

**Differenzierung, Spezifizierung und Migration
der lateralen Gliazellen im spätembryonalen
Bauchmark von *Drosophila melanogaster***

**Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften**

Am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Ruth Beckervordersandforth

geboren am 17.05.1978 in Aachen

Mainz, September 2007

There are things known and things unknown,
and in between are doors.

Jim Morrison

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Embryonale Neurogenese bei <i>Drosophila</i>	2
1.2 Die Gliazellen	7
1.2.1 Entstehung der lateralen Gliazellen.....	8
1.2.2 Klassifizierung der Gliazellen	10
1.2.3 Migration der Peripheren Gliazellen.....	12
1.3 Fragestellung dieser Arbeit.....	15
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	17
2.1.1 Fliegenzucht.....	17
2.1.2 Herstellung von Apfelagar-Röhrchen und Eiablage.....	17
2.1.3 Fliegenstämme	18
2.1.4 Kreuzungen.....	20
2.1.5 Balancieren von Mutationen.....	21
2.1.6 Ektopische Expression mithilfe des UAS/Gal4-Systems	21
2.1.7 Rekombination.....	22
2.1.8 EMS Mutagenese.....	23
2.2 Antikörperfärbung	25
2.2.1 verwendete Antikörper	25
2.2.2 Fixierung und Devitellinisierung.....	26
2.2.3 Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern.....	27
2.2.4 Signaldetektion	27
2.2.5 Dokumentation der Färbungen	28
2.3 <i>in Situ</i> Hybridisierung.....	29

2.3.1 Herstellung der mRNA-Sonden.....	29
2.3.2 Konzentration der mRNA-Sonden.....	29
2.3.3 Hybridisierung	30
2.3.4 Signaldetektion	30
2.3.5 <i>in Situ</i> Hybridisierung gekoppelt mit Antikörperfärbung.....	31
2.4 Molekularbiologische Methoden	31
2.4.1 Präparation von DNA	31
2.4.2 Herstellung von cDNA aus <i>Drosophila</i> -Embryonen.....	32
2.4.3 PCR und Sequenzierung	32
2.4.4 Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese.....	32
2.4.5 Bestimmung der Integrationsorte von P-Elementen durch inverse PCR und Plasmid-Rescue.....	33
2.5 Geräte und Materialien	34
2.5.1 Lösungen und Puffer.....	34
2.5.2 Mikroskope und Binokulare	37
2.5.3 molekularbiologische Geräte	37
2.5.4 Software	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Gliale Subtypen, Markergenexpression und Stammbaumanalyse im Bauchmark von <i>Drosophila</i> am Ende der Embryogenese	38
3.1.1 Molekulare Klassifizierung und Stammbaumanalyse der lateralen Gliazellen im zentralen Nervensystem.....	39
3.1.2 Molekulare Klassifizierung der Gliazellen im peripheren Nervensystem.....	59
3.1.3 Mutantanalyse mithilfe der molekularen Marker.....	70
3.2 EMS Mutagenese zur Identifizierung von Genen, die eine Rolle bei der Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen spielen.....	73

3.2.1 Mutagenese	74
3.2.2 Identität und Muster der peripheren Gliazellen	75
3.2.3 Mutanten mit Defekten im peripheren Gliamuster	76
3.2.4 Kartierung der Mutationen über Komplementationsanalysen	82
4. Diskussion.....	88
4.1 Gliale Determinierung und Differenzierung.....	89
4.2 Die Gliazellen des ZNS	91
4.2.1 Die morphologische und positionelle Klassifizierung der lateralen ZNS-Glia kann durch die Analyse der molekularen Marker bestätigt und erweitert werden .	91
4.2.2 Subtyp-spezifische Funktionen von Kandidatengen.....	93
4.3 Die Gliazellen im peripheren Nervensystem	97
4.3.1 Die Identität der peripheren Gliazellen.....	97
4.3.2 Migration der peripheren Gliazellen.....	98
4.4 Die Zusammensetzung der glialen Anteile in den Zellklonen der Neuroblasten ist unveränderlich	101
4.5 Phänotypische Charakterisierung der <i>castor</i> Funktionsverlustmutante mithilfe der molekularen Marker.....	102
5. Zusammenfassung	104
6. Literatur	106
7. Anhang.....	115
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	115
7.2 Namen und Abkürzungen der Gliazellen.....	117
7.3 Namen und Abkürzungen der Gene.....	118
7.4 Integrationsorte der P-Elementlinien	119
7.5 Liste der Defizienzen	120
Versicherung gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung.....	124

Lebenslauf.....	125
Beruflicher Werdegang.....	125
Publikationen	126
Danke	127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neurogenese bei <i>Drosophila melanogaster</i>	3
Abbildung 2: Entwicklung des ventralen Nervensystems	5
Abbildung 3: Segregationswellen und Identität der Neuroblasten	6
Abbildung 4: Neurale Vorläuferzellen generieren Neurone und Gliazellen	10
Abbildung 5: Klassifizierung der lateralen Gliazellen	12
Abbildung 6: Migration der peripheren Gliazellen.....	14
Abbildung 7: Das UAS-Gal4-System.....	22
Abbildung 8: Strategie der EMS-Mutagenese für das zweite Chromosom.....	24
Abbildung 9: Anzahl der lateralen Gliazellen in abdominalen Hemisegmenten des ZNS	41
Abbildung 10: Position und Klassifizierung der lateralen Gliazellen im Bauchmark....	42
Abbildung 11: Zuordnung der Gliazellen zu identifizierten Zellstammbäumen.....	46
Abbildung 12: Analyse der Markerexpression in Neuropil-assoziierten Gliazellen	49
Abbildung 13: Die Kategorie der Oberflächen-assoziierten Gliazellen und ihre weitere Einteilung in.....	52
Abbildung 14: Jede Oberflächen-assoziierte Gliazelle kann anhand der Kombination der exprimierten molekularen Marker identifiziert werden	54
Abbildung 15: Analyse der Markerexpression in Kortex-assoziierten Gliazellen	57
Abbildung 16: Charakteristika der Markerexpression der glialen Kategorien im ZNS .	57
Abbildung 17: Das periphere Nervensystem im Embryonalstadium 16	61
Abbildung 18: Identifizierung der peripheren Gliazellen via Expression von moleku- laren Markern.....	64
Abbildung 19: Position und Nomenklatur der embryonalen peripheren Gliazellen	66
Abbildung 20: Klonale Herkunft der peripheren Gliazellen	69

Abbildung 21: Charakterisierung von homozygot mutanten <i>castor</i> ⁻ Embryonen im ZNS	71
Abbildung 22: Verschiedene Phänotypen der EMS-Mutagenese im GFP-Muster	75
Abbildung 23: EMS-Mutanten mit Differenzierungsdefekten	76
Abbildung 24: EMS-Mutanten mit weniger Gliazellen in der Peripherie	78
Abbildung 25: EMS-Mutanten mit mehr Gliazellen in der Peripherie.....	79
Abbildung 26: EMS-Mutanten mit Migrationsdefekten.....	81
Abbildung 27: Die peripheren Gliazellen bilden dichte Cluster in der Peripherie.....	82
Abbildung 28: Kartierung der EMS-Mutanten über Komplementationsanalyse mit Defizienzen des rechten Arms des zweiten Chromosoms	86
Abbildung 29: Kartierung der EMS-Mutanten über Komplementationsanalyse mit Defizienzen des linken Arms des zweiten Chromosoms	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Fliegenstämme	20
Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper	26
Tabelle 3: Integrationsort der P-Elemente	34
Tabelle 4: Expression der analysierten molekularen Marker in den lateralen Gliazellen des ZNS.....	40
Tabelle 5: Nomenklatur und klonaler Ursprung der ZNS Gliazellen.....	44
Tabelle 6: Expression der molekularen Marker in Neuropil-assoziierten Gliazellen.....	49
Tabelle 7: Expression der molekularen Marker in Oberflächen-assoziierten Gliazellen.....	53
Tabelle 8: Expression der molekularen Marker in Kortex-assoziierten Gliazellen.....	55
Tabelle 9: Expression der molekularen Marker in peripheren Gliazellen	65
Tabelle 10: Position der peripheren Gliazellen.....	67
Tabelle 11: Nomenklatur der peripheren Gliazellen.....	68
Tabelle 12: Kartierung der identifizierten mutierten Genloci bzw. chromosomalen Bereiche	85
Tabelle 13: Klassifizierung der molekularen Marker nach Proteinklassen	97

1. Einleitung

Eine der großen Herausforderungen der Neurobiologie ist die Fragestellung, wie aus pluripotenten neuralen Stammzellen eine zelluläre Diversität entsteht, die ein komplexes Organ wie das Nervensystem ausbildet. Das Nervensystem prozessiert als höchstes Schaltorgan die von den Sinneszellen eingehende Information und kontrolliert grundlegende Vorgänge wie Bewegung, Homoöstase und Denken. Die Verschaltung einer ungeheuren Anzahl von Zellen ließ im Laufe der Evolution eine Komplexität entstehen, die in keinem anderen Gewebe vorliegt. Der Aufbau dieses hochkomplexen Organs erfordert die korrekte Spezifizierung, eine präzise Organisation und multiple Interaktionen einer großen Anzahl an neuralen Zellen. Das Nervensystem wird im Wesentlichen von zwei Zelltypen aufgebaut: Neurone und Gliazellen. Neurone spielen eine große Rolle in der Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen und sind seit Jahren Objekt intensiver Forschung. Es werden drei Klassen von Neuronen unterschieden: 1. sensorische Neurone, die physikalische und chemische Reize empfangen und weiterleiten, 2. Motoneurone, die Impulse an die Muskeln geben, und das Bindeglied zwischen Informationsverarbeitung und resultierender Reaktion darstellen, und 3. Interneurone, welche die Verbindung zwischen den Nervenzellen herstellen. Die Kontakte zwischen den Neuronen werden über chemische oder elektrische Synapsen vermittelt. Im Falle der motorischen Neurone überträgt die so genannte motorische Endplatte den Impuls auf den Muskel. Die Impulse (Aktionspotentiale) werden über lange Fortsätze, die Axone, und über zahlreiche Verzweigung, die Dendriten, übertragen. Die Aufgaben der weniger bekannten Partner, der Gliazellen, sind erst in den letzten Jahren in den Brennpunkt des Interesses geraten. Ihnen werden Funktionen in immer mehr Prozessen zugeschrieben, wie Umhüllung und elektrische Isolierung von Axonen und die Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase der Neurone. Gliazellen bilden die Blut-Hirn-Schranke und dienen als Wegweiser für auswachsende Axone.

Die Untersuchung komplexer biologischer Mechanismen wird in unterschiedlichen Modellsystemen betrieben. Als eines der ältesten Modellorganismen hat sich *Drosophila melanogaster* für die Analyse entwicklungsbiologischer Prozesse etabliert. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse über grundlegende Mechanismen und homologe Gene zeigen, dass sich die Entwicklungswege von *Drosophila* und höheren Organismen durchaus ähneln, was neben anderen Gebieten, auch für die Neurobiologie zutrifft

(Arendt und Nubler-Jung 1999). Dies eröffnet die Möglichkeit die Vorteile eines einfacheren Tiermodells zu nutzen, z. B. die kurze Generationszeit der Fruchtfliege und die Existenz von vielen mutanten Linien. Aufgrund der Vielzahl der vorhandenen genetischen Werkzeuge ist *Drosophila* leicht zu manipulieren. Des Weiteren ist die Fruchtfliege morphologisch präzise beschrieben. Das fundamentale Verständnis der prinzipiellen Mechanismen, die zum Aufbau des Fliegengehirns führen, kann Aufschluss über die Neurogenese in Vertebraten liefern. Letztlich kann dies sogar zu Therapiemethoden im Bereich der Krankheitsbekämpfung führen. Im Folgenden wird ein Überblick über Entwicklung des Nervensystems und die Gliogenese bei *Drosophila* gegeben.

1.1 Embryonale Neurogenese bei *Drosophila*.

Drosophila melanogaster gehört als Insekt zur Klasse der Arthropoden, die sich durch ein Strickleiternnervensystems auszeichnet. Morphologisch setzt es sich aus einem über dem Schlund gelegenen Gehirn (Oberschlundganglion, Cerebralganglion) und einem ventral verlaufenden Bauchmark zusammen. Im Strickleiternnervensystem werden die paarigen Neuomere des Bauchmarks durch eine anteriore und eine posteriore Kommissur pro Segment miteinander verbunden. Die Verbindung mit den Ganglien der anderen Segmente wird über die parallel longitudinal verlaufenden Konnektive hergestellt. Wie bei allen höheren Tieren besteht das Nervensystem aus einem zentralen Nervensystem (ZNS) und einem peripheren Nervensystem (PNS). Das Insektengehirn ist in Trito-, Deuto- und Protocerebrum (Bullock TH 1965) unterteilt, während sich das Bauchmark aus vierzehn bilateral symmetrischen Ganglien, den Neuomeren, zusammensetzt. Entsprechend der Körperregionen werden diese in drei gnathale (G1-G3), drei thorakale (T1-T3) und neun abdominale (A1-A9) Neuomere untergliedert. Die Neuomere werden durch die aus dem Mesektoderm abstammenden Zellen der Mittellinie (ML) in zwei spiegelbildliche Hälften geteilt, die so genannten Hemineuomere. Das embryonale ZNS entwickelt sich aus einer bilateralen zweidimensionalen Zellschicht, dem Neuroektoderm. Das Gehirn geht dabei aus der procephalen neurogenen Region (pNR) hervor, während das Bauchmark aus der ventralen neurogenen Region (vNR) entsteht (Campos-Ortega 1997).

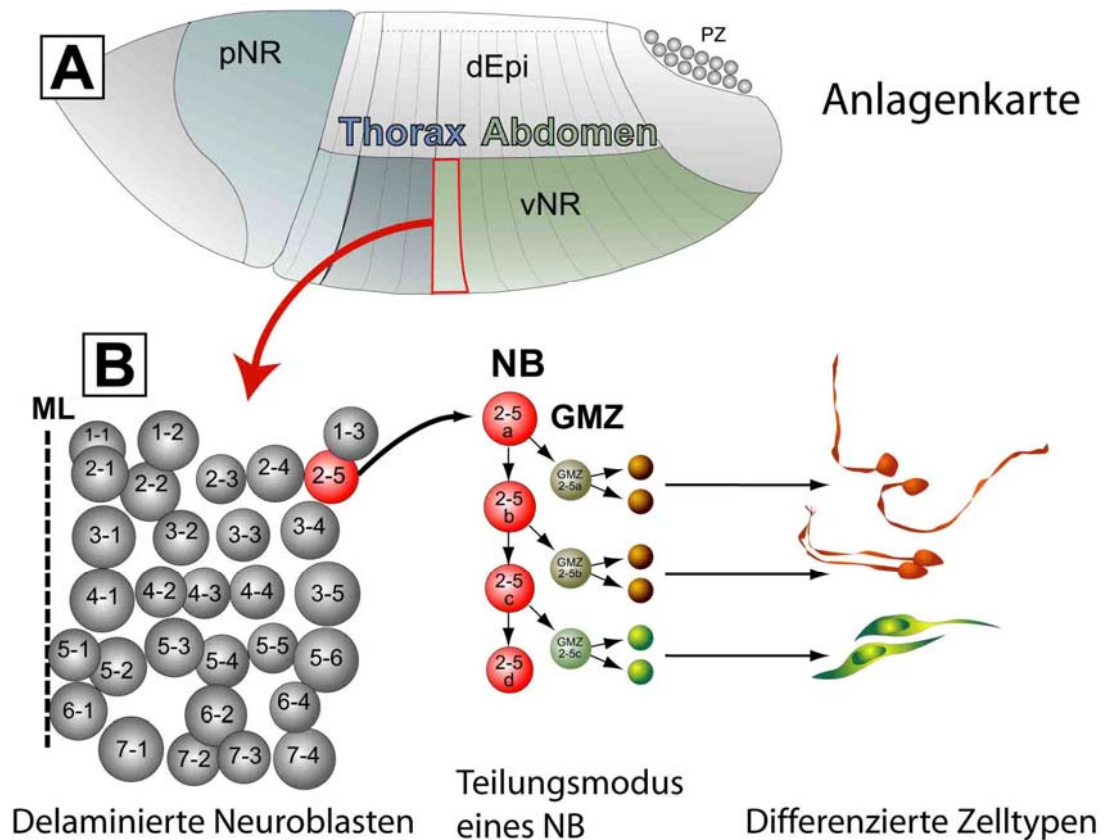


Abbildung 1: Neurogenese bei *Drosophila melanogaster*

(A) Laterale Ansicht der Anlagenkarte im Gastrula-Stadium. Aus der procephalen neurogenen Region (pNR) entwickelt sich das Gehirn. Das Bauchmark entsteht aus der ventralen neurogenen Region (vNR). Anterior ist links. (B) Aufsicht auf ein Hemineuomer eines abdominalen Segments, anterior ist oben. Die bereits delaminierten Neuroblasten (NBs) sind anhand ihrer Position zu unterscheiden. Jeder NB teilt sich im Stammzellmodus und generiert dabei Gangliengliamutterzellen (GMZs), die sich ebenfalls teilen und Neurone (rot) und/oder Gliazellen (grün) produzieren. dEPI = dorsale Epidemis, ML = Mittellinie, PZ = Polzellen. (Mit freundlicher Genehmigung von Christian Berger und Christoph Rickert).

Im folgenden Abschnitt werde ich lediglich auf die Entwicklung des Bauchmarks eingehen und weder das Gehirn noch die Mittellinie besprechen. In Abb. 2 sind die wichtigsten Schritte der Neurogenese zusammengefasst. Zu Beginn der Embryogenese legen Morphogen-Gradienten von maternalen Effektgenen die anterior-posteriore und die dorsoventrale Körperachse fest (Abb. 2 A). Die maternalen Gene kontrollieren die Expression von zygotischen Musterbildungsgenen entlang der A/P und D/V Achse (Abb. 2 B), wodurch die einschichtige vNR in Domänen von äquivalenten neuronalen Vorläuferzellen unterteilt wird. Diese Domänen werden als proneurale Cluster bezeichnet (in Abb. 2 B mit weißem Stern gekennzeichnet). Sie bestehen aus vier bis sechs Zellen und zeichnen sich durch die Expression so genannter proneuraler Gene aus (Jimenez und Campos-Ortega 1990; Skeath und Carroll 1992). Proneurale Gene

befähigen diese Zellen, sich zu neuronalen Vorläufern zu entwickeln. Ein als laterale Inhibition bezeichneter Vorgang sondert durch Zell-Zell-Interaktionen eine der Zellen als so genannten Neuroblast (NB) aus dem Cluster aus. Die neurogenen Faktoren Notch und Delta sind die Schlüsselfaktoren der lateralen Inhibition (Abb. 2 C; zusammengefasst in (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Schweisguth 2004). *Notch* kodiert für einen membranständigen Rezeptor, während Delta als dessen spezifischer Ligand fungiert. Anfänglich exprimieren alle Zellen des Clusters die beiden Gene gleichermaßen. Durch eine gesteigerte Expression von Delta in einer der Zellen, dem späteren NB, verschiebt sich das Gleichgewicht. Dies führt zu einer verstärkten Expression von *Notch* in den verbliebenen Zellen, wodurch die proneuralen Gene herunterreguliert werden und neurales Schicksal unterdrückt wird. Als Resultat geht eine Zelle als neuraler Vorläufer aus dem Cluster hervor, während die anderen Zellen sich zu Epidermoblasten entwickeln.

Jedes Hemineuromer (im Thorax und im Abdomen) wird aus 30 NBs gebildet (Abb. 1B und 3), die während der Gastrulation in fünf aufeinander folgenden Segregationswellen (S1-S5) aus dem Neuroektoderm in das Innere des Embryos delaminieren. Dabei entsteht ein segmental reproduzierbares Muster, bei dem jeder NB anhand des Zeitpunkts seiner Delamination und seiner Position im Hemineuromer erkannt werden kann. Die Benennung der NBs basiert dabei auf der Position im Hemineuromer und bezeichnet die Reihe (A/P-Achse) und Spalte (D/V-Achse) im kartesischen Koordinatensystem. Zusätzlich zur Position und zum Zeitpunkt der Delamination kann jeder NB durch die Expression spezifischer Markerkombinationen (Broadus *et al.*, 1995; Doe 1992) einzeln angesprochen werden (dargestellt in Abb. 3). Nach der Delamination generieren die NBs einen für sie charakteristischen Zellstammbaum (Abb. 1B). Dabei teilen sie sich im Stammzellmodus, wobei eine selbsterneuerte Vorläuferzelle und eine kleinere Gangliemutterzellen (GMZ) abgeschnürt werden. Die asymmetrische Teilung wird durch die ungleiche Verteilung von Proteinen zur basalen und apikalen Seite des NBs gewährleistet (Abb. 2C).

Die Identität der GMZ wird über die so genannten temporären Spezifizierungsgene festgelegt. Diese werden im NB exprimiert, in den GMZ aufrechterhalten und an die Nachkommen weitergegeben (Abb. 2 D). Die temporäre Genkaskade besteht aus den Transkriptionsfaktoren Hunchback (Hb) als erstes und Krüppel (Kr) als zweites Spezifizierungsgen.

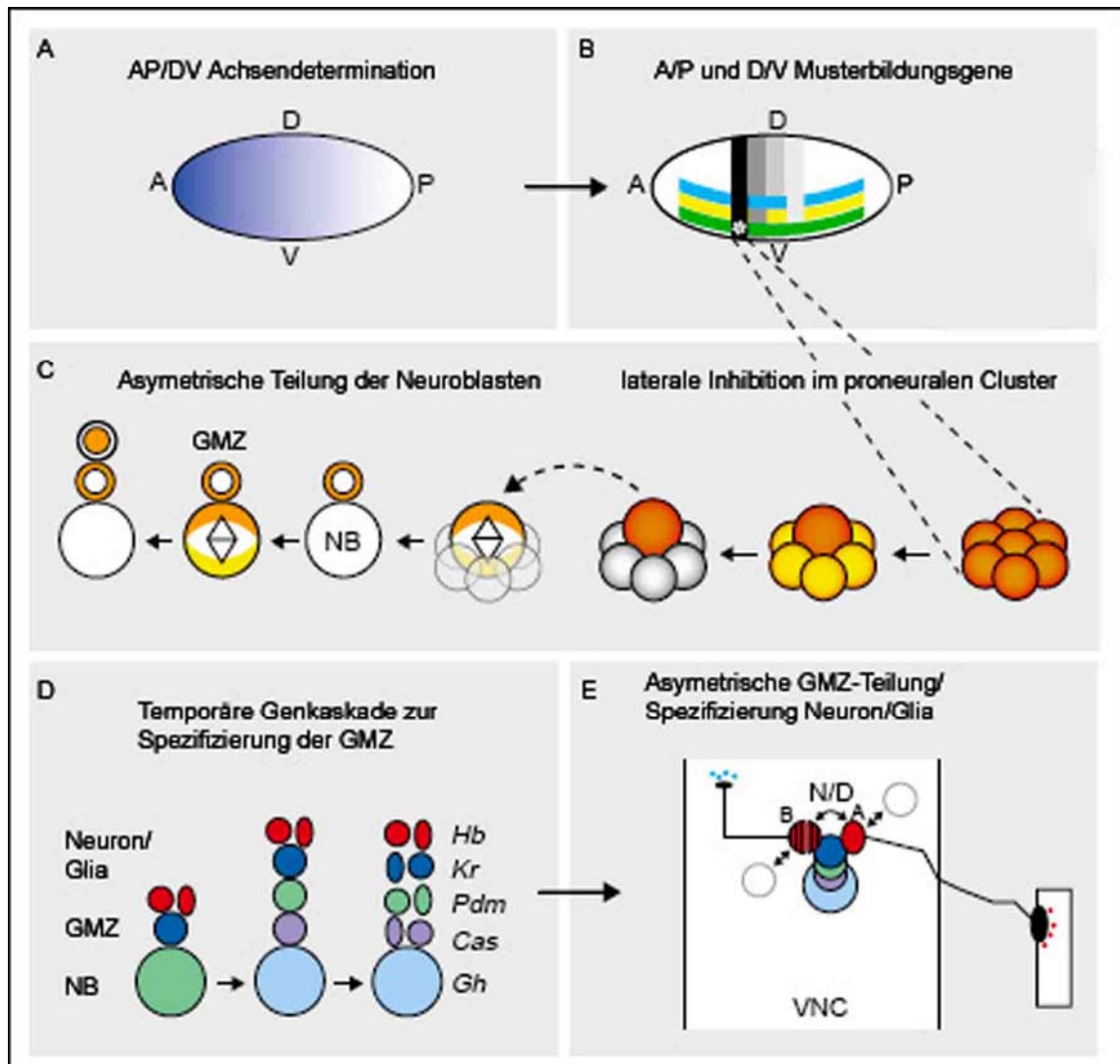


Abbildung 2: Entwicklung des ventralen Nervensystems“ \f R

(A) Während der frühen Embryogenese werden die anterioposteriore (A/P) und dorsoventrale (D/V) Hauptachse durch Morphogengradienten festgelegt. (B) Dies führt zur Expression von D/V (schwarz-graue Streifen) und A/P (farbige Streifen) Mustergenen, die das Neuroektoderm in distinkte Bereiche mit neuronalen Domänen (weißer Stern) einteilen. (C) In solch einem proneuralen Cluster wird durch laterale Inhibition eine neurale Vorläuferzelle ausgesondert. Dieser so genannte Neuroblast (NB) generiert einen spezifischen Zellstammbaum durch asymmetrische Teilung. Durch die ungleiche Verteilung von Proteinen an der basalen (gelb) und apikalen (braun) Seite im NB wird, neben dem erneuerten NB, eine kleinere Gangliengliedermutterzelle (GMZ) abgeschnürt. (D) Eine spezifische Identität erhalten die GMZs durch die Expression der temporären Spezifizierungsgene *hunchback (hb)*, *krüppel (kr)*, *POU-domain protein (pdm)*, *castor (cas)* und *grainyhead (gh)*. (E) Durch asymmetrische Teilung produziert die GMZ zwei unterschiedliche Nachkommenzellen, z. B. ein Neuron und eine Gliazellen. Die Spezifizierung der Nachkommenzellen ist hier am Beispiel des Notch/Numb Signalwegs dargestellt. Die Nachbarzellen (hellgraue Kreise) übertragen über die Expression von *Notch* das „A-Schicksal“ an beide Tochterzellen. Durch die asymmetrische Verteilung von Numb blockiert eine der Zellen das Notch-Signal und nimmt das „B-Schicksal“ an. So entstehen spezifische Neurone mit unterschiedlichen Neurotransmittern (rote und blaue Punkte). (Abbildung nach Skeath und Thor, 2003).

Das Pou-Domänenprotein-1 und -2 (Pdm 1 und Pdm 2) legt das Schicksal der nächsten GMZ fest, gefolgt von Castor (Cas) und Grainyhead (Gh) (Brody und Odenwald 2002; Brody und Odenwald 2005; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998; Novotny *et al.*, 2002). Durch das sequenzielle Anschalten dieser Faktoren über einen bestimmten

Zeitraum wird sichergestellt, dass jede GMZ, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten geboren wird, eine eigene Identität besitzt. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen früh und spät geborenen GMZ und ihren Nachkommen.

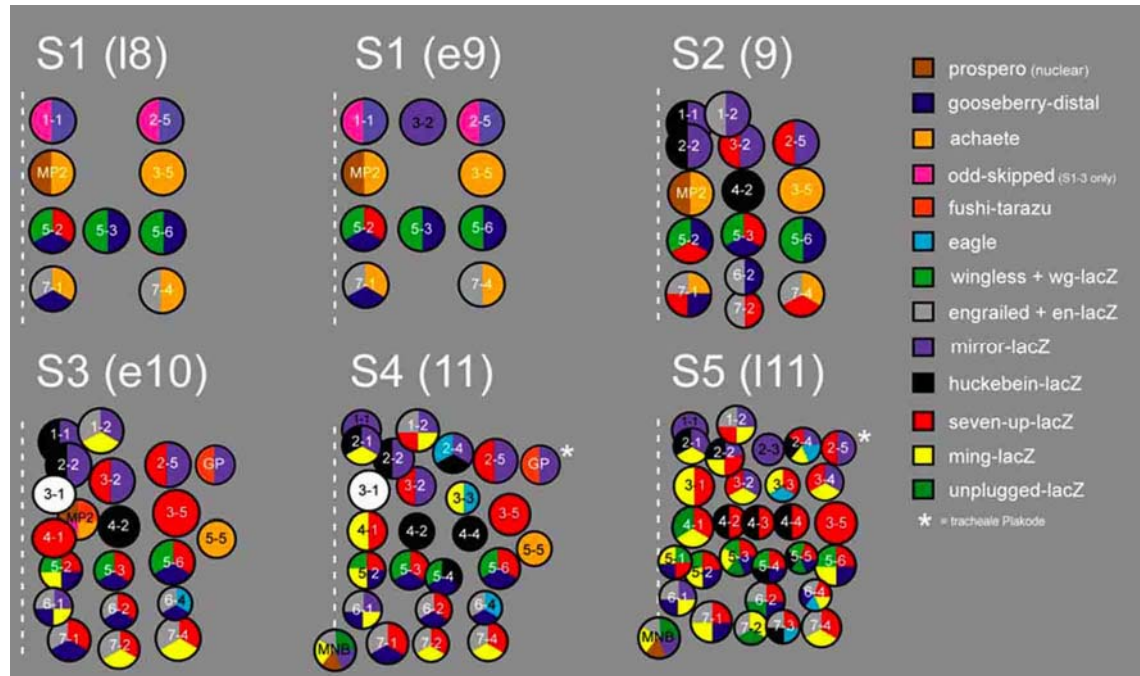


Abbildung 3: Segregationswellen und Identität der Neuroblasten

Jeder NB kann anhand des Delaminationszeitpunktes, seiner Position im Hemineuromer und der spezifischen Expression von Markergenen eindeutig identifiziert werden. Rechts ist der Farbcode der exprimierten Marker aufgelistet. Anterior ist oben, gestrichelte Linie deutet die Mittellinie an, der Stern die tracheale Plakode. Abbildung nach (Doe, 1992; Broadus *et al*, 1995).

Die GMZ generieren zwei postmitotische Nachkommenzellen, die ausdifferenzieren. Die Zellschicksale der Tochterzellen werden über verschiedene Signalwege bestimmt, z. B. über die antagonistisch wirkenden Gene *Notch* und *numb* (Abb. 2 E). Benachbarte Zellen leiten über den Notch-Signalweg an beide Geschwisterzellen das „A-Schicksal“ weiter. Durch die asymmetrische Verteilung von Numb wird in einer der Zellen das Notch-Signal geblockt, und die Zelle nimmt das „B-Schicksal“ an (Spana und Doe 1996).

Es gibt drei Arten von neuronalen Stammzellen, die anhand ihrer Nachkommen unterschieden werden können (siehe Abb. 4). Eine Vorläuferzelle, die nur Neurone generiert, wird als Neuroblast (NB) bezeichnet, während eine Stammzelle, die nur Gliazellen produziert, Glioblast (GB) genannt wird. So genannten Neuroglioblasten (NGB) generieren gemischte Zellklone mit Neuronen und Gliazellen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden neurale Stammzellen weiterhin NB genannt, ohne zwischen den drei Typen zu unterscheiden.

Am Ende der Embryonalentwicklung sind aus 30 NBs im Thorax und Abdomen etwa 350 Neurone und 32 Gliazellen entstanden. Die Anzahl der Gliazellen im Thorax ist dabei höher als im Abdomen und liegt bei 35-37 Zellen.

1.2 Die Gliazellen

In *Drosophila* übersteigt die Anzahl der Neurone die der Gliazellen um das Zehnfache, in Vertebraten ist das Verhältnis jedoch umgekehrt. Trotz der zahlenmäßigen Überlegenheit bei Vertebraten spielten die Gliazellen sehr lange eine untergeordnete Rolle bei der Untersuchung des Nervensystems, während die Funktion von Neuronen intensiv erforscht wurde. Der Begriff „Glia“ stammt vom Griechischen ab und bedeutet Leim. Er impliziert schon die primäre Funktion, die man den Gliazellen zuschrieb. Es wurde angenommen, dass es sich bei den Gliazellen um eine Art Bindegewebe handelt, das lediglich dazu dient, die Neurone zusammenzuhalten. Erst durch neuere Arbeiten wurde die Wichtigkeit der Gliazellen für den Aufbau und die Funktion des Nervensystems erkannt. Gliazellen schützen das ZNS, indem sie die Neurone mit Nährstoffen versorgen und so das Überleben und die Regeneration von nervösem Gewebe gewährleisten. Wie für die Astrozyten der Vertebraten gezeigt werden konnte, besitzen Gliazellen Ionenkanäle und Rezeptoren, mit denen sie mit Neuronen interagieren und an der Informationsverarbeitung beteiligt sind. Des Weiteren kontrollieren sie neuronale Funktionen durch Regulierung der extrazellulären Ionenhomöostase und der axonalen Leitfähigkeit und spielen eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität (Pfrieger und Barres 1997; Robitaille 1998). Gliazellen sind außerdem in Wegfindungsprozessen involviert. Sie können als abstoßendes oder anziehendes Substrat für migrierende Neurone und Wachstumskegel dienen. In Vertebraten und Invertebraten richten sich die Wachstumskegel von Pionierneuronen an Gliazellen aus und wandern an ihnen entlang, was z.B. für das Pionierneuron aCC („anterior corner cell“) in *Drosophila* gezeigt wurde (Sepp *et al.*, 2001). Ablation von Gliazellen führt zu schweren Defekten in der axonalen Wegfindung und im Aufbau des ZNS und PNS (Sepp *et al.*, 2001). Eine andere Aufgabe der Gliazellen ist die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke, die das Gehirn vor der hohen Kalium-Konzentration der Hämolymphe schützt. Diese Funktion ist in *Drosophila* einer speziellen glialen Subgruppe, den Oberflächen-assoziierten Gliazellen, zuzuschreiben (Schwabe *et al.*, 2005). Gliazellen scheinen zudem noch eine Rolle in der temporären

Regulation der NB-Proliferation im larvalen Gehirn zu spielen. In der frühen larvalen Phase sind die NBs ruhig gestellt (Truman und Bate 1988). Die larvalen Gliazellen umhüllen die NBs und unterdrücken durch die Expression bestimmter Proteine, wie z.B. Anachronism (Ana), deren Teilung (Ebens *et al.*, 1993). Am Ende des Larvenstadiums fangen die Gliazellen an, *E-cadherin* zu exprimieren und fördern damit die Proliferation der NBs (Dumstrei *et al.*, 2003).

Diese Auswahl an glialen Funktionen zeigt die Wichtigkeit von Gliazellen in der Entwicklung des ZNS und PNS. Defekte in der Differenzierung von Gliazellen können schwere Krankheiten induzieren. Multiple Sklerose, z. B., ist eine Krankheit, bei der die von Oligodendrozyten gebildete isolierende Myelinschicht zerstört wird. Das führt dazu, dass die elektrische Leitfähigkeit der Neurone stark eingeschränkt ist und die Signalverbindungen zwischen Gehirn und Rückenmark unterbrochen werden. Letzten Endes hat dies Körperlähmung zur Folge.

In der Fruchtfliege unterscheidet man zwischen zwei Hauptgruppen von Gliazellen, den lateralen Glia und den Mittellinienglia (Klämbt *et al.*, 1996). Letztere sind mesektodermalen Ursprungs und ummanteln die Axone der Kommissuren (Klämbt und Goodman 1991). Sie entstehen aus Mittellinienvorläuferzellen, deren Stammbäume vollständig beschrieben sind (Bossing und Technau 1994). In dieser Arbeit habe ich mich ausschließlich mit der Gruppe der lateralen Gliazellen beschäftigt. Laterale Gliazellen umfassen die Mehrheit der Gliazellen im Bauchmark und stammen von neuronalen Vorläufern des Neuroektoderms ab. Insgesamt acht NBs generieren Gliazellen im ZNS pro Hemisegment, darunter sind zwei reine Glioblasten: der NB6-4a und der Longitudinalen Glioblast (LGB). Die restlichen Gliazellen stammen aus gemischten Zelllinien und werden von NB1-1a, NB2-2t, NB1-3, NB2-5, NB5-6 und NB7-4 generiert. Die Gliazellen der Peripherie setzen sich aus zwei Populationen von unterschiedlicher klonaler Herkunft zusammen: etwa die Hälfte der peripheren Glia stammen von den ZNS NBs 1-3, 2-5 und 5-6 ab, die anderen werden in der Peripherie von so genannten „sensory organ precursors“ (SOP) generiert.

