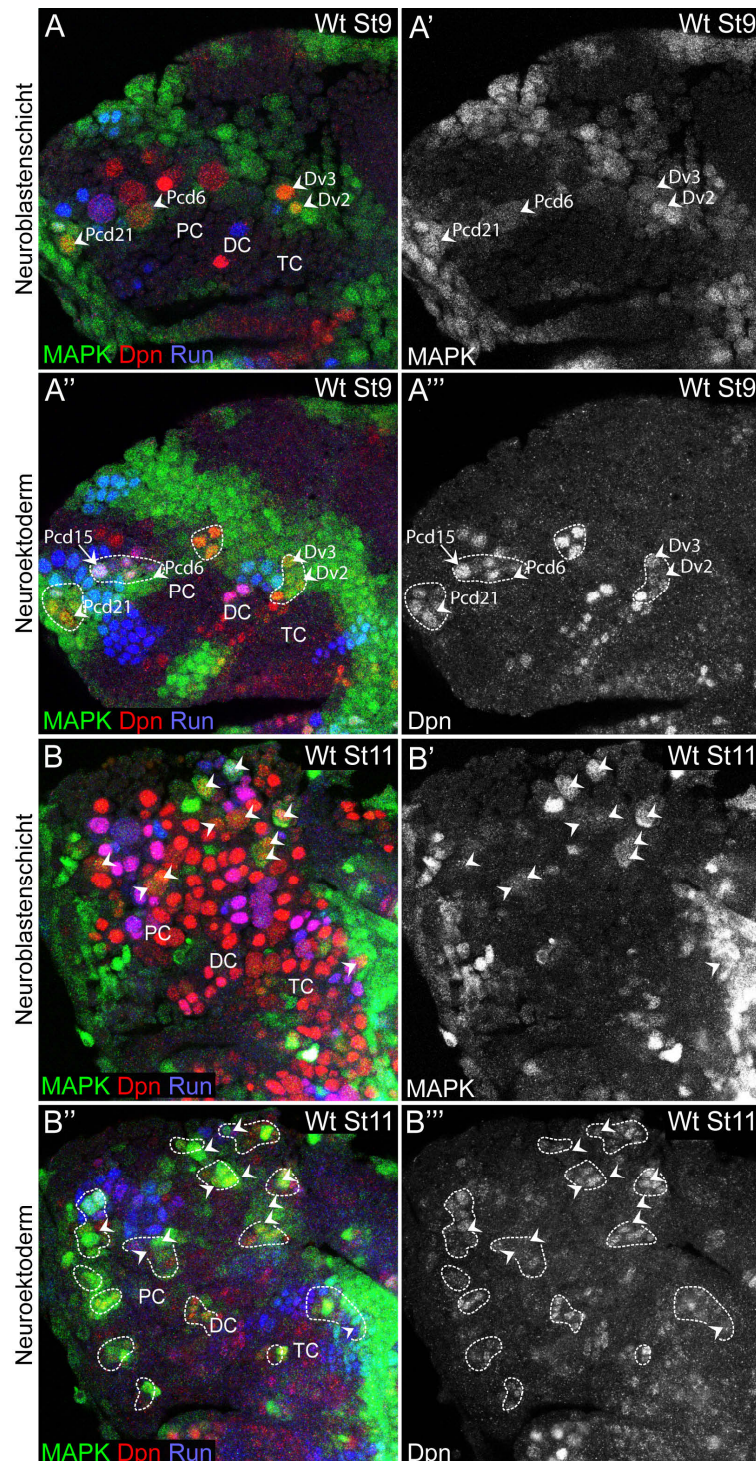


Abb. 3-3: MAPK-Aktivität in Neuroblasten

Gezeigt ist die MAPK-Aktivität (grün) in Neuroblasten (NBs) (A, A', B, B') und dem darüber liegenden Neuroektoderm (NE) (A'', A''', B'', B''') wildtypischer Hirnanlagen des frühen St9 (A-A''') bzw. St11 (B-B'''). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. NBs wurden auf Grund der Lage, Morphologie und Expression des NB-Markers Deadpan (Dpn) (rot) unter Zuhilfenahme des NB-Subpopulationsmarkers Runt (Run) (blau) identifiziert (siehe Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003a). Bezeichnungen identifizierter NBs sind in A'', A''' angegeben. (A) MAPK ist im frühen St9 in einigen NBs aktiv (Pfeilspitzen in A, A'), welche mit Dpn/MAPK co-exprimierenden proneuralen Clustern assoziiert sind (gestrichelte Umrandungen in A'', A'''); Pfeilspitzen indizieren Positionen MAPK-exprimierender NBs in A, A'). Dazu zählt der Run-exprimierende Pcd15, welcher sich in Bildung befindet und noch im neuroektodermalen Gewebeverbund lokalisiert ist (Pfeil in A, A'). NBs, welche jenseits der neuroektodermalen MAPK-Domäne gebildet werden, zeigen kein MAPK-Signal. (B) In St11 exprimieren ~11 NBs MAPK (Pfeilspitzen in B, B'), welche sich auf Grund der Lage von MAPK-exprimierenden NBs in St9 unterscheiden (vgl. A, A') und stets mit MAPK-exprimierenden proneuralen Clustern assoziiert sind (gestrichelte Linien in B'', B'''); Pfeilspitzen indizieren Positionen MAPK-positiver NBs in B, B'). Siehe Text für weitere Details.

In Hirn-NBs, die außerhalb der neuroektodermalen MAPK-Domäne entstanden sind, konnte kein MAPK-Signal beobachtet werden (vgl. **Abb. 3-3 A und A''**). Auch in Stadium 11 wurde eine Subpopulation MAPK-exprimierender NBs detektiert (**Abb. 3-3 B, B'**). Auf Grund des recht dynamischen MAPK-Aktivierungsmusters zu diesem Zeitpunkt war MAPK jedoch nicht durchgängig in den gleichen NBs aktiv, was die eindeutige Identifikation MAPK-positiver NBs erschwerte. Auffällig ist dennoch, dass sich MAPK-exprimierende NBs in Stadium 11 auf Grund der Lage von den in Stadium 9 unterscheiden (Stadium 9: ausschließlich im dorsalen/zentralen PC und ventralen DC; Stadium 11: vor Allem im anterioren/ventralen PC und nicht im DC). Ähnlich wie in Stadium 9 waren MAPK-exprimierende NBs jedoch auch in St 11 ausschließlich mit MAPK/Dpn-co-exprimierenden proneuralen Clustern assoziiert (vgl. **Abb. 3-3 B, B'', B'''**), was erneut auf eine kürzlich erfolgte Bildung aus MAPK-positivem NE hindeutet.

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass MAPK in proneuralen Clustern einiger Hirn-NBs zu deren Bildungszeitpunkt aktiv ist, danach jedoch nicht lange aufrechterhalten wird. Dieses Aktivierungsmuster impliziert darüber hinaus, dass MAPK an der Bildung dieser NBs beteiligt sein könnte, bei deren weiterer Entwicklung jedoch vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt. Da MAPK-positive NBs zudem niemals jenseits der neuroektodermalen MAPK-Domänen beobachtet wurden liegt es zudem nahe, dass MAPK nicht *de novo* in Hirn-NBs aktiviert wird.

3.1.4. EGFR unterdrückt Apoptose im procephalen Neuroektoderm

Auf der Grundlage des MAPK-Aktivierungsmusters in der embryonalen Hirnanlage liegt es nahe, dass EGFR an der Bildung von Hirn-NBs beteiligt sein könnte. Unterstützt wird diese Vermutung von Beobachtungen im embryonalen VNS, wo EGFR für die Bildung intermediärer NBs benötigt wird (Skeath, 1998).

Um den Einfluss von EGFR auf die NB-Bildung in der Hirnanlage zu untersuchen, wurde zunächst die Anzahl von Hirn-NBs in *EGFR^{f2}*-Mutanten nach Abschluss der NB-Bildung im späten Stadium 11 bestimmt. Dabei fiel auf, dass die Hirnanlage von *EGFR^{f2}*-Mutanten zu diesem Zeitpunkt durch umfangreiche apoptotische Degeneration gekennzeichnet ist. Um das Ausmaß von Apoptose genauer zu untersuchen, wurde die Expression der Protease *Drosophila* Caspase-1 (Dcp-1) in der Hirnanlage von *EGFR^{f2}*-Mutanten untersucht, welche spezifisch in apoptotischen Zellen aktiviert wird (Song et al., 1997), und somit als Apoptosemarker dient. Im pNE von *EGFR^{f2}*-Mutanten lässt sich im Vergleich zum Wildtyp ab Stadium 10 die erste ektopische Aktivierung von Dcp-1 in einigen Zellclustern des DC und PC beobachten (**Abb. 3-4 A, B**). Im weiteren Verlauf der NB-Bildung nimmt die Anzahl apoptotischer pNE-Zellen dramatisch zu und deckt im späten Stadium 11 weite Teile von TC, DC und vor Allem PC ab (**Abb. 3-4 C-F**). Die apoptotische Degeneration des pNE wird von einer deutlichen Reduktion Dpn-exprimierender Hirn-NBs begleitet, deren Gesamtzahl nach Abschluss der NB-Bildung im späten Stadium 11 um etwa 40% verringert ist (Wildtyp: $\bar{\varnothing}$ 100,3 \pm 4,1 NBs je Hirnhemisphäre (HHS), n=19; *EGFR^{f2}*: $\bar{\varnothing}$ 62,3 \pm 4,7 NBs je HHS, n=18) (**Abb. 3-4 E', F'**; **Abb. 3-5 A, B, E**).

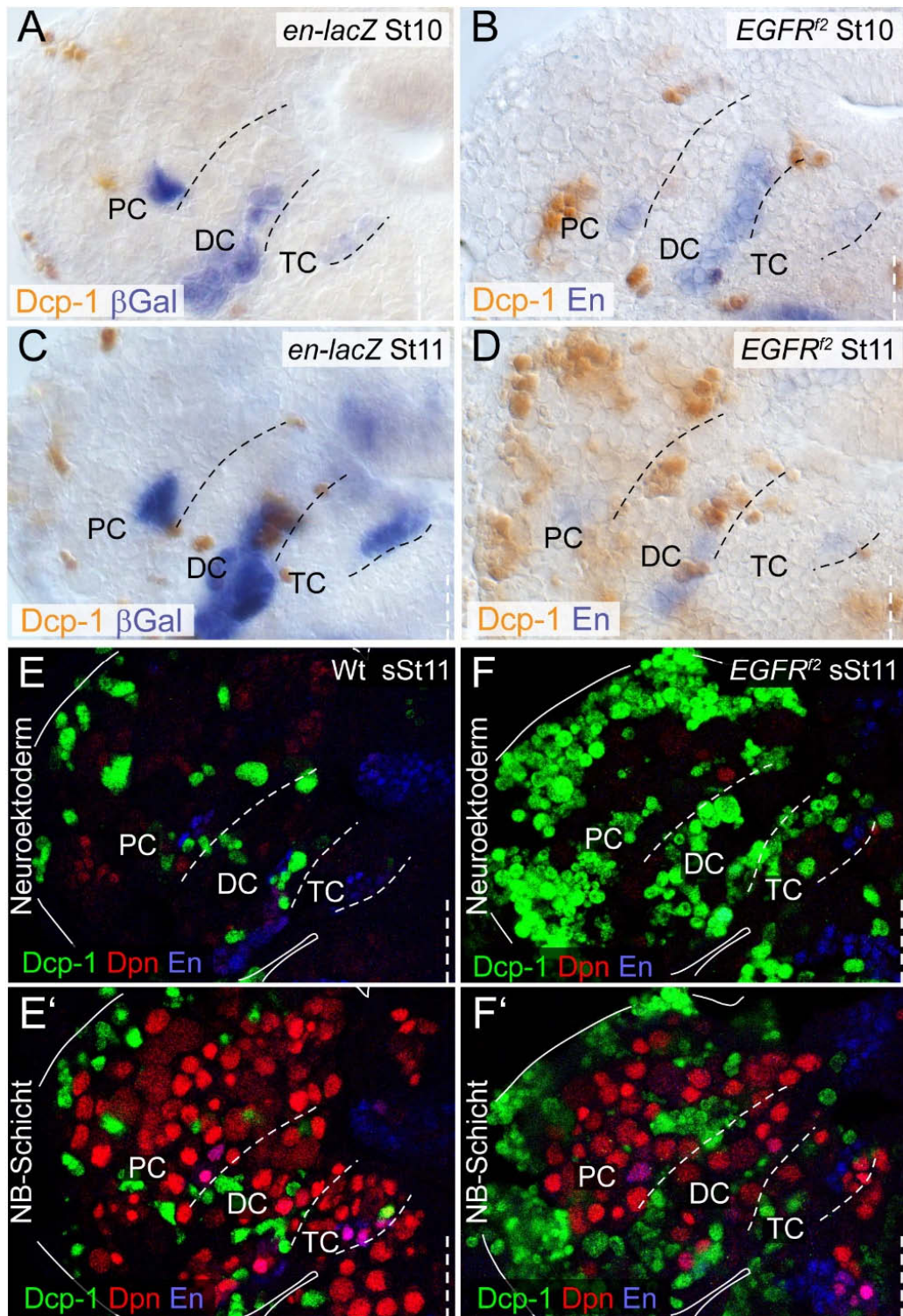


Abb. 3-4: Apoptose in der Hirnanlage von *EGFR^{f2}*-Mutanten

Gezeigt ist die Expression des Apoptosemarkers *Drosophila* Caspase-1 (Dcp-1) in Kombination mit dem Segmentmarker Engrailed (*En/en-lacZ*) (A-F) und dem NB-Marker Deadpan (Dpn) (E, F) in Stadium 10 (St10) bis spätem St11 (sSt11) im Wildtyp (*Wt/en-lacZ*) (A, C, E) und *EGFR^{f2}*-Mutanten (B, D, E). Im Fokus ist das pNE (A-F) bzw. die Neuroblasten (NB)-Schicht (E', F'; in E/E' und F/F' sind jeweils unterschiedliche Fokusebenen derselben Präparate dargestellt). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. (A-F) Im wildtypischen St10 sind vereinzelte pNE-Zellen apoptotisch (A). Bis sSt11 steigt die Anzahl apoptotischer NE-Zellen geringfügig (C, E). *EGFR^{f2}*-Mutanten zeichnen sich im Vergleich durch eine von St10 bis sSt11 deutlich zunehmende Anzahl apoptotischer NE-Zellen aus, welche im sSt11 weite Anteile des pNE von TC, DC und insbesondere PC ausmachen (B, D, F). Die Anzahl Dpn-exprimierender Hirn-NBs ist in *EGFR^{f2}*-Mutanten (F') im Vergleich zum Wt (E') deutlich reduziert, wobei in *EGFR^{f2}*-Mutanten keine Apoptose in NBs beobachtet werden kann.

Da jedoch keine Expression von Dcp-1 in Hirn-NBs beobachtet werden konnte ist davon auszugehen, dass lediglich das pNE von Apoptose betroffen ist, und die reduzierte Anzahl an Hirn-NBs in *EGFR*²-Mutanten nicht durch die apoptotische Degeneration von NBs zustande kommt (**Abb. 3-4 E', F'**). EGFR ist somit notwendig für die Bildung von ~40% der Hirn-NBs und bewerkstelligt dies vermutlich durch die Unterdrückung von Zelltod im pNE.

3.1.5. EGFR reguliert die Bildung von Hirnneuroblasten nicht nur durch die Unterdrückung von Apoptose im procephalen Neuroektodem

Um zu untersuchen, ob EGFR die NB-Bildung ausschließlich über die Unterdrückung von Apoptose im pNE reguliert, wurde die Anzahl an Hirn-NBs in *EGFR*²; *Df(3L)H99*-Doppelmutanten untersucht, welche auf Grund einer Deletion der pro-apoptotischen Gene *grm*, *hid*, *rpr* und *skl* keine Apoptose durchführen können (White et al., 1994; Choi et al., 2006). Diese zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine hochsignifikante Reduktion von Hirn-NBs um etwa 20-25% ($\bar{\phi}$ 78,8±10,4 NBs je HHS, n=14) (**Abb. 3-5 C, E**), welche somit deutlich geringer ausfällt als die etwa 40%ige Reduktion in *EGFR*²-Mutanten. Die NB-Anzahl in *Df(3L)H99*-Kontrollembryonen war im Vergleich zum Wildtyp hingegen nicht reduziert ($\bar{\phi}$ 100,8±6,7 NBs je HHS, n=14) (**Abb. 3-5 D, E**).

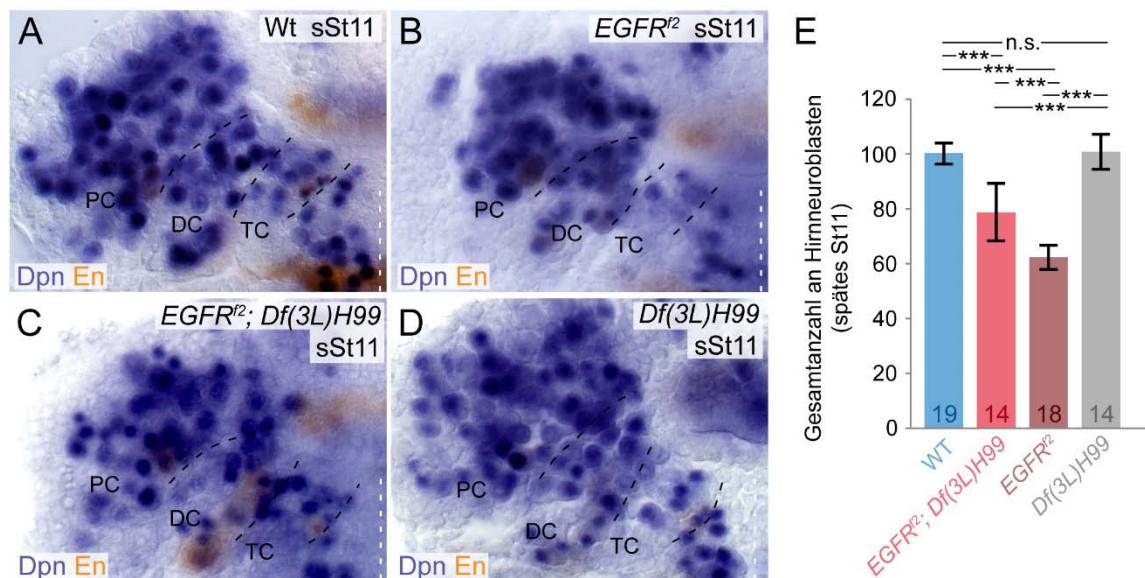


Abb. 3-5: Apoptose-abhängige und -unabhängige Bildung von NBs in *EGFR*-Mutanten

Gezeigt ist die Gesamtpopulation der Hirn-Neuroblasten (NBs) (visualisiert durch den NB-Marker Dpn) im Wt (A), *EGFR*²- (B), *EGFR*²; *Df(3L)H99*- (C) und *Df(3L)H99*-Mutanten (D) nach Abschluss der NB-Bildung im späten Stadium 11 (sSt11). Der Segmentmarker Engrailed (En) indiziert Grenzen der Hirnneuromere TC, DC und PC (schwarz gestrichelte Linien). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. (A-D) Im Wt werden in TC, DC und PC igs. etwa 100 Hirn-NBs gebildet (A) (vgl. Urbach et al., 2003), während in *EGFR*²-Mutanten rund 40% der Hirn-NBs fehlen (B). In apoptosedefizienten *EGFR*²; *Df(3L)H99*-Doppelmutanten fehlen nur rund 20-25% der Hirn-NBs (C). Dieser Verlust ist lediglich auf die Mutation von *EGFR* zurückzuführen, da *Df(3L)H99*-Kontrollembryonen eine wildtypische Anzahl von ~100 Hirn-NBs aufweisen (D). (E) Statistische Auswertung der NB-Zahlen in Wt ($\bar{\phi}$ 100,3±4,1 Hirn-NBs), *EGFR*²; *Df(3L)H99*-Doppelmutanten ($\bar{\phi}$ 78,8±10,4 Hirn-NBs), *EGFR*²-Mutanten ($\bar{\phi}$ 62,3±4,7 Hirn-NBs) und *Df(3L)H99*-Kontrollembryonen ($\bar{\phi}$ 100,8±6,7 Hirn-NBs). Zahlen in den Balken indizieren die Anzahl jeweils ausgewerteter Hirn-Hemisphären. Fehlerbalken indizieren Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant; *** p<0,0001; ungepaarter t-Test.

EGFR reguliert die Bildung von Hirn-NBs also durch die Unterdrückung von Apoptose in neuroektodermalen Vorläufern, kontrolliert jedoch darüber hinaus die Bildung von 20-25% der Hirn-NBs in apoptoseunabhängiger Weise

3.1.6. EGFR ist notwendig für die Bildung ventraler Hirnneuroblasten

In TC und DC wird EGFR während der NB-Bildungsphase im ventralen NE (TC und DC) und intermediäre NE (DC) aktiviert (**Abb. 3-1 D**; vgl. Urbach et al., 2003). Um gezielt die Bildung von Hirn-NBs in Regionen zu untersuchen, in welchen EGFR aktiv ist, wurde die Bildung ventraler und intermediärer NBs in beiden Neuromeren von *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten untersucht. Zur Identifikation intermediärer NBs wurde das DV-Gen *ind* nachgewiesen, welches spezifisch in intermediären NBs exprimiert wird (Urbach und Technau, 2003b). Durch die stereotype Lage ventral der Ind-positiven, intermediären NBs konnten darüber hinaus auch ventrale NBs zuverlässig identifiziert werden (**Abb. 3-6 A, A', B, B'**).

In *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten konnte eine deutliche Reduktion ventraler NBs in TC und DC beobachtet werden (**TC**: $\bar{\phi}$ 4,5 \pm 1,1 NBs je HHS im Wt, n=12; $\bar{\phi}$ 1,4 \pm 0,8 NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=18; **DC**: $\bar{\phi}$ 4,9 \pm 1,0 NBs je HHS im Wt, n=12; $\bar{\phi}$ 3,2 \pm 0,9 NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=18), während intermediäre NBs in normaler Anzahl gebildet werden (**TC**: $\bar{\phi}$ 2,6 \pm 0,6 NBs je HHS im Wt, n=12; $\bar{\phi}$ 2,6 \pm 0,9 NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=18; **DC**: $\bar{\phi}$ 2,1 \pm 0,3 NBs je HHS im Wt, n=12; $\bar{\phi}$ 2,3 \pm 0,5 NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=18) (**Abb. 3-6 A-C**).

Auch die Verwendung des Markers Vnd, welcher spezifisch in ventralen NBs exprimiert wird (Urbach und Technau, 2003a), lieferte vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Verlusts ventraler NBs in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten (**Abb. 3-6 D-E**). Vnd wird im wildtypischen Stadium 11 in allen ventralen NBs des TC und PC, sowie in zwei NBs des DC (dem ventralen Dv8 sowie dem dorsalen Dd5) exprimiert (Urbach und Technau, 2003b), und erlaubt somit auch Rückschlüsse auf die Bildung ventraler NBs im PC. In *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten wurde im Vergleich zum Wt eine signifikante Reduktion Vnd-exprimierender NBs in allen Hirnneuromeren beobachtet (**TC**: $\bar{\phi}$ 5,1 \pm 0,6 NBs je HHS im Wt, n=10; $\bar{\phi}$ 1,4 \pm 0,7 NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=20; **DC**: $\bar{\phi}$ 2,0 \pm 0,0 NBs je HHS im Wt, n=10; $\bar{\phi}$ 1,2 \pm 0,5 NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=20; **PC**: $\bar{\phi}$ 8,6 \pm 0,7 NBs je HHS im Wt, n=10; $\bar{\phi}$ 5,9 \pm 1,3 NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=20) (**Abb. 3-6 D-F**), was die zuvor beobachtete Reduktion ventraler NBs im TC und DC von *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten bestätigt.

Im Vergleich zu apoptosedefizienten *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten zeigen *EGFR^{f2}*-Mutanten nur eine geringfügig höheren Verlust ventraler NBs in TC, während die Anzahl intermediärer NBs in TC und DC sowie ventraler NBs im DC nicht signifikant reduziert ist (**Abb. 3-6 C**). Da *EGFR^{f2}*-Mutanten im Vergleich zu *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten jedoch eine um 10-15% verringerte Gesamtzahl an Hirn-NBs aufweisen, lässt sich darauf schließen, dass insbesondere das PC von *EGFR^{f2}*-Mutanten von apoptoseabhängigen Defekten der NB-Bildung betroffen ist. Dieser Schluss ist konform mit der zuvor beobachteten umfangreichen apoptotischen Degeneration des protocerebralen NE in *EGFR^{f2}*-Mutanten (siehe Kapitel 3.1.4).

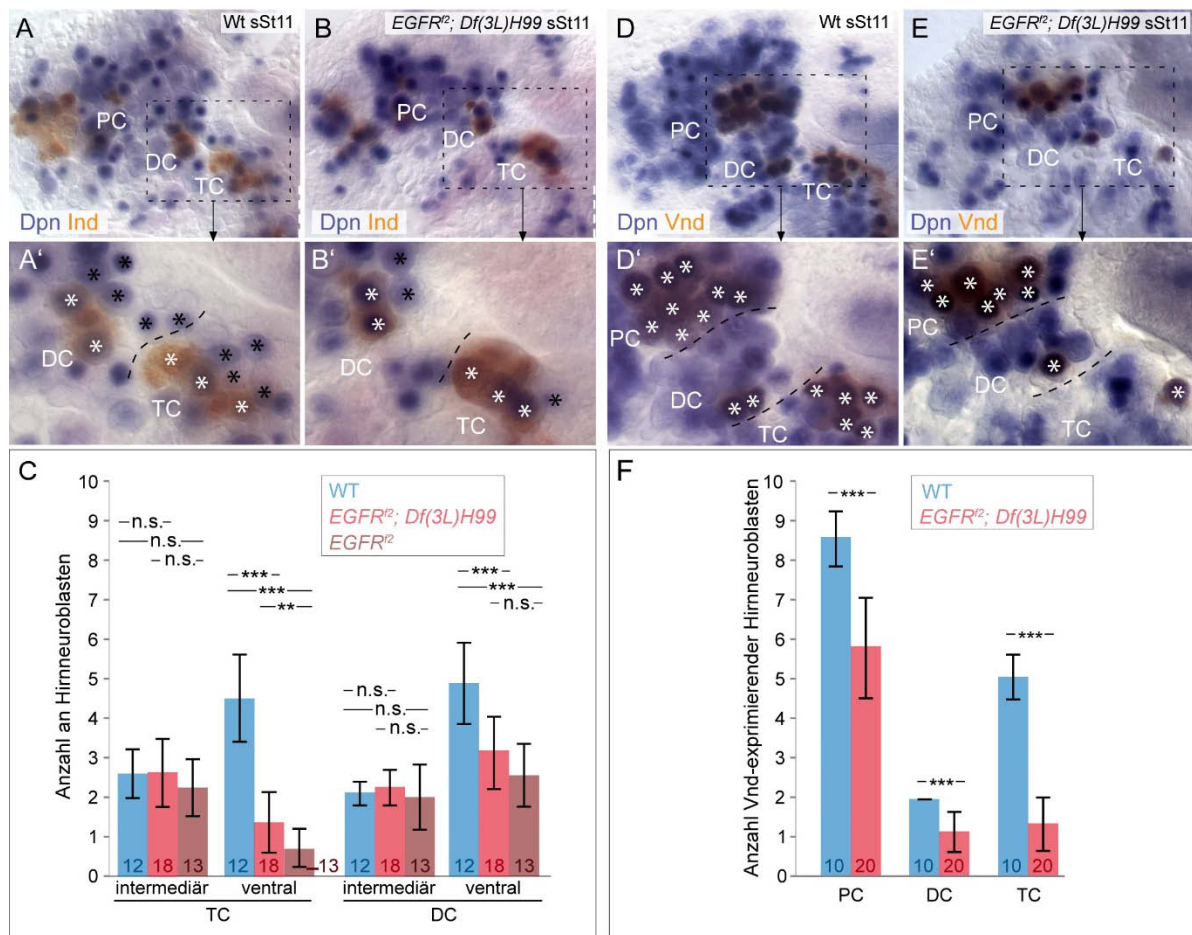


Abb. 3-6: Bildung ventraler und intermediärer NBs in Abhängigkeit von EGFR

Gezeigt sind ventrale und intermediäre Neuroblasten (NBs) im TC und DC des Wt (A, A', D, D') und von *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten (B, B', E, E') nach Abschluss der NB-Bildung im späten Stadium 11 (sSt11) (A', B', D', E' zeigen jeweils Vergrößerungen entsprechend des gestrichelten Kastens in A, B, D, E). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. NBs wurden durch ihre Morphologie, Lage und Expression des NB-Markers Dpn identifiziert (vgl. Urbach et al., 2003). Ind markiert intermediäre NBs in TC und DC (Urbach und Technau, 2003a) (weiße Sterne in A', B'). Ventrale NBs wurde durch ihre Lage ventral der intermediären NBs (schwarze Sterne in A', B') oder Expression des DV-Gens Vnd (weiße Sterne in D', E') (Urbach und Technau, 2003a) identifiziert. (A, B) In TC und DC von *EGFR^{f2}; Df(3L)H99* (B, B') ist im Vergleich zum Wt (A, A') eine wildtypische Anzahl intermediärer NBs (weiße Sterne) zu beobachten, während die Anzahl ventraler NBs (schwarze Sterne) in beiden Neuromeren reduziert ist. (C) Statistische Auswertung der Anzahl ventraler und intermediärer NBs in DC und TC von Wt, *EGFR^{f2}; Df(3L)H99* und *EGFR^{f2}* (entsprechend des angegebenen Farbcodes) (Intermediäre NBs im TC: Wt $\bar{x} \pm \text{SD}$ $2,6 \pm 0,6$; *EGFR^{f2}; H99* $2,6 \pm 0,9$; *EGFR^{f2}* $2,2 \pm 0,7$; intermediate NBs im DC: Wt $\bar{x} \pm \text{SD}$ $2,1 \pm 0,3$; *EGFR^{f2}; H99* $2,3 \pm 0,5$; *EGFR^{f2}* $2,0 \pm 0,8$; ventrale NBs im TC: Wt $\bar{x} \pm \text{SD}$ $4,5 \pm 1,1$; *EGFR^{f2}; H99* $1,4 \pm 0,8$; *EGFR^{f2}* $0,7 \pm 0,5$; ventrale NBs im DC: Wt $\bar{x} \pm \text{SD}$ $4,9 \pm 1,0$; *EGFR^{f2}; H99* $3,2 \pm 0,9$; *EGFR^{f2}* $2,6 \pm 0,8$). Zahlen in Balken indizieren die Anzahl ausgewerteter Hirnhemisphären; n.s. nicht signifikant, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$, ungepaarter t-Test. (D, E) Vnd markiert ventrale NBs im TC und PC und eine Subpopulation von zwei NBs im DC (ventraler Dv8 und dorsaler Dd5) (Urbach und Technau, 2003a) (weiße Sterne in D', E'). Die Anzahl Vnd-exprimierender NBs ist in TC, DC und PC von *EGFR^{f2}; Df(3L)H99* (E, E') im Vergleich zum Wt (D, D') reduziert. (F) Statistische Auswertung der Anzahl Vnd-exprimierender NBs in PC, DC und TC von Wt und *EGFR^{f2}; H99* (siehe Farbcode) (PC: $\bar{x} \pm \text{SD}$ $8,6 \pm 0,7$ NBs je HHS im Wt, n=10; $\bar{x} \pm \text{SD}$ $5,9 \pm 1,3$ NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=20; DC: $\bar{x} \pm \text{SD}$ $2,0 \pm 0,0$ NBs je HHS im Wt, n=10; $\bar{x} \pm \text{SD}$ $1,2 \pm 0,5$ NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=20; TC: $\bar{x} \pm \text{SD}$ $5,1 \pm 0,6$ NBs je HHS im Wt, n=10; $\bar{x} \pm \text{SD}$ $1,4 \pm 0,7$ NBs je HHS in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*, n=20). Zahlen in Balken indizieren die Anzahl ausgewerteter Hirnhemisphären; Fehlerbalken indizieren Standardabweichung; n.s. nicht signifikant, *** $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test.

Die bisher geschilderten Ergebnisse zeigen, dass EGFR im TC für die Bildung der meisten ventralen NBs benötigt wird. Um die Identität ventraler NBs, die in Abhängigkeit von EGFR gebildet werden, weiter einzugrenzen, wurde die Expression des NB-Subpopulationsmarkers Dachshund (Dac) im TC von *EGFR^{f2}*-Mutanten untersucht. Dac wird im TC spezifisch im ventralen NB Tv2 exprimiert (Urbach

und Technau, 2003a). Wie im Wildtyp wurde auch in *EGFR^{f2}*-Mutanten stets ein Dac-exprimierender NB an der typischen Position des Tv2 beobachtet (n=22 HHS) (**Abb. 3-7 A, B**), dessen Bildung demnach nicht von EGFR abhängt. Da im TC von *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten durchschnittlich nur ein ventraler NB gebildet wird (**Abb. 3-6 B', C, E', F**) lässt sich darauf schließen, dass es sich dabei um Tv2 handelt, und EGFR Aktivität somit für die Bildung aller übrigen ventralen NBs des TC (Tv1, Tv3, Tv4, Tv5; vgl. Urbach et al., 2003) benötigt wird.

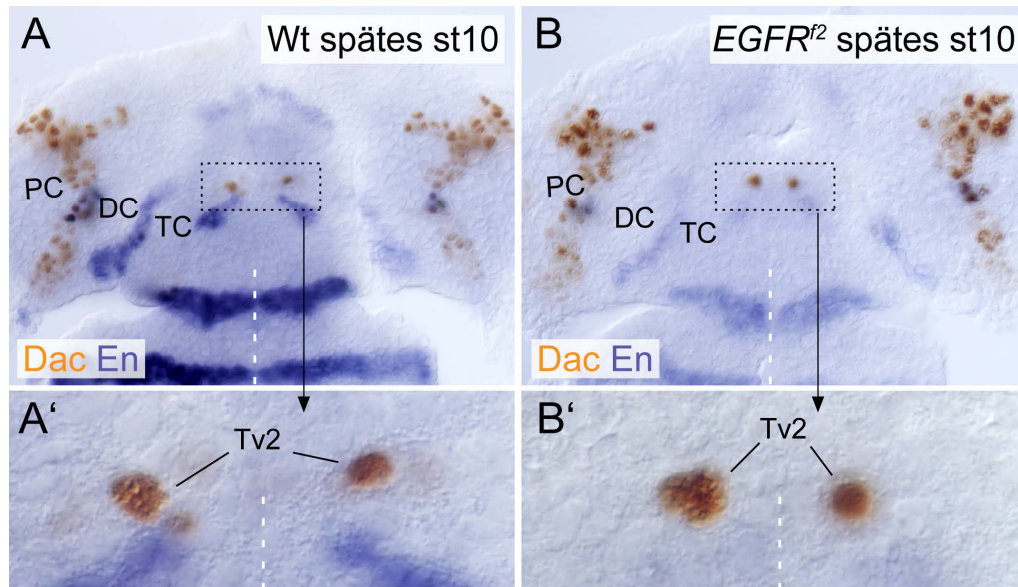


Abb. 3-7: Bildung des tritocerebralen Neuroblasten Tv2 in *EGFR*-Mutanten

Gezeigt ist die Expression des Neuroblasten (NB)-Subpopulationsmarkers Dachshund (Dac) in Kombination mit dem Segmentmarker Engrailed (En) in der Hirnanlage des Wildtyp (A, A') und von *EGFR^{f2}*-Mutanten (B, B') im späten Stadium 10 (A', B' zeigen jeweils Vergrößerungen des TC entsprechend der gestrichelten Kästen in A, B); für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. (A, B) Dac wird im wildtypischen TC spezifisch im ventralen NB Tv2 exprimiert (Urbach und Technau, 2003a) (A, A'), welcher auch in *EGFR^{f2}*-Mutanten stets beobachtet werden kann (100% der HHS, n=22) (B, B').

3.1.7. EGFR reguliert die Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* im procephalen Neuroektoderm

Hirn-NBs werden maßgeblich in Abhängigkeit des proneuralen Gens *lethal of scute* (*l'sc*) gebildet (Younossi-Hartenstein et al., 1997; Urbach et al., 2003). Da EGFR die NB-Bildung auch auf apoptoseunabhängige Weise kontrolliert, besteht die Möglichkeit, dass EGFR dies durch die Regulation von *l'sc* bewerkstelligt. Aus diesem Grund wurde die Expression von *l'sc* im pNE von *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten während der frühen und fortgeschrittenen NB-Bildungsphase untersucht (frühes Stadium 9 bzw. Stadium 11). Im Vergleich zum Wildtyp ist die Expression von *l'sc* in *EGFR^{f2}; Df(3L)H99*-Doppelmutanten zu beiden Zeitpunkten deutlich reduziert, wobei die Ausfälle mit der Ausdehnung der EGFR-Aktivität in PC, DC und TC übereinstimmen (**Abb. 3-8 A-D**). Um zu überprüfen, ob EGFR-Aktivität auch hinreichend ist, um *l'sc*-Expression zu induzieren, wurde diese nach ektopischer Aktivierung des EGFR-Rezeptors durch panneurale Expression des sekretierten EGFR-Liganden Spitz (*sSpi*) (Schweitzer et al., 1995b) unter Verwendung des *sca*-Gal4-Treibers (Klaes et al., 1994) analysiert (im Folgenden *sca>sSpi*). Dazu wurde mit Stadium 12 ein Zeitpunkt gewählt,

zu dem die NB-Bildung abgeschlossen, und die endogene *l'sc*-Expression weitestgehend herunterreguliert ist. *sca>sSpi*-Embryonen weisen im Vergleich zum Wt in Stadium 12 eine deutliche Überaktivierung von *l'sc* auf (**Abb. 3-8 D, E**). Die Expression von *l'sc* geht dabei jedoch nicht über Bereiche hinaus, in welchen endogene *l'sc*-Expression zu früheren Zeitpunkten beobachtet werden kann (vgl. **Abb. 3-8 B/F**). Es ist also davon auszugehen, dass EGFR nicht hinreichend ist, um ektopische *l'sc*-Expression zu induzieren, wohl aber, um bestehende *l'sc*-Expression verlängert aufrechtzuerhalten.

Um zu überprüfen, ob die verlängerte *l'sc*-Expression in *sca>sSpi* zur Bildung zusätzlicher Hirn-NBs führt, wurde deren Anzahl in *sca>sSpi* bestimmt. Dazu wurde Stadium 13 gewählt, da es sich dabei um das späteste Stadium handelt, zu welchem *sca*-Gal4 umfangreich im pNE aktiv ist (nicht gezeigt). Die Anzahl an Hirn-NBs ist in *sca>sSpi*-Embryonen in Stadium 13 deutlich erhöht ($\bar{\varnothing}$ 163,4 \pm 11,0 NBs je HHS in *sca>sSpi*, n=10; $\bar{\varnothing}$ 127,2 \pm 9,2 NBs je HHS im Wt n=10) (**Abb. 3-8 G-I**). Zusätzlich wurde die Anzahl proliferierender NBs in *sca>sSpi*-Embryonen untersucht, da EGFR-Aktivität in verschiedenen Entwicklungszusammenhängen einen positiven Einfluss auf die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen ausübt (z.B. Schweitzer und Shilo, 1997; Garoia et al., 2005; Marena et al., 2006; Jiang und Edgar, 2009). Dazu wurde mit Hilfe des Mitosemarkers Phosphohiston H3 (PH3) der relative Anteil proliferierender NBs im Wildtyp und *sca>sSpi* in Stadium 13 bestimmt. Die absolute Anzahl proliferierender NBs ist in *sca>sSpi* zwar signifikant erhöht (*sca>sSpi*: $\bar{\varnothing}$ 40,8 \pm 5,5 NBs je HHS PH3⁺, n=10; Wt: $\bar{\varnothing}$ 29,0 \pm 3,5 NBs je HHS PH3⁺, n=10), nicht jedoch deren relativer Anteil in Bezug auf die NB-Gesamtzahl (*sca>sSpi*: $\bar{\varnothing}$ 25% der NBs je HHS PH3⁺, n=10; Wt: $\bar{\varnothing}$ 23% NBs je HHS PH3⁺, n=10) (**Abb. 3-8 G-I**).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass EGFR notwendig und hinreichend zur Aufrechterhaltung der *l'sc*-Expression im pNE ist und so unabhängig von Apoptose die Bildung von Hirn-NBs kontrolliert. Ektopische EGFR-Aktivität hat jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die proliferative Aktivität von Hirn-NBs.

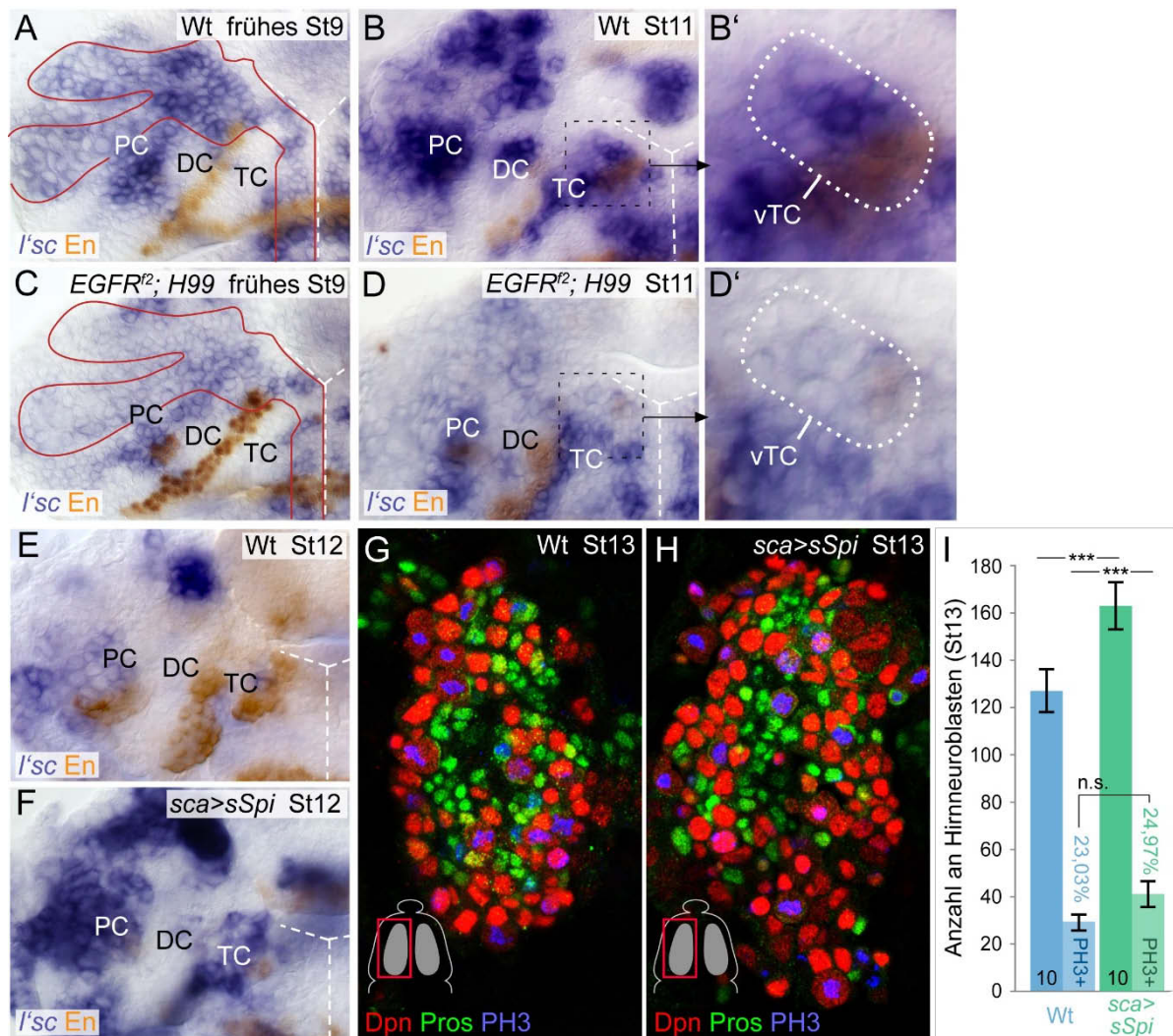


Abb. 3-8: Expression des proneural Gens *lethal of scute* in Abhängigkeit von EGFR und NB-Bildung nach EGFR-Überaktivierung

Gezeigt ist die Expression von *lethal of scute*-mRNA (*l'sc*) in Kombination mit dem Segmentmarker Engrailed (En) (A-F) in linken Hirnhemisphären nach Filetpräparation (für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1), sowie die Expression des Neuroblasten (NB)-Markers Deadpan (Dpn), des Gangliemutterzellmarkers Prospero (Pros) und der Proliferationsmarkers Phospho-Histon H3 (PH3) in linken Hirnhemisphären von *whole-mount*-Embryonen (G, H) (Dorsalaufsicht, anterior ist oben, ventrale Mittellinie ist rechts) in den jeweils indizierten Stadien und Genotypen; in B'/D' sind jeweils Vergrößerungen von B/D entsprechend der gestrichelten Kästen dargestellt. (A-D) *l'sc* wird im wildtypischen pNE im frühen St9 (A) und St11 (B) umfangreich exprimiert. Dazu zählen Anteile des pNE, in welchen EGFR/MAPK aktiv ist (rote Umrandung in A; vgl. Abb. 3-1 D). *EGFR²; Df(3L)H99*-Doppelmutanten zeigen großflächige Ausfälle der *l'sc*-Expression im frühen St9 (B) und St11 (D), welche mit EGFR/MAPK-Aktivität im pNE (rote Umrandung in C) übereinstimmen. Ausfälle der *l'sc*-Expression betreffen u. a. das ventrale TC (weiß gestrichelte Umrandung in D'; vgl. Wt in B'), wo die meisten NBs in Abhängigkeit von EGFR gebildet werden (vgl. Abb. 3-6). (E, F) In St12 wurde *l'sc*-Expression im wildtypischen pNE weitgehend herunterreguliert, während die panneurale EGFR-Aktivierung durch ektopische Expression des EGFR-Liganden Spitz mittels des *scabrous*-Gal4-Treibers (*sca>sSpi*) zu einer verlängerten Aufrechterhaltung von *l'sc*-Expression führt (F). (G, H) Die NB-Gesamtzahl ist in Stadium 13 von *sca>sSpi* (H) im Vergleich zum Wildtyp (G) deutlich erhöht (NBs wurden auf Grundlage der kortikalen Lage, Morphologie, Expression von Dpn und fehlender nukleärer Lokalisation von Pros identifiziert; vgl. Spana und Doe, 1995). Die Gesamtzahl, jedoch nicht der relative Anteil proliferierender (PH3-positiver) NBs ist in *sca>sSpi* (H) im Vergleich zum Wt (G) erhöht. (I) Statistische Auswertung von G, H; Wildtyp: \bar{x} 127,2±9,2 NBs, davon sind 29,0±3,5 NBs (23,0%) PH3-positiv; *sca>sSpi*: \bar{x} 163,4±11,0 NBs, davon sind 40,8±5,5 NBs (25,0%) PH3 positiv); Zahlen in Balken indizieren Anzahl ausgewerteter Hirnhemisphären; Fehlerbalken indizieren Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant; *** p<0,0001, Ungepaarter t-Test. Siehe Text für weitere Details.