1.2.1 Entstehung der lateralen Gliazellen

In *Drosophila* wird gliales Zellschicksal durch das Gen *glial cells missing* (*gcm*) induziert (Hosoya *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1996). *gcm* kodiert für einen Transkriptionsfaktor und wird in allen lateralen Gliazellen exprimiert. In Funktionsverlustmutanten von *gcm* fehlen nahezu alle lateralen Gliazellen, während

durch eine ektopische Expression von *gcm* auf Kosten von Neuronen viel mehr Gliazellen im ZNS entstehen (Akiyama-Oda *et al.*, 1998; Hosoya *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1996). *gcm* fungiert also als Schalter zwischen neuronalem und glialem Zellschicksal, wobei *gcm* positive Zellen sich zu Gliazellen entwickeln und *gcm* negative Zellen neuronales Schicksal annehmen (Abb. 4). *gcm* Expression startet im Embryonalstadium 10 und wird bis Stadium 14 aufrechterhalten. Die Transkription von *gcm* wird über einen Multi-Komponenten-Signalweg reguliert (Jones 2005), bei dem die exakte temporäre Regulation von *gcm* eine wichtige Rolle spielt. Zudem konnte gezeigt werden, dass *gcm* in unterschiedlichen Zellstammbäumen durch denselben Faktor (Notch) aktiviert oder reprimiert werden kann (Van De Bor und Giangrande 2001; Van De Bor *et al.*, 2000). Eine Regulation von *gcm* erfolgt unter anderem über Auto- und Kreuzregulierung mit *gcm2* (Jones *et al.*, 2004; Kammerer und Giangrande 2001; Miller *et al.*, 1998). *gcm2* ist ein durch Genduplikation entstandenes Paralog von *gcm* (Kammerer und Giangrande 2001), dessen ektopische Expression zwar gliales Schicksal induzieren kann, dessen Verlust jedoch nur schwache Auswirkungen auf die Entwicklung der Gliazellen hat.

Aufgrund der transienten Expression im ZNS ist es wahrscheinlich, dass *gcm* für die Initiierung des glialen Schicksals verantwortlich ist, nicht aber für die gliale Differenzierung. Die Aufrechterhaltung des glialen Schicksals und die Differenzierung der Gliazellen werden über die Aktivierung von Zielgenen bewirkt (Abb. 4). Es sind bisher nur wenige Zielgene von *gcm* bekannt, die eine Rolle in der Entwicklung der Gliazellen spielen. Zu den bereits beschriebenen Genen gehören *reversed polarity (repo)*, *pointed (pnt)*, *tramtrack (ttk)* und *locomotion defects (loco)* (Badenhorst 2001; Giesen *et al.*, 1997; Granderath *et al.*, 2000; Granderath *et al.*, 1999; Halter *et al.*, 1995; Klaes *et al.*, 1994; Klämbt 1993; Xiong *et al.*, 1994). Das Homöodomänenprotein Repo wird in allen Gliazellen exprimiert und stellt den wichtigsten Marker für laterale Gliazellen dar. Repo kontrolliert verschiedene Aspekte der glialen Differenzierung: im Zusammenspiel mit Pnt wird das gliale Schicksal gefördert, während die Interaktion von Repo mit Ttk neuronales Schicksal unterdrückt (Badenhorst *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 2003). *pnt* und *ttk* werden in allen Gliazellen exprimiert, zeigen aber auch Expression in Neuronen und anderen Geweben. Andere Zielgene von *gcm*, wie z.B. *loco*, werden nicht in allen, sondern nur in einzelnen Gliazellen oder Gruppen von Glia exprimiert.

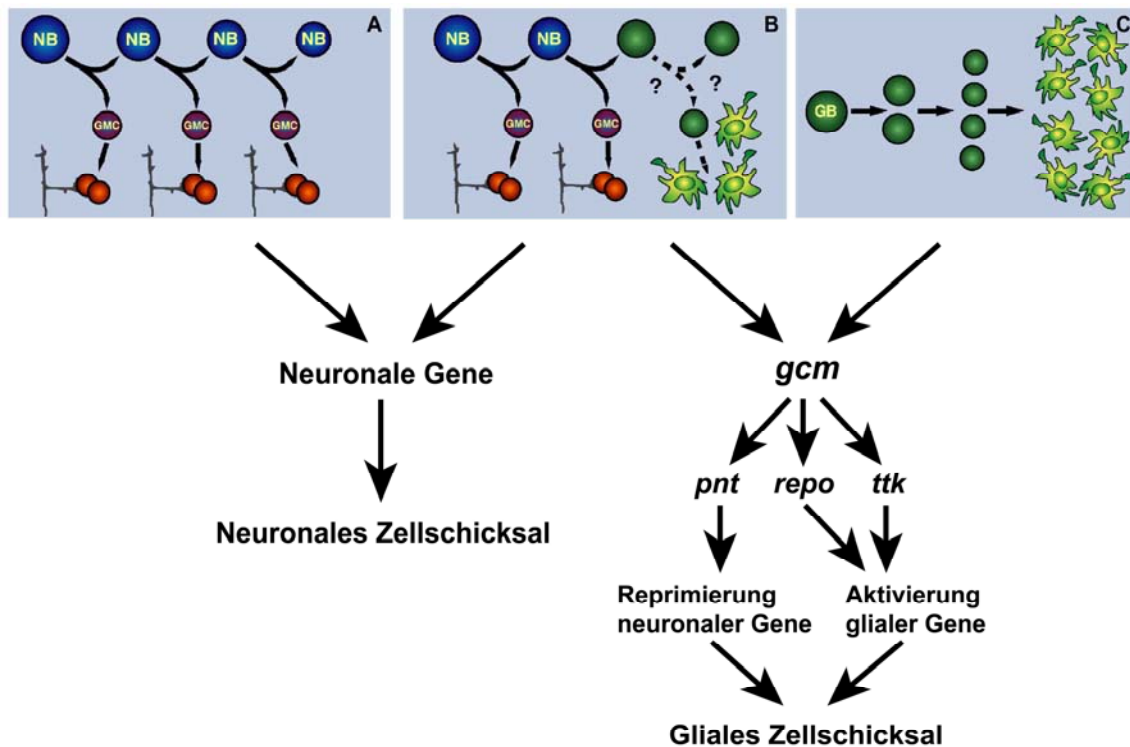


Abbildung 4: Neurale Vorläuferzellen generieren Neurone und Gliazellen

Es gibt drei Arten von neuralen Vorläuferzellen: (A) Ein Neuroblast (NB) generiert ausschließlich Neurone (rot). (B) Ein Neuroglioblast bringt sowohl Neurone, als auch Gliazellen (grün) hervor. (C) Ein Glioblast (GB) produziert einen rein glialen Klon. Die Expression neuronaler Gene im Vorläufer aktiviert neuronales Zellschicksal. Die Transkription des Schaltergens *glial cells missing* (*gcm*) in der Vorläuferzelle resultiert in glialem Schicksal. Dies geschieht sowohl über die Aktivierung weiterer glialer Faktoren (*reverse polarity=repo*, *pointed=pnt*), als auch über Reprimierung von neuronalen Genen (*tramtrack=ttk*).

1.2.2 Klassifizierung der Gliazellen

Die Population der Gliazellen umfasst mehrere Kategorien und Subgruppen. In Vertebraten werden die Gliazellen des ZNS in die zwei Hauptgruppen der Astrozyten und Oligodendrozyten unterteilt. Die zahlenmäßig größere Gruppe der Astrozyten zeichnet sich durch eine sternförmige, amöboide Morphologie aus und stellt den Kontakt zu Nervenzellen, Synapsen und/oder Blutgefäßen her. Die zellulären Fortsätze der Oligodendrozyten bilden die isolierende Myelinschicht aus, welche die Axone der Neurone umhüllt. Im PNS wird diese Aufgabe von den Schwann'schen Zellen übernommen. Eine weitere zu den Gliazellen gehörende Population sind die Mikroglia. Diese Zellen werden von Monozyten (Blutzellen) gebildet und stellen das „Immunsystem“ des ZNS dar.

In *Drosophila* werden alle Repo positiven Zellen im ZNS und im PNS als laterale Gliazellen zusammengefasst. Vor fast 20 Jahren wurden zum ersten Mal spezielle Gruppen von Gliazellen beschrieben, die sich von den anderen Gliazellen durch die Expression bestimmter Marker, wie dem Segmentpolaritätsgen *fushi tarazu* (*ftz*) oder verschiedenen Enhancer Trap Linien, hervorhoben (Doe *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 1989; Klämbt und Goodman 1991). 1995 nahm Ito *et al* die Einteilung der Gliazellen des späten embryonalen und frühen larvalen ZNS in verschiedenen Klassen, basierend auf morphologischen und positionellen Gesichtspunkten, vor (Ito *et al.*, 1995). Anhand von gliaspezifischen Expressionsmustern verschiedener Gal4-Linien konnten Ito *et al* jede Gliazellen im ZNS ansprechen. Die Gliazellen des ZNS wurden auf folgende Weise klassifiziert: individuelle Zellen mit gleichen morphologischen und positionellen Merkmalen wurden in sechs Subgruppen eingeteilt. Diese Subgruppen wiederum bildeten drei Kategorien, die auf der Assoziation mit den verschiedenen Grundstrukturen des Bauchmarks (Oberfläche, Kortex und Neuropil) basierten.

Entsprechend der Einführung von Ito *et al* werden die englischen Namen der Gliazellen verwendet. In Abb. 5 ist die Klassifizierung schematisch dargestellt.

Die Oberflächen-assozierten Gliazellen umhüllen die gesamte Oberfläche des Bauchmarks. Diese Kategorie teilt sich in zwei Subgruppen auf: „subperineurial glia“ (SPG) und „channel glia“ (CG). Die SPGs liegen unterhalb der ZNS Oberfläche und bilden die Blut-Hirn-Schranke. Sie haben runde und ausgesprochen flache Zellumrisse und Zellkerne. Die CGs kleiden die dorsoventralen Kanäle aus. Ihre Zellkerne haben eine lange, schmale Form. Die Kategorie der Kortex-assozierten Gliazellen besteht nur aus einer Subgruppe, den „cell body glia“ (CBG). Diese ummanteln die Zellkörper der Neurone im Kortex und entwickeln eine Astrozyten-ähnliche Morphologie. Die letzte Kategorie, die Neuropil-assozierten Gliazellen, bestehen aus Zellen, die mit den axonalen Strukturen des ZNS (Nervenzwurzel und Neuropil) verbunden sind. Zwei Subtypen werden dieser Kategorie zugeordnet. Die „nerve root glia“ (NRG) sind Zellen, die die Nervenzwurzeln der in die Peripherie ziehenden Axone umhüllen. Diese Subgruppe ist in Abhängigkeit des Nervs, mit dem sie assoziiert ist, weiter unterteilt in „segmental nerve root glia“ (SNG) und „intersegmental nerve root glia“ (ISNG). Die letzte Subgruppe der Neuropil-assozierten Gliazellen bildet die „interface glia“, die in der Regel als „longitudinal glia“ (LG) bezeichnet wird. Diese Zellen liegen entlang der longitudinalen Trakte. Alle Neuropil-assozierten Gliazellen zeichnen sich durch längliche ellipsoide Zellkörper und Kerne aus.

Die axonalen Trakte des PNS werden von so genannten „peripheral glia“ (PG) umhüllt. Diese Zellen positionieren sich entlang der peripheren Nerven und werden in „exit glia“ (EG; liegen an der Transitionszone von ZNS und PNS) und PG (liegen entlang der motorischen und sensorischen Trakte des PNS) unterteilt. Diese Bezeichnung stellt allerdings einen temporären Zustand dar, da alle in jüngeren Stadien am Rande des ZNS liegenden EG in die Peripherie auswandern und am Ende der Embryogenese als PG bezeichnet werden.

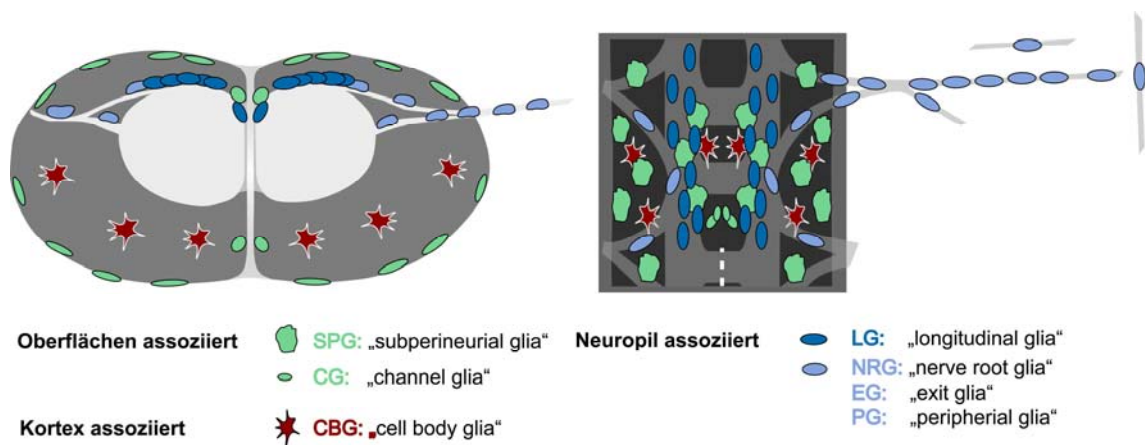


Abbildung 5: Klassifizierung der lateralen Gliazellen

Schematische Darstellung der lateralen Gliazellen im ZNS und PNS. (A) frontale Ansicht. (B) ventrale Ansicht; die gestrichelte Linie deutet die Mittellinie an. Die Klassifizierung erfolgt anhand von Position und Morphologie. Abbildung nach (Ito *et al*, 1995).

1.2.3 Migration der Peripheren Gliazellen

Eine, im Vergleich mit Neuronen, herausragende Eigenschaft von Gliazellen ist die Zellbeweglichkeit. Alle Gliazellen im ZNS und PNS sind in der Lage als ganze Zellen an ihre Zielposition zu wandern, während die Neurone in der Regel an ihrem Geburtsort verharren und zelluläre Fortsätze, Axone und Dendriten, ausstrecken. Die Gliazellen legen dabei unterschiedlich große Strecken zurück, wobei die PGs den längsten Weg migrieren. Einige der PGs werden im ZNS geboren und wandern im Laufe der Embryonalentwicklung entlang der axonalen Trakte in die Peripherie. Abb. 6 zeigt eine schematische Darstellung der PG-Wanderung im Einklang mit dem Auswachsen der Axone der peripheren motorischen und sensorischen Neurone. Im späten Stadium 12 liegen die PGs noch an ihrem Geburtsort an der ZNS/PNS Grenze (Exit oder Transitionszone= TZ) und besitzen eine runde, kompakte Morphologie. Bereits kurz nach der Entstehung der ersten PGs projiziert das Pionierneuron aCC des

Intersegmentalnerv (ISN) in ihre Richtung und bildet Kontakt mit den PGs (Abb. 6 A). Im Verlauf von Stadium 13 werden mehr PGs geboren, und sechs bis sieben Zellen liegen nun an der TZ, wo sie sich zu einer Art Schacht formieren (Abb. 6 B). Der Wachstumskegel des Motoneurons aCC wird durch diesen Schacht aus dem ZNS in die Peripherie geleitet. Diese Struktur dient auch den später ins ZNS einwachsenden sensorischen Fasern als Leitschiene. Die PGs im Exit sind folglich Wegweiser für motorische und sensorische Axone (Sepp *et al.*, 2001). Mitte Stadium 13 erreicht der Wachstumskegel von aCC das laterale Chordotonalorgan und faszikuliert mit den Axonen der sensorischen Neuronen (Abb. 6 C). Entlang dieser axonalen Faszikel beginnen nun die PGs ihre Migration in die Peripherie. Eine Pionierglia verlässt das ZNS als erste und führt die anderen PGs an. Dabei verbleiben die PGs stets hinter dem Pionierneuron. Im Verlauf der Migration sind die Gliazellen immer mit den axonalen Trakten verbunden, wobei eine bevorzugte Adhäsion zu den sensorischen Fasern besteht (Sepp *et al.*, 2000). Zu Beginn ihrer Wanderung sind die PGs mit dem anterioren Faszikel/ISN und dem posterioren Faszikel/Segmentalnerv (SN) assoziiert. Nur eine PG migriert am SN und sendet zytoplasmatische Ausläufer entlang der Projektionen der ventralen Chordotonalorgane (vch und v'ch), die am Ende der Embryonalentwicklung von dieser Zelle vollständig umhüllt werden (Sepp *et al.*, 2000). Alle anderen PGs reihen sich perlschnurartig entlang des ISN auf und breiten sich nach dorsal aus, bis sie auf die zytoplasmatischen Ausläufer einer im PNS entstandenen PG stoßen.

Das Migrationsverhalten der PGs im Wildtyp wird in von Hilchen *et al* mittels 4D-Mikroskopie detailliert beschrieben (von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung). Die Axone der sensorischen Neurone erreichen in der Zwischenzeit die TZ und werden durch den kegelförmigen glialen Schacht ins ZNS geleitet (Abb. 6 D). Es konnte gezeigt werden, dass, in Abwesenheit von PGs, die sensorischen Neurone an den falschen Stellen ins ZNS eintreten oder gar nicht erst das ZNS erreichen. Auch die Pionieraxone der Motoneurone entwickeln abnormales Wanderungsverhalten bei Verlust von PGs (Sepp *et al.*, 2001). Am Ende der Embryonalentwicklung umhüllen die PGs die sensorischen Trakte vollständig. Die motorischen Trakte sind nur in Bereichen umhüllt, in denen sie mit sensorischen Axonen assoziiert sind. Die Enden der Motoneurone sind im Embryo nie von Gliazellen ummantelt, möglicherweise, um eine Behinderung bei der Zielerkennung und der synaptischen Konsolidierung zu verhindern (Sepp *et al.*, 2000).

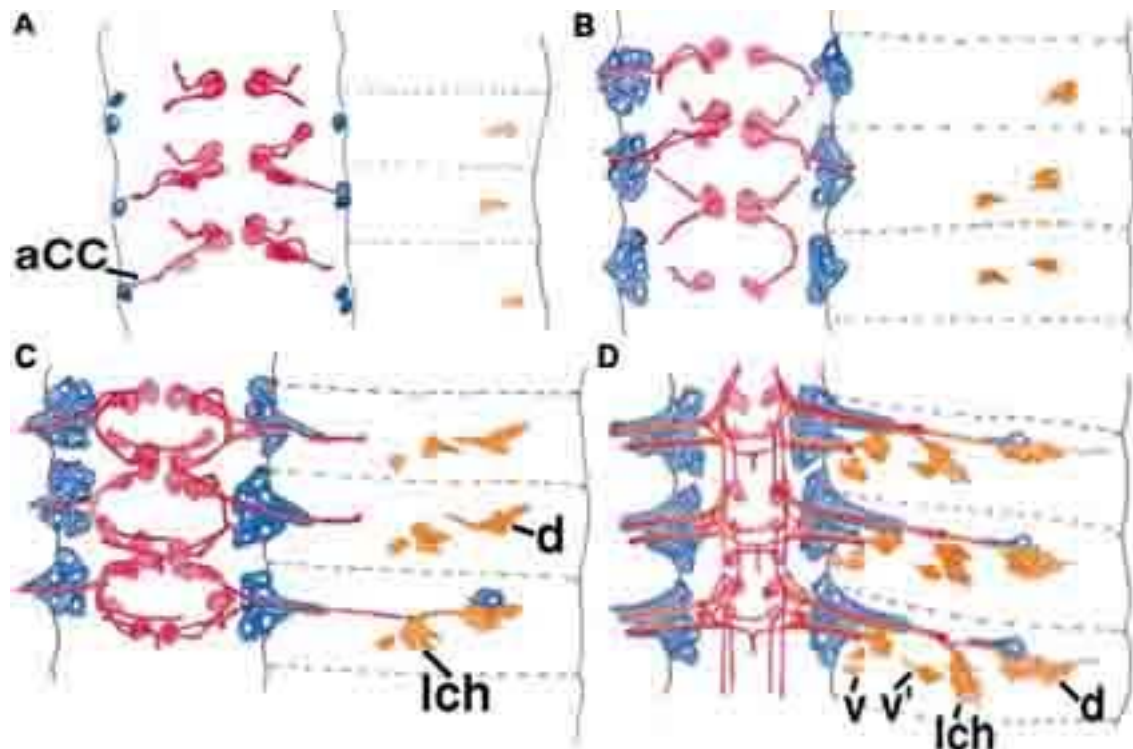


Abbildung 6: Migration der peripheren Gliazellen

Schematische Darstellung der Entwicklung des peripheren Nervensystems und der Wanderung der peripheren Gliazellen. Anterior ist oben; ZNS ist links. Periphere Gliazellen (PG; blau); Motorneurone (rot); sensorische Neurone (gelb). (A) Stadium 12.1; Das Axon des Pioniermotorneurons aCC kontaktiert die PGs an der ZNS/PNS-Grenze. (B) frühes Stadium 13; Die PGs proliferieren, der aCC-Wachstumskegel tritt aus dem ZNS aus und sensorische Neurone entstehen in der Peripherie. (C) Stadium Mitte 13; aCC erreicht das laterale Chordotonalorgan und die sensorischen Neurone faszikulieren mit den Motorneuronen. Die PGs beginnen ihre Wanderung entlang der axonalen Faszikel. (D) Stadium 14; die sensorischen Nerven werden durch die kegelförmig positionierten Gliazellen in das ZNS geleitet. Die PGs setzen ihre Wanderung in die Peripherie fort. lch= laterales Chordotonalorgan, v= ventrales Cluster sensorischer Neurone, v'= ventrales Cluster sensorischer Neurone, d= dorsales Chordotonalorgan. Abbildung aus (Sepp *et al*, 2001).

Im Laufe der Larvalentwicklung jedoch werden auch diese Enden der Motoneurone vollständig von Gliazellen bedeckt. In der Larve unterscheidet man zwischen perineurialen und subperineurialen Gliazellen. Die subperineurialen Gliazellen verbinden sich über „septate junctions“ und bilden die Blut-Nerven-Schranke, während die perineuriale Glia eine äußere Hülle um die gesamten axonalen Trakte formt. Welche der embryonalen PGs zur Perineurial- oder Subperineurialglia wird, ist bis jetzt nicht bekannt.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Die Klassifizierung der lateralen Gliazellen basiert auf der Morphologie der Zellen und ihrer Position im Bauchmark. Aber greift diese Einteilung auch auf molekularer Ebene, indem Zellen eines Subtyps dem gleichen molekularen Spezifizierungsprogramm unterliegen? Ist es möglich, die Gliazellen genetisch zu gruppieren? Und wenn ja, ist diese molekulare Klassifizierung mit der Einteilung nach morphologischen und positionellen Kriterien vergleichbar? Um diese Fragen zu beantworten, habe ich die Expression von fast 50 molekularen Markern in abdominalen Segmenten von Stadium 16 Embryonen im ZNS und PNS analysiert. Die analysierten Marker setzen sich aus Enhancer Trap Linien, spezifischen Antikörpern und mRNA Sonden zusammen und spiegeln verschiedene Proteinklassen wider. Der Großteil der untersuchten Marker kodiert für Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das Lückengen *huckebein (hkb)*, Paarregelgene wie *fushi tarazu (ftz)*, *runt* und *odd paired (opa)* und die Segmentpolaritätsgene *wingless (wg)*, *engrailed (en)*, *gooseberry (gsb)*, *ladybird (ldb)* und *mirror (mirr)*. Untersucht wurden auch die temporären Spezifizierungsgene *hunchback (hb)*, *POU domain 1 (pdm1)* und *castor (cas)*, die kolumnären Gene *muscle segment homeobox (msh)* und *ventral nervous system defective (vnd)* und bekannte gliale Differenzierungsfaktoren, wie *reversed polarity (repo)*, *pointed (pnt)*, *prospero (pros)*, *fire exit (fie)*, *nervana2* und *gliotactin*. Die anderen Proteinklassen setzen sich aus Enzymen, Transmembranproteinen, RNA- oder DNA-Bindefaktoren und Komponenten von Signalwegen zusammen. Zudem lieferte ein in unserem Labor durchgeführtes Mikroarrayexperiment zur Identifizierung von glialen Faktoren eine Reihe von unbekanntem Kandidatengenen, die mittels *in Situ* Hybridisierung analysiert wurden (Altenhein *et al.*, 2006). Das Ziel war, anhand der Expressionsdaten möglichst vieler Markergene eine molekulare Klassifizierung der Gliazellen vorzunehmen. Die Kenntnisse über die Expression der molekularen Marker stellen außerdem gute Werkzeuge für die phänotypische Charakterisierung von Mutanten dar.

Die Analyse von Mutanten ist eine wichtige Methode zur Untersuchung von biologischen Mechanismen auf genetischer, molekularer und zellulärer Ebene. Genaue Kenntnisse der zu untersuchenden Strukturen im Wildtyp sind Voraussetzung zur Identifizierung und Charakterisierung von Genfunktionen, die an der Entstehung dieser

Strukturen beteiligt sind. Wir haben uns die Frage gestellt, welche genetischen Prozesse in der Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen eine Rolle spielen. Die detaillierte Analyse der Identität der Gliazellen in der Peripherie anhand der molekularen Marker, schuf eine gute Basis für eine Mutantanalyse. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Christian Klämbt (Universität Münster) wurde eine EMS-Mutagenese durchgeführt. Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit stelle ich die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung und der Kartierung von 34 EMS Mutanten vor, die Defekte im Muster der peripheren Gliazellen zeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

2.1.1 Fliegenzucht

Die Fliegen werden auf *Drosophila*-Standardmedium in wieder verwendbaren Kulturgefäßen (Ø 25 und 50 mm) bei 25°C gehalten. Diese sind mit luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen. Zur Verbreiterung der Stämme werden die Kulturgefäße alle drei Tage abgeschüttelt und die Fliegen in neue Gefäße gesetzt. Die Generationsdauer unter diesen Bedingungen beträgt 220 Stunden (Ashburner 1982), was allerdings, je nach Stamm, leicht variieren kann. Bei geplanten Versuchen werden die Fliegen drei Tage vor der gewünschten Eiablage mit Trockenhefe angefüttert. Stämme, die nicht für Experimente verwendet werden, werden bei 18°C gehalten. Die Generationsdauer verlängert sich dann auf ca. 440 Stunden.

2.1.2 Herstellung von Apfelagar-Röhrchen und Eiablage

Zur Herstellung von Apfelagar-Röhrchen wird 1 Liter handelsüblicher Apfelsaft mit 28 g Agar-Agar aufgekocht und ca. 1 cm dick in Kulturgefäße gegossen. Die Röhrchen werden auf 4°C gelagert und können so bis zu vier Wochen verwendet werden.

Zur Eiablage sollten Fliegen verwendet werden, die nicht jünger als eine halbe Woche und nicht älter als zwei Wochen sind. Diese Tiere werden drei Tage vorher mit Trockenhefe angefüttert, bevor sie auf die Apfelagar-Röhrchen überführt werden. Die Apfelagar-Röhrchen werden ebenfalls mit ein wenig Hefe bestreut. Die Fliegen werden dann auf 25°C, 18°C oder 29°C gestellt. Für immunohistochemische Methoden werden Übernachtsablagen benutzt, in denen sich ein breites Spektrum an Entwicklungsstadien befindet. Um eine homogene Ablage eines bestimmten Stadiums zu bekommen, werden Stundenablagen genommen. Diese werden anschließend auf 25°C, 18°C oder 29°C inkubiert, bis das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht ist.

2.1.3 Fliegenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
Oregon-R	Wildtyp	Bloomington
Mz97, nGFP	Mz97-Gal4, stinger::GFP/ Mz97-Gal4, stinger::GFP	UAS- AG Technau (Ito <i>et al.</i> , 1995) UAS-
<i>castor</i> ^{<i>jl</i>c2}	<i>castor</i> ⁻ /TM3, Sb	Bloomington
<i>repo</i> -Gal4	<i>repo</i> -Gal4/ <i>repo</i> -Gal4; <i>repo</i> -Gal4/TM6b	Christian Klämbt (Edenfeld <i>et al.</i> , 2006)
LacZ-Linien		
ryXho25	<i>engrailed</i> -lacZ	(Hama <i>et al.</i> , 1990)
<i>fushi tarazu</i> -lacZ	<i>fushi tarazu</i> -lacZ	Bloomington
<i>spalt major</i> -lacZ	<i>spalt major</i> -lacZ	Bloomington
<i>huckebein</i> -lacZ	<i>huckebein</i> -lacZ	C.Q. Doe (Doe 1992)
3-101-lacZ	3-101-lacZ	Christian Klämbt
3-66	3-66-lacZ	Christian Klämbt
201	r150	Christian Klämbt
250	H15/CyO	Christian Klämbt
239	AO75/TM3	Christian Klämbt
J29	J29-lacZ	Christian Klämbt
Y15	Y15-lacZ	Christian Klämbt
M84	M84-lacZ	Christian Klämbt
P101	P101-lacZ	Christian Klämbt
209	1275-lacZ/TM3	Bill Chia
<i>wingless</i> -lacZ	<i>wingless</i> -lacZ	(Broadus <i>et al.</i> , 1995)
<i>mirror</i> -lacZ	<i>mirror</i> -lacZ	(Broadus <i>et al.</i> , 1995; McNeill <i>et al.</i> , 1997)
<i>seven up</i> -lacZ	<i>seven up</i> -lacZ	(Mlodzik <i>et al.</i> , 1990)
UAS-lacZ	UAS-lacZ	Bloomington

Gal4-Linien		
<i>dEAAT1</i> -Gal4	<i>dEAAT1</i> -Gal4	Bloomington
<i>nervana2</i> -Gal4	<i>nervana2</i> -Gal, UAS-CD8:: <i>GFP</i>	Bloomington
Mz813-Gal4	Mz813-Gal4/TM3	AG Technau
<i>scabrous</i> -Gal4	<i>scabrous</i> -Gal4	Uwe Hinz (Ellis <i>et al.</i> , 1994)
<i>engrailed</i> -Gal4	<i>engrailed</i> -Gal4	Andrea Brand
<i>castor</i> -Gal4	<i>castor</i> -Gal4	(Hitier <i>et al.</i> , 2001)
UAS-Linien		
UAS-CD8:: <i>GFP</i>	UAS-CD8:: <i>GFP</i>	Bloomington
UAS-stinger:: <i>GFP</i>	UAS-stinger:: <i>GFP</i>	(Barolo <i>et al.</i> , 2000)
UAS- <i>castor</i>	UAS- <i>castor</i>	Ward Odenwald
UAS-gap:: <i>GFP</i>		Bloomington
Balancer-Linien		
<i>w</i> ;TM3, <i>Sb</i> , <i>Ser</i> , <i>e</i> /TM6b, <i>Tb</i> , <i>Hu</i> , <i>e</i>		Olaf Vef
<i>yw</i> , <i>N^l</i> / FM7c, <i>twi</i> -Gal4, UAS- <i>eGFP</i>		Bloomington
<i>ww</i> ; TM3, <i>kr</i> -Gal4, UAS- <i>GFP</i> , <i>Sb</i> , <i>e</i> /TM6b <i>abdA-lacZ</i>		Olaf Vef
<i>Ant-Hu</i> , <i>e</i>		
eigene Linien		
Mz813-Gal4, n <i>GFP</i>	Mz813-Gal4, n <i>GFP</i>	R. Beckervordersandforth
Mz813-Gal4,CD8:: <i>GFP</i>	Mz813-Gal4, CD8:: <i>GFP</i>	R. Beckervordersandforth
EMS Mutanten		
EMS 38	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 49	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 56	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 97	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 101	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 132	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 195	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 260	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 298	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 308	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 336	Mz97, n <i>GFP</i> /CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau

EMS 356	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 360	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 388	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 391	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 441	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 445	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 512	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 638	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 644	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 658	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 667	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 670	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 874	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 925	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 1878	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 2085	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau
EMS 2108	Mz97, nGFP/CyO, <i>tub</i> -Gal80	AG Technau

Tabelle 1: Liste der verwendeten Fliegenstämme

Alle zur Kartierung der EMS Mutanten verwendeten Defizienzen werden im Anhang aufgeführt.

2.1.4 Kreuzungen

Für Kreuzungsexperimente müssen von einem der beiden Fliegenstämme jungfräuliche Fliegen gesammelt werden. Man hält hierfür die Parentalfliegen einige Tage zur Eiablage in frischen Zuchtgefäßen und entfernt die Fliegen danach. Wenn die Fliegen der F1-Generation schlüpfen, werden diese mit CO₂ betäubt und unter Kontrolle im Binokular nach Männchen und Weibchen getrennt. Das Absammeln der F1-Fliegen erfolgt bei 25°C alle vier bis sechs Stunden, bei 18°C alle 12 Stunden. Diese Zeitintervalle verhindern die Begattung der Weibchen durch die gleichzeitig schlüpfenden Männchen, da diese in der kurzen Zeit keine Geschlechtsreife entwickeln. Hat man genügend weibliche Fliegen gesammelt, können sie mit den Männchen des zweiten

Stammes verpaart werden, wobei Weibchen zu Männchen im Verhältnis 1:3 zusammengesetzt werden.

2.1.5 Balancieren von Mutationen

Viele Mutationen verursachen Letalität im homozygoten Zustand und würden innerhalb weniger Generationen verloren gehen. Mit Hilfe der so genannten Balancerchromosomen (Lindsley 1992) können Mutationen langfristig im heterozygoten Zustand gehalten werden. Die Balancerchromosomen tragen vielfältige Aberrationen, die Rekombination verhindern, und Letalfaktoren, sodass nur heterozygote Fliegen überleben können. Gleichzeitig tragen viele Balancerchromosomen Markergene, die so genannten „Blue-“ oder „Green-“ Balancer, die die Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren ermöglichen. „Blue-Balancer“ tragen als Reportergen β -Galaktosidase (*lacZ*), das durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden kann. Bei „Green-Balancern“ ist das *lacZ* durch das aus der Qualle stammende grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt. Das GFP kann durch Fluoreszenzlicht angeregt werden.

2.1.6 Ektopische Expression mithilfe des UAS/Gal4-Systems

Das UAS/GAL4 System nach Brand und Perrimon (Brand und Perrimon 1993) erlaubt eine gerichtete räumliche und zeitliche Genexpression in *Drosophila*. Hierbei werden transgene Fliegenstämme benutzt, die transposoninduzierte Insertionen tragen (siehe Abb. 7). Die Gal4- oder Treiberlinie erhält ein transposables Element (P-Element), das für das aus der Hefe stammende Galaktosidase-Gen (*Gal4*) kodiert. Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor aus Hefe, der an die so genannten „upstream activating sequences“ (UAS) bindet. Durch die Insertion wird das Gal4-Gen unter die Kontrolle eines endogenen Enhancers gebracht und in dem gewebe-, zell- und zeitspezifischen Muster des Enhancers exprimiert. Der zweite Stamm trägt ein P-Element mit dem zu exprimierenden Gen und mehreren UAS-Sequenzen. Die Verkreuzung der beiden Stämme führt zur Bindung der Galaktosidase an die UAS-Sequenzen und zur Expression des Zielgens in Abhängigkeit des Gal4-regulierenden Enhancers. Die Auswahl geeigneter Gal4-Stämme ermöglicht die zeit- und gewebespezifische Expression des Zielgens.

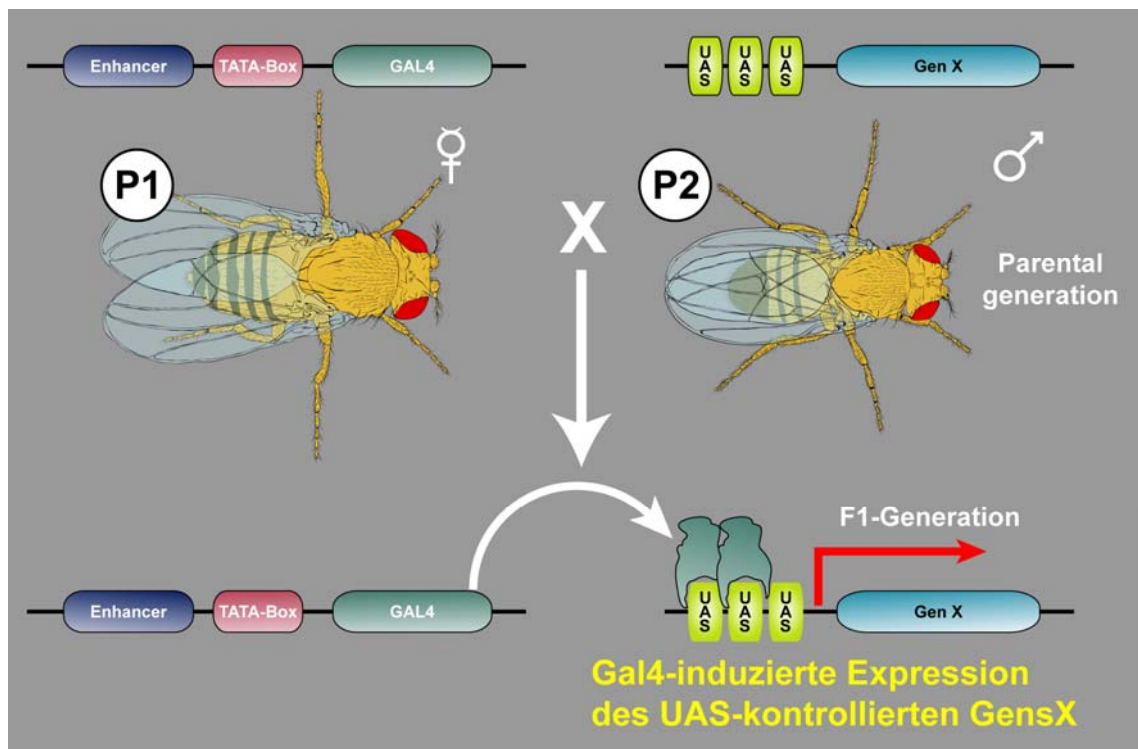


Abbildung 7: Das UAS-Gal4-System

Fliegen des Treiberstammes (P1) exprimieren Gal4 unter der Kontrolle eines lokalen Enhancers. Diese werden mit Tieren des UAS-Stammes (P2) verkreuzt. In den Nachkommen kann das Gal4-Protein an die UAS-Sequenzen binden und das dahinter liegende Gen X aktivieren. (Mit freundlicher Genehmigung von Christian Berger)

2.1.7 Rekombination

Liegen zwei Gene, von denen man unterschiedliche Allele miteinander kombinieren möchte, auf demselben Chromosom, muss man die beiden Gen-tragenden Abschnitte miteinander rekombinieren. Aus dem Abstand der beiden Gene auf dem Chromosom lässt sich die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der ein solches Rekombinationsereignis auftritt. Eine Rekombinationswahrscheinlichkeit von 1% ist ein centi-Morgan (1 CM) und entspricht, abhängig vom Locus, etwas 300 bis 500 kBp Abstand bei *Drosophila*. Die Männchen, die ein mögliches Rekombinationsereignis tragen, werden mit unabhängigen Allelen zurückgekreuzt und damit auf das Vorhandensein beider Allele geprüft. Diese Unabhängigkeit ist deshalb notwendig, weil mutante und balancierte Stämme mit der Zeit Letalfaktoren akkumulieren. Anhand der Rückkreuzung stellt man fest, ob das Rekombinationsereignis auf einem dieser Letalfaktoren beruht anstelle der gewünschten Mutation.