3.1.8. EGFR reguliert Zellteilungen der frühen Hirnanlage

Als nächstes wurde untersucht, ob EGFR einen Einfluss auf die proliferative Aktivität des frühen pNE ausübt. EGFR würde in diesem Fall die Ausdehnung des pNE und somit die Größe proneuraler Domänen beeinflussen, von welcher letztendlich die Anzahl entstehender NBs abhängt. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des Mitosemarkers PH3 die Anzahl proliferierender Zellen im ventralen- und zentralen pNE von Wildtyp-Embryonen und *EGFR^{f2}*-Mutanten bestimmt. Dazu wurde mit dem frühen Stadium 8 ein Zeitpunkt gewählt, in welchem sowohl EGFR-Aktivität als auch mitotische Aktivität im ventralen/zentralen pNE deutlich ausgeprägt sind (**Abb. 3-9 A, B**).

In *EGFR^{f2}*-Mutanten konnte im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Reduktion um durchschnittlich ~20% PH3-positiver Neuroektodermalzellen im ventralen- und zentralen pNE beobachtet werden (Wt: $\bar{\phi}$ 48,9 \pm 10,5 NE-Zellen je HHS, n=24; *EGFR^{f2}*: $\bar{\phi}$ 40,4 \pm 10,1 NE-Zellen je HHS, n=21) (**Abb. 3-9 B-D**). Besonders deutlich ist diese Reduktion im ventralen NE von *EGFR^{f2}*-Mutanten, in welchem EGFR umfangreich aktiviert wird (vgl. **Abb. 3-1 A-D**).

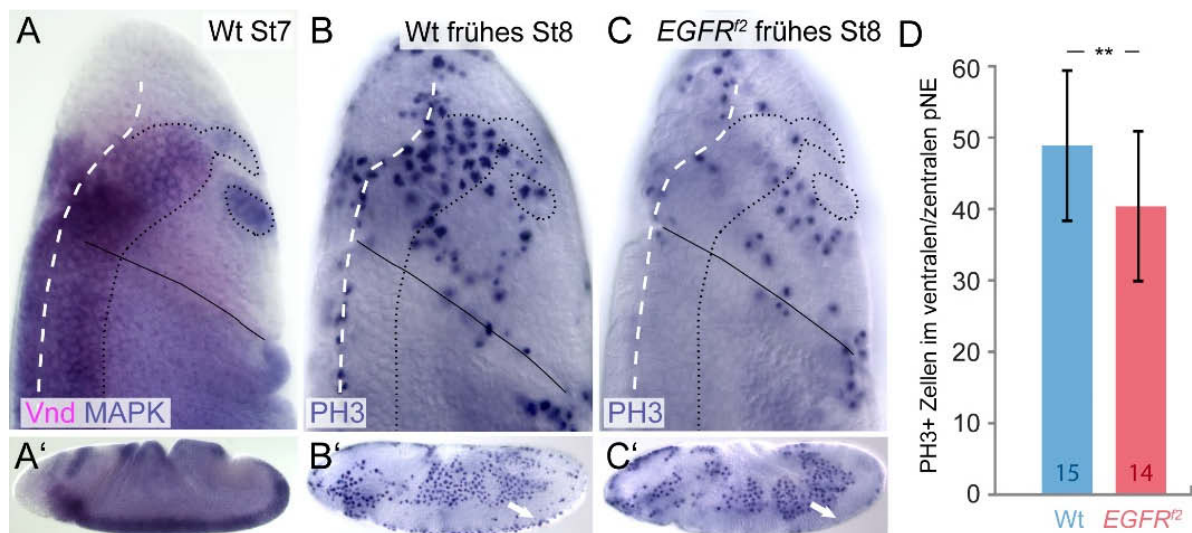


Abb. 3-9: EGFR-abhängige Kontrolle früher Zellteilungen im pNE

Gezeigt ist die MAPK-Aktivität (im Kontext von Vnd als Marker für ventrales Neuroektoderm) bzw. der Mitosemarker Phospho-Histon 3 (PH3) im Kopfbereich von *whole-mount*-Embryonen im Stadium (St) 7 (A) bzw. frühen St 8 (B, C) mit Fokus auf das ventrale/zentrale pNE; anterior ist oben, weiß gestichelte Linie = ventrale Mittellinie, schwarze Linie = cephale Furche, gepunktete Umrandung = wildtypisches MAPK-Aktivierungsmuster (vgl. MAPK in A); A'-C' zeigt jeweils eine Gesamtansicht der Embryonen aus A-C (anterior ist links). (A) MAPK ist im ventralen und zentralen pNE aktiv, bevor es mitotisch aktiv wird (vgl. B). (B, C) Im Wildtyp (Wt) (B) werden im frühen St 8 umfangreiche mitotische Domänen im ventralen/zentralen pNE ausgebildet (vgl. Foe, 1989). *EGFR^{f2}*-Mutanten (C) zeigen eine deutlich reduzierte Anzahl proliferierender Neuroektodermalzellen in Bereichen des ventralen/zentralen pNE, die im Wildtyp durch EGFR/MAPK-Aktivität gekennzeichnet sind (gepunktete Umrandung; vgl. A, B). Proliferation ist auch im MAPK-exprimierenden VNS reduziert (weißer Pfeil in C', vgl. A', B') (D) Die Anzahl PH3-exprimierender Zellen des ventralen/zentralen pNE ist in *EGFR^{f2}*-Mutanten ($\bar{\phi}$ 40,4 \pm 10,1 je HHS) im Vergleich zum Wt ($\bar{\phi}$ 48,9 \pm 10,5 je HHS) signifikant reduziert; Fehlerbalken indizieren Standardabweichung; Zahl in Balken indiziert die Anzahl ausgewerteter Hirnhemisphären; ** p<0,01, ungepaarter t-Test.

EGFR kontrolliert also die proliferative Aktivität und somit die Ausdehnung des frühen pNE. Neben der Kontrolle des proneuralen Gens *l'sc* und der Unterdrückung von Apoptose im pNE (siehe oben) nimmt EGFR also auch auf diesem Wege Einfluss auf die Ausdehnung proneuraler Domänen und somit auf die Anzahl gebildeter Hirn-NBs.

3.1.9. Zusammenfassung: Funktionen des EGFR in der frühen Hirnentwicklung

Basierend auf den vorherigen Kapiteln konnten diverse Funktionen des EGFR in der embryonalen Hirnentwicklung identifiziert werden, welche für die korrekte Bildung von Hirn-NBs verantwortlich sind. Vor der NB-Bildung wird EGFR zunächst für Zellteilungen im pNE benötigt, welche die Ausdehnung des pNE bestimmen. Während der NB-Bildung wird EGFR für die Expression des proneuralen Gens *l'sc* in weiten Teilen des pNE benötigt, welches maßgeblich für die Bildung von Hirn-NBs verantwortlich ist (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Younossi-Hartenstein et al., 1997). Den weiteren Verlauf der NB-Bildung stellt aktivierter EGFR sicher, indem er Zelltod im pNE unterdrückt, wovon vor allem das PC betroffen ist. Der fehlerhafte Ablauf dieser Prozesse kann zusammengenommen den Verlust von etwa 40% der Hirn-NBs in *EGFR^{f2}*-Mutanten erklären, obgleich weitere EGFR-abhängige Prozesse diesbezüglich einen zusätzlichen Beitrag leisten können (z.B. die Beeinflussung lateraler Inhibition bei der NB-Bildung).

3.1.10. Die Verteilung von EGFR-Ligandenquellen in der frühen Hirnanlage zeigt deutliche segmentspezifische Unterschiede

Nachdem in den vergangenen Kapiteln verschiedene Funktionen des EGFR in der frühen Hirnentwicklung beleuchtet wurden, beschäftigen sich die folgenden Kapitel mit der Regulation der EGFR-Aktivität im pNE. Das komplexe, segment-spezifische Aktivierungsmuster von EGFR (siehe Kapitel 3.1.1) steht dort im Gegensatz zum relativ einfachen EGFR-Aktivierungsmuster im embryonalen VNS (Skeath, 1998). Dort wird EGFR von den sekretierten Liganden Spitz (Spi) und Vein (Vn) aktiviert (Schweitzer et al., 1995b; Schnepf et al., 1996; Skeath, 1998). Um die Grundlage des hirnspezifischen EGFR-Aktivierungsmusters zu untersuchen, wurde zunächst die Verteilung dieser Liganden in der frühen Hirnanlage analysiert. Spi-Sekretionsquellen wurden dabei durch den Nachweis von *rhomboid (rho)*-mRNA dargestellt, weil Rho die zeitlich/räumliche Sekretion von Spi reguliert wird (Schweitzer et al., 1995b; Urban et al., 2002). Vn-Sekretionsquellen wurden hingegen durch den direkten Nachweis von *vn*-mRNA dargestellt.

3.1.10.1. *rhomboid* und *vein* werden differentiell im procephalen Neuroektoderm und angrenzenden Mesektoderm exprimiert

In Stadium 5 wird *rho* in einem breiten Streifen im pNE induziert, welcher mit der *vnd*-Expressionsdomäne übereinstimmt und somit das ventrale NE von TC, DC und PC umfasst (Urbach et al., 2006) (**Abb. 3-10 A, I**). Die Expression beider Faktoren korrespondiert somit mit der zuvor beobachteten MAPK-Aktivität im ventralen NE der frühen Hirnanlage (**Abb. 3-1 A, B**). In Stadien 6-9 wird die *rho*-Expression im ventralen TC, DC und PC zunehmend reduziert, bis letztendlich in Stadium 9 nur noch eine äußerst geringe Expression im ventralen DC und PC zu erkennen ist (**Abb. 3-10 B, C**). Im ventral an das pNE angrenzenden Mesektoderm (charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors Single-minded (Sim); Nambu et al., 1990) wird *rho*-Expression hingegen

aufrechterhalten und dort in Stadium 9 außerordentlich stark exprimiert (**Abb. 3-10 C, D**). Daneben wird *rho* ab Stadium 5/6 innerhalb der anterioren und posterioren MAPK-Streifen des dorsalen/intermediären PC induziert, wobei im anterioren Streifen relativ schwache *rho*-Expression beobachtet werden kann (**Abb. 3-10 A, B**). In Stadium 9 ist die *rho*-Expression im anterioren MAPK-Streifen des d/iPC nach wie vor schwach, im posterioren Streifen jedoch deutlich zu beobachten (**Abb. 3-10 C**).

Insgesamt korreliert die räumlich-zeitliche *rho*-Expression deutlich mit dem MAPK-Aktivierungsmuster (vgl. **Abb. 3-1 A-D**), wobei das Level der *rho*-Expression variiert und nur bedingt mit der MAPK-Aktivierungsintensität übereinstimmt. Insbesondere im Umfeld des ventralen und intermediären DC, ventralen PC und anterioren MAPK-Streifens innerhalb des dorsalen/intermediären PC wird *rho* trotz deutlicher MAPK-Aktivität recht schwach exprimiert (**Abb. 3-10 K**).

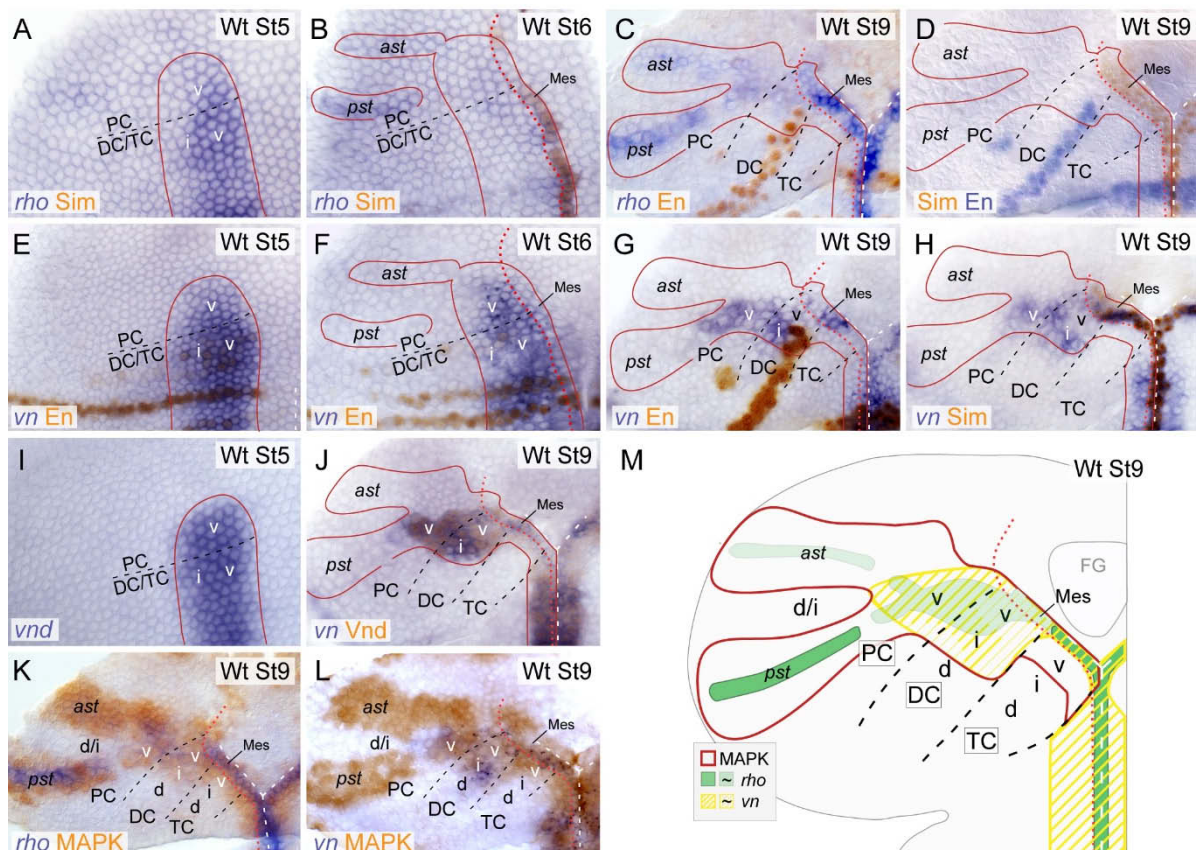


Abb. 3-10: Expression von *rho* und *vn* im pNE

(A-L) Gezeigt ist die wildtypische Expression von *rho*- und *vn*-mRNA in Stadien 5-9 im Kontext des Segmentmarkers Engrailed (En), des Mesektoderm (Mes)-Markers Single-minded (Sim), des DV-Gens Ventral nervous system defective (Vnd) und der MAPK-Aktivität (entsprechend der Angaben; für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1). Rote Umrandungen indizieren das wildtypische EGFR/MAPK-Aktivierungsmuster im jeweiligen Stadium (vgl. Abb. 3-1 A-D). (M) Schematische Darstellung der *rho*- und *vn*-Expression im Kontext des MAPK-Aktivierungsmusters in St 9 (entsprechend des angegebenen Farbcodes; ~ indiziert schwache *rho/vn*-Expression). Siehe Text für weitere Details.

Die Expression von *vn* korreliert in Stadium 5 noch deutlich mit *rho* und MAPK und wird ebenfalls im ventralen, *vnd*-exprimierenden NE induziert (**Abb. 3-10 E, I**). Im weiteren Verlauf unterscheidet sich die Verteilung von *vn* und *rho* im pNE jedoch deutlich. So wird *vn*-Expression bis Stadium 9 lediglich

im ventralen TC herunterreguliert, im übrigen NE (vPC und v/iDC) und angrenzendem, Sim-exprimierenden Mesektoderm jedoch aufrechterhalten (**Abb. 3-10 F-H**). Die *vn*-Expression korrespondiert somit auch in Stadium 9 noch deutlich mit Vnd (**Abb. 3-10 J**). Im d/iPC wird *vn* trotz umfangreicher MAPK-Aktivität jedoch zu keinem Zeitpunkt exprimiert (**Abb. 3-10 F-H, L**).

Zusammengenommen korrespondiert die Expression von *rho* und *vn* also deutlich mit dem räumlich/zeitlichen MAPK-Aktivierungsmuster, wobei sich die Kombinatorik beider Faktoren innerhalb der MAPK-Domäne regional deutlich unterscheidet (zusammengefasst in **Abb. 3-10 M**). Somit liegt nahe, dass die EGFR-Aktivität im pNE ähnlich wie im VNS von *rho*/Spi und Vn induziert wird, wobei sie im Gegensatz dazu in den Hirnneuromeren vermutlich von einer regional unterschiedlichen Kombination beider Liganden abhängt.

3.1.10.2. *spitz* und *Star* werden in der frühen Hirnanlage ubiquitär, jedoch in regional unterschiedlicher Intensität exprimiert

Auf Grundlage des *rho*-Expressionsmusters liegt nahe, dass die räumlich/zeitliche Spi-Sekretion, wie im embryonalen VNS, auch im pNE durch die Expression von *rho* reguliert wird. Neben *rho* wird auch das Chaperon *Star* (*S*) für die Sekretion von Spi benötigt (Tsruya et al., 2002). Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Verteilung von Spi-Sekretionsquellen im pNE auch auf der Ebene der *S*- und *spi*-Expression reguliert wird, wurde als nächstes die Verteilung von *S*- und *spi*-mRNA im wildtypischen pNE untersucht. *S* und *spi* werden in Stadium 9 im gesamten pNE sowie im angrenzenden Mesektoderm exprimiert (**Abb. 3-11 A-C**) und nehmen somit offenbar keinen direkten Einfluss auf die Verteilung der Spi-Sekretionsquellen. Jedoch weisen beide Faktoren regional unterschiedliche Expressionsstärken auf. So wird *S* im anterioren PC außerordentlich stark exprimiert, während die Expression im übrigen PC und im dorsalen TC zum Teil recht schwach ist. *spi* wird etwas gleichmäßiger exprimiert, zeigt in dorsalen Anteilen des pNE jedoch ein vergleichsweise schwaches Signal. Obwohl die Verteilung von Spi-Ligandenquellen also offenbar nicht auf der Ebene der *spi*- und *S*-Expression bestimmt wird ist es möglich, dass die Verfügbarkeit des aktiven Spi-Liganden in den verschiedenen Regionen des pNE durch die Expressionsstärke von *spi* und *S* mitbestimmt wird.

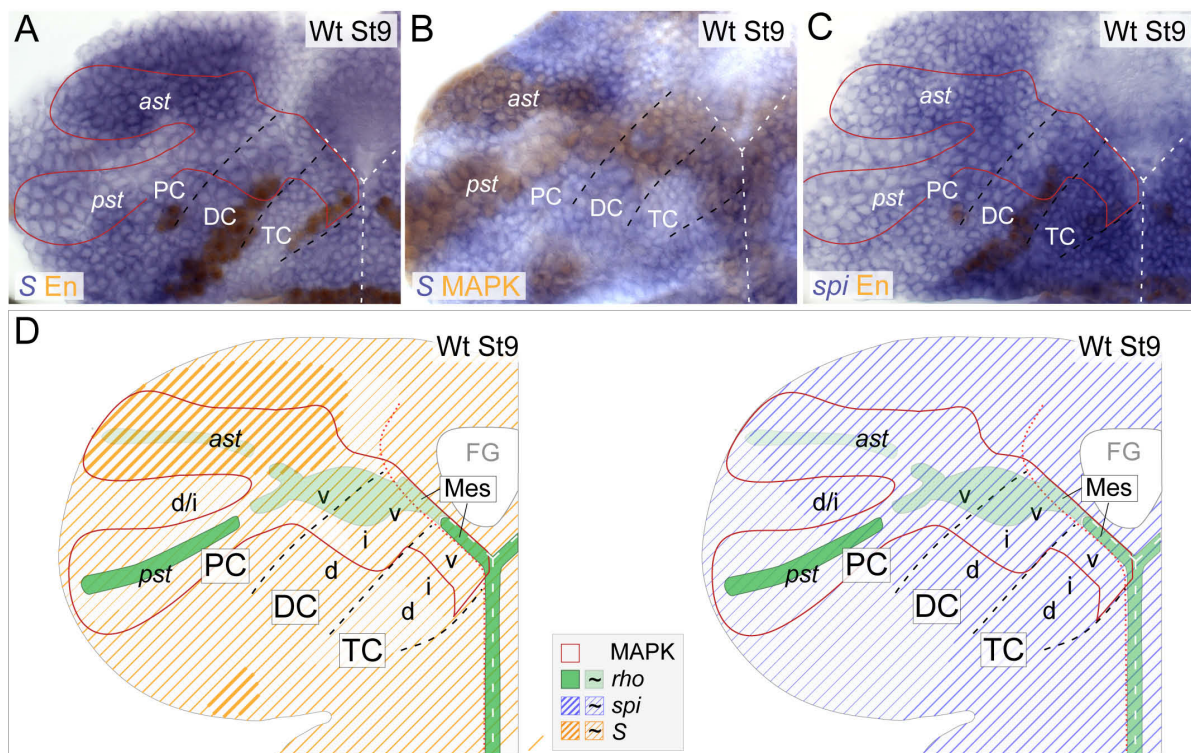


Abb. 3-11: Expression von S und spi im pNE

Gezeigt ist die wildtypische Expression von S- (A, B) und spi-mRNA (C) in Stadium 9 im Kontext des segmentalen Markers Engrailed (En) (A, C) bzw. der MAPK-Aktivität (B). Rote Umrandungen indizieren die wildtypische MAPK-Domäne (vgl. Abb. 3-1 D). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. (A-C) S (A, B) und spi (C) werden ubiquitär im pNE exprimiert und korreliert nicht mit dem Aktivitätsmuster von MAPK (rote Umrandungen in A-C). Beide Faktoren zeigen jedoch regional unterschiedliche Expressionsstärken. (D) Schematische Darstellung der S- und spi-Expression entsprechend des aufgeführten Farbcodes (~ indiziert schwache Expression; für rho-Expression siehe Abb. 3-10 C).

3.1.11. *rhomboid* wird zur EGFR-Aktivierung in allen Hirneuromeren benötigt, *vein* jedoch nur im Deutocerebrum und ventralen Protocerebrum

Die Expressionsanalyse von *rho* und *vn* impliziert, dass EGFR-Aktivität im pNE von regional unterschiedlichen Kombinationen der aktivierenden Liganden Spi (via *rho*) und Vn abhängt. Um die Notwendigkeit von *rho* und *vn* bei der EGFR-Aktivierung im pNE zu untersuchen, wurde die MAPK-Aktivität in amorphen *rho*^{PA5}- und *vn*^{RG436}-Mutanten analysiert. Im Vergleich zum Wt (**Abb. 3-12 A**) weisen *rho*^{PA5}-Mutanten in allen Hirneuromeren einen nahezu vollständigen Verlust von MAPK auf (100% der untersuchten HHS; n=22) (**Abb. 3-12 B, E**). Im Gegensatz dazu ist MAPK in *vn*^{RG436}-Mutanten lediglich im DC und ventralen PC reduziert (stark reduziert in 35%, mäßig reduziert in 49%, normal in 11% HHS; n=35), was mit der *vn*-Expression in diesem Bereich übereinstimmt (**Abb. 3-12 C, F**).

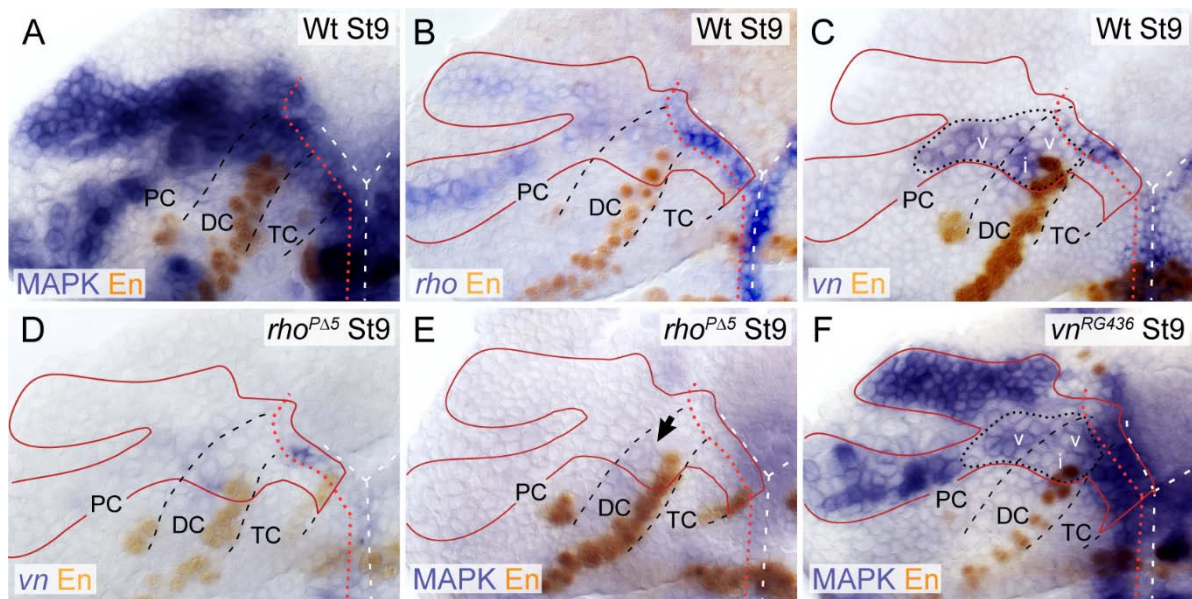


Abb. 3-12: MAPK-Aktivierung im pNE von *rho*- und *vn*-Mutanten

Gezeigt ist das MAPK-Aktivierungsmuster im pNE in Stadium 9 im Wildtyp (A), *rho*^{PΔ5}-Mutanten (E) und *vn*^{RG436}-Mutanten (F) im Vergleich zum wildtypischen Expressionsmuster von *rho* (B) und *vn* (C), sowie die Expression von *vn* in *rho*^{PΔ5}-Mutanten (D) (jeweils im Kontext des Segmentmarkers En). Rote Umrandungen in B, C, E, F indizieren das wildtypische MAPK-Aktivierungsmuster (vgl. A). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. (A-C) Das wildtypische MAPK-Aktivierungsmuster (A) korrespondiert mit der *rho*-Expression im pNE und angrenzendem Mesektoderm (B) (vgl. Abb. 3-10). *vn*-Expression korrespondiert mit der MAPK-Aktivierung in DC und vPC (C), wo *rho* vergleichsweise schwach exprimiert wird (B). (D-F) *rho*^{PΔ5}-Mutanten zeigen eine reduzierte *vn*-Expression in DC und vPC (D) und einen nahezu vollständigen Ausfall der MAPK-Aktivierung im gesamten pNE. Schwache MAPK-Aktivierung kann lediglich noch im intermediären DC beobachtet werden (Pfeil) (E). *vn*^{RG436}-Mutanten zeigen hingegen eine spezifische Reduktion der MAPK-Aktivität im DC und vPC (F), deren Ausmaß mit der wildtypischen *vn*-Expression in diesem Bereich übereinstimmt (gepunktete Umrandung in C, F).

Die MAPK-Aktivität in den übrigen Anteilen des pNE (TC und d/iPC) ist nicht beeinträchtigt. Demnach hängt die EGFR-Aktivierung im gesamten pNE von *rho* ab, während im DC und vPC neben *rho* auch *vn* benötigt wird. MAPK fällt in *rho*^{PΔ5}-Mutanten auch im DC und vPC weitestgehend aus, obwohl in diesem Bereich vornehmlich *vn* exprimiert wird (Abb. 3-12 B, C). Daher wurde überprüft, ob *vn*-Expression in *rho*^{PΔ5}-Mutanten beeinträchtigt ist. In der Tat ist die *vn*-Expression im DC und vPC von *rho*^{PΔ5}-Mutanten deutlich reduziert (Abb. 3-12 D). *Vn* reguliert EGFR im DC und vPC demnach in Abhängigkeit von *rho*, welches dort vermutlich im frühen Embryo benötigt wird, um *vn*-Expression zu induzieren.

3.1.12. Der EGFR-Antagonist *argos* wird außergewöhnlich stark im dorsalen Tritocerebrum exprimiert

Nach der Analyse aktivierender EGFR-Liganden wurde als Nächstes die Verteilung des EGFR-Antagonisten Argos (Aos) im pNE untersucht. Aos ist ein sekretierter Faktor, welcher EGFR-Aktivität inhibiert, indem er den Liganden Spi bindet und ihn so inaktiviert (Schweitzer et al., 1995a; Klein et al., 2004; Klein et al., 2008).

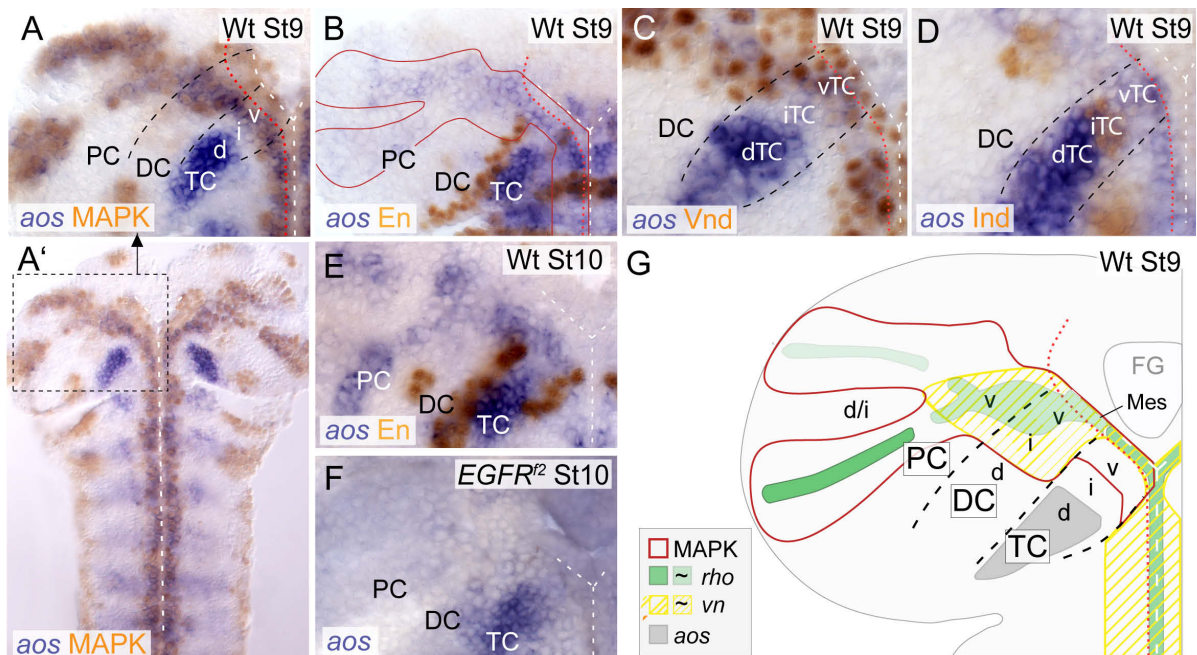


Abb. 3-13: Expression des EGFR-Antagonisten *argos* im pNE

(A-D) *aos*-Expression im Wildtyp in Stadium 9 in Kombination mit MAPK (A), dem Segmentmarker Engrailed (En) (B) und den DV-Genen Vnd (C) und Ind (D). *aos* wird im pNE aller Hirnneuromere mit MAPK co-detektiert (entsprechend der zuvor beschriebenen Induktion von *aos downstream* von EGFR/MAPK; siehe Golembo et al., 1996b) (A, B; A zeigt eine Vergrößerung entsprechend des gestrichelten Kastens in A'; rote Umrandung in B indiziert die wildtypische MAPK-Domäne) und darüber hinaus außergewöhnlich stark in Anteilen des TC exprimiert (A-D). Die starke *aos*-Expressionsdomäne im TC liegt dorsal der Expressionsdomänen von Vnd (ventral) (C) und Ind (intermediär) (vgl. Seibert & Urbach 2010) (D) und ist somit auf das dorsale TC begrenzt. (E, F) *aos* wird im dTC unabhängig von MAPK aktiviert, da die Expression im dTC von *EGFR^{l2}*-Mutanten im Gegensatz zum übrigen pNE nicht beeinträchtigt ist (F; vgl. Wildtyp in E). (G) Die schematische Darstellung der Expression von *rho*, *vn* (siehe Abb. 3-10) und *aos* (nur EGFR-unabhängige *aos*-Domäne im dTC dargestellt) verdeutlicht die segment-spezifische Verteilung von EGFR-Liganden (Vn, Spi; *rho* repräsentiert Spi-Sekretionsquellen; siehe Text) und Antagonisten (Aos). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

aos wird im pNE aller Hirn-Neuromere mit MAPK co-exprimiert (Abb. 3-13 A, B). Dies entspricht der im embryonalen VNS beschriebenen Rolle von *aos* als negativer Feedback-Regulator, welcher *downstream* von EGFR induziert wird (Golembo et al., 1996b).

Darüber hinaus kann im TC eine außergewöhnlich starke *aos*-Expressionsdomäne beobachtet werden, welche auf das dorsale NE begrenzt und somit außerhalb des MAPK-positiven NE lokalisiert ist (Abb. 3-13 A-D). Da *EGFR^{l2}*-Mutanten mit Ausnahme des dorsalen TC einen vollständigen Verlust der *aos*-Expression im pNE zeigen (Abb. 3-13 E, F), bestätigt sich die Vermutung, dass *aos* in TC, DC und PC *downstream* von EGFR induziert wird, im dTC jedoch tatsächlich unabhängig von EGFR exprimiert wird. *Aos* könnte somit in EGFR-abhängiger und -unabhängiger Weise an der Regulation der EGFR-Aktivität im pNE beteiligt sein.

3.1.13. *argos* begrenzt EGFR-Aktivität im procephalen Neuroektoderm und beeinflusst die dorsoventrale Musterbildung im Tritocerebrum

Um den Einfluss von *aos* auf das EGFR-Aktivierungsmuster im pNE zu untersuchen, wurde die MAPK-Aktivität in *aos*^{Δ7}-Mutanten analysiert. Während MAPK im wildtypischen pNE in Stadium 11 bereits weitgehend herunterreguliert wurde, zeigen *aos*^{Δ7}-Mutanten eine ausgeprägte Überaktivierung von EGFR in allen Hirnneuromeren (**Abb. 3-14 A, B**). Diese Beobachtung stimmt mit der zuvor erwähnten Rolle von *aos* als negativer EGFR-Feedbackregulator überein und demonstriert, dass *aos* durch die generelle Begrenzung der EGFR-Aktivität im pNE an deren zeitlich-räumlicher Regulation beteiligt ist. Die markante *aos*-Expression im wildtypischen dorsalen TC in Stadium 9 impliziert darüber hinaus, dass *aos* im TC die segment-spezifische Ausdehnung der EGFR-Aktivität entlang der DV-Achse beeinflussen könnte. Um dies zu überprüfen, wurde die MAPK-Aktivität in Stadium 9 von *aos*^{Δ7}-Mutanten untersucht.

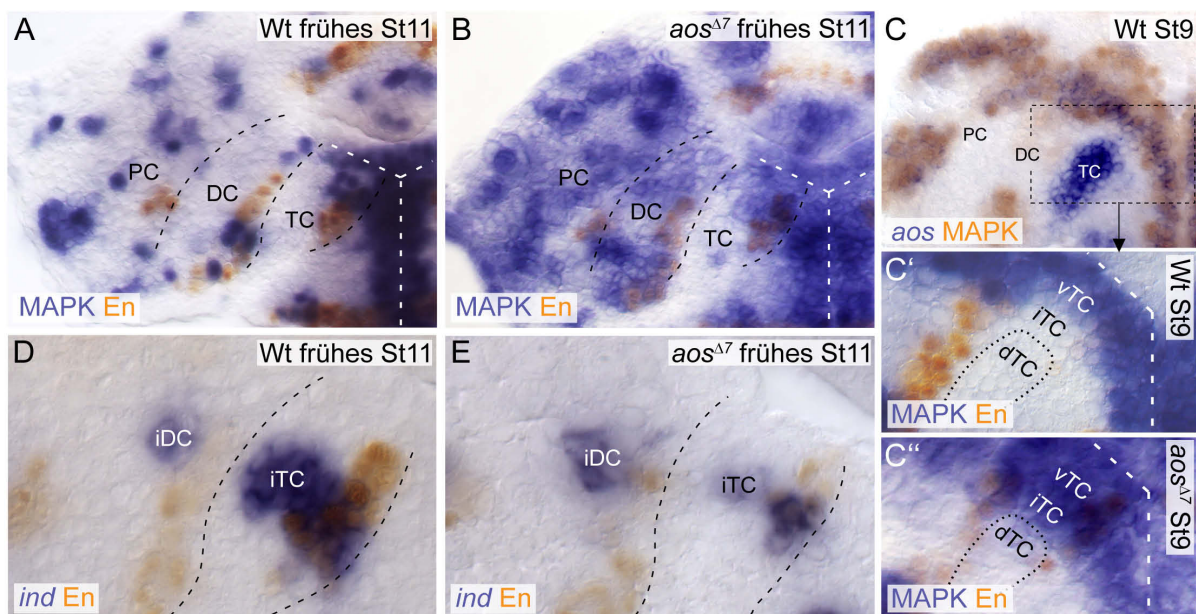


Abb. 3-14: MAPK-Aktivierung und *ind*-Expression in *argos*-Mutanten

(A, B) MAPK-Aktivierung im Kontext des Segmentmarkers En im Wildtyp (A) und *aos*^{Δ7}-Mutanten (B). *aos*^{Δ7}-Mutanten zeigen eine deutliche Überaktivierung von MAPK im frühen St 11 (B), während MAPK im Wildtyp bereits weitgehend herunterreguliert ist (A). (C) *aos* wird in St 9 deutlich im dorsalen TC exprimiert (C). Zu diesem Zeitpunkt ist MAPK im benachbarten intermediären TC herunterreguliert (C, C'). Im Gegensatz dazu zeigen *aos*^{Δ7}-Mutanten ektopische MAPK-Aktivität im intermediären TC (C'') (gepunktete Umrandungen in C' und C'' indizieren Position der wildtypischen *aos*-Domäne im dTC). (D, E) *ind* wird im wildtypischen frühen Stadium 11 deutlich im iTc exprimiert (D), ist dort in *aos*^{Δ7}-Mutanten jedoch deutlich reduziert. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

Während MAPK im wildtypischen TC in Stadium 9 auf das ventrale NE begrenzt ist, kann in *aos*^{Δ7}-Mutanten darüber hinaus eine ektopische MAPK-Aktivierung im iTc beobachtet werden (**Abb. 3-14 C-C''**). *Aos* wird demnach aus dem dorsalen TC in das benachbarte intermediäre TC sekretiert, um EGFR-Aktivität dort zu unterdrücken. Als zusätzliche *Aos*-Quelle könnte in diesem Zusammenhang das ventrale TC dienen, in welchem *aos* in geringerem Maße durch EGFR induziert wird.

Wie in Kapitel 3.1.1 bereits erwähnt, wird das DV-Gen *ind* im intermediären TC erst induziert, nachdem EGFR dort herunterreguliert wurde (**Abb. 3-1 D'**). Da die ektopische Aktivierung von EGFR

im gesamten pNE in Stadium 11 zum Verlust der *ind*-Expression im intermediären TC führt (Seibert, 2010) liegt es nahe, dass EGFR im intermediären TC tatsächlich herunterreguliert werden muss, um dort *ind*-Expression zu ermöglichen. Da EGFR-Aktivität im intermediären TC von *aos*^{Δ7}-Mutanten verlängert aufrechterhalten wird, liegt es nahe, dass *aos* auf diesem Wege die Expression von *ind* im TC beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurde die *ind*-Expression im pNE von *aos*^{Δ7}-Mutanten im frühen Stadium 11 analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp, in welchem *ind* zu diesem Zeitpunkt deutlich exprimiert wird, zeigen *aos*^{Δ7}-Mutanten im TC ein nahezu vollständigen Verlust der *ind*-Expression (**Abb. 3-14 D, E**).

Als negativer *feedback*-Regulator spielt *aos* somit eine Rolle bei der räumlich/zeitlichen Begrenzung des EGFR-Signals und reguliert zudem unabhängig von EGFR die segment-spezifische Ausdehnung der EGFR-Aktivität im TC. Letzteres wirkt sich wiederum auf die regionalisierte Expression des DV-Gens *ind* aus, wodurch *aos* eine wichtige Rolle bei Musterbildungsprozessen der Hirnanlage zukommt.

3.1.14. Das DV-Gen *vnd* wird für *vein*-Expression in der frühen Hirnanlage benötigt

In den vergangenen Kapiteln wurde demonstriert, dass der Schlüssel zum EGFR-Aktivierungsmuster im pNE in der segmentspezifischen Verteilung von *rho*, *vn* und *aos* liegt. Aus diesem Grund wurden im Folgenden Faktoren untersucht, welche die regionalisierte Expression dieser Faktoren im pNE bestimmen. Wie in Kapitel 3.1.10.1 bereits berichtet, korreliert das *vn*-Expressionsmuster deutlich mit dem des DV-Gens *Vnd* (**Abb. 3-15 A, B**), was auf eine mögliche regulatorische Interaktion von *Vnd* und *vn* hinweist. Daher wurde zunächst die *vn*-Expression in *vnd*^{Δ6}-Mutanten untersucht. *vnd*^{Δ6}-Mutanten zeigen in Stadium 9 einen vollständigen Verlust der *vn*-Expression im pNE (**Abb. 3-15 C**). Auch im Mesektoderm der Hirnanlage ist die *vn*-Expression in *vnd*^{Δ6}-Mutanten weitestgehend reduziert und lediglich in vereinzelt Zellen zu beobachten. Als nächstes wurde die *vn*-Expression im pNE nach ektopischer Expression von *vnd* unter Verwendung des maternalen Gal4-Treiberstamms *NGT40-Gal4* (Tracey et al., 2000) untersucht (*NGT40>vnd*), welcher bis Stadium 11 ubiquitär im pNE aktiv ist. Konsistent mit dem Verlust von *vn* in *vnd*-Mutanten kann in *NGT40>vnd* Embryonen ektopische *vn*-Expression im DC und PC beobachtet werden (**Abb. 3-15 D**).

Im embryonalen VNS wurde beobachtet, dass *vn*-Expression *downstream* von EGFR als positiver *feedback*-Regulator induziert wird. Um auch diese Möglichkeit zu testen, wurde die *vn*-Expression pNE von *EGFR*^{Δ2}-Mutanten in Stadium 9 untersucht. *EGFR*^{Δ2}-Mutanten zeigen eine reduzierte *vn*-Expression (insbesondere im iDC) (**Abb. 3-15 E**), welche jedoch insgesamt im Vergleich zu *vnd*^{Δ6}-Mutanten moderat ausfällt. Die Reduktion von *vn* gleicht der von Seibert (2010) beschriebenen Reduktion von *vnd* in *EGFR*^{Δ2}-Mutanten, weshalb nahelegt, dass EGFR die *vn*-Expression indirekt über *vnd* kontrolliert. Sollte diese Vermutung stimmen, so wäre der Verlust von *vn* eine Folge des *Vnd*-Verlusts in *EGFR*^{Δ2}-Mutanten, und restliche *vn*-Expression könnte lediglich in *Vnd*-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Da dies ist in der Tat der Fall ist (**Abb. 3-15 F**), wird die *vn*-Expression im pNE wahrscheinlich nur indirekt durch EGFR beeinflusst.

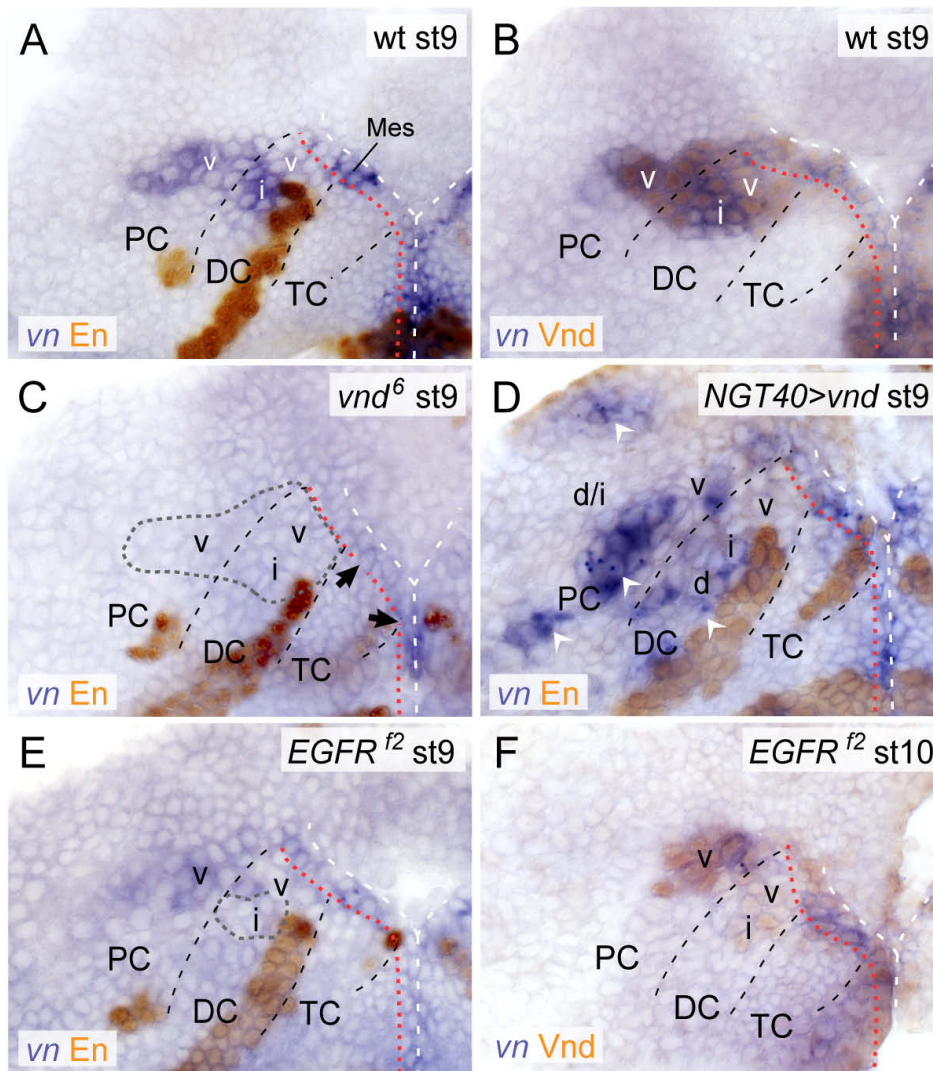


Abb. 3-15: Regulation der *vn*-Expression durch *Vnd* und *EGFR*

(A, B) *vn*-Expression im Wildtyp in Kombination mit dem Segmentmarker *En* (A) und dem DV-Gen *Vnd* (B). *vn* wird im pNE des DC und ventralen PC sowie im ventral an TC und DC angrenzenden Mesektoderm (Mes) mit *Vnd* co-exprimiert. (C, D) Expression von *vn* in *vnd*⁶-Mutanten (C) und nach *NGT40*-getriebener Überexpression von *vnd* im gesamten pNE (*NGT40>vnd*) (D). *vnd*⁶-Mutanten zeigen einen nahezu vollständigen Verlust der *vn*-Expression im pNE und Mes der Hirnanlage. Schwache *vn*-Expression kann lediglich im Mes beobachtet werden (schwarze Pfeile in C). Entsprechend wird *vn* nach Überexpression von *vnd* ektopisch im dDC und d/iPC exprimiert (weiße Pfeilspitzen in D). (E, F) *vn*-Expression in *EGFR*^{f2}-Mutanten in Kombination mit dem Segmentmarker *En* (E) und dem DV-Gen *Vnd* (F). *vn*-Expression wird im VNS durch *EGFR* reguliert (Golembo et al., 1999). *EGFR*^{f2}-Mutanten zeigen im pNE jedoch eine vergleichsweise wenig reduzierte *vn*-Expression (v. a. im iDC; grau gestrichelte Umrandung in E). Da restliche *vn*-Expression stets mit *Vnd* co-exprimiert ist (F) und *Vnd*-Expression im pNE von *EGFR*^{f2}-Mutanten reduziert ist (Seibert, 2010) liegt nahe, dass *EGFR* die *vn*-Expression über *vnd* reguliert. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

3.1.15. Die *EGFR*-abhängigen DV-Gene *vnd*, *ind* und *Nkx6* kontrollieren die Expression von *argos* im Tritocerebrum

Als nächstes wurde untersucht, ob auch die Expression des *EGFR*-Antagonisten *aos* durch DV-Gene reguliert wird. Dies liegt nahe, da die *EGFR*-unabhängige *aos*-Expression im TC auf das dorsale NE begrenzt ist (siehe Kapitel 3.1.12) und somit eine deutliche Regionalisierung entlang der DV-Achse aufweist. Es wurde daher überprüft ob *aos*-Expression im TC durch DV-Gene im intermediären und ventralen NE reprimiert, und so auf das dorsale TC begrenzt wird. Dazu wurde zunächst die *aos*-

Expression in *vnd*⁶-Mutanten untersucht, welche durch den Verlust aller ventral und intermediär exprimierten DV-Gene (*vnd*, *ind* und *Nkx6*) gekennzeichnet sind (Seibert et al., 2009) (**Abb. 3-16 D, E, G, H**). Im Vergleich zum Wildtyp wird *aos* in *vnd*⁶-Mutanten ektopisch im intermediären und ventralen TC exprimiert (**Abb. 3-16 A, B**), was zeigt, dass *aos*-Expression dort üblicherweise in der Tat durch *vnd* (ventral), *ind* (intermediär) und/oder *Nkx6* (ventral/intermediär) reprimiert wird.

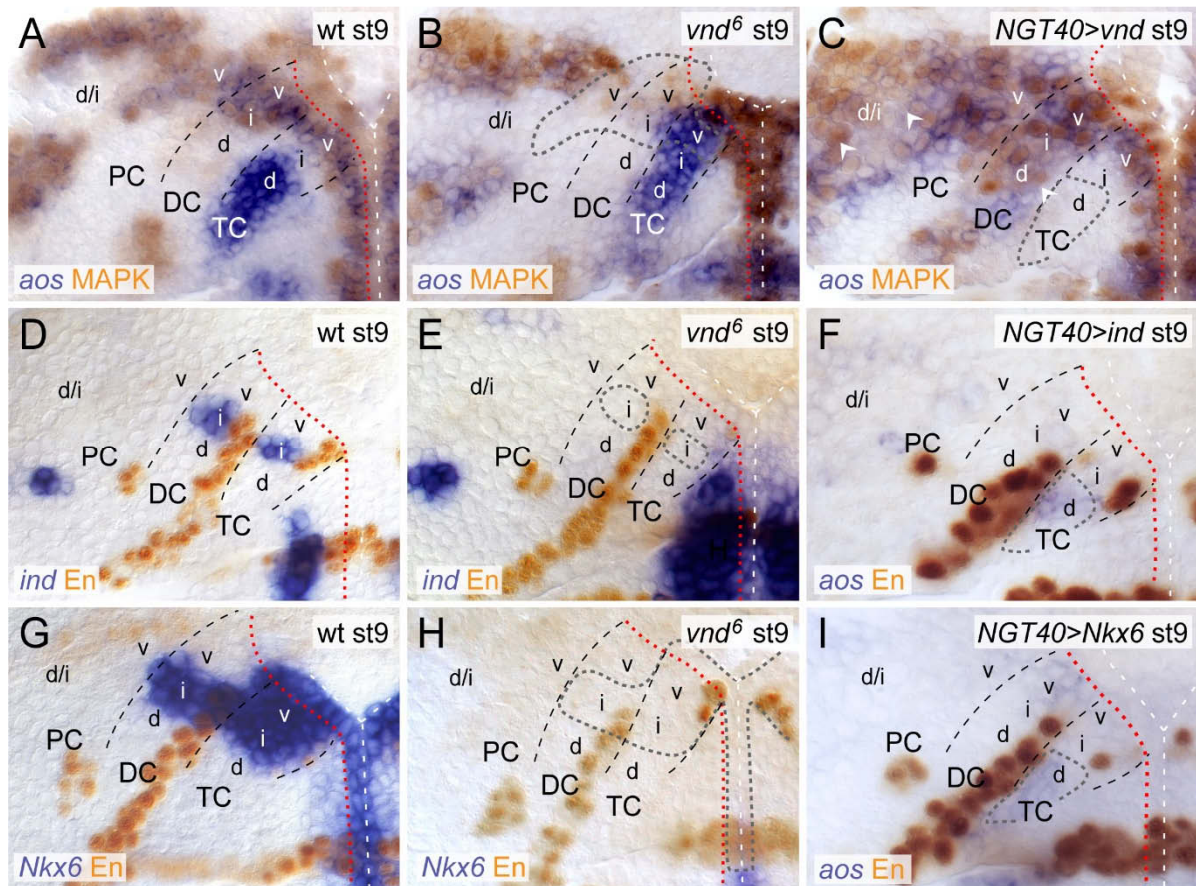


Abb. 3-16: Regulation von *aos* und EGFR durch DV-Gene

(A-C) Expression von *aos* und MAPK im Wt (A), *vnd*⁶-Mutanten (B) und nach ektopischer *vnd*-Expression durch *NGT40*-Gal4 (*NGT40>vnd*) (C). *aos*-Expression außerhalb der MAPK-Domäne ist im wildtypischen pNE auf das dTC begrenzt (A). (B) In *vnd*⁶-Mutanten ist *aos* im ventralen und intermediären TC de-reprimiert bei gleichzeitiger Reduktion von MAPK im vTC, DC und vPC (grau gestrichelte Umrandung). (C) Überexpression von *vnd* im gesamten pNE resultiert in einem Verlust von *aos* im TC (grau gestrichelte Umrandung) während MAPK im dDC und Anteilen des d/iPC ektopisch aktiviert wird (Pfeilspitzen). (D-I) *ind* und *Nkx6* werden im Wildtyp im intermediären NE von DC und TC (*ind*, *Nkx6*) bzw. ventralen TC (*Nkx6*) exprimiert (D, G), werden in beiden Neuomeren von *vnd*⁶-Mutanten jedoch nicht exprimiert (E, H; grau gestrichelte Linien indizieren wildtypische *ind*- und *Nkx6*-Expression). Durch ektopische Expression von *ind* und *Nkx6* mit *NGT40*-Gal4 im gesamten pNE (*NGT40>ind* bzw. *NGT40>Nkx6*) wird *aos* im dTC nahezu vollständig reprimiert (F, I; grau gestrichelte Umrandung indiziert wildtypische *aos*-Domäne). Die De-Repression von *aos* im TC von *vnd*⁶-Mutanten (B) kommt demnach durch den gemeinsamen Verlust von *vnd*, *ind* (E) und *Nkx6* (H) im ventralen und intermediären TC zustande (D, E, G, H mit freundlicher Genehmigung von J. Seibert). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

Einzelmutanten von *ind*- und *Nkx6* zeigen keine entsprechende de-Repression von *aos* im iTC (nicht gezeigt), was vermutlich durch die redundante Expression beider Faktoren in diesem Bereich begründet ist (vgl. **Abb. 3-16 D, G**). Die ektopische Expression von *vnd*, *ind* oder *Nkx6* durch den Gal4-Treiberstamm *NGT40*-Gal4 zeigt jedoch in jedem der Fälle eine deutliche Reduktion von *aos* im dTC (**Abb. 3-16 C, F, I**). Die ventral bzw. intermediär exprimierten DV-Gene *vnd*, *ind* und *Nkx6* sind

demnach alle in der Lage *aos*-Expression zu reprimieren, und begrenzen sie so im Wildtyp auf das dorsale TC.

3.1.16. Vnd kontrolliert die EGFR-Aktivität in der frühen Hirnanlage

In den vergangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Verteilung des EGFR-Liganden Vn und des EGFR-Antagonisten Aos maßgeblich durch das DV-Gen Vnd bestimmt wird. Vnd sollte entsprechend auch die EGFR-Aktivität im pNE beeinflussen, Um dies zu untersuchen, wurde die MAPK-Aktivität im pNE von *vnd*⁶-Mutanten und nach der ektopischen Expression von *vnd* analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen *vnd*⁶-Mutanten eine deutliche Reduktion der MAPK-Aktivität in TC, DC, ventralen PC und Mesektoderm der Hirnanlage (**Abb. 3-16 A, B**). Die Reduktion von MAPK im DC und ventralen PC entspricht dabei der in Kapitel 3.1.11 beschriebenen Reduktion von MAPK in *vn*-Mutanten, und ist daher offenbar auf den Verlust von *vn* in *vnd*⁶-Mutanten zurückzuführen (vgl. **Abb. 3-12 F**). Die De-Repression von *aos* im ventralen/intermediären TC von *vnd*⁶-Mutanten ist demnach für die reduzierte MAPK-Aktivität in ventralem TC und Mesektoderm verantwortlich, da diese Bereiche in *vn*-Mutanten nicht betroffen sind. Da die ektopische *aos*-Expression im TC von *vnd*⁶-Mutanten jedoch vermutlich auch zu einer vermehrten Aos-Sekretion in das benachbarte DC führt, ist neben *vn* möglicherweise auch *aos* an der Reduktion von MAPK im DC von *vnd*⁶-Mutanten beteiligt.

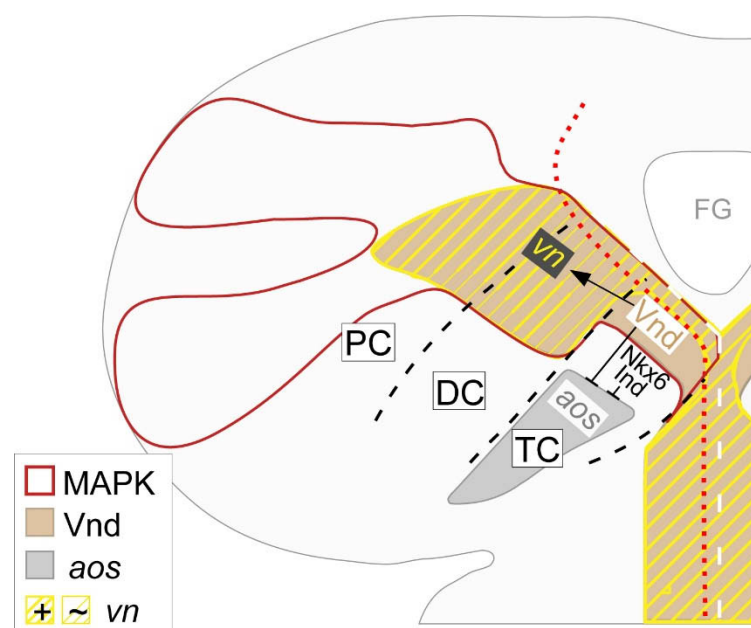


Abb. 3-17: Schematisch Zusammenfassung der Regulation von *vn* und *aos* im pNE durch DV-Gene

Schematische Darstellung der Vnd-abhängigen Regulation von *vn* und *aos*. Wildtypische Expressionsdomänen von Vnd, *vn* und *aos* bzw. MAPK-Aktivität sind entsprechend des Farbcodes dargestellt (+ indiziert starke; ~ indiziert schwache Expression). Vnd ist notwendig für die Expression von *vn* (Pfeil) (siehe Abb. 3-15 A-D) und reprimiert gemeinsam mit Ind und Nkx6 die *aos*-Expression im ventralen und intermediären TC (—) (siehe Abb. 3-16). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. Siehe Text für weitere Details.

Die ektopische Expression von Vn durch den Gal4-Treiber *NGT40* (*NGT40>vnd*) führt im Gegensatz zu *vnd*⁶-Mutanten zu einer ektopischen Aktivierung von MAPK im dDC und d/iPC (**Abb. 3-16 C**). Angesichts der Verteilung von *aos* und *vn* in *NGT40>vnd* (vgl. **Abb. 3-15 D** und **Abb. 3-16 C**) ist die ektopische MAPK-Aktivierung im d/iPC auf die ektopisch *vn*-Expression im d/iPC von *NGT40>vnd* zurückzuführen. Das ektopische MAPK-Signal im dDC von *NGT40>vnd* wird offenbar ebenfalls durch die ektopische *vn*-Expression in diesem Bereich induziert. Zusätzlich kann dort jedoch auch eine erhöhte Spi-Aktivität an der ektopischen MAPK-Aktivierung im dorsalen DC beteiligt sein, da die fehlende *aos*-Expression im benachbarten TC (**Abb. 3-16 C**) vermutlich zu einer verringerten AOS-Sekretion (und demnach erhöhten Spi-Aktivität) im DC führt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die DV-Gene *vnd*, *ind* und *Nkx6* die EGFR-Aktivität im pNE durch Kontrolle der EGFR-Liganden Vn und Spi beeinflussen. Vnd wird in diesem Zusammenhang für die Expression von *vn* im PC, DC und Mesektoderm der Hirnanlage benötigt, während Vnd, Ind und Nkx6 gemeinsam die Expression von *aos* auf das dorsale TC begrenzen und so die Reichweite von Spi aus den umliegenden Sekretionsquellen beeinflussen (zusammengefasst in **Abb. 3-17**).

3.1.17. Das cephalen Lückengenes *tailless* wird für die Expression von *rhomboid* und *vein* im Protocerebrum benötigt

Nachdem mit den DV-Genen *vnd*, *ind* und *Nkx6* zentrale Regulatoren der *vn*- und *aos*-Expression im pNE identifiziert wurden, stellte sich die Frage nach Faktoren, welche die Expression von *rho* regulieren. Wie bereits gezeigt, wird *rho* unter anderem im dorsalen/intermediären NE des PC exprimiert. Da das cephalen Lückengenes *tailless* (*tll*) (Rudolph et al., 1997) umfangreich im PC exprimiert wird, kommt es als potentieller Regulator der protocerebralen *rho*-Expression in Frage. Um dies zu überprüfen wurde zunächst das räumlich-zeitliche MAPK-Aktivierungsmuster im pNE mit dem *tll*-Expressionsmuster verglichen. *tll* wird im frühen Stadium 5 bereits vor der Aktivierung von MAPK in einem breiten Streifen im anterioren pNE exprimiert (**Abb. 3-18 A**). Kurz darauf wird MAPK im PC innerhalb der *tll*-Expressionsdomäne aktiviert (**Abb. 3-18 B**). Die anfangs recht gleichmäßige *tll*-Expressionsdomäne teilt sich im weiteren Verlauf zunehmend in Sub-Regionen unterschiedlicher Expressionsstärke auf, deckt die protocerebrale MAPK-Domäne jedoch bis Stadium 9 weiterhin weitestgehend ab (**Abb. 3-18 C**).

Es besteht also die Möglichkeit, dass *tll* für die Expression von *rho* im PC benötigt wird. Daher wurde die Expression von *rho* in *tll*⁴⁹-Mutanten und nach ektopischer *tll*-Expression im gesamten pNE durch *NGT40*-Gal4 (*NGT40>tll*) untersucht. *tll*⁴⁹-Mutanten zeigen im Stadium 9 im Vergleich zum Wildtyp einen nahezu vollständigen Verlust der *rho*-Expression im gesamten PC (**Abb. 3-18 D, E**).

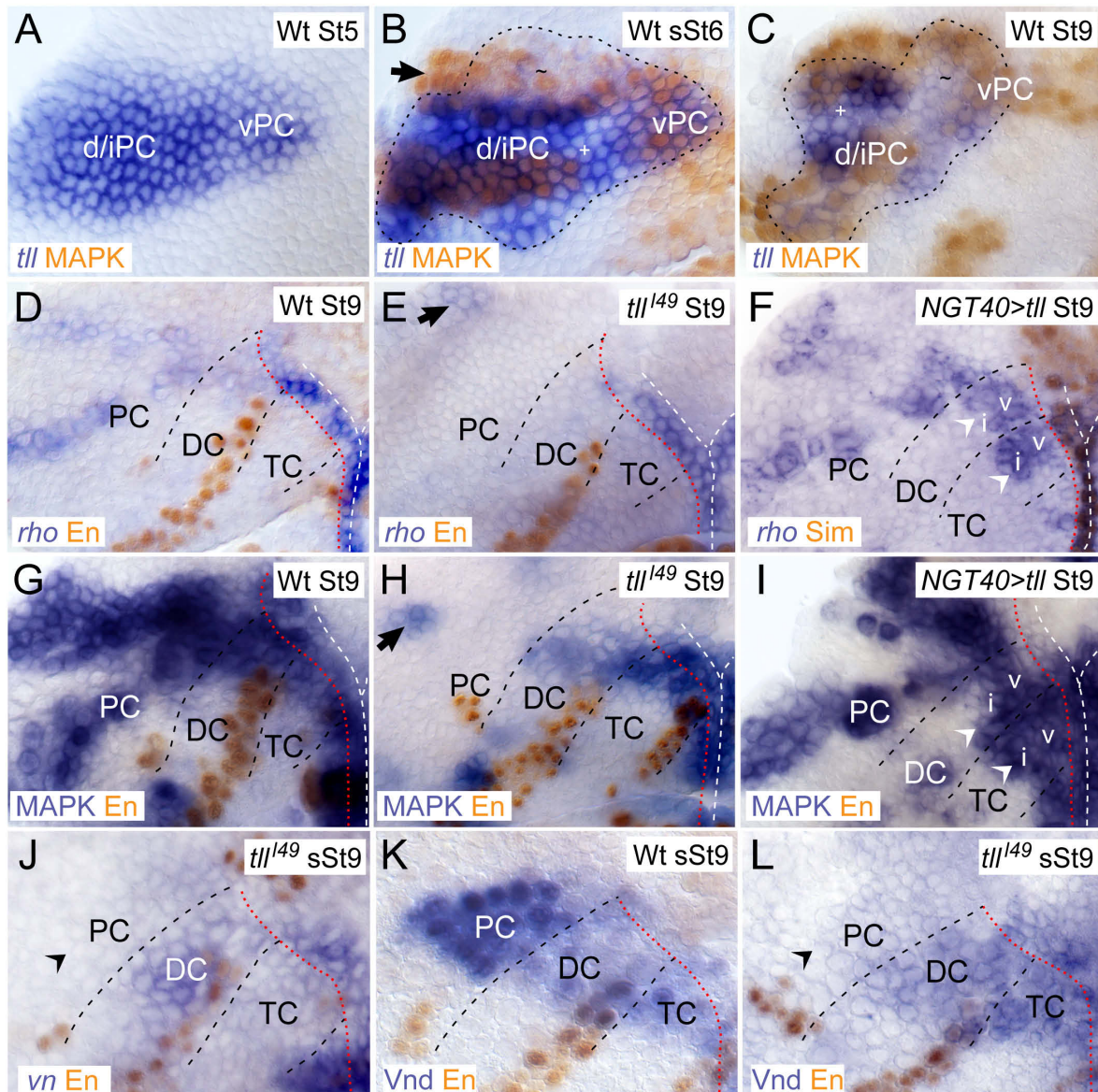


Abb. 3-18: Regulation der *rho*- und *vn*-Expression im PC durch Tailless

(A-C) Wildtypische *tailless* (*tll*)-Expression im Kontext des MAPK-Aktivierungsmuster im frühen St 5 (fSt5) (A), spätem St 6 (sSt6) (B) und St 9 (C). \sim /+ induziert Sub-Domänen schwacher bzw. deutlicher *tll*-Expression. *tll* wird im PC bereits vor der Induktion von MAPK exprimiert. (A). MAPK wird im PC innerhalb der *tll*-Expressionsdomäne aktiviert (B) mit Ausnahme eines vergleichsweise kleinen Anteils der MAPK-Domäne im anterodorsalen PC (Pfeil in B). Auch in Stadium 9 überlappt MAPK-Aktivität im PC deutlich mit der *tll*-Expressionsdomäne (C). (D-F) *rho*-Expression im wildtypischen St9 (D), in *tll*⁴⁹-Mutanten (E) und nach *NGT40*-getriebener ektopischer *tll*-Expression (*NGT40>tll*) (F) in Kombination mit dem Segmentmarker *En* (D, E) und dem Mesektodermmarker *Sim* (F). *tll*⁴⁹-Mutanten (E) zeigen im Vergleich zum Wildtyp (D) einen Verlust der *rho*-Expression im PC mit Ausnahme einzelner Zellen im anterodorsalen PC (Pfeil; vgl. MAPK in B). Ektopische *tll*-Expression im gesamten pNE (F) führt zu ektopischer *rho*-Expression im ventralen/intermediären TC und DC (weiße Pfeilspitzen) (Segmentgrenzen wurden entsprechend ihrer wildtypischen Position entlang der AP-Achse des pNE im Bezug auf die cephalische Furche indiziert). (G-I) MAPK-Aktivierung in Stadium 9 im Wildtyp (G), in *tll*⁴⁹-Mutanten (H) und in *NGT40>tll* (I) (jeweils in Kombination mit dem Segmentmarker *En*). Der Verlust der MAPK-Aktivierung im PC von *tll*⁴⁹-Mutanten (H) im Vergleich zum Wildtyp (G) bzw. die ektopische Aktivierung von MAPK im v/i TC und DC in *NGT40>tll* (I) stimmt mit den beobachteten Phänotypen bzgl. der *rho*-Expression überein (vgl. D-F) (*En*-Expression in I wird durch ektopische *tll*-Expression effizient reprimiert, weshalb Segmentgrenzen entsprechend ihrer wildtypischen Position entlang der AP-Achse des pNE im Bezug auf die cephalische Furche indiziert wurden; ein Einfluss der fehlenden *En*-Expression auf die ektopische MAPK-Aktivierung im TC/DC kann nicht ausgeschlossen werden). (J-L) *vn*-Expression im späten Stadium 9 in *tll*⁴⁹-Mutanten (J), sowie *Vnd*-Expression im Wildtyp (K) und in *tll*⁴⁹-Mutanten (L) (jeweils in Kombination mit dem Segmentmarker *En*). Im Vergleich zum Wildtyp (K) zeigen *tll*⁴⁹-Mutanten (L) einen spezifischen Verlust von *Vnd* im PC (E) (schwarze Pfeilspitze), welcher mit dem dortigen Verlust der *vn*-Expression übereinstimmt (J) (schwarze Pfeilspitze). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. Für eine schematische Zusammenfassung der hier gezeigten Ergebnisse siehe Abb. 3-20.

Im TC und DC von *NGT40>tll* kann im Gegensatz dazu ektopische *rho*-Expression im ventralen/intermediären NE beobachtet werden; im PC, wo *tll* endogen ohnehin großflächig exprimiert wird, ist die *rho*-Expression hingegen weitestgehend unverändert (**Abb. 3-18 F**).

Korrespondierend mit den Effekten auf die *rho*-Expression fällt auch MAPK im PC von *tll⁴⁹*-Mutanten in Stadium 9 im Vergleich zum Wildtyp weitestgehend aus (**Abb. 3-18 G, H**). Auch die ektopische *rho*-Expression in *NGT40>tll* spiegelt sich in einer entsprechenden ektopischen Aktivierung von MAPK im ventralen/intermediären TC und DC wieder (**Abb. 3-18 I**). *tll* wird somit für die *rho*-abhängige Aktivierung von MAPK im d/iPC benötigt und ist darüber hinaus hinreichend, um *rho*/MAPK im v/iTC und v/iDC zu induzieren.

tll⁴⁹-Mutanten zeigen über das dorsale/intermediäre PC hinaus auch im ventralen PC Defekte bei der MAPK-Aktivierung. Wie zuvor berichtet ist *vn* der vorherrschende EGFR-Ligand im ventralen PC (siehe Kapitel 3.1.10.1). Aus diesem Grund wurde die Expression von *vn* in *tll⁴⁹*-Mutanten analysiert. In der Tat fehlen in diesen die protocerebralen Anteile der *vn*-Expression, während die *vn*-Expression im benachbarten DC nicht beeinträchtigt ist (**Abb. 3-18 E**; vgl. Wildtyp in **Abb. 3-16 A**). Da *vn*-Expression im pNE vom DV-Gen *Vnd* abhängt (siehe Kapitel 3.1.14), wurde auch die Expression von *Vnd* in *tll⁴⁹*-Mutanten untersucht. Wie zuvor *vn* zeigt auch *Vnd* in *tll⁴⁹*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp einen spezifischen Ausfall der protocerebralen Expressionsdomäne (**Abb. 3-18 E, F**), weshalb darauf geschlossen werden kann, dass *tll* die *vn*-Expression im PC über die Expression von *Vnd* kontrolliert.

Es lässt sich demnach zusammenfassen, dass *tll* indirekt die Sekretion beider aktivierender EGFR-Liganden *Spi* (via *rho*) und *Vn* (via *vnd*) im PC kontrolliert (**Abb. 3-20**). Auf Grund der umfangreichen *tll*-Expression im PC ist jedoch deutlich, dass weitere Faktoren an der regionalisierten Expression von *rho* und *Vnd* beteiligt sein müssen.

3.1.18. Single-minded wird für die *rhomboid*- und *vein*-Expression im procephalen Mesektoderm und somit für die EGFR-Aktivierung im angrenzenden Tritocerebrum benötigt

Im embryonalen VNS wird *rho* in Abhängigkeit des des Transkriptionsfaktors Single-minded (*Sim*) spezifisch in mesektodermalen Zellen der ventralen Mittellinie exprimiert, welche dort somit eine wichtige EGFR-Ligandenquelle darstellen (Golembo et al., 1996a; Chang et al., 2001). Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Rolle von *Sim* bei der Kontrolle der EGFR-Ligandensekretion in der frühen Hirnanlage untersucht. In der VNS-Entwicklung reguliert *Sim* die *rho*-Expression im Mesektoderm, welches in Folge die alleinige Sekretionsquelle des EGFR-Liganden *Spi* darstellt (Golembo et al., 1996a; Chang et al., 2001). Wie bereits gezeigt, werden *rho* und *vn* zu Beginn der Embryogenese *Sim*-unabhängig im pNE exprimiert, da beide Faktoren bereits vor *Sim* im pNE detektiert werden können.

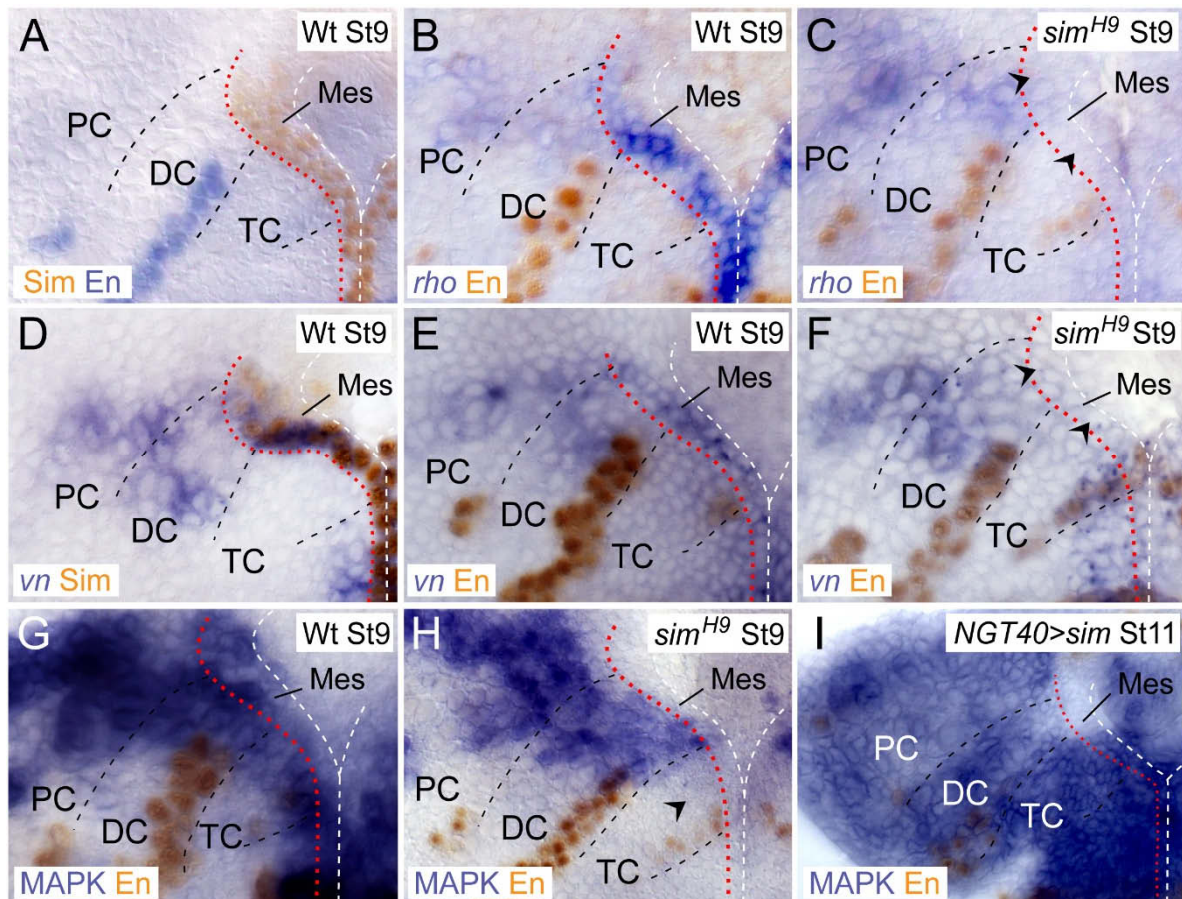


Abb. 3-19: Regulation der rhomboid- und vein-Expression im procephalen Mesektoderm durch Single-minded

(A-C) Expression von Sim (A) und *rho* (B) im Wildtyp, sowie Expression von *rho* in *sim^{H9}*-Mutanten (C) (jeweils in Kombination mit dem Segmentmarker En). Der Vergleich der Sim- (A) und *rho*- (B) Expression zeigt, dass *rho* im Mesektoderm (Mes) ventral von TC und DC mit Sim co-exprimiert wird. In *sim^{H9}*-Mutanten (C) fällt die *rho*-Expression spezifisch im Mes aus (Pfeilköpfe), während die Expression im pNE erhalten bleibt. (D-F) *vn*-Expression im Wildtyp in Kombination mit Sim (D) und dem Segmentmarker En (E), sowie *vn*-Expression in Kombination mit En in *sim^{H9}*-Mutanten (F). Ähnlich wie *rho* wird auch *vn* im Mes mit Sim co-exprimiert (D, E) und fällt spezifisch im Mes von *sim^{H9}*-Mutanten aus (F), während die neuroektodermale Expression in DC und PC bestehen bleibt. (G-I) MAPK-Aktivität im Wildtyp (G), in *sim^{H9}*-Mutanten (H) und in *NGT40>sim* (I). Im Vergleich zum Wildtyp (G) fällt MAPK spezifisch im Mes und TC von *sim^{H9}*-Mutanten aus (H). Im Gegensatz dazu führt die ektopische Expression von *sim* durch die ubiquitär aktive Treiberlinie *NGT40-Gal4* in Stadium 11 zu einer ektopischen Aktivierung von MAPK im gesamten pNE (I). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. Für eine schematische Zusammenfassung siehe Abb. 3-20.

In Stadium 9 werden *rho* und *vn* im Mesektoderm der Hirnanlage (angrenzend an TC und DC) mit Sim co-exprimiert (**Abb. 3-19 A, B, D, E**). Besonders deutlich ist dies im TC, wo *rho*- und *vn* ausschließlich im angrenzenden Mesektoderm, nicht jedoch im NE exprimiert werden, und *rho* darüber hinaus die stärkste Expression innerhalb der Hirnanlage aufweist. Somit stellt das Mesektoderm offenbar die maßgebliche EGFR-Ligandenquelle des TC dar, was im Gegensatz zu den vornehmlich neuroektodermalen Ligandenquellen von DC und PC steht (siehe oben). Um den Einfluss von Sim auf die *rho*- und *vn*-Expression im Mesektoderm der Hirnanlage zu überprüfen, wurde die Expression beider Faktoren in amorphen *sim^{H9}*-Mutanten untersucht. In der Tat zeigen diese einen spezifischen Verlust der *rho*-Expression im Mesektoderm, während die neuroektodermale *rho*-Expression in DC und TC nicht beeinträchtigt ist (**Abb. 3-19 C**). Gleiches gilt für die *vn*-Expression, welche in *sim^{H9}*-Mutanten spezifisch im Mesektoderm der Hirnanlage ausfällt (**Abb. 3-19 F**).

Als nächstes wurde das MAPK-Aktivitätsmuster in *sim^{H9}*-Mutanten untersucht. *sim^{H9}*-Mutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp einen spezifischen Verlust von MAPK im TC, während die MAPK-Aktivität in DC und PC nicht beeinträchtigt ist (**Abb. 3-19 G, H**). Die ektopische Expression von Sim in der Hirnanlage unter Verwendung des Gal4-Treibers *NGT40* (*NGT40>sim*) führt hingegen zu einer ubiquitären Aktivierung von MAPK in der Hirnanlage (**Abb. 3-19 I**). Dies ist vermutlich auf die ektopische Expression von *rho* und *vn* zurückzuführen, für welche Sim in der Hirnanlage benötigt wird (siehe oben), und welche auch im vNE durch Sim ektopisch induziert werden kann (Chang et al., 2001). Während EGFR-Aktivität im pNE somit Sim-unabhängig induziert wird, demonstrieren diese Daten, dass Sim die Sekretion von EGFR-Liganden aus dem Mesektoderm der Hirnanlage reguliert und so spezifisch im TC für die Aktivierung des EGFR benötigt wird (**Abb. 3-20**). Zusammen mit *Tll* und den DV-Genen *vnd*, *ind* und *Nkx6* wurden somit in jedem Hirnneuromer Faktoren identifiziert, welche für die segmentspezifische Verteilung von EGFR-Liganden und das daraus resultierende EGFR-Aktivierungsmuster verantwortlich sind.

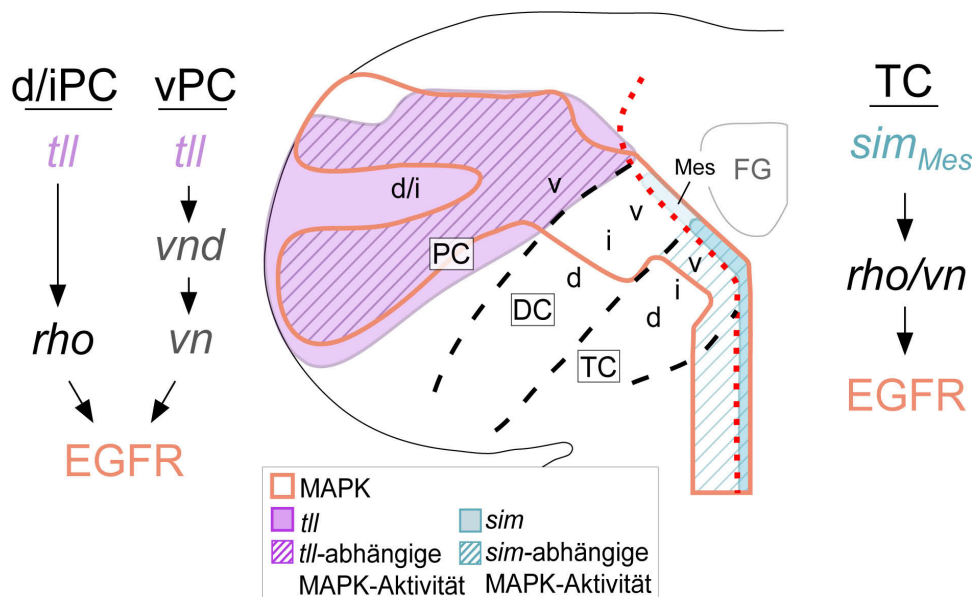


Abb. 3-20: Regulation der EGFR-Aktivität durch *sim* im TC und *tll* im PC

Schematische Darstellung der *tll*- und *Sim*-Expression und der von beiden Faktoren abhängigen Teile der MAPK-Aktivierungsdomäne (entsprechend des angegebenen Farbcodes). *tll* (violett) kontrolliert die EGFR/MAPK-Aktivität (rote Umrandung) spezifisch im PC (violett schraffiert) durch die positive Regulation von *rho* im d/iPC und *vnd/vn* im vPC (links) (vgl. Abb. 3-18). *sim*-Expression im procephalen Mesektoderm (Mes) (*sim_{Mes}*; türkis) kontrolliert die EGFR/MAPK-Aktivität im TC und angrenzendem Mes (türkis schraffiert) durch die positive Regulation der *rho*- und *vn*-Expression im Mes (vgl. Abb. 3-19). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-1. Siehe Text für weitere Details.

3.1.19. Zusammenfassung: Regulation der EGFR-Aktivität in der frühen Hirnanlage

In den vergangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass das EGFR-Aktivierungsmuster im pNE von den aktivierenden Liganden Spi (via Rho) und Vn, sowie dem EGFR-Antagonisten Aos bestimmt wird. Diese Faktoren zeigen ein segmentspezifisches Verteilungsmuster, so dass die Aktivierung des EGFR von regional unterschiedlichen Kombinationen dieser Faktoren abhängt. Das TC zeigt diesbezüglich eine vergleichsweise hohe Ähnlichkeit zum VNS, da dort die Liganden Spi und Vn in Abhängigkeit des

mesektodermalen Transkriptionsfaktors *Sim* aus der ventralen Mittellinie sekretiert werden. Außergewöhnlich ist dort jedoch die prominente, EGFR-unabhängige *aos*-Expression im dorsalen TC. Diese wird von den DV-Genen *Vnd*, *Ind* und *Nkx6* auf das dorsale NE begrenzt und ist dafür verantwortlich, EGFR im iTC herunterzuregulieren. Auf diese Weise beeinflusst *Aos* wiederum die Expression *ind* im TC.

DC und PC sind die einzigen Neuromere des embryonalen ZNS, in welchen die EGFR-Aktivität nicht von mesektodermalen, sondern ausschließlich von neuroektodermalen Ligandenquellen abhängt. EGFR wird dort in Abhängigkeit von *Rho* und *Vn* aktiviert, wobei beide Faktoren in regional unterschiedlichen Kombinationen exprimiert werden. So hängt die EGFR-Aktivität im DC und angrenzenden ventralen PC in erster Linie von *Vn* ab, welches dort in Abhängigkeit von *Vnd* exprimiert wird. Im dorsalen/intermediären PC wird hingegen ausschließlich *rho* in Abhängigkeit des cephalen Lückengens *tll* exprimiert, weshalb *Spi* dort den exklusiven Liganden darstellt.

3.2. Identifikation und molekulare Charakterisierung von gnathalen NBs

Während in den vergangenen Kapiteln Ergebnisse zur Funktion und Regulation des EGFR in der frühen Hirnanlage gezeigt wurden, beschäftigt sich der folgende Abschnitt mit der Identifikation und molekularen Charakterisierung von NBs in den gnathalen Kopfsegmenten von *Drosophila*. Die in diesem Kapitel (3.2.) beschriebenen Ergebnisse entstanden unter meiner Mitbeteiligung, und wurden in der Zeitschrift *Development* in dem Artikel Urbach et al. (2016) mit mir als anteiligem Erstautor publiziert. Ziel dieses Projekts war es, die Gesamtpopulation embryonaler NBs in den gnathalen Neuromeren zu erfassen und diese auf Einzelzellebene molekular zu charakterisieren. Dazu wurde die Expression von 64 Markergenen in NBs der Gnathalsegmente (Mandibular- (MN), Maxillar- (MX) und Labialsegment (LB)) analysiert (für eine detaillierte Auflistung der untersuchten Markergene siehe **Tab. 7-1** im Anhang). Bei den untersuchten Markern handelt es sich in erster Linie um Transkriptionsfaktoren, die zuvor zur Charakterisierung von NBs des Rumpfes (T1-A7), des terminalen Abdomens (A8-A10) und der procephalen Hirnanlage (PC, DC, TC) verwendet wurden (Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach und Technau, 2003a; Birkholz et al., 2013a; R. Urbach, unveröffentlicht). 18 der untersuchten Marker wurden nicht in gnathalen NBs detektiert (siehe Anhang **Tab. 7-1**) und werden deshalb in den folgenden Abschnitten nicht weiter thematisiert.

Eine besondere Bedeutung kam einer Gruppe von 32 Markergenen zu, die in Gnathal- und Rumpfsegmenten in spezifischen, segmental konservierten NB-Subpopulationen exprimiert werden (gekennzeichnet mit „*“ in **Tab. 7-1**) (Urbach et al., 2016). Das Expressionsprofil dieser Markergene ist in Rumpfsegmenten charakteristisch für bestimmte NB-Identitäten, und erlaubt es somit, in den Gnathalsegmenten NBs mit serieller Homologie zu definierten Rumpf-NBs zu identifizieren (Urbach et al., 2016). Dazu wurde die Expression dieser Markergene in gnathalen NBs mit NBs des Prothorakalsegments (PT oder T1) verglichen, welches dem Grundzustand der metamer angelegten NB-Population entspricht (Doe, 1992). Gnathale NBs, die im Vergleich zu prothorakalen NBs ein vergleichbares Expressionsprofil molekularer Marker aufweisen, und sich an einer korrespondierenden Position im Neuomer befinden, können mit hoher Wahrscheinlichkeit als seriell homologe NBs angesehen werden. Daneben wurden in Urbach et al. (2016) weitere Kriterien herangezogen, um serielle Homologien gnathaler NBs zu untermauern. Dazu zählt die Position des neuroektodermalen Ursprungs, die Expressionskombinatorik proneuraler Gene im zugehörigen proneuralen Cluster und der Bildungszeitpunkt gnathaler NBs im Vergleich zu Rumpf-NBs.

In den folgenden Kapiteln wird die segmentale Population gnathaler NBs zunächst anhand allgemeiner NB- und Segmentmarker beschrieben, um im Anschluss auf mithilfe ausgewählter Marker die Identifikation seriell homologer NBs in den gnathalen Neuromeren zu schildern, wobei auch auf Unterschiede bezüglich der Expressionsprofile von NBs in Gnathal- und Rumpfsegmenten eingegangen wird. Schließlich wird die Expression der übrigen untersuchten Marker in gnathalen NBs geschildert. Die Ergebnisse der folgenden Kapitel – also die Kartierung gnathaler NBs unter Angabe ihrer Identitäten (entsprechend der von Doe (1992) geprägten Nomenklatur für NBs der

thorakalen/abdominalen Rumpfsegmente) und Expressionsprofile molekularer Marker – sind in **Abb. 3-21** zusammengefasst.

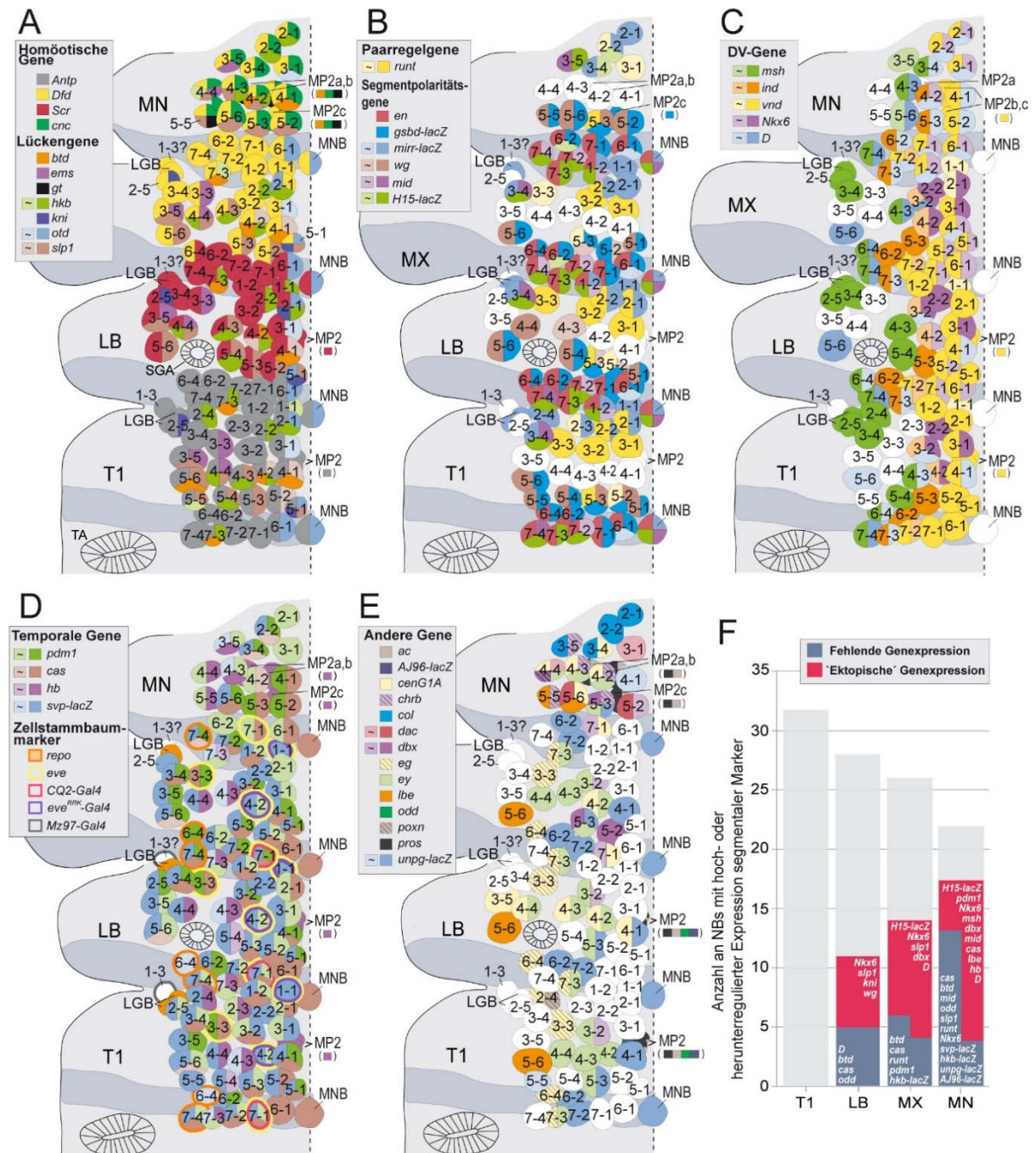


Abb. 3-21: Expressionsprofile molekularer Marker in gnathalen Neuroblasten (aus Urbach et al., 2016).
 (A-E) Schematische Darstellung der NB-Population im Mandibular- (MN), Maxillar- (MX), Labial- (LB) und Prothorakalsegment (T1) nach Abschluss der NB-Bildung im späten Stadium 11 (jeweils linke Hemisegmente nach Filetpräparation; gestrichelte Linie indiziert ventrale Mittellinie). Gezeigt ist das Expressionsprofil molekularer Marker in NBs entsprechend des jeweils links angegebenen Farbcodes („~“ indiziert schwache Expression). Dunkelgraue Färbung repräsentiert En-Expressionsdomänen im posterioren Kompartiment von T1, LB, MX und MN. SGA = Speicheldrüsenanlage (von engl. *salivary gland anlage*); LGB=Longitudinaler Glioblast; MNB=Mittellinienneuroblast. (F) Gesamtzahl der NBs in T1, LB, MX und MN (grauer Balken) sowie die Anzahl identifizierter NBs in LB, MX und MN, welche im Vergleich zu ihrem seriellen Homolog im T1 bestimmte Gene zusätzlich („ektopisch“) (rot) oder nicht (blau) exprimieren (betroffene Gene sind im jeweiligen Balken angegeben).

3.2.1. Darstellung der segmentalen Neuroblastenpopulation in den gnathalen Neuromeren

Zur Darstellung und Analyse gnathaler NBs wurden Filetpräparationen des gnathalen ZNS angefertigt (**Abb. 3-22 A**). NBs wurden in diesen Filetpräparationen durch die charakteristische Morphologie und Lage (große, abgerundete Zellen unterhalb des NE) und durch Nachweis der NB-Marker Deadpan (Dpn) (Bier et al., 1992) und Worniu (Wor) (Cai et al., 2001) identifiziert.