2.1.8 EMS Mutagenese

Die EMS-Mutagenese dient dem Ziel, weitere Gene zu identifizieren, die eine Rolle in der Differenzierung und Migration von Gliazellen spielen. Diese wurde in Kollaboration mit dem Institut für Neurobiologie der Universität Münster durchgeführt. Bei dieser Mutagenese wurden mehrere genetische Werkzeuge kombiniert, um die experimentelle Arbeit zu vereinfachen und die Effektivität zu steigern (Vef *et al.*, 2006). Mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems wird ein kernständiges „green fluorescent protein“ (stinger::GFP=nGFP) in Gliazellen exprimiert. Dafür wurde die Gal4-Linie Mz97 (Ito *et al.*, 1995), die in Gliazellen und Önozyten exprimiert, mit einem UAS-nGFP rekombiniert. In dieser Arbeit wird der Genotyp von Mz97-Gal4, UAS-stinger::GFP als Mz97, nGFP angegeben. Die GFP positiven Zellkerne der Mz97 exprimierenden Zellen ermöglichen nun die Identifizierung der Gliazellen im Fluoreszenzmikroskop *in vivo*. EMS-Mutanten, die Defekte in der Differenzierung und/oder Migration der Gliazellen entwickeln, können also direkt an ihrem Phänotyp im GFP-Muster erkannt werden. Dazu muss, aufgrund der Verwendung von GFP, keine zusätzliche Antikörperfärbung durchgeführt werden, was einen viel geringeren Arbeitsaufwand und die Einsparung von teurem Material bedeutet. Mz97, nGFP diente als Ausgangsstamm für die Mutagenese mit Ethylmethylsulfonat (EMS), einem Mutagen, das vorwiegend Punktmutationen induziert. EMS wurde an Männchen dieses Ausgangsstammes verfüttert und auf Letalität getestet. Auf diese Weise wurden ca. 2100 homozygot letale Mutationen auf dem zweiten Chromosom induziert. Die homozygot mutanten EMS-Stämme wurden mit Jungfrauen verkreuzt, die ein CyO-tub-Gal80 Chromosom und ein (Sco) DTS Chromosom tragen (DTS = „dominant temperature sensitive“). Das (Sco) DTS Chromosom trägt eine rezessive Letalmutation und eine temperatursensitive Mutation, die bei einer Temperatur von 29°C dominant letal ist. Diese Fliegen wurden von 20°C auf 29°C gestellt, sodass nur die Fliegen überleben, die nicht das DTS Chromosom tragen (siehe Abb. 8 A), sondern den Gal80-Balancer. Das Balancieren der Mutanten mit dem DTS Chromosom spart Zeit, da das Sammeln der CyO-Gal80-Jungfrauen wegfällt. Das durch alpha1 Tubulin getriebene und somit ubiquitär exprimierte Gal80 ist ein Repressor von Gal4 (Lee und Luo 1999). Wie in Abb. 8 B dargestellt, dient es zur Identifizierung der homozygot mutanten Embryonen, bei denen die Gal4-Aktivität als einzige nicht unterdrückt wird und GFP exprimiert werden kann. Somit können die homozygoten mutanten Tiere direkt anhand der GFP-Fluoreszenz von den heterozygoten unterschieden werden.

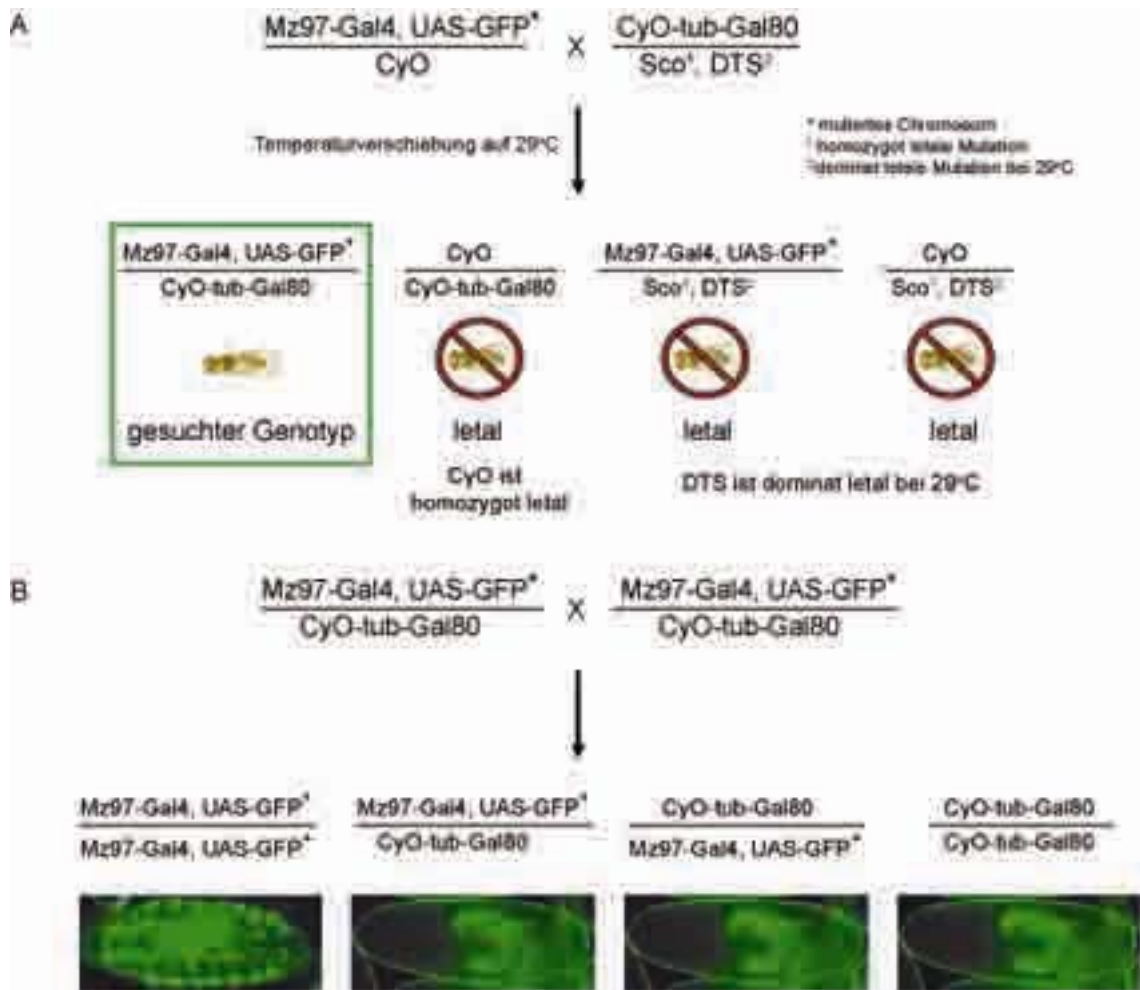


Abbildung 8: Strategie der EMS-Mutagenese für das zweite Chromosom

(A) Umbalancierung ohne das Sammeln von Jungfrauen: Männchen, die das mutierte Chromosom mit dem gliaspezifischen Gal4-Treiber und der UAS-nGFP Insertion tragen (balanciert über CyO), werden mit Weibchen verkreuzt, die ein tub-Gal80 Balancerchromosom über einem Sco, DTS Chromosom tragen. Bei der Temperaturverschiebung auf 29°C sterben alle Tiere, die die DTS Mutation tragen. (B) Identifizierung der homozygot Mutanten: in allen Embryonen, die den tub-Gal80 Balancer tragen, wird Gal4 reprimiert. Das GFP wird also nur in den homozygot mutant Embryonen exprimiert, die dadurch leicht von den Heterozygoten zu unterscheiden sind. Diese werden im Hinblick auf ihr Gliamuster analysiert (Abb. aus Vef *et al.*, 2006).

2.2 Antikörperfärbung

2.2.1 verwendete Antikörper

Antikörper	Tier	Verd.	Herkunft
primäre Antikörper			
anti-Repo (4 α 3)	Kaninchen	1:500	Joachim Urban Halter et al., 1995
anti-Repo	Maus	1:10	DSHB
anti-Gooseberry (proximal und distal)	Ratte	1:2	B. Holmgren (Zhang et al.,)
anti-Msh	Kaninchen	1: 500	M. P. Scott
anti-Ladybird early	Maus	1:2	Jagla et al., 1997
anti-Castor	Kaninchen	1:500	Ward Odenwald
anti-Deadpan	Kaninchen	1:250	H. Vässin Bier et al., 1998
anti-Pdm1	Kaninchen	1:500	Yeo et al., 1995
anti-Hunchback	Meerschweinchen	1:1000	Joachim Urban Mettler et al., 2006
anti- β Gal	Maus	1:700	Promega
anti- β Gal	Kaninchen	1:1000	Cappel
anti-GFP	Maus	1:1000	DSHB
anti-Zfh1	Maus	1:200	Lai et al., 1991 Fortini et al., 1991
anti-Prospero	Maus	1:5	DSHB
anti-Fas2	Maus	1:10	DSHB
anti-Futsch (22C10)	Maus	1:10	DSHB
anti-Digoxigenin-POD	Maus	1:500	Roche
anti-Digoxigenin-AP	Maus	1:1000	Roche
sekundäre Antikörper			
anti-Kaninchen-Cy5	Esel	1:500	Jackson Laboratories
anti-Kaninchen-Cy3	Esel	1:500	Jackson Laboratories
anti-Maus-Cy3	Esel	1:500	Jackson Laboratories

anti-Hühnchen-FITC	Esel	1:500	Jackson Laboratories
anti-Maus-FITC	Esel	1:500	Jackson Laboratories
anti-Maus-Cy5	Ziege	1:500	Jackson Laboratories
anti-Kaninchen-FITC	Ziege	1:500	Jackson Laboratories
anti-Meerschweinchen- Cy3	Ziege	1:500	Jackson Laboratories
anti-Maus-Alexa	Ziege	1:500	Invitrogen
anti-Kaninchen-Biotin	Ziege	1:500	Dianova
anti-Maus-Biotin	Ziege	1:500	Dianova
anti-Kaninchen-AP	Ziege	1:500	Dianova
anti-Maus-AP	Ziege	1:500	Dianova

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper

2.2.2 Fixierung und Devitellinisierung

Die Embryonen in den Eiablagen werden zum Entfernen des Chorions für zwei Minuten mit 7,5% Chlorbleiche überschichtet. Nach gründlichem Spülen mit Wasser werden sie in ein Reaktionsgefäß mit frisch angesetzter Fixierlösung überführt und für 22 Minuten unter starkem Schütteln fixiert. Anschließend wird die untere, wässrige Lösung aus PEMS-Puffer und Formaldehyd abgezogen und in gleichem Volumen durch Methanol ersetzt. Gründliches Vortexen, zusammen mit den Scherkräften an der Phasegrenze Heptan/Methanol, lösen die zweite Schutzhülle des Embryos, die Vitellinmembran. Die devitellinisierten Embryonen sinken zu Boden. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, bis so viele Embryonen wie möglich, abgesunken sind. Dann wird die gesamte Lösung durch Methanol ersetzt. Nach mehrmaligem Spülen mit Methanol können die Embryonen entweder bei -20°C mehrere Monate gelagert oder, wie im Folgenden beschrieben, direkt gefärbt werden. Das Methanol wird dann durch PBT ersetzt. Mehrmaliges Waschen für ca. 15 Minuten entfernt sämtliche Methanolrückstände. Fixierung und Devitellinisierung werden für Antikörperfärbung und *in Situ* Hybridisierung weitestgehend gleich gemacht. Nur die Fixierlösung unterscheidet sich in ihrer Konzentration.

2.2.3 Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Die primären Antikörper werden bei 4°C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Dabei führt die niedrige Temperatur erfahrungsgemäß zu einem guten Bindungsverhalten der Antikörper. Am nächsten Tag wird der nicht gebundene Antikörper durch intensives Waschen mit PBT entfernt. Die Antikörper werden bei 4°C gelagert und können mehrfach verwendet werden. Bei längerer Lagerung kann der Antikörper mit 0,01% Natriumazit versetzt werden. Dies beugt einer Kontamination, z. B. durch Schimmelpilze, vor.

Danach folgt die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern. Diese werden im Verhältnis 1:250 in PBT verdünnt und für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur (RT) oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach gründlichem Abwaschen des nicht gebundenen Antikörpers erfolgt die Signaldetektion.

2.2.4 Signaldetektion

2.2.4.1 Fluoreszenzfärbung

Die Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten, sekundären Antikörpern erfolgt im Dunkeln. Nach mehrmaligem Waschen mit PBT und PBS werden die Embryonen in „mounting medium“ der Firma Vectashield überführt, bei 4°C im Dunkeln gelagert oder direkt filepräpariert. Eine Lagerung ist nur begrenzt möglich, da die an den Antikörper gekoppelten fluoreszierenden Konjugate im Laufe der Zeit ausbleichen. Diese Konjugate werden durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlängen zur Emission langwelligeren Lichtes angeregt. Verwendet wurden Antikörper, die mit FITC oder Alexa-488 (Anregungswellenlänge: 488nm), Cy3 (yanin3; 543nm) oder Cy5 (Cyanin5; 633nm) gekoppelt sind. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscan Mikroskop.

2.2.4.2 Meerrettichperoxidase-Färbung

Bei dieser zweiten Färbemethode werden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet. Eine Verstärkung der Farbreaktion wird über eine AB-Komplex-Lösung (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) hervorgerufen. Diese besteht aus Streptavidin und Avidin, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase und soll mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch angesetzt werden. Streptavidin komplexiert mit Avidin und bindet an Biotin, wodurch eine hochsensitive Verstärkung erzielt wird. Die Embryonen werden für eine

Stunde in der A/B-Lösung bei RT inkubiert. Es wird erneut gründlich mit PBT gewaschen, bevor die Nachweisreaktion mit durch Wasserstoffperoxid ($H_2 O_2$) aktivierter DAB-Lösung erfolgt. Das DAB wird dabei durch die Peroxidaseaktivität in einen braunen Niederschlag umgesetzt. Die Stärke der Färbung hängt von der Länge der Enzymreaktion ab. Die Färbung wird unter dem Binokular beobachtet und durch Zugabe von PBT abgestoppt. Die Embryonen werden nach Waschen mit PBS in 70% Glycerin aufbewahrt oder für eine anschließende AP-Färbung in Detektionspuffer überführt.

2.2.4.3 alkalische Phosphatase-Färbung

Hier wird ein Sekundärantikörper eingesetzt, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Diese Färbemethode wird bei allen *in Situ* Hybridisierungen angewendet. Die alkalische Phosphatase ist nur im alkalischen Milieu aktiv, weshalb nach den Waschschrritten ein so genannter Detektionspuffer verwendet wird, der einen pH-Wert von 9,5 hat. Bei Zugabe von NBT und BCIP, als Substrat der alkalischen Phosphatase, erfolgt eine Farbreaktion, die zu einem Ausfall eines wasserunlöslichen, blauschwarzen Salzes führt. Die Färbung wird unter dem Binokular beobachtet und durch Zugabe von PBT, das den pH-Wert neutralisiert, abgestoppt. Die Farbreaktion wird endgültig durch anschließendes Waschen mit Methanol abgestoppt, was außerdem den Schwarzanteil aus der Färbung herauswäscht. In einer Doppelfärbung mit Meerrettichperoxidase wird so ein stärkerer Kontrast erzeugt. Nach wiederholtem Waschen mit PBT und PBS werden die Embryonen in 70% Glycerin gegeben und können so jahrelang aufbewahrt werden.

2.2.5 Dokumentation der Färbungen

Die fluoreszent gefärbten Embryonen wurden aus dem „mounting medium“ auf einen Objektträger in einen Tropfen 70%iges Glycerin überführt und filetiert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscan Mikroskop der Firma Leica (TCS SPII). Die sequenziell gescannten Bilder werden mit der Leica Confocal Software bearbeitet.

Die sichtbaren Meerrettichperoxidase- und alkalische Phosphatase-Färbungen werden ebenfalls in einen Tropfen 70%iges Glycerin auf einen Objektträger gegeben und filetiert. Diese Auswertungen erfolgten an einem Mikroskop mit Kamera (Axiocam).

Alle Bilder wurden im Anschluss mit der Adobe Photoshop Software bearbeitet.

2.3 *in Situ* Hybridisierung

2.3.1 Herstellung der mRNA-Sonden

Die Expression einiger Markergene wurde durch *in Situ* Hybridisierung (ISH) mit spezifischen mRibonukleinsäure-Sonden (mRNA-Sonden) nachgewiesen. Zur Herstellung dieser Sonden verwendete man cDNA, revers-komplementär transkribierte RNA, als Matrize. Die cDNAs stammten aus einer Kollektion von „expressed sequence tags“ (ESTs, *Drosophila* Genome Collection Release 1 und 2 vom Berkley *Drosophila* Genome Projekt). Alle cDNAs, für die es keinen EST-Klon in dieser Kollektion gab, wurden selbst hergestellt, amplifiziert, aufgereinigt und kloniert (siehe unten). Die Plasmid-DNA wurde präpariert (Mini Preparation Kit, QUIAGEN) und für die *in vitro* Transkription mittels Restriktionsenzymen linearisiert. Über Gelelektrophorese wird der Erfolg der Restriktion und die Größe der DNA-Fragmente kontrolliert. Etwa 1µg linearisierte Matrizen-DNA wird nun von einer RNA-Polymerase bei 37°C in RNA umgeschrieben. Dabei werden Digoxigenin-tragende Uraciltriphosphate (UTPs, RNA-Dig Labelling Mix, Roche) in den RNA-Strang eingebaut, an die später ein α-DIG Antikörper binden kann. Durch Zugabe von DNaseI wird die Matrizen-DNA abgebaut, und Fällung mit LiCl entfernt alle nicht eingebauten Nukleotide. Die Sonden werden in DEPC-Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.3.2 Konzentration der mRNA-Sonden

Über einen so genannten „dot test“ wird bestimmt, in welcher Konzentration die Sonden verwendet werden sollen. Hierbei wird 1µl der Sonde auf eine positiv geladene Nylonmembran gegeben. Die RNA wird mit UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden (1200KJ/cm²). Unspezifische Bindestellen werden durch Waschen mit Blockingpuffer abgesättigt. Nach ca. 30 Minuten Inkubation mit einem AP-gekoppelten α-DIG Antikörper (1:7500) erfolgt, nach mehrmaligem Waschen, die Farbreaktion, wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben. Aus der Intensität der Färbung lässt sich die optimale Konzentration der Sonde folgern.

2.3.3 Hybridisierung

Die Fixierung erfolgte wie in 2.2.2 beschrieben. Alle Arbeiten mit den Sonden wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Die fixierten Embryonen werden durch mehrmaliges Waschen mit PBTween rehybridisiert. Für eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wird ein Reduktionsschritt eingeführt, indem die durch die Fixierung gebildeten Mehrfachbindungen aufgebrochen werden, und somit eine starke Autofluoreszenz verhindert wird. Hierzu werden die Embryonen für 10 Minuten mit Natriumborhydrid (0,001mg/1ml PBS) inkubiert und danach gründlich mit PBTween gewaschen. Anschließend tauscht man das PBTween schrittweise gegen Hybridisierungspuffer aus und prähybridisiert die Embryonen für eine Stunde bei 55°C. Um unspezifische Bindungsstellen der RNA-Sonden zu blocken, wird einzelsträngige Heringssperma-DNA zu der Hybridisierungslösung gegeben. Nach der Prähybridisierung werden die verwendeten Sonden bei 95°C für 5 bis 10 Minuten denaturiert und auf die Embryonen gegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht in einem auf 55°C temperierten Schüttler. Am Nächsten Tag werden die Sonden abgezogen und eingefroren, da sie mehrmals verwendet werden können. Es folgen stringente Waschschrte mit Hybridisierungslösung, 1:1 verdünnter Hybridisierungslösung und PBTween bei 65°C. Anschließend wird der AP- oder Peroxidase-gekoppelte α -DIG (POD) Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.3.4 Signaldetektion

Nachdem der Antikörper mit PBT ausgewaschen wurde, erfolgt die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben. Für die FISH werden die Embryonen mit TNT-Puffer gewaschen und anschließend für 10 Minuten in der Färbelösung (Cy3/Reaktionslösung 1:50; siehe Anleitung Perkin Elmar FISH Kit) inkubiert. Durch Waschen mit TNT-Puffer wird die Reaktion gestoppt. Nach erneuten Waschschrten mit PBT wird der sekundäre Antikörper bei Raumtemperatur dazugegeben und nach zwei Stunden mit PBT abgewaschen. Die gefärbten Embryonen werden in „mounting medium“ (Vectashield) gelagert.

2.3.5 *in Situ* Hybridisierung gekoppelt mit Antikörperfärbung

Bei einer ISH/FISH mit anschließender Antikörper Färbung wird der primäre Antikörper zusammen mit dem α -DIG Antikörper auf die Embryonen gegeben und über Nacht inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBT erfolgt die Inkubation des zweiten Antikörpers (biotinyliert oder Fluoreszenz-gekoppelt) bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Nach Auswaschen des sekundären Antikörpers erfolgt die AP-Färbung zur Detektion der ISH und erneutes gründliches Waschen mit PBT. Danach wird der A/B-Komplex angesetzt und die DAB-Färbung, wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt.

Bei einer FISH werden die Antikörper gegen α -DIG-POD und gegen das gewünschte Protein zusammen inkubiert. Die Inkubation der sekundären Antikörper erfolgt ebenfalls zusammen und die der Farbreaktion wie oben beschrieben.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Präparation von DNA

Für die meisten molekularbiologischen Arbeiten an DNA benötigt man diese in größeren Mengen, weshalb sie in der Regel als Plasmid-DNA kloniert vorliegt. Durch Transformation kompetenter Bakterien kann diese vermehrt und nachfolgend chemisch und chromatographisch aufgereinigt werden (alkalische Lyse und Aufreinigung an Silicasäulen, Plasmid Mini Kit, QUIAGEN). Zur Gewinnung von genomischer DNA (z. B. für inverse PCR, siehe unten) werden Wanderlarven in einem salz- und detergenzhaltigem Puffer zermahlen und bei 65°C inkubiert. Anschließend Fällung mit Lithiumchlorid/Kaliumazetat-Lösung und ethanolische Fällung liefern relativ saubere genomische DNA. Weitere Aufreinigung erfolgt über Phenol-Chloroformextraktion oder über Gelextraktion. Dafür werden die DNA-Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten, die Agarose wird in Guanidinthiocyanat aufgelöst, die DNA an Silicasäulen gebunden und in Tris-Puffer eluiert (QIAquick Gel Extraction Kit, QUIAGEN).

2.4.2 Herstellung von cDNA aus *Drosophila*-Embryonen

Aus Embryonen älterer Entwicklungsstadien wird Gesamt-RNA aufgereinigt (RNeasy Mini Kit, QUIAGEN). Im nächsten Schritt wird die in der Gesamt-RNA vorhandene polyadenylierte mRNA durch Reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern (Invitrogen) und reverser Transkriptase (*Superscript II*, Invitrogen) in cDNA umgeschrieben (c=complementary). Die entstandenen RNA:DNA-Heteroduplexe werden dann mit NaOH inkubiert, um den RNA-Anteil zu hydrolysieren. Anschließend wird mit HCl neutralisiert und die DNA-Einzelstränge werden aufgereinigt (PCR-Purification Kit, QUIAGEN). Die Ausbeute für einen Embryo liegt bei etwa 1ng polyA⁺-RNA.

2.4.3 PCR und Sequenzierung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung definierter DNA-Fragmente ausgehend von unterschiedlichen DNA-Matrizen. Das Grundprinzip der PCR ist die enzymatische Duplikation einer DNA-Sequenz, ausgehend von zwei Oligonukleotid-Primern, die jeweils komplementär zum (+)-Strang des einen Endes und zum (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region sind. In dieser Arbeit wurden die durch Reverse Transkription gewonnenen cDNAs zur Herstellung von RNA-Sonden amplifiziert. In einem zweiten Amplifikationsschritt, der „nested PCR“, wurden die cDNA-Mengen nochmals erhöht. Sofern die PCR-Produkte kloniert werden mussten, wurden sie aufgereinigt (QUIquick PCR Purifikation Kit, QUIAGEN) und in einen kommerziellen Vektor kloniert (pGEM-Teasy, Promega oder TOPO Cloning Kit, Invitrogen). Des Weiteren wurden über „Single-Embryo-PCR“ Exon- und Intronbereiche bestimmter Gene von einzelnen mutanten und wildtypischen Embryonen amplifiziert und sequenziert. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise, Mainz, durchgeführt.

2.4.4 Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese

Sowohl zur molekularen Charakterisierung (analytischer Verdau), als auch zur Herstellung zueinander kompatibler Enden für die Ligation in Vektoren, wird die DNA mit Restriktionsenzymen versetzt und bei 37°C inkubiert. Alle hier eingesetzten Enzyme stammen von Fermentas und New England Biolabs. Zur Analyse der DNA nach der Restriktion oder PCR wird diese in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Konzentration der Agarose betrug zwischen 0,5% für sehr große (> 3kb) und 1% für

kleine DNA-Fragmente (< 1kb). Als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Das EtBr wurde vor dem Gießen des Gels in die warme Agaroselösung gegeben. Als Größenreferenz wurden verschiedenen DNA-Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung mit aufgetrennt (λ -DNA x *EcoRI/HinDIII*, GeneRuler10bp-Ladder plus, beide Fermentas).

2.4.5 Bestimmung der Integrationsorte von P-Elementen durch inverse PCR und Plasmid-Rescue

Die bei der Herstellung transgener Fliegen verwendeten P-Elemente besitzen grundsätzlich ein Markergen, mit dem sich das Vorhandensein des P-Elements überprüfen lässt (z. B. *white*-Gen, *rosy*-Gen, *neomycin*-Resistenzgen). Das Chromosom, auf dem das P-Element inseriert hat, lässt sich sehr leicht anhand anderer dominanter Marker feststellen. Der chromosomale Abschnitt lässt sich über *in Situ* Hybridisierung an Polytäanchrosomen auf 100-200kBp genau feststellen, jedoch ist dies aufwendig und für manche Anwendungen zu ungenau (z. B. Nutzung von P-Element-Linien als hypomorphe oder amorphe Allele). Eine genaue Bestimmung des Integrationsorts ist möglich, wenn man die das P-Element umgebende genomische Sequenz amplifiziert und sequenziert. Bei beiden Methoden, inverse PCR und Plasmid-Rescue, wird die DNA durch Restriktionsenzyme verdaut. Dabei entsteht ein Fragment, das einen Anteil des P-Elements und ein Stück flankierender genomischer DNA enthält. In einer anschließenden Ligation werden alle Restriktionsfragmente durch eine T4-DNA-Ligase zirkularisiert. Wenn der P-Element-Anteil eine „origin-of-replication“ (ori) und ein Resistenzgen (z. B. Ampicillin oder Chloramphenicol) enthält, kann das gewünschte Fragment durch Transformation in kompetente Bakterien kloniert und sequenziert werden (Plasmid-Rescue). Fehlen diese für die bakterielle Amplifikation notwendigen Komponenten oder ist das „Rescue“-Fragment zu groß, kann man den genomischen Bereich durch auf dem P-Element liegende, entgegengesetzt orientierte Primer mittels PCR amplifizieren (inverse PCR). Für die inverse PCR nimmt man normalerweise Restriktionsenzyme, die häufig schneiden, um so kleinere Fragmente zu erzeugen und die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche PCR zu erhöhen. Über diese beiden Methoden habe ich die Lokalisation der P-Elemente für einige der Enhancer Trap Stämme ermittelt.

Enhancer Trap Linie	„getrapptes“ Gen	Methode
M84-lacZ	CG30358	Plasmid rescue
P101-lacZ	CG14148	Plasmid rescue
201-lacZ	CG1631	Plasmid rescue
250-lacZ	<i>spinster</i>	Plasmid rescue
3-101-lacZ	<i>pumillio</i>	Plasmid rescue
3-66-lacZ	<i>odd paired</i>	Plasmid rescue
209-lacZ	<i>invadolysin</i>	inverse PCR
239-lacZ	CG14959/CG12078	Plasmid rescue
Mz813-Gal4	<i>rolling stone</i>	Plasmid rescue
Mz97-Gal4	SP2637	Plasmid rescue

Tabelle 3: Integrationsorte der P-Elemente

2.5 Geräte und Materialien

2.5.1 Lösungen und Puffer

20xPBS (pH7,4)

1,3 M NaCl

0,07 M Na₂HPO₄

0,03 M Na₂H₂PO₄

Aus dieser Stammlösung wird 1xPBS angesetzt und weiterverwendet. 1xPBS wird im Folgenden als PBS bezeichnet.

1xPBT

1xPBS wird mit 0,1% Triton versetzt und wird weiterhin als PBT bezeichnet.

PBTween

1xPBS wird mit 0,1% Tween 20 versetzt.

PEMS

0,1 M Pipes-Puffer

1 mM MgSO₄

1 mM EGTA

1,2 M Sorbit

Fixativ für Antikörperfärbung

450µl PBS

600µl Heptan

70µl Formaldehyd (37%)

Fixativ für *in Situ* Hybridisierung

350µl PBS

500µl Heptan

150µl Formaldehyd (37%)

A/B Lösung

Puffer A: 2,84g NaHPO₄ – 0 H₂O in 100 ml H₂O

Puffer B: 2,76g NaHPO₄ – 1 H₂O in 100 ml H₂O

Eine Stunde vor Gebrauch gibt man 4 µl Lösung A und 4 µl Lösung B in 300 µl PBT, damit sich die Komponenten verbinden können.

DAB-Färbelösung:

Für Antikörperfärbung eine Tablette (10 mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in 40 ml 1xPBS für zwei Stunden im Rotationsschüttler lösen. Vor der Farbreaktion wird 1 µl H₂O₂ zur Aktivierung dazugegeben.

Detektionspuffer für alkalische Phosphatase

5 M NaCl

1 M MgCl

1 M Tris pH 9,5

0,1% Tween

NBT/X-Phosphat-Färbelösung für alkalische Phosphatase Färbung:

Detektionspuffer 1 ml

NBT (Nitroblau-tertazoliumchlorid;
50 mg/ml in 70% DMF) 4,5 µl

BCIP (X-Phosphat; 5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphat;
50mg/ml in 70% DMF) 3,5 µl

(DMF: Dimethylformamid)

Hybridisierungspuffer für *in Situ* Hybridisierung

50% (V/V) Formamid

5xSSC

0,1% Tween20

Für die Prähybridisierung wird 10µl/ml einzelsträngige Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zugegeben.

TNT-Puffer für das TSA-Kit

1 M Tris-HCl, pH 7,5

0,15 M NaCl

0,05% Tween20

Färbelösung des TSA Kit

12µl fluorophore CY3/Cy5 Tyramide in 900 µl Amplification Reagenz

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Stammlösung (50x, pH 8,3)

242 g Tris in 500 ml H₂O lösen

100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0)

57,1 ml Eisessig

auf 1 L mit H₂O

Puffer für Gewinnung genomischer DNA aus L3 Larven

100 mM Tris-HCl (pH 7,59)

100 mM EDTA

100 mM NaCl

0,5% SDS

Salzlösung zur Fällung

1 Vol. 5 M KAc

2,5 Vol. 6 M LiCl

LB-Medium

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

10 g NaCl

in 900 ml H₂O lösen

auf pH 7 mit 10M NaOH einstellen

auf 1 L mit H₂O auffüllen und autoklavieren

LB-Platten

LB-Medium wird in 15 g/l Bacto-Agar zugegeben und nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen. Die Zugabe von Antibiotika erfolgt vorher in das abgekühlte LB-Medium. Die Platten können bei 4°C mindestens 8 Wochen gelagert werden.

Antibiotika

Stamm-Konzentration

Gebrauchskonzentration

Ampicillin	500 mg/ml H ₂ O	50µg/µl
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	170 µg/µl

2.5.2 Mikroskope und Binokulare

Binokular	MZ75	Leica
Durchlichtmikroskop	Axioplan	Zeiss
	Axiophot	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	BX 50 WI	Olympus
	TCS SP2	Leica
konfokales LSM	ProgRes 3012	Kontron
CCD-Kamera	Axiocam MRm	Zeiss

2.5.3 molekularbiologische Geräte

PCR-Maschine	Thermomixer compact	Eppendorf
	Thermocycler T-Gradient	Biometra
Vakuumentrifuge	SpeedVac	Savant
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	Sigma 3K20 Zentrifuge	B. Braun
Gelapparatur	HE33-Gel Circle	Hofer
Netzteil	GPS 200/400	Gene Power
Supply		
Thermodrucker	P9I	Mitsubishi
Thermoblock	TB 1 Thermoblock	Biometra

2.5.4 Software

Amira 4.0	TGS
Axiovision 4.1.1	Zeiss
Leica Confocal Software 2.00	Leica
Endnote 9	Thomsom
Photoshop 07	Adobe
Illustrator CS2	Adobe
Office 2003	Microsoft

3. Ergebnisse

3.1 Gliale Subtypen, Markergenexpression und Stammbaumanalyse im Bauchmark von *Drosophila* am Ende der Embryogenese

Der erste Teil meiner Arbeit umfasst die Expressionsanalyse von 45 molekularen Markern in Gliazellen des zentralen (ZNS) und des peripheren Nervensystems (PNS) von *Drosophila melanogaster* in Stadium 16 der Embryogenese. Ziel dieser Arbeit war es, eine molekulare Klassifizierung der Gliazellen vorzunehmen. Den folgenden Ergebnisteil habe ich in ZNS und PNS unterteilt. Die Gliazellen im ZNS sind des Weiteren nach Subgruppen gegliedert. Die Markierungen und Stammbaumanalysen in verschiedenen GFP-Linien ermöglichten die genaue Identifizierung der klonalen Herkunft der Gliazellen im PNS und ZNS. Im letzten Kapitel dieses Ergebnisteils wird der Phänotyp der Funktionsverlustmutante von *castor* mit Hilfe der molekularen Marker charakterisiert.

Die Ergebnisse der Markeranalyse im ZNS werden in Kürze unter dem Titel „Glial subtypes, marker gene expression, and cell lineage in the late embryonic ventral nerve cord of *Drosophila*“ zur Veröffentlichung eingereicht (Beckervordersandforth *et al.*, in Vorbereitung). Die Markerexpression der Gliazellen in der Peripherie wird unter dem Titel „Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo“ veröffentlicht werden (von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung). Die Analyse der molekularen Marker bezieht sich ausschließlich auf die Gliazellen. Die Expression in Neuronen ist zwar in Tabelle 4 aufgelistet, wird aber im Text nicht weiter ausgeführt.

3.1.1 Molekulare Klassifizierung und Stammbaumanalyse der lateralen Gliazellen im zentralen Nervensystem

Die Gliazellen des ZNS wurden aufgrund morphologischer und positioneller Gesichtspunkte in verschiedene Subgruppen eingeteilt (Ito *et al.*, 1995). Basierend auf der Assoziation der Zellen mit unterschiedlichen Strukturen des Bauchmarks, entstanden die drei Kategorien Oberflächen-, Kortex- und Neuropil- assoziierte Gliazellen. Die Oberflächen-assoziierten Gliazellen ummanteln das gesamte Bauchmark und bilden die Blut-Hirn-Schranke. Diese Kategorie ist unterteilt in „subperineurial glia“ (SPG), die unter der äußeren Hülle des Bauchmarks liegen, und in „channel glia“ (CG), die die Dorsoventralkanäle auskleiden. Die Kortex-assoziierten Gliazellen umhüllen die Zellkörper der Neurone im Kortex. Diese Kategorie ist nicht weiter unterteilt, sondern besteht nur aus „cell body glia“ (CBG). Gliazellen, die eng mit axonalen Strukturen verbunden sind, gehören zu den Neuropil-assoziierten Glia. Hier unterscheidet man zwischen „nerve root glia“ (NRG), also Gliazellen, die mit den Nervenwurzeln der in die Peripherie wandernden Segmental- und Intersegmentalnerven verbunden sind, und „longitudinal glia“ (LG), die die longitudinalen Faszikel ummanteln.

Bis jetzt war nicht bekannt, ob diese glialen Kategorien und Subgruppen aus Zellen bestehen, die der gleichen molekularen Spezifizierung unterliegen. Ist es also möglich, Gliazellen nach genetischen Kriterien zu gruppieren? Und wenn ja, wie sieht diese molekulare Klassifizierung im Vergleich zur Kategorisierung anhand von Position und Morphologie aus? Um diese Fragen zu beantworten, habe ich die Expressionsmuster von molekularen Markern (Enhancer-Trap Linien, Antikörper, mRNA-Sonden) in lateralen Gliazellen in Stadium 16 Embryonen untersucht. Neben bekannten glialen Genen wurden viele bis jetzt unbekannte Faktoren untersucht, die einer Sammlung von Enhancer-Trap Linien entstammten. Ein Mikroarray-Experiment zur Identifizierung von Zielgenen von *glial cells missing (gcm)* stellte weitere unbekannte Kandidatengene zur detaillierten Charakterisierung zur Verfügung (Altenhein *et al.*, 2006). Insgesamt wurden 45 Faktoren auf Einzelzellebene untersucht, von denen die meisten in verschiedenen glialen Subgruppen exprimiert werden (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Expression der analysierten molekularen Marker in den lateralen Gliazellen des ZNS

x Expression in mehr als 50% der untersuchten Hemisegmente

(x) Expression in weniger als 50% und mehr als 10% der untersuchten Hemisegmente

Expression in weniger als 10% der untersuchten Hemisegmenten wird nicht angezeigt

* Charakterisierung über *in Situ* Hybridisierung

3.1.1.1 Anzahl und Position der lateralen Gliazellen im ZNS in abdominalen Segmenten

Zur Analyse der Gliazellen auf Einzelzellebene war es zunächst notwendig, die Anzahl und Position aller lateralen Gliazellen im ZNS zu bestimmen. Die Anzahl der Gliazellen pro abdominalem Hemisegment wird in früheren Arbeiten unterschiedlich beschrieben und beläuft sich auf 25 bis 30 (Bossing *et al.*, 1996; Halter *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997). Die Variabilität von bis zu fünf Gliazellen pro Hemineuromer veranlasste mich, die Zellzahl erneut zu bestimmen. Die genaue Quantifizierung der Gliazellen erfolgte durch Zählen von Repo positiven Zellen in mehr als 100 abdominalen Hemisegmenten im Embryonalstadium 16.

Dazu wurden Antikörperfärbungen gegen Repo und Inverted (Inv) in der transgenen

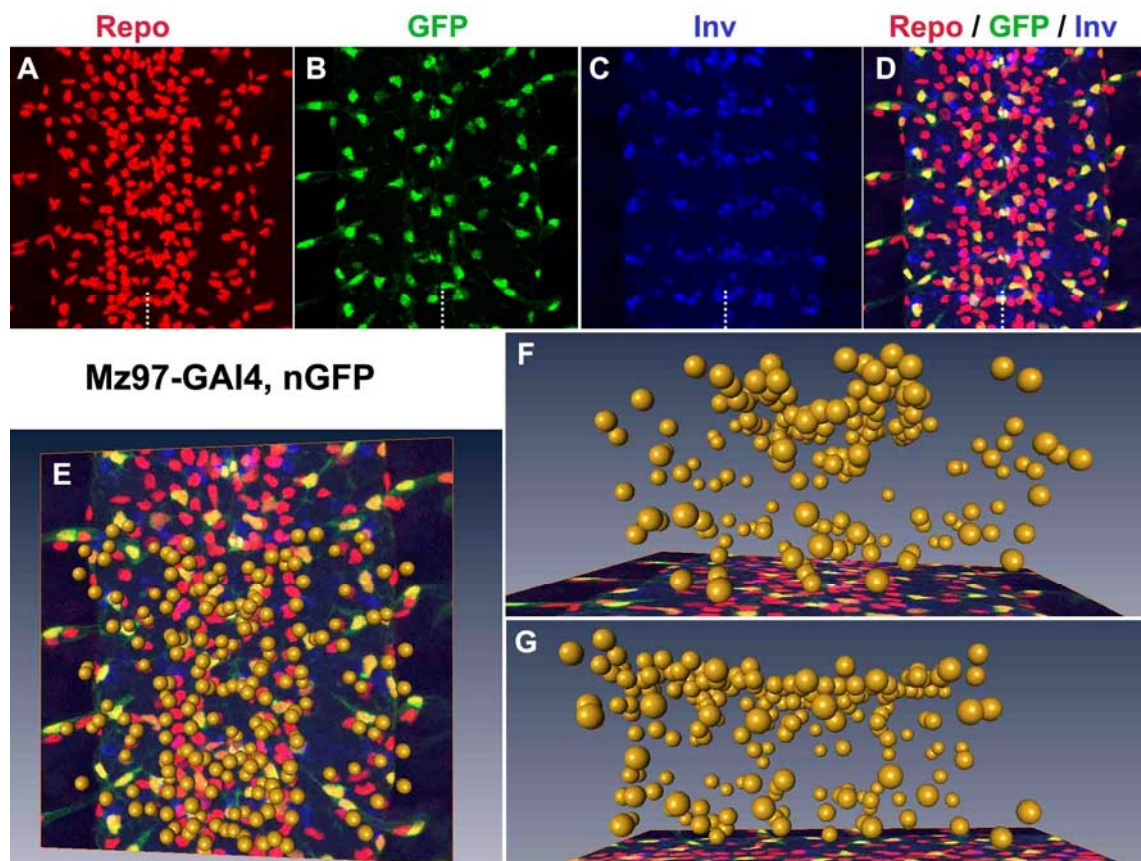


Abbildung 9: Anzahl der lateralen Gliazellen in abdominalen Hemisegmenten des ZNS

Filetpräparation von Stadium 16 Embryonen. (A-D) Anterior ist oben, Mittellinie als gestrichelte Linie angedeutet; Mz97, nGFP als Wildtyp zur Quantifizierung der Gliazellen im ZNS. Laterale Gliazellen wurden durch Antikörperfärbung gegen Repo (rot) sichtbar gemacht. α -Invected diente zur Festlegung von Segmentgrenzen (blau), Mz97, nGFP als zweiter glialer Marker, der in einer Subpopulation von Gliazellen exprimiert wird (grün). (E-G) Repo positive Zellen wurden mit dem 3D-Programm Amira gezählt. (E) Horizontale Aufsicht, anterior ist oben; (F) frontale Aufsicht, dorsal ist oben; (G) Sagittale Aufsicht, anterior ist links und dorsal oben.

Linie Mz97-Gal4, rekombiniert mit einem kernständigen UAS-GFP (UAS-nGFP), durchgeführt (Abb. 9 A-D). Inv ist ein Protein, dessen Expressionsmuster mit dem des Segmentpolaritätsgens *engrailed* (*en*) übereinstimmt. Beide Gene werden posterior im Segment exprimiert, in Zellen, die von Neuroblasten der sechsten und siebten Zellreihe abstammen (Broadus *et al.*, 1995; Doe 1992). Die Inv positiven Zellen dienen zur Festlegung der Segmentgrenzen bei der Quantifizierung der Gliazellen. Mz97, nGFP wird in acht Gliazellen pro Hemineuomer exprimiert und dient als Marker für eine Subpopulation von Gliazellen. Die Quantifizierung der Repo positiven Zellen erfolgte mit Hilfe des 3D-Programmes Amira (Abb. 9 E-G) und bestätigte die Anzahl von 25 Gliazellen pro Hemisegment. Die Variabilität in der Zellzahl ist jedoch viel geringer als beschrieben. Sie schwankt zwischen einer bis zwei Zellen mit einem maximalen Mittelwert von 1, 2 Zellen pro Hemisegment.

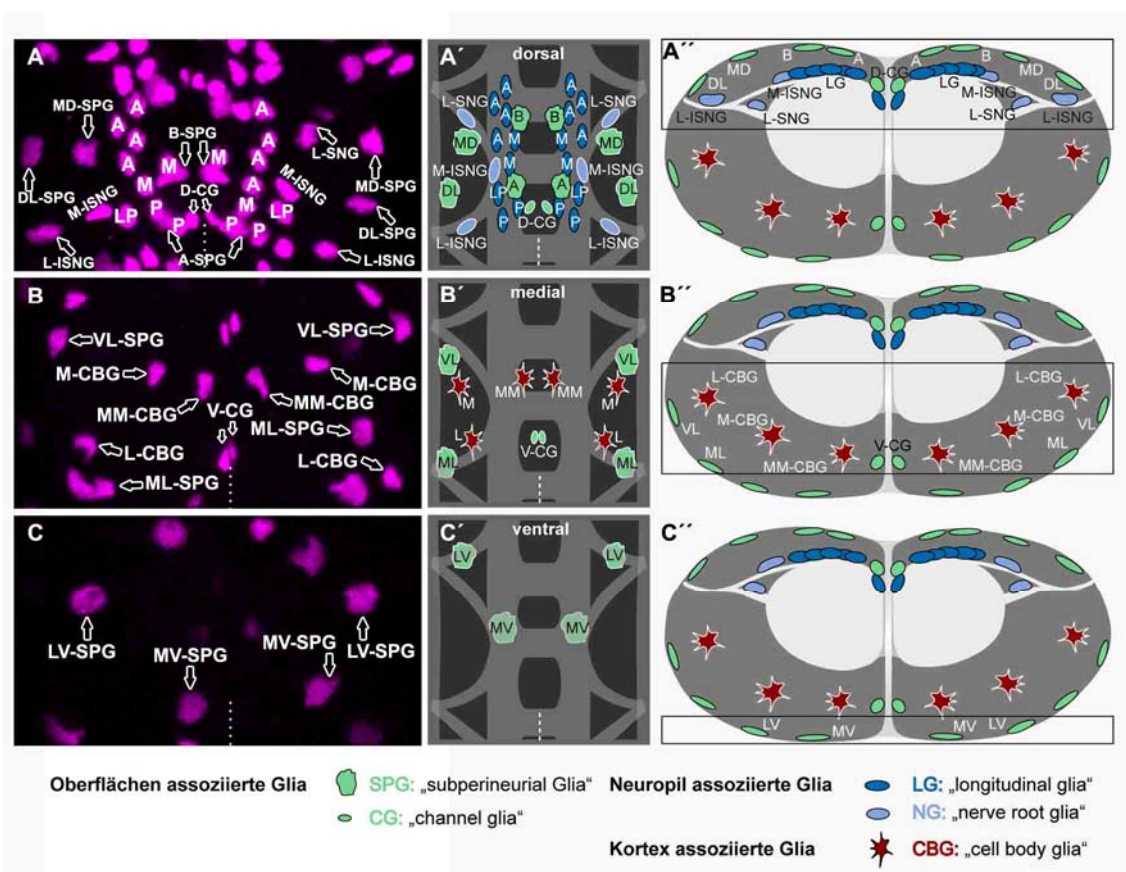


Abbildung 10: Position und Klassifizierung der lateralen Gliazellen im Bauchmark

Die Verteilung der Gliazellen entlang der dorsoventralen, mediolateralen und anteroposterioren Achse eines abdominalen Hemineuomers in Embryonalstadium 16. (A-C) Die Zellkerne der lateralen Gliazellen sind mit α -Repo (Magenta) angefärbt; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet. Anterior ist oben. Die Cartoons verdeutlichen die Verteilung der Gliazellen entlang der anteroposterioren (A'-C') und dorsoventralen Achse (A''-C''). A-C und A'-C' zeigen die horizontale Aufsicht, A''-C'' die frontale. Schwarze Boxen in A''-C'' deuten dorsale (A-A''), mediale (B-B'') und ventrale (C-C'') Ebenen an. Die glialen Untergruppen sind durch verschiedenen Farben und Formen voneinander abgegrenzt; die Namen der Gliazellen sind durch Großbuchstaben angedeutet (z.B. steht MD für MD-SPG = mediadorsale SPG).

Als Nächstes haben wir die Klassifizierung der einzelnen Gliazellen anhand ihrer Position im Bauchmark untersucht. Die Lage der Zellen wurde anhand der anteroposterioren, mediolateralen und dorsoventralen Achsen bestimmt. Die Gliazellen wurden gemäß Ito *et al.* klassifiziert und benannt (Abb. 10) (Ito *et al.*, 1995). Die Buchstaben nach dem Bindestrich zeigen die Zugehörigkeit zur Subgruppe an, während die Buchstaben davor die Position der Zelle beschreiben (D= dorsal, M= medial, V= ventral, L= lateral). Wenn zwei Buchstaben vor der Subgruppe stehen, wie z. B. im Fall der VL-SPG, beschreibt der zweite Buchstabe die Region im Neuomer, während der erste Buchstabe die genaue Position in dieser Region anzeigt. Zu der Kategorie der Oberflächen-assoziierten Gliazellen zählen acht SPGs und zwei CGs. Die Neuropil-assoziierten Gliazellen setzen sich aus neun LGs und drei NRGs zusammen. Die NRGs sind unterteilt in Gliazellen, die entlang des intersegmentalen (ISNG) und segmentalen Nervs (SNG) liegen. Die LGs können aufgrund ihrer Markerexpression in drei Cluster gliedert werden: das anteriore LG Cluster (A-LGs), das mediale LG Cluster (M-LGs) und das posteriore LG Cluster (P-LGs). Eine der neun LGs zeigt eine von den anderen abweichende Kombination an exprimierten Markern und wurde als lateroposteriore LG (LP-LG) bezeichnet. Die Kategorie der Kortex-assoziierten Gliazellen besteht aus drei CBGs. Insgesamt sind die Positionen der Zellkerne der Gliazellen im Bauchmark konstant, wobei es Unterschiede zwischen den Subgruppen gibt. Die Positionen der Nuklei der CBGs sind z. B. variabler als die der LGs.

Durch die detaillierte und statistisch abgesicherte Analyse der Zellpositionierung und Markerexpression ergaben sich Änderungen hinsichtlich der Zugehörigkeit einiger Gliazellen zu ihrer Subgruppe und der Identifizierung von Einzelzellen. Die Abweichungen zwischen früheren Publikationen und dieser Arbeit sind in Tab. 5 aufgelistet und werden in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben und diskutiert.

3.1.1.2 Die klonale Identität der Gliazellen

Die Zugehörigkeit der Gliazellen des Bauchmarks zu einem bestimmten Neuroblasten wurde mittels DiI Markierungen und Stammbaumanalysen untersucht (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). In den Arbeiten von Bossing und Schmidt wurden die markierten glialen Tochterzellen anhand ihrer Morphologie und ihrer Position identifiziert, ohne das komplette Muster der Gliazellen zu erkennen. In den Zellstammbäumen einiger NBs ergaben sich Variationen in der Anzahl und der

Zusammensetzung des glialen Anteils, während andere NBs immer den gleichen Zellklon generierten.

klonale Herkunft	klonale Herkunft	Nomenklatur	
Beckervordersand- forth et al., unveröffentlicht	Bossing et al., 1996 Schmidt et al., 1997	Beckervordersandforth et al., unveröffentlicht	Ito et al., 1995
NB1-1a	NB1-1a	A-SPG	A-SPG
NB1-1a	NB1-1a	B-SPG	B-SPG
NB1-1a	NB1-1a	LV-SPG	LV-SPG
NB2-2t	NB2-2t	A-SPG	
NB1-3	NB1-3	M-ISNG	M-ISNG
NB1-3	NB5-6a	MD-SPG	MD-SPG
NB5-6a	NB5-6a	DL-SPG	DL-SPG
NB5-6a	NB5-6a	MV-SPG	MV-SPG
NB5-6a	NB7-4	VL-SPG	VL-SPG
NB6-4	NB6-4	MM-CBG	MM-CBG
NB6-4	NB6-4	M-CBG	M-CBG
NB6-4t	NB6-4t	MM-CBG	MM-CBG
NB7-4	NB7-4	D-CG	D-CG
NB7-4	NB7-4	V-CG	V-CG
NB7-4	NB7-4	L-CBG	L-CBG
NB7-4	NB7-4	ML-SPG	VL-CBG
NB7-4	NB1-3	L-ISNG	L-ISNG
LGB	LGB	anteriore LG Cluster (4)	D-IG Cluster (3-5)
LGB	LGB	mediale LG Cluster (2)	V-IG
LGB	LGB	posteriore LG Cluster (2)	L-IG Cluster (2)
LGB	LGB	LP-LG	
	NB1-3	L-SNG	L-SNG
			LD-SPG
			M-CG1 und 2
			M-SNG1 und 2

Tabelle 5: Nomenklatur und klonaler Ursprung der ZNS Gliazellen

Was ist der Grund für die Variationen im glialen Teil einiger Zellstammbäume? Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Position mancher Gliazellen variabel ist und man sie daher unterschiedlichen Identitäten zugeordnet hat. Um diese Frage zu klären, wurden die Stammbaumanalysen wiederholt. Dies geschah in Kollaboration mit Christoph Rickert, der alle DiI Markierungen durchgeführt und dokumentiert hat. Die DiI Markierungen wurden in den transgenen Stämmen *repo-Gal4*, *UAS-nGFP* und *Mz97, nGFP* durchgeführt. Diese Strategie hat den Vorteil, dass man die DiI-markierten Stammbäume im Rahmen des gesamten Gliamusters (*repo-Gal4*) oder zusammen mit

einzelnen, identifizierten Gliazellen (Mz97-Gal4) auswerten kann. Dies ermöglichte uns, die Gliazellen sehr gezielt anzusprechen und sie mit größerer Genauigkeit ihrer Stammzelle zuzuordnen. Diese Daten bestätigen die früheren Stammbaumanalysen für NB1-1a und NB6-4 (Bossing *et al.*, 1996; Higashijima *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Udolph *et al.*, 1993), die drei SPGs und zwei bis drei CBGs generieren.

Die Stammbäume der NBs 5-6a, 1-3 und 7-4 dagegen konnten verifiziert werden (siehe Tabelle 5). NB5-6a generiert neben Neuronen vier Gliazellen (siehe Abb. 11 A-D): eine Exitglia (EG; Abb. 11 A) und drei SPGs, was auch schon von Schmidt *et al.* beschrieben wurde. Die Daten zeigen, dass die dorsolaterale SPG (DL-SPG; Abb. 11 A), die medioventrale SPG (MV-SPG; Abb. 11 C) und die ventrolaterale SPG (VL-SPG; Abb. 11 B) von NB5-6a abstammt, und die mediodorsale SPG (MD-SPG; Abb. 11 J) jedoch vom NB1-3 generiert wird. Der gliale Anteil des Stammbaumes von NB7-4 enthält fünf Gliazellen: die dorsale und ventrale CG (D-CG und V-CG; Abb. 11 F und G), die laterale CBG (L-CBG; Abb. 11 F), die mediolaterale SPG (ML-SPG; Abb. 11 F) und die laterale ISNG (L-ISNG; Abb. 11 E und G). Frühere Stammbaumanalysen haben gezeigt, dass NB7-4 fünf Gliazellen generiert, von denen zwei wegen ihrer mediolateralen Positionen am posterioren Rand des Segmentes als CBGs klassifiziert wurden (Schmidt *et al.*, 1997). Betrachtet man nun die Expression der molekularen Marker, zeigt sich, dass eine der beiden Zellen Marker exprimiert, die charakteristisch für SPGs sind. Zusätzlich dazu ist der Nukleus dieser Zelle rund und flach und entspricht eher dem Zellkern einer SPG als einer CBG, deren Nuklei unregelmäßig geformt und klein sind. Die Zelle scheint demnach eher zur Subgruppe der SPG zu gehören. Um diese Zelle in unsere Kategorien und Nomenklatur zu integrieren, habe ich sie mediolaterale SPG (ML-SPG; Abb. 11 F) genannt.

Der NB1-3 produziert Gliazellen, die im embryonalen Stadium 16 sowohl im ZNS als auch im PNS liegen (Abb. 11 J und K). Im ZNS stammen zwei Zellen von NB1-3 ab: die mediale ISNG (M-ISNG; Abb. 11 J) und die mediodorsale SPG (MD-SPG). Die Zellen der Peripherie werden im Kapitel 3.1.2 besprochen.

Mit Hilfe von DiI Markierungen in den spezifischen Enhancer-Trap Linien konnte nicht nur der klonale Ursprung jeder Gliazelle präzisiert werden, sondern nun auch die Frage nach der Variabilität in einigen Linien beantwortet werden: jeder NB generiert einen unveränderlichen Zellstammbaum. Die in früheren Arbeiten beschriebene Variabilität im glialen Anteil ist auf die unterschiedliche Position der Gliazellen zurückzuführen.

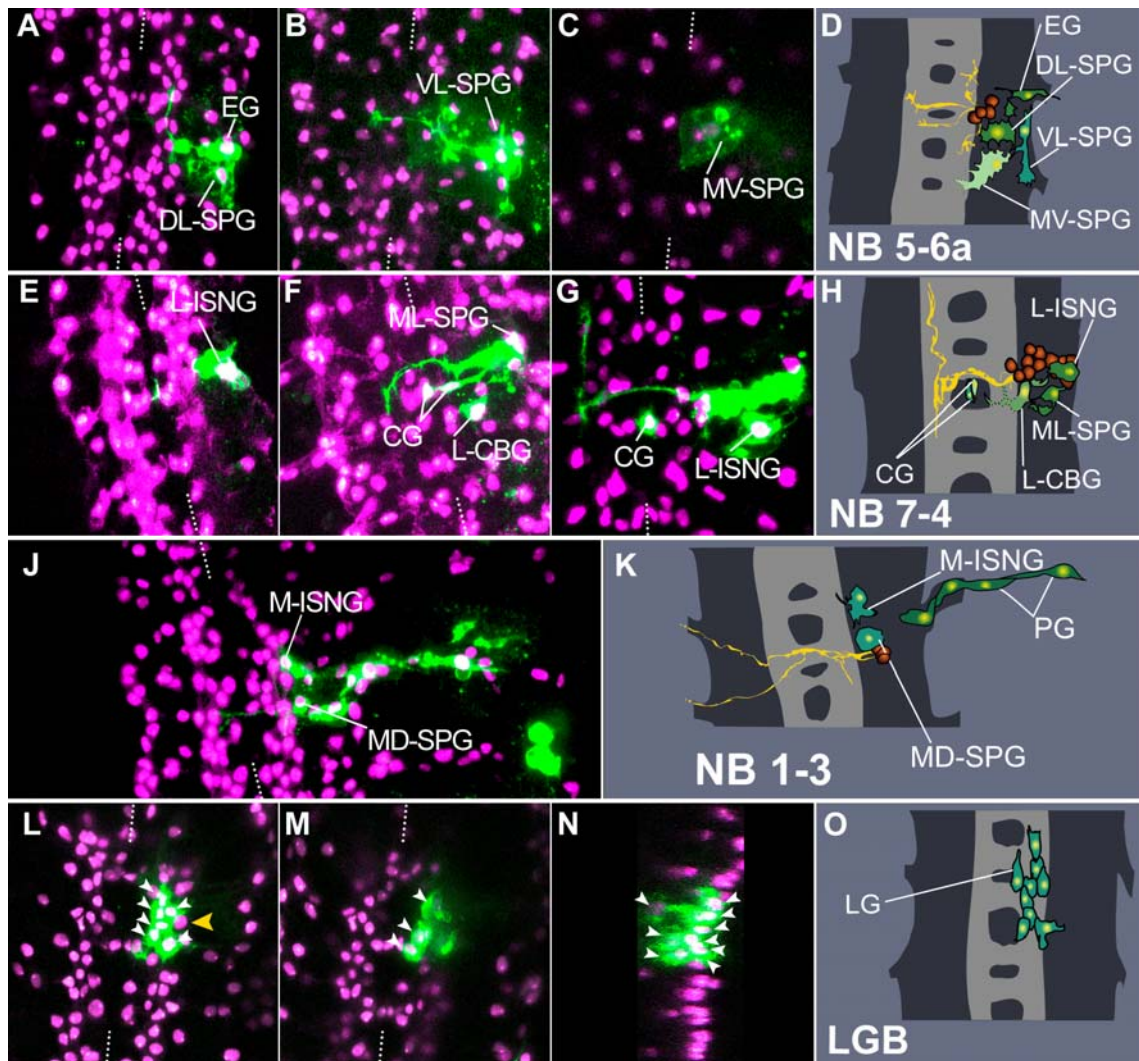


Abbildung 11: Zuordnung der Gliazellen zu identifizierten Zellstambäumen

Filetpräparation von Embryonen des Embryonalstadiums 16, abdominale Neuromere, anterior ist oben; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet. Fluoreszierende DiI Markierungen in Grün; Gliazellen in Magenta. Alle DiI Markierungen wurden in *repo-Gal4, nGFP* Embryonen durchgeführt; außer (G) DiI Markierung in *Mz97, nGFP*. Die Cartoons veranschaulichen die gesamten Zellstambäume mit Neuronen (rot) und Gliazellen (in grün). (A-D) Stammbaum von NB5-6a; dorsal (A) EG und DL-SPG; medial (B) VL-SPG; ventral (C) MV-SPG. (E-H) Der NB7-4 Klon besteht aus einem Cluster von Interneuronen und fünf Gliazellen; mediale (E und G) und ventrale (F) Ebenen zeigen DiI markierte D- und V-CG, L-ISNG, ML-SPG und L-CBG; (G) *Mz97, nGFP* markiert spezifisch die L-ISNG, die DiI positiv ist. (J und K) NB1-3 generiert Gliazellen des ZNS und PNS: Im ZNS sind zwei dorsale Gliazellen DiI positiv, die M-ISNG und die MD-SPG. (L-O) Stammbaum von LGB; neun Zellen sind DiI positiv (kleine, weiße Pfeilköpfe); M-ISNG ist nicht DiI markiert (L: großer, gelber Pfeilkopf); (N) Sagittalschnitt zeigt die Verteilung der LGs entlang der D/V Achse an, dorsal ist rechts. (Mit freundlicher Genehmigung von Christof Rickert)

3.1.1.3 Expression molekularer Marker in Neuropil-assoziierten Gliazellen

Die Neuropil-assoziierten Gliazellen umhüllen axonale Strukturen, wie die Kommissuren und Konnektive des Neuropils und die Nervenwurzeln mit den in die Peripherie auswandernden Axonen. Man unterteilt diese Kategorie weiter in „longitudinal glia“ (LG) und „nerv root glia“ (NRG). Die LGs werden vom LGB generiert und ummanteln die longitudinalen Faszikel der Konnektive. Diese Zellen wurden in früheren Arbeiten auch „interface glia“ genannt. Diese Bezeichnung konnte sich jedoch nicht durchsetzen. In späten Embryonalstadien reihen sich zehn Repo positive Zellen entlang der Konnektive auf. Zwölf der analysierten Marker werden in allen zehn Zellen exprimiert (Tab. 6), wie z. B. *muscle segment homeobox (msh)*; siehe Tabelle 6) und 209-lacZ (Abb. 12 A-A’). Dieser lacZ-Stamm exprimiert β Gal in 100 % aller untersuchten Hemisegmente (n= 38). Es gibt allerdings auch Marker, wie z. B. 239-lacZ (Abb. 12 B-B’), die in neun der zehn Zellen stark exprimiert werden, in der zehnten jedoch nur sehr schwach. Umgekehrt gibt es Marker, die nur in dieser Zelle exprimiert werden. Der Enhancer-Trap Stamm 250-lacZ (Abb. 12 E-E’) zum Beispiel, zeigt β Gal Expression nur in dieser Zelle und in einer weiteren LG, während die anderen acht LGs β Gal negativ sind. Die eine Zelle unterscheidet sich also deutlich von den anderen neun durch die Expression der molekularen Marker. Auch in ihrer Position zeigen sich Abweichungen zu den anderen Zellen. Sie liegt etwas lateraler und scheint eher mit dem ISN verbunden zu sein, als mit den longitudinalen Faszikeln. Es ist demnach fraglich, ob es sich bei dieser Zelle tatsächlich um eine LG handelt. In der bestehenden Literatur ist die Anzahl der LGs unterschiedlich beschrieben worden: Griffith und Hidalgo definieren die zehn Zellen, die sich entlang der Konnektive aufreihen, als LGs (Griffiths und Hidalgo 2004). Ito und Halter beschreiben bis zu acht Zellen als LGs, und die Zellstammbaumanalysen sprechen von sieben bis neun LGs (Halter *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997). Um diese Diskrepanzen zu klären, wurden von Christof Rickert DiI Markierungen in *repo-Gal4*, gekreuzt mit UAS-nGFP, durchgeführt (wie im vorherigen Kapitel schon beschrieben). Abb. 11 L-O zeigt den DiI positiven Zellklon eines longitudinalen Glioblasten (LGB). Die Zahl seiner Tochterzellen beläuft sich auf neun (weiße Pfeilspitzen in Abb. 11 L-N). Die zehnte Zelle liegt sehr dicht am Zellklon (gelbe Pfeilspitze in Abb. 11 L) und ist eindeutig DiI negativ. Demnach kann es sich hierbei nicht um eine LG handeln, da diese als Nachkommen des LGB definiert werden. Weitere DiI Markierungen haben gezeigt, dass diese Zelle vom NB1-3 produziert wird (Abb. 11 J und K). Es handelt sich bei dieser Zelle um die M-ISNG, da sie mit dem ISN

assoziiert ist. Die Unterschiede in der Markerexpression der M-ISNG, verglichen mit den LGs, lassen sich einerseits durch den unterschiedlichen klonalen Ursprung, andererseits aber auch durch die Zugehörigkeit zu einer anderen funktionalen Subgruppe, den NRG, erklären.

Die Population der neun LGs kann in drei Subgruppen und eine einzelne Zelle unterteilt werden. Die sechs anterioren LGs exprimieren *prospero* (*pros*) (Griffiths und Hidalgo 2004) in 99% aller Hemisegmente (n= 48; Abb. 12 C-C''). Die vier anteriorsten dieser sechs Zellen fassen wir als anteriore LGs (A-LGs) zusammen. Sie exprimieren exakt die gleichen Marker, lassen sich aber von den zwei posterioren *prospero* positiven LGs durch die signifikant schwächere Expression von 201-lacZ und *mirr-lacZ* unterscheiden (Tab. 6). Die beiden posterioren *pros* positiven LGs zeigen starke Expression von 201-lacZ und *mirr-lacZ* und werden als mediale LGs (M-LGs) bezeichnet. Ebenfalls starke Expression von 201-lacZ und *mirr-lacZ* weisen zwei posterioren LGs auf, die kein *pros* exprimieren, und posteriore LGs (P-LGs) genannt werden. Sowohl in den M-LGs als auch in den P-LGs wird die Gal4-Linie Mz813 exprimiert (in 25% aller Hemisegmente; n= 66; Abb. 12 D-D''). Die beiden P-LGs zeigen außerdem eine schwache Expression von *hkb-lacZ*, die sich auch in der neunten LG detektieren lässt (Tab. 6). Diese Zelle wurden von uns aufgrund ihrer Position lateroposteriore LG (LP-LG) genannt und zeigt eine sehr ähnliche Kombination der Markerexpression wie die M-ISNG. Die beiden Zellen lassen sich allerdings durch die Expressionsmuster von 239-lacZ (Abb. 12 B-B'') und *salm-lacZ* (Abb. 12 F-F''), was nur in der LP-LG exprimiert wird, unterscheiden.

NRGs werden in Abhängigkeit zu ihrem assoziierten Nerv in eine „segmental nerve root glia“ (SNG) und zwei „intersegmental nerve root glias“ (ISNGs) unterteilt. Die drei Zellen zeigen individuelle Kombinationen von Markergenexpression.

Für die Gruppe der Neuropil-assoziierten Gliazellen konnten wir durch Dil Markierungen und Expressionsanalysen zeigen, dass sie aus neun LGs, einer SNG und zwei ISNG besteht. Aufgrund der Markerkombinationen ließen sich die LGs weiter unterteilen in die Zellcluster der A-LGs (vier Zellen), M-LGs, P-LGs (jeweils zwei Zellen) und in eine LP-LG.

	A-LG Cluster	M-LG Cluster	P-LG Cluster	LP-LG	M-ISNG	L-ISNG	L-SNG
	LGB	LGB	LGB	LGB	NB1-3	NB7-4	
209-lacZ	x	x	x	x	x		x
<i>neprilysin4*</i>	x	x	x	x	x		
CG8965*	x	x	x	x	x		
CG7433*	x	x	x	x	x		
Msh	x	x	x	x	x		
<i>ftz-lacZ</i>	x	x	x	x	(x)	(x)	(x)
3-101-lacZ	x	x	x	x	(x)		(x)
201-lacZ	x	x	x	x	(x)		
Zhf2	(x)	x	x	x	x		
<i>mirr-lacZ</i>	(x)	x	x	(x)	x		
239-lacZ	x	x	x	(x)			
CG11910*	x	x	x	x			
Prospero	x	x					
Mz813-Gal4		(x)	(x)				(x)
<i>hkb-lacZ</i>			(x)	(x)			
CG6218*				x	x	x	
CG6783*				x	x	x	
CG16876*				x	x		
250-lacZ				x	x	x	x
nervana2-Gal4				(x)	x		(x)
<i>salm-lacZ</i>				x		(x)	
CG9336*						x	x
Mz97-Gal4						x	
J29-lacZ						x	
<i>svp-lacZ</i>						x	
Zhf1						x	
CG4322/moody*						x	
CG2893*						x	
CG15860*						x	

Tabelle 6: Expression der molekularen Marker in Neuropil-assoziierten Gliazellen

x Expression in mehr als 50% der untersuchten Hemisegmente

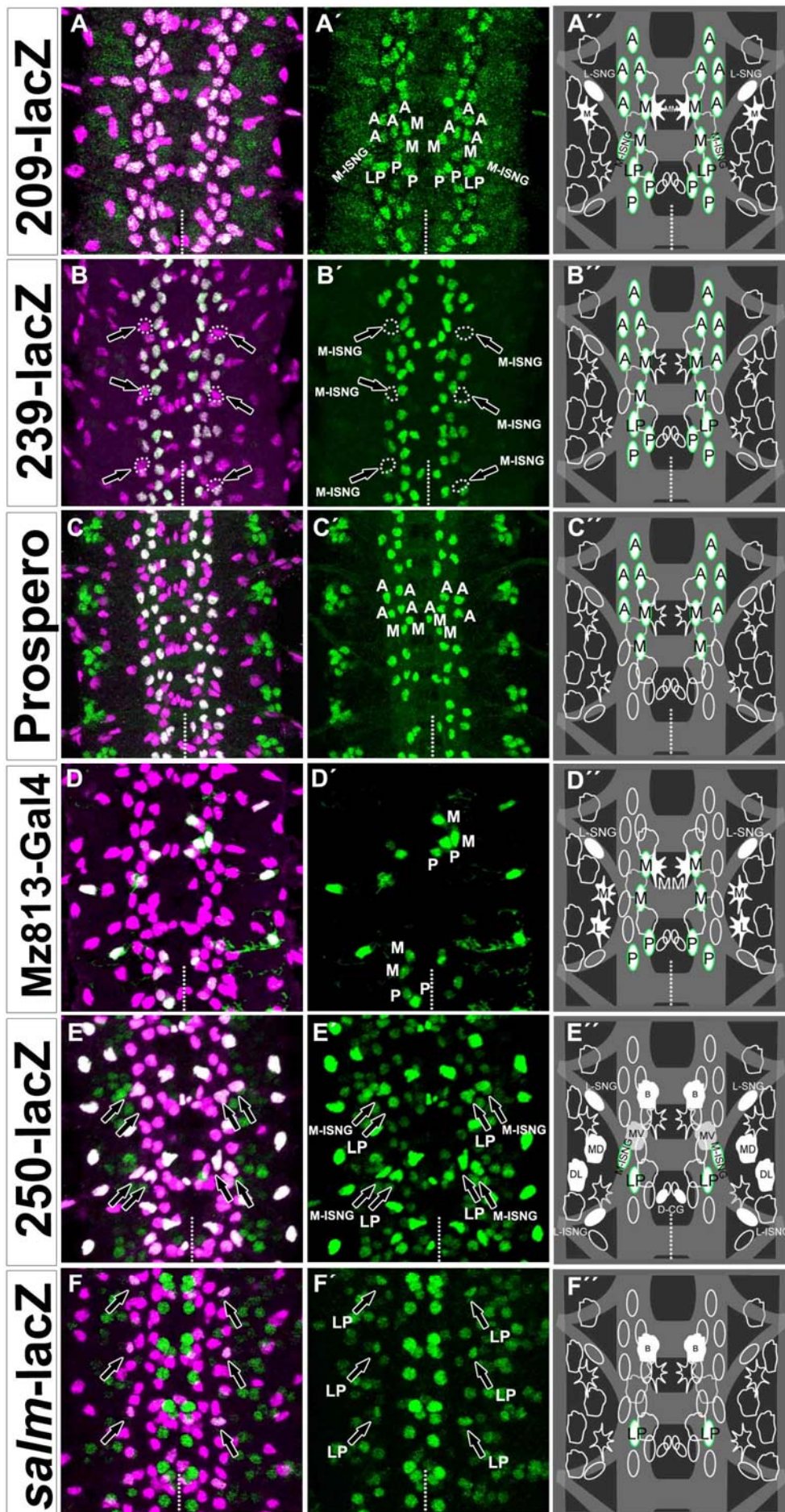
(x) Expression in weniger als 50% und mehr als 10% der untersuchten Hemisegmente

Expression in weniger als 10% der untersuchten Hemisegmenten wird nicht angezeigt

* Charakterisierung über *in Situ* Hybridisierung

Abbildung 12: Analyse der Markerexpression in Neuropil-assoziierten Gliazellen

Filetpräparation von Embryonen des Embryonalstadiums 16, abdominale Segmente, Horizontalansicht, anterior ist oben; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet; Maximalprojektion von dorsalen Ebenen. Folgende Expressionsmuster wurden analysiert: (A-A'') Enhancer Trap Stamm 209-lacZ, α -Repo, α - β Gal; Buchstaben deuten die Identität der LGs oder LG-Cluster an. (B-B'') 239-lacZ, α -Repo, α - β Gal; gestrichelte Kreise markieren die M-ISNG, die kein β Gal exprimiert. (C-C'') Wildtyp, α -Repo, α -Prospero. (D-D'') Mz813, nGFP, α -Repo. (E-E'') 250-lacZ, α -Repo, α - β Gal. (F-F'') *salm-lacZ*, α -Repo, α - β Gal. (A-F) Doppelfärbungen gegen Repo und den spezifischen Marker, (A'-F') Markergenexpression, (A''-F'') Cartoon des gesamten glialen Expressionsmusters. Die doppelt gefärbten Zellen sind weiß. Die grüne Umrandung zeigt doppelt gefärbte Zellen, die zur Kategorie der Neuropil assoziierten Gliazellen gehören. Siehe nächste Seite.