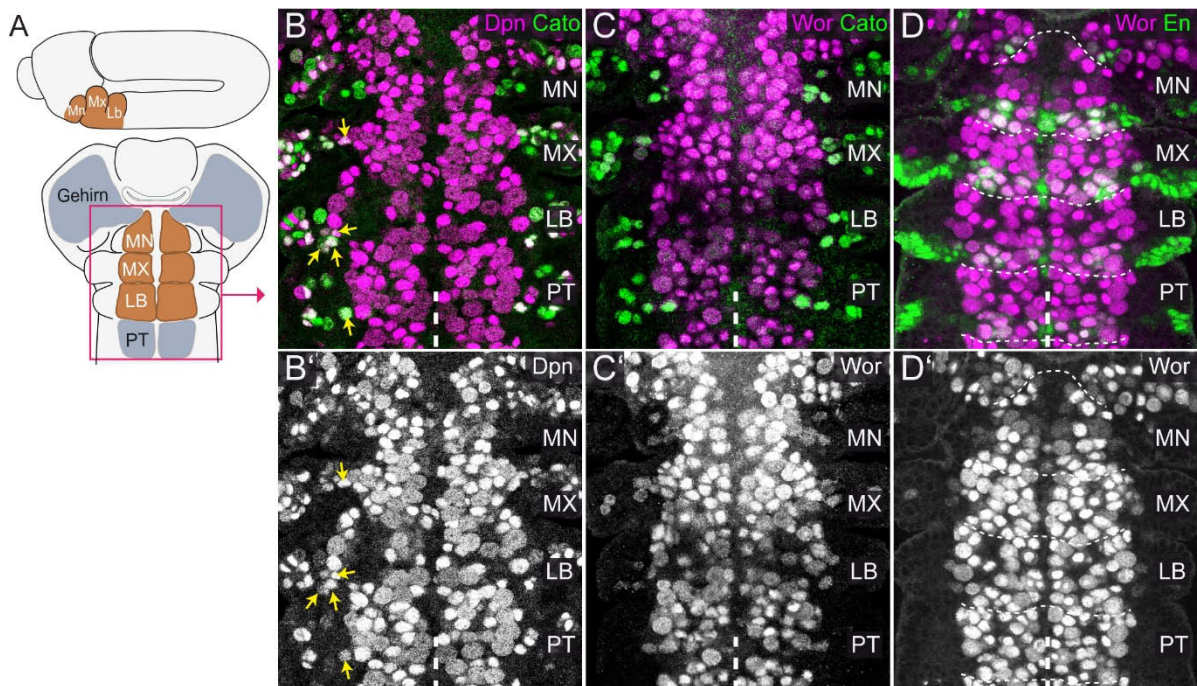


Abb. 3-22: Expression von Deadpan, Worniu und Cousin of atonal in gnathalen Kopfsegmenten

(A) Schematische Darstellung eines Stadium 11-Embryos im *whole-mount* (oben; anterior ist links) und nach Filetpräparation (unten; anterior ist oben). Die gnathalen Kopfsegmente bzw. -neuromere sind braun hervorgehoben. Die Filetpräparation erlaubt eine Aufsicht auf das gesamte embryonale ZNS (dunkelgrau), bestehend aus den Neuromeren des Gehirns, der gnathalen Mandibular- (MN), Maxillar- (MX), Labialsegmente (LB) und der posterior angrenzenden thorakalen/abdominalen Rumpfsegmente (hier nur das Prothorakalsegment (PT) dargestellt). Der rote Kasten entspricht dem in B-D gezeigten Ausschnitt des gnathalen ZNS und angrenzenden PT. (B-D) Filetpräparationen des wildtypischen gnathalen ZNS im späten Stadium 11 entsprechend der Darstellung in A mit Fokus auf die NB-Schicht (anterior ist oben; fette gestrichelte Linie indiziert ventrale Mittellinie, feine gestrichelte Linien in D, D' indizieren Segmentgrenzen). Gezeigt ist die Expression der NB-Marker Deadpan (Dpn) (lila in B, grau in B') und Worniu (Wor) (lila in C, D, grau in C', D'), des Markers für sensorische Vorläufer Cousin of atonal (Cato) (grün in B, C) und des segmentalen Markers Engrailed (En) (Grün in D) in der Anlage des gnathalen ZNS. Dpn wird in allen NBs exprimiert (B, B'), jedoch zusätzlich in Cato-exprimierenden Vorläufern sensorischer Organe (gelbe Pfeile). Wor-Expression ist hingegen weitestgehend auf Cato-negative NBs begrenzt (C, C'). Der segmentale Marker Engrailed (En; grün in D) visualisiert posteriore Segmentgrenzen und erlaubt so die zuverlässige Unterscheidung gnathaler Segmente. Siehe Text für weitere Details. (A-C abgeändert nach Urbach et al., 2016).

Dpn wird in allen NBs exprimiert, darüber hinaus jedoch in einigen Vorläuferzellen sensorischer Organe (SOPs von engl. *sensory organ precursors*) (**Abb. 3-22 B, B'**). Die dorsal der NBs gelegenen SOPs grenzen unmittelbar diese an und lassen sich auf Grund der Position daher nur bedingt von NBs unterscheiden. Auch Wor wird in allen NBs exprimiert, wobei die Expression im Vergleich zu Dpn weitestgehend auf NBs begrenzt ist (**Abb. 3-22 C, C'**). Zur zweifelsfreien Unterscheidung von NBs und SOPs wurde der Marker Cousin of atonal (Cato) verwendet, welcher spezifisch in SOPs exprimiert wird (Goulding et al., 2000), und somit in Kombination mit Dpn oder Wor die zuverlässige

Identifikation gnathaler NBs erlaubt (**Abb. 3-22 B, C**). Die Grenzen gnathaler Neuromere, und somit die segmentale Zugehörigkeit von NBs, wurden mit Hilfe des segmentalen Markers Engrailed (En) visualisiert, welcher im posterioren Kompartiment jedes Segments exprimiert wird (DiNardo et al., 1985; Doe, 1992) (**Abb. 3-22 D**). Insgesamt konnten im MN 22 NBs, im MX 26-27 NBs und im LB 28-29 NBs je Hemisegment (HS) beobachtet werden³, sowie in jedem Neuromer ein unpaarig angelegter Mittellinienneuroblast (MNB) (Urbach et al., 2016). Im Vergleich zum Grundzustand der Rumpfneuromere T1-A7 (je 32 NBs/HS + MNB; Doe, 1992) wird in LB, MX und MN somit eine zunehmend reduzierte NB-Population gebildet. Die räumliche Anordnung der NBs zeigt jedoch insbesondere im LB und MX eine hohe Ähnlichkeit zum PT (Urbach et al., 2016) (deutlich erkennbar z.B. in **Abb. 3-22 D'**).

3.2.2. Charakterisierung der segmentalen NB-Population in den gnathalen Neuromeren

In diesem Kapitel wird die NB-Population der Gnathalsegmente LB, MX und MN anhand ausgewählter Marker charakterisiert. Jeder dieser Marker wird in Gnathal- und Rumpfsegmenten in einer spezifischen, segmental konservierten Subpopulation an Rumpf-NBs exprimiert (**Tab. 3-1**) (Urbach et al., 2016). Das Expressionsprofil dieser Marker (siehe **Tab. 3-2**) ist somit charakteristisch für individuelle Rumpf-NBs und wurde verwendet, um seriell homologe NBs in den gnathalen Neuromeren zu identifizieren.

Tab. 3-1: Ausgewählte Marker zur Beschreibung der gnathalen NB-Population

Marker	Expression in Rumpf-NBs	Referenzen
Eagle (Eg)	2-4, 3-3, 7-3, 6-4	Broadus et al. (1995)
Empty Spiracles (Ems)	3-3, 3-5, 4-4	Hartmann et al. (2000)
Engrailed (En)	6-1, 6-2, 6-4, 7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 1-2, MNB	Doe (1992)
Eyeless (Ey)	3-2, 4-2, 4-3, 4-4, 5-3, 7-3	Noveen et al. (2000); Urbach et al. (2016)
Intermediate neuroblasts defective (Ind)	3-2, 4-2, 5-3, 6-2, 7-2, 7-3	Weiss et al. (1998); Urbach et al. (2016)
Midline (Mid)	1-2, 3-4, 7-2, 7-4, MNB	Buescher et al. (2006); Urbach et al. (2016)
<i>mirror (mirr)</i> -lacZ	1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 3-4, 6-1, LGB, MNB	Broadus et al. (1995); Urbach et al. (2016)
<i>seven up (svp)</i> -lacZ	1-1, 1-2, 2-2, 2-4, 2-5, 3-1, 3-2, 3-4, 3-5, 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 5-5, 5-6, 6-4, 7-1, 7-2, 7-3, 7-4	Doe (1992); Urbach et al. (2016)
Runt (Run)	2-1, 2-2, 2-3, 3-1, 3-2, 3-3, 5-2, 5-3	Doe und Technau (1993); Dormand und Brand (1998); Urbach et al. (2016)

³ Da für NB 1-3 keine hinreichend spezifischen Marker beschrieben sind, konnte dessen Existenz im LB und MN nicht zweifelsfrei geklärt werden (Urbach et al., 2016).

Tab. 3-2: Expressionsprofile der Markergene aus Tab. 3-1 in Rumpf-NBs

	Eg	Ems	En	Ey	Ind	Mid	<i>mirr-lacZ</i>	<i>svp-lacZ</i>	Run	weitere spezifische Marker (Kapitel)
1-1										<i>vnd</i> (3.2.3.2), <i>hkb-lacZ</i> (3.2.3.4)
1-2										<i>vnd</i> (3.2.3.2), <i>H15-lacZ</i> (3.2.3.3)
1-3										
2-1										<i>vnd</i> (3.2.3.2), <i>hkb-lacZ</i> , <i>otd</i> (3.2.3.4)
2-2										<i>hkb-lacZ</i> (3.2.3.4)
2-3										
2-4										
2-5										<i>kni</i> (3.2.3.4), <i>msh</i> (3.2.3.2)
3-1										<i>vnd</i> (3.2.3.2), <i>otd</i> (3.2.3.4)
3-2										<i>dbx</i> (3.2.3.6)
3-3										
3-4										<i>msh</i> (3.2.3.2), <i>H15-lacZ</i> (3.2.3.3)
3-5										<i>msh</i> (3.2.3.2)
4-1										<i>unpg-lacZ</i> (3.2.3.6), <i>btd</i> (3.2.3.4)
4-2										<i>hkb-lacZ</i> (3.2.3.4)
4-3										<i>msh</i> (3.2.3.2), <i>hkb-lacZ</i> (3.2.3.4)
4-4										<i>hkb-lacZ</i> (3.2.3.4)
5-1										<i>kni</i> (3.2.3.4)
5-2										<i>vnd</i> (3.2.3.2), <i>slp1</i> , <i>wg</i> (3.2.3.3)
5-3										<i>unpg-lacZ</i> (3.2.3.6)
5-4										<i>msh</i> (3.2.3.2), <i>hkb-lacZ</i> (3.2.3.4)
5-5										<i>unpg-lacZ</i> (3.2.3.6)
5-6										<i>lbe</i> (3.2.3.6), <i>btd</i> (3.2.3.4), <i>msh</i> (3.2.3.2)
6-1										<i>vnd</i> (3.2.3.2), <i>otd</i> (3.2.3.4)
6-2										
6-4										<i>msh</i> (3.2.3.2)
7-1										<i>vnd</i> (3.2.3.2)
7-2										<i>vnd</i> (3.2.3.2), <i>H15-lacZ</i> (3.2.3.3)
7-3										<i>H15-lacZ</i> (3.2.3.3)
7-4										<i>H15-lacZ</i> (3.2.3.3), <i>msh</i> (3.2.3.2)
LGB										
MNB										

Gezeigt sind die Expressionsprofile der in Tab. 3-1 aufgeführten Marker in NBs des Prothorakalsegments (grüne Schattierungen indizieren die Expression vom jeweils in dieser Spalte aufgeführten Markergene; fehlende Schattierungen indizieren fehlende Markerexpression). Daten stammen aus den in Tab. 3-1 aufgeführten Referenzen. In wenigen Fällen ist das Expressionsprofil der aufgeführten Marker nicht eindeutig (z.B. NBs 5-4, 5-5 und 5-6 exprimieren von den ausgewählten Markern lediglich *svp-lacZ*). In solchen Fällen sind in der rechten Spalte weitere charakteristische Marker angegeben, welche eine Unterscheidung dieser NBs ermöglichen.

Zur zweifelsfreien Identifikation von NBs kamen zusätzlich die in Urbach et al. (2016) angegebenen Homologiekriterien (Expression weiterer segmental konservierter Marker, Bildungszeitpunkt und Position neuroektodermalen Ursprungs von NBs, Expressionskombinatorik proneuraler Gene im jeweiligen proneuralen Clustern) zum Einsatz.

Zunächst wurden mit Hilfe des segmentalen Markers *En* die Existenz posteriorer NBs (NBs 6-1, 6-2, 6-4, 7-1, 7-2, 7-3 und 7-4; Doe, 1992) in den gnathalen Neuromeren untersucht. Diese sind weitestgehend in typischer Anzahl und Anordnung in LB, MX und MN vorhanden, mit Ausnahme eines *En*-exprimierenden NB im MN (**Abb. 3-23 A**). Angesichts der reduzierten NB-Gesamtzahl in den gnathalen Neuromeren kann somit darauf geschlossen werden, dass dort in erster Linie anteriore NBs nicht gebildet werden (Urbach et al., 2016). Der fehlende *En*-exprimierende NB im MN konnte eindeutig als NB 6-4 identifiziert werden, da an der entsprechenden Stelle im MN (im Gegensatz zu MX und LB) kein NB mit dem NB 6-4-typischen Expressionsprofil ($En^+/Eg^+/svp-lacZ^+/Ind^-$) beobachtet werden konnte (**Abb. 3-23 A-C**). Bestätigt wird das Fehlen des NB 6-4 durch das Fehlen von Reversed polarity (*Repo*)-exprimierenden Tochterzellen des NB 6-4 (Schmidt et al., 1997) im MN (**Abb. 3-23 F**). Alle übrigen posterioren NBs – also NBs 6-1 ($En^+/mirr-lacZ^+/svp-lacZ^-$), 7-1 ($En^+/Ind^-/mirr-lacZ^+/svp-lacZ^+$), NBs 6-2 ($En^+/Ind^+/svp-lacZ^+/Mid^-$), 7-2 ($En^+/Ind^+/svp-lacZ^+/Mid^+$), 7-3 ($En^+/Ind^+/svp-lacZ^+/Ey^+/Eg^+$) und 7-4 ($En^+/Ind^-/Mid^+/svp-lacZ^+$) – sind in LB, MX und MN an ihren typischen Positionen vorhanden (**Abb. 3-23 A-E**). Neben den posterior/intermediären NBs 6-2, 7-2 und 7-3 konnte auch die Existenz der anterior/intermediären NBs 4-2 ($Ey^+/Ind^+/Run^-/huckebein(hkb)-lacZ^+$; für *hkb-lacZ* siehe Kapitel) und 5-3 ($Ey^+/Ind^+/Run^+/unplugged(unpg)-lacZ^+$; für *unpg-lacZ* siehe Kapitel 3.2.3.6) bestätigt werden (**Abb. 3-23 A, D**). Lediglich der intermediäre NB 3-2 ($Ind^+/Run^+/Ey^+/Dbx^+$; für *Dbx* siehe Kapitel 3.2.3.6) konnte nur in LB und MX, nicht jedoch im MN beobachtet werden (**Abb. 3-23 A, D**).

Mit Hilfe der NB-Subpopulationsmarker *Eg*, *Run*, *mirr-lacZ*, *Ems* und *Mid* konnten neben dem mandibularen NB 3-2 weitere anteriore NBs identifiziert werden, die in gnathalen Neuromeren fehlen: NBs 2-4 ($Eg^+/Run^-/mirr-lacZ^-/Ems^-/Mid^-$; außerdem charakterisiert durch Expression von *PoxN*, siehe Kapitel 3.2.3.6) und 2-3 ($Eg^-/Run^+/mirr-lacZ^+/Ems^-/Mid^-$) sind in keinem der gnathalen Neuromere vorhanden (**Abb. 3-23 B, D, E**). Außerdem fehlen NB 1-1 ($Eg^-/Run^-/mirr-lacZ^+/Ems^-/Mid^-$), 1-2 ($Eg^-/Run^+/mirr-lacZ^+/Ems^-/Mid^+$) und 3-3 ($Eg^+/Run^+/mirr-lacZ^-/Ems^+/Mid^-$) spezifisch im MN, während sie in LB und MX gebildet werden (**Abb. 3-23 A, D, E, F**).

Insgesamt konnten folgende NBs in gnathalen Neuromeren nicht beobachtet werden: NBs 2-3, 2-4 und 5-5 im LB, NBs 2-3, 2-4, 2-5, 5-4, 5-5 und MP2 im MX und NBs 1-1, 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 2-5, 3-2, 3-3, 5-1, 5-4 und 6-4 im MN (für NBs 2-5, 5-2, 5-4, 5-5 und MP2 siehe folgende Kapitel und Urbach et al., 2016). Lediglich im MN wurden mit MP2a,b,c zusätzliche NBs detektiert, welche vermutlich duplizierte MP2s darstellen, und in den übrigen Gnathal-/Rumpfsegmenten nicht vorhanden sind (siehe Kapitel 3.2.4 und Urbach et al., 2016).

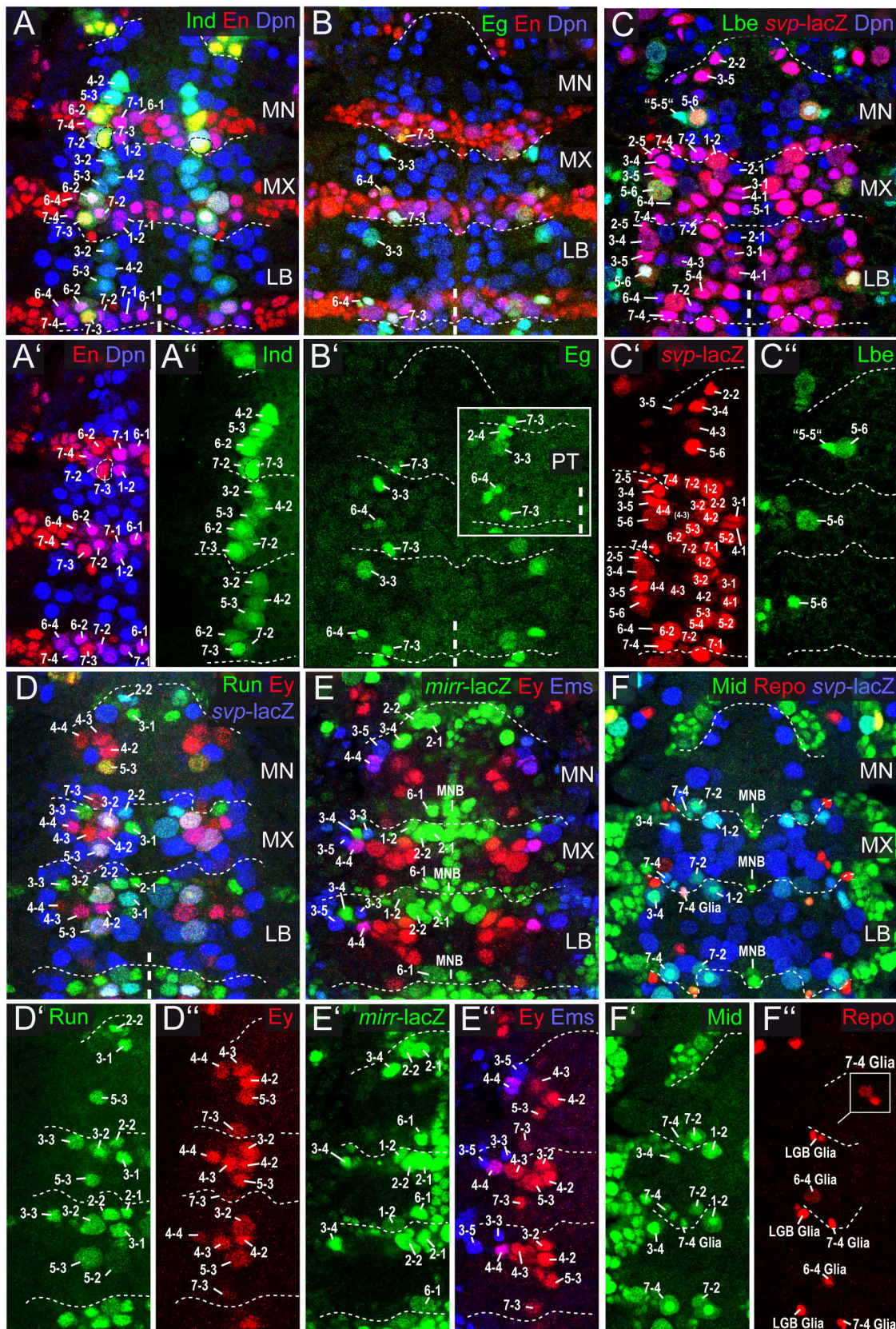


Abb. 3-23 Kartierung und Identifikation gnathaler NBs mit Hilfe ausgewählter molekularer Marker. (A-F) Expression verschiedener NB-Subpopulationsmarker (entsprechend der Beschriftung) in gnathalen NBs nach Abschluss der NB-Bildung im späten Stadium 11 in Filetpräparationen des gnathalen ZNS. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22. In A', A'', C', C'', D', D'', E', E'', F' und F'' sind jeweils linke Hemisegmente der in A, C, D, E, F gezeigten Präparate dargestellt. Der Kasten in B' zeigt die Expression von Eg in NBs des Prothorakalsegments (PT). Die Repo-exprimierenden Gliazellnachkommen von NB 7-4 sind in F nicht im Fokus (Kasten in F''). Siehe Text für weitere Details.

Alle übrigen gnathalen NBs konnten als serielle Homologe von NBs des PT identifiziert werden (Urbach et al., 2016). Lediglich im Falle des NB 5-5 und der mutmaßlichen Mittellinienvorläufer MP2a,b,c (beide MN) ist die Homologie zum NB 5-5 bzw. MP2 der Rumpfsegmente auf Grund derer stark abgewandelten Expressionsprofile nicht eindeutig (Urbach et al., 2016).

Trotz der seriellen Homologie unterscheiden sich gnathale NBs in den meisten Fällen von ihren Homologen der Rumpfsegmente. So wurde in 11 von 28-29 labialen NBs, in 14 von 26-27 maxillaren NBs und in 17 von 22 mandibularen NBs ein modifiziertes Expressionsprofil segmental konservierter Markergene beobachtet (siehe folgende Kapitel und Urbach et al., 2106; zusammengefasst in **Abb. 3-21 F**). So wird beispielsweise Run im Gegensatz zu Rumpf-Neuromeren und LB nicht im NB 5-2 des MX und MN exprimiert, oder Mid im MN im Gegensatz zu den übrigen Gnathal-/Rumpfneuromeren nicht in NB 3-4 exprimiert (**Abb. 3-23 D, F**). Ladybird early (Lbe), welches in Rumpfneuromeren spezifisch in NB 5-6 exprimiert wird (De Graeve et al., 2004), kann im MN in einem weiteren NB beobachtet werden, wobei es sich vermutlich um NB 5-5 handelt (**Abb. 3-23 C**) (Urbach et al., 2016). *svp-lacZ* wird im PT und LB in NB 6-4 exprimiert, nicht jedoch im MX; Im MN kann *svp-lacZ* nicht in den üblicherweise *svp-lacZ*-exprimierenden NBs 3-1, 4-1, 4-2, 4-4, 5-2, 5-3, 5-5, 6-2 und 7-1 beobachtet werden (**Abb. 3-23 C**) (Urbach et al., 2016). Insgesamt zeigen 20 der 32 segmental konservierten Markergene in einem oder mehreren gnathalen NBs eine abgewandelte (also im Vergleich zum PT fehlende oder ektopische) Expression (siehe folgende Kapitel und Urbach et al., 2016).

Neben diesen segmental konservierten Genen werden andere ausschließlich oder vornehmlich in gnathalen Neuroblasten exprimiert (Urbach et al., 2016). Dazu zählt der COE-Transkriptionsfaktor *collier (col)* (Crozatier et al., 1996), und das Augenentwicklungsgen Dachshund (Dac) (Mardon et al., 1994), welche mit Ausnahme einiger prägnathaler Hirn-NBs lediglich in einer spezifischen Sub-Population mandibularer NBs exprimiert werden (Col in NBs 2-1, 2-2, 3-4, 3-5; Dac in NBs 3-1, 4-1, 4-4, 5-2, 5-6) (**Abb. 3-24 A, B**) (Urbach et al., 2016). Auch *giant (gt)*, *charybde (chrb)* und *centauriny1A (cenG1A)* werden ausschließlich oder vornehmlich in gnathalen NBs exprimiert (siehe Kapitel 3.2.3.4 für Gt bzw. Kapitel 3.2.3.6 für *chrb* und *cenG1A*) (Urbach et al., 2016).

Zusammengenommen zeigt die NB-Population der gnathalen Neuromere eine ausgeprägte serielle Homologie zu den thorakalen/abdominalen Rumpfneuromeren T1-A7. In LB, MX und MN (also mit zunehmender Entfernung zu den thorakalen/abdominalen Rumpfneuromeren) wird die segmentale NB-Population jedoch zunehmend abgewandelt. Dies äußert sich einerseits in der reduzierten Neuroblastenzahl, wobei vornehmlich anteriore NBs von dieser Reduktion betroffen sind, und andererseits in einer zunehmenden Abwandlung der Expressionsprofile individueller NBs in LB, MX und MN.

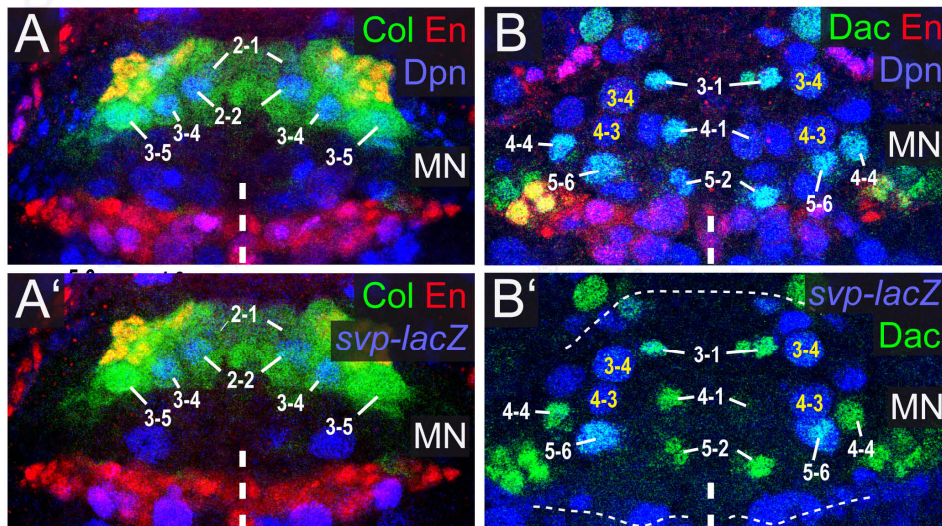


Abb. 3-24 Expression von Col und Dac in mandibularen NBs.

(A, B) Expression von Collier (A, A') und Dachshund (Dac) in mandibularen NBs im späten Stadium 11 nach Filetpräparation des gnathalen ZNS und im Kontext des NB-Markers Dpn (A, B) bzw. des NB-Subpopulationsmarkers *svp-lacZ* (A', B'). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22. Col und Dac werden in den Gnathal- und Rumpfneuromeren lediglich in einer jeweils spezifischen NB-Subpopulation mandibularer NBs exprimiert. Siehe Text für weitere Details.

3.2.3. Expressionsmuster molekularer Marker in gnathalen Neuroblasten

Nachdem die segmentale Population gnathaler NBs im vergangenen Kapitel anhand ausgewählter Marker charakterisiert wurde, werden im folgenden Kapitel die Expressionsmuster aller übrigen untersuchten Marker in gnathalen Neuroblasten beschrieben. Die dabei getätigten Aussagen zur Identifikation und somit dem Fehlen bzw. Vorhandensein spezifischer NBs stammen aus dem vorherigen Kapitel bzw. aus Urbach et al. (2016).

3.2.3.1. Temporale Spezifizierungsfaktoren

Die temporale Spezifizierungsfaktoren *seven-up* (*svp*), *hunchback* (*hb*), *POU domain transcription factor 1* (*pdm1*) und *castor* (*cas*) werden in aufeinanderfolgenden Zeitfenstern in NBs exprimiert und bestimmen so die Identität der Tochterzellen, welche zu einem gegebenen Zeitpunkt gebildet werden (zusammengefasst in Yasugi und Nishimura, 2016). Die genannten Faktoren wurden in NBs aller gnathaler Neuromere detektiert (siehe unten). Im Gegensatz zu *svp-lacZ*, welches als *lacZ*-Konstrukt wegen der langen Haltbarkeit von β -Galaktosidase ein recht stabiles Expressionsmuster aufwies, wurden Hb, Pdm1 und Cas vergleichsweise dynamisch in NBs exprimiert (Urbach et al., 2016). Da die Expression von *svp-lacZ* in gnathalen NBs bereits in Kapitel 3.2.2 behandelt wurde, ist sie im folgenden Kapitel nicht aufgeführt.

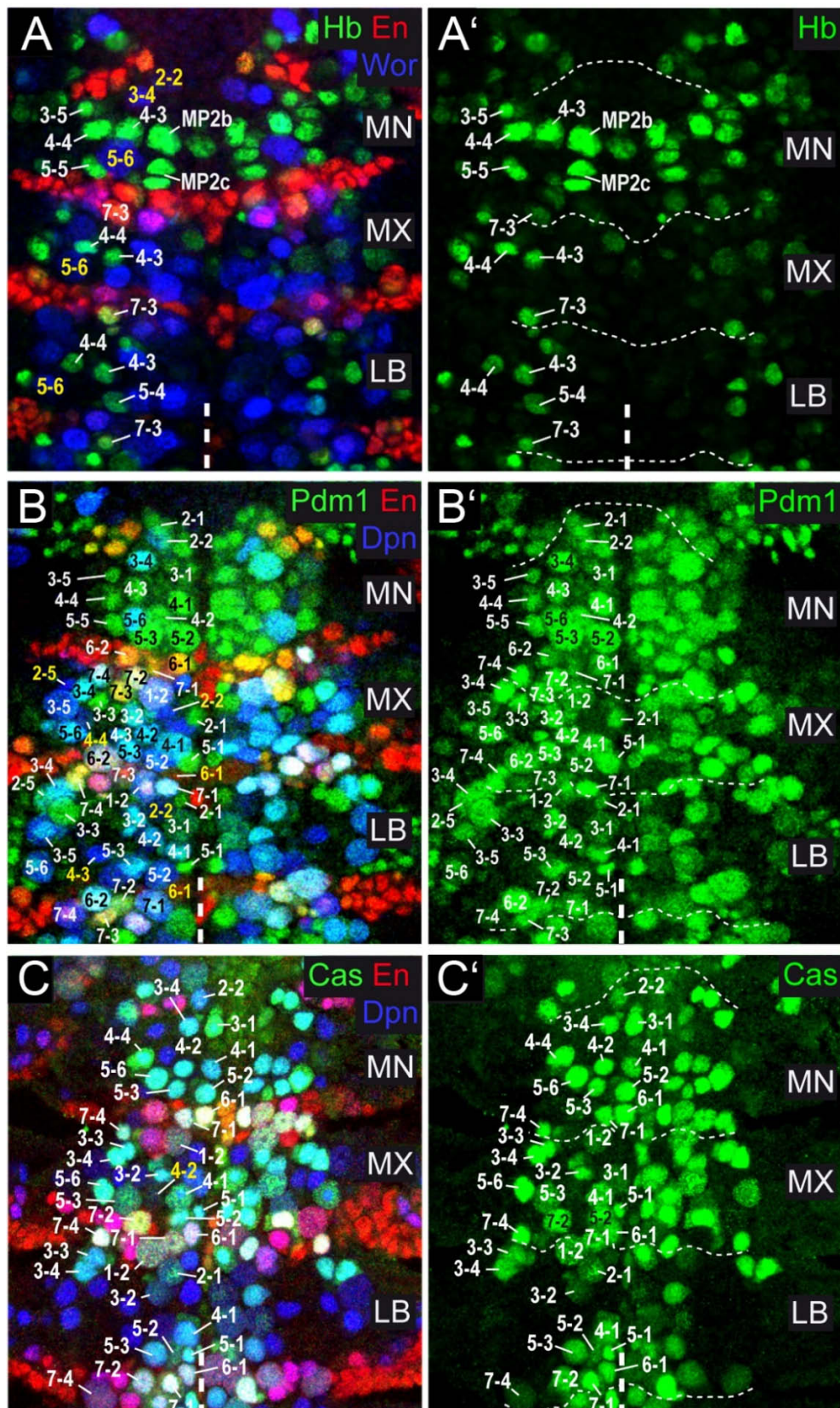


Abb. 3-25: Expression von temporalen Spezifizierungsfaktoren in gnathalen NBs.

Gezeigt ist die Expression der temporalen Spezifizierungsfaktoren Hunchback (Hb) (A, A'), POU domain transcription factor1 (Pdm1) (B, B') und Castor (Cas) (C, C') in gnathalen NBs des späten Stadium 11. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22. Indiziert sind NBs, welche den jeweils in grün dargestellten Marker exprimieren (weiße Bezeichnungen) bzw. nicht exprimieren (gelbe Bezeichnungen). Der Cas-negative mandibulare NB 2-1 ist in C/C' nicht im Fokus. Siehe Text für weitere Details.

Hunchback (Hb) wird im Rumpf in einer segmental konservierten Population der sieben NBs 2-3, 2-4, 4-3, 4-4, 5-4, 7-3 und MP2 exprimiert (Mettler et al., 2006). Im LB wurde Hb lediglich in den fünf NBs 4-3, 4-4, 5-4, 7-3 (**Abb. 3-25 B, B'**) und MP2 (nicht gezeigt) beobachtet, welche eine Subpopulation der Hb-exprimierenden NBs im PT darstellen. Die Reduktion Hb-exprimierender NBs im LB ist auf das Fehlen von NB 2-3 und 2-4 zurückzuführen. Im MX exprimieren mit NBs 4-3, 4-4 und 7-3 nur drei NBs Hb, was durch das Fehlen von NBs 2-3, 2-4, 5-4 und MP2 begründet ist. Im MN konnte mit NBs 4-3, 4-4 und 7-3 eine Subpopulation Hb-exprimierender NBs des PT, LB und MX detektiert werden. Daneben exprimieren mit 3-5, 4-2, 5-5 und MP2a,b,c sechs weitere NBs Hb. Die Expression von Hb ist somit im MN im Vergleich zum LB, MX und den Rumpf-Neuromeren demnach deutlich abgewandelt.

POU domain transcription factor1 (Pdm1) zeigt ein äußerst dynamisches Expressionsmuster in gnathalen NBs und ist daher in einigen NBs nicht reproduzierbar nachzuweisen (Urbach et al., 2016). Pdm1 ist exprimiert in etwa 2/3 der NBs von PT, MX und MN, sowie nahezu allen NBs des MN. Pdm1-Expression konnte in NBs 2-1, 3-1, 3-4, 3-5, 4-1, 4-2, 5-3, 5-6, 6-2, 7-1, 7-2, 7-3 und 7-4 von PT, LB, MX und MN nachgewiesen werden (**Abb. 3-25 C, C'**) (Urbach et al., 2016). NB 5-2 exprimiert Pdm1 darüber hinaus in allen gnathalen Neuromeren, jedoch nicht im PT. NB 2-5 exprimiert Pdm1 in PT und LB, jedoch nicht im MX. Darüber hinaus fehlen die typischerweise Pdm1-exprimierenden NBs 2-5, 3-2, 3-3 und 5-1 im MN. NB 6-4 exprimiert Pdm1 in MX, jedoch nicht in PT, LB und MN. Im MN ist dies durch das Fehlen von NB 6-4 begründet, während NB 6-4 in PT und LB jeweils gebildet wird, aber kein Pdm1 exprimiert. Pdm1-Expression in NBs 2-2, 4-3, 4-4, 5-5 und 6-1 konnte nur im MN, jedoch nicht in PT, LB und MX beobachtet werden. Im Falle von NB 5-5 des LB und MX ist dies durch das Fehlen des NB begründet, während die übrigen NBs in den jeweiligen Neuromeren vorliegen, aber kein Pdm1 exprimieren.

Castor (Cas) wird ebenfalls dynamisch in gnathalen NBs exprimiert, kann im späten Stadium 11 jedoch reproduzierbar in über der Hälfte der NBs von PT, LB, MX und MN beobachtet werden (Urbach et al., 2016). Im PT wird Cas in NBs 1-2, 2-1, 3-2, 3-3, 3-4, 4-1, 5-1, 5-2, 5-3, 5-6, 6-1, 7-1, 7-2, 7-4 und MNB exprimiert (Doe, 1992; Urbach et al., 2016). Im LB und MX konnte Cas in derselben NB-Subpopulation detektiert werden, mit Ausnahme von NB 2-1 im MX (**Abb. 3-25 C, C'**). Die Cas-Expression unterscheidet sich in NBs des MN am deutlichsten vom Grundzustand des PT. So werden die üblicherweise Cas-exprimierenden NBs 1-2, 3-2, 3-3, 5-1 und MP2 im MN nicht gebildet. Anstelle von MP2 entstehen im MN drei MP2-ähnliche NBs (MP2a,b,c siehe Kapitel 3.2.4), deren Homologie zu MP2 jedoch unter anderem auf Grund der fehlenden Cas-Expression nicht eindeutig ist (nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte wie im MX keine Cas-Expression in NB 2-1 beobachtet werden, wohingegen NBs 2-2 und 4-2 im MN außergewöhnlicher Weise Cas exprimieren (**Abb. 3-25 C**).

3.2.3.2. Dorsoventrale Musterbildungsgene

Die dorso-ventralen Musterbildungsgene *ventral nervous system defective (vnd)*, *intermediate neuroblasts defective (ind)*, *muscle segment homeobox (msh)*, *Nkx6* und *Dichaete (D)* bewerkstelligen

die Regionalisierung des frühen NE entlang der DV-Achse (D'Alessio und Frasch, 1996; Buescher und Chia, 1997; Isshiki et al., 1997; Chu et al., 1998; McDonald et al., 1998; Weiss et al., 1998; Uhler et al., 2002; Zhao und Skeath, 2002; Cowden und Levine, 2003; Urbach et al., 2006; Seibert et al., 2009) und wurden in NBs aller gnathaler Neuomere detektiert. Da die Expression von *ind* in gnathalen NBs bereits in Kapitel 3.2.2 behandelt wurde, ist sie im folgenden Kapitel nicht aufgeführt.

Ventral nervous system defective (Vnd) wird in Rumpf-Neuomeren in allen ventralen NBs (NBs 1-1, 1-2, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1, 5-2, 6-1, 7-1 und MP2) und im intermediären NB 7-2 exprimiert (Chu et al., 1998; Shao et al., 2002). In derselben NB-Subpopulation ist Vnd-Expression in LB, MX und MN zu beobachten, mit Ausnahme des MP2 in MX und der NBs 1-1, 1-2 und 5-1 im MN, welche in diesen Segmenten nicht gebildet werden (**Abb. 3-26 A**); im MN exprimieren außerdem die ventral gelegenen MP2-ähnlichen NBs MP2b und MP2c Vnd (siehe Kapitel 3.2.4; **Abb. 3-34 A**).

Muscle segment homeobox (Msh) wird in den Rumpf-Neuomeren von den sieben dorsalen NBs 2-4, 2-5, 3-4, 4-3, 5-4, 6-4 und 7-4 sowie dem longitudinalen Glioblast (LGB) exprimiert (Isshiki et al., 1997). Auch in den gnathalen Neuomeren wird Msh in dorsalen NBs exprimiert (**Abb. 3-26 B**). Im LB existieren auf Grund des fehlenden NB 2-4 nur sechs Msh-exprimierende NBs. Im MX fehlt neben NB 2-4 mit NB 5-4 ein weiterer Msh-exprimierender NB. Im MN fehlen die Msh-exprimierenden NBs 2-4, 5-4, 6-4 und LGB. Daneben exprimieren die üblicherweise Msh-negativen dorsalen NBs 3-5 und 5-6 im MN Msh, was zusammengenommen zu einer reduzierten Anzahl von vier Msh-exprimierenden NBs führt.

Nkx6 wird im Rumpf in den ventralen und intermediären NBs 2-2, 3-1, 3-2 und 4-2 exprimiert (Uhler et al., 2002). In allen gnathalen Neuomeren wurde *Nkx6-mRNA* in der gleichen NB-Subpopulation (mit Ausnahme des im MN fehlenden NB 3-2) und darüber hinaus in zusätzlichen NBs detektiert (**Abb. 3-26 C**). So wurde ein vergleichsweise schwaches *Nkx6-mRNA*-Signal im LB auch in NBs 5-2, 6-1 und 7-1 detektiert. Im MX wurde *Nkx6* in einer relativ umfangreichen NB-Subpopulation aus NBs 2-1, 2-2, 4-1, 5-1, 5-2, 6-1 und 7-1 detektiert. Im MN exprimiert mit NBs 2-1, 2-2, 3-1, 4-2, 6-1 und 7-1 eine Sub-Population der maxillaren NBs *Nkx6*.

Das **Dichaete (D)**-Expressionsmuster zeigt unter den DV-Genen die deutlichsten segmentalen Unterschiede in den gnathalen Neuomeren (Urbach et al., 2016). Die Expression in Rumpf-Neuomeren ist dynamisch und wird vornehmlich in dorsalen NBs beobachtet (Zhao und Skeath, 2002). Im PT wird D im späten Stadium 11 in unterschiedlichen Expressionsstärken in NBs 3-2, 4-1, 4-3, 5-6, 6-4, 7-3 und 7-4 exprimiert. D-Expression ist in dieser NB-Subpopulation mit Ausnahmen auch in LB und MX zu beobachten (**Abb. 3-26 D**).

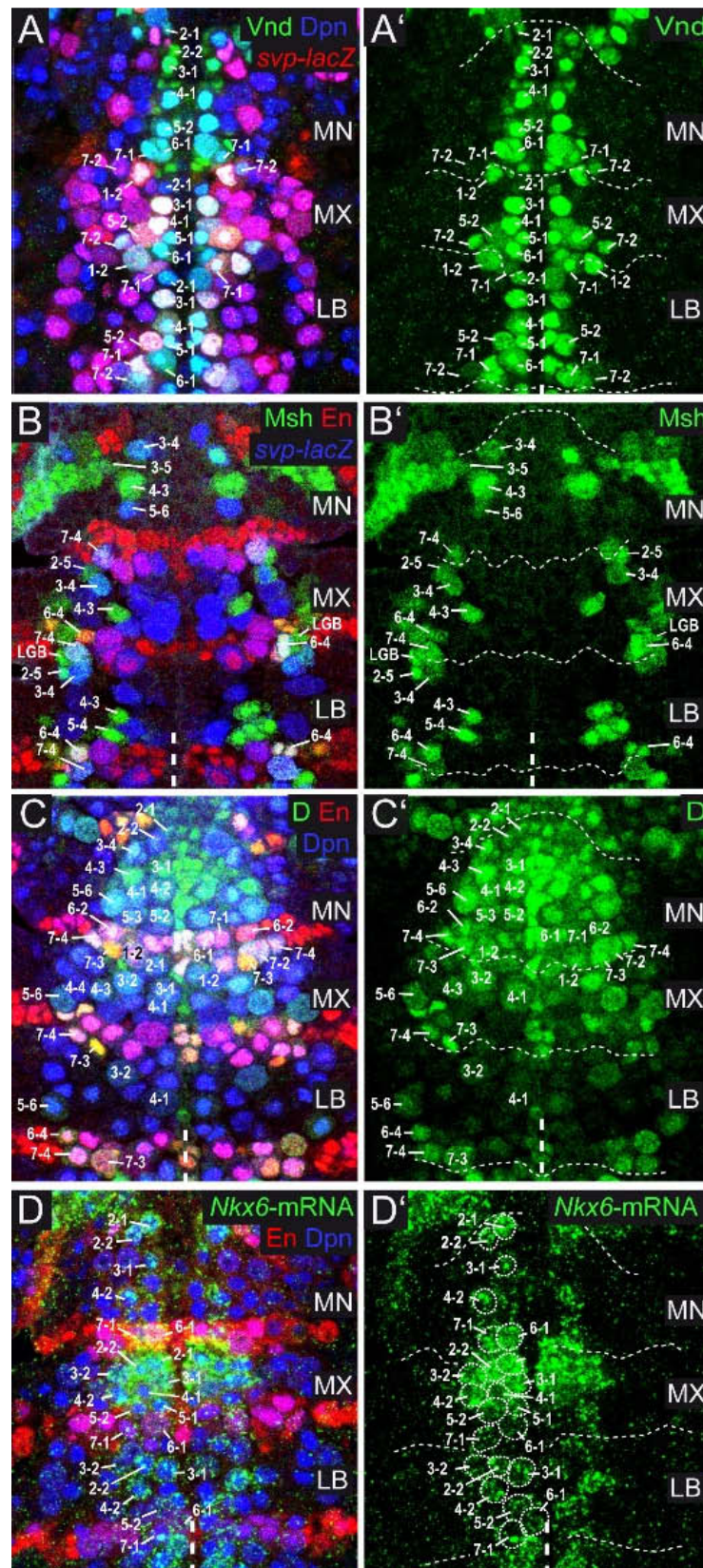


Abb. 3-26: Expression von DV-Genen in gnathalen NBs.

(A-D) Gezeigt ist die Expression der DV-Gene *Ventral nervous system defective* (*Vnd*) (A, A'), *Muscle segment homeobox* (*Msh*; *Drop-Flybase*) (B, B'), *Dichaete* (D) (C, C') und *Nkx6*-mRNA (D, D') im Kontext des NB-Markers *Dpn* (A, C, D), des NB-Subpopulationsmarkers *svp-lacZ* (A, B) und des Segmentmarkers *En* (B-E) in gnathalen NBs im späten Stadium 11. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22. Gepunktete Linien in D' indizieren Umrisse *Nkx6*-exprimierender NBs. (C, C') Der *Msh*-exprimierende maxillare LGB ist nicht im Fokus (vgl. Abb. 3-32 A'). (E, E') Der labiale NB 4-3 zeigt hier schwache D-Expression, welche jedoch nicht durchgängig nachgewiesen werden kann. Siehe Text für weitere Details.

Diese Ausnahmen sind die fehlende D-Expression im NB 4-3 des LB, sowie die zusätzliche D-Expression im NB 1-2 des MX. In NBs des MN ist die D-Expression deutlich modifiziert und mit Ausnahme der dorsalen NBs 3-5, 4-4 und 5-5 in allen NBs zu beobachten (**Abb. 3-26 D**). Obgleich mit NBs 3-2 und 6-4 D-exprimierende NBs im MN fehlen, kommen die intersegmentalen Unterschiede der D-Expression in gnathalen Neuromeren in erster Linie durch Modifikationen im Expressionsprofil vorhandener NBs zustande. Diese sind angesichts des dynamischen temporalen Expressionsmusters von D vermutlich durch die deutlich verzögerte NB-Bildung im MN mitbegründet (Urbach et al., 2016).

3.2.3.3. Segmentpolaritätsgene

Die Segmentpolaritätsgene *engrailed (en)*, *gooseberry (gsb)*, *wingless (wg)*, *mirror (mirr)*, *H15* und *midline (mid)* werden als segmentale Musterbildungsfaktoren in definierten Domänen entlang der AP-Achse von Rumpfsegmenten exprimiert, welche weitestgehend auch in den gnathalen Neuromeren zu beobachten sind. Da die Expressionsmuster von *en*, *mirr* und *mid* in gnathalen NBs bereits in Kapitel 3.2.2 behandelt wurden, sind sie im folgenden Kapitel nicht aufgeführt.

Gooseberry (Gsb) definiert in Rumpfsegmenten NB-Identitäten der Reihen 5/6 und wird dementsprechend in NBs 5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 5-5, 5-6, 6-1, 6-2, 6-4, sowie in NB 7-1 exprimiert (Zhang et al., 1994; Broadus et al., 1995). Auch in LB, MX und MN wird *gsb-d-lacZ* in dieser stereotypen NB-Subpopulation exprimiert, wobei die Anzahl jeweils reduziert ist (**Abb. 3-27 B**). Diese Reduktion lässt sich auf das Fehlen *gsb-d-lacZ*-exprimierender NBs zurückführen (NB 5-5 im LB; NBs 5-4 und 5-5 im MX; NBs 5-1, 5-4 und 6-4 im MN).

Wingless (Wg) ist im Gegensatz zu den meisten untersuchten Markern ein sekretiertes Protein (Gonzalez et al., 1991). Wg-exprimierende Zellen weisen jedoch eine deutliche periphere Akkumulation des Proteins auf und lassen sich somit zuverlässig identifizieren (**Abb. 3-27 B**). Wg wird in Rumpfsegmenten in allen NBs der Reihe 5 exprimiert (NBs 5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 5-5 und 5-6) (Doe, 1992). Entsprechend wird Wg auch im LB und MX in diesen NBs exprimiert, mit Ausnahme des NB 5-5 in LB und MX und NB 5-4 im MX, welche in den jeweiligen Neuromeren nicht gebildet werden (**Abb. 3-27 B**). Wg-Expression in NBs 5-1, 5-2 und 5-3 von LB und MX war jedoch mitunter recht gering und konnte in manchen Fällen nicht eindeutig detektiert werden. Im LB wird Wg darüber hinaus außergewöhnlicher Weise in NBs 4-3 und 4-4 exprimiert (**Abb. 3-27 C**). Im MN ist die Wg-Expression wieder auf NBs der Reihe 5 begrenzt, wobei die typischerweise Wg-exprimierenden NBs 5-1 und 5-4 in diesem Segment nicht gebildet werden.

H15-lacZ wird in Rumpf-NBs in einem vergleichbaren Muster exprimiert wie *midline (mid)*; siehe Kapitel 3.2.2) (Buescher et al., 2006). *H15-lacZ* wurde im PT, LB und MX in NBs 1-2, 3-4, 7-2, 7-3, 7-4 und MNB detektiert (**Abb. 3-27 C**).

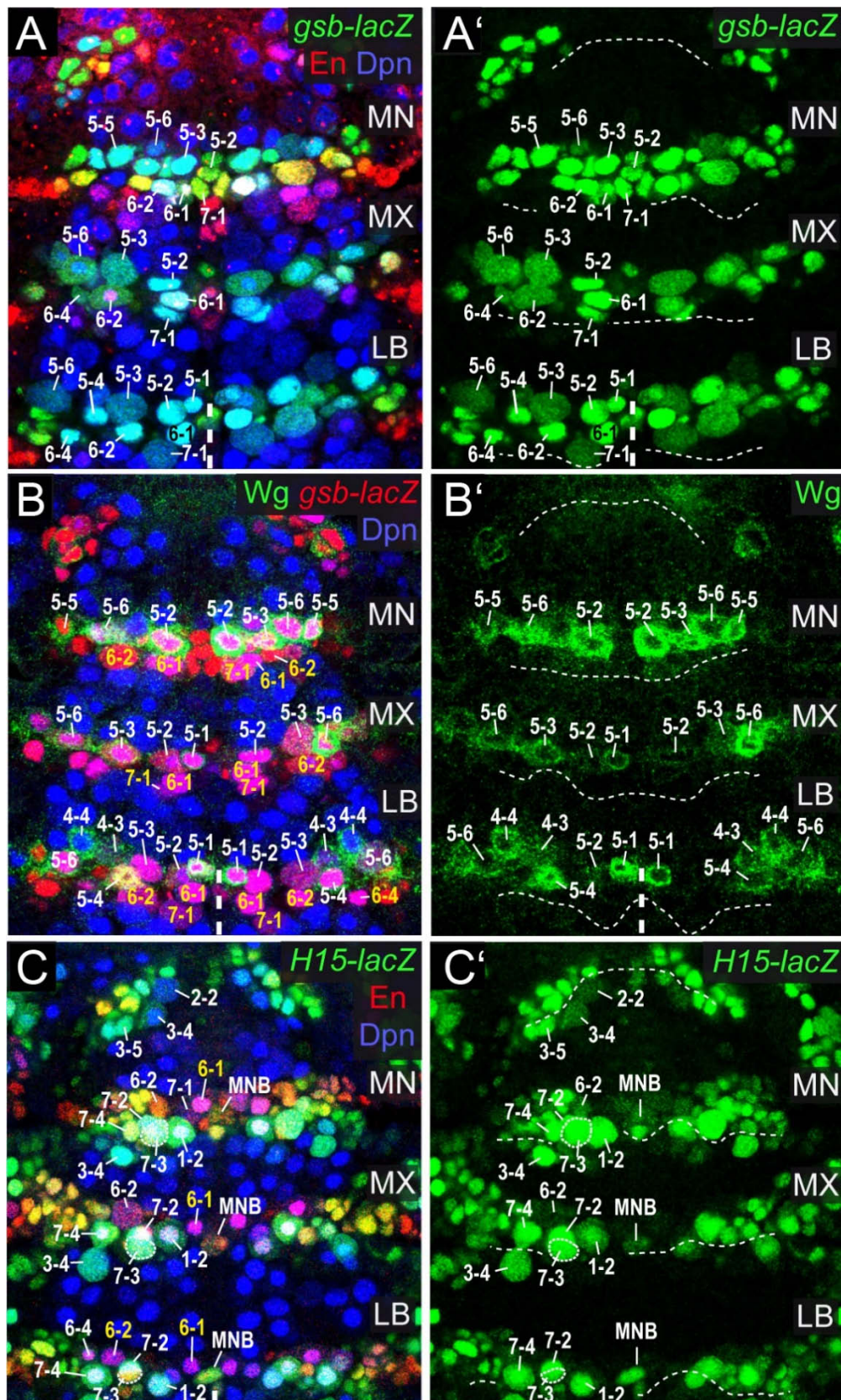


Abb. 3-27: Expression von Segmentpolaritätsgenen in gnathalen NBs.

(A-C) Expression von, *gooseberry-distal-lacZ* (*gsb-d-lacZ*) (A, A', B), *Wingless* (*Wg*) (B, B') und *H15-lacZ* (C, C') in gnathalen NBs im späten Stadium 11 im Kontext verschiedener NB-(Subpopulations-)marker (entsprechend der Beschriftung). Für Abkürzungen und Orientierung siehe Abb. 3-22. Die gezeigten Segmentpolaritätsgene werden in jedem gnathalen Neuromer in spezifischen, weitestgehend segmental konservierten NB-Subpopulationen exprimiert. Siehe Text für weitere Details.

Der von Buescher et al. (2006) beschriebene *H15-lacZ* exprimierende NB 2-5 wurde auf Grundlage des charakteristischen Expressionsprofils und Bildungszeitpunkts als NB 3-4 identifiziert (NB2-5: $Dpn^+/kni^+/Msh^+/svp-lacZ^+/Pdm1^+/mirr-lacZ^-/Cas^-$, gebildet im späten Stadium 8; NB3-4: $Dpn^+/kni^+/Msh^+/svp-lacZ^+/Pdm1^+/mirr-lacZ^+/Cas^+$, gebildet im frühen Stadium 11; Urbach et al., 2016). In dieser Sub-Population wurde *H15-lacZ* unter Einbeziehung folgender Abwandlungen auch in den gnathalen Neuromeren detektiert: Im MX und MN wurde zusätzlich ein schwaches *H15-lacZ*-Signal in NB 6-2 detektiert; außerdem wird der *H15-lacZ*-exprimierende NB 1-2 im MN nicht gebildet (Urbach et al., 2016). Anstelle exprimieren NBs 2-2 und 3-5 in diesem Neuromer unüblicher Weise *H15-lacZ* (**Abb. 3-27 C**). Im MN exprimiert somit ein vergleichsweise hoher Anteil von acht der igs. 22 NBs *H15-lacZ*.

3.2.3.4. Lückengene

Lückengene sind fundamentale Musterbildungsfaktoren, welche den frühen Embryo entlang der AP-Achse in definierte Bereiche unterteilen, und so die Expression weiterer Musterbildungsfaktoren (Paarregelgene, homöotische Gene) kontrollieren (zusammengefasst in Gaul und Jackle, 1990). Im weiteren Verlauf werden Lückengene auch in NBs exprimiert, wo sie unterschiedliche Funktionen erfüllen (z.B. Younossi-Hartenstein et al., 1997; Hartmann et al., 2000; Isshiki et al., 2001; Moris-Sanz et al., 2014). Die Lückengene *empty-spiracles (ems)*, *orthodenticle (otd)*, *huckebein (hkb)*, *buttonhead (btd)*, *sloppy-paired 1 (slp1)* und *knirps (kni)* wurden in NBs aller gnathaler Neuromere detektiert; im Gegensatz dazu wird *Giant (Gt)* innerhalb der Gnathal- und Rumpfneuromere spezifisch in NBs des MN exprimiert, und unterscheidet sich somit bezüglich der Expression in NBs fundamental von den übrigen Lückengenen (siehe unten). Da die Expression von *ems* in gnathalen NBs bereits in Kapitel 3.2.2 behandelt wurde, ist sie im folgenden Kapitel nicht aufgeführt.

Giant (Gt) in Stadium 11 ausschließlich in neuralen Vorläufern der Hirnanlage (nicht gezeigt) und des MN exprimiert (**Abb. 3-28 A, B**) (Urbach et al., 2016). Zu den Gt-exprimierenden NBs des MN zählt der Ladybird-early (Lbe)-exprimierende NB 5-5 (**Abb. 3-28 A**), welcher aus einer Gt/Lbe-exprimierenden proneuralen Domäne des NE hervorgeht (**Abb. 3-28 A'**). Wie zuvor erwähnt ist die Identität von NB 5-5 im MN auf Grund eines deutlich modifizierten Expressionsprofils molekularer Marker nicht eindeutig, wozu auch die für NB 5-5 untypische Gt- und Lbe-Expression zählt (Urbach et al., 2016). Neben NB 5-5 ist Gt in drei neuralen Vorläufern exprimiert, welche spezifisch im MN auftreten und Ähnlichkeiten zum Mittellinienvorläufer MP2 der Rumpfsegmente aufweisen (MP2a,b,c; siehe Kapitel 3.2.4) (**Abb. 3-28 B**).

Orthodenticle (Otd) wird in thorakalen Neuromeren in den vier ventralen NBs 2-1, 3-1, 5-1 und 6-1 exprimiert (Urbach et al., 2016). Die gleiche Subpopulation Otd-exprimierender NBs wurde in LB und MX beobachtet (**Abb. 3-28 C**). Im MN wurde keine Otd-Expression in NB 2-1 beobachtet. Durch das Fehlen von NB 5-1 sind somit im MN mit NBs 3-1 und 6-1 lediglich zwei der üblicherweise vier Otd-exprimierenden NBs vorhanden (**Abb. 3-28 C**).

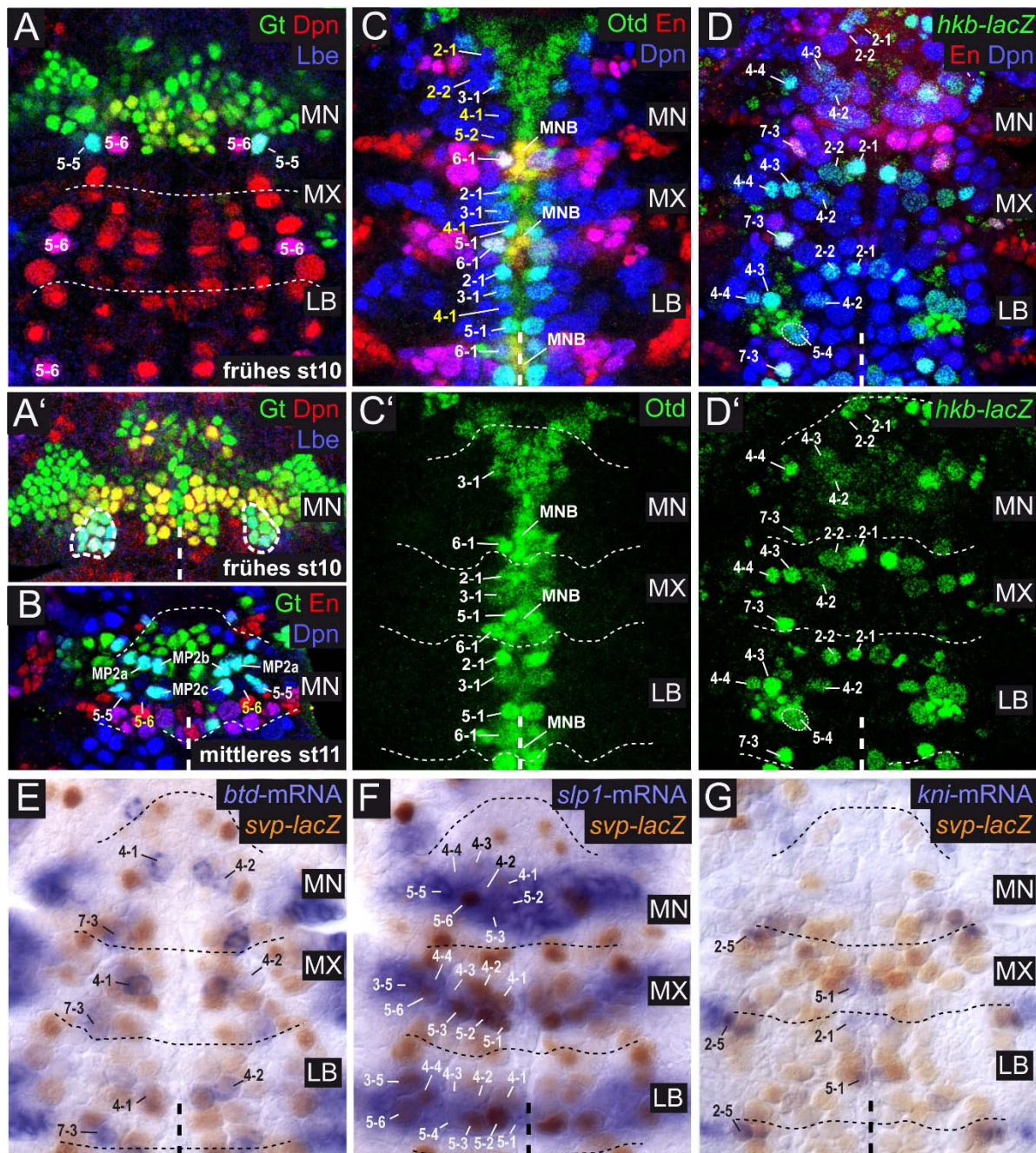


Abb. 3-28: Expression von Lückengenen in gnathalen NBs.

(A-G) Expression von Giant (Gt) (A, A', B), Orthodenticle (Otd) (C, C'), *huckebein-lacZ* (*hkb-lacZ*) (D, D'), *buttonhead-mRNA* (*btd-mRNA*) (E), *sloppy paired 1-mRNA* (*slp1-mRNA*) (F) und *knirps* (*kni-mRNA*) (G) im gnathalen ZNS des frühen Stadium 10 (A, A'), mittleren Stadium 11 (B) und späten Stadium 11 (C-H) in Kombination mit verschiedenen NB-(Subpopulations-)markern (entsprechend der Beschriftung). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22. Während Gt (A, B) spezifisch im MN exprimiert wird, zeigen die übrigen Lückengene (C-G) ein weitestgehend segmental konserviertes Expressionsmuster in spezifischen NB-Subpopulationen aller gnathaler Neuromere (der *hkb-lacZ*-exprimierende NB 1-1 ist in LB und MX von C und C' jeweils nicht im Fokus). Der Lbe-positive NB 5-5 exprimiert Gt (A) und wird im frühen St10 aus Gt/Lbe-exprimierendem NE (gestrichelte Umrandung in A') gebildet (A' zeigt das Präparat aus A mit Fokus auf das NE). Aus dem Gt-exprimierendem NE gehen auch die Gt-exprimierenden MP2a,b,c hervor (B). Siehe Text für weitere Details.

huckebein* (*hkb*)-*lacZ wird in Rumpf-Segmenten in jeweils zehn NBs exprimiert (NBs 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 2-4, 4-2, 4-3, 4-4, 5-4, 5-5 und 7-3) (Broadus et al., 1995; McDonald und Doe, 1997) und stellt damit ein relativ umfangreich exprimiertes Lückengen dar. In der gleichen NB-Subpopulation wurde *hkb-lacZ* im LB detektiert, mit Ausnahme von NBs 2-4 und 5-5, welche im LB nicht gebildet werden (**Abb.**

3-28 D). Im MX fehlt neben den üblicherweise *hkb-lacZ* exprimierenden NBs 2-4 und 5-5 auch NB 5-4, während im vorhandenen NB 1-1 kein *hkb-lacZ* detektiert wurde (**Abb. 3-28 D**). Im MN fehlen die üblicherweise *hkb-lacZ*-exprimierenden NBs 1-1, 2-4 und 5-4. Während NB 5-5 im MN gebildet wird, konnte *hkb-lacZ* darin nicht detektiert werden (**Abb. 3-28 D**).

buttonhead (btd) wird in Rumpf-Neuromeren einer charakteristischen Subpopulation von vier NBs (NBs 4-1, 4-2, 5-6 und 7-3) exprimiert (Urbach et al., 2016). In LB, MX und MN konnte *btd*-Expression jeweils in NBs 4-1, 4-2 und 7-3 beobachtet werden, in keinem der gnathalen Neuromere jedoch in NB 5-6 (**Abb. 3-28 E**).

sloppy-paired 1 (slp1) wird in Rumpf-Neuromeren in allen NBs der Reihen 4 und 5 exprimiert (Bhat et al., 2000). Dies trifft ebenso auf die gnathalen Neuromere LB, MX und MN zu, wobei die Expression in LB und MX darüber hinaus auf NB 3-5 ausgedehnt ist (**Abb. 3-28 F**). Die Anzahl *slp1*-exprimierender NBs in den gnathalen Neuromeren ist im Vergleich zum PT jedoch durch das segment-spezifische Fehlen von Reihe-5-NBs reduziert (NB 5-5 im LB; NBs 5-4 und 5-5 im MX; NBs 5-1 und 5-4 im MN).

knirps (kni) ist ein äußerst spezifischer NB-Marker und wird im PT lediglich in NBs 5-1 und 2-5 exprimiert (Urbach et al., 2016). Gleiches trifft auf LB und MX zu, wobei *kni*-Expression im MX jedoch zusätzlich in NB 2-1 detektiert wurde (**Abb. 3-28 G**). Im MN wurde kein *kni*-exprimierender NB beobachtet, was sich durch das Fehlen von NB 5-1 und 2-5 erklärt.

3.2.3.5. Homöotische Gene

Homöotische Gene werden entlang der AP-Achse des Embryos in zusammenhängenden, parasegmental angelegten Domänen exprimiert, welche die unterschiedlichen Körperabschnitte der Fliege definieren (zusammengefasst in Scott und Carroll, 1987; Lemons und McGinnis, 2006). Durch die Aktivität homöotischer Gene wird das Entwicklungsprogramm neuraler Vorläufer entsprechend des Körperabschnitts modifiziert (zusammengefasst in Technau et al., 2006; Rogulja-Ortmann und Technau, 2008). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Gengruppen (Temporale Spezifizierungsfaktoren, DV-Gene, Segmentpolaritätsgene, Lückengene) werden homöotische Gene also nicht segmental konserviert exprimiert und dienen nicht zur Identifikation seriell homologer NBs.

Deformed (Dfd) wird im Ektoderm von Parasegment (PS) 0 und 1 exprimiert, was in Bezug auf die Gnathalsegmente dem gesamten MN und anterioren Kompartiment des MX entspricht (Martinez-Arias et al., 1987). Dem entsprechend konnte *Dfd* in allen NBs des MN und allen anterioren NBs des MX (Reihen 1-5) nachgewiesen werden. In dorsalen Anteilen des MX ist *Dfd*-Expression darüber hinaus auf das posteriore Kompartiment ausgedehnt, und kann dort im posterioren NB 6-4 des MX nachgewiesen werden (**Abb. 3-29 A**).

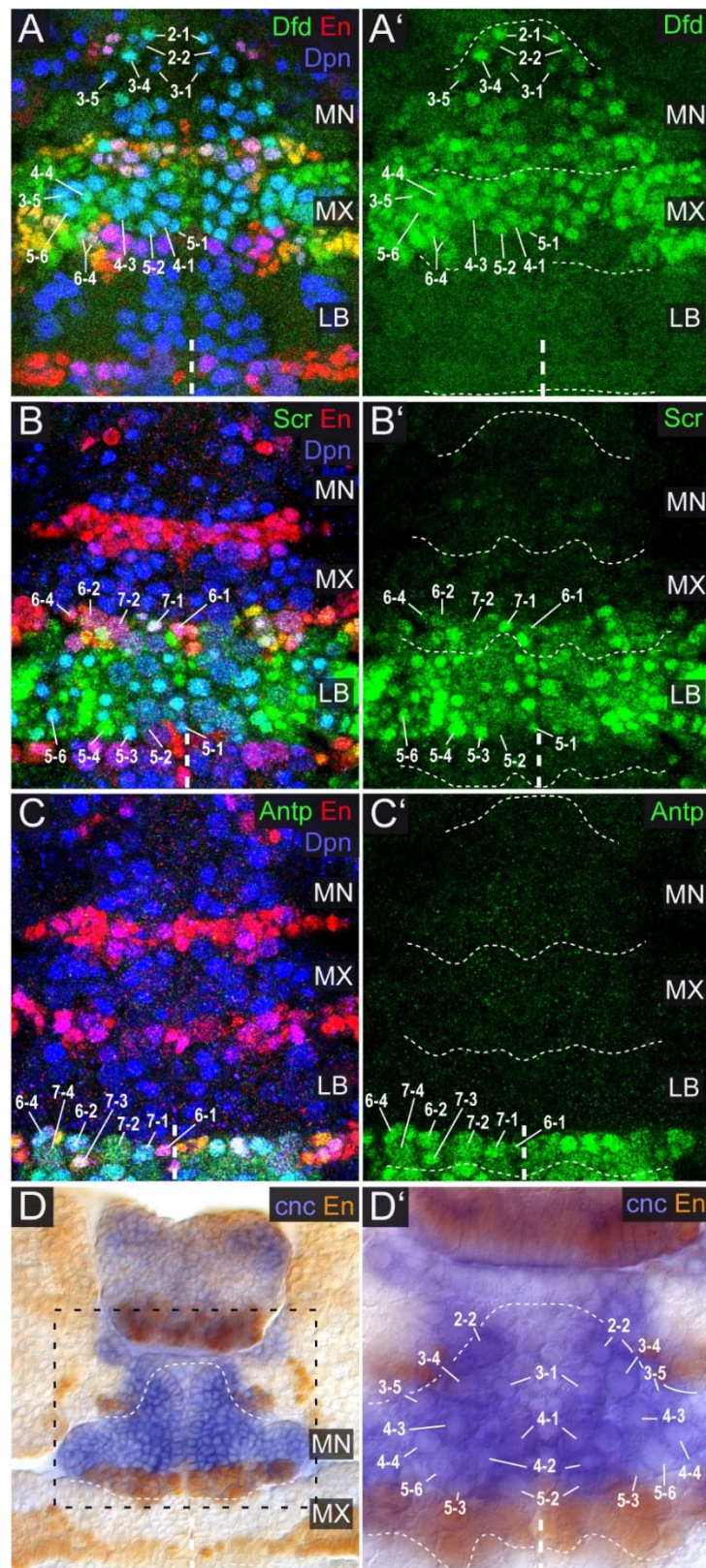


Abb. 3-29: Expression homöotischer Gene in gnathalen NBs.

Gezeigt ist die Expression von *Dfd* (A, A'), *Scr* (B, B'), *Antp* (C, C') und *cnc*-mRNA (D, D') in Kombination mit dem Segmentmarker *En* (A-D) und dem NB-Marker *Dpn* (A-C) in gnathalen NBs im späten Stadium 11. (A-D) Homöotische Gene werden in gnathalen NBs in ihrem typischen, parasegmentalen Muster exprimiert (siehe Text). Ausnahmen sind die Expression von *Dfd* im dorso-posterioren MX, welche den posterioren NB 6-4 umfasst (A, A') und die Expression von *cnc*-mRNA im posterioren NE des MN (D; zeigt Fokus auf das Neuroektoderm), welche jedoch keine posterioren NBs umfasst (D'; zeigt eine Vergrößerung des gestrichelten Kastens in D mit Fokus auf die NB-Schicht). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-25. Siehe Text für weitere Details.

Sex-combs reduced (Scr) wird im Ektoderm von PS 2 exprimiert, welches sich über das posteriore Kompartiment des MX und anteriore Kompartiment des LB erstreckt (Martinez-Arias et al., 1987) und somit posterior an die Dfd-Expressionsdomäne anschließt. Entsprechend konnte Scr in allen posterioren NBs des MX (Reihe 6/7) und anterioren NBs des LB (Reihen 1-5) detektiert werden (**Abb. 3-29 B**). Auf Grund der oben beschriebenen Ausdehnung der dorsalen Dfd-Expressionsdomäne ins posteriore MX ist NB 6-4 durch die außergewöhnlichen Co-Expression von Dfd und Scr charakterisiert.

Die Expression von **Antennapedia (Antp)** schließt posterior an Scr an und deckt in Stadium 11 PS 3-5 ab, was dem posterioren LB, dem gesamten Pro- und Mesothorakalsegment (T1 und T2) und dem anterioren Metathorakalsegment (T3) entspricht (Birmingham et al., 1990). Dementsprechend wurde Antp in allen posterioren NBs (Reihen 6/7) des LB (**Abb. 3-29 C**) und darüber hinaus in den posterior anschließenden thorakalen NBs detektiert (nicht gezeigt).

cap'n'collar (cnc) wird im MN exprimiert, wo es Aspekte der Dfd-Funktion repräsentiert (McGinnis et al., 1998). Während sich die *cnc*-Expression das gesamte mandibulare Ektoderm erstreckt, konnte *cnc* nur in anterioren NBs des MN (Reihen 2-5) detektiert werden (**Abb. 3-29 D**).

3.2.3.6. Andere Gene

Im folgenden Abschnitt werden mit *dbx*, *unplugged (unpg)*, *pox neuro (poxn)*, *charybde (chrb)* und *centaurin Gamma1A (cenG1A)* weitere Marker behandelt, welche keiner der vorherigen Kategorien angehören. Einige dieser Faktoren zeigen in Rumpf-Neuromeren ein segmental hochkonserviertes Expressionsmuster (*unpg*, *poxn*), so dass deren Expression als Kriterium zur Identifikation gnathaler NBs herangezogen wurde; andere wurden ausschließlich (*chrb*) oder vornehmlich (*cenG1A*) in gnathalen Neuromeren detektiert (siehe unten).

Der *helix-turn-helix*-Transkriptionsfaktor **Dbx** wird in NBs der prägnathalen Hirnneuromere und Rumpfneuromere exprimiert (Lacin et al., 2009; Urbach et al., 2016). Im PT und LB kann Dbx lediglich in NB 3-2 beobachtet werden (**Abb. 3-30 A**) (Urbach et al., 2016). Das Expressionsmuster in MX und MN ist hingegen deutlich abgewandelt. So wurde Dbx im MX neben NB 3-2 in NBs 5-2, 5-3 und 7-1 detektiert, welche auch im MN mit Ausnahme des dort nicht gebildeten NB 3-2 Dbx exprimieren (**Abb. 3-30 A**).

unplugged (unpg)-lacZ wird im Rumpf in einer segmental konservierten NB-Subpopulation bestehend aus NBs 4-1, 5-3, 5-5, 6-2, 7-2 und MNB exprimiert (Broadus et al., 1995; Urbach et al., 2016). In dieser NB-Subpopulation wurde *unpg-lacZ* auch in LB, MX und MN detektiert mit Ausnahme von NB 5-5, welcher in LB und MX nicht gebildet wird, im MN jedoch trotz seines Vorhandenseins kein *unpg-lacZ* exprimiert (**Abb. 3-30 B**).

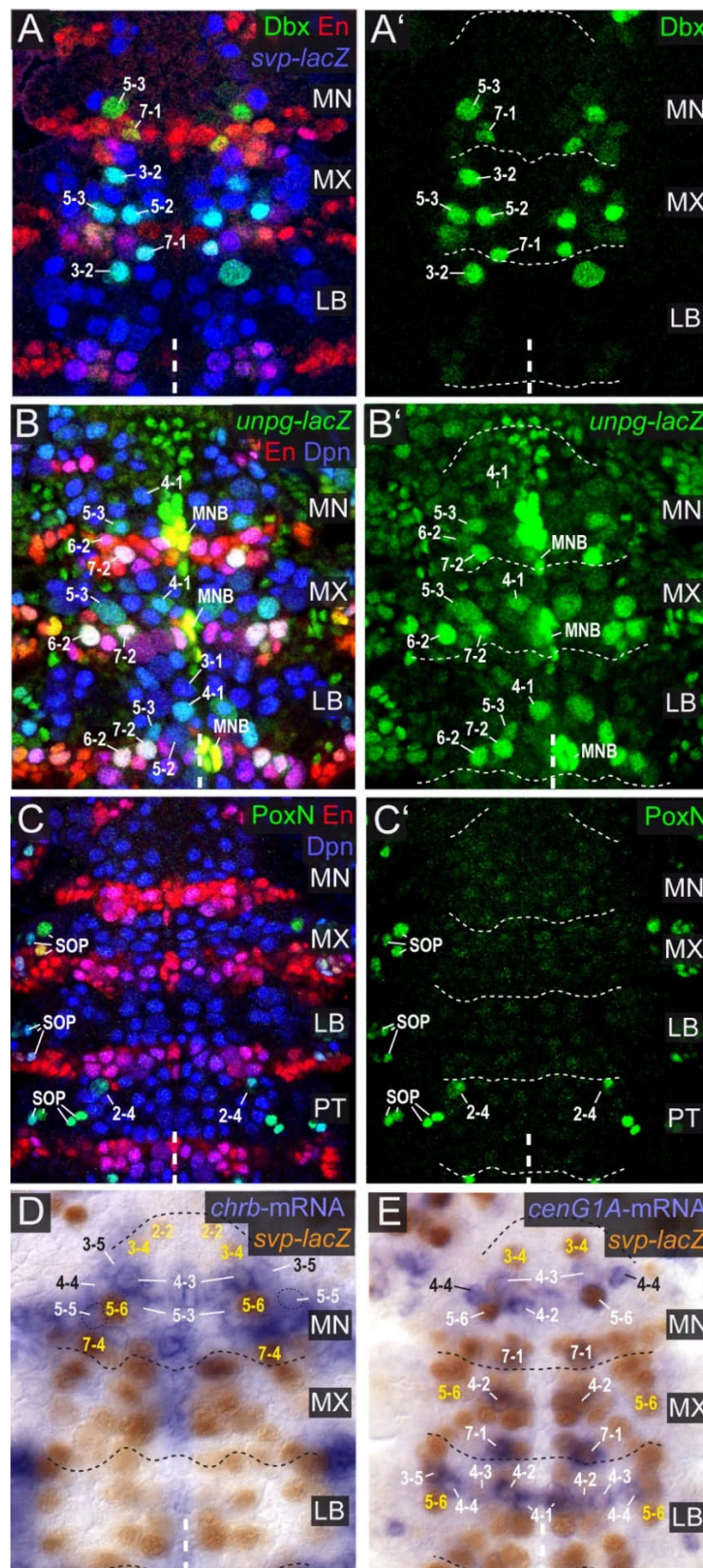


Abb. 3-30: Expression von *Dbx*, *unpg-lacZ*, *Poxn*, *chrB*-mRNA und *cenG1A*-mRNA in gnathalen NBs.

(A-D) Gezeigt ist die Expression von *Dbx* (A, A'), *unpg-lacZ* (B, B'), *PoxN* (C, C'), *charybde* (*chrB*)-mRNA (D) und *centauriny1A* (*cenG1A*)-mRNA (E) in gnathalen NBs im späten Stadium 11 in Kombination mit den NB-(Subpopulations)markern *svp-lacZ* und *Dpn* bzw. dem Segmentmarker *En* (entsprechend der Beschriftung). Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22. *Dbx*-Expression setzt im mandibularen NB 5-2 vergleichsweise spät ein und ist daher in A/A' noch nicht erkennbar. Siehe Text für weitere Details.

Der *paired-box*-Transkriptionsfaktor **Pox neuro (Poxn)** (Bopp et al., 1989) wird in SOPs der Rumpf- und Gnathalsegmente, sowie spezifisch im NB 2-4 der Rumpfsegmente exprimiert (**Abb. 3-30 C**) (Dambly-Chaudiere et al., 1992; Urbach, 2007). In keinem der gnathalen Neuromere wurde Poxn-Expression in NBs detektiert, was sich durch das Fehlen von NB 2-4 in LB, MX und MN erklärt. Auf Grund der hochspezifischen Expression von Poxn in NB2-4 der Rumpf-Neuromere war das fehlende Poxn-Signal ein wichtiges Kriterium, aufgrund dessen auf das Fehlen dieses NB in gnathalen Neuromeren geschlossen wurde (Urbach et al., 2016).

charybde (chrB) ist ein proapoptotisches Gen, welches im embryonalen ZNS exprimiert wird und für die Kopfentwicklung benötigt wird (Simin et al., 2002; Scuderi et al., 2006). *chrB* wird nicht in Rumpf-NBs, jedoch in einer spezifischen NB-Subpopulation im MN detektiert (stets in NBs 3-5, 4-2, 4-3, 4-4, 5-3 und 5-5; darüber hinaus häufig in NBs 5-6 und 7-1) (**Abb. 3-30 D**) (Urbach et al., 2016). *chrB* zählt somit neben Col, Dac, Gt und *cnc* zu der überschaubaren Gruppe molekularer Marker, die innerhalb des embryonalen VNS ausschließlich in mandibularen NBs exprimiert werden.

Der GTPase-Aktivator ***centaurin Gamma1A (cenG1A)*** wird in NBs exprimiert (Southall und Brand, 2009), wobei das Expressionsmuster bisher nicht genauer untersucht wurde. *cenG1A* konnte in NBs aller Körperabschnitte (Hirn-, Gnathal- und Rumpfneuromere) nachgewiesen werden (siehe Anhang **Abb. 7-3**), wobei das Expressionsmuster in NBs insgesamt recht dynamisch ist (Urbach et al., 2016). Aufgrund dessen konnte *cenG1A* in einigen NBs nicht durchgängig beobachtet werden. Im LB konnte *cenG1A* in bis zu sieben NBs nachgewiesen werden, durchgängig jedoch nur in NBs 4-1, 4-2, 4-3, 4-4 und häufig in NB 3-5; im MX wurde *cenG1A* in NBs 4-2, 7-1 und gelegentlich einem weiteren NB beobachtet; im MN wurde *cenG1A* stets in NBs 4-3, 5-6 und 7-1, sowie in bis zu zwei weiteren NBs detektiert (**Abb. 3-30 E**).

3.2.3.7. Zellstammbaum-Marker

Im folgenden Kapitel wird die Expression von Markern beschrieben welche in definierten NB-Tochterzellen exprimiert werden. Einerseits konnte so die Existenz bestimmter NBs in den Gnathalsegmenten untermauert werden. Andererseits konnte so auf Unterschiede im Entwicklungsmodus vorhandener gnathaler NBs im Vergleich zu Rumpf-NBs geschlossen werden.

Even-skipped (Eve) wird in spezifischen Neuronen exprimiert, welche von NBs 1-1, 3-3, 4-2 und 7-1 gebildet werden. Es handelt sich dabei um die aCC-/pCC- (NB 1-1; Broadus et al., 1995), EL- (NB 3-3; Schmidt et al., 1997), RP2- und U-Neurone (NB 4-2 bzw. 7-1; Bossing et al., 1996). Bei ***eve^{RRK}-Gal4*** und ***CQ2-Gal4*** handelt es sich jeweils um transgene Konstrukte, welche Gal4 unter Kontrolle von definierten Anteilen des *eve*-Enhancers exprimieren. Dabei wird *eve^{RRK}-Gal4* Gal4 spezifisch in den aCC-/pCC- und RP2-Neuronen (Baines et al., 1999; Fujioka et al., 2003), und *CQ2-Gal4* in den U-Neuronen exprimiert (Landgraf et al., 2003).

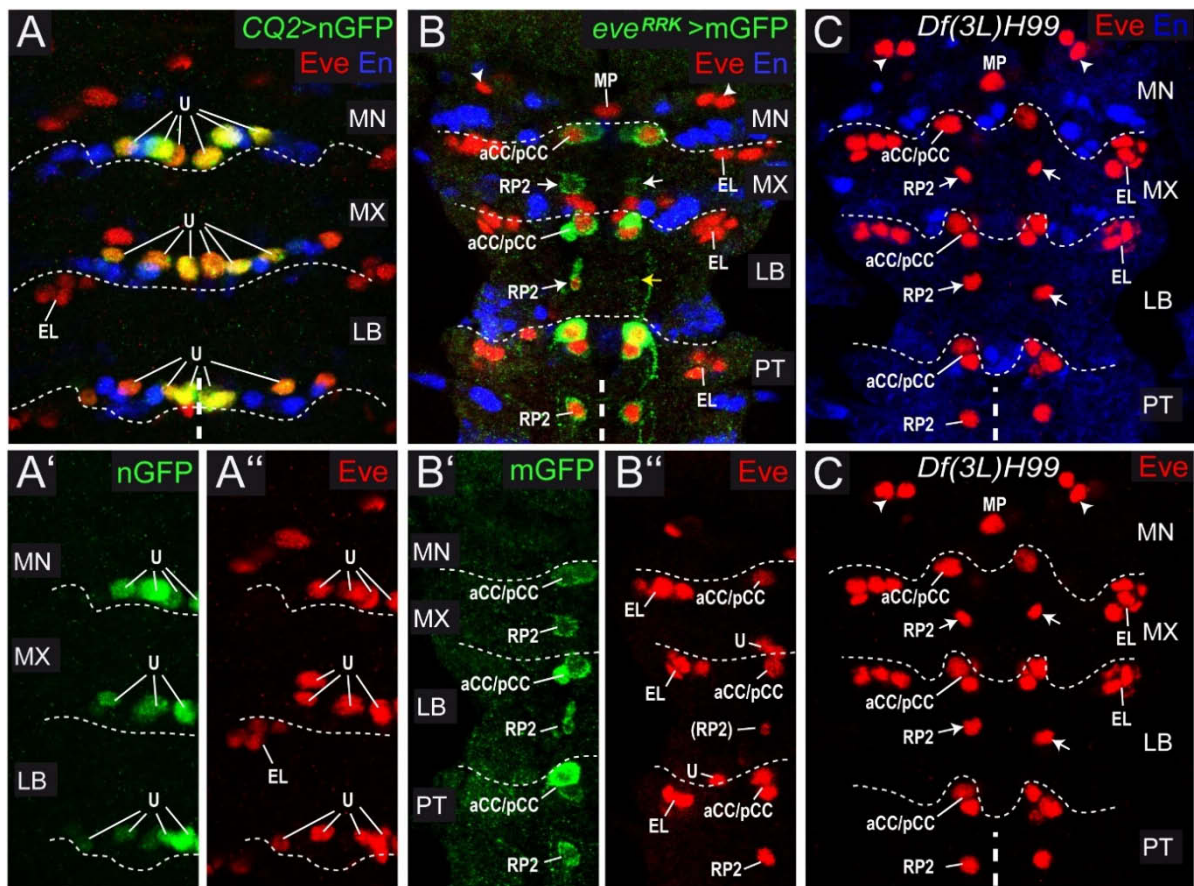


Abb. 3-31: Expression der Zellstammbaummarker Even-skipped, *eve^{RRK}*-Gal4 und *CQ2*-Gal4 in Nachkommenzellen gnathaler NBs

Gezeigt ist die Expression von *CQ2*-Gal4 (visualisiert durch Kombination mit *UAS-nGFP*; *CQ2>nGFP*) (A, A'), *eve^{RRK}*-Gal4 (visualisiert durch Kreuzung mit membranständigem GFP; *eve^{RRK}>mGFP*) (B, B') und Even-skipped (Eve) (A, A', B, B', C, C') in Filetpräparationen des ZNS in Stadium 15 des Wildtyp (A, B) und apoptosedefizienten *Df(3L)H99*-Embryonen (C) (jeweils in Kombination mit dem Segmentmarker En). A'/B' und A''/B'' = linke Hemineuromere aus A/B. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22 (A) *CQ2>nGFP* ist in den Eve-positiven, von NB 7-1 abstammenden U-Neuronen (U) exprimiert, welche in MN, MX und LA detektiert werden können. Eve ist darüber hinaus in EL-, aCC/pCC- und RP2-Neuronen exprimiert, welche mit Ausnahme der labialen EL-Neurone (EL) nicht im Fokus liegen (siehe B). (B) *eve^{RRK}>mGFP* markiert die von NB1-1 gebildeten aCC/pCC-Neurone (aCC/pCC), welche im MN nicht beobachtet wurden, sowie die von NB4-2 gebildeten RP2-Neurone (RP2; Pfeile in B), welche in MX und LB häufig fehlen (gelber Pfeil), kein Eve exprimieren (siehe MX) und/oder morphologische Zeichen von Apoptose zeigen (linkes Hemineuromer im MN). RP2-Neurone können im MN nicht beobachtet werden. Eve ist darüber hinaus in den von NB 3-3 gebildeten EL-Neuronen (EL), in den von NB 7-1 gebildeten U-Neuronen (außerhalb des Fokus; siehe A) exprimiert, sowie in einer Gruppe von Zellen unbekannter Herkunft im MN (weißer Pfeilkopf). (C) In Apoptose-defizienten *Df(3L)H99*-Embryonen sind RP2-Neurone in MX und LB stets in normaler Morphologie zu beobachten, was deren Degeneration durch Apoptose im Wildtyp bestätigt.. Siehe Text und Tab. 3-3 für weitere Details.

eve^{RRK}- und *CQ2*-Aktivität wurde unter Verwendung des Gal4/UAS-Systems durch Expression von membranständigem CD8::GFP (*eve^{RRK}>mGFP*) bzw. nukleär-lokalisiertem GFP (*CQ2>nGFP*) visualisiert. Auf Grundlage der Expression von Eve, *eve^{RRK}>mGFP* und *CQ2>nGFP* konnten mit aCC/pCC-, EL-, RP2- und U-Neuronen in Stadium 15 Tochterzellen aller vier *eve*-exprimierender NBs 1-1, 3-3, 4-2 und 7-1 in LB und MX beobachtet werden (Abb. 3-31 A,B), was mit der Existenz dieser NBs in LB und MX übereinstimmt. Im MN wurden entsprechend der Existenz von NB 7-1 lediglich U-Neurone beobachtet (Abb. 3-31 A). Darüber hinaus wurde in jedem mandibularen Hemisegment ein laterales, Eve-exprimierendes Cluster unbekannter Herkunft beobachtet (Abb. 3-31 B). Auf Grund der Position könnte es sich bei diesen zwar um EL-Neurone handeln, was jedoch auf Grund des

Fehlens von NB 3-3 im MN unwahrscheinlich ist. aCC/pCC-Neurone wurden im MN entsprechend des Fehlens von NB 1-1 nicht beobachtet.

RP2-Neurone wurden im LB und MX in der Regel beobachtet, nie jedoch im MN (**Abb. 3-31 B**), obwohl NB 4-2 auf Grundlage von typischer Position und Markerexpressionsprofil ($Ey^+/Ind^+/hkb-lacZ^+/Run^-$; siehe Kapitel 3.2.2) in jedem dieser Neuomere vorhanden ist (Urbach et al., 2016). Auffällig ist, dass sich RP2-Neurone des LB und MX häufig durch fehlende Eve-Expression (bei bestehender $eve^{RRK}>mGFP$ -Expression) auszeichnen, und in vereinzelt Fällen gänzlich fehlen; zusammen mit der oft aberranten Morphologie stellt dies einen deutlichen Hinweis auf apoptotische Degeneration der RP2-Neurone in LB und MX dar (**Abb. 3-31 B**). Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurde die Eve-Expression in gnathalen Neuomeren Apoptose-defizienter *Df(3L)H99*-Embryonen untersucht und mit wildtypischen Embryonen verglichen (**Abb. 3-31 B, C**). Während im Wildtyp in früheren Stadien (st11-13) stets Eve-exprimierende RP2-Neurone in PT, LB und MX beobachtet wurden (n=40 HS), fehlten diese häufig in LB und MX späterer Stadien (st15/16) (in 59% im LB und 73% im MX; n=22 HS), in welchen sie im PT jedoch stets vorhanden waren. In *Df(3L)H99*-Embryonen wurden RP2-Neurone in PT, LB und MX in st15/16 stets beobachtet (n=22 HS) (**Tab. 3-3**) (**Abb. 3-31 C**). Demnach werden RP2-Neurone im PT, LB und MX regulär gebildet, degenerieren jedoch durch Apoptose segment-spezifisch in LB und MX, und werden im MN, im welchen sie in WT und *Df(3L)H99*-Embryonen nie beobachtet wurden (**Abb. 3-31 B, C**), offenbar von Beginn an nicht gebildet.

Tab. 3-3: Vorkommen von RP2-Neuronen in gnathalen Neuomeren von Wildtyp- und *Df(3L)H99*-Embryonen

	Wildtyp (st11-13)	Wildtyp (st15)	<i>Df(3L)H99</i> (st15)
MN	0%	0%	0%*
MX	100%	27%	100%
LB	100%	41%	100%
PT	100%	100%	100%

n=12 Hemisegmente (HS) (Stadium 11), 12 HS (Stadium 12), 16 HS (Stadium 13), 22 HS (Stadium 15/16) jeweils in Wildtyp; n=22 HS in *Df(3L)H99*. * In wenigen Fällen wurden ektopische, Eve-exprimierende Zellen im MN beobachtet. Da im WT jedoch zu keinem Zeitpunkt RP2-Neurone im MN beobachtet wurden, handelt es sich dabei höchstwahrscheinlich nicht um RP2-Neurone.

Reversed polarity (Repo) ist ein Gliazellmarker (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995). In Stadium 11 lässt sich Repo in Rumpf-Neuomeren im longitudinalen Glioblast (LGB oder LGP von engl. *longitudinal glial precursor*) sowie in glialen Nachkommenzellen der NBs 6-4 und 7-4 detektieren (Schmidt et al., 1997). Auch in LB und MX wurde Repo-Expression an der charakteristischen Position des LGB nachgewiesen und deutet dementsprechend auf dessen Existenz in beiden Neuomeren hin. Darüber hinaus wurden Repo-exprimierende Tochterzellen in LB und MX an Positionen detektiert, die mit Tochterzellen der NBs 6-4 und 7-4 korrespondieren (**Abb. 3-32 A**). Dies bestätigt die zuvor postulierte Existenz beider NBs in diesen Neuomeren. Die Anzahl Repo-exprimierender Zellen im MN war in st11 vergleichsweise gering. Lediglich Tochterzellen des NB 7-4 wurden beobachtet. Das Fehlen weiterer Repo-exprimierender Zellen bestätigt, dass NB 6-4 im MN nicht gebildet wird und ist Hauptindikator für das Fehlen des LGB im MN.