3.1.1.4 Expression molekularer Marker in Oberflächen-assoziierten Gliazellen

Oberflächen-assoziierte Gliazellen unterscheiden sich morphologisch und positionell stark von den anderen glialen Kategorien. Diese Gliazellen sind flach und rund (Pfannekuchen-ähnlich) und liegen an der Oberfläche des Bauchmarks. Insgesamt zehn Zellen, acht SPGs und zwei CGs, werden dieser Kategorie zugeordnet, die von den NBs 1-1, 5-6 und 7-4 abstammen. Zwei Marker werden in allen Gliazellen dieser Kategorie exprimiert: die Gene *seven up (svp)* und *moody*. Die Expression von *moody* in SPGs und seine Funktion wurde detailliert in Arbeiten von U. Gaul und U. Heberlein beschrieben (Bainton *et al.*, 2005; Schwabe *et al.*, 2005). *In Situ* Hybridisierung mit einer spezifischen mRNA-Sonde gegen *moody* bestätigt, dass dieses Gen im ZNS ausschließlich in allen acht SPGs und in beiden CGs exprimiert wird (Tab. 7). Für *svp* dagegen ist noch keine Funktion in SPGs bekannt. *svp-lacZ* ist ein bekannter Marker für bestimmte NBs und deren Nachkommen (Broadus und Doe 1995; Mlodzik *et al.*, 1990) und wird gegen Ende der Embryonalentwicklung in allen Oberflächen-assoziierten Gliazellen exprimiert (100% Expression in allen Hemisegmenten; n=50; Abb. 13 A-A''). Der Enhancer-Trap Stamm M84 wird in alle SPGs und in der V-CG exprimiert (Abb. 13 B-B'').

Die Kategorie der Oberflächen-assoziierten Gliazellen wird weiter unterteilt in SPGs und CGs. SPGs umhüllen das komplette Bauchmark, während CGs die Dorsoventralkanäle auskleiden. Der Enhancer-Trap Stamm P101-lacZ kennzeichnet alle SPGs in 100% der analysierten Hemisegmente, wird jedoch nicht in CGs exprimiert (n=30; Abb. 13 C-C''). Im Gegensatz dazu wird *en-lacZ* exklusiv in beiden CGs exprimiert (in 100% der Hemisegmente; n= 50; Abb. 13 D-D''). Oberflächen-assoziierte Gliazellen, sowie deren Subgruppen SPG und CG zeichnen sich also durch die Expression spezifischer molekularer Marker aus. Deshalb konnten wir eine Zelle, die ehemals als CBG klassifiziert wurde in die Kategorie der SPG einordnen (siehe oben).

Auch die klonale Identität einiger Oberflächen-assoziiierter Gliazellen spiegelt sich in der Markerexpression wider, was am Beispiel der Gliazellen von NB1-1a und NB5-6a deutlich gemacht werden kann. NB1-1a produziert einen Zellstammbaum mit drei Gliazellen (A-SPG, B-SPG und LV-SPG), die alle durch die Expression von *huckebein-lacZ (hkb-lacZ; Abb. 14 D-D'')* (Bossing *et al.*, 1996) und *mirror-lacZ (mirr-lacZ; Tab. 7)* (Broadus *et al.*, 1995) gekennzeichnet sind. Dagegen zeigen alle Gliazellen, die

vom NB5-6a produziert werden, eine Expression von *wingless-lacZ* (*wg-lacZ*; Abb. 14 C-C''').

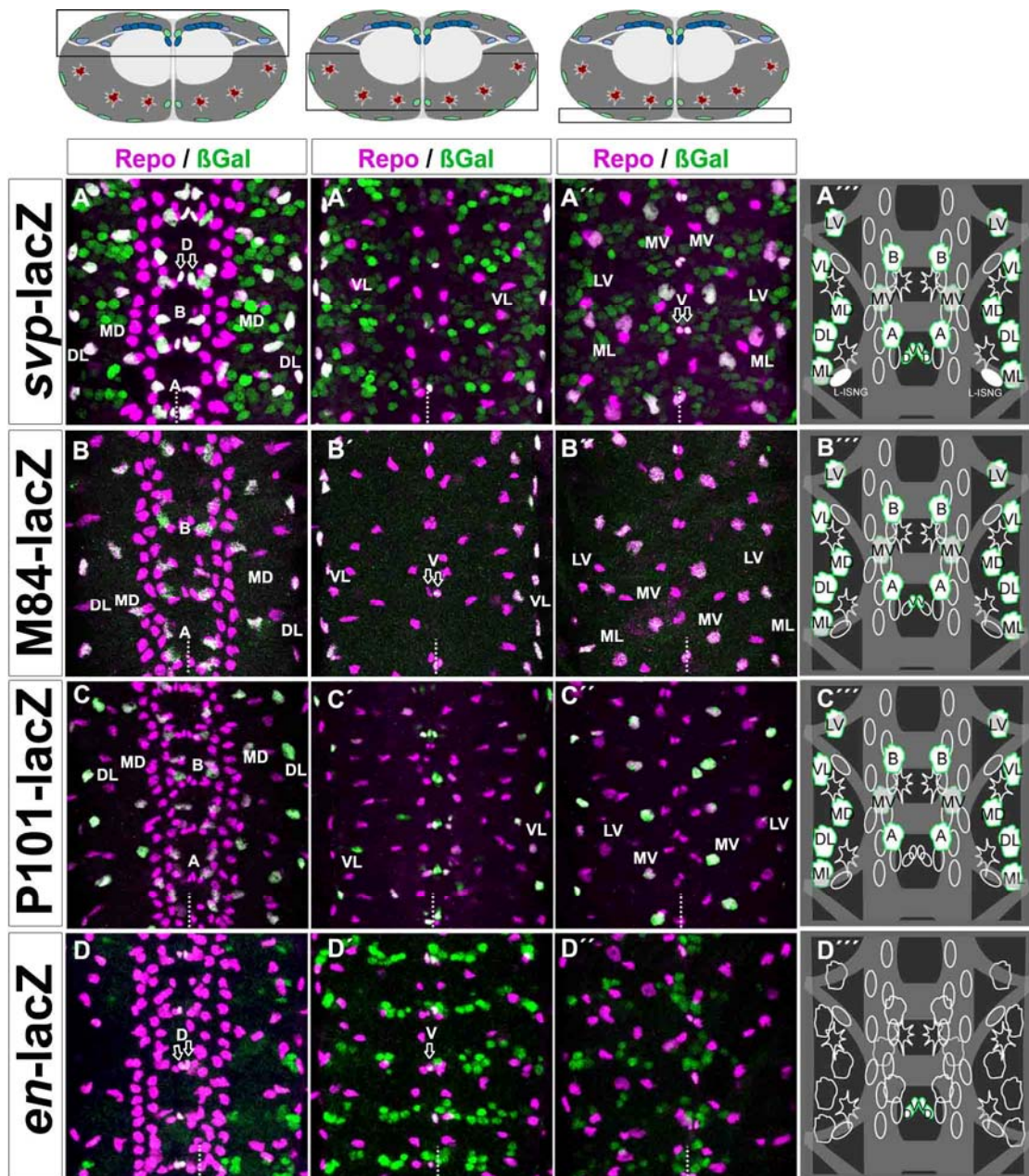


Abbildung 13: Die Kategorie der Oberflächen-assoziierten Gliazellen und ihre weitere Einteilung in „subperineurial glia“ und „channel glia“ werden durch die Expression von molekularen Marker bestätigt

Filetpräparation von Embryonen des Embryonalstadiums 16, abdominale Segmente, Horizontalansicht, anterior ist oben; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet. Die schwarzen Boxen in den oberen Cartoons beziehen sich auf die gezeigten konfokalen Ebenen: (A-H) dorsale Ebenen, (A'-H') mediale Ebenen, (A''-H'') ventrale Ebenen. Folgende Enhancer Trap Linien wurden mit Antikörperfärbung gegen *Repo* und β Gal analysiert: (A-A'') *svp-lacZ*, (B-B'') M84-lacZ, (C-C'') P101-lacZ und (D-D'') *en-lacZ*. Die Pfeile zeigen doppelt gefärbte Zellen an; Namen der Zellen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. (A''-H'') Cartoon des gesamten glialen Expressionsmusters. Die doppelt gefärbten Zellen sind weiß. Die grüne Umrandung zeigt doppelt gefärbte Zellen, die zur Kategorie der Oberflächen assoziierten Gliazellen gehören.

	B-SPG	A-SPG	LV-SPG	MD-SPG	DL-SPG	VL-SPG	MV-SPG	ML-SPG	D-CG	V-CG
	NB1-1a	NB1-1a	NB1-1a	NB1-3	NB5-6a	NB5-6a	NB5-6a	NB7-4	NB7-4	NB7-4
<i>svp-lacZ</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>CG4322/moody*</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>M84-lacZ</i>	x	x	x	x	x	x	x	x		x
<i>P101-lacZ</i>	x	x	x	x	x	x	x	x		
<i>Zfh1</i>	(x)	x	x	x	x	x	x		(x)	x
<i>Mz97-Gal4</i>	x		x	x	x	(x)	x		x	
<i>J29-lacZ</i>	x		x	x	x		x		x	
<i>250-lacZ</i>	x			x	x		x		x	
<i>ftz-lacZ</i>	(x)		x		x	(x)	(x)		(x)	(x)
<i>CG3168*</i>		x	x	x	x	x	x		x	x
<i>CG15860*</i>			x	x	x	x	x			
<i>Castor</i>		(x)	(x)						(x)	(x)
<i>CG5080*</i>		x			x	x				x
<i>wg-lacZ</i>					x	x	x			
<i>CG6218*</i>	x			x		x				
<i>mirr-lacZ</i>	x	x	x							
<i>hkb-lacZ</i>	x	x	x							
<i>CG6783*</i>					x	x				
<i>CG16876*</i>						x				
<i>CG7433*</i>				x		x				
<i>en-lacZ</i>									x	x
<i>CG2893*</i>		x		x						
<i>salm-lacZ</i>	x									
<i>dEAAT1-Gal4</i>				(x)						
<i>CG9336*</i>							x			
<i>nervana2-Gal4</i>									(x)	

Tabelle 7: Expression der molekularen Marker in Oberflächen-assoziierten Gliazellen

x Expression in mehr als 50% der untersuchten Hemisegmente

(x) Expression in weniger als 50% und mehr als 10% der untersuchten Hemisegmente

Expression in weniger als 10% der untersuchten Hemisegmenten wird nicht angezeigt

* Charakterisierung über *in Situ* Hybridisierung

Insgesamt werden 26 Marker in Oberflächen-assoziierten Gliazellen exprimiert. Die Gal4-Linie Mz97, beispielsweise, wird in fünf SPGs (B-SPG, MD-SPG, DL-SPG, VL-SPG und MV-SPG) und in der D-CG exprimiert (Abb. 14 A-A''). Dagegen gibt es auch Marker, die nur in einer einzigen SPG exprimiert werden, z. B. *spalt major-lacZ* (*salm-lacZ*; Abb. 14 B-B''), das nur die B-SPG markiert. Da die Expressionsmuster der Marker überlappen, können wir jede einzelne Oberflächen-assoziierte Gliazelle anhand der individuellen Kombination der Markergen Expression identifizieren. Folglich hat jede Oberflächen-assoziierte Gliazelle, trotz morphologischer und molekularer Gemeinsamkeiten, eine individuelle Identität.

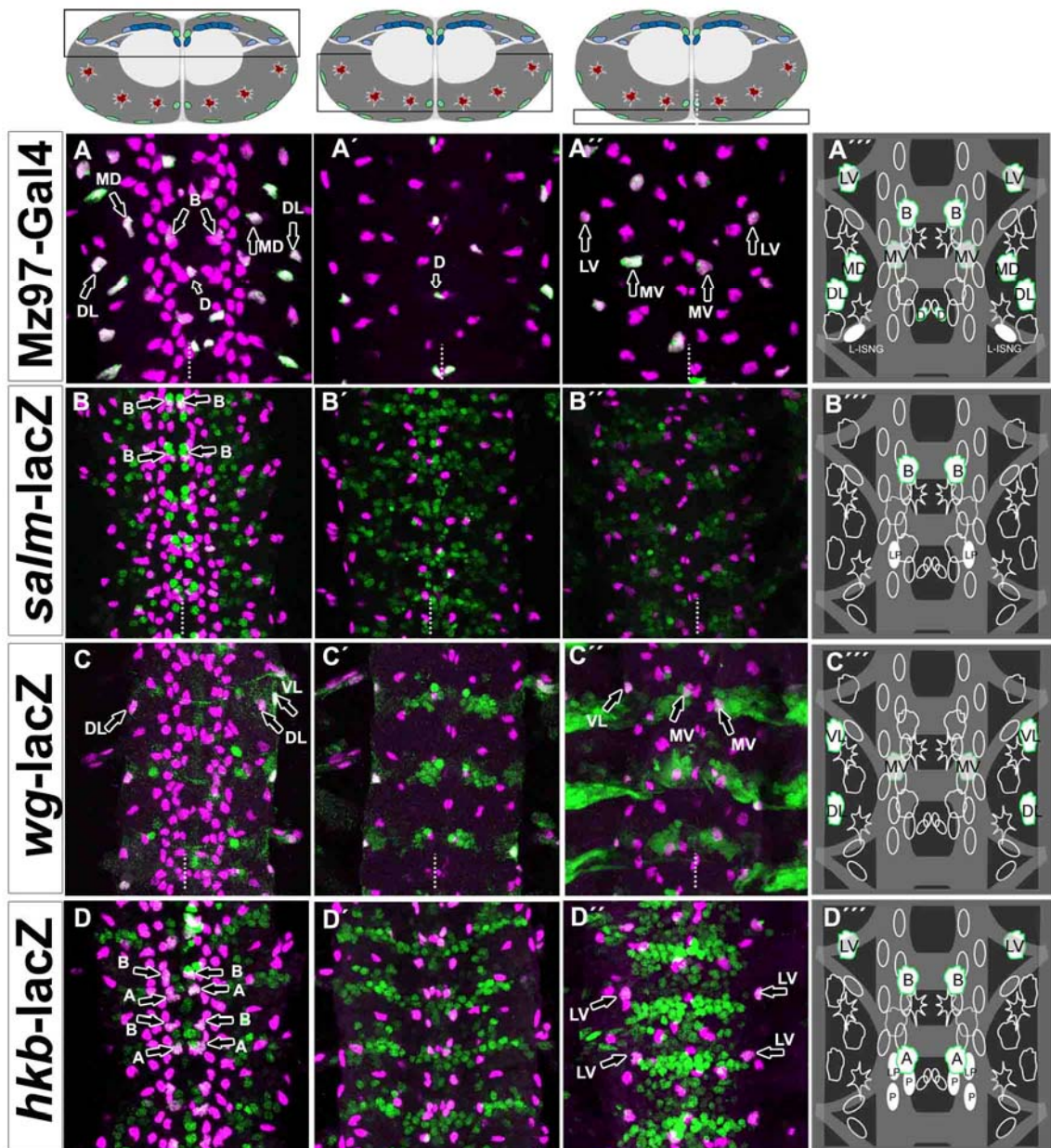


Abbildung 14: Jede Oberflächen-assoziierte Gliazelle kann anhand der Kombination der exprimierten molekularen Marker identifiziert werden

Filetpräparation von Embryonen des Embryonalstadiums 16, abdominale Segmente, Horizontalansicht, anterior ist oben; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet. Die schwarzen Boxen in den oberen Cartoons beziehen sich auf die gezeigten konfokalen Ebenen: (A-H) dorsale Ebenen, (A'-H') mediale Ebenen, (A''-H'') ventrale Ebenen. Folgende Expressionsmuster wurden analysiert: (A-A'') Mz97, nGFP, α -Repo. (B-B'') *salm-lacZ*, α -Repo, α - β Gal. (C-C'') *wg-lacZ*, α -Repo, α - β Gal. (D-D'') *hkb-lacZ*, α -Repo, α - β Gal. Die Pfeile zeigen doppelt gefärbte Zellen an; Namen der Zellen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. (A'''-H''') Cartoon des gesamten glialen Expressionsmusters. Die doppelt gefärbten Zellen sind weiß. Die grüne Umrandung zeigt doppelt gefärbte Zellen, die zur Kategorie der Oberflächen assoziierten Gliazellen gehören.

3.1.1.5 Expression molekularer Marker in Kortex-assoziierten Gliazellen

Die Ergebnisse der Markeranalyse und unserer Klondaten zeigen, dass im Abdomen drei Zellen zur Kategorie der Kortex-assoziierten Glia gehören. Alle drei Zellen zeigen Expression von sechs molekularen Markern (Tab. 8). Als Beispiel ist in Abb. 15 A-A'' die Enhancer-Trap Linie Mz813-Gal4 gezeigt, die mit UAS-nGFP rekombiniert wurde. GFP wird in 90% aller Hemisegmente (n= 66) in drei Gliazellen exprimiert, die im Kortex liegen. Die GFP-Expression ist nicht auf CBGs beschränkt, sondern ist ebenfalls schwach in LGs zu detektieren. Auch die Gal4-Linie *dEAAT1*-Gal4, gekreuzt mit UAS-nGFP, zeigt Expression in den drei CBGs (Abb. 15 B-B''). *dEAAT1* ist ein Aminosäure-Transporter, für den beschrieben wurde, dass er in allen Gliazellen des ZNS exprimiert wird (Soustelle *et al.*, 2002). Diese spezifische Gal4-Linie wird in späten Embryonalstadien dagegen nur in CBGs und etwas schwächer in drei weiteren Gliazellen (MD-SPG, L- und M-ISNG) exprimiert.

	MM-CBG	M-CBG	L-CBG
	NB6-4	NB6-4	NB7-4
<i>dEAAT1</i>-Gal4	x	x	x
Mz813-Gal4	x	x	x
209-lacZ	x	x	(x)
201-lacZ	x	x	(x)
3-101-lacZ	x	x	(x)
<i>nervana2</i>-Gal4	x	x	(x)
<i>neprilysin4</i>*	x	x	x
CG2893*	x	x	x
CG6218*	x	x	x
CG6783*	x	x	x
CG16876*	x	x	
<i>ftz</i>-lacZ	(x)	(x)	

Tabelle 8: Expression der molekularen Marker in Kortex-assoziierten Gliazellen

x Expression in mehr als 50% der untersuchten Hemisegmente

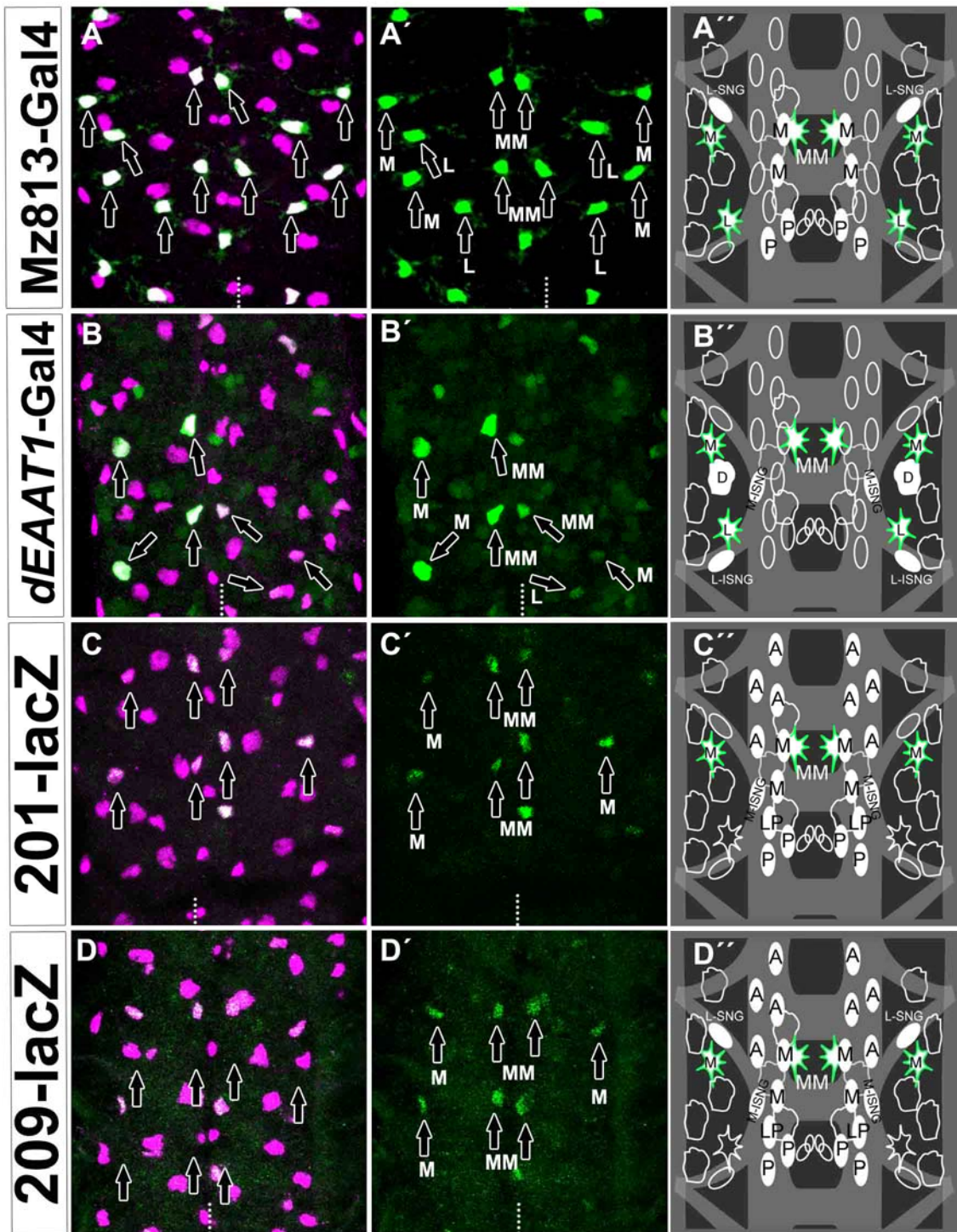
(x) Expression in weniger als 50% und mehr als 10% der untersuchten Hemisegmente

Expression in weniger als 10% der untersuchten Hemisegmenten wird nicht angezeigt

* Charakterisierung über *in Situ* Hybridisierung

CBGs werden von zwei NBs generiert, NB6-4, der die MM-CBG und die M-CBG produziert, und NB7-4, von dem die L-CBG abstammt. Der Unterschied in der klonalen Herkunft der Zellen spiegelt sich auch hier in der Markerexpression wider. Die Enhancer-Trap Linien 201-lacZ (Abb. 15 C-C''), 209-lacZ (Abb. 15 D-D'') und 3-101-lacZ (Tab. 8) werden in beiden CBGs vom NB6-4a stark exprimiert, wohingegen die L-

CBG vom NB7-4 eine sehr schwache β Gal Expression zeigt. Die Expression des Gens CG16876 ist auf die MM-CBG und die M-CBG beschränkt (Altenhein *et al.*, 2006). Einen spezifischen Marker für die L-CBG konnten wir nicht finden. Außerdem gibt es unter den von uns analysierten Markern keinen, dessen Expression auf CBG beschränkt ist. Alle Marker für CBGs werden auch in anderen glialen Subgruppen exprimiert.

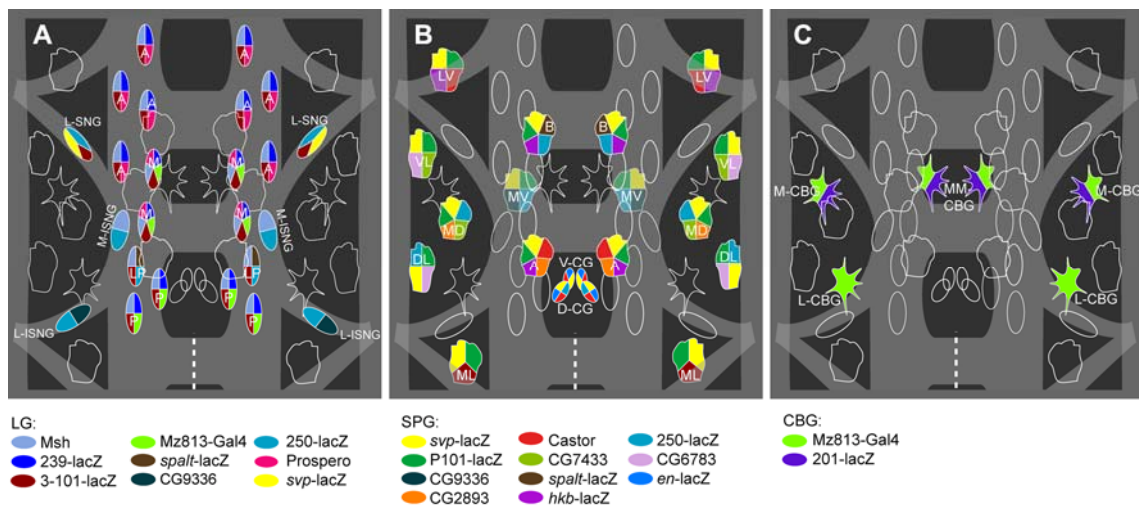


Abbildungsbeschriftung siehe nächste Seite

Abbildung 15: Analyse der Markerexpression in Kortex-assoziierten Gliazellen

Filetpräparation von Embryonen des Embryonalstadiums 16, abdominale Segmente, Horizontalansicht, anterior ist oben; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet; Maximalprojektion von medioventralen Ebenen. Folgende Enhancer Trap Linien wurden mit Antikörperfärbung analysiert: (A-A'') Mz813, nGFP, α -Repo; (B-B'') *dEAAT1*-Gal4 x UAS-nlacZ, α -Repo, α - β Gal; (C-C'') 201-lacZ, α -Repo, α - β Gal; (D-D'') 209-lacZ, α -Repo, α - β Gal. Die Pfeile zeigen doppelt gefärbte Zellen an; Namen der Zellen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. (A-D) Doppelfärbungen, (A'-D') Enhancer Trap Expression, (A''-D'') Cartoon des gesamten glialen Expressionsmusters. Die doppelt gefärbten Zellen sind weiß. Die grüne Umrandung zeigt doppelt gefärbte Zellen, die zu den Kortex-assoziierten Gliazellen gehören.

In Abb. 16 sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen der molekularen Marker in den lateralen Gliazellen des ZNS im Embryonalstadium 16 zusammengefasst.

**Abbildung 16: Charakteristika der Markerexpression der glialen Kategorien im ZNS**

Schematische Darstellung eines abdominalen Neuromers; anterior ist oben; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet. Die spezifische Expression der molekularen Marker ist durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Diese Abbildung zeigt nicht alle Marker, sondern nur eine Auswahl, die die wichtigsten Ergebnisse zu den drei Untergruppen demonstriert:

(A) Neuropil assoziierte Gliazellen werden in LGs und NRG unterteilt. Die LGs können in drei Cluster unterteilt werden, die jeweils die gleichen Marker exprimieren: A-LGs (bestehend aus vier LGs), M-LGs (zwei LGs) und P-LGs (zwei LGs). Die LP-LG exprimiert eine einzigartige Marker-Kombination. (B) jede einzelne Oberflächen assoziierte Gliazelle kann durch die spezifische Kombinationen der Marker-Expression identifiziert werden. (C) Kortex assoziierte Gliazellen: die vom NB6-4a generierten MM-CBG und M-CBG exprimieren die gleichen Marker und können von der L-CBG vom NB7-4 unterschieden werden.

3.1.1.6 Vergleich zwischen Thorax und Abdomen

Jedes thorakale und abdominale Hemineuromer wird aus 30 Neuroblasten gebildet, die eine einzigartige Identität haben. NBs, die an übereinstimmenden Positionen und zur gleichen Zeit, aber in unterschiedlichen Segmenten aus dem Neuroektoderm delaminieren, werden seriell Homologe genannt. Viele NBs generieren den gleichen Zellstammbaum im Thorax und im Abdomen, einige jedoch produzieren

segmentspezifische Zellklone (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Udolph *et al.*, 1993). Diese können sich sowohl in der Zellzahl als auch in der Art der Zellen unterscheiden. Die Anzahl der Gliazellen im thorakalen ZNS unterscheidet sich nicht von der Anzahl im Abdomen, aber die Verteilung der Gliazellen auf die Subgruppen ist eine andere. Die NBs 1-1, 2-2, 5-6 und 6-4 generieren Tagma-spezifische Zellklone. Diese Stammzellen bringen SPG und CBG hervor und verschieben die Anzahl der Gliazellen innerhalb der Kategorie der Oberflächen- und Kortex-assoziierten Gliazellen. Die Neuropil-assoziierten Gliazellen zeigen keine Unterschiede zwischen den Segmenten, da weder die NBs 1-3 und 7-4, noch der LGB Tagma-spezifische Zellklone hervorbringen (Schmidt *et al.*, 1997). NB6-4 generiert im Abdomen ausschließlich CBGs: die M-CBG und die MM-CBG. Im Thorax generiert der NB6-4t Neurone, eine M-CBG, und zwei MM-CBGs. Zusammen mit der L-CBG (NB7-4) kommt man im Abdomen auf eine Zellzahl von drei CBGs (wie oben schon beschrieben) und im Thorax auf vier CBGs. In der Subgruppe der Oberflächen-assoziierten Gliazellen gibt es dagegen eine SPG weniger im Thorax. Hier produziert NB1-1t ausschließlich Neurone (Bossing *et al.*, 1996; Klämbt und Goodman 1991; Prokop und Technau 1994; Udolph *et al.*, 1993), während NB2-2t einen gemischten Zellklon mit Neuronen und einer SPG generiert, die an der gleichen Position liegt, wie die A-SPG vom NB1-1a. Die fehlende LV-SPG wird wahrscheinlich vom NB5-6t ersetzt, der eine zusätzliche ventrale SPG generiert. Die B-SPG fehlt in thorakalen Hemisegmenten.

Für Zellstammbäume von NBs, die keine Tagmaspezifität entwickeln, zeigen sich keine Unterschiede in der glialen Expression der molekularen Marker. Aber wie sieht das Expressionsmuster in den Tagma-spezifischen Zellklonen aus? Um diese Frage zu beantworten, haben wir die Markerexpression in den Gliazellen der Zellstammbäume von NB1-1, 2-2 und 6-4 analysiert. Alle molekularen Marker, die in den beiden CBGs von NB6-4a exprimieren, konnten auch in der zweiten thorakalen MM-CBG detektiert werden. Es scheint demzufolge so zu sein, dass alle NB6-4 generierten Gliazellen der gleichen molekularen Spezifizierung unterliegen. Als Nächstes haben wir die Markerexpression der thorakalen A-SPG-ähnlichen Zelle untersucht. Die Expression sämtlicher SPG-spezifischer Marker (*svp-lacZ*, *M84-lacZ* und *P101-lacZ*) zeigt, dass es sich bei dieser Zelle tatsächlich um eine SPG handelt. Bossing *et al.* konnten zeigen, dass das Genes *hkb* ein spezifischer Marker für die gliale Nachkommenschaft von NB1-1a und NB2-2t ist (Bossing *et al.*, 1996). Wir konnten diesen Befund bestätigen und mit *mirr-lacZ* einen weiteren Marker hinzufügen, der spezifisch in NB1-1a und 2-2t Glia

exprimiert wird. Genau wie es für *hkb* gezeigt wurde, wird *mirr* im Thorax in der A-SPG-ähnlichen Zelle exprimiert. Das klärt noch nicht die Frage, ob diese Zelle im Thorax und Abdomen wirklich die gleiche Identität hat. Die Enhancer-Trap Linie *castor-Gal4* exprimiert im Abdomen das Reportergen spezifisch in der A-SPG und ermöglicht es uns zwischen A-SPG und B-SPG zu unterscheiden. Im Thorax wird *cas-Gal4* in der A-SPG-ähnlichen Zelle exprimiert und zeigt damit, dass diese Zelle nicht nur an der gleichen Position liegt, sondern auch die gleiche Kombination an molekularen Markern exprimiert. Demnach hat die A-SPG die gleiche Identität in Thorax und Abdomen, wird aber von zwei unterschiedlichen Stammzellen generiert.

3.1.2 Molekulare Klassifizierung der Gliazellen im peripheren Nervensystem

Die Gliazellen der Peripherie positionieren sich entlang der axonalen Trakte der Motorneurone und der sensorischen Neurone und umhüllen diese. Periphere Gliazellen (PGs) sind für die Ausbildung der Blut-Nerven-Schranke verantwortlich und garantieren damit die elektrische Leitfähigkeit der Neurone. Sie haben außerdem eine wichtige Funktion als Wegweiser für die auswachsenden Axone der Motorneurone und der sensorischen Neurone während der Entwicklung des PNS. Eine sehr charakteristische Eigenschaft von PGs ist ihre ausgeprägte Beweglichkeit. Im Gegensatz zu Neuronen, die in der Regel an ihrem Geburtsort verweilen und nur zelluläre Fortsätze, wie Axone und Dendriten ausstrecken, sind Gliazellen in der Lage, als ganze Zellen weite Strecken zurückzulegen. PGs überwinden dabei von allen Gliazellen die weitesten Strecken, indem sie aus dem ZNS heraus wandern und dabei die Nerven der gesamten Peripherie ummanteln. Am Ende der Embryonalentwicklung haben sich die PGs in einem geordneten Muster entlang der peripheren Nerven aufgereiht. PGs können aufgrund ihres klonalen Ursprungs in zwei Gruppen unterteilt werden: einige der PGs werden von in der Peripherie liegenden ektodermalen „Sensory organ precursor cells“ (SOPs) gebildet (Bodmer *et al.*, 1989; Fredieu und Mahowald 1989; Nelson und Laughon 1993), die anderen entstammen den Neuroblasten aus dem ZNS (Schmidt *et al.*, 1997).

Wir haben uns die Fragen gestellt, ob PGs eine eigene Identität besitzen. Unterscheiden sich die PGs funktional voneinander? Wie werden sie spezifiziert? Um mögliche Einblicke in diese Differenzierung und Spezifizierung der PGs zu erlangen, habe ich, genau

wie für das ZNS, die Expressionsmuster von molekularen Markern untersucht. Alle Experimente zu peripheren Gliazellen wurden in abdominalen Segmenten analysiert. Diese Untersuchungen werden zusammen mit 4D-Aufnahmen zur Analyse des Migrationsverhaltens individueller PGs im Laufe der Embryogenese, sowie Zellstammbaumanalysen unter dem Titel „Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo“ veröffentlicht (von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung).

3.1.2.1 Das periphere Nervensystem im Embryonalstadium 16

Alle Gliazellen der Peripherie sind mit axonalen Strukturen assoziiert. Die axonalen Trakte werden hauptsächlich von drei peripheren Nervenbündeln gebildet (Bodmer und Jan 1987): dem anterioren Transversalnerv (TN), dem Intersegmentalnerv (ISN, auch anteriores Faszikel genannt) und dem Segmentalnerv (SN, auch posteriores Faszikel genannt). Entlang der anteroposterioren Achse verläuft ein vierter Nerv, der vom „dorsal bipolar dendritic neuron“ (dbd) gebildet wird und als dorsaler longitudinaler Nerv (DLN) bezeichnet wird. Die axonalen Trakte werden von Motorneuronen und sensorischen Neuronen gebildet. Abb. 17 zeigt einen Fas2-Exon-Trap Stamm, bei dem die Motorneurone GFP exprimieren (Fas 2; Abb. 17 A, C und D; Geschenk von Stephan Sigrist). Die sensorischen Neurone werden durch Antikörperfärbung gegen das Futsch-Protein (22C10; Abb. 17 B, C und D) markiert.

In abdominalen Hemisegmenten gibt es zwölf Gliazellen, die entlang der peripheren Nerven an charakteristischen Positionen liegen. Drei Zellen liegen an der Transitionszone (TZ) von ZNS und PNS (Halter *et al.*, 1995; Klämbt und Goodman 1991), von denen zwei mit dem ISN assoziiert sind, während die dritte am SN liegt. Eine Gliazelle ist mit dem SN assoziiert. Entlang des ISNs reihen sich perlschnurartig sechs Zellen auf. Sowohl der TN als auch der DLN werden von jeweils einer Repo positiven Zelle umhüllt. Es gibt außerdem ein weiteres Cluster von fünf Repo positiven Zellen, bei denen es sich nicht um PGs handelt, sondern um so genannte Ligamentzellen. Sie sind nicht mit peripheren Nerven assoziiert und liegen am proximalen Ende des lateralen Chordotonalorgans (Carlson *et al.*, 1997; Carlson *et al.*, 1997).

Um die Zellumrisse der Gliazellen zu sehen, haben wir ein membranständiges UAS-gap-GFP mit *repo*-Gal4 getrieben (Abb. 17 D). Anhand des GFP Musters kann man sehen, dass am Ende der Embryogenese die peripheren Nerven komplett von den PGs umhüllt werden. Die mit dem ISN assoziierten PGs sind nicht voneinander zu unter-

scheiden, da ihre zytoplasmatischen Ausläufer zu dicht zusammen liegen. Dafür werden SN, TN und DLN alleinig von ihren jeweiligen „support glial cells“ umhüllt, deren zellulären Ausläufer in Abb. 17 D zu sehen sind.

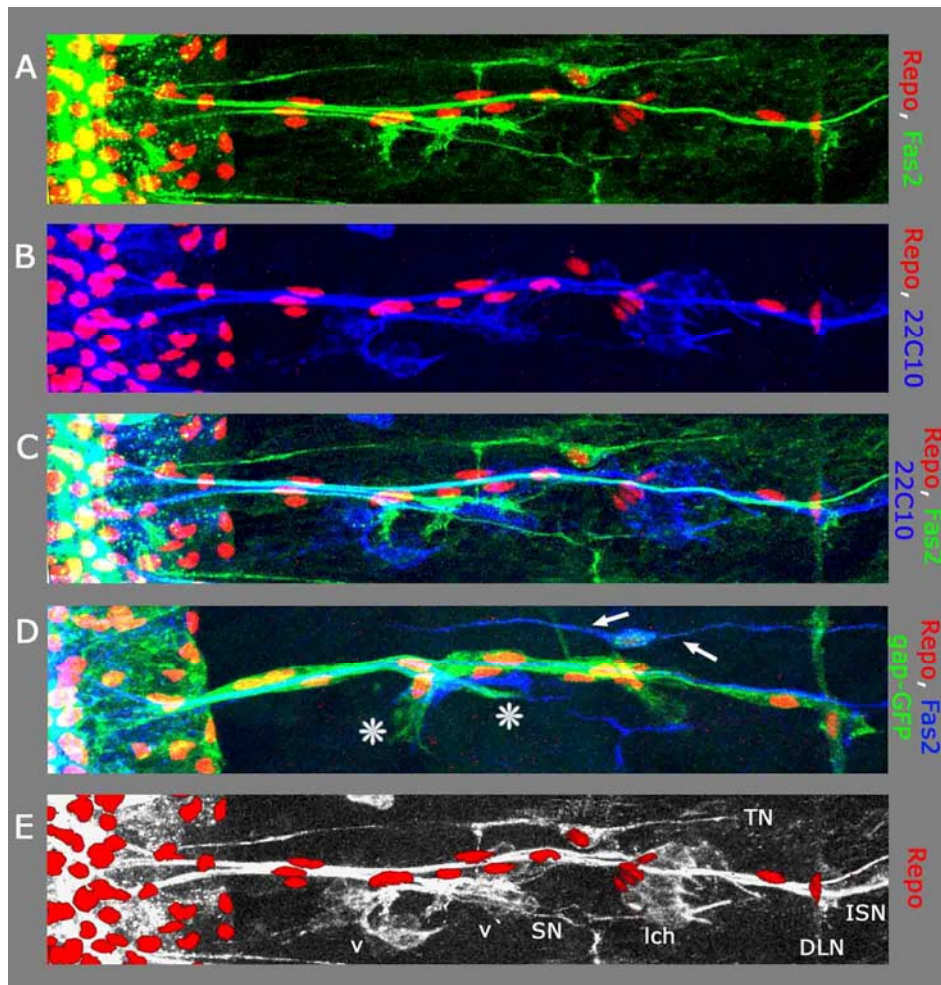


Abbildung 17: Das periphere Nervensystem im Embryonalstadium 16

Abdominales Hemisegment im Embryonalstadium 16 eines Fas2-Exontrap-Stammes (A-C, E; Geschenk von S. Sigrist) und *repo-Gal4* x UAS-gap-GFP (D); anterior ist oben, Mittellinie links. (A-C) Die Zellkerne der peripheren Glia (Rot) positionieren sich entlang axonalen Projektionen der Motoneurone (Grün) und sensorischen Neurone (Blau). (D) Die Expression eines membranständigen GFPs in allen Gliazellen veranschaulicht die Umrisse der PGs (Grün). Die axonalen Trakte der Motoneurone werden komplett von Gliazellen umhüllt. Die dünnen Fortsätze der Gliazellen am TN sind fast nicht sichtbar (kleine Pfeile). Dagegen sind Filopodien-ähnliche Zellfortsätze entlang des Segmentalnervs zu sehen (Sternchen). (E) Das periphere Nervensystem besteht aus vier großen Nervenbündeln (TN, SN, ISN und DLN) und drei Clustern von sensorischen Neuronen (v, v', und lch). Zwölf Repo positive Gliazellen positionieren sich entlang der peripheren Trakte. TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; DLN: dorsaler longitudinaler Nerv; v und v': ventrale sensorische Neurone; lch: laterales Chordotonalorgan. (Abb. aus von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung)

3.1.2.2 Einzelzellidentität der peripheren Gliazellen

Um die Frage zu beantworten, ob PGs eine eigene Identität aufweisen, haben wir die Expressionsmuster molekularer Marker in diesen Zellen untersucht. Für die Analyse der PGs wurden vor allem Enhancer Trap Linien herangezogen und zusammen mit Antikörpern und mRNA-Sonden auf Einzelzellebene charakterisiert (Tab. 9).

Die Gal4-Linie Mz97, nGFP wurde im heterozygoten und homozygoten Zustand ausgewertet. Homozygot exprimieren sechs PGs GFP (Abb. 18 A-A''): die beiden ISN assoziierten EGs (Abb. 18 A-A'; Sternchen), die am SN liegende Zelle (Abb. 18 A-A'; unausgefüllter Pfeilkopf), drei ISN assoziierten PGs (Abb. 18 A-A'; weißer Pfeil, gebogener Pfeil und unausgefüllter, gebogener Pfeil) und die distalste PG am ISN (Abb. 18 A-A'; ausgefüllter Pfeilkopf). Zusätzlich dazu sind Zellen aus dem Mesoderm und die Önozyten Mz97 positiv. Im heterozygoten Zustand dagegen sind nur vier PGs und die Önozyten GFP positiv (Abb. 18 B-B''): eine der EGs (Abb. 18 B-B'; Sternchen), die am SN liegende Zelle (Abb. 18 B-B'; unausgefüllter Pfeilkopf), eine der PGs am ISN (Abb. 18 B-B'; gebogener Pfeil), sowie die distalste PG am ISN (Abb. 18 B-B'; ausgefüllter Pfeilkopf). In 20% der analysierten Hemisegmente ($n > 80$) ist eine weitere mit dem ISN assoziierte proximale PG GFP positiv (wird hier nicht gezeigt). Der Unterschied in der GFP Expression zwischen dem heterozygoten und dem homozygoten Zustand ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in heterozygoten Embryonen eine Kopie des p(Gal4) Elements weniger vorkommt als im homozygoten Zustand. Das Muster der GFP Expression ist in beiden Konditionen jedoch stark reproduzierbar. Aus diesem Grund haben wir die Linie als zusätzlichen Marker zur α -Repo Färbung benutzt. Alle analysierten lacZ-Linien wurden mit Mz97 verkreuzt, und die Expression von β Gal wurde zusammen mit Repo und GFP ausgewertet. Die Expression der Markerstämme konnte dadurch im Kontext aller PGs (Repo) und einzeln identifizierbarer Zellen (Mz97, nGFP) analysiert werden. Die Symbole kennzeichnen immer die gleichen peripheren Gliazellen.

Die lacZ-Linie 3-101 (Abb. 18 C-C'') zeigt β Gal Expression in den mit dem TN und dem SN assoziierten PGs (Abb. 18 C-C'; spitzer Stern und unausgefüllte Pfeilspitze) und einer proximalen PG am ISN (Abb. 18 C-C'; Pfeil) in 90% der analysierten Hemisegmente ($n = 36$). In 20% der Fälle ist zusätzlich eine weitere PG am ISN β Gal positiv. Die Enhancer-Trap Linie 250-lacZ (Abb. 18 D-D'') zeigt β Gal Expression in drei von vier Mz97 positiven Zellen in 90% der Hemisegmente ($n = 24$): in der distalen EG (Abb. 18 D-D'; Sternchen), in PG am SN (Abb. 18 D-D'; unausgefüllte Pfeilspitze)

und in einer medialen PG am ISN (Abb. 18 D-D'; gebogener Pfeil). Die distalste PG am ISN, die als vierte Zelle Mz97 positiv ist, zeigt keine β Gal Expression in 250-lacZ, dafür ist aber die mit dem DLN assoziierte Gliazelle gefärbt (Abb. 18 D-D'; unausgefüllter Pfeil). Beide mit dem ISN assoziierten EGs (Abb. 18 E-E', Sternchen), die PG des SNs (Abb. 18 E-E'; unausgefüllte Pfeilspitze), die proximale PG des ISNs (Abb. 18 E-E'; Pfeil) und die Gliazelle des TN (Abb. 18 E-E'; spitzer Stern) zeigen β Gal Expression in der Enhancer-Trap Linie 201-lacZ. In 25% der analysierten Hemisegmente ist die mediale PG des ISN (Abb. 18 E-E'; gebogener Pfeil) und die ePG11 (nicht gezeigt) ebenfalls β Gal positiv (n= 30). LacZ-Stamm 3-66 markiert exklusiv die mit dem TN assoziierte PG (Abb. 18 F-F'; spitzer Stern). Eine Enhancer-Trap Insertion in der Nähe des *spalt major* Locus (*salm-lacZ*; Abb. 18 G-G'') wird in drei PGs exprimiert: in der am SN liegende PG (Abb. 18 G-G'; unausgefüllte Pfeilspitze), der benachbarten proximalen PG am ISN (Abb. 18 G-G'; Pfeil) und in der PG am DLN (Abb. 18 G-G'; unausgefüllter Pfeil). *mirr-lacZ* markiert vier Gliazellen in der Peripherie in 100% der Hemisegmente (n= 20; Abb. 18 H-H'): zwei GFP negative PGs am ISN (Abb. 18 H-H'; dünne Pfeile), die distalste PG des ISNs (Abb. 18 H-H'; ausgefüllte Pfeilspitze) und die mit dem DLN assoziierte PG (Abb. 18 H-H'; unausgefüllter Pfeil). In 50% aller analysierten Hemisegmente zeigt zusätzlich die PG am TN β Gal Expression (Abb. 18 H-H'; spitzer Stern). Sowohl *salm-lacZ*, als auch *mirr-lacZ* zeigen Reporterexpression in einigen Zellen des lateralen Chordotonalorgans (Abb. 18 G, G', H und H'; lch). *cas-Gal4* gekreuzt mit UAS-nGFP markiert zwei mit dem ISN assoziierte PGs (Abb. 18 J-J'; dünne Pfeile). Der einziger Marker für die mit dem SN assoziierte EG ist *ladybird*, hier mittels einer Antikörperfärbung gegen das Lbe-Protein gezeigt (Abb. 18 K-K'; unausgefüllter, dünner Pfeil) (De Graeve *et al.*, 2004). Alle Marker, die getestet wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Anhand der spezifischen Kombination an Markerexpressionen können wir fast alle Gliazellen in der Peripherie einzeln ansprechen und voneinander unterscheiden. Die Ausnahme bilden zwei mit dem ISN assoziierte PGs, die beide *cas-Gal4/mirr-lacZ* positiv sind, und nicht unterschieden werden können.

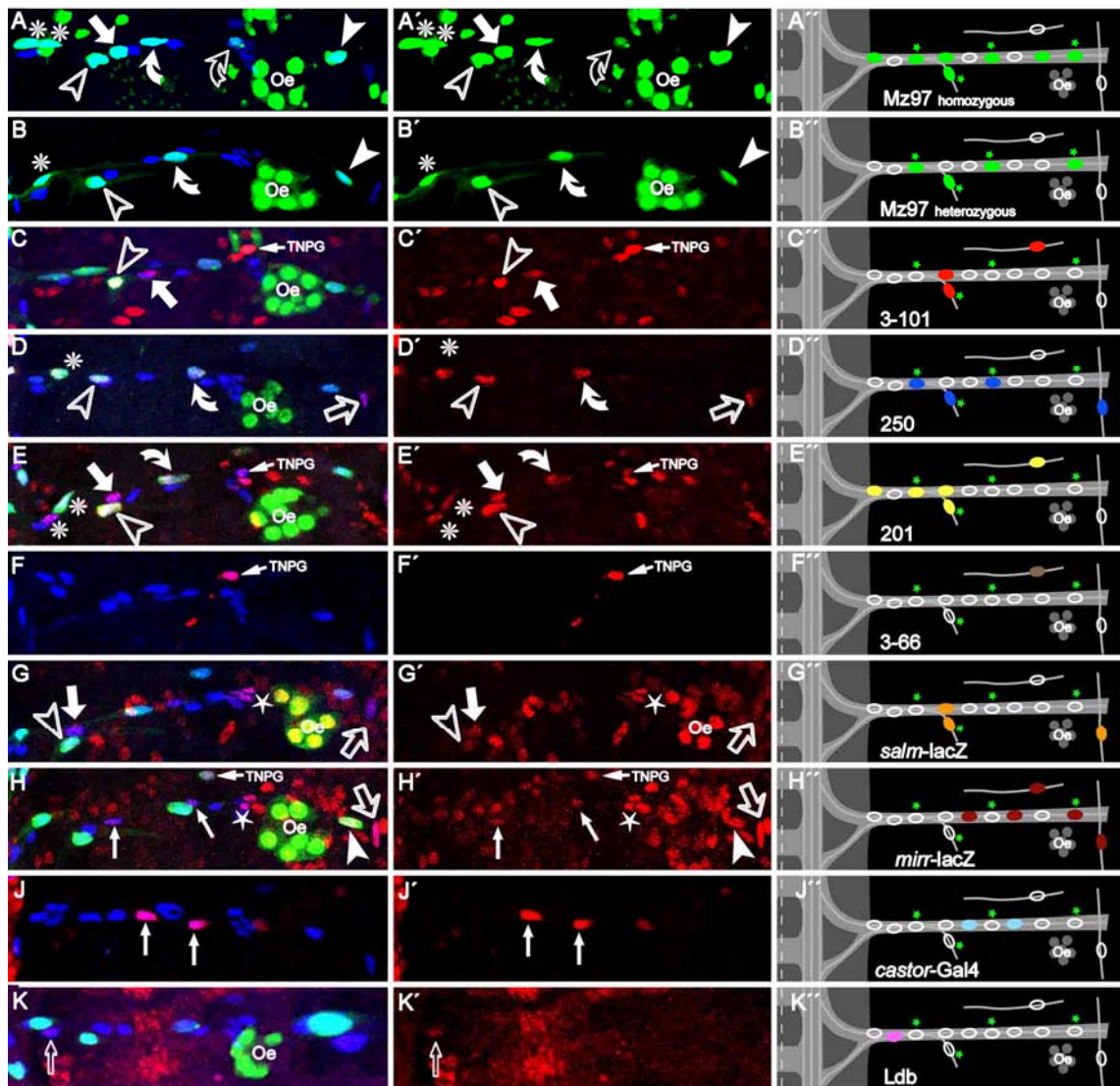


Abbildung 18: Identifizierung der peripheren Gliazellen via Expression von molekularen Markern
 Filetpräparation von Stadium 16 Embryonen zeigt die Peripherie eines abdominalen Hemisegment; anterior ist oben, ZNS links. Die meisten Marker wurden im heterozygoten Mz97, nGFP Hintergrund analysiert (Grün), um die einzelnen Zellen besser identifizieren zu können. Folgende Marker (Rot) wurden mit α -Repo Antikörperfärbung (Blau) analysiert: (A-A'') Mz97, nGFP / Mz97, nGFP α -Repo, GFP; (B-B'') Mz97, nGFP / +, α -Repo, GFP; (C-C'') 3-101-lacZ x Mz97, nGFP, α -Repo, α - β Gal, GFP; (D-D'') 250-lacZ x Mz97, nGFP, α -Repo, α - β Gal, GFP; (E-E'') 201-lacZ x Mz97, nGFP, α -Repo, α - β Gal, GFP; (F-F'') 3-66-lacZ x Mz97, nGFP, α -Repo, α - β Gal, GFP; (G-G'') *salm-lacZ* x Mz97, nGFP, α -Repo, α - β Gal, GFP; (H-H'') *mirr-lacZ* x Mz97, nGFP, α -Repo, α - β Gal, GFP; (J-J'') *castor-Gal4* x UAS-nlacZ, α -Repo, α - β Gal; (K-K'') Mz97, nGFP / +, α -Lbe, α -Repo, GFP. (A-K) Doppel- bzw. Dreifachfärbung, (A'-K') Markergenexpression allein, (A''-H'') Cartoon des glialen Expressionsmusters. Die GFP Expression im heterozygoten Mz97, nGFP Hintergrund ist in den Cartoons durch grüne Sternchen gekennzeichnet. Gleiche Zellen sind immer mit gleichen Symbolen gekennzeichnet (Beschreibung siehe Text).

	ePG1	ePG2	ePG3	ePG4	ePG5	ePG6	ePG7	ePG8	ePG9	ePG10	ePG11	ePG12
	1-3	5-6a	1-3	SOP	SOP	2-5	1-3	2-5	1-3	SOP	SOP	SOP
Mz97-Gal4 homozygot	x		x	x	x		x		x	x		
Mz97-Gal4 heterozygot			x	x			x			x		
cas-Gal4						x		x				
3-101-lacZ				x	x		(x)					x
250-lacZ			x	x			x				x	
201-lacZ	x		x	x	x		(x)				(x)	x
3-66-lacZ												x
salm-lacZ				x	x						x	
mirr-lacZ						x		x		x	x	x
svp-lacZ		x	x	x		x	x	x		x		
wg-lacZ		x		x	x					x	x	
Y15-lacZ	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
J29-lacZ			x	x			x			x		
Lbe		x										
Pdm											x	
Hb												(x)
CG9336*	x		x	x	x		x		x	x	x	

Tabelle 9: Expression der molekularen Marker in peripheren Gliazellen

x Expression in mehr als 50% der untersuchten Hemisegmente

(x) Expression in weniger als 50% und mehr als 10% der untersuchten Hemisegmente

Expression in weniger als 10% der untersuchten Hemisegmenten wird nicht angezeigt

* Charakterisierung über *in Situ* Hybridisierung

3.1.2.3 Positionierung der peripheren Gliazellen

Die peripheren Gliazellen haben eine individuelle Identität, die sich nicht nur in der Assoziation mit unterschiedlichen Nerven, sondern auch in der spezifischen Kombination der Markergenexpression zeigt. Ergibt sich daraus auch eine bestimmte Funktion bzw. Position für die einzelnen peripheren Gliazellen? Mithilfe der molekularen Marker haben wir untersucht, ob sich die PGs an stereotype Positionen entlang der Nerven anordnen oder ob die Positionen austauschbar sind. Die Zellen wurden anhand der Markergenexpression identifiziert und ihre Position zueinander bestimmt (Abb. 19 A und Tabelle 10). Dabei haben wir für die drei PGs in der Transitionszone 60 und für die Gliazellen entlang des ISN mehr als 100 Hemisegmente ausgewertet. Insgesamt sind die Positionen der einzelnen Zellen sehr stereotyp. In einigen wenigen Fällen verschiebt sich eine Zelle um eine Position nach distal oder proximal. Die Gliazellen in der TZ zeigen dabei viel mehr Variabilität als die weiter distal gelegenen Zellen.

Die Einzelzellidentität der peripheren Gliazellen zeigt sich also auch in der Anordnung der Zellen entlang der peripheren Trakte am Ende der Embryonalentwicklung.

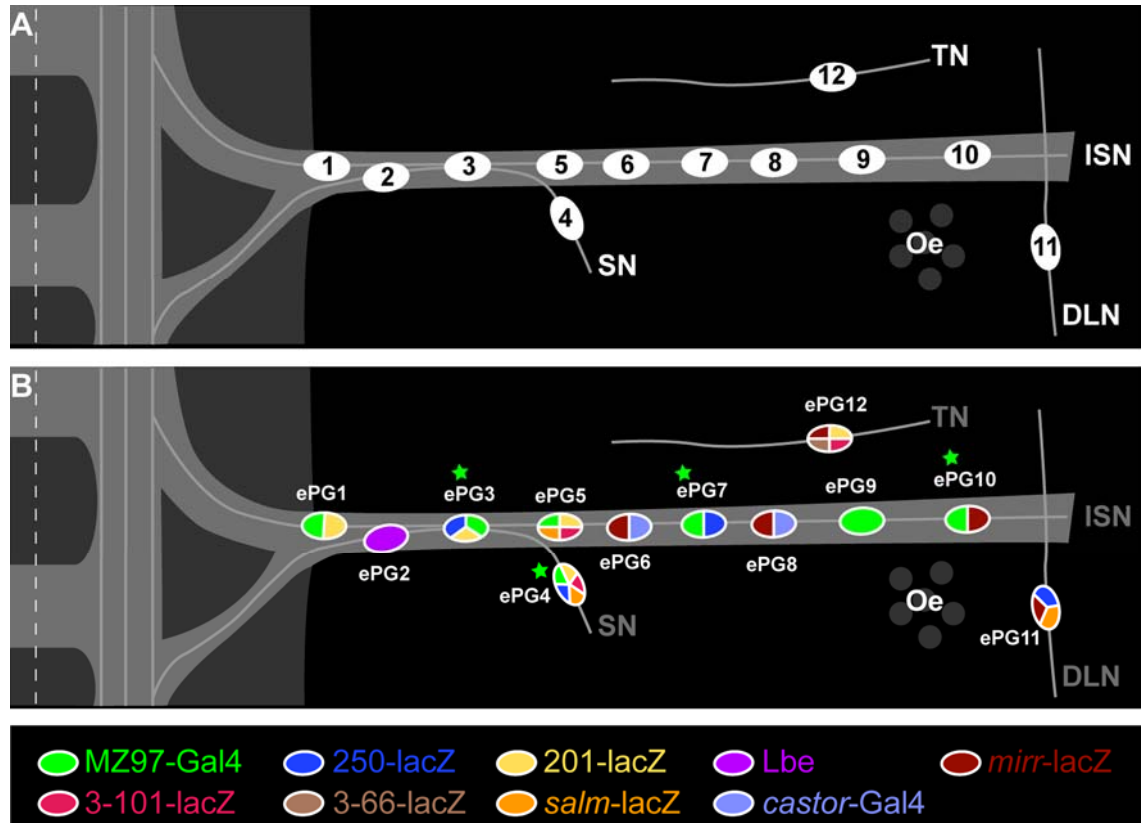


Abbildung 19: Position und Nomenklatur der embryonalen peripheren Gliazellen

Schematische Darstellung eines abdominalen Hemisegments; Stadium 16; anterior ist oben, Mittellinie links. (A) Die Positionen der zwölf peripheren Gliazellen sind stereotyp, mit wenigen Abweichungen (siehe Tab. 10). Die Benennung basiert auf der proximodistalen Positionierung der PGs entlang der peripheren Trakte. Die proximalsten PG ist die ePG1 und die PG am TN die ePG12. (B) Die Expression der molekularen Marker ist durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Die grünen Sternchen kennzeichnen die PGs, die im heterozygoten Zustand Mz97, nGFP exprimieren. Diese Abbildung zeigt nicht alle Marker, sondern nur eine Auswahl, die die wichtigsten Ergebnisse demonstriert: alle PGs können anhand ihrer spezifischen Markerexpression identifiziert werden, mit Ausnahme der vom NB2-5 generierten PGs, die beide *mirr-lacZ* und *cas-Gal4* exprimieren. Weitere Marker können Tab. 9 entnommen werden. TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; DLN: dorsaler longitudinaler Nerv; Oe: Önozyten.

Pos. Cell	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ePG1	62,5	6,3	31,2									
ePG2	17,7	38,2	44,1									
ePG 3	7,1	46,4	46,4									
ePG 4				95,9	4,1							
ePG 5				4,9	91,5	3,7						
ePG 6					4,4	86,8	8,8					
ePG 7						7,87	69,7	21,4	1,1			
ePG 8							21,3	69,3	9,3			
ePG 9							1,5	6,1	92,4			
ePG10										100		
ePG11											100	
ePG12												100

Tabelle 10: Position der peripheren Gliazellen

Tabelle aus von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung

3.1.2.4 Die Nomenklatur der peripheren Gliazellen

Die Benennung der peripheren Gliazellen in der Literatur ist uneinheitlich und verwirrend (siehe Tab. 11). Eine frühe Arbeit über Gliazellen in der Peripherie identifizierte und benannte die mit dem TN und DLN assoziierten PGs in „support cell of the lateral bipolar dendritic neuron“ und „support cell of the dorsal bipolar dendritic neuron“ (Bodmer *et al.*, 1989). Als nächstes wurden sechs weitere Gliazellen beschrieben, von denen drei als Exit Glia und drei als periphere Glia klassifiziert wurden, die PG1 bis PG3 (von proximal nach distal) bezeichnet wurden (Fredieu und Mahowald 1989; Klämbt und Goodman 1991). Spätere Arbeiten benannten die Zellen um: aus PG1 wurde die „ventral peripheral glia“ (vPG) und aus PG3 die „dorsolateral peripheral glia“ (Sepp *et al.*, 2000). In Edenfeld *et al* wird die dIPG als „dorsal intersegmental peripheral glia“ (dIPG) bezeichnet. Zusätzlich dazu wurden zwei weitere Zellen am ISN als „ventral intersegmental peripheral glia“ (vIPG) und „medial intersegmental peripheral glia“ (mIPG) benannt. Insgesamt ist die Benennung widersprüchlich und uneinheitlich. Wir schlagen daher eine Terminologie auf vor, die die identifizierten Zellen in ein einheitliches und simples Nomenklatorsystem integrieren. Basierend auf der stereotypen Position der Zellen im Embryonalstadium 16 werden die PGs von eins bis zwölf durchnummeriert, angefangen mit der proximalsten Zelle im Exitbereich (Abb. 19 B). Die alte und neue Nomenklatur der PGs sind in Tab. 11 zusammengefasst.

Nomenklatur							
von Hilchen et al., unveröffentlicht	Bodmer et al., 1989	Fredieu und Mahowald, 1989	Klämbt und Goodman, 1991	Nelson und Laughon, 1993	Sepp et al., 2000	Edenfeld et al., 2006	
ePG1		sechs periphere Gliazellen	EGA	EA, M1, M2			
ePG2			EGM1				
ePG3			EGM2			vIPG	
ePG4			PG1	P1	vPG	vPG	
ePG5			PG2	P2			
ePG6							
ePG7							mIPG
ePG8							
ePG9							
ePG10			PG3	P3	dIPG	dIPG	
ePG11	dbd glia						
ePG12	lbd						

Tabelle 11: Nomenklatur der peripheren Gliazellen

Tabelle aus von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung

3.1.2.5 Klonaler Ursprung der peripheren Gliazellen

Die Untersuchungen der Markerexpression haben gezeigt, dass, abgesehen von zwei am ISN liegenden PGs, jede PG ihre eigene Identität besitzt und am Ende der Embryonalentwicklung eine bestimmte Position einnimmt. Doch woher kommen die PGs? Die Herkunft der ePG11, der ePG10 und der ePG12 sind in früheren Arbeiten schon detailliert beschrieben worden (Bodmer *et al.*, 1989; Fredieu und Mahowald 1989; Nelson und Laughon 1993). Alle drei werden im Stadium 13 von SOPs in der Peripherie generiert. Außerdem war bekannt, dass drei NBs aus dem ZNS periphere Gliazellen produzieren: der NB1-3 generiert PGs und EGs, der NB2-5 produziert ebenfalls PGs, und eine der EGs stammt vom NB5-6a ab (De Graeve *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 1997). Um genau zu untersuchen, welche PG von welchem Vorläufer abstammt, wurden einzelne Vorläufer in verschiedenen transgenen Linien (homozygot Mz97, nGFP, *repo*-Gal4 und *cas*-Gal4 gekreuzt mit UAS-nGFP) mit DiI markiert und die Zellstammbäume zusammen mit den spezifischen GFP Mustern ausgewertet. Dies geschah ebenfalls in Kollaboration mit Christof Rickert, der die Markierungen durchgeführt und dokumentiert hat. DiI Markierungen des NB1-3 in Mz97, nGFP und *repo*-Gal4, nGFP (Abb. 20 A und A') zeigen, dass dieser NB vier mit dem ISN assoziierte PGs generiert. Es handelt sich dabei um die ePG1, eEPG10 (Abb. 20 A-A');

Sternchen), ePG7 (Abb. 20 A-A'; gebogener Pfeil) und ePG9 (Abb. 20 A-A'; unausgefüllter, gebogener Pfeil). DiI Markierungen im *cas*-Gal4, nGFP Hintergrund demonstrieren, dass die beiden *cas*-Gal4 positiven ePG6 und ePG8 Nachkommen des NB2-5 sind (Abb. 20 B; dünne Pfeile). In Abb. 20 C-C'''' ist ein SOP in der Peripherie zu erkennen, der Neurone der v- und v' sensorischen Cluster generiert, die ins ZNS projizieren (Abb. 20 C-C'). Zusätzlich produziert dieser Vorläufer zwei periphere Gliazellen: etwas ventraler gelegene ePG4 (Abb. 20 C''-C'''; unausgefüllte Pfeilspitze) und die ePG5 (Abb. 20 C''-C'''; dicker, weißer Pfeil).

Damit ist die klonale Herkunft aller lateralen Gliazellen im PNS aufgeschlüsselt. Fünf der zwölf Zellen werden von SOPs generiert, die verbleibenden sieben PGs stammen von den NBs 1-3, 2-5 und 5-6 ab (Abb. 20 D).

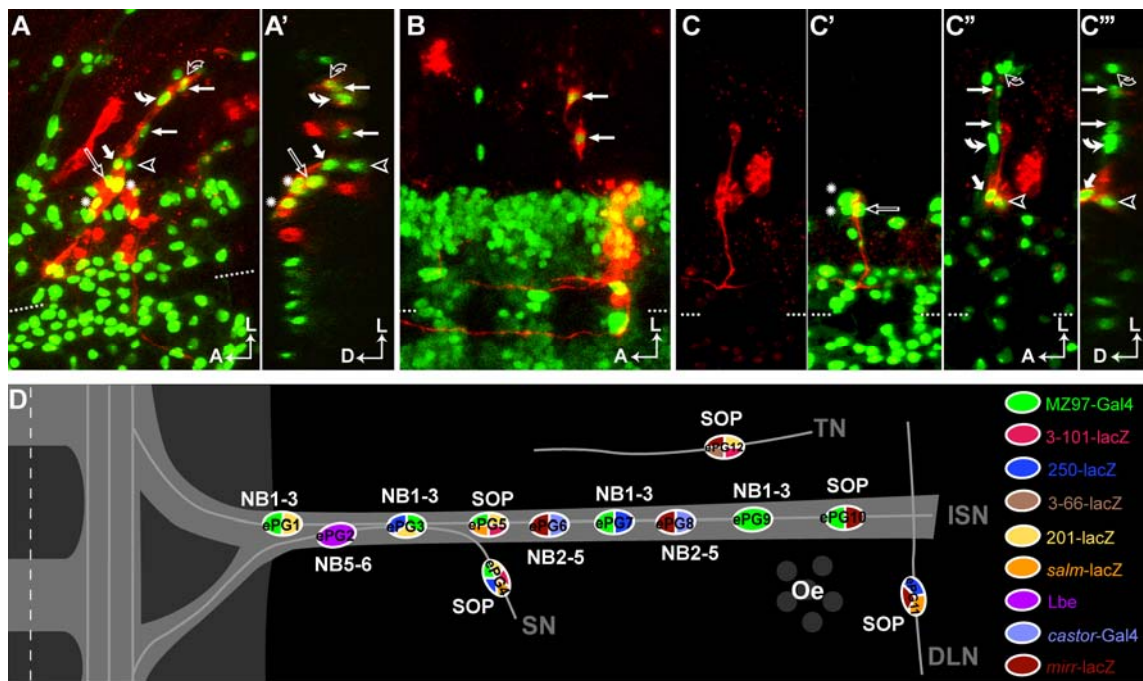


Abbildung 20: Klonale Herkunft der peripheren Gliazellen

(A-C''') Filetpräparation von Embryonen im Stadiums 16, abdominale Neuromere, anterior ist links; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet. Fluoreszierende DiI Markierungen in Rot; Marker in Grün. Die DiI Markierungen wurden in *repo*-Gal4, nGFP (A und C-C''') und *cas*-Gal4, nGFP (B) durchgeführt. (A) NB1-3 Klon, Horizontalansicht und (A') Sagitalansicht zeigen, dass vier PGs zum Zellstammbaum des NB1-3 gehören: ePG1 und 3 (Sternchen), ePG7 (weißer, gebogener Pfeil) und ePG9 (unausgefüllter, gebogener Pfeil). (B) Die Cas positiven Zellen ePG6 und ePG8 werden von NB2-5 generiert (kleine, weiße Pfeile). (C) Zellstammbaum eines SOPs; (C und C') Sensorischen Neurone des Klons projizieren ins ZNS. (C'') Horizontalansicht und (C''') Sagitalansicht zeigen die ePG4 (unausgefüllter Pfeilkopf) und die ePG5 (dicker, weißer Pfeil), die den glialen Anteil des SOP-Stammbaums bilden. (D) Schema eines abdominalen Hemisegments; Stadium 16; anterior ist oben, Mittellinie links. Die Expression der molekularen Marker ist durch unterschiedliche Farben dargestellt; Farbkode links. Der klonalen Ursprung der PGs ist mit weißen Buchstaben gekennzeichnet, die Namen der PGs in schwarzen Buchstaben. TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; DLN: dorsaler longitudinaler Nerv; Oe: Önozyten. (Abb. aus von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung)

3.1.3 Mutantenanalyse mithilfe der molekularen Marker

Die meisten Gliazellen des ZNS und PNS können aufgrund ihrer spezifischen Expression der molekularen Marker individuell angesprochen werden. Dadurch ist es möglich, das Schicksal einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Entwicklung, Spezifizierung und ihres Migrationsverhaltens in mutanten Hintergründen zu untersuchen. Die von mir analysierten Marker bieten gute Kandidaten für eine Mutantenanalyse, da ihr Expressionsmuster in Gliazellen genau bekannt ist. Anhand der phänotypischen Charakterisierung einer Funktionsverlustmutante von *castor*, soll im Folgenden der Nutzen der molekularen Marker demonstriert werden.

Die wildtypische Expression von *cas* wurde in Embryonen der Kreuzung *cas*-Gal4 x UAS-*nlacZ* gefärbt mit α - β Gal und im Wildtyp mit Antikörperfärbung gegen α -Cas analysiert. Die Expression ist im ZNS und PNS konstant. *cas* wird in den beiden peripheren Gliazellen des NB2-5 exprimiert (ePG6 und 8; Abb. 18 J-J'') und neben vielen Neuronen, in vier Gliazellen im ZNS: in den beiden „Channel Glia“ (V-CG und D-CG vom NB7-4) und in A-SPG und LV-SPG des NB1-1a (Abb. 21 A-D). Antikörperfärbung gegen Castor zeigt im PNS in Stadium 16 keine Färbung mehr, wohingegen im ZNS die Färbung noch schwach zu sehen ist. Das liegt wahrscheinlich daran, dass das Cas-Protein in späten Stadien schon abgebaut ist, während Gal4 oder *lacZ* langsamer degradiert werden.