Neben den erwähnten LGB und NBs 6-4/7-4 werden Gliazellen in Rumpf-Neuromeren von NBs 1-1, 1-3, 2-2 5-6 und 2-5 gebildet, welche jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt durch Repo detektiert werden können (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Da für NB 1-3 keine geeigneten molekularen Marker beschrieben sind, konnten dessen Existenz in den gnathalen Neuromeren nicht geklärt werden. Deshalb wurde mit dem Nachweis glialer Nachkommen des NB 1-3 im späten Embryo der Versuch unternommen, das Vorhandensein des NBs zu beurteilen. NB 1-3 bildet embryonale periphere Gliazellen (ePGs), welche aus der ZNS-Anlage heraus migrieren und dabei eng mit peripheren Nerven assoziiert sind (von Hilchen et al., 2008). NB 1-3 bildet zwei ePGs, die durch die Expression von **Mz97-Gal4** charakterisiert sind, welches jedoch auch in einigen von SOPs abstammenden peripheren Gliazellen exprimiert wird (von Hilchen et al., 2008). Mit Hilfe von Fasciclin II (Fas II) wurden periphere Nerven im Kopfbereich visualisiert (**Abb. 3-32 B**). Während der labiale Nerv (LBN) eindeutig verfolgt werden konnte, wurde dies in MX und MN durch die Fusion der maxillaren und mandibularen Nerven zu einem Maxillarnerv (MXN; siehe Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) erschwert. So konnten sowohl an LBN als auch MXN *Mz97-Gal4* exprimierende Gliazellen detektiert werden, wobei die segmentale Zugehörigkeit der ePGs am MXN nicht beurteilt werden konnte (**Abb. 3-32 B**). Da einige *Mz97-Gal4* exprimierende ePGs im Rumpf aus SOPs hervorgehen, die in gnathalen Neuromeren umfangreich gebildet werden (**Abb. 3-22**), konnte neben der segmentalen Zugehörigkeit auch die Abstammung der mit LBN und MXN assoziierten ePGs nicht eindeutig beurteilt werden. Es ist auf Grundlage der Existenz *Mz97-Gal4* exprimierender ePGs an LBN und MXN also möglich, dass NB 1-3 in LB, MX und MN existiert, was jedoch nicht abschließend geklärt werden konnte.

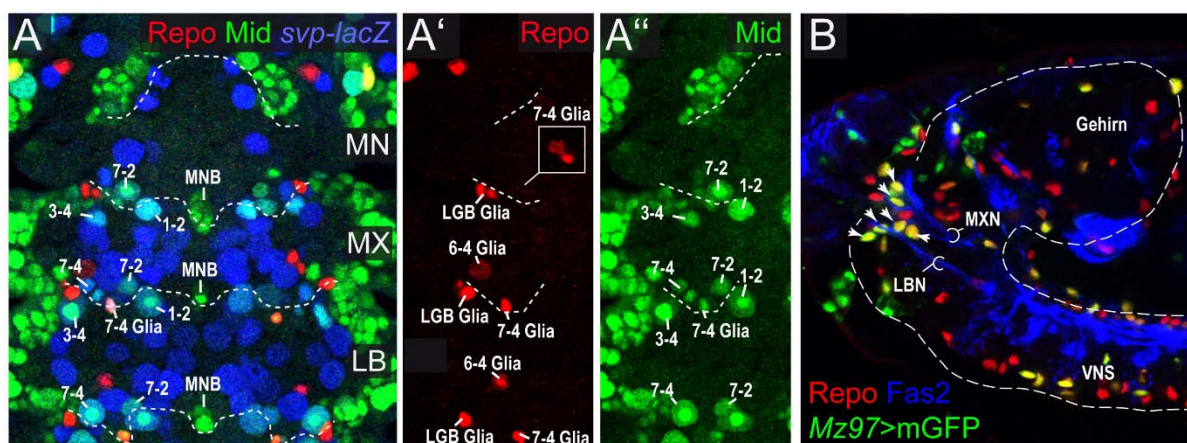


Abb. 3-32: Expression der Gliamarker Reversed Polarity und Mz97-Gal4 in Nachkommenzellen gnathaler Neuro-/Glioblasten

Gezeigt ist die Expression des Gliazellmarkers Reversed-polarity (Repo) im gnathalen Kopfbereich nach Filetpräparation in Stadium 11 (A-A''; für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22) und in der Lateralansicht eines *whole-mount*-Embryos in Stadium 15 (B; anterior = links; ventral = unten) in Kombination mit den jeweils angegebenen Faktoren. (A) Repo wird in glialen Nachkommen von NB 7-4, 6-4 und LGB exprimiert (7-4 Glia, 6-4 Glia und LGB-Glia in A, A'), die durch Position und Co-Markierung von *svp-lacZ* und Midline (A, A'') eindeutig identifiziert werden können. (B) An den Fasziklin2 (*Fas2*)-exprimierenden peripheren Labial- (LBN) und Maxillarnerven (MXN) sind Repo/*Mz97*>nGFP co-exprimierende Gliazellen lokalisiert, welche von NB 1-3 abstammen könnten. Siehe Text für weitere Details.

3.2.4. Der Mittellinienvorläufer MP2 in den gnathalen Neuromeren

Im MN wurden drei Dpn-exprimierende NBs beobachtet (MP2a,b,c), welche unmittelbar unterhalb der „regulären“ NBs lokalisiert sind (**Abb. 3-33 A, B**) und einige Besonderheiten aufweisen. Dazu zählt die kernständige Lokalisation von Prospero (Pros) (**Abb. 3-33 B,C,D; Abb. 3-34 A, A'**), welche im Gegensatz zur NB-typischen kortikalen Pros-Lokalisation steht (**Abb. 3-33 E**) (Spana und Doe, 1995). Zusammen mit der Expression des proneuralen Gens Achaete (Ac) ist die kernständige Pros-Lokalisation charakteristisch für den im Rumpf segmental angelegten Mittellinienvorläufer MP2 (Doe, 1992; Broadus et al., 1995). Es liegt also nahe, dass es sich um MP2-ähnliche Vorläufer handelt, welche spezifisch im MN überzählig angelegt werden. Demnach wurde diese neuartigen NBs als MP2a,b,c bezeichnet (Urbach et al., 2016). Weitere spezifische MP2-Marker wie Odd-skipped (Broadus et al., 1995) und *AJ96-lacZ* (Klaes et al., 1994) wurden in MP2a,b,c jedoch nicht detektiert (**Abb. 3-34 B, C**).

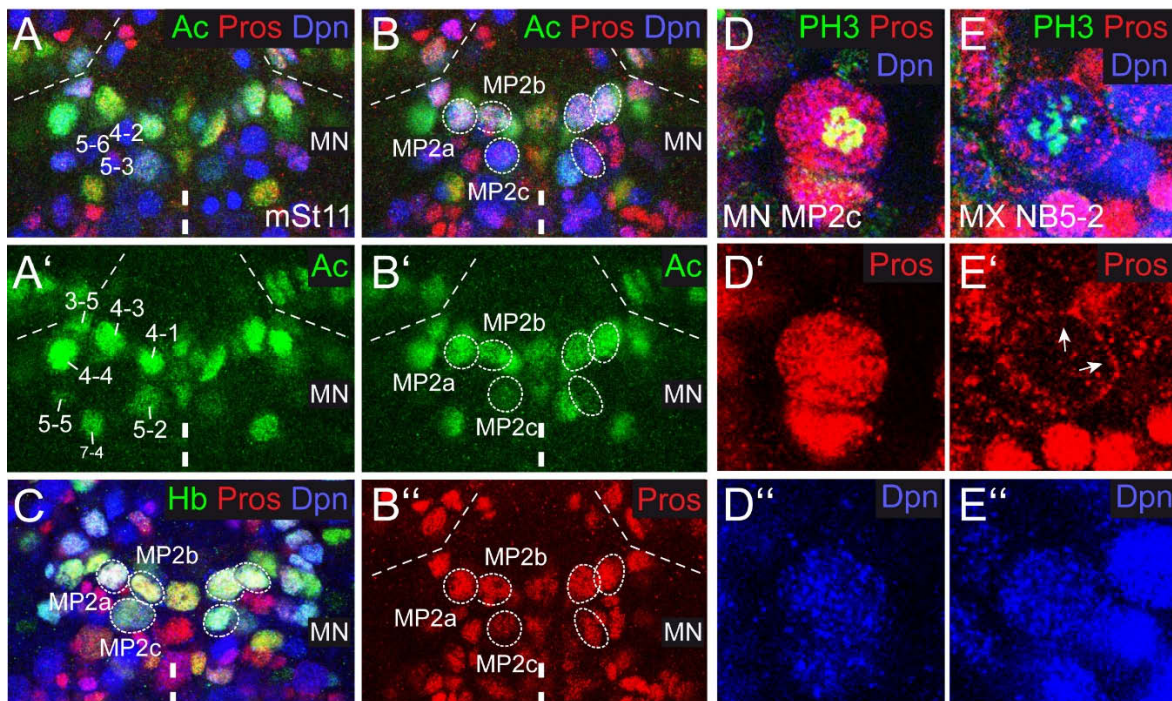


Abb. 3-33: Charakterisierung der MP2-ähnlichen Vorläufer MP2a, MP2b und MP2c im Mandibularsegment.

Gezeigt ist die Expression des NB-Markers Deadpan (Dpn), des proneuralen Gens Achaete (Ac), des Differenzierungsfaktors Prospero (Pros) und des NB-Subpopulationsmarkers Hunchback (Hb) (entsprechend der Beschriftung) im MN des wildtypischen mittleren Stadium 11 (mSt11) nach Filetpräparation (A-C; Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22), sowie im maxillaren NB 5-2 (D) und mandibularen MP2c (E) während der Mitose (beurteilt nach Expression des Mitosemarkers phospho-Histon H3 (PH3)). (A-C) Eine vergleichsweise große NB-Subpopulation exprimiert im MN das proneurale Gen Achaete (Ac) (A', B') (Fokus in B unmittelbar unterhalb der in A dargestellten NBs). Dazu gehört eine Gruppe von NBs mit kernständiger Pros-Lokalisation (MP2a,b,c) (B, B'). MP2a,b,c exprimieren außerdem Hb (C). (D, E) Auch während der Mitose zeigen MP2a,b,c nukleäre Pros-Lokalisation (hier MP2c; D, D'), während andere gnathale NBs (hier NB 5-2 des MX) eine kortikale Pros-Lokalisation ausweisen (E, E'). Dpn-Expression zeigt, dass es sich in beiden Fällen nicht um postmitotische Zellen handelt (D'', E''). Siehe Text für weitere Details.

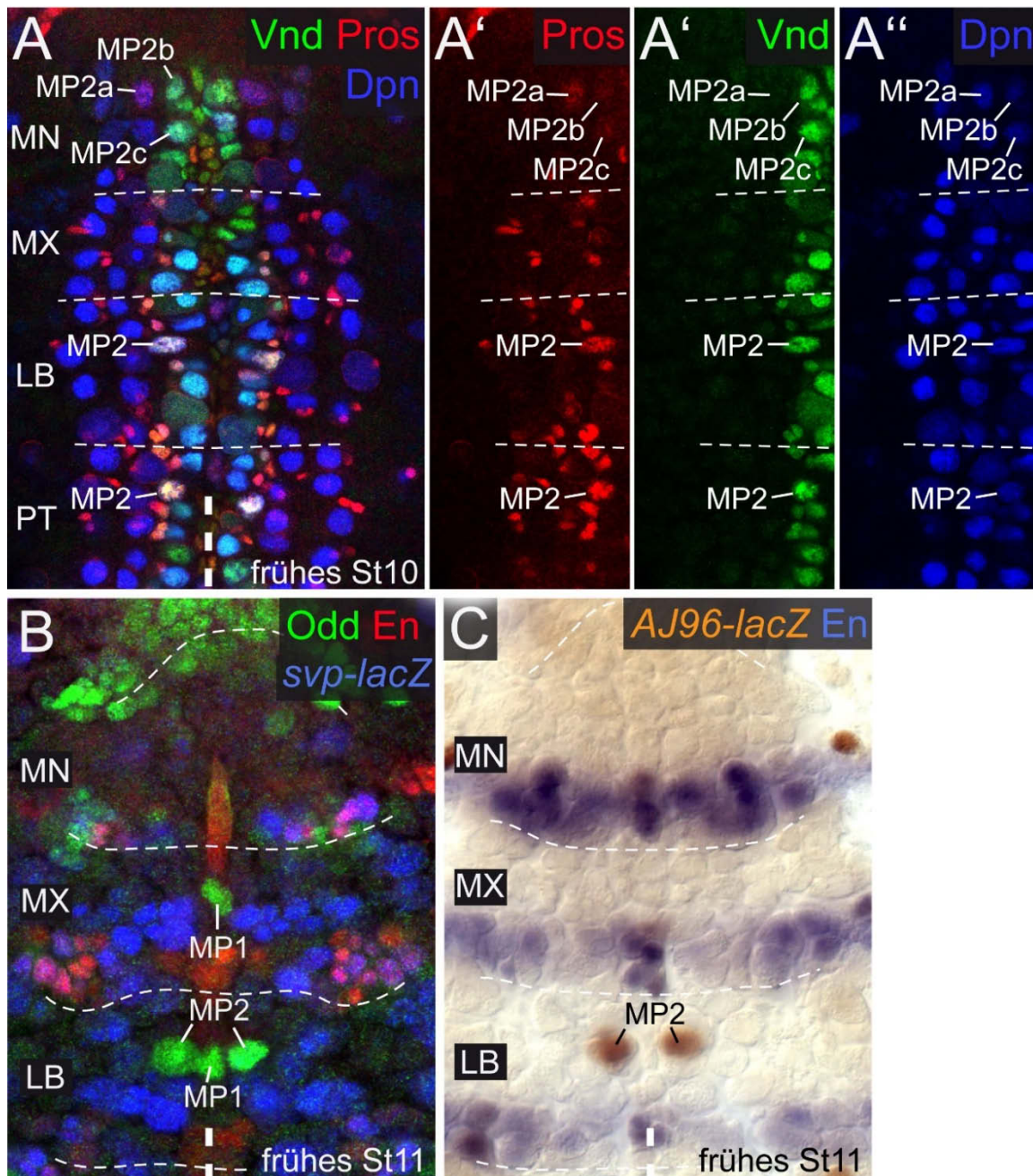


Abb. 3-34: Expression der MP2-Marker Pros, Vnd, Odd und AJ96-lacZ in den gnathalen Neuromeren

Gezeigt ist die Expression der MP2-Marker Vnd, Pros (kernständig), Odd und AJ96-lacZ (Klaes et al., 1994) in Kombination mit den NB(Subpopulations)-Markern Dpn und *svp-lacZ* sowie dem Segmentmarker En in gnathalen Neuromeren des frühen Stadium 10 (St) 10 und 11 (entsprechend der Beschriftung) nach Filetpräparation. Für Orientierung und Abkürzungen siehe Abb. 3-22. (A-C) Beurteilt nach Pros(kernständig) (A, A'), Vnd (A, A'') Odd (B) und AJ96-lacZ wird MP2 im LB an der typischen Position gebildet (vgl. PT), fehlt jedoch im MX. Die mandibularen MP2a,b,c exprimieren nicht die MP2-Marker Odd (B) und AJ96-lacZ (C), und nur die ventralen MP2a,c exprimieren Vnd (A, A''). Im frühen Stadium 10 (kurz nach der Entstehung von MP2a,b,c; siehe Urbach et al., 2016) wird Pros(kernständig) in MP2a,b,c nur schwach exprimiert (vgl. Abb. 3-33). Siehe Text für weitere Details.

Anders als MP2 der Rumpfsegmente sind MP2a,b,c jedoch durch die Expression von Gt und Hb charakterisiert (Abb. 3-28 B; Abb. 3-33 C). Die Homologie von MP2a,b,c des MN zum MP2 der Rumpfsegmente ist daher nicht eindeutig (Urbach et al., 2016). Auch unterscheiden sich MP2a,b,c untereinander und sind nicht als homogene Gruppe anzusehen (z. B. im Bezug auf Vnd-Expression; siehe Abb. 3-34 A, A'').

4. Diskussion

4.1. Funktion und Regulation des EGFR in der frühen Hirnentwicklung

4.1.1. EGFR beeinflusst die Bildung von Hirn-NBs durch Unterdrückung von Apoptose im pNE

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *EGFR*-Mutanten im Laufe der NB-Bildung eine umfangreiche apoptotische Degeneration der Hirnanlage aufweisen. Bereits Dumstrei et al. (1998) haben ähnliche Beobachtungen in Stadium 12 von *EGFR*-Mutanten gemacht und auf Grund der Position degenerierten Zellmaterials an der Oberfläche des Embryos darauf geschlossen, dass das Ektoderm der Hirnanlage von Zelltod betroffen ist. Diese Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Durch die Verwendung des spezifischen NB-Markers Dpn konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die eng mit dem Ektoderm assoziierten NBs in *EGFR*-Mutanten von Apoptose betroffen sind (**Abb. 3-4 F'**). Dennoch zeigen *EGFR*-Mutanten nach Abschluss der NB-Bildung im späten Stadium 11 einen deutlichen Verlust von etwa 40% der Hirn-NBs. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass dieser Verlust Resultat einer Degeneration von Hirn-NBs nach deren Bildung ist. EGFR wird also ausschließlich für die Bildung von Hirn-NBs benötigt, und nicht für deren Überleben. Der Vergleich von *EGFR*-Mutanten mit apoptosedefizienten *EGFR; H99*-Doppelmutanten, in welchen etwa 20-25% der Hirn-NBs nach Abschluss der NB-Bildung fehlen, zeigt, dass 15-20% der Hirn-NBs als Folge apoptotischer Degeneration des pNE nicht gebildet werden. Da die Anzahl apoptotischer Neuroektodermalzellen in der Hirnanlage erst ab dem mittleren/späten Stadium 10 deutlich erhöht ist (**Abb. 3-4**), sind offenbar vornehmlich spät gebildete NBs von apoptoseabhängigen Bildungsdefekten in *EGFR*-Mutanten betroffen. In TC und DC konnten nur geringfügige apoptosebedingte Verluste von Hirn-NBs in *EGFR*-Mutanten beobachtet werden (**Abb. 3-6 C**). Somit betrifft Apoptose in *EGFR*-Mutanten vor Allem die Bildung später NBs des PC, wobei es sich in erster Linie um anteriore und dorsale NBs handelt (Urbach et al., 2003). Dies stimmt räumlich mit der Ausdehnung apoptotischen Neuroektoderms in *EGFR*-Mutanten überein, welches vor Allem das PC, und von diesem insbesondere anteriore und dorsale Anteile umfasst (**Abb. 3-4 F**).

In Mittellinien-Gliazellen wurde beobachtet, dass EGFR-Aktivierung in Abhängigkeit des Liganden Spi die Expression des proapoptotischen Gens Hid reprimiert, und so die Induktion von Apoptose verhindert (Bergmann et al., 2002). Es liegt nahe, dass EGFR auf einem ähnlichen Weg das Überleben von pNE-Zellen sichert. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass die Unterdrückung von Apoptose im pNE durch EGFR nicht bloß von dessen Aktivität, sondern von der Aktivierung durch den EGFR-Liganden Spi abhängt, da Apoptose im pNE von *EGFR*-Mutanten vor Allem in Bereichen des PC beobachtet wurde (anteriores/dorsales PC), in welchen EGFR ausschließlich von Spi aktiviert wird (gemessen an der exklusiven Expression von *rho* im d/iPC und dessen Notwendigkeit, dort EGFR zu aktivieren; siehe **Abb. 3-12**).

4.1.2. EGFR beeinflusst die Ausdehnung des pNE durch die Regulation früher Mitosen

EGFR hat einen positiven Einfluss auf die Proliferation im pNE (**Abb. 3-9**), was mit der Funktion des EGFR in anderen Geweben wie Imaginalscheibenepithelien, Mitteldarmvorläufern und renale Vorläufern der Malphigischen Gefäße übereinstimmt (Schweitzer und Shilo, 1997; Garoia et al., 2005; Marendia et al., 2006; Jiang und Edgar, 2009; Li et al., 2015). Im pNE bilden sich im Vorfeld der NB-Bildung mitotische Domänen aus, wobei es sich um definierte, zusammenhängende Zellgruppen handelt, die zeitgleich mitotisch aktiv werden (Foe, 1989; Urbach et al., 2003). Diese mitotischen Domänen sind im pNE von *EGFR*-Mutanten deutlich reduziert (**Abb. 3-9 B-D**), was zwangsläufig zu einer verringerten Ausdehnung des pNE führt. Die beobachteten Ausfälle mitotischer Aktivität betreffen vor Allem ventrale Anteile der mitotischen Domäne 9 (**Abb. 3-9 B, C**) (vgl. Foe, 1989), welche sich neben dem gesamten DC mutmaßlich über anteriore Anteile des TC und posteriore Anteile des PC erstreckt (Urbach et al., 2003). Dementsprechend konnte in diesen Neuromeren eine EGFR-abhängige Reduktion ventraler NBs beobachtet werden (**Abb. 3-6**). Es liegt also nahe, dass diese Reduktion zum Teil durch eine verringerte Ausdehnung des NE in Folge unterbliebener Zellteilungen verursacht wird, welche durch die resultierende Verkleinerung proneuraler Domänen letztendlich zur Bildung von weniger NBs führt.

In Hirn-NBs scheint EGFR jedoch keinen Einfluss auf die mitotische Aktivität zu nehmen, da die ektopische, pan-neurale Expression des EGFR-Liganden Spi den relativen Anteil proliferierender NBs nicht erhöht (**Abb. 3-8 G-I**). Die Funktion des EGFR bei der Proliferationskontrolle in der frühen Hirnanlage ist somit offenbar, ähnlich wie die Regulation von Apoptose (siehe vorheriges Kapitel), auf das pNE beschränkt.

4.1.3. EGFR reguliert die Bildung von Hirn-NBs durch die Expressionskontrolle proneuraler Gene

Die Bildung von Hirn-NBs wird in den embryonalen Anlagen von Gehirn und Bauchmark maßgeblich durch proneurale Genen des *achaete-scute*-Komplexes (AS-C) kontrolliert (Jiménez und Campos-Ortega, 1990; Younossi-Hartenstein et al., 1997). In der Hirnanlage ist *l'sc* das vorherrschende proneurale Gen des AS-C und wird in ausgedehnten proneuralen Domänen in jedem Hirnneuromer exprimiert (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003). EGFR-Aktivität wird während der gesamten NB-Bildungsphase für die Expression von *l'sc* im pNE benötigt (**Abb. 3-8 A-D**). Ein ähnlicher Zusammenhang besteht im larvalen optischen Lobus, wo *l'sc*-Expression ebenfalls von EGFR aktiviert wird (Yasugi et al., 2010). Ausfälle der *l'sc*-Expression im pNE konnten in dieser Arbeit im ventralen TC und DC sowie in der gesamten DV-Ausdehnung des PC von apoptosedefizienten *EGFR; Df(3L)H99*-Doppelmutanten beobachtet werden und sind daher nicht durch apoptotische Degeneration des pNE begründet. Die Ausfälle der *l'sc*-Expression stimmen dabei räumlich mit Defekten in der NB-Bildung überein (**Abb. 3-5 C; Abb. 3-6**). Auf Grund der zentralen Funktion von *l'sc* bei der NB-Bildung ist davon auszugehen, dass ein großer Anteil der fehlenden 20-25% an Hirn-NBs in *EGFR; Df(3L)H99*-Doppelmutanten auf die Reduktion von *l'sc* zurückzuführen ist. Interessanter Weise fördert EGFR

durch die Kontrolle der *I'sc*-Expression nicht nur die Bildung von Hirn-NBs, sondern begrenzt sie auch. Eine verlängerte Aufrechterhaltung der EGFR-Aktivität im pNE verhindert, dass *I'sc*-Expression nach Abschluss der NB-Bildung herunterreguliert wird, was zur Bildung überzähliger Hirn-NBs führt (**Abb. 3-8 E-I**). EGFR ist somit durch die Expressionskontrolle von *I'sc* direkt an der räumlich-zeitlichen Regulation der Bildung von Hirn-NBs beteiligt.

Während der Entwicklung von Hirn und Bauchmark reguliert das DV-Gen *vnd* die Bildung bestimmter ventraler NBs offenbar unabhängig von proneuralen Genen des AS-C (Skeath et al., 1994; Chu et al., 1998; Urbach et al., 2006). Da neben *I'sc* auch die Expression von *vnd* im ventralen PC, DC und TC von *EGFR*-Mutanten reduziert ist (Seibert, 2010), kann man davon ausgehen, dass auch Defekte in der *vnd*-Expression an dem beobachteten Verlust ventraler Hirn-NBs in *EGFR*-Mutanten beteiligt sind.

4.1.4. EGFR wird in mehreren Entwicklungsschritten für die Bildung spezifischer Hirn-NBs benötigt

Es lässt sich festhalten, dass EGFR in mehreren Entwicklungsschritten die Ausdehnung proneuraler Domänen im pNE beeinflusst und so eine zentrale Rolle bei der Bildung von Hirn-NBs spielt (zusammengefasst in **Abb. 4-1**). So fördert EGFR zunächst die Proliferation des frühen pNE und bestimmt auf diesem Weg die Anzahl neuroektodermaler Vorläuferzellen, die später zu proneuralen Domänen rekrutiert werden können. In einem nächsten Schritt beeinflusst EGFR die Ausbildung proneuraler Domänen unmittelbar durch die Expressionskontrolle des proneuralen Gens *I'sc*. Zuletzt verhindert EGFR durch die Unterdrückung von Apoptose im pNE die Degeneration proneuraler Domänen während der fortschreitenden Bildung von Hirn-NBs.

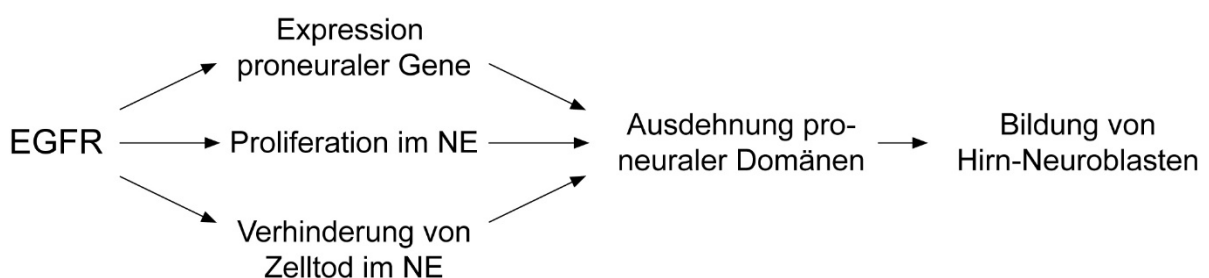


Abb. 4-1: Einfluss von EGFR auf die Bildung von Hirn-NBs

Schematische Zusammenfassung der EGFR-abhängigen Entwicklungsprozesse in der frühen Hirnanlage, welche die Bildung von Hirn-NBs beeinflussen (siehe Text für Details).

Auch im VNS wird EGFR für die Bildung von NBs benötigt. Dennoch unterscheidet sich der Einfluss von EGFR auf die NB-Bildung im VNS und der Hirnanlage. So fehlen im VNS von *EGFR*-Mutanten vor Allem intermediäre NBs, während ventrale NBs in der Regel – wenn auch mis-spezifiziert – gebildet werden (Skeath, 1998). Im Gegensatz dazu wird EGFR in TC und DC für die Bildung ventraler NBs benötigt, während intermediäre (*Ind*-exprimierende) NBs in *EGFR*-Mutanten in normaler Anzahl entstehen (**Abb. 3-6**). Das Fehlen intermediärer NBs im VNS ist zum Teil auf den Ausfall der *ind*-Expression im NE zurückzuführen (Weiss et al., 1998; von Ohlen und Doe, 2000). Zumindest im DC

lässt sich ein vergleichbarer Ausfall der *ind*-Expression beobachten (Seibert, 2010), welcher die Bildung intermediärer NBs dort jedoch nicht beeinflusst (**Abb. 3-6 A-C**). Dass auch im TC von *EGFR*-Mutanten intermediäre NBs in normalem Umfang entstehen entspricht den Erwartungen, da *EGFR* im intermediären TC vor der Induktion von *ind* (und der Bildung intermediärer NBs) herunterreguliert wird (**Abb. 3-1 D, D'**). Anzeichen von Mis-Spezifizierung ventraler und intermediärer NBs konnten im TC und DC von *EGFR*-Mutanten im Gegensatz zum VNS nicht beobachtet werden. So ist die Anzahl intermediärer (Ind-exprimierender) NBs dort nicht verändert, und verbleibende ventrale NBs exprimieren die typischen ventralen Marker *Vnd* und *Dac* in einem erwartungsgemäßen Umfang (**Abb. 3-6 D', E'; Abb. 3-7**).

4.1.5. *EGFR* ermöglicht die Expression von *ind* im DC durch die Phosphorylierung des Co-Repressors Groucho

Zur Aktivierung von *ind* im DC wird sowohl *EGFR*-Aktivität als auch die Phosphorylierung des Co-Repressors Groucho benötigt (**Abb. 3-2**) (Seibert, 2010). Es wurde gezeigt, dass Groucho direkt durch den *EGFR*/MAPK-Signalweg phosphoryliert, und so inaktiviert werden kann (Cinnamon et al., 2008). Diese *EGFR*/MAPK-abhängige Gro-Inaktivierung wird im Rumpf-NE für die Aktivierung von *ind* benötigt (Helman et al., 2011). Das DC ist das einzige Neuromer im gesamten Embryo, in welchem *ind* mit dem Gro-abhängigen Repressor *Vnd* (Yu et al., 2005) co-exprimiert wird (**Abb. 3-2 A**), obwohl *Vnd* die *ind*-expression üblicherweise reprimiert (Weiss et al., 1998). Es liegt auf der Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse also nahe, dass *EGFR* spezifisch im DC den *Vnd*/Gro-Repressorkomplex durch Gro-Phosphorylierung inaktiviert, und so die Expression von *ind* ermöglicht. Interessanter Weise ist *Vnd* im Rumpf trotz der Phosphorylierung von Gro im ventralen (*Vnd*-exprimierenden) NE in der Lage, *ind* effizient zu reprimieren (Weiss et al., 1998; Cinnamon et al., 2008). Es ist bekannt, dass *Vnd* mit unterschiedlichen Co-Repressoren interagieren kann (Zhang et al., 2008). Eine mögliche Erklärung ist daher, dass *Vnd* im Rumpf anstelle von Gro mit anderen, *EGFR*-unabhängigen Co-Repressoren assoziiert ist.

4.1.6. *EGFR*-Aktivität hängt in der embryonalen Hirnanlage von einer segment-spezifischen Verteilung von Liganden ab

EGFR zeigt in der frühen Hirnanlage ein komplexes Aktivierungsmuster (**Abb. 3-1**), welches frühe Neurogeneseprozesse auf segmentspezifische Weise beeinflusst; dazu zählt neben den bereits diskutierten Aspekten die Regulation der DV-Gene im pNE (Seibert, 2010). Da *EGFR* somit einen fundamentalen Schritt zur Entstehung intersegmentaler Unterschiede in der Hirnentwicklung darstellt, wurde dessen segmentspezifische Regulation in der frühen Hirnanlage analysiert. Als Ausgangspunkt diente dabei die recht umfassend erforschte Regulation des *EGFR* im embryonalen VNS.

Im VNS wird EGFR von den Liganden Spi und Vn aktiviert, wobei die Sekretion von Spi durch die Transmembranprotease Rho reguliert wird (Shilo, 2005). Die EGFR-Aktivierung im VNS lässt sich in zwei Phasen unterteilen: eine frühe mittellinienunabhängige und eine darauf folgende mittellinienabhängige Phase (Skeath, 1998). Während der frühen Phase (ab Stadium 5) wird EGFR durch die Expression von *rhomoid* (*rho*) und *vein* (*vn*) im ventralen NE aktiviert (Bier et al., 1990; Schnepf et al., 1996; Skeath, 1998; Udolph et al., 1998). Diese Phase wird maßgeblich vom frühembryonal aktiven Dorsal (DI)-Morphogengradienten reguliert, auf dessen Grundlage *rho* und mutmaßlich *vn* im ventralen NE aktiviert werden (Ip et al., 1992; Stathopoulos et al., 2002; Hong et al., 2008). Auch in der Hirnanlage wird die Expression von *rho* und *vn* vor dem Transkriptionsfaktor Sim (welcher für die Spezifizierung von Mittellinienzellen verantwortlich ist; Nambu et al., 1990) im ventralen pNE induziert (**Abb. 3-10 A, E**). Vermutlich hängt deren Induktion auch im pNE vom DI-Gradienten ab; so ist die Expression eines *rho*-Reporterkonstrukts im ventralen NE nach der Elimination von DI-Bindungsstellen des *rho*-Enhancers entlang der gesamten AP-Achse des Embryos, also im präsumptiven Kopf- und Rumpfbereich, reduziert (Ip et al., 1992).

Ab Stadium 9 wird EGFR im VNS in Abhängigkeit der ventralen Mittellinie aktiviert (Golembo et al., 1996a; Gabay et al., 1997a; Skeath, 1998). In dieser Phase wird *rho* im VNS in Abhängigkeit von Sim ausschließlich in den mesektodermalen Zellen der ventralen Mittellinie exprimiert (Bier et al., 1990; Nambu et al., 1990; Chang et al., 2001). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EGFR im pNE in Stadium 9 größtenteils unabhängig von der ventralen Mittellinie aktiviert wird, was im deutlichen Gegensatz zum VNS steht. Die Expression von *rho* und *vn* ist lediglich im TC auf die ventrale Mittellinie begrenzt und hängt dort von Sim ab (**Abb. 3-19 A-F**). Entsprechend wird auch EGFR lediglich im TC in Abhängigkeit von Sim aktiviert (**Abb. 3-19 G, H**; zusammengefasst in **Abb. 4-2**).

Die EGFR-Aktivität in DC und PC hängt hingegen von Sim-unabhängigen neuroektodermalen Ligandenquellen ab. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der deutliche Einfluss von *vn* auf die EGFR-Aktivität im DC und angrenzenden ventralen PC (**Abb. 3-12 F**), da *vn* im VNS eine untergeordnete Rolle bei der EGFR-Aktivierung spielt (Schnepf et al., 1996; Skeath, 1998; Golembo et al., 1999). Grund dafür ist unter anderem die redundante Funktion von Spi bei der EGFR Aktivierung im vNE, welches einen Verlust von Vn offenbar kompensieren kann und zudem ein inhärent stärkeres EGFR-Aktivierungspotential besitzt (Schnepf et al., 1998; Skeath, 1998; Golembo et al., 1999). Im DC und vPC werden jedoch, gemessen an der überaus geringen *rho*-Expression, nur geringe Mengen an Spi sekretiert, während *vn* umfangreich exprimiert wird (**Abb. 3-10 C, G, M**). Die geringe Spi-Dosis ist dort vermutlich nicht dazu in der Lage, einen Verlust von Vn zu kompensieren, weshalb Vn zur korrekten EGFR-Aktivierung zwingend benötigt wird.

Neben DC und ventralem PC weist auch das dorsale/intermediäre PC einige Besonderheiten bezüglich der EGFR-Ligandenverteilung auf. Im Gegensatz zum übrigen embryonalen ZNS wird im dorsalen/intermediären PC kein *vn* exprimiert (**Abb. 3-10 E-G, M**). Somit wird EGFR im größten Anteil des PC ausschließlich vom *rho*-abhängigen Liganden Spi aktiviert. Die Expressionsstärke von *rho* korreliert dabei jedoch nicht mit der Intensität des MAPK-Signals (**Abb. 3-10 K**). Auf Grundlage der geringen *rho*-Expressionsstärke sollte im anterioren MAPK-Streifen des dorsalen/intermediären PC

nur eine geringe Menge Spi sekretiert werden, was insbesondere angesichts der dort fehlenden *vn*-Expression eine vergleichsweise schwache EGFR-Aktivierung verursachen sollte. Dass EGFR in diesem Bereich dennoch stark aktiviert wird, könnte mit dem Chaperon *Star (S)* zusammenhängen. *S* reguliert den intrazellulären Transport des Spi-Vorläufers in den Golgi-Apparat, wo dieser durch Rho gespalten und sekretiert wird (Tsruya et al., 2002; Urban et al., 2002). Da *S* im anterioren PC außergewöhnlich stark exprimiert wird (**Abb. 3-11 A**), ist davon auszugehen, dass der Spi-Vorläufer in diesem Bereich besonders effizient in den Golgi-Apparat transportiert wird. Die daraus resultierende hohe Verfügbarkeit des Spi-Vorläufers im Golgi-Apparat könnte die geringe *rho*-Expression kompensieren und eventuell sogar zu einer erhöhten Spi-Sekretion führen. Zudem wurde gezeigt, dass auch *S* durch Rho gespalten und so inaktiviert werden kann (Tsruya et al., 2007). Somit kann die geringe *rho*-Expression im anterioren PC paradoxer Weise zu einer gesteigerten Spi-Sekretion führen, indem sie einen effizienten Transport des Spi-Vorläufers durch *S* weiter begünstigt. Obwohl das räumlich/zeitliche Aktivierungsmuster von EGFR also durch die lokalisierte *rho*- und *vn*-Expression bestimmt wird, könnte die Intensität der Rezeptoraktivierung durch die unterschiedlichen Expressionsstärken von *S* und *rho* innerhalb der Hirnanlage beeinflusst werden. Daneben sind vermutlich weitere Faktoren an der Regulation der EGFR-Signalintensität beteiligt. Dazu zählen beispielsweise intrazelluläre Regulatoren des Ras/MAPK-Signalwegs wie Sprouty, Kekkon-1 oder die MAPK-Phosphatase Mkp-3 (Musacchio und Perrimon, 1996; Ghiglione et al., 1999; Kramer et al., 1999; Reich et al., 1999; Kim et al., 2004), welche im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die EGFR-Aktivität in der frühen Hirnanlage von denselben Liganden abhängt wie im VNS (Spi und Vn), welche jedoch in der Hirnanlage auf segment-spezifische Weise in unterschiedlichen Kombinationen aus unterschiedlichen Geweben (NE und/oder Mesektoderm) sekretiert werden (zusammengefasst in **Abb. 4-2**). Im TC wird EGFR durch die Sekretion von Spi und Vn aus der Mittellinie reguliert, was der Situation im VNS ähnelt. Die EGFR-Aktivierung in DC und ventralem PC hängt maßgeblich von Vn, und im dorsalen/intermediären PC ausschließlich von Spi ab, wobei beide Liganden in DC und PC aus dem Neuroektoderm sekretiert werden.

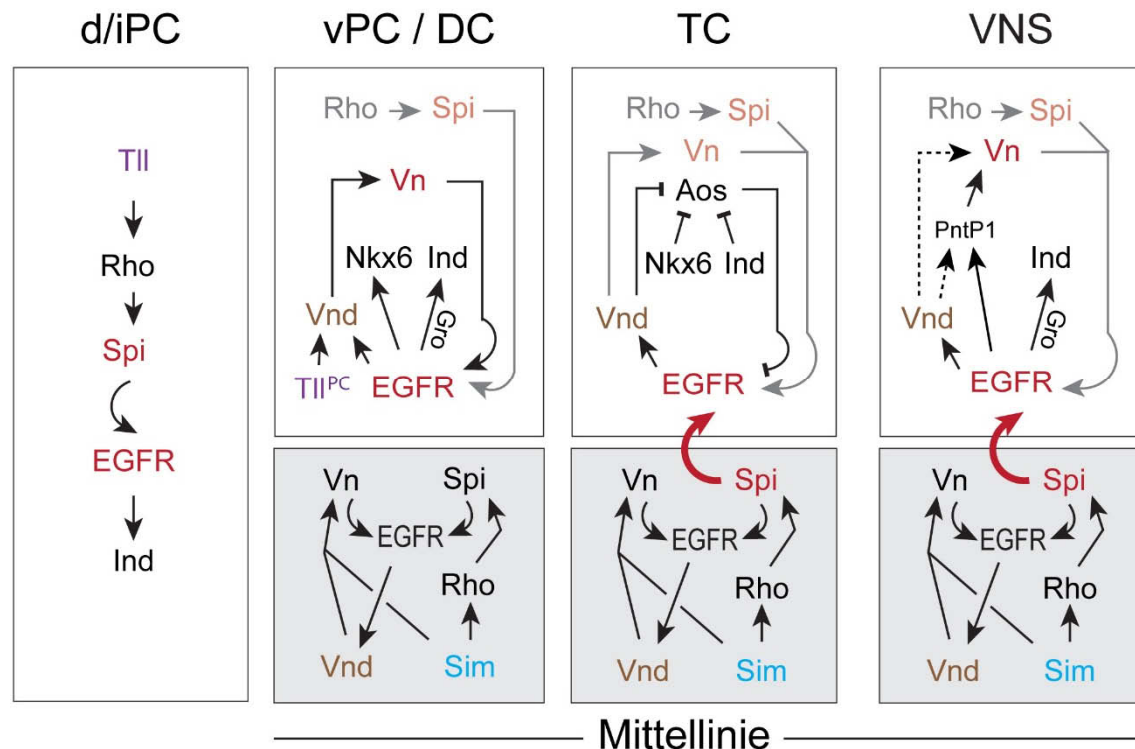


Abb. 4-2: EGFR-Aktivität wird in der Hirnanlage durch ein segment-spezifisches genetisches Netzwerk reguliert

In dieser Studie erarbeitete genetische Interaktionen, welche zur regionalisierten Aktivierung des EGFR im NE des dorsalen/intermediären Protocerebrum (d/iPC), ventralen Protocerebrum und Deutocerebrum (vPC/DC), Tritocerebrum (TC) und ventralen Nervensystem (VNS) führen (weiße Kästen; von links nach rechts). Genetische Interaktionen im jeweils angrenzenden Mesektoderm (=Mittellinie) sind in grauen Kästen dargestellt. Liganden, die zur EGFR-Aktivierung im jeweiligen Hirnabschnitt benötigt werden, sind rot dargestellt. Gebogene Pfeile indizieren sekretierte Faktoren. Faktoren/Liganden, welche für die frühe EGFR-Aktivierungsphase verantwortlich sind, sind in grau/orange dargestellt. Außerdem ist die segment-spezifische Regulation der DV-Gene *vnd*, *ind* und *Nkx6* downstream des EGFR indiziert (siehe Seibert, 2010). EGFR wird in TC, DC und PC unterschiedlich reguliert. Nur in TC und VNS wird EGFR durch die Sekretion von Spi aus der Mittellinie aktiviert, während im vPC/DC die Vnd-abhängige Expression des Liganden Vn im ventralen NE maßgeblich für die Aktivierung des EGFR verantwortlich ist. Im d/iPC hängt EGFR-Aktivität von der Tll-abhängigen Expression des Spi-Aktivators Rho ab. PntP1 reguliert die Expression von Vn im VNS (Golembo et al., 1999). In der Hirnanlage reguliert Vnd die Expression von Vn, wobei der Einfluss von PntP1 unklar ist. Es besteht die Möglichkeit, dass Vnd die Expression von Vn PntP1-abhängig oder -unabhängig reguliert (gestrichelte Pfeile). Siehe Text für weitere Details.

4.1.7. Tailless wird für die Sekretion von EGFR-Liganden aus dem protocerebralen Neuroektoderm benötigt

Das PC ist auf Grundlage der EGFR-Ligandenverteilung in zwei Bereiche zu unterteilen: das vPC, welches überwiegend *vn* exprimiert und das dorsale/intermediäre PC, welches ausschließlich *rho* exprimiert (**Abb. 3-10 M**). Die Expression beider Faktoren hängt vom cephalen Lückengen *tailless* (*tll*) ab (**Abb. 3-18**). Da die EGFR-Aktivität im PC von *tll*⁴⁹-Mutanten in frühen Embryonalstadien gestört ist (siehe Anhang **Abb. 7-1**), wird *tll* dort bereits für die Aktivierung von EGFR benötigt. Dies steht im Gegensatz zur DI-abhängigen EGFR-Aktivierung im übrigen NE (siehe vorheriges Kapitel). *tll* wird im gesamten PC exprimiert, *rho* und *vn* jedoch nur in definierten Anteilen. Demnach werden neben *tll* weitere Faktoren benötigt, welche für die regionalisierte Expression von *rho* und *vn* im PC verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass *tll* die Expression von *vn* nicht direkt, sondern über *vnd* reguliert, welches die *vn*-Expression auf das ventrale NE begrenzt (**Abb. 3-15 A-D; Abb.**

3-18 **D-F**). Im Falle von *rho* konnte jedoch kein Faktor identifiziert werden, welcher für die regionalisierte Expression im dorsalen/intermediären PC verantwortlich ist. Interessanter Weise steht der Einfluss von Tll auf die EGFR-Aktivität im frühen pNE gewissermaßen im Gegensatz zur Funktion von Tll während der Entwicklung des larvalen visuellen Systems. Während Tll für die Expression von *rho* und *vn*, und somit für EGFR-Aktivität im frühen pNE, benötigt wird, blockiert Tll während der Entwicklung des larvalen visuellen Systems die Expression EGFR-Abhängiger Zielgene und hat somit einen negativen Einfluss auf EGFR-abhängige Entwicklungsprogramme (Daniel et al., 1999).

4.1.8. DV-Gene kontrollieren die EGFR-Aktivität durch die Regulation von *vein* und *argos*

Die DV-Gene *vnd*, *ind* und *Nkx6* waren bisher lediglich als Zielgene des EGFR-Signalwegs bekannt, deren regionalisierte Expression in Rumpf-NE und pNE durch EGFR reguliert wird. So ist EGFR notwendig für die Aktivierung der *ind*-Expression (im Rumpf-NE, DC und PC) und für die Aufrechterhaltung der *vnd*- und *Nkx6*-Expression (*vnd* im Rumpf-NE, TC, DC und PC; *Nkx6* in DC und PC) (Gabay et al., 1996; Skeath, 1999; von Ohlen und Doe, 2000; Seibert, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit hat sich jedoch gezeigt, dass die DV-Gene *ind*, *Nkx6* und – allen voran – *vnd* zentrale Regulatoren des EGFR-Signalwegs sind, indem sie die Verteilung aktiver EGFR-Liganden im pNE beeinflussen.

Vnd wird für die Expression von *vn* in allen Hirnneuromeren benötigt (**Abb. 3-15 A-D**). Insbesondere im DC und ventralen PC, wo die EGFR-Aktivierung entscheidend von Vn abhängt (**Abb. 3-12 F**), ist die Aktivierung von EGFR in *vnd*-Mutanten demnach gestört (**Abb. 3-16 A, B**). Auch im embryonalen VNS wird Vnd für die *vn*-Expression im ventralen NE benötigt (siehe Anhang, **Abb. 7-2**). Golembo et al. (1999) haben jedoch demonstriert, dass *vn*-Expression im embryonalen VNS vom EGFR-abhängigen Transkriptionsfaktor PointedP1 (PntP1) abhängt. Da *vnd* im embryonalen VNS von *pntP1*-Mutanten normal exprimiert wird (Gabay et al., 1996), liegt es nahe, dass Vnd und PntP1 parallel für die *vn*-Expression benötigt werden.