In der Funktionsverlustmutante von *cas* erscheinen die axonalen Trakt des ZNS und auch des PNS intakt. Trotzdem treten sehr spezifische Defekte in der Anzahl und in der Position der Gliazellen im ZNS und PNS mit einer hohen Penetranz auf. In der Peripherie fehlen in jedem analysierten Hemisegments (n=26) zwei PGs, sodass nur noch sieben statt neun PGs zwischen Exitbereich und den Ligamentzellen zu finden sind. Um zu untersuchen, welche der PGs in der Peripherie fehlen, wurden *In Situ* Hybridisierungen mit einer mRNA-Sonde gegen das Gen CG9336 durchgeführt (dieses Experiment wurde von Christian von Hilchen gemacht). CG9336 wird im Wildtyp in allen PGs vom NB1-3, in den ePGs 4, 5, 10 und 11 exprimiert. Es wird also, umgekehrt gesagt, nicht in den Gliazellen vom NB5-6 (ePG2) und NB2-5 (ePG6 und 8) exprimiert (Tab. 9). In der *cas*-Mutante zeigen alle Gliazellen in der Peripherie, bis auf die ePG2, Expression von CG9336, was eindeutig zeigt, dass es sich bei den fehlenden Zellen um ePG6 und 8 handelt (von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung).

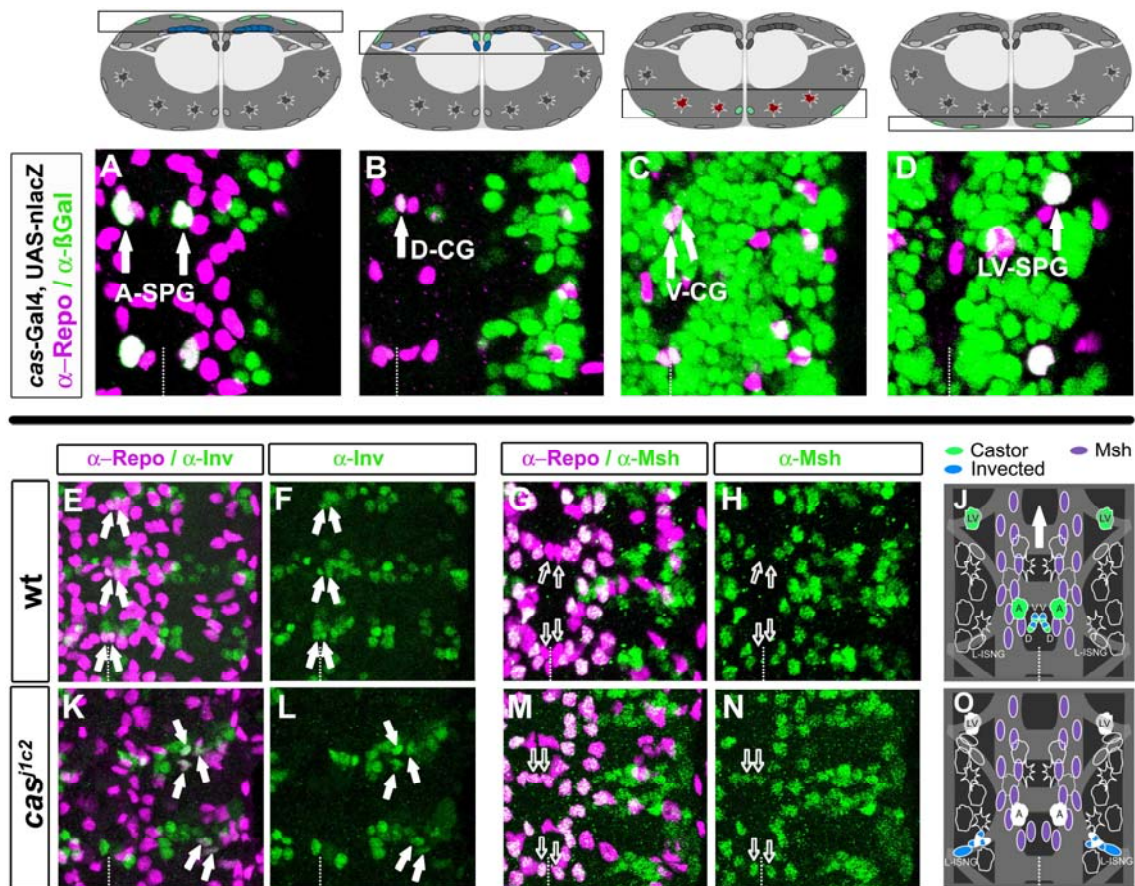


Abbildung 21: Charakterisierung von homozygot mutanten castor Embryonen im ZNS

Filetpräparation von Embryonen des Embryonalstadiums 16, abdominale Segmente, Horizontalansicht, anterior ist oben; Mittellinie durch gestrichelte Linie angedeutet. (A-D) *cas-Gal4xUAS-nlacZ*; Antikörperfärbung gegen α -Repo (Magenta) und β Gal (Grün), doppelt gefärbte Zellen in weiß, Namen der Zellen sind abgebildet. Die schwarzen Boxen in den oberen Cartoons beziehen sich auf die gezeigten konfokalen Ebenen: (A) dorsale Ebene zeigt die A-SPG; (B) Maximalprojektion von drei dorsalen Ebenen präsentiert doppelt gefärbten D-CG; laterale Zellen erscheinen weiß aufgrund der Überlagerung der Ebenen, sind aber nicht doppelt gefärbt; (C) mediale Ebene, V-CG, (D) ventrale Ebene zeigt die LV-SPG. (E-J) Wildtyp, α -Repo mit α -Inv (E und F) und mit α -Msh (G und H). (K-O) homozygoten *castor^{jic2}* Funktionsverlustmutanten (Mellerick *et al*, 1992), α -Repo mit α -Inv (K und L) und mit α -Msh (M und N). Im Wildtyp liegen die Inv positiven CGs medial in den Dorsoventrankanälen. In der *cas*-Mutante gibt es drei Inv positive Gliazellen, die am lateralen Rand des ZNS liegen (weiße Pfeile in E, F, K und L). In der *cas*-Mutante positionieren sich die posterioren, Msh positiven LGs ganz medial, während im Wildtyp die Msh negativen CGs am medialsten liegen (weiße, unausgefüllte Pfeile in G, H, M und N). (J und O) Wildtyp und *castor^{jic2}* Phänotyp im Cartoon zusammengefasst; Markerexpression wird durch Farben angezeigt. In der *cas*-Funktionsverlustmutante werden die Zellen, die im Wildtyp *cas* exprimieren, weiß dargestellt.

Im ZNS der *cas*-Mutante ist die Anzahl der Repo positiven Zellen erhöht. Zur statistischen Absicherung wurde die Zahl der Repo positiven Zellen in 30 abdominalen Hemisegmenten von homozygot mutanten Stadium 16 Embryonen bestimmt. Mit einer maximalen Variabilität von 1,3 Zellen, befinden sich in den Mutanten 29 Repo positive Zellen pro Hemisegment, also vier Zellen mehr als im Wildtyp. Zwei der zusätzlichen Gliazellen liegen im Exitbereich des ZNS an der Position, an der die NB2-5

Tochterzellen geboren werden. Es ist also wahrscheinlich, dass die PGs von NB2-5 nicht fehlen, sondern an ihrem Geburtsort bleiben und nicht in die Peripherie auswandern. Auch Gliazellen aus dem ZNS scheinen in der Funktionsverlustmutante von *cas* Wanderungsdefekte zu zeigen. Im Wildtyp werden die CGs lateral geboren und wandern im Laufe der Embryonalentwicklung in die Dorsoventralkanäle ein. Beide Zellen exprimieren, unter anderem, *cas* und *invected* (weiße Pfeile in Abb. 21 E und F). In der *cas* Mutante liegt ein Cluster von zwei bis drei Zellen lateral im Invected-Streifen (weiße Pfeile in Abb. 21 K und L). Diese Zellen haben CG-typische, kleine, runde Zellkerne und sind *Inv* positiv. Es handelt sich hierbei um CGs, die an ihrem lateralen Geburtsort liegen bleiben und nicht zu den Dorsoventralkanälen wandern. Trotz des Fehlens der CGs gibt es in der Mutante Repo positive Zellen, die direkt über den Dorsoventralkanälen liegen. Bei diesen Zellen handelt es sich longitudinale Gliazellen, wie wir anhand einer Antikörperfärbung gegen *Msh*, das exklusiv in LGs und in der M-ISNG exprimiert wird, feststellen konnten (Abb. 21 G und H; unausgefüllte Pfeile; Tab. 6). Die posterioren LGs positionieren sich in der *cas* Funktionsverlustmutante viel weiter medial als im Wildtyp (Abb. 21 M und N; unausgefüllte Pfeile), vermutlich um das Fehlen der CGs zu kompensieren. Zusätzlich zu den Positionierungsdefekten konnten wir eine Deregulierung von *Inv* in der L-ISNG feststellen. Diese Zelle wird vom NB7-4 generiert und exprimiert sowohl *cas* als auch *inv* in frühen embryonalen Stadien. Im Laufe der Embryogenese schaltet sie beides ab und ist in Stadium 16 im Wildtyp *Inv* und *Cas* negativ. In der *cas* Mutante dagegen bleibt *inv* angeschaltet. A-SPG und LV-SPG werden beide vom NB1-1a generiert und exprimieren *cas* im Wildtyp. In der Mutante sind beide Zellen präsent und nehmen ihre wildtypischen Positionen ein.

3.2 EMS Mutagenese zur Identifizierung von Genen, die eine Rolle bei der Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen spielen

Die Analyse von Mutanten ist eine wichtige Methode zur Untersuchung von biologischen Mechanismen auf genetischer, molekularer und zellulärer Ebene. Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* bietet dabei eine Vielzahl von effizienten genetischen Werkzeugen zur Erzeugung von Mutanten, wie z. B. mit chemischen Reagenzien wie EMS oder mittels P-Element Mutagenese (Grigliatti 1986; Kidwell 1986). Dabei wird eine Vielzahl an mutanten Stämmen generiert und auf einen bestimmten Phänotyp hin untersucht. Die Interpretation der Phänotypen stützt sich auf den Vergleich mit der wildtypischen Situation. Genaue Kenntnisse der zu untersuchenden Strukturen im Wildtyp sind deswegen Voraussetzung zur Identifizierung und Charakterisierung von Genfunktionen, die an der Entstehung dieser Strukturen beteiligt sind. Die Analyse von Determinierungs- und Differenzierungsprozessen einzelner Zelltypen ist enorm vereinfacht worden durch eine Vielzahl von zellspezifischen Markern (Doe 1992; Urbach und Technau 2003, sowie diese Arbeit), die die Untersuchung von einzelnen Zellen in wildtypischen und mutanten Hintergründen ermöglichen.

In diesem Teil der Arbeit haben wir uns der Frage gewidmet, welche genetischen Prozesse an der Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen beteiligt sind. Die detaillierte Analyse der Herkunft und der Identität der zwölf Gliazellen in der Peripherie ermöglichte es uns, fast alle PGs einzeln anzusprechen und ihre Wanderung im Verlauf der Embryonalentwicklung zu verfolgen (siehe vorheriges Kapitel und von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung). Die genauen Kenntnisse der wildtypischen Situation, zusammen mit den analysierten molekularen Markern, schufen eine gute Basis für eine Mutantanalyse. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Christian Klämbt (Universität Münster) wurde eine EMS-Mutagenese durchgeführt. Mutationen auf dem ersten und dritten Chromosom werden in Münster untersucht, während wir an Mutationen auf dem zweiten Chromosom arbeiten. Das Mutagenese-Experiment für das zweite Chromosom wurde von Diana Cleppien, Thomas Löffler und Olaf Vef geplant

und durchgeführt. Der Ansatz ist 2006 unter dem Titel „A new strategy for efficient in vivo screening of mutagenized *Drosophila* embryos“ in der Zeitschrift „Development Genes and Evolution“ veröffentlicht worden (Vef *et al.*, 2006). Eine erste phänotypische Charakterisierung der Mutanten wurde von Diana Cleppien vorgenommen. An der Kartierung der Mutanten waren Olaf Vef, Christian von Hilchen, Barbara Groh-Reichert, Dagmar Volland und Korinna Kochinke beteiligt.

3.2.1 Mutagenese

Mit dem Ziel, die genetischen Mechanismen der Entstehung und des Wanderungsverhaltens von peripheren Gliazellen (PGs) zu untersuchen, wurde in unserem Labor eine klassische Mutagenese durchgeführt. Als Mutagen wurde Ethylmethylsulfonat (EMS) verwendet, das vorwiegend Punktmutationen induziert. Aufgrund des invarianten Expressionsmusters in peripheren Gliazellen wurde die Gal4-Linie Mz97 als Ausgangsstamm der Mutagenese verwendet und mit einem kernständigen UAS-GFP rekombiniert. Diese Fliegen wurden mit EMS mutagenisiert und auf homozygot letale Mutationen selektiert (beschrieben in Material und Methoden). Auf diese Weise entstanden 2400 letale Stämme, die über Balancer Chromosomen gehalten werden. Die weitere Untersuchung der homozygot letalen Mutationen erfolgte über die Auswertung des Mz97-nGFP Musters in lebenden Embryonen des Stadiums 16. In Abb. 22 ist eine Auswahl an beobachteten mutanten Phänotypen im GFP-Muster zu sehen. Unter den 2400 letalen Stämmen waren Mutanten mit generellen Entwicklungsdefekten (Abb. 22 C), Fehlentwicklungen im Keimstreifrückzug (Abb. 22 B), Anomalien in den Önozyten und Fehlpositionierungen des Dotters (Abb. 22 D und E). 150 der 2400 mutanten Stämme zeigten Defekte in der Entwicklung des Nervensystems (Abb. 22 G und F), wovon 40 EMS Stämme einen Phänotyp in der Entwicklung, Positionierung und Anzahl der GFP positiven Peripheren Gliazellen aufwiesen. Diese Mutanten wurden in verschiedenen Phänotypenklassen unterteilt, die ich im Folgenden anhand von Beispielen bespreche. Eine Charakterisierung aller Mutanten mit einem Defekt im Muster der Gliazellen in der Peripherie erfolgte mithilfe von Antikörperfärbungen gegen Repo und gegen Fas2.

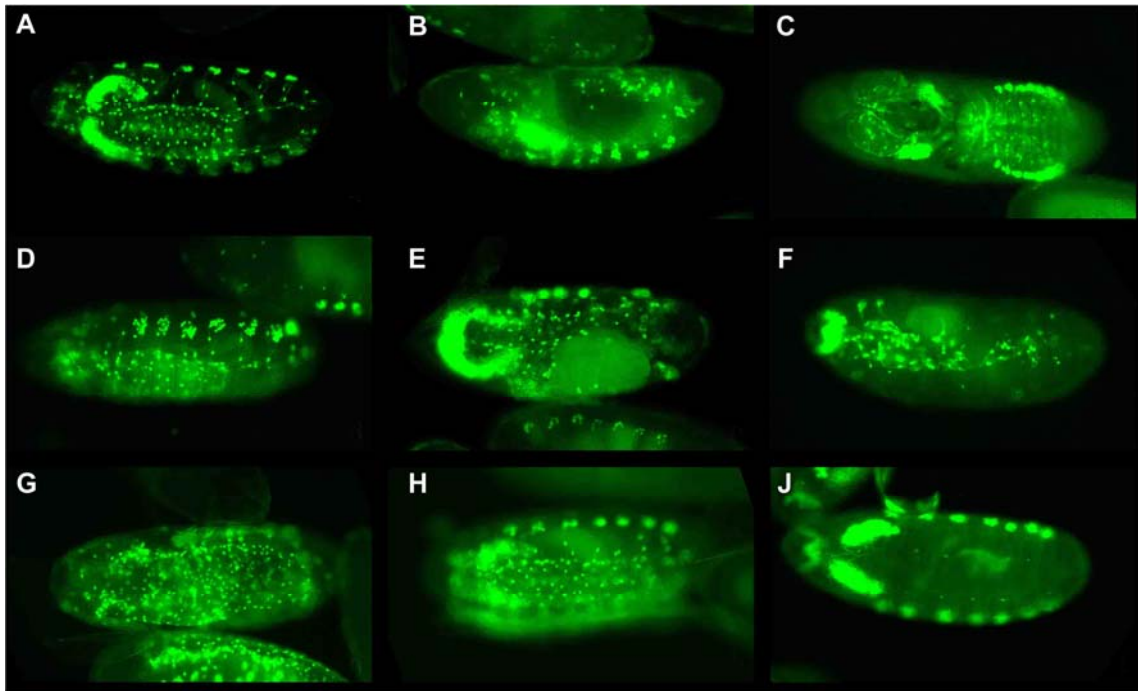


Abbildung 22: Verschiedene Phänotypen der EMS Mutanten im GFP-Muster

Embryonen, Stadium 16, anterior ist links. Die Phänotypen der homozygot letalen EMS-Mutanten werden über ihre GFP Expression analysiert. GFP wird in den Speicheldrüsen, den Önozyten und in einer Auswahl von Gliazellen im ZNS und PNS exprimiert. (A) wildtypischer Ausgangsstamm der EMS Mutagenese Mz97, nGFP; (B) Mutante mit Fehlentwicklung im Keimstreifrückzug; (C) generelle Entwicklungsdefekte; (D) Anomalien in den Önozyten; (E) Fehlpositionierung des Dotters; (F) starker neurogener Defekt; (G-J) Phänotypen in der Entwicklung (G), Positionierung (H) und Anzahl (J) der GFP positiven peripheren Gliazellen. (Mit freundlicher Genehmigung von Diana Cleppien)

3.2.2 Identität und Muster der peripheren Gliazellen

Sieben der zwölf Repo positiven PGs werden im ZNS geboren und beginnen ihre Migration entlang der peripheren Nerven nach dorsal im embryonalen Stadium 13. Fünf der PGs stammen von SOPs ab und werden in der Peripherie geboren. Nicht alle dieser PGs wandern, wie z. B. die ePG11. Andere, wie die ePG10, migrieren ventral in Richtung ZNS. Die GFP Expression der mutagenisierten Gal4-Linie Mz97 ermöglicht die Identifizierung von einzelnen PGs. Aufgrund der maternalen Komponente von Gal80 wird GFP in homozygoten Embryonen nicht in sechs PGs, sondern, wie im heterozygoten Zustand, in vier PGs exprimiert. Die GFP positiven Zellen sind die distalste der drei Exitglia (ePG3; Abb. 23; gebogener, unausgefüllter Pfeil), die am SN positionierte ePG4 (Abb. 23; unausgefüllte Pfeilspitze), die mit dem ISN assoziierten ePG7 (Abb. 23; gebogener ausgefüllter Pfeil) und die aus der Peripherie kommende ePG10 (Abb. 23; ausgefüllte Pfeilspitze). Im Wildtyp liegen alle vier Zellen am Ende

der Embryonalentwicklung in stereotypischen Positionen und sind damit voneinander zu unterscheiden. In den folgenden Abbildungen werden immer die hier eingeführten Symbole für die einzelnen GFP positiven Zellen verwendet.

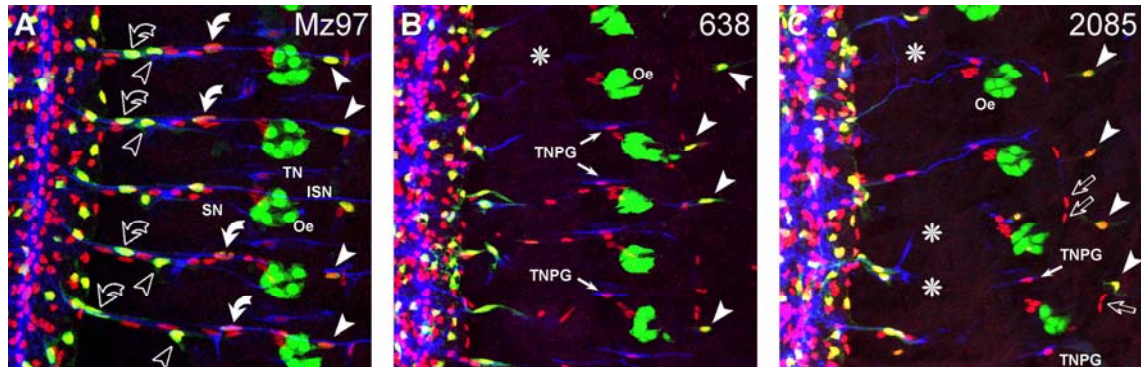


Abbildung 23: EMS-Mutanten mit Differenzierungsdefekten

Filetpräparation von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben, Mittellinie ist links. Antikörperfärbung mit α -Repo und α -Fas2, endogenes GFP markiert eine Subpopulation von Gliazellen: ePG3 (gebogener, unausgefüllter Pfeil), ePG4 (unausgefüllter Pfeilkopf), ePG7 (weißer, gebogener Pfeil), ePG10 (weißer Pfeilkopf). (A) Wildtyp Referenz Mz97, nGFP, (B) EMS Mutante 638, (C) EMS Mutante 2085; kleine weiße unausgefüllte Pfeile deuten auf die ePG11, die in einigen Hemisegmenten verdoppelt ist. Beide Mutanten zeigen schwere Defekte in den axonalen Trakten (rundes Sternchen) und im Muster der PGs. Die ePG12 (spitzer Stern) ist in beiden wildtypisch positioniert. TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; Oe: Önozyten.

3.2.3 Mutanten mit Defekten im peripheren Gliamuster

Die EMS Mutanten mit Defekten im Muster der PGs spiegeln unterschiedliche Aspekte der glialen Entwicklung wider. Einige der Stämme zeigen starke Defekte in der generellen Differenzierung der Neurone und Gliazellen im ZNS und PNS, wie z. B. EMS 638 und EMS 2085 (Abb. 23 B und C). Bei beiden Stämmen liegen in der Peripherie zu wenige Gliazellen. Zwischen eine und fünf PGs wandern in die Peripherie, wobei in den meisten Hemisegmenten zwei bis drei PGs zu finden sind. Oft bleiben diese im Exitbereich hängen, sodass die gesamten peripheren Nerven „nackt“ sind (Abb. 23 B und C; rundes Sternchen). Die von SOPs abstammenden Gliazellen ePG10 und ePG11 sind ebenfalls nicht in der Lage zu ihrer korrekten Position zu wandern: ePG10 (Abb. 23 B und C; ausgefüllter Pfeilkopf) liegt in den meisten Hemisegmenten distaler als die ePG11 (Abb. 23 C; unausgefüllter Pfeil). Die ePG12 ist dagegen in 95% der analysierten Hemisegmente an ihrer wildtypischen Position (Abb. 23 B und C; kleiner, weißer Pfeil). Die peripheren axonalen Trakte sind sehr dünn, und z. T. nicht Fas2 positiv. Auch im ZNS sind schwere Defekte zu sehen. Die Gliazellen

sind chaotisch positioniert und die axonalen Strukturen sind zusammen gebrochen. Beide EMS-Stämme zeigen sehr starke Phänotypen, bei denen eher die generelle neurale Entwicklung betroffen ist, als gliaspezifische Prozesse, wie Migration oder Differenzierung.

Mutanten mit gliaspezifischen Phänotypen wurden im Hinblick auf Anzahl, Wanderungsverhalten und Position der PGs untersucht. Dabei ermöglichten uns genaue Kenntnisse über Identität, Herkunft und Position der PGs, die EMS Mutanten auf Einzelzellebene zu analysieren. Die spezifischen Phänotypen beinhalten Abweichungen in der Anzahl der PGs (meist Reduktionen), in Clustern der PGs oder deren Zellkerne und in Positionsdefekte. Die meisten Phänotypen zeigen mehr als einen Defekt und sind darum in mehrere Klassen einzuteilen.

3.2.3.1 EMS Mutanten mit weniger peripheren Gliazellen

Eine Gruppe umfasst Mutanten, bei denen die Anzahl der Gliazellen in der Peripherie reduziert ist (EMS 101, 308, 360, 512, 644, 2108; Abb. 15). Im Stamm EMS 101 befinden sich durchschnittlich vier PGs zwischen der Defaszikulationszone von ISN und SN und dem lateralen Chordotonalorgan, verglichen mit sechs Zellen im Wildtyp (Abb. 24 B). Die GFP-Expression deutet darauf hin, dass eine vom NB1-3 und eine vom NB2-5 generierte PG am ISN fehlen. In manchen Hemisegmenten clustern die nicht auswandernden Zellen im Exitbereich, in anderen fehlen sie einfach. Im Gegensatz dazu ist die ePG11 oft vielfach vorhanden (Abb. 24 B; kleiner, unausgefüllter Pfeil). EMS 308 zeigt zwischen drei und sechs PGs in der Peripherie, von denen die meisten nicht viel weiter wandern als bis über die Defaszikulationszone. Das resultiert in „nackten“ Stellen entlang des ISNs (Abb. 24 C; rundes Sternchen). Die fehlenden PGs verharren nicht im Exit, da sich in diesem Bereich die wildtypische Anzahl an Zellen befindet. Zusätzlich dazu entwickelt diese Mutante einen Migrationsdefekt: die ePG10 wandert nicht proximal an der ePG11 vorbei, sondern bleibt distal der ePG11 liegen (Abb. 24 C; weißer Pfeilkopf). In EMS 360 liegen zu wenige PGs in der Peripherie. Die PGs zeigen außerdem Defekte in der Wanderung entlang des ISN. Auch in Hemisegmenten, in denen die Anzahl der Zellen wildtypisch ist, bleiben die PGs in lockeren Clustern zwischen ZNS und Defaszikulationszone hängen. Die aus der Peripherie zum ZNS wandernden Zellen scheinen keinen Defekt zu haben. Die ePG10 wandert, wie im Wildtyp, an der ePG11 (Abb. 24 D; kleiner, unausgefüllter Pfeil) vorbei, wobei sie manchmal weit in das Önozytencluster migriert

(Abb. 24 D; weißer Pfeilkopf). Den mutanten Embryonen von EMS 644 fehlt spezifisch die distalste PG am ISN, die ePG9. Die vier GFP positiven Zellen erscheinen generell wildtypisch in 95% der Hemisegmente. Eine weitere GFP negative, proximale Zelle am ISN fehlt in den Mutanten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die ePG5, da die beiden PGs vom NB2-5 vorhanden zu sein scheinen (Abb. 24 E; kleine, weiße Pfeile). Auch in Stamm 2108 fehlt eine spezifische Zelle, die ePG12. Anhand der Fas2-Färbung kann man die Position erkennen, an der die ePG12 normalerweise liegen würde, aber in keinem Hemisegment ist der Repo positive Zellkern zu sehen (Abb. 24 F; rundes Sternchen). Zudem fehlen in dieser EMS-Linie noch weitere PGs, von denen die Identität nicht genau bestimmt werden konnte.

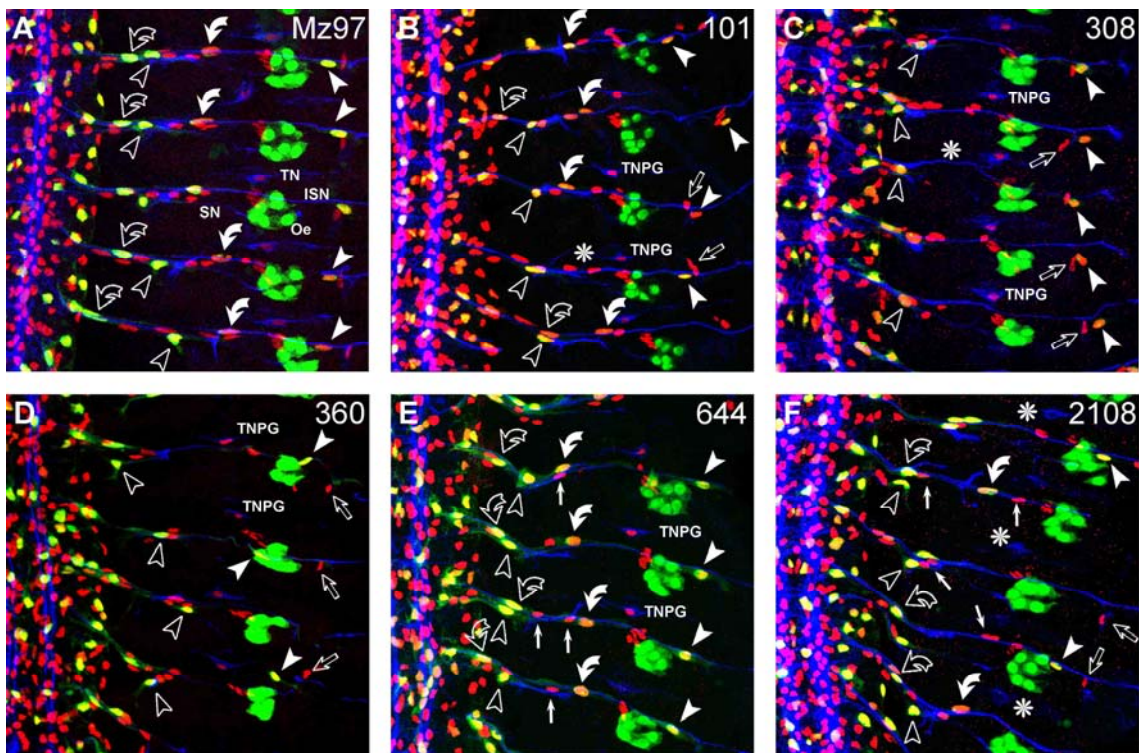


Abbildung 24: EMS-Mutanten mit weniger Gliazellen in der Peripherie

Filetpräparation von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben, Mittellinie ist links. Antikörperfärbung mit α -Repo und α -Fas2, endogenes GFP markiert eine Subpopulation von Gliazellen: ePG3 (gebogener, unausgefüllter Pfeil), ePG4 (unausgefüllter Pfeilkopf), ePG7 (weißer, gebogener Pfeil), ePG10 (weißer Pfeilkopf), ePG6 und 8 (kleine, weiße Pfeile); ePG12 (spitzer Stern); ePG11 (kleine, unausgefüllte Pfeile); Das runde Sternchen markieren phänotypische Besonderheiten. (A) Wildtyp Referenz Mz97, nGFP, (B-F) EMS Mutanten mit einer Reduktion in der Anzahl der PGs. (B und C) EMS 101 und 308; das runde Sternchen markieren die Reduktion der PGs entlang des ISN. (F) In EMS 2108 fehlt die ePG12 (rundes Sternchen). TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; Oe: Önozyten.

Mutanten mit Defekten in der Anzahl der peripheren Gliazellen zeigen meist eine Reduktion der Zellen in der Peripherie. Es gibt allerdings EMS-Linien, bei denen zu viele Gliazellen entlang der peripheren Trakte liegen.

3.2.3.2 EMS Mutante mit mehr peripheren Gliazellen

Die EMS-Linie 260 zeigt starke Defekte im ZNS (Abb. 25 B). Die Mittellinie ist zusammen gebrochen und die longitudinalen Trakte fusionieren. Das Bauchmark erscheint insgesamt viel schmaler. In der Peripherie liegen bis zu 15 Gliazellen, die über die ganze Länge der peripheren Nerven wandern (Abb. 25 B; gestrichelte Umrandung). Die Identität der meisten Zellen kann nicht erkannt werden. Die ePG10 (Abb. 25 B; ausgefüllter Pfeilkopf), ePG11 und ePG12 (Abb. 25 B; spitzer Stern) sind immer Repo positiv und liegen mehr oder weniger wildtypisch. Der Defekt scheint also auf die Gliazellen beschränkt zu sein, die in dorsaler Richtung auswandern.

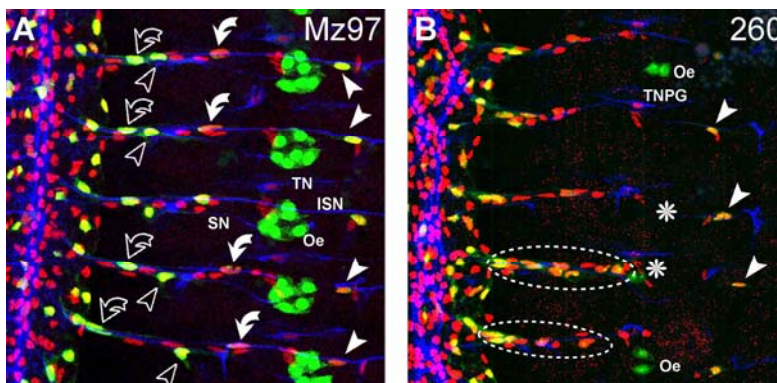


Abbildung 25: EMS-Mutante mit mehr Gliazellen in der Peripherie

Filetpräparation von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben, Mittellinie ist links. Antikörperfärbung mit α -Repo und α -Fas2, endogenes GFP markiert eine Subpopulation von Gliazellen: ePG3 (gebogener, unausgefüllter Pfeil), ePG4 (unausgefüllter Pfeilkopf), ePG7 (weißer, gebogener Pfeil), ePG10 (weißer Pfeilkopf), ePG12 (spitzer Stern). (A) Wildtyp Referenz Mz97, nGFP, (B) EMS Mutante 260; Anzahl der PGs ist in der Peripherie erhöht, in einigen Hemisegmenten auf bis zu 15 Zellen (gestrichelte Umrandungen); Önozyten sind stark reduziert oder nicht GFP positiv (rundes Sternchen). TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; Oe: Önozyten.

3.2.3.3 EMS Mutanten mit Migrationsdefekten

Eine weitere Phänotypenklasse umfasst Mutanten, die Defekte in der Migration der PGs aufweisen (Abb. 26). In den Mutanten von EMS-Stamm 658 wandern die PGs aus dem ZNS nicht weit genug in die Peripherie. Es liegen deutlich weniger Zellen in der Peripherie, was daran liegt, dass die PGs in der Transitionszone von ZNS und PNS hängen bleiben (Abb. 26 C; rundes Sternchen). Eine, selten zwei PGs liegen weiter distal am Ligamentzellcluster (Abb. 26 C; kleine weiße Pfeile). In fast jedem Hemisegment exprimieren nur zwei der aus dem ZNS auswandernden PGs GFP (Abb. 26 C; unausgefüllte Pfeilspitze und weißer, gebogener Pfeil). Die reduzierte Markerexpression zusammen mit der defekten Positionierung der PGs machen es schwer, die Identität einzelner Zellen zu bestimmen. Die ePG10 zeigt ebenfalls einen Migrationsdefekt (Abb. 26 C; ausgefüllte Pfeilspitze). Sie bleibt hinter der ePG11 zurück und wandert nicht auf das ZNS zu. Dies ist auch der Fall bei homozygoten Embryonen des Stammes 670 (Abb. 26 D): hier zieht die ePG10 nicht an der ePG11 vorbei, sondern bleibt dorsaler davon liegen (Abb. 26 D; weißer Pfeilkopf). Interessanterweise ist die Position aller in die Peripherie auswandernden peripheren Gliazellen wildtypisch. Diese Mutation betrifft also ganz spezifisch die Wanderung der ePG10. In Mutanten des EMS-Stammes 1878 wandern die PGs zu weit. Mindestens eine, gelegentlich zwei, der aus dem ZNS abstammenden distalen PGs (Abb. 26 E; ePG9 und/oder ePG8), wandern an den Önozyten vorbei in die Peripherie (Abb. 26 E; unausgefüllter Pfeil). Die GFP positive ePG7 migriert in 50% der Hemisegmente (n=25) ebenfalls weiter lateral und liegt schon im Ligamentzellcluster (Abb. 26 E; gebogener ausgefüllter Pfeil). Dagegen liegt die ePG10 in 50% der Hemisegmente auf gleicher Höhe mit der ePG11 oder verbleibt dorsaler davon (Abb. 26 E; ausgefüllte Pfeilspitze).

Zusammengefasst kann man sagen, dass es Mutanten gibt, bei denen die Migration aller Gliazellen defekt ist und andere, bei denen spezielle Zellen nicht wandern. Die Migrationsrichtung (ventral oder dorsal) spielt dabei keine Rolle. In den meisten Fällen wandern die Gliazellen nicht weit genug. Nur im EMS-Stamm 1878 wandern sie über ihr normales Ziel hinaus.