Neben *vn* reguliert Vnd auch die Expression des EGFR-Antagonisten *aos* im TC. Vnd ist im frühen Embryo im ventralen und intermediären TC aktiv, wo es für die Aktivierung der DV-Gene *Nkx6* und *ind* benötigt wird (Seibert et al., 2009; Seibert und Urbach, 2010) (**Abb. 3-16 E, H**). Gemeinsam reprimieren Vnd, Ind und *Nkx6* die Expression von *aos* im ventralen und intermediären NE und begrenzen sie so auf das dTC (**Abb. 3-16 B, C, F, I**). Von dort wird Aos sekretiert, um EGFR-Aktivität im angrenzenden intermediären TC zu reprimieren (**Abb. 3-14 C-C'**). Dieser Prozess ist offenbar wichtig für die DV-Musterbildung im TC, da die Expression des DV-Gens *ind* spezifisch im TC von *aos*-Mutanten reduziert ist (**Abb. 3-14 D, E**). Aos bindet den EGFR-Liganden Spi und inaktiviert ihn auf diese Weise (Klein et al., 2004). Durch die Regulation von *aos* und *vn* (siehe oben) nimmt Vnd somit Einfluss auf die Verteilung beider aktivierender EGFR-Liganden (Spi und Vn) im pNE und ist für die korrekte EGFR-Aktivierung in allen Hirnneuromeren notwendig (**Abb. 3-16 A, B**). Da umgekehrt auch

EGFR für die Aufrechterhaltung der *vnd*-Expression in allen Hirnneuromeren benötigt wird (Seibert, 2010), besteht ein positiver *feedback-loop* zwischen EGFR und *vnd*. Somit ist davon auszugehen, dass Vnd über EGFR die Ausdehnung der eigenen Expression stabilisiert. Daneben hängt auch die Expression weiterer DV-Gene von EGFR ab (Ind in DC und PC, Nkx6 in TC, DC) (Seibert, 2010). Da Vnd die Verteilung sekretierter Liganden bestimmt, besteht also die Möglichkeit, dass Vnd die Expression von Ind und Nkx6 über EGFR auf nicht-zellautonome Weise positiv beeinflusst.

4.1.9. Phylogenetische Betrachtung der EGFR-Funktion bei der Musterbildung der Hirnanlage

Die Kernkomponenten des EGFR-Signalwegs sind zwischen *Drosophila* und Vertebraten hoch konserviert (z. B. Urban et al., 2001; Roux und Blenis, 2004; Stein und Staros, 2006). In Vertebraten sind die vier EGFR-Homologe ErbB1-4 bekannt. Die Diversität der EGFR/ErbB-Liganden ist in Vertebraten jedoch deutlich höher. Zu ErbB-Liganden gehören neben Neuregulinen (homolog zu Vein) und TGF α (homolog zu Spi) weitere Liganden wie Amphiregulin (AR), Epiregulin, Betacellulin und Epigen (zusammengefasst in Bogdan und Klambt, 2001; Iwakura und Nawa, 2013). Im embryonalen Vorderhirn von Vertebraten (entspricht dem PC in *Drosophila*; Urbach, 2007) werden die EGFR/ErbB-Liganden TGF α , Neuregulin1 und Neuregulin3 im Antihem exprimiert (Assimacopoulos et al., 2003). Das Antihem ist einem Anteil des Neuroepithels, der zwischen dorsalem und ventralem Telencephalon lokalisiert ist und vermutlich an der dorso-ventralen Musterbildung der Hirnanlage beteiligt ist (Assimacopoulos et al., 2003). Im Neuroepithel (pNE in *Drosophila*) des embryonalen Vorderhirns von Vertebraten und *Drosophila* werden somit homologe EGFR/ErbB-Liganden exprimiert, was eine evolutionär konservierte Regulation und Funktion des EGFR-Signalwegs bei der Musterbildung der Hirnanlage impliziert. Darüber hinaus wird vermutet, dass ErbB an Musterbildungsprozessen im Bereich der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (MHB von engl. *midbrain hindbrain boundary*) beteiligt ist (Nakamura, 2013), wobei es sich vermutlich um eine konservierte Hirnregion handelt, deren Äquivalent im DC von *Drosophila* liegt (Urbach, 2007).

4.2. Identifikation und molekulare Charakterisierung gnathaler Neuroblasten

4.2.1. Die individuelle Charakterisierung embryonaler NBs im ZNS von *Drosophila* wurde durch die Charakterisierung gnathaler NBs vervollständigt

Im Verlauf der letzten 30 Jahre wurde jeder NB der thorakalen und abdominalen Rumpfsegmente (T1-A7), der procephalen Hirnanlage (TC, DC, PC) und der terminalen Abdominalsegmente (A8-A10) durch die Expressionsanalyse molekularer Marker individuell charakterisiert (Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Urbach und Technau, 2003a; Birkholz et al., 2013a). Unter Einbeziehung von Ergebnissen aus dieser Arbeit wurden diese Untersuchungen nun auf die gnathalen Neuromere (LB, MX, MN)

ausgeweitet (Urbach et al., 2016), welche bis zuletzt den einzigen Abschnitt des embryonalen ZNS von *Drosophila* darstellten, in welchem das segmentale Muster und die Identitäten von NBs nicht detailliert beschrieben wurden. Durch die Erfassung gnathaler NBs wurde somit die detaillierte Beschreibung der 2x567 NBs (mit Ausnahme der Vorläufer der Mittellinie und des optischen Lobus) im embryonalen ZNS von *Drosophila* abgeschlossen, wovon nun jeder einzelne durch sein individuelles Expressionsprofil und seine Position innerhalb des Neuromers identifiziert werden kann (Urbach et al., 2016).

4.2.2. Gnathale Neuroblasten sind homolog zu Rumpfneuroblasten, zeigen jedoch Modifikationen in ihrem Entstehungsmuster und Expressionsprofil

In jedem thorakalen/abdominalen Rumpfsegment (T1-A7) wird eine stereotype Population an NBs gebildet, wobei NBs, die an korrespondierenden Stellen dieser Segmente entstehen, vergleichbare Identitäten einnehmen (zusammengefasst in Skeath & Thor, 2003; Technau et al., 2006). Als Anteile des VNS weisen auch die gnathalen Neuromere im Vergleich zu den prägnathalen Hirnneuromeren eine vergleichsweise hohe Ähnlichkeit zu den Rumpfneuromeren auf. In dieser Arbeit wurde die Expression von 32 segmental konservierten Markergenen untersucht, die in spezifischen NB-Subpopulationen der Rumpfneuromere T1-A7 exprimiert werden (siehe Anhang **Tab. 7-1**). Die Analyse dieser Markergene erlaubte es zusammen mit dem jeweiligen Bildungszeitpunkt und der Position des neuroektodermalen Ursprungs, gnathale NBs mit serieller Homologie zu Rumpf-NBs zu identifizieren (Urbach et al., 2016). Auf dieser Grundlage ist jeder gnathale NB als serielles Homolog eines Rumpf-NBs zu betrachten. Lediglich die Identität der mandibularen NBs 5-5 und MP2a,b,c ist auf Grund des stark abgewandelten Expressionsprofils umstritten (Urbach et al., 2016). MP2a,b,c stellen womöglich Duplikationen des MP2 der Rumpfsegmente dar, da beide durch eine kernständige Lokalisation von Pros sowie die Expression des proneuralen Gens *Ac* gekennzeichnet sind (Urbach et al., 2016). Die Expression der typischen MP2-Marker *Odd* und *AJ96-lacZ* fehlt jedoch (**Abb. 3-33 B-D; Abb. 3-34**). Eine vergleichende Analyse der Zellstammbäume bzw. weiterer Marker könnte nützlich sein, um die mutmaßliche Homologie dieser NBs zu untermauern.

Trotz des insgesamt vergleichsweise hohen Homologiegrads sind in den gnathalen NB-Populationen deutliche Abwandlungen vom Grundzustand der Rumpfneuromere zu beobachten. So ist die NB-Anzahl in gnathalen Neuromeren ausgehend vom Prothorakalsegment (T1) von posterior nach anterior sukzessive reduziert (32 NBs in T1; 28-29 NBs in LB; 26-27 NBs in MX und 22 NBs in MN), wobei vornehmlich anteriore NBs von dieser Reduktion betroffen sind (Urbach et al., 2016). Zudem sind die Expressionsprofile der NBs in LB, MX und MN von posterior nach anterior zunehmend modifiziert. So weisen 11 der 28-29 labialen NBs, 14 der 26-27 maxillaren NBs und 17 der 22 mandibularen NBs ein in Bezug auf T1 abgewandeltes Expressionsprofil auf (Urbach et al., 2016). Insgesamt sind 19 der 31 segmental konservierten Markergene durch deren fehlende und/oder ektopische Expression an der Modifikation von Expressionsprofilen gnathaler NBs beteiligt (*AJ96-lacZ*, *btd*, *cas*, *D*, *Dbx*, *H15-lacZ*, *hb*, *kni*, *lbe*, *mid*, *msh*, *Nkx6*, *odd*, *pdm1*, *run*, *slp1*, *svp-lacZ*, *unpg-lacZ*,

wg), während die übrigen 12 Markergene (*eg, ems, en, ey, gsb-d-lacZ, ind, mirr-lacZ, otd, poxn, pros, repo, vnd*) konstant in seriell homologen NBs thorakaler, abdominaler und gnathaler Neuromere exprimiert werden (Urbach et al., 2016).

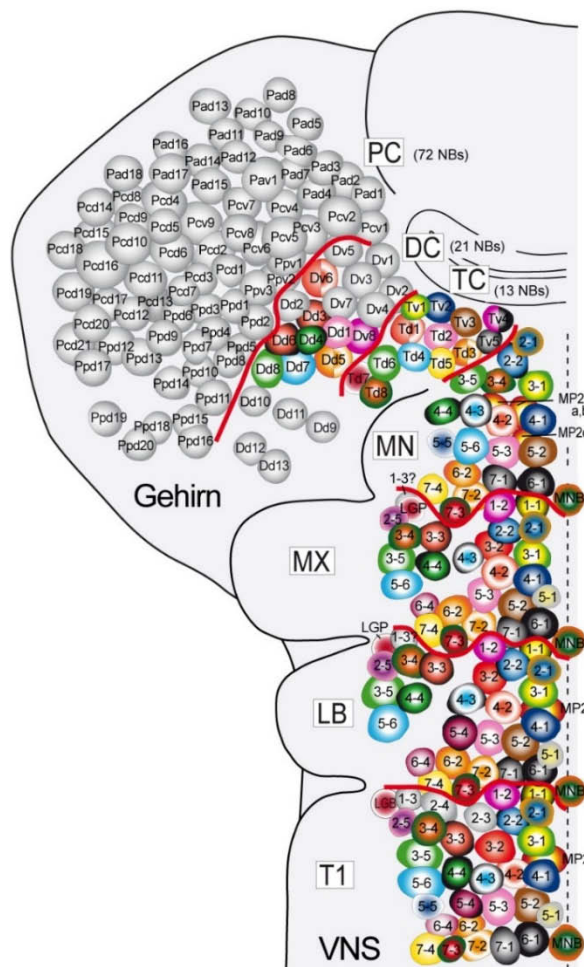


Abb. 4-3: Seriell homologe NBs im embryonalen ZNS von *Drosophila* (aus Urbach et al., 2016).

Schematische Darstellung des embryonalen ZNS nach Filetpräparation. Gezeigt ist die NB-Population linker Hemineuromere der prägnathalen Hirneuromere Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC), der gnathalen Neuromere des Mandibular- (MN), Maxillar- (MX) und Labialsegments (LB) und des Prothorakalsegmentes (T1; entspricht dem Grundzustand). Anterior = oben; gestrichelte Linie = ventrale Mittellinie. Farbcodes indizieren NB-Identitäten, welche auf Grundlage des Markerexpressionsprofils seriell homologe NBs in den gezeigten Neuromeren darstellen. Jeder gnathale NB ist seriell homolog zu einem entsprechenden NB in T1. Jeder tritocerebrale und etwa die Hälfte deutocerebraler NBs sind potentielle serielle Homologe von Rumpf-NBs, wobei manche dieser NBs Ähnlichkeiten zum Markerexpressionsprofil zweier Rumpf-NBs aufweisen (Tv4 ähnelt NB 6-1 und 1-2; Td1 und Dv6 ähneln beide NBs 3-2 und 4-2; Dd5 ähneln NBs 6-2 und 7-2).

Auch in den prä-gnathalen Hirneuromeren und terminalen Abdominalneuromeren lässt sich mit zunehmender Entfernung von Rumpfneuromeren (also in weiter distal gelegenen Neuromeren) eine zunehmende Abweichung vom Grundmuster der segmentalen NB-Population beobachten (Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003a; Birkholz et al., 2013a; Urbach et al., 2016). Im posterioren Hirneuromer TC werden 13 NBs gebildet, welche allesamt auf Grundlage des Expressionsprofils molekularer Marker, Bildungszeitpunkt und Position neuroektodermalen Ursprungs als serielle Homologe von Rumpf-NBs angesehen werden können; im DC weisen hingegen nur ~9 der 21 NBs ein

ähnliches Expressionsprofil zu Gnathal- und Rumpf-NBs auf, und im PC keiner der 72 NBs (**Abb. 4-3**) (Urbach et al., 2016).

Ähnlich wie in den gnathalen Neuromeren weicht auch die segmentale NB-Population der terminalen Abdominalneuomere A8-A10 zunehmend vom Grundzustand ab (Birkholz et al., 2013a). Dort sind NBs in A8, A9 und A10 zunehmend reduziert (31 NBs in A8, 23 NBs in A9, 11 NBs in A10), wobei im Gegensatz zu den gnathalen Neuromeren vornehmlich posteriore NBs von der Reduktion betroffen sind. Auffällig ist, dass bestimmte NBs in gnathalen und terminalen Abdominalneuomeren vornehmlich fehlen, während andere stets gebildet werden: so fehlt NB 2-3 sowohl in den gnathalen Neuromeren (LB, MX und MN) als auch in den terminalen Abdominalneuomeren (A8-A10); mit Ausnahme von A8 gilt gleiches für NB2-4 (Birkholz et al., 2013a; Urbach et al., 2016). Insgesamt sieben NBs werden in jedem Segment des VNS (also LB, MX, MN und T1-A10) gebildet (NBs 2-1, 2-2, 3-4, 3-5, 5-2, 5-3 und 5-6) (für eine zusammenfassende Darstellung der segmentalen NB-Populationen des VNS siehe **Abb. 4-4**; Urbach et al., 2016).

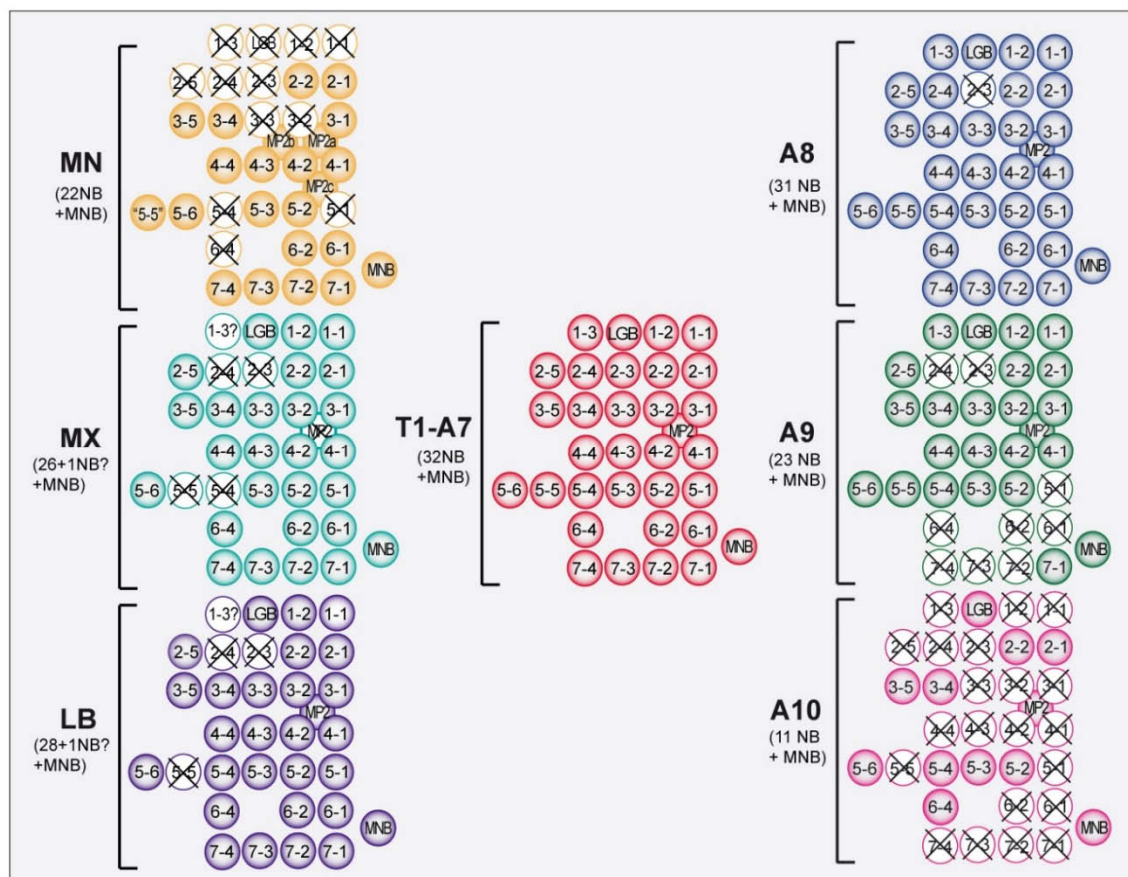


Abb. 4-4: Vergleich der segmentalen NB-Population in Gnathal- und Rumpfneuromeren (aus Urbach et al., 2016)

Schematische Repräsentation der segmentalen NB-Population in den gnathalen Neuromeren MN, MX und LB (links) und der terminalen Abdominalneuomere (A8-A10) im Vergleich zum Grundzustand in den Rumpfneuromeren T1-A7 (Mitte). NBs, welche in dem jeweiligen Neuomer nicht gebildet werden, sind durchgestrichen dargestellt.

Es liegt nahe, dass diese NBs neurale Kernstrukturen des metameren VNS bzw. der gnathalen Neuomere generieren, welche zum Aufbau eines funktionierenden Nervensystems in jedem Segment benötigt werden. Andere NBs generieren offenbar spezifischere Neurone und Gliazellen, welche den lokalen Anforderungen des jeweiligen Segments gerecht werden müssen. Exemplarisch wird dies an NB 2-3 deutlich, welcher als einziger NB lediglich in T1-A7 gebildet wird, in LB, MX, MN

und A8-A10 jedoch fehlt. Schmid et al. (1999) vermuten auf der Grundlage von Morphologie und Projektionsmusters des Zellstammbaums, dass NB 2-3 embryonal angelegte Motorneurone bildet, welche erst im adulten Tier mit der Innervierung der Beine ihre Funktion aufnehmen. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung bildet NB 2-3 in den extremitätenlosen Abdominalsegmenten A1-A7 keine Nachkommen (Schmid et al., 1999; Lacin und Truman, 2016). Der Zellstammbaum von NB 2-3 würde somit eine hochspezifische Funktion erfüllen, welche lediglich in den Thorakalsegmenten benötigt wird und das Fehlen des NB in Gnathal- und terminalen Abdominalsegmenten erklärt.

4.2.3. Neuroblastenzellstammbäume werden in den gnathalen Neuromeren segmentspezifisch modifiziert

Für manche NBs konnte eine beginnende Analyse von Zellstammbaumanteilen durchgeführt werden. In Rumpfsegmenten wurde gezeigt, dass Zellstammbäume segment-spezifisch durch Unterschiede in der Regulation von Proliferation und/oder Apoptose in NBs und Nachkommenzellen modifiziert werden, was maßgeblich durch die Aktivität homöotischer Gene bestimmt wird (zusammengefasst in Technau et al., 2006; Rogulja-Ortmann und Technau, 2008). Auch in den gnathalen Neuromeren konnten segment-spezifische Unterschiede in den Zellstammbäumen am Beispiel des NB 4-2 festgestellt werden (Urbach et al., 2016).

NB 4-2 entsteht in allen gnathalen Neuromeren (Urbach et al. 2016), und bildet in Rumpfsegmenten neben weiteren Motor- und Interneuronen das Eve-exprimierende Motorneuron RP2 (Bossing et al., 1996). RP2 wird auch in LB und MX von NB 4-2 gebildet, vollzieht jedoch in beiden Segmenten Apoptose (Urbach et al., 2016). Im Gegensatz dazu wird RP2 trotz des Vorhandenseins von NB 4-2 im MN nicht gebildet (**Abb. 3-31 B, C**; Urbach et al. 2016). Neben dem charakteristischen Markerexpressionsprofil ($Dpn^+/Ind^+/Ey^+/Pdm1^+/Nkx6^+/hkb-lacZ^+/Slp1^+/btd^+$) zeigt NB 4-2 in den gnathalen Neuromeren segmentspezifische Modifikationen in der Expression von *svp-lacZ* (fehlt im NB 4-2 des MN), *Cas* (wird nur im NB 4-2 des MN exprimiert), *Dfd* (wird nur im NB 4-2 von MX und MN exprimiert), *Scr* (wird nur im NB 4-2 des LB exprimiert) und *cnc* (wird nur im NB 4-2 des MN exprimiert) (**Abb. 3-23 C, Abb. 3-25 C, Abb. 3-29 A, B, D**). Diese Faktoren stellen somit Kandidaten dar, die an der segment-spezifischen des Zellstammbaums von NB 4-2 in den gnathalen Neuromeren beteiligt sein könnten (Urbach et al., 2016). So könnte beispielsweise *Cas* oder *cnc* die Bildung von RP2 im MN unterdrücken oder *svp* zur Bildung von RP2 im MN benötigt werden. Ähnliches gilt für die übrigen Markergene, welche eine auffällige Expression in gnathalen NBs aufweisen. Die durchgeführte Identifikation und molekulare Charakterisierung gnathaler NBs erlaubt es, Zellstammbäume des gnathalen ZNS in Zukunft den zugehörigen NBs zuzuweisen, und die molekularen Mechanismen ihrer segment-spezifischen Entwicklungsmodi zu erforschen.

5. Zusammenfassung/Summary

5.1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Regulation und Funktion der Epidermal growth factor-Rezeptor (EGFR)-Aktivität in der frühen Hirnanlage von *Drosophila* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Aktivierung in den embryonalen Hirn-Neuomeren Trito- (TC), Deuto- (DC) und Protocerebrum (PC) einem dynamischen räumlich/zeitlichen Muster folgt, welches von den aktivierenden EGFR-Liganden Spitz (Spi; homolog zu TGF α in Vertebraten) und Vein (Vn; homolog zu Neuregulinen in Vertebraten), sowie dem Spi-Antagonisten Argos (Aos) abhängt. Es wurde zudem ein genetisches Netzwerk identifiziert, welches die Verteilung dieser Faktoren in der Hirnanlage bewerkstelligt. In diesem kontrollieren der mesektodermale Transkriptionsfaktor *single-minded* (*sim*), das cephalen Lückengen *tailless* (*tll*), sowie die dorsoventralen Musterbildungsgene *ventral nervous system defective* (*vnd*), *intermediate neuroblasts defective* (*ind*) und *Nkx6* die neuomer-spezifisch regionalisierte Expression von *rhomboid* (*rho*; katalysiert die Sekretion von Spi), *vn* und *aos* im procephalen Neuroektoderm (pNE) und Mesktoderm der Hirnanlage. EGFR wird dabei im TC maßgeblich in Abhängigkeit der *sim*-exprimierenden ventralen Mittellinie aktiviert, während die EGFR-Aktivierung in DC und PC von neuroektodermalen Ligandenquellen abhängt.

Um Funktionen des EGFR in der frühen Hirnentwicklung zu identifizieren, wurden zudem frühe Neurogeneseprozesse in der embryonalen Hirnanlage nach Funktionsverlust und Überaktivierung des EGFR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass EGFR Apoptose im pNE unterdrückt, und zugleich einen positiven Einfluss auf Proliferation und Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* (*l'sc*) in Neuroektodermalzellen hat. Auf diesen Wegen kontrolliert EGFR die Bildung von ~40% der Neuroblasten in der Hirnanlage. EGFR stellt somit einen zentralen Regulator der frühen Hirnentwicklung dar, welcher entscheidende Entwicklungsschritte auf neuomerspezifische Weise beeinflusst.

Im Rahmen eines weiteren Projekts wurde ein Beitrag zur Identifikation und molekularen Charakterisierung von NBs der gnathalen Neuomere geleistet. Die gnathalen Neuomere stellen bis zuletzt den einzigen Abschnitt des embryonalen zentralen Nervensystems dar, in welchem NBs nicht detailliert kartiert wurden. Daher wurde in dieser Arbeit eine Expressionsanalyse von 46 molekularen Markern in gnathalen Neuroblasten durchgeführt. Unter Einbeziehung der dabei gewonnenen Daten konnten alle gnathalen NBs individuell identifiziert und molekular charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die NB-Populationen der Gnathalsegmente (Labial- (LB), Maxillar- (MX) und Mandibularsegment (MN)) aus seriell homologen NBs der thorakalen/abdominalen Rumpfsegmente besteht, deren Anzahl jedoch in LB, MX und MN zunehmend reduziert ist. Insbesondere im MN sind die Markerexpressionsprofile von Neuroblasten im Vergleich zu den Rumpfsegmenten zudem deutlich abgewandelt. Durch die Identifikation und molekulare Charakterisierung gnathaler NBs ist eine Grundlage für wichtige weiterführende Analysen geschaffen worden, wie der detaillierten Analyse gnathaler Zellstambäume oder der Untersuchung serieller und evolutionärer Homologie im gesamten zentralen Nervensystem.

Summary

This work focusses on regulation and function of Epidermal growth factor receptor (EGFR) activity during early brain development of *Drosophila*. It was shown that EGFR is activated in the embryonic brain neuromeres Trito- (TC), Deuto- (DC) and Protocerebrum (PC) in a dynamic spatio/temporal pattern, which relies on the activating EGFR ligands Spitz (Spi; homologous to TGF α in vertebrates) and Vein (Vn; homologous to Neuregulins in vertebrates), and of the Spi-antagonist Argos (Aos). A genetic network was identified, which controls deployment of those factors in the embryonic brain anlage. In that network, the mesectodermal transcription factor *single-minded* (*sim*), the cephalic gap gene *tailless* (*tll*), as well as the dorso-ventral patterning genes *ventral nervous system defective* (*vnd*), *intermediate neuroblasts defective* (*ind*) and *Nkx6* control the regionalized expression of *rhomboid* (*rho*; catalyzes Spi secretion), *vn* and *aos* in the procephalic neuroectoderm (pNE) and mesectoderm of the brain anlage in a neuromere-specific manner. It was shown in that regard, that EGFR activity in the TC depends on *sim*-expressing mesectodermal cells of the ventral midline, while EGFR activity relies on neuroectodermal ligand sources in DC and PC.

Furthermore, early neurogenesis was analyzed in the brain anlagen of genetic EGFR loss-of-function and gain-of-function backgrounds. It was shown, that EGFR is required in to suppress apoptosis in the pNE, while positively influencing proliferation and expression of the proneural gene *lethal of scute* (*l'sc*). That way, EGFR controls formation of ~40% of brain neuroblasts. Therefore, EGFR is a central regulator of early brain development, influencing crucial developmental steps in a neuromere-specific manner.

In the context of a further project, this work contributes to the identification and molecular characterization of neuroblasts in the gnathal neuromeres of *Drosophila*. Until recently, the gnathal neuromeres represented the only part of the embryonic central nervous system, in which neuroblasts were not mapped in detail. Therefore, expression of 46 molecular markers was analyzed in gnathal neuroblasts. Taking the obtained data into account, each gnathal neuroblast was individually identified and molecularly characterized. It was shown, that neuroblast populations of the gnathal segments (Labial (LB), Maxillary (MX) and Mandibular (MN) segments) entirely consist of neuroblasts which can be considered serially homologous to those of the thoracic/abdominal trunk segments T1-A7. Anyway, neuroblast numbers are progressively diminished in LB, MX and MN with regard to trunk segments. Also, marker expression profiles are increasingly modified in neuroblasts of LB, MX and MN with regard to the respective serial homologues in the trunk. Mapping and characterization of gnathal neuroblasts represents a foundation for further studies aiming at the analysis of gnathal cell lineages or the occurrence of serial or evolutionary homology in the entire central nervous system.

6. Referenzen

- Ajuria, L., Nieva, C., Winkler, C., Kuo, D., Samper, N., Andreu, M.J., Helman, A., González-Crespo, S., Paroush, Z.e., Courey, A.J., Jiménez, G.** (2011). Capicua DNA-binding sites are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*. *Development* **138**, 915-924.
- Arendt, D., Nübler-Jung, K.** (1999). Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development* **126**, 2309-2325.
- Assimacopoulos, S., Grove, E.A., Ragsdale, C.W.** (2003). Identification of a Pax6-dependent epidermal growth factor family signaling source at the lateral edge of the embryonic cerebral cortex. *J Neurosci* **23**, 6399-6403.
- Baines, R.A., Robinson, S.G., Fujioka, M., Jaynes, J.B., Bate, M.** (1999). Postsynaptic expression of tetanus toxin light chain blocks synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **9**, 1267-1270.
- Bellen, H.J., Tong, C., Tsuda, H.** (2010). 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat Rev Neurosci* **11**, 514-522.
- Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B.Z., Steller, H.** (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell* **2**, 159-170.
- Bermingham, J.R., Jr., Martinez-Arias, A., Petitt, M.G., Scott, M.P.** (1990). Different patterns of transcription from the two Antennapedia promoters during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **109**, 553-566.
- Bhat, K.M., van Beers, E.H., Bhat, P.** (2000). Sloppy paired acts as the downstream target of wingless in the *Drosophila* CNS and interaction between sloppy paired and gooseberry inhibits sloppy paired during neurogenesis. *Development* **127**, 655-665.
- Bier, E., Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (1990). rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **4**, 190-203.
- Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (1992). deadpan, an essential pan-neural gene in *Drosophila*, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. *Genes Dev* **6**, 2137-2151.
- Birkholz, O., Rickert, C., Berger, C., Urbach, R., Technau, G.M.** (2013a). Neuroblast pattern and identity in the *Drosophila* tail region and role of doublesex in the survival of sex-specific precursors. *Development* **140**, 1830-1842.
- Birkholz, O., Vef, O., Rogulja-Ortmann, A., Berger, C., Technau, G.M.** (2013b). Abdominal-B and caudal inhibit the formation of specific neuroblasts in the *Drosophila* tail region. *Development* **140**, 3552-3564.
- Bogdan, S., Klambt, C.** (2001). Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr Biol* **11**, R292-295.
- Bopp, D., Jamet, E., Baumgartner, S., Burri, M., Noll, M.** (1989). Isolation of two tissue-specific *Drosophila* paired box genes, Pox meso and Pox neuro. *EMBO J* **8**, 3447-3457.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C.Q., Technau, G.M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41-64.
- Brand, A.H., Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Briscoe, J., Ericson, J.** (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 43-49.
- Broadus, J., Skeath, J.B., Spana, E.P., Bossing, T., Technau, G., Doe, C.Q.** (1995). New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **53**, 393-402.
- Brook, W.J., Cohen, S.M.** (1996). Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science* **273**, 1373-1377.

- Buchanan, S.M., Kain, J.S., de Bivort, B.L.** (2015). Neuronal control of locomotor handedness in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 6700-6705.
- Buescher, M., Chia, W.** (1997). Mutations in *lottchen* cause cell fate transformations in both neuroblast and glioblast lineages in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* **124**, 673-681.
- Buescher, M., Hing, F.S., Chia, W.** (2002). Formation of neuroblasts in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by SoxNeuro. *Development* **129**, 4193-4203.
- Buescher, M., Tio, M., Tear, G., Overton, P.M., Brook, W.J., Chia, W.** (2006). Functions of the segment polarity genes *midline* and *H15* in *Drosophila melanogaster* neurogenesis. *Dev Biol* **292**, 418-429.
- Cai, Y., Chia, W., Yang, X.** (2001). A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J* **20**, 1704-1714.
- Campbell, G., Goring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C.Q., Tomlinson, A.** (1994). RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. *Development* **120**, 2957-2966.
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. 2nd ed.
- Castle, W.E.** (1906). INBREEDING, CROSS-BREEDING AND STERILITY IN DROSOPHILA. *Science* **23**, 153.
- Chang, J., Kim, I.O., Ahn, J.S., Kim, S.H.** (2001). The CNS midline cells control the *spitz* class and *Egfr* signaling genes to establish the proper cell fate of the *Drosophila* ventral neuroectoderm. *Int J Dev Biol* **45**, 715-724.
- Choi, Y.J., Lee, G., Park, J.H.** (2006). Programmed cell death mechanisms of identifiable peptidergic neurons in *Drosophila melanogaster*. *Development* **133**, 2223-2232.
- Chu, H., Parras, C., White, K., Jiménez, F.** (1998). Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by *vnd* in *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* **12**, 3613-3624.
- Cinnamon, E., Helman, A., Ben-Haroush Schyr, R., Orfan, A., Jiménez, G., Paroush, Z.e.** (2008). Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in *Drosophila* embryogenesis. *Development* **135**, 829-837.
- Clifford, R., Schüpbach, T.** (1994). Molecular analysis of the *Drosophila* EGF receptor homolog reveals that several genetically defined classes of alleles cluster in subdomains of the receptor protein. *Genetics* **137**, 531-550.
- Condie, J.M., Mustard, J.A., Brower, D.L.** (1991). Generation of anti-Antennapedia monoclonal antibodies and Antennapedia protein expression in imaginal discs. *Drosophila Information Service* **70**.
- Cornell, R.A., Ohlen, T.V.** (2000). *Vnd/nkx*, *ind/gsh*, and *msh/msx*: conserved regulators of dorsoventral neural patterning? *Curr Opin Neurobiol* **10**, 63-71.
- Cowden, J., Levine, M.** (2003). Ventral dominance governs sequential patterns of gene expression across the dorsal-ventral axis of the neuroectoderm in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **262**, 335-349.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibensouda, S., Vincent, A.** (1996). Collier, a novel regulator of *Drosophila* head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr Biol* **6**, 707-718.
- D'Alessio, M., Frasch, M.** (1996). *msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech Dev* **58**, 217-231.
- Dambly-Chaudiere, C., Jamet, E., Burri, M., Bopp, D., Basler, K., Hafen, E., Dumont, N., Spielmann, P., Ghysen, A., Noll, M.** (1992). The paired box gene *pox neuro*: a determinant of poly-innervated sense organs in *Drosophila*. *Cell* **69**, 159-172.
- Daniel, A., Dumstreij, K., Lengyel, J.A., Hartenstein, V.** (1999). The control of cell fate in the embryonic visual system by *atonal*, *tailless* and *EGFR* signaling. *Development* **126**, 2945-2954.
- Davis, R.L.** (2011). Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* **70**, 8-19.

- De Graeve, F., Jagla, T., Daponte, J.P., Rickert, C., Dastugue, B., Urban, J., Jagla, K. (2004). The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells. *Dev Biol* **270**, 122-134.
- del Valle Rodriguez, A., Didiano, D., Desplan, C. (2011). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat Methods* **9**, 47-55.
- Dessaud, E., McMahon, A.P., Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* **3**, S30-37.
- DiNardo, S., Kuner, J.M., Theis, J., O'Farrell, P.H. (1985). Development of embryonic pattern in *D. melanogaster* as revealed by accumulation of the nuclear engrailed protein. *Cell* **43**, 59-69.
- Dittrich, R., Bossing, T., Gould, A.P., Technau, G.M., 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**, 2515-2525.
- Doe, C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855-863.
- Doe, C.Q., Technau, G.M. (1993). Identification and cell lineage of individual neural precursors in the *Drosophila* CNS. *Trends Neurosci* **16**, 510-514.
- Dormand, E.L., Brand, A.H. (1998). Runt determines cell fates in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **125**, 1659-1667.
- Dubois, L., Enriquez, J., Daburon, V., Crozet, F., Lebreton, G., Crozatier, M., Vincent, A. (2007). Collier transcription in a single *Drosophila* muscle lineage: the combinatorial control of muscle identity. *Development* **134**, 4347-4355.
- Dumstrei, K., Nassif, C., Abboud, G., Aryai, A., Aryai, A., Hartenstein, V. (1998). EGFR signaling is required for the differentiation and maintenance of neural progenitors along the dorsal midline of the *Drosophila* embryonic head. *Development* **125**, 3417-3426.
- Dumstrei, K., Wang, F., Shy, D., Tepass, U., Hartenstein, V. (2002). Interaction between EGFR signaling and DE-cadherin during nervous system morphogenesis. *Development* **129**, 3983-3994.
- Foe, V.E. (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**, 1-22.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H., Levine, M. (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *EMBO J* **6**, 749-759.
- Freeman, M., Klämbt, C., Goodman, C.S., Rubin, G.M. (1992). The argos gene encodes a diffusible factor that regulates cell fate decisions in the *Drosophila* eye. *Cell* **69**, 963-975.
- Fregoso Lomas, M., Hails, F., Lachance, J.F., Nilson, L.A. (2013). Response to the dorsal anterior gradient of EGFR signaling in *Drosophila* oogenesis is prepatterned by earlier posterior EGFR activation. *Cell Rep* **4**, 791-802.
- Fujioka, M., Lear, B.C., Landgraf, M., Yusibova, G.L., Zhou, J., Riley, K.M., Patel, N.H., Jaynes, J.B. (2003). Even-skipped, acting as a repressor, regulates axonal projections in *Drosophila*. *Development* **130**, 5385-5400.
- Gabay, L., Scholz, H., Golembo, M., Klaes, A., Shilo, B.Z., Klambt, C. (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Development* **122**, 3355-3362.
- Gabay, L., Seger, R., Shilo, B.Z. (1997a). In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* **277**, 1103-1106.
- Gabay, L., Seger, R., Shilo, B.Z. (1997b). MAP kinase in situ activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **124**, 3535-3541.
- Garoia, F., Grifoni, D., Trotta, V., Guerra, D., Pezzoli, M.C., Cavicchi, S. (2005). The tumor suppressor gene fat modulates the EGFR-mediated proliferation control in the imaginal tissues of *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* **122**, 175-187.

- Gaul, U., Jackle, H.** (1990). Role of gap genes in early *Drosophila* development. *Adv Genet* **27**, 239-275.
- Gendre, N., Luer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G.M., Stocker, R.F.** (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development* **131**, 83-92.
- Ghiglione, C., Carraway, K.L., Amundadottir, L.T., Boswell, R.E., Perrimon, N., Duffy, J.B.** (1999). The transmembrane molecule *kekkon 1* acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* **96**, 847-856.
- Glicksman, M.A., Brower, D.L.** (1988). Expression of the Sex combs reduced protein in *Drosophila* larvae. *Dev Biol* **127**, 113-118.
- Golembo, M., Raz, E., Shilo, B.Z.** (1996a). The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development* **122**, 3363-3370.
- Golembo, M., Schweitzer, R., Freeman, M., Shilo, B.Z.** (1996b). Argos transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development* **122**, 223-230.
- Golembo, M., Yarnitzky, T., Volk, T., Shilo, B.Z.** (1999). Vein expression is induced by the EGF receptor pathway to provide a positive feedback loop in patterning the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Genes Dev* **13**, 158-162.
- Gonzalez, F., Swales, L., Bejsovec, A., Skaer, H., Martinez Arias, A.** (1991). Secretion and movement of wingless protein in the epidermis of the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **35**, 43-54.
- Goulding, S.E., White, N.M., Jarman, A.P.** (2000). *cato* encodes a basic helix-loop-helix transcription factor implicated in the correct differentiation of *Drosophila* sense organs. *Dev Biol* **221**, 120-131.
- Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., O'Connor-Giles, K.M.** (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* **194**, 1029-1035.
- Halter, D.A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S.S., Ito, K., Travers, A.A., Technau, G.M.** (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317-332.
- Hartenstein, V., Campos-Ortega, J.A.** (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* **193**, 308-325.
- Hartmann, B., Hirth, F., Walldorf, U., Reichert, H.** (2000). Expression, regulation and function of the homeobox gene *empty spiracles* in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *Mech Dev* **90**, 143-153.
- Hasson, P., Egoz, N., Winkler, C., Volohonsky, G., Jia, S., Dinur, T., Volk, T., Courey, A.J., Paroush, Z.e.** (2005). EGFR signaling attenuates Groucho-dependent repression to antagonize Notch transcriptional output. *Nat Genet* **37**, 101-105.
- Heberlein, U., Hariharan, I.K., Rubin, G.M.** (1993). Star is required for neuronal differentiation in the *Drosophila* retina and displays dosage-sensitive interactions with Ras1. *Dev Biol* **160**, 51-63.
- Helman, A., Cinnamon, E., Mezuman, S., Hayouka, Z., Von Ohlen, T., Orian, A., Jiménez, G., Paroush, Z.e.** (2011). Phosphorylation of Groucho mediates RTK feedback inhibition and prolonged pathway target gene expression. *Curr Biol* **21**, 1102-1110.
- Homem, C.C.F., Reichardt, I., Berger, C., Lendl, T., Knoblich, J.A.** (2013). Long-term live cell imaging and automated 4D analysis of *drosophila* neuroblast lineages. *PLoS One* **8**, e79588.
- Hong, J.-W., Hendrix, D.A., Papatsenko, D., Levine, M.S.** (2008). How the Dorsal gradient works: insights from postgenome technologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20072-20076.
- Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Bier, E., Levine, M.** (1992). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **6**, 1728-1739.

- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., Doe, C.Q.** (2001). Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* **106**, 511-521.
- Isshiki, T., Takeichi, M., Nose, A.** (1997). The role of the msh homeobox gene during Drosophila neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* **124**, 3099-3109.
- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L.L., Rossler, W., Simpson, J.H., Strausfeld, N.J., Strauss, R., Vosshall, L.B., Insect Brain Name Working, G.** (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron* **81**, 755-765.
- Ito, K., Urban, J., Technau, G.M.** (1995). Distribution, classification, and development of Drosophila glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **204**, 284-307.
- Iwakura, Y., Nawa, H.** (2013). ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* **7**, 4.
- Jagla, K., Jagla, T., Heitzler, P., Dretzen, G., Bellard, F., Bellard, M.** (1997). ladybird, a tandem of homeobox genes that maintain late wingless expression in terminal and dorsal epidermis of the Drosophila embryo. *Development* **124**, 91-100.
- Jiang, H., Edgar, B.A.** (2009). EGFR signaling regulates the proliferation of Drosophila adult midgut progenitors. *Development* **136**, 483-493.
- Jiménez, F., Campos-Ortega, J.A.** (1990). Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of *D. melanogaster*. *Neuron* **5**, 81-89.
- Jiménez, F., Martin-Morris, L.E., Velasco, L., Chu, H., Sierra, J., Rosen, D.R., White, K.** (1995). vnd, a gene required for early neurogenesis of Drosophila, encodes a homeodomain protein. *EMBO J* **14**, 3487-3495.
- Jussen, D., Urbach, R.** (2014). Non-fluorescent RNA in situ hybridization combined with antibody staining to visualize multiple gene expression patterns in the embryonic brain of Drosophila. *Methods Mol Biol* **1082**, 19-35.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S.J., Odenwald, W.F.** (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the Drosophila CNS. *Genes Dev* **12**, 246-260.
- Kammermeier, L., Leemans, R., Hirth, F., Flister, S., Wenger, U., Walldorf, U., Gehring, W.J., Reichert, H.** (2001). Differential expression and function of the Drosophila Pax6 genes eyeless and twin of eyeless in embryonic central nervous system development. *Mech Dev* **103**, 71-78.
- Kandel, E.R., Barres, B.A., Hudspeth, A.J.** (2013). Nerve Cells, Neural Circuitry, and Behaviour, in: Kandel, E.R., Schwartz, J.R., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J. (Eds.), *Principles Of Neural Science*, 5 ed. McGraw-Hill, p. 21.
- Kibbe, W.A.** (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* **35**, W43-46.
- Kiecker, C., Lumsden, A.** (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 553-564.
- Kim, M., Cha, G.-H., Kim, S., Lee, J.H., Park, J., Koh, H., Choi, K.-Y., Chung, J.** (2004). MKP-3 has essential roles as a negative regulator of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway during Drosophila development. *Mol Cell Biol* **24**, 573-583.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H., Klämbt, C.** (1994). The Ets transcription factors encoded by the Drosophila gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149-160.
- Klein, D.E., Nappi, V.M., Reeves, G.T., Shvartsman, S.Y., Lemmon, M.A.** (2004). Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration. *Nature* **430**, 1040-1044.
- Klein, D.E., Stayrook, S.E., Shi, F., Narayan, K., Lemmon, M.A.** (2008). Structural basis for EGFR ligand sequestration by Argos. *Nature* **453**, 1271-1275.

- Kolodkin, A.L., Pickup, A.T., Lin, D.M., Goodman, C.S., Banerjee, U.** (1994). Characterization of Star and its interactions with sevenless and EGF receptor during photoreceptor cell development in *Drosophila*. *Development* **120**, 1731-1745.
- Kosman, D., Small, S., Reinitz, J.** (1998). Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins. *Dev Genes Evol* **208**, 290-294.
- Kramer, S., Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M.A., Hiromi, Y.** (1999). Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* **126**, 2515-2525.
- Kunz, T., Kraft, K.F., Technau, G.M., Urbach, R.** (2012). Origin of *Drosophila* mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *Development* **139**, 2510-2522.
- Lacin, H., Truman, J.W.** (2016). Lineage mapping identifies molecular and architectural similarities between the larval and adult *Drosophila* central nervous system. *Elife* **5**, e13399.
- Lacin, H., Zhu, Y., Wilson, B.A., Skeath, J.B.** (2009). *dbx* mediates neuronal specification and differentiation through cross-repressive, lineage-specific interactions with *eve* and *hb9*. *Development* **136**, 3257-3266.
- Landgraf, M., Jeffrey, V., Fujioka, M., Jaynes, J.B., Bate, M.** (2003). Embryonic origins of a motor system: motor dendrites form a myotopic map in *Drosophila*. *PLoS Biol* **1**, E41.
- Le Dreau, G., Marti, E.** (2012). Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. *Dev Neurobiol* **72**, 1471-1481.
- Lemons, D., McGinnis, W.** (2006). Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* **313**, 1918-1922.
- Li, Z., Liu, S., Cai, Y.** (2015). EGFR/MAPK signaling regulates the proliferation of *Drosophila* renal and nephric stem cells. *J Genet Genomics* **42**, 9-20.
- Lichtneckert, R., Reichert, H.** (2005). Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity (Edinb)* **94**, 465-477.
- Lupo, G., Harris, W.A., Lewis, K.E.** (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 103-114.
- Mardon, G., Solomon, N.M., Rubin, G.M.** (1994). *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473-3486.
- Marenda, D.R., Vrailas, A.D., Rodrigues, A.B., Cook, S., Powers, M.A., Lorenzen, J.A., Perkins, L.A., Moses, K.** (2006). MAP kinase subcellular localization controls both pattern and proliferation in the developing *Drosophila* wing. *Development* **133**, 43-51.
- Markstein, M., Zinzen, R., Markstein, P., Yee, K.-P., Erives, A., Stathopoulos, A., Levine, M.** (2004). A regulatory code for neurogenic gene expression in the *Drosophila* embryo. *Development* **131**, 2387-2394.
- Martinez-Arias, A., Ingham, P.W., Scott, M.P., Akam, M.E.** (1987). The spatial and temporal deployment of *Dfd* and *Scr* transcripts throughout development of *Drosophila*. *Development* **100**, 673-683.
- McDonald, J.A., Doe, C.Q.** (1997). Establishing neuroblast-specific gene expression in the *Drosophila* CNS: *huckebein* is activated by *Wingless* and *Hedgehog* and repressed by *Engrailed* and *Gooseberry*. *Development* **124**, 1079-1087.
- McDonald, J.A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C.Q., Mellerick, D.M.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev* **12**, 3603-3612.
- McGinnis, N., Ragnhildstveit, E., Veraksa, A., McGinnis, W.** (1998). A cap 'n' collar protein isoform contains a selective Hox repressor function. *Development* **125**, 4553-4564.
- Melcher, C., Pankratz, M.J.** (2005). Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biol* **3**, e305.
- Mellerick, D.M., Nirenberg, M.** (1995). Dorsal-ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system of *Drosophila* embryos. *Dev Biol* **171**, 306-316.

- Mettler, U., Vogler, G., Urban, J.** (2006). Timing of identity: spatiotemporal regulation of hunchback in neuroblast lineages of *Drosophila* by Seven-up and Prospero. *Development* **133**, 429-437.
- Moris-Sanz, M., Estacio-Gomez, A., Alvarez-Rivero, J., Diaz-Benjumea, F.J.** (2014). Specification of neuronal subtypes by different levels of Hunchback. *Development* **141**, 4366-4374.
- Moses, C., Helman, A., Paroush, Z., Von Ohlen, T.** (2011). Phosphorylation of Ind by MAP kinase enhances Ind-dependent transcriptional repression. *Dev Biol* **360**, 208-215.
- Musacchio, M., Perrimon, N.** (1996). The *Drosophila* kekkon genes: novel members of both the leucine-rich repeat and immunoglobulin superfamilies expressed in the CNS. *Dev Biol* **178**, 63-76.
- Nakamura, H.** (2013). Midbrain patterning: Isthmus organizer, tectum regionalization and polarity formation in: Rubenstein, J., Rakic, P. (Eds.), *and PNS*. Academic press, pp. 45-60.
- Nambu, J.R., Franks, R.G., Hu, S., Crews, S.T.** (1990). The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* **63**, 63-75.
- Noveen, A., Daniel, A., Hartenstein, V.** (2000). Early development of the *Drosophila* mushroom body: the roles of eyeless and dachshund. *Development* **127**, 3475-3488.
- O'Leary, D.D., Sahara, S.** (2008). Genetic regulation of arealization of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 90-100.
- Paridaen, J.T., Huttner, W.B.** (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep* **15**, 351-364.
- Patel, N.H., Martin-Blanco, E., Coleman, K.G., Poole, S.J., Ellis, M.C., Kornberg, T.B., Goodman, C.S.** (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**, 955-968.
- Pignoni, F., Baldarelli, R.M., Steingrímsson, E., Diaz, R.J., Patapoutian, A., Merriam, J.R., Lengyel, J.A.** (1990). The *Drosophila* gene tailless is expressed at the embryonic termini and is a member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **62**, 151-163.
- Poulson, D.F.** (1950). Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*, in: Demerec, M. (Ed.), *Biology of Drosophila*. John Wiley, New York, pp. 267-274.
- Raz, E., Shilo, B.Z.** (1993). Establishment of ventral cell fates in the *Drosophila* embryonic ectoderm requires DER, the EGF receptor homolog. *Genes Dev* **7**, 1937-1948.
- Rebeiz, M., Posakony, J.W.** (2004). GenePalette: a universal software tool for genome sequence visualization and analysis. *Dev Biol* **271**, 431-438.
- Reich, A., Sapir, A., Shilo, B.** (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* **126**, 4139-4147.
- Rogulja-Ortmann, A., Technau, G.M.** (2008). Multiple roles for Hox genes in segment-specific shaping of CNS lineages. *Fly (Austin)* **2**, 316-319.
- Roux, P.P., Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-344.
- Rudolph, K.M., Liaw, G.J., Daniel, A., Green, P., Courey, A.J., Hartenstein, V., Lengyel, J.A.** (1997). Complex regulatory region mediating tailless expression in early embryonic patterning and brain development. *Development* **124**, 4297-4308.
- Rutledge, B.J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y.N., Perrimon, N.** (1992). The *Drosophila* spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev* **6**, 1503-1517.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.
- Schmid, A., Chiba, A., Doe, C.Q.** (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-4689.

- Schmidt-Ott, U., Technau, G.M.** (1992). Expression of *en* and *wg* in the embryonic head and brain of *Drosophila* indicates a refolded band of seven segment remnants. *Development* **116**, 111-125.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., 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.
- Schnepp, B., Donaldson, T., Grumbling, G., Ostrowski, S., Schweitzer, R., Shilo, B.Z., Simcox, A.** (1998). EGF domain swap converts a *Drosophila* EGF receptor activator into an inhibitor. *Genes Dev* **12**, 908-913.
- Schnepp, B., Grumbling, G., Donaldson, T., Simcox, A.** (1996). *Vein* is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev* **10**, 2302-2313.
- Schweitzer, R., Howes, R., Smith, R., Shilo, B.Z., Freeman, M.** (1995a). Inhibition of *Drosophila* EGF receptor activation by the secreted protein *Argos*. *Nature* **376**, 699-702.
- Schweitzer, R., Shaharabany, M., Seger, R., Shilo, B.Z.** (1995b). Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev* **9**, 1518-1529.
- Schweitzer, R., Shilo, B.Z.** (1997). A thousand and one roles for the *Drosophila* EGF receptor. *Trends Genet* **13**, 191-196.
- Scott, K., Brady, R., Jr., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C., Axel, R.** (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* **104**, 661-673.
- Scott, M.P., Carroll, S.B.** (1987). The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell* **51**, 689-698.
- Scuderi, A., Simin, K., Kazuko, S.G., Metherall, J.E., Letsou, A.** (2006). *scylla* and *charybde*, homologues of the human apoptotic gene RTP801, are required for head involution in *Drosophila*. *Dev Biol* **291**, 110-122.
- Seibert, J.** (2010). Genetische Mechanismen der dorsoventralen Musterbildung im embryonalen Gehirn von *Drosophila*, Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Seibert, J., Urbach, R.** (2010). Role of *en* and novel interactions between *msh*, *ind*, and *vnd* in dorsoventral patterning of the *Drosophila* brain and ventral nerve cord. *Dev Biol* **346**, 332-345.
- Seibert, J., Volland, D., Urbach, R.** (2009). *Ems* and *Nkx6* are central regulators in dorsoventral patterning of the *Drosophila* brain. *Development* **136**, 3937-3947.
- Shao, X., Koizumi, K., Nosworthy, N., Tan, D.-P., Odenwald, W., Nirenberg, M.** (2002). Regulatory DNA required for *vnd/NK-2* homeobox gene expression pattern in neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 113-117.
- Shilo, B.-Z.** (2005). Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development* **132**, 4017-4027.
- Shilo, B.Z.** (2003). Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res* **284**, 140-149.
- Simin, K., Scuderi, A., Reamey, J., Dunn, D., Weiss, R., Metherall, J.E., Letsou, A.** (2002). Profiling patterned transcripts in *Drosophila* embryos. *Genome Res* **12**, 1040-1047.
- 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**, 3301-3312.
- Skeath, J.B.** (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* **21**, 922-931.
- Skeath, J.B., Carroll, S.B.** (1991). Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* **5**, 984-995.
- Skeath, J.B., Carroll, S.B.** (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* **114**, 939-946.

- Skeath, J.B., Carroll, S.B.** (1994). The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J* **8**, 714-721.
- Skeath, J.B., Panganiban, G.F., 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**, 1517-1524.
- Skeath, J.B., Thor, S.** (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 8-15.
- Solanki, N., Wolf, R., Heisenberg, M.** (2015). Central complex and mushroom bodies mediate novelty choice behavior in *Drosophila*. *J Neurogenet* **29**, 30-37.
- Song, Z., McCall, K., Steller, H.** (1997). DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science* **275**, 536-540.
- Southall, T.D., Brand, A.H.** (2009). Neural stem cell transcriptional networks highlight genes essential for nervous system development. *EMBO J* **28**, 3799-3807.
- Spana, E.P., Doe, C.Q.** (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**, 3187-3195.
- Stathopoulos, A., Van Drenth, M., Erives, A., Markstein, M., Levine, M.** (2002). Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell* **111**, 687-701.
- Stein, R.A., Staros, J.V.** (2006). Insights into the evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. *BMC Evol Biol* **6**, 79.
- Strausfeld, N.J., Sinakevitch, I., Brown, S.M., Farris, S.M.** (2009). Ground plan of the insect mushroom body: functional and evolutionary implications. *J Comp Neurol* **513**, 265-291.
- Strauss, R.** (2002). The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 633-638.
- Strauss, R., Heisenberg, M.** (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* **13**, 1852-1861.
- Suzuki, D.T.** (1970). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. *Science* **170**, 695-706.
- Technau, G.M., Berger, C., Urbach, R.** (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn* **235**, 861-869.
- Technau, G.M., Campos-Ortega, J.A.** (1985). Fate-mapping in wild-type *Drosophila melanogaster* II. Injections of horseradish peroxidase in cells of the early gastrula stage. *Roux's Arch Dev Biol* **194**, 196-212.
- Technau, G.M., Rogulja-Ortmann, A., Berger, C., Birkholz, O., Rickert, C.** (2014). Composition of a neuromere and its segmental diversification under the control of Hox genes in the embryonic CNS of *Drosophila*. *J Neurogenet* **28**, 171-180.
- Thomas, J.B., Crews, S.T., Goodman, C.S.** (1988). Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* **52**, 133-141.
- Tracey, W.D., Ning, X., Klingler, M., Kramer, S.G., Gergen, J.P.** (2000). Quantitative analysis of gene function in the *Drosophila* embryo. *Genetics* **154**, 273-284.
- Tsruya, R., Schlesinger, A., Reich, A., Gabay, L., Sapir, A., Shilo, B.-Z.** (2002). Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the *Drosophila* EGF receptor ligand Spitz. *Genes Dev* **16**, 222-234.
- Tsruya, R., Wojtalla, A., Carmon, S., Yogev, S., Reich, A., Bibi, E., Merdes, G., Schejter, E., Shilo, B.-Z.** (2007). Rhomboid cleaves Star to regulate the levels of secreted Spitz. *EMBO J* **26**, 1211-1220.
- Udolph, G., Urban, J., Rüsing, G., Lüer, K., Technau, G.M.** (1998). Differential effects of EGF receptor signalling on neuroblast lineages along the dorsoventral axis of the *Drosophila* CNS. *Development* **125**, 3291-3299.
- Uhler, J., Garbern, J., Yang, L., Kamholz, J., Mellerick, D.M.** (2002). Nk6, a novel *Drosophila* homeobox gene regulated by vnd. *Mech Dev* **116**, 105-116.
- Urbach, R.** (2007). A procephalic territory in *Drosophila* exhibiting similarities and dissimilarities compared to the vertebrate midbrain/hindbrain boundary region. *Neural Dev* **2**, 23.

- Urbach, R., Jussen, D., Technau, G.M.** (2016). Gene expression profiles uncover individual identities of gnathal neuroblasts and serial homologies in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development* **143**, 1290-1301.
- Urbach, R., Schnabel, R., Technau, G.M.** (2003). The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* **130**, 3589-3606.
- Urbach, R., Technau, G.M.** (2003a). Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**, 3621-3637.
- Urbach, R., Technau, G.M.** (2003b). Segment polarity and DV patterning gene expression reveals segmental organization of the *Drosophila* brain. *Development* **130**, 3607-3620.
- Urbach, R., Technau, G.M.** (2004). Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *Bioessays* **26**, 739-751.
- Urbach, R., Volland, D., Seibert, J., Technau, G.M.** (2006). Segment-specific requirements for dorsoventral patterning genes during early brain development in *Drosophila*. *Development* **133**, 4315-4330.
- Urban, S., Lee, J.R., Freeman, M.** (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* **107**, 173-182.
- Urban, S., Lee, J.R., Freeman, M.** (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J* **21**, 4277-4286.
- Venken, K.J., Bellen, H.J.** (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **6**, 167-178.
- Venken, K.J., Simpson, J.H., Bellen, H.J.** (2011). Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron* **72**, 202-230.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J.** (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **31**, 3688-3691.
- von Hilchen, C.M., Beckervordersandforth, R.M., Rickert, C., Technau, G.M., Altenhein, B.** (2008). Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **125**, 337-352.
- von Ohlen, T., Doe, C.Q.** (2000). Convergence of dorsal, dpp, and egfr signaling pathways subdivides the *drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev Biol* **224**, 362-372.
- Von Ohlen, T.L., Moses, C.** (2009). Identification of Ind transcription activation and repression domains required for dorsoventral patterning of the CNS. *Mech Dev* **126**, 552-562.
- Walldorf, U., Gehring, W.J.** (1992). Empty spiracles, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO J* **11**, 2247-2259.
- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jackle, H., Janning, W., Klambt, C.** (2003). FlyMove--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* **19**, 310-311.
- Weiss, J.B., Von Ohlen, T., Mellerick, D.M., Dressler, G., Doe, C.Q., Scott, M.P.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev* **12**, 3591-3602.
- Wheeler, S.R., Stagg, S.B., Crews, S.T.** (2008). Multiple Notch signaling events control *Drosophila* CNS midline neurogenesis, gliogenesis and neuronal identity. *Development* **135**, 3071-3079.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., Steller, H.** (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-683.
- Wurst, G., Hersperger, E., Shearn, A.** (1984). Genetic analysis of transdetermination in *Drosophila*. II. Transdetermination to wing of leg discs from a mutant which lacks wing discs. *Dev Biol* **106**, 147-155.
- Xie, B., Charlton-Perkins, M., McDonald, E., Gebelein, B., Cook, T.** (2007). Senseless functions as a molecular switch for color photoreceptor differentiation in *Drosophila*. *Development* **134**, 4243-4253.

- Xiong, W.C., Okano, H., Patel, N.H., Blendy, J.A., Montell, C.** (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the Drosophila nervous system. *Genes Dev* **8**, 981-994.
- Yagi, Y., Suzuki, T., Hayashi, S.** (1998). Interaction between Drosophila EGF receptor and vnd determines three dorsoventral domains of the neuroectoderm. *Development* **125**, 3625-3633.
- Yasugi, T., Nishimura, T.** (2016). Temporal regulation of the generation of neuronal diversity in Drosophila. *Dev Growth Differ* **58**, 73-87.
- Yasugi, T., Sugie, A., Umetsu, D., Tabata, T.** (2010). Coordinated sequential action of EGFR and Notch signaling pathways regulates proneural wave progression in the Drosophila optic lobe. *Development* **137**, 3193-3203.
- Yeo, S.L., Lloyd, A., Kozak, K., Dinh, A., Dick, T., Yang, X., Sakonju, S., Chia, W.** (1995). On the functional overlap between two Drosophila POU homeo domain genes and the cell fate specification of a CNS neural precursor. *Genes Dev* **9**, 1223-1236.
- Younossi-Hartenstein, A., Green, P., Liaw, G.J., Rudolph, K., Lengyel, J., Hartenstein, V.** (1997). Control of early neurogenesis of the Drosophila brain by the head gap genes *tll*, *otd*, *ems*, and *btd*. *Dev Biol* **182**, 270-283.
- Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Green, P., Hartenstein, V.** (1996). Early neurogenesis of the Drosophila brain. *J Comp Neurol* **370**, 313-329.
- Yu, Z., Syu, L.-J., Mellerick, D.M.** (2005). Contextual interactions determine whether the Drosophila homeodomain protein, Vnd, acts as a repressor or activator. *Nucleic Acids Res* **33**, 1-12.
- Zak, N.B., Shilo, B.Z.** (1990). Biochemical properties of the Drosophila EGF receptor homolog (DER) protein. *Oncogene* **5**, 1589-1593.
- Zhang, H., Syu, L.-J., Modica, V., Yu, Z., Von Ohlen, T., Mellerick, D.M.** (2008). The Drosophila homeodomain transcription factor, Vnd, associates with a variety of co-factors, is extensively phosphorylated and forms multiple complexes in embryos. *FEBS J* **275**, 5062-5073.
- Zhang, Y., Ungar, A., Fresquez, C., Holmgren, R.** (1994). Ectopic expression of either the Drosophila gooseberry-distal or proximal gene causes alterations of cell fate in the epidermis and central nervous system. *Development* **120**, 1151-1161.
- Zhao, G., Skeath, J.B.** (2002). The Sox-domain containing gene *Dichaete/fish-hook* acts in concert with *vnd* and *ind* to regulate cell fate in the Drosophila neuroectoderm. *Development* **129**, 1165-1174.
- Zhao, G., Wheeler, S.R., Skeath, J.B.** (2007). Genetic control of dorsoventral patterning and neuroblast specification in the Drosophila Central Nervous System. *Int J Dev Biol* **51**, 107-115.
- zur Lage, P.I., Jarman, A.P.** (2010). The function and regulation of the bHLH gene, *cato*, in Drosophila neurogenesis. *BMC Dev Biol* **10**, 34.

7. Anhang

7.1. Abbildungen

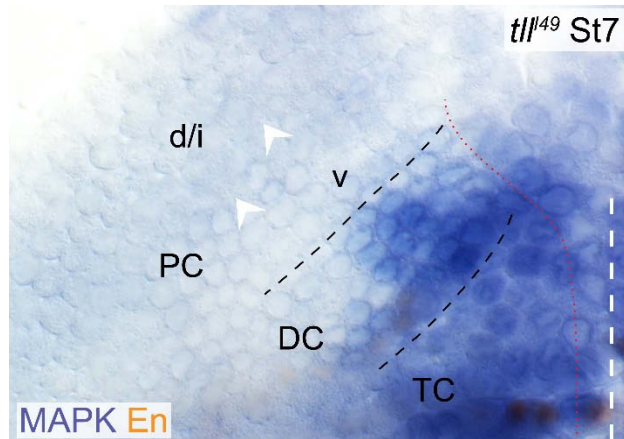


Abb. 7-1: MAPK-Aktivität im frühen PC von *tailless*-Mutanten

Gezeigt ist das MAPK-Aktivierungsmuster in Kombination mit dem Segmentmarker Engrailed (En) in der linken Hirnhemisphäre einer *tll⁴⁹*-Mutante in Stadium 7 (St7) nach Filetpräparation mit Fokus auf das Neuroektoderm. anterior ist oben; schwarz gestrichelte Linien indizieren Segmentgrenzen, rot gepunktete Linie die Grenze zwischen Neuroektoderm und Mesektoderm und die weiß gestrichelte Linie die ventrale Mittellinie. Im wildtypischen Protocerebrum (PC) ist MAPK ab St6 im ventralen (v) NE und in zwei Streifen im dorsalen/intermediären (d/i) NE aktiv (siehe (Abb. 3-1 C)). In *tll⁴⁹*-Mutanten fällt MAPK im vPC und d/iPC (Pfeilspitzen) bereits in St7 aus. Da diese Anteile erst kurz zuvor (spätes Stadium 6) im Wildtyp beobachtet werden können, ist *tll* an der Aktivierung von MAPK im PC beteiligt. DC=Deutocerebrum, TC=Tritocerebrum.

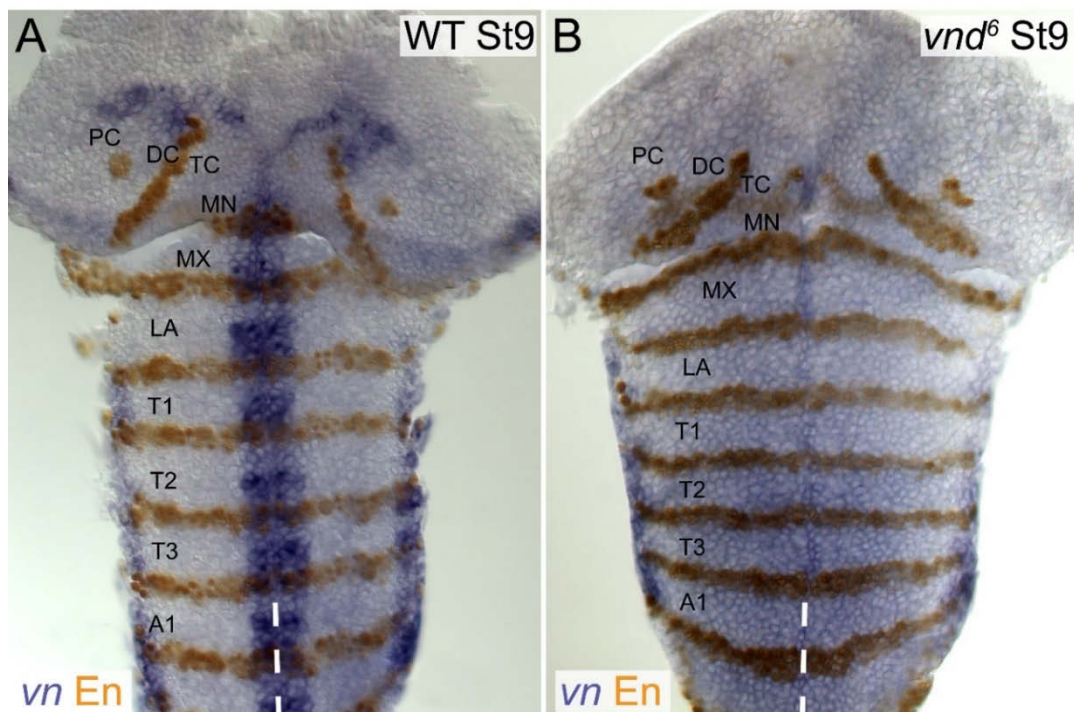


Abb. 7-2: Expression von *vn* in vNE und pNE von *vnd*-Mutanten

Gezeigt ist die *vn*-Expression in Kombination mit dem Segmentmarker En im Kopf- und Rumpf-NE von Wildtyp (WT) und *vnd⁶*-Mutanten. Weiß gestrichelte Linie indiziert die ventrale Mittellinie. (A, B) In *vnd⁶*-Mutanten fällt die *vn*-Expression im gesamten NE der Kopf- und Rumpfneuromere aus (B; vgl. WT in A). PC=Protocerebrum, DC=Deutocerebrum, TC=Tritocerebrum, MN=Mandibularsegment, MX=Maxillarsegment, LA=Labialsegment, T1=Prothorakalsegment, T2=Mesothorakalsegment, T3=Metathorakalsegment, A1=1. Abdominalsegment. A2-A10 sind nicht abgebildet.

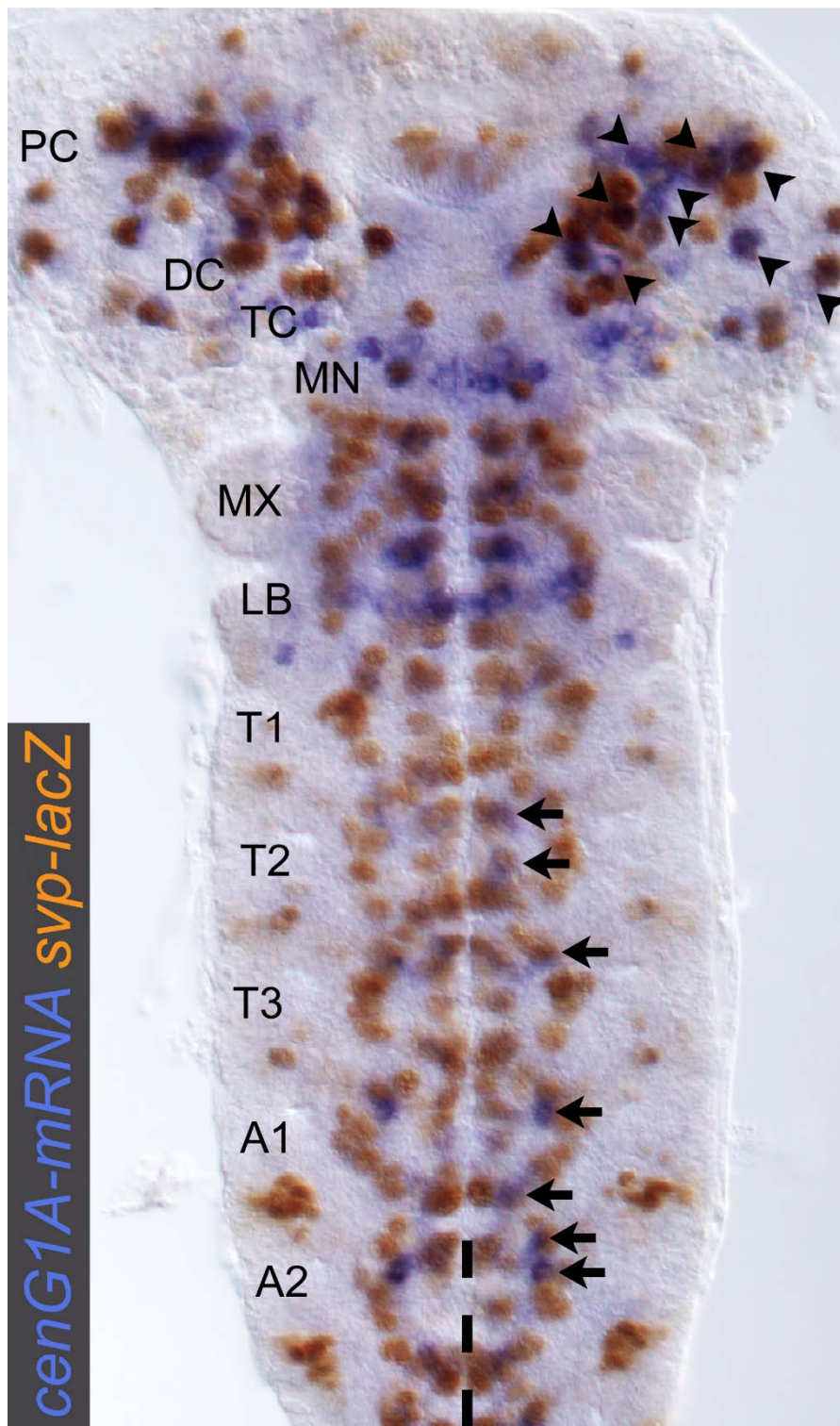


Abb. 7-3: Expression von *cenG1A* im embryonalen ZNS.

Gezeigt ist die Expression von *centaurin* $\gamma 1A$ -mRNA (*cenG1A*; blau) und des Neuroblasten-Subpopulationsmarkers *seven-up-lacZ* (*svp-lacZ*; braun) in einem Embryo des späten Stadium 11 nach Filetpräparation (anterior ist oben, gestrichelte Linie indiziert die ventrale Mittellinie) mit Fokus auf die Neuroblastenschicht. *cenG1A* wird in Neuroblasten der Hirnanlage (PC, DC, TC), der gnathalen Kopfsegmente (MN, MX, LB) und der thorakalen/abdominalen Rumpsegmente exprimiert (Pfeile) (T1-A2; A3-A10 sind präparationsbedingt nicht abgebildet). PC=Protocerebrum, DC=Deutocerebrum, TC=Tritocerebrum, MN=Mandibularsegment, MX=Maxillarsegment, LB=Labialsegment, T1-T3=Thorakalsegmente 1-3 (Pro-, Meso- und Metathorax), A1-A2=Abdominalsegmente 1-2.

7.2. Tabellen

Tab. 7-1: Zur Charakterisierung gnathaler NBs verwendete Marker (nach Urbach et al., 2016)

Markergen	Kategorie	Genprodukt	Klasse	gnathale NBs	Rumpf-NBs	Hirn-NBs
<i>achaete (ac)</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	mRNA	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>AJ96*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	lacZ	-	+	+	-
<i>Antennapedia (Antp)</i>	Homöotische Gene (Kapitel 3.2.3.5)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	-
<i>asense (ase)</i>	Allgemeine NB-Marker	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>buttonhead (btd)*</i>	Lückengene (Kapitel 3.2.3.4)	mRNA	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>cap and collar (cnc)</i>	Homöotische Gene (Kapitel 3.2.3.5)	mRNA	Transkriptionsfaktor	+	-	+
<i>castor (cas)*</i>	Temporale Spezifizierungsfaktoren (Kapitel 3.2.3)	Protein, lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>centaurin gamma 1A (cenG1A)</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	mRNA	GTPase	+	+	+
<i>charybde (chrb)</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	mRNA	?	+	-	+
<i>collier (col, knot)</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	-	+
<i>CQ2</i>	Zellstammbaummarker (Kapitel 3.2.3.7)	Gal4	-	(+)	(+)	-
<i>dachshund (dac)</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	-	+
<i>dbx*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>deadpan (dpn)</i>	Allgemeine NB-Marker (Kapitel 3.2.1)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>Deformed (Dfd)</i>	Homöotische Gene	Protein	Transkriptionsfaktor	+	-	-

Markergen	Kategorie	Genprodukt	Klasse	gnathale NBs	Rumpf-NBs	Hirn-NBs
	(Kapitel 3.2.3.5)					
<i>dichaete (d)*</i>	DV-Gene (Kapitel 3.2.3.2)	mRNA, Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>eagle (eg)*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.2)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>empty spiracles (ems)*</i>	Lückengene (Kapitel 3.2.2)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>engrailed (en)*</i>	Segmentpolaritätsgene (Kapitel 3.2.2)	Protein, lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>even-skipped (eve)</i>	Zellstammbaummarker (Kapitel 3.2.3.7)	Protein	Transkriptionsfaktor	(+)	(+)	-
<i>eve^{RRK}</i>	Zellstammbaummarker (Kapitel 3.2.3.7)	Gal4	-	(+)	(+)	-
<i>eyeless (ey)*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.2)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>giant (gt)</i>	Lückengene (Kapitel 3.2.3.4)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	-	+
<i>gooseberry distal (gsb-d)*</i>	Segmentpolaritätsgene (Kapitel 3.2.3.3)	Protein, lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>H15 (nmr1)*</i>	Segmentpolaritätsgene (Kapitel 3.2.3.3)	Protein, lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>huckebein (hkb)*</i>	Lückengene (Kapitel 3.2.3.4)	lacZ, mRNA	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>hunchback (hb)*</i>	Temporale Spezifizierungsfaktoren (Kapitel 3.2.3)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>intermediate neuroblast defective (ind)*</i>	DV-Gene (Kapitel 3.2.2)	Protein, mRNA	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>knirps (kni)*</i>	Lückengene (Kapitel 3.2.3.4)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>ladybird early (lbe)*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.2)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>midline (mid, nmr2--FlyBase)*</i>	Segmentpolaritätsgene	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+

Markergen	Kategorie	Genprodukt	Klasse	gnathale NBs	Rumpf-NBs	Hirn-NBs
	(Kapitel 3.2.2)					
<i>mirror (mirr)*</i>	Segment-polaritätsgene (Kapitel 3.2.2)	lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>muscle specific homoeobox (msh, drop--FlyBase)*</i>	DV-Gene (Kapitel 3.2.3.2)	Protein, mRNA	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>Mz97</i>	Zellstammbaummarker (Kapitel 3.2.3.7)	Gal4	-	(+)	(+)	n.a.
<i>Nkx6*</i>	DV-Gene (Kapitel 3.2.3.2)	mRNA	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>odd-skipped (odd)*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	-
<i>orthodenticle (otd)*</i>	Lückengene (Kapitel 3.2.3.4)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>pou domain-1 (pdm-1, nub-FlyBase)*</i>	Temporale Spezifizierungsfaktoren (Kapitel 3.2.3)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>pox neuro (pox n)*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	Protein	Transkriptionsfaktor	-	+	+
<i>prospero (pros)*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.4)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	-
<i>reversed polarity (repo)*</i>	Zellstammbaummarker (Kapitel 3.2.3.7)	Protein	Transkriptionsfaktor	(+)	(+)	(+)
<i>runt*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>seven up (svp)*</i>	Temporale Spezifizierungsfaktoren (Kapitel 3.2.2)	lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>Sex comb reduced (Scr)</i>	Homöotische Gene (Kapitel 3.2.3.5)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	-	-
<i>sloppy paired 1 (slp1)*</i>	Lückengene (Kapitel 3.2.3.4)	Protein, mRNA	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>unplugged (unpg)*</i>	Andere Gene (Kapitel 3.2.3.6)	mRNA, lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+

Markergen	Kategorie	Genprodukt	Klasse	gnathale NBs	Rumpf-NBs	Hirn-NBs
<i>ventral nervous system defective (vnd)*</i>	DV-Gene (Kapitel 3.2.3.2)	Protein, mRNA, lacZ	Transkriptionsfaktor	+	+	+
<i>wingless (wg)*</i>	Segmentpolaritätsgene (Kapitel 3.2.3.3)	Protein, lacZ	Sekretierter Ligand	+	+	+
<i>worniu (wor)</i>	Allgemeine NB-Marker (Kapitel 3.2.1)	Protein	Transkriptionsfaktor	+	+	+

* indiziert segmental konservierte Gene, die zur Identifikation seriell homologer NBs verwendet wurden; + indiziert Markerexpression in gnathalen, Rumpf- oder Hirnneuroblasten; (+) indiziert Expression in Zellstammbaumkomponenten von gnathalen, Rumpf- oder Hirnneuroblasten. (Daten stammen aus dieser Arbeit; Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003b, a; Urbach, 2007; Kunz et al., 2012; Urbach et al., 2016)

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Frühe Neurogeneseprozesse in <i>Drosophila</i>	3
Abb. 1-2: Entstehungsmuster und Expressionsprofil von Rumpf-Neuroblasten	5
Abb. 1-3: Regulation der EGFR-Aktivität im embryonalen VNS	6
Abb. 1-4: Embryonalanlagen der prägnathalen und gnathalen Hirnabschnitte in <i>Drosophila</i>	8
Abb. 1-5: Expression molekularer Marker in Hirn-Neuroblasten	10
Abb. 1-6: Expression und regulatorische Interaktion von EGFR und DV-Genen im pNE	11
Abb. 2-1: Filetpräparation von <i>Drosophila</i> -Embryonen (nach Jussen und Urbach 2014).....	39
Abb. 3-1: Wildtypisches MAPK-Aktivierungsmuster im Neuroektoderm der frühen Hirnanlage.....	42
Abb. 3-2: Deutocerebrale <i>ind</i> -Expression in Abhängigkeit der Phosphorylierung des Co-Repressors Groucho.....	44
Abb. 3-3: MAPK-Aktivität in Neuroblasten.....	45
Abb. 3-4: Apoptose in der Hirnanlage von <i>EGFR^{f2}</i> -Mutanten	47
Abb. 3-5: Apoptose-abhängige und -unabhängige Bildung von NBs in <i>EGFR</i> -Mutanten	48
Abb. 3-6: Bildung ventraler und intermediärer NBs in Abhängigkeit von EGFR	50
Abb. 3-7: Bildung des tritocerebralen Neuroblasten Tv2 in <i>EGFR</i> -Mutanten.....	51
Abb. 3-8: Expression des proneuralen Gens <i>lethal of scute</i> in Abhängigkeit von EGFR und NB-Bildung nach EGFR-Überaktivierung.....	53
Abb. 3-9: EGFR-abhängige Kontrolle früher Zellteilungen im pNE	54
Abb. 3-10: Expression von <i>rho</i> und <i>vn</i> im pNE	56
Abb. 3-11: Expression von <i>S</i> und <i>spi</i> im pNE	58
Abb. 3-12: MAPK-Aktivierung im pNE von <i>rho</i> - und <i>vn</i> -Mutanten	59
Abb. 3-13: Expression des EGFR-Antagonisten <i>argos</i> im pNE.....	60
Abb. 3-14: MAPK-Aktivierung und <i>ind</i> -Expression in <i>argos</i> -Mutanten	61
Abb. 3-15: Regulation der <i>vn</i> -Expression durch Vnd und EGFR.....	63
Abb. 3-16: Regulation von <i>aos</i> und EGFR durch DV-Gene	64
Abb. 3-17: Schematisch Zusammenfassung der Regulation von <i>vn</i> und <i>aos</i> im pNE durch DV-Gene.....	65
Abb. 3-18: Regulation der <i>rho</i> - und <i>vn</i> -Expression im PC durch Tailless	67
Abb. 3-19: Regulation der rhomboid- und vein-Expression im procephalen Mesektoderm durch Single-minded.....	69
Abb. 3-20: Regulation der EGFR-Aktivität durch <i>sim</i> im TC und <i>tll</i> im PC.....	70
Abb. 3-21: Expressionsprofile molekularer Marker in gnathalen Neuroblasten (aus Urbach et al., 2016).	73
Abb. 3-22: Expression von Deadpan, Worniu und Cousin of atonal in gnathalen Kopfsegmenten ..	74
Abb. 3-23 Kartierung und Identifikation gnathaler NBs mit Hilfe ausgewählter molekularer Marker.	78
Abb. 3-24 Expression von Col und Dac in mandibularen NBs.	80
Abb. 3-25: Expression von temporalen Spezifizierungsfaktoren in gnathalen NBs.	81
Abb. 3-26: Expression von DV-Genen in gnathalen NBs.	84
Abb. 3-27: Expression von Segmentpolaritätsgenen in gnathalen NBs.	86
Abb. 3-28: Expression von Lückengenen in gnathalen NBs.	88
Abb. 3-29: Expression homöotischer Gene in gnathalen NBs.....	90

Abb. 3-30: Expression von <i>Dbx</i> , <i>unpg-lacZ</i> , <i>Poxn</i> , <i>chrb</i> -mRNA und <i>cenG1A</i> -mRNA in gnathalen NBs.	92
Abb. 3-31: Expression der Zellstammbaummarker Even-skipped, <i>eve^{RRK}</i> -Gal4 und <i>CQ2</i> -Gal4 in Nachkommenzellen gnathaler NBs	94
Abb. 3-32: Expression der Gliamarker Reverserd Polarity und <i>Mz97</i> -Gal4 in Nachkommenzellen gnathaler Neuro-/Glioblasten	96
Abb. 3-33: Charakterisierung der MP2-ähnlichen Vorläufer MP2a, MP2b und MP2c im Mandibularsegment	97
Abb. 3-34: Expression der MP2-Marker <i>Pros</i> , <i>Vnd</i> , <i>Odd</i> und <i>AJ96-lacZ</i> in den gnathalen Neuromeren	98
Abb. 4-1: Einfluss von EGFR auf die Bildung von Hirn-NBs	101
Abb. 4-2: EGFR-Aktivität wird in der Hirnanlage durch ein segment-spezifisches genetisches Netzwerk reguliert	105
Abb. 4-3: Seriell homologe NBs im embryonalen ZNS von <i>Drosophila</i> (aus Urbach et al., 2016).	109
Abb. 4-4: Vergleich der segmentalen NB-Population in Gnathal- und Rumpfneuromeren (aus Urbach et al., 2016)	110
Abb. 7-1: MAPK-Aktivität im frühen PC von <i>tailless</i> -Mutanten	125
Abb. 7-2: Expression von <i>vn</i> in vNE und pNE von <i>vnd</i> -Mutanten	125
Abb. 7-3: Expression von <i>cenG1A</i> im embryonalen ZNS.	126

7.4. Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Liste verwendeter Geräte	19
Tab. 2-2: Liste verwendeter Software	19
Tab. 2-3: Liste verwendeter Balancer	21
Tab. 2-4: Liste verwendeter Fliegenstämme	21
Tab. 2-5: Liste verwendeter RNA-antisense-Sonden	33
Tab. 2-6: Liste verwendeter primärer Antikörper	36
Tab. 2-7: Liste verwendeter sekundärer Antikörper	38
Tab. 2-8: Liste verwendeter Lasertypen und davon angeregter Fluorophore	40
Tab. 3-1: Ausgewählte Marker zur Beschreibung der gnathalen NB-Population	75
Tab. 3-2: Expressionsprofile der Markergene aus Tab. 3-1 in Rumpf-NBs	76
Tab. 3-3: Vorkommen von RP2-Neuronen in gnathalen Neuromeren von Wildtyp- und <i>Df(3L)H99</i> -Embryonen	95
Tab. 7-1: Zur Charakterisierung gnathaler NBs verwendete Marker (nach Urbach et al., 2016)	127

7.5. Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt sind gängige Abkürzungen aus dem Wörterbuch sowie Bezeichnungen chemischer Elemente nach dem Periodensystem.

Gennamen

<i>ac</i>	-	<i>achaete</i>
<i>antp</i>	-	<i>antennapedia</i>
<i>btd</i>	-	<i>buttonhead</i>
<i>cas</i>	-	<i>castor</i>
<i>cato</i>	-	<i>cousin of atonal</i>
<i>CenG1A</i>	-	<i>Centaurin Gamma 1A</i>
<i>chrb</i>	-	<i>charybde</i>
<i>cnc</i>	-	<i>cap'n'collar</i>
<i>D</i>	-	<i>Dichaete</i>
<i>col</i>	-	<i>collier (auch bekannt als knot)</i>
<i>Cy</i>	-	<i>Curly</i>
<i>Dcp-1</i>	-	<i>Drosophila Caspase-1</i>
<i>dfd</i>	-	<i>deformed</i>
<i>dpn</i>	-	<i>deadpan</i>
<i>eg</i>	-	<i>eagle</i>
<i>EGFR</i>	-	<i>epidermal growth factor receptor (auch bekannt als faint little ball)</i>
<i>ems</i>	-	<i>empty-spiracles</i>
<i>en</i>	-	<i>engrailed</i>
<i>eve</i>	-	<i>even-skipped</i>
<i>gro</i>	-	<i>groucho</i>
<i>gt</i>	-	<i>giant</i>
<i>hb</i>	-	<i>hunchback</i>
<i>hkb</i>	-	<i>huckebein</i>
<i>ind</i>	-	<i>intermediate neuroblasts defective</i>
<i>inv</i>	-	<i>invected</i>
<i>kni</i>	-	<i>knirps</i>
<i>lacZ</i>	-	β -galactosidase
<i>lbe</i>	-	<i>ladybird early</i>

<i>l'sc</i>	-	<i>lethal of scute</i>
<i>MAPK</i>	-	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (auch bekannt als <i>rolled</i>)
<i>mid</i>	-	<i>midline</i>
<i>msh</i>	-	<i>muscle segment homeobox</i> (auch bekannt als <i>Drop</i>)
<i>odd</i>	-	<i>odd-skipped</i>
<i>otd</i>	-	<i>orthodenticle</i>
<i>pdm1</i>	-	<i>POU domain transcription factor 1</i> (auch bekannt als <i>nubbin</i>)
<i>Pm</i>	-	<i>Plum</i>
<i>poxn</i>	-	<i>paired box neuro transcription factor</i>
<i>pros</i>	-	<i>prospero</i>
<i>repo</i>	-	<i>reversed polarity</i>
<i>rho</i>	-	<i>rhomboid</i>
<i>S</i>	-	<i>Star</i>
<i>Sb</i>	-	<i>Stubble</i>
<i>sc</i>	-	<i>scute</i>
<i>scr</i>	-	<i>sex combs reduced</i>
<i>sim</i>	-	<i>single-minded</i>
<i>slp1</i>	-	<i>sloppy-paired 1</i>
<i>spi</i>	-	<i>spitz</i>
<i>svp</i>	-	<i>seven-up</i>
<i>tll</i>	-	<i>tailless</i>
<i>unpg</i>	-	<i>unplugged</i>
<i>vn</i>	-	<i>vein</i>
<i>vnd</i>	-	<i>ventral neuroblasts defective</i>
<i>wg</i>	-	<i>wingless</i>
<i>wor</i>	-	<i>worniu</i>

Sonstige Abkürzungen

<i>a</i>	-	anterior
AP	-	Alkalische Phosphatase
AS-C	-	<i>achaete-scute</i> Komplex
ATP	-	Adenosintriphosphat
A1-A10	-	Abdominalsegmente 1-10

BCIP	-	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BDSC	-	Bloomington Drosophila Stock Center
Bio	-	Biotin
bp	-	Basenpaare
cDNA	-	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CTP	-	Cytosintriphosphat
CxD	-	Crossover Suppressor Dichaete (drittchromosomaler Balancer)
CyO	-	Curly of Oster (zweitchromosomaler Balancer)
d	-	dorsal
DAB	-	3,3'-Diaminobenzidin
DC	-	Deutocerebrum
ddH ₂ O	-	doppel destilliertes (= entmineralisiertes) Wasser
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DGRC	-	Drosophila Genomics Resource Center
DIG	-	Digoxygenin
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure (von engl. <i>deoxy ribonucleic acid</i>)
dNTP	-	Desoxynukleosidtriphosphat
DPSS	-	<i>diode pumped solid state</i> -Laser
DSHB	-	Developmental Studies Hybridoma Bank
DTS	-	<i>dominant temperature sensitive</i>
DV	-	Dorsoventral
EST	-	<i>expressed sequence tag</i>
GTP	-	Guanosintriphosphat
HRP	-	Meerrettichperoxidase (von engl. <i>horseraddish peroxidase</i>)
HHS	-	Hirnhemisphäre
HS	-	Hemisegment
i	-	intermediär
LB	-	Labialsegment
LBN	-	Labialnerv
LGB	-	longitudinaler Glioblast
lin	-	Zellstammbaum (von engl. <i>lineage</i>)
Mes	-	Mesektoderm
mGFP	-	membranständiges grün-fluoreszierendes Protein

MN	-	Mandibularsegment
MNB	-	Mittellinienneuroblast
mRNA	-	Boten-Ribonukleinsäure (von engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MP	-	Mittellinienvorläufer (von engl. <i>midline precursor</i>)
mSpi	-	membrangebundenes Spitz (inaktiver Vorläufer des Egfr-Liganden Spitz)
MX	-	Maxillarsegment
MXN	-	Maxillarnerv
NB	-	Neuroblast
NBT	-	Nitroblautetrazoliumchlorid
NE	-	Neuroektoderm
nGFP	-	nukleäres grün-fluoreszierendes Protein
p	.	posterior
PC	-	Protocerebrum
PCR	-	Polymerasekettenreaktion (von engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PH3	-	Phosphohiston H3
pNE	-	procephales Neuroektoderm (=procephale neurogene Region)
POD	-	Peroxidase
PT	-	Prothorax
rpm	-	Umdrehungen pro Minute (von engl. <i>rounds per minute</i>)
RT	-	Raumtemperatur
S1-S5	-	(Neuroblasten-) Segregationswellen 1-5
SOP	-	sensorische Vorläuferzelle (von engl. <i>sensory organ precursor</i>)
SSC	-	Standard Salz-Citrat-Lösung
ssDNA	-	Heringssperma-DNA (von engl. <i>salmon sperm DNA</i>)
sSpi	-	sekretiertes Spitz (aktive Form des Egfr-Liganden Spitz)
TC	-	Tritocerebrum
T _m	-	Schmelztemperatur (von engl. <i>melting temperature</i>)
TGF α	-	<i>transforming growth factor α</i>
TM3	-	Third Multiple 3 (drittchromosomaler Balancer)
TM6b	-	Third Multiple 6b (drittchromosomaler Balancer)
TSA	-	Tyramid-Signalamplifikation
T1-T3	-	Thorakalsegment 1-3 (Pro-, Meso- und Metathorax)
U	-	Unit

UAS	-	<i>upstream activating sequence</i>
UTP	-	Uraciltriphosphat
v	-	ventral
vNE	-	ventrales Neuroektoderm (=ventrale neurogene Region)
VNS	-	ventrales Nervensystem
Wt	-	Wildtyp
°C	-	Grad Celsius
λ	-	Wellenlänge

7.6. Lebenslauf

7.7. Publikationsleistungen

Folgende Artikel wurden im Rahmen dieser Arbeit in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht:

Jussen, D., Urbach, R. (2014). Non fluorescent RNA in situ hybridization combined with antibody staining to visualize multiple gene expression patterns in the embryonic brain of *Drosophila*. *Methods Mol Biol.* **1082**:19-35.

Urbach, R.¹, Jussen, D.¹, Technau, G.M. (2016). Gene expression profiles uncover individual identities of gnathal neuroblasts and serial homologies in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development* **143**, 1290-1301. ¹geteilte Erstautorenschaft

Jussen, D., von Hilchen, J, Urbach, R. (2016). Genetic regulation and function of EGFR signaling in patterning of the embryonic *Drosophila* brain. *Open Biology* **6**: 160202.

7.8. Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Absatz 3d der Promotionsordnung

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

Mainz, den 12.01.2017

David Jussen

7.9. Danksagungen