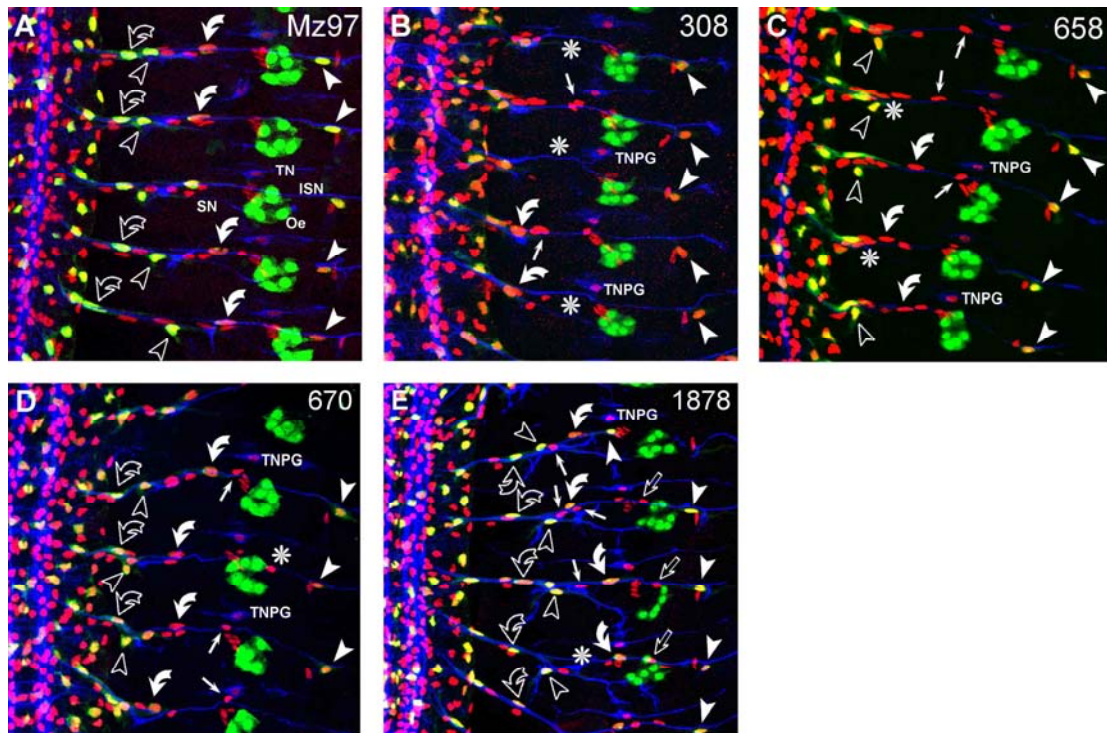


Abbildung 26: EMS-Mutanten mit Migrationsdefekten

Filetpräparation von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben, Mittellinie ist links. Antikörperfärbung mit α -Repo und α -Fas2, endogenes GFP markiert eine Subpopulation von Gliazellen: ePG3 (gebogener, unausgefüllter Pfeil), ePG4 (unausgefüllter Pfeilkopf), ePG7 (weißer, gebogener Pfeil), ePG10 (weißer Pfeilkopf), ePG6 und 8 (kleine weiße Pfeile); ePG12 (spitzer Stern); distalste PG aus dem ZNS, evtl. ePG9 (kleine weiße unausgefüllte Pfeile); Das runde Sternchen markieren phänotypische Besonderheiten. (A) Wildtyp Referenz Mz97, nGFP, (B-E) EMS Mutanten mit Migrationsdefekten. (B) EMS 308; Rundes Sternchen markieren „nackte“ Bereiche auf dem ISN. (C) EMS 658; Rundes Sternchen markieren lockere Clusterbildung an der Defaszikulationszone. (D) EMS 670; Rundes Sternchen markiert eine sehr weit distal gewanderte PG. (E) EMS 1878; hier wandern die PGs zu weit in die Peripherie; Rundes Sternchen markiert „nackten“ Bereiche auf dem ISN. TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; Oe: Önozyten.

3.2.3.4 EMS Mutanten mit Clusterphänotypen

Die letzte, sehr auffällige Phänotypenklasse besteht aus vier EMS-Linien, deren PGs in engen Clustern zusammen liegen (Abb. 27). Die Gliazellen wandern in die Peripherie und bilden dichte Ansammlungen von Zellen (Abb. 27; rundes Sternchen). Die Wanderung findet dann, wenn überhaupt, nur im Verband der PGs statt. Die Ausprägung der Defekte ist unterschiedlich stark zwischen den EMS-Stämmen. EMS 169 zeigte den stärksten Defekt, während EMS 223 eher lockere Cluster ausbildet. Die EMS-Mutanten 169, 223, 495 und 1541 werden von Christian von Hilchen bearbeitet. Deswegen werde ich hier nicht weiter auf diese Phänotypenklasse eingehen.

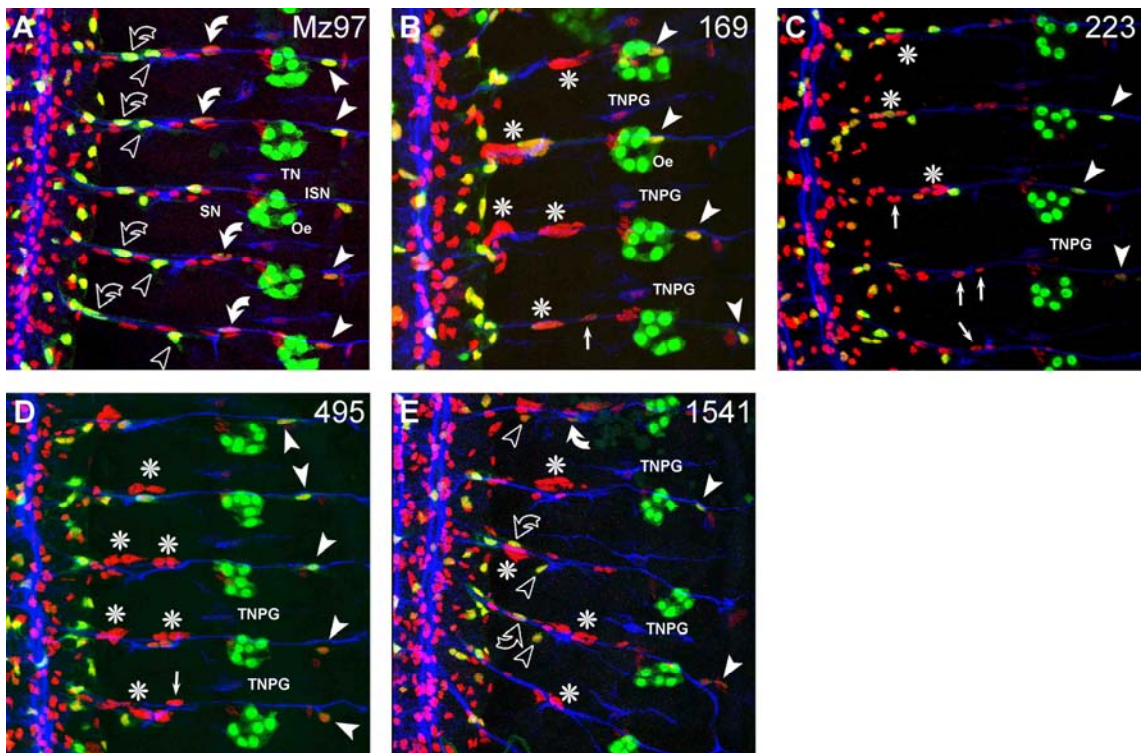


Abbildung 27: Die peripheren Gliazellen bilden dichte Cluster in der Peripherie

Filetpräparation von Stadium 16 Embryonen, anterior ist oben, Mittellinie ist links. Antikörperfärbung mit α -Repo und α -Fas2, endogenes GFP markiert eine Subpopulation von Gliazellen: ePG3 (gebogener, unausgefüllter Pfeil), ePG4 (unausgefüllter Pfeilkopf), ePG7 (weißer, gebogener Pfeil), ePG10 (weißer Pfeilkopf), ePG6 und 8 (kleine weiße Pfeile); ePG12 (spitzer Stern); Die runden Sternchen markieren phänotypische Besonderheiten, hier die Cluster der PGs. (A) Wildtyp Referenz Mz97, nGFP, (B-E) EMS Mutanten, bei denen die PGs dichtere (B; EMS 169) oder lockerere (C; EMS 223) Cluster ausbilden. TN: Transversalnerv; SN: Segmentalnerv; ISN: Intersegmentalnerv; Oe: Önozyten.

3.2.4 Kartierung der Mutationen über Komplementationsanalysen

Die Voraussetzung zur Charakterisierung von Genfunktionen mittels Mutantanalyse ist die Identifizierung der mutierten Genloci. Deswegen war, neben der Beschreibung der mutanten Phänotypen, die Kartierung der Mutation wichtig. In meiner Doktorarbeit habe ich die folgenden EMS-Mutanten kartiert: EMS 75, 101, 260, 356, 360, 445, 874, 885, 925, 981, 1135, 1230 und 1770. Die anderen hier aufgeführten EMS-Linien wurden hauptsächlich von Olaf Vef kartiert, mit Unterstützung von Dagmar Volland und Barbara Groh-Reichert. Christian von Hilchen arbeitet an der Kartierung von EMS 169, 223, 495 und 1541. Die EMS-Mutanten werden über Komplementationsanalyse kartiert, d.h. die EMS Linien wurden mit Stämmen verkreuzt, die defizient für eine kartierte Stelle auf dem zweiten Chromosom sind. Diese so genannten Defizienzen sind, genau wie die EMS-Linien, homozygot letal und tragen dominante, adulte, sichtbare Marker (hier CyO) auf dem Balancerchromosom. Die F1-Generation der Kreuzung

wurde auf die Anwesenheit dieser Marker überprüft. Liegen Defizienz und EMS-Mutation an unterschiedlichen Stellen auf dem zweiten Chromosom, komplementieren sich beide Mutationsereignisse, und man bekommt nicht-balancierte Fliegen in der F1-Generation. Bei Nicht-Komplementation liegen Defizienz und Mutation im gleichen Locus, sodass sich die Informationen der homologen Chromosomen nicht vervollständigen können, und diese Tiere sterben. Alle Nachkommen dieser Kreuzung sind balanciert und tragen die sichtbaren Marker.

Das Bloomington Stockcenter bietet ein großes „Defizienzen-Kit“ an, das aus über 100 Stämmen besteht und das gesamte zweite Chromosom abdeckt. 34 EMS-Linien wurden mit den 110 defizienten Stämmen verkreuzt. Die Ergebnisse der Komplementationstests sind in den Abbildungen 28 und 29 zusammengefasst. Drei EMS-Linien zeigten Komplementation mit allen defizienten Stämmen (EMS 132, 874 und 670). Für einige Bereiche des zweiten Chromosoms gibt es keine Defizienzen, da diese aus unterschiedlichen Gründen nicht balanciert werden können. Hierbei handelt es sich vor allem um Abschnitte in der Nähe des Zentromers. Die EMS-Linien 132, 874 und 670 tragen eventuell Mutationen in solchen Loci, die wir über Komplementationsanalyse nicht kartieren konnten.

Es stellte sich heraus, dass die meisten EMS-Stämme mehrere Letalmutationen auf dem zweiten Chromosom tragen. Bis zu neun letale Mutationen wurden in einem Stamm gefunden (EMS 474), wobei der Durchschnitt bei 2,7 Mutationsereignissen liegt. Bei mehreren letalen Mutationsereignissen stellte sich uns die Frage, welche Mutation für die Ausbildung des glialen Phänotypes verantwortlich ist, oder ob der Defekt durch die Kombination verschiedener Mutationen hervorgerufen wird. Um das zu überprüfen, haben wir Eiablagen der Komplementations-Kreuzungen genommen und Antikörperfärbung gegen Repo und Fas2 gemacht. Die Phänotypen der Embryonen mit einem defizienten Chromosom über einem EMS Chromosom wurden mit denen des homozygoten EMS-Stammes verglichen. Die Defizienzen, die in den Abbildungen 28 und 29 mit Magenta markiert sind, zeigten, verkreuzt mit den entsprechenden EMS-Mutanten, im hemizygoten Zustand den glialen Phänotyp des jeweiligen homozygoten EMS-Stammes. Für insgesamt 17 EMS-Linien konnte die Region, in der die für den glialen Phänotyp verantwortliche Mutation liegt, identifiziert werden. Für diese Stämme wurden weitere Komplementationstests durchgeführt mit Defizienzen, die die große Region in kleinere Stücke unterteilen (zusammengefasst in Tab. 12).

3.2.4.1 Kartierung von identifizierten Bereichen

Für 13 der 34 EMS Mutanten konnte der Bereich, in dem die den Phänotyp verursachende Mutation liegt, identifizieren und weiter kartieren werden.

Die EMS-Linien 308 (Abb. 24 C und 26 B), 512 und 644 (Abb. 24 E) sind allelisch und zeigen Nicht-Komplementation mit der kleinen Defizienz BL68, in der wenige Gene liegen. Es ist bis jetzt allerdings nicht klar, welches der Gene den glialen Phänotyp verursacht.

Auch die EMS-Linien 360 (Abb. 24 D) und 925 sind allelisch und zeigen sehr ähnliche Phänotypen. Bei beiden Stämmen ist die Anzahl der PGs reduziert und die Gliazellen wandern nicht weit genug in die Peripherie. Die Mutation liegt im Bereich 48E1-48E10 auf dem zweiten Chromosom, der 25 Gene umfasst. Über Komplementationanalyse konnte die Region nicht weiter eingegrenzt werden, da es keine weiteren letalen Stämme für diesen Bereich gibt. Alle 25 Gene hatten keine beschriebene Funktion im Nervensystem oder waren unbekannt. Da es wahrscheinlich ist, dass eine Mutation, die den Phänotyp im Nervensystem hervorruft, in einem Gen liegt, das im Nervensystem exprimiert wird, habe ich die Expressionsmuster dieser Gene untersucht. Die Analyse der Expression erfolgt via *In Situ* Hybridisierung mit mRNA Sonden. Von allen 25 Genen zeigte nur CG8407 eine Expression im Nervensystem. Über Single-Embryo-PCR habe ich CG8407 aus homozygot mutanten Embryonen von EMS 360 und 925 amplifiziert und die Sequenz mit der von Embryonen des Ausgangsstammes Mz97 verglichen. Leider konnte ich keinen Unterschied zwischen den Sequenzen feststellen. Zusätzlich dazu wurde eine spezifische mRNA-Sonde gegen CG8407 generiert und in den homozygot mutanten Embryonen beider EMS-Linien getestet. Die Expression von CG8407 ist wildtypisch in den EMS-Linien 360 und 925 und kann daher auch nicht den mutanten Phänotyp hervorrufen.

Über Kartierung mit kleineren Defizienzen konnten wir die mutierten Regionen für die EMS-Linien 101, 223, 260, 356, 445, 495, 658 und 1541 weiter eingrenzen. Für drei EMS-Mutanten konnte Olaf Vef für die den Phänotyp verursachende Mutation ein Genlocus identifizieren: EMS 985 ist ein *numb*-Allel und wird von Benjamin Altenhein weiter bearbeitet (Edenfeld *et al.*, 2006). EMS 169 ist ein *scar*-Allel und wird von Christian von Hilchen untersucht. Die dritte EMS Mutante mit identifiziertem Genlocus ist EMS 667, bei der wahrscheinlich das Gen CG8841 mutiert ist. Der Stand der momentanen Kartierungsergebnisse ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

EMS-Stamm	Große Defizienz	Kleine Defizienz	mutierte Gene	Phänotyp
169	Df 4961 060F01;060F05		<i>scar</i>	Cluster
985	Df 2892 029C01-02;030C08-09		<i>numb</i>	Migration
97	Df 2892 029C01-02;030C08-09			
667	Df 4960/Df 5879 048E12-F01;049A11-B06		CG8841	
308	Df 4966 045A06-07;045E02-03	Df 68 045C8;045D08	<i>pkN</i>	Kein Phänotyp
			<i>wunen</i>	
512	Df 4966 045A06-07;045E02-03	Df 68 045C8;045D08	<i>pkN</i>	Kein Phänotyp
			<i>wunen</i>	
644	Df 4966 045A06-07;045E02-03	Df 68 045C8;045D08		
360*	Df 7146 048E01-02; 048E02-10	25 Kandidatengene		
925*	Df 7146 048E01-02; 048E02-10			
1541	Df 1888 042B03-05;043E15-18	Df 3920 042E01-04;043C03	042E01-04 bis 043C07 9 Kandidatengene	
223	Df 1888/Df 1007 042B03-05;043E15-18	Df 4313 042C02-07 043D01-07 Df 6143 042A01;043C07		
101*	Df 3518 051D03-08;052F05-09	Df 6764 051D03-E04;052A06-10	051E11-F01 bis 052A06-10 17 Kandidatengene	
445*	Df 3518 051D03-08;052F05-09	Df 2468 051E03;052C09-D01 Df 6763 051E11-F01;051F01-052A14		
658	Df 3518 051D03-08;052F05-09	Df 1896 051A02;051B06 Df 5422 051A05;051C	051B01 bis 051C3-7	
260*	Def 420 036C02-04; 037B09-C01, 036F + ?	Df 6073 036C;036E Df 6105 036C04-D01; 037C02-05 Df 6087 036C;036E-F	036C04-D02 bis 036E mehr als 50 Kandidatengene	
356*	Df 442 049C01-04; 050C23-D02	Df 7873 050C05;050C09	17 Kandidatengene	
495	Df 6336 026D03-E01;026F04-07			

Tabelle 12: Kartierung der identifizierten mutierten Genloci bzw. chromosomalen Bereiche

* Kartierungen wurden von mir durchgeführt

Abbildung 28: Kartierung der EMS-Mutanten über Komplementationsanalyse mit Defizienzen des rechten Arms des zweiten Chromosoms

Schematische Darstellung des linken Arms des zweiten Chromosoms. Darunter sind die fehlenden Bereiche der einzelnen defizienten Stämme mit schwarzen Balken dargestellt. Die Resultate der Komplementationsanalysen sind in der Tabelle gezeigt. Die identifizierten chromosomalen Bereiche der EMS-Stämme, die eine letale Mutation tragen, sind mit Kästchen gekennzeichnet.

Abbildung 29: Kartierung der EMS-Mutanten über Komplementationsanalyse mit Defizienzen des linken Arms des zweiten Chromosoms

Schematische Darstellung des linken Arms des zweiten Chromosoms. Darunter sind die fehlenden Bereiche der einzelnen defizienten Stämme mit schwarzen Balken dargestellt. Die Resultate der Komplementationsanalysen sind in der Tabelle gezeigt. Die identifizierten chromosomalen Bereiche der EMS-Stämme, die eine letale Mutation tragen, sind mit Kästchen gekennzeichnet.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung, Spezifizierung und Migration von lateralen Gliazellen im Bauchmark von *Drosophila melanogaster* untersucht. Der erste Teil besteht aus der molekularen Charakterisierung der lateralen Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems am Ende der Embryogenese. Ziel war es, eine mögliche molekulare Klassifizierung der Gliazellen zu entwickeln und mit der bestehenden Klassifizierung unter morphologischen und positionellen Gesichtspunkten zu vergleichen. Um dies zu erreichen, habe ich die Expressionsmuster von 46 molekularen Markern in Gliazellen von Stadium 16 Embryonen analysiert. Diese Marker setzen sich aus Segmentierungsgenen, temporären Spezifizierungsgenen, Kolumnargenen, bekannten glialen Differenzierungsgenen und unbekanntem Faktoren zusammen. Die spezifischen Expressionsmuster ermöglichen es uns, Gruppen von Gliazellen und einzelne Gliazellen gezielt anzusprechen und anhand ihrer einzigartigen Kombination an exprimierten Markern zu identifizieren. Dies schafft auf der einen Seite eine gute Grundlage zur Untersuchung spezifischer Zellschicksale in mutanten Hintergründen, was hier am Beispiel einer *castor* Funktionsverlustmutante demonstriert wird. Auf der anderen Seite spielt jedes Markergen selbst möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung und Differenzierung von glialen Subtypen, ebenso wie im Aufbau und in der Aufrechterhaltung von subtyp-spezifischen Funktionen. Dil Markierungen und Stammbaumanalysen in spezifischen Enhancer Trap Linien ermöglichten die genaue Identifizierung der klonalen Herkunft der Gliazellen im ZNS und PNS. Die Analyse der molekularen Klassifizierung und der klonalen Herkunft schaffte außerdem die Grundlage für eine einheitliche Nomenklatur der Gliazellen des PNS und ZNS.

Der zweite Teil meiner Arbeit beschäftigt sich mit Mutanten aus einer EMS Mutagenese zur Identifizierung von Genen, die eine Rolle bei der Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen spielen. Die im ersten Teil geschaffenen Grundlagenkenntnisse über die Identität, Position und Herkunft der Gliazellen im Wildtyp ermöglichten eine detaillierte phänotypische Charakterisierung von 34 EMS Mutanten, die Defekte in der Entwicklung und Migration der peripheren Gliazellen zeigen. Parallel dazu wurden einige der Mutationen der EMS Linien über Komplementationsanalyse soweit wie möglich kartiert.

4.1 Gliale Determinierung und Differenzierung

Die Mechanismen, die zur glialen Determination und frühe Differenzierung führen, sind bei allen lateralen Gliazellen die gleichen: Der Transkriptionsfaktor Gcm ist der Schalter der Regulationskaskade, die neuronales gegen gliales Schicksal kontrolliert. Die Expression von *gcm* induziert dabei gliales Schicksal und wird von vorgelagerten Signalen (z. B. *prospero* und homöotische Gene (Freeman und Doe 2001)) aktiviert. *gcm* Expression beginnt in Stadium 10 und die mRNA kann bis Stadium 14/15 detektiert werden. Das Gen wird also nur in der frühen Phase der glialen Entwicklung exprimiert, und ist für die Determination der Gliazellen verantwortlich, nicht aber für die weitere Differenzierung. Zielgene von *gcm* sind *gcm2*, *reversed polarity (repo)*, *pointed (pnt)*, *tramtrack (ttk)* und *locomotion defects (loco)*. Alle Zielgene tragen GCM-Bindestellen in ihrer Promotorregion und können somit direkt von *gcm* reguliert werden. In der 5' Region von *repo* befinden sich z. B. 11 Gcm Bindestellen (Akiyama *et al.*, 1996). Repo kodiert für ein Homöodomänen-Protein, das in allen lateralen Gliazellen des Bauchmarks, in den Laminarglia, Medullarglia und in den Subretinalzellen des visuellen Systems im Gehirn exprimiert wird. Schwache Allele von *repo* bewirken eine Polaritäts-Umkehr in der physiologischen Antwort der Photorezeptorzellen auf Lichteinfall (Xiong *et al.*, 1994). Starke Allele verursachen Defekte in der Entwicklung der embryonalen Gliazellen und führen zu Letalität (Halter *et al.*, 1995; Xiong *et al.*, 1994). Aufgrund multipler funktioneller Domänen ist es wahrscheinlich, dass Repo durch unterschiedliche Mechanismen wirken kann, die vom zellulären Kontext abhängen. In verschiedenen Gliazellen agiert Repo alleine, in anderen kooperiert es z.B. mit Ttk und Pnt, um die Aktivität weiterer Zielgene zu regulieren (Yuasa *et al.*, 2003). Die Interaktion mit Pnt führt dabei zur Aktivierung von glialem Zellschicksal, während Repo im Zusammenspiel mit Ttk die neuronale Entwicklung reprimiert. *pnt* kodiert für zwei Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie (P1 und P2) und wird im ZNS ausschließlich in Gliazellen exprimiert. Es ist in die Differenzierung von Gliazellen mesektodermalen und neuroektodermalen Ursprungs involviert, wobei P2 ausschließlich eine Rolle in der funktionalen Determination der Mittellinienglia spielt. Funktionsverlust von *pnt* führt zu weniger Gliazellen und defekter axonaler Wegfindung, *pnt* Überexpression zu mehr Gliazellen im ZNS (Klaes *et al.*, 1994). Nach den Ergebnissen meiner Markeranalysen wird *pnt* im

Embryonalstadium 16 nicht mehr exprimiert. Auf der Suche nach Zielgenen von *pnt*, entdeckten Granderath *et al* das Gen *loco*, ein RGS („regulator of G-protein signaling“), das den G-Protein Signalweg, durch die Umwandlung der aktiven GTP-gebundenen Form in die inaktive GDP-gebundene Form, beendet (Granderath *et al.*, 1999). Es befinden sich sowohl GCM-, als auch ETS-Bindestellen in der Promotorregion von *loco*, so dass es durch *pnt* und/oder direkt durch *gcm* reguliert werden kann (Granderath *et al.*, 2000). *ttk* kodiert für zwei Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, die als transkriptionelle Repressoren wirken. Im ZNS wird nur das *ttk*69-Transkript exprimiert. Es wird in allen Gliazellen exprimiert und garantiert die korrekte gliale Differenzierung durch Repression des neuronalen Schicksals (Giesen *et al.*, 1997). Die für neurale Stammzellen spezifischen Gene *deadpan* und *asense* sind dabei die Zielgene der von Ttk69 bewirkten Reprimierung. Die Überexpression von *ttk* verhindert gliale Entwicklung, indem die S-Phase verhindert wird und die Expression von *cyclin E* reprimiert wird. Umgekehrt durchlaufen in *ttk*-Mutanten die Gliazellen zusätzliche Replikationsrunden. Ttk sichert also die gliale Identität durch Repression der Neuroblasten-spezifischen Gene und die Kontrolle über die Proliferation der Gliazellen (Badenhorst 2001).

Gcm und seine bekannten Zielgene werden entweder früh in Gliazellen exprimiert, wie *ttk* und *pnt*, oder bleiben in allen Gliazellen im gesamten Verlauf der Gliogenese angeschaltet, wie z. B. *repo* und *gliotactin*. Diese Faktoren können somit zwar an der Determination und Differenzierung der Gliazellen beteiligt sein, nicht aber an der Etablierung und Spezifizierung von glialen Subtypen. Die Identifizierung von weiteren Zielgenen von Gcm war das Ziel zweier Mikroarray-Experimente (Altenhein *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2003). Insgesamt konnten mehr als 60 Kandidatengene identifiziert werden, von denen fast alle entweder in Subsets von Gliazellen und/oder erst in späten Embryonalstadien exprimiert werden. Die von mir untersuchten molekularen Marker werden ebenfalls in einigen, aber nicht in allen Gliazellen und glialen Subtypen exprimiert. Sie sind damit Kandidaten für Faktoren, die in die Spezifizierung bestimmter Gliazellen involviert sind und bieten eine genetische Grundlage zur Klassifizierung der Gliazellen. Im Folgenden werde ich sowohl auf die molekulare Klassifizierung als auch auf die Subtyp-spezifische Funktion einzelner Faktoren in Gliazellen eingehen.

4.2 Die Gliazellen des ZNS

4.2.1 Die morphologische und positionelle Klassifizierung der lateralen ZNS-Glia kann durch die Analyse der molekularen Marker bestätigt und erweitert werden

Das primäre Ziel dieses Teils der Doktorarbeit war die Klassifizierung der Gliazellen nach molekularen Gesichtspunkten. Diese Klassifizierung sollte dann mit der bestehenden morphologischen und positionellen Klassifizierung verglichen werden. Bei Ito *et al* wurden die lateralen Gliazellen in die drei Kategorien Oberflächen-, Kortex- und Neuropil-assoziierte Gliazellen eingeteilt (Ito *et al.*, 1995). Die Kategorien der Oberflächen-assoziierten und Neuropil-assoziierten Glia wurden weiter in kleinere Subgruppen unterteilt, z. B. in „Subperineurial Glia“ (SPG) und „Channel Glia“ (CG) für die Kategorie der Oberflächen-assoziierten Gliazellen. Einige der von mir untersuchten Marker zeigen Expressionsmuster, die den glialen Kategorien oder Subgruppen entsprechen. Die beiden Marker *moody* und *syp-lacZ*, z. B. sind exklusiv in allen Oberflächen-assoziierten Gliazellen exprimiert. Auch die weitere Einteilung in SPGs und CGs spiegelt sich in der Expression der molekularen Marker wider: P101-lacZ wird in allen SPGs exprimiert, während *inv* ausschließlich in den beiden CGs angeschaltet ist. Die molekulare Klassifizierung stimmt also mit der morphologischen und positionellen Klassifizierung überein. Zusätzlich konnte aufgrund der Expression dieser SPG-spezifischen Marker eine Zelle, die vorher in die Kategorie der Kortex-assoziierten Gliazellen eingeteilt wurde, als SPG klassifiziert werden. Diese Zelle wurde in ML-SPG umbenannt, um sie in die bestehende Nomenklatur zu integrieren. Damit gibt es acht SPGs und zwei CGs in der Kategorie der Oberflächen-assoziierten Gliazellen. Ein anderes, auffälliges Merkmal dieser Kategorie ist, dass jede einzelne Zelle eine spezifische Kombination an molekularen Markern exprimiert und damit auch individuell identifiziert werden kann. Ein gutes Beispiel dafür ist die A-SPG. Diese Zelle wird im Abdomen vom NB1-1a generiert, der im Thorax einen rein neuronalen Klon produziert. Im Thorax ist trotzdem eine SPG an derselben Position zu finden, die vom NB2-2t abstammt. Wir konnten zeigen, dass es sich tatsächlich um die A-SPG handelt, da beide Zellen in den verschiedenen Tagmata die gleiche Kombination an molekularen Markern exprimieren. Daraus können wir schließen, dass die A-SPG, trotz

unterschiedlicher klonaler Herkunft, die gleiche Identität in Thorax und Abdomen besitzt. Die Abbildung 16 B im Ergebnissteil fasst die Charakteristika der Oberflächen-assoziierten Gliazellen zusammen: man kann sowohl die Kategorie, als auch die Einteilung in SPG und CG mit den molekularen Markern bestätigen. Jede Zelle dieser Kategorie zeigt eine individuelle Kombination an exprimierten Markern.

Die Expression der molekularen Marker spiegelt also nicht nur die Zugehörigkeit zu einer Kategorie oder Subgruppe wider, sondern auch den klonalen Ursprung der Gliazellen. SPG und CG werden von vier NBs generiert: NB1-1a, 2-2t, 5-6 und 7-4. Die SPGs entstehen vermutlich durch asymmetrische Teilung, bei denen eine Gliazelle und ein Neuron entstehen. Es wird angenommen, dass Notch eine wichtige Rolle in der Spezifizierung von SPGs spielt. Für den NB1-1a konnte gezeigt werden, dass Notch in der Signalkaskade oberhalb von *gcm* agiert und für die Spezifizierung der SPG essentiell ist (Udolph *et al.*, 2001). Der NB1-1a ist der einzige NB, der neben Neuronen ausschließlich SPGs generiert. Der gliale Anteil des NB1-1a Zellklons kann anhand der spezifischen Expression von *huckebein* (*hkb*) und *mirror-lacZ* (*mirr-lacZ*) identifiziert werden. Im NB1-1a wird *hkb* sowohl für die Entwicklung der Gliazellen als auch zur axonalen Wegfindung benötigt (Bossing *et al.*, 1996). De Iaco *et al* konnten zeigen, dass Gcm direkt mit Hkb kooperiert. Hier fungiert Hkb nicht als Transkriptionsfaktor, sondern reguliert durch Protein-Interaktion die Autoregulation von *gcm* (De Iaco *et al.*, 2006). Auch die Zellen vom NB5-6 kann man mit einem spezifischen Marker ansprechen. Alle drei SPG und die EG exprimieren *wg-lacZ*. Dieses Segmentpolaritätsgen wird in den NB der fünften Zellreihe exprimiert, von denen nur der NB5-6 Gliazellen generiert.

Die Subgruppe der LGs konnte anhand der Kombination der exprimierten molekularen Marker und der Position der Zellen weiter unterteilt werden. LGs sind definiert als die Zellen, die von LGB abstammen und sich im Laufe der Embryonalentwicklung entlang der longitudinalen Konnektive aufreihen. Die Anzahl der LGs war zunächst nicht klar, da die bestehende Literatur von sieben bis zehn Zellen spricht (Griffiths und Hidalgo 2004; Halter *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997). Um diese Diskrepanzen zu klären, haben wir Dil Markierungen in *repo-Gal4xUAS-nGFP* durchgeführt und konnten zeigen, dass der LGB neun Tochterzellen generiert. Eine der LGs, die LP-LG, liegt etwas lateraler als die anderen neun und scheint eher mit dem ISN assoziiert zu sein, als mit den longitudinalen Trakten. Die LP-LG exprimiert außerdem fast die gleichen Marker, wie die benachbarte M-ISNG. Man könnte die LP-LG daher durchaus

der Gruppe der NRG zuzuordnen. Wir haben allerdings davon Abstand genommen, um Konflikte mit der bestehenden Nomenklatur zu vermeiden. Trotz aller Gemeinsamkeiten haben die beiden Zellen einen anderen klonalen Ursprung: die LP-LG stammt von LGB ab, wohingegen die M-ISNG vom NB1-3 generiert wird. Keines der 46 Kandidatengene wird exklusiv in der Kategorie der Neuropil-assoziierten Gliazellen exprimiert. Allerdings konnte ich Marker identifizieren, die ausschließlich in NRG exprimiert werden, wie z.B. 250-lacZ. Auch die LGs zeigen spezifische Markerexpression von 239-lacZ. Die LGs konnten des Weiteren in drei Subgruppen unterteilt werden (Abb. 16), deren Zellen sich durch die Expression der gleichen molekularen Marker auszeichnen.

4.2.2 Subtyp-spezifische Funktionen von Kandidatengen

Die analysierten Marker setzen sich aus verschiedenen Genklassen zusammen (siehe Tab. 13). Die meisten Marker kodieren für Transkriptionsfaktoren, die bei der Spezifizierung von NBs eine Rolle spielen, z. B. *fushi tarazu* und *msh*. Andere Gene scheinen in zellspezifischen Funktionen, wie z. B. Signalkaskaden involviert zu sein, wiederum andere zeigen enzymatische Aktivität.

Das Gen *moody* wird in allen Oberflächen-assoziierten Gliazellen exprimiert. *moody* ist allerdings nicht nur ein exzellenter Marker, sondern spielt eine wichtige Rolle im Aufbau und in der Aufrechterhaltung einer Subtyp-spezifischen Funktion. Die Oberflächen-assoziierten Gliazellen bilden am Ende der Embryonalentwicklung eine dünne Zellschicht, die das gesamte Bauchmark umhüllt, die Blut-Hirn-Schranke. Diese Barriere wird durch so genannten „septate junctions“ abgedichtet und dient als Schutz gegen die hohe Kaliumkonzentration in der Hämolymphe (Carlson *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 1993). *Moody* ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) (Bainton *et al.*, 2005; Schwabe *et al.*, 2005), der zusammen mit drei weiteren Komponenten, den G-Protein-Untereinheiten $G_{\alpha i}$ und $G_{\alpha o}$, sowie dem G-Protein Signal-Regulator Loco (Granderath *et al.*, 1999), das kortikale Aktinzytoskelett reguliert. Dadurch werden die langen zellulären Fortsätze der SPGs stabilisiert und ermöglichen die Ausbildung enger Verbindungen, wie die „septate junctions“.

Das ausschließlich in LGs exprimierte Gen CG11910 hat ebenfalls eine annotierte Funktion als GRPC. Dies könnte auf eine Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion der LGs mit den Neuronen der axonalen Trakte hinweisen. Es konnten bereits mehrerer Faktoren

in Neuronen und Gliazellen identifiziert werden, die das Wachstum der Axone mit der Proliferation der LGs verbinden. Hierbei spielt das in den A-LGs und M-LGs exprimierte Protein Prospero eine wichtige Rolle, indem Pros das mitotische Potenzial des glialen Vorläufers erhält (Griffiths und Hidalgo 2004). Prospero reguliert die Zellproliferation durch *CycE* und stimmt die Anzahl der LGs mit den vorhandenen Axonen ab. Dabei aktiviert das von den Pionierneuronen produzierte Neuregulin Vein in den LGs mit der höchsten Prospero-Konzentration den MAPKinase Signaltransduktionsweg (Hidalgo *et al.*, 2001). Vein induziert so die Teilung der LGs, garantiert aber auch das Überleben der Zellen. Die Expression von *pros* in den LGs wird von vielen Faktoren reguliert, wie z.B. *lottchen (msh/drop)*, *dead ringer* und *fringe* (Buescher und Chia 1997; Shandala *et al.*, 2003; Thomas und van Meyel 2007). Vielleicht stellt CG11910 eine weitere Komponente dieser Signaltransduktion dar.

Mehrere der analysierten Marker gehören zur Proteinklasse der Enzyme, wie z. B. die beiden Metalloproteasen Nepilysin4 (Nep4) und Invadolysin (209-lacZ). Invadolysin ist für die Migration von Keimstreifzellen und in der Mitose von Bedeutung, wo es durch Spaltung von Laminin an der Auflösung der Kernmembran beteiligt ist (McHugh *et al.*, 2004). Eine Funktion im Nervensystem ist bis jetzt nicht bekannt. Die Funktion von Nep4 ist gänzlich unbekannt. In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass Metalloproteasen im ZNS in viele Prozesse involviert sind, wie z. B. beim Auswachsen der Neuriten, bei der Migration von Neuronen und der Myelinisierung von Axonen (Pizzi und Crowe 2007). Die Matrix-Metalloprotease MMP-12 wird in Oligodendrozyten exprimiert und spielt eine Rolle in der Reifung und der morphologischen Differenzierung dieser Zellen (Larsen *et al.*, 2006; Larsen und Yong 2004). Oligodendrozyten umhüllen die axonalen Projektionen im Gehirn, in dem sie lange zelluläre Fortsätze ausstrecken, die sich vielfach um die Axone wickeln und dabei eine dicke Myelinschicht bilden. In *Drosophila* werden die axonalen Trakte von longitudinalen Gliazellen umhüllt, die sich allerdings nur einmal um die Axone wickeln und auch keine Myelinschicht aufbauen. Unbeachtet dessen werden die LGs in *Drosophila* als Analoge zu den Oligodendrozyten der Vertebraten beschrieben (Hidalgo und Booth 2000). Interessanterweise werden die beiden analysierten Metalloproteasen in allen LGs und in den CBGs exprimiert. Daraus ergibt sich die Frage, ob Invadolysin und Nepilysin4, analog zu MMP-12 in Vertebraten, an der Differenzierung von LGs beteiligt sind. Um das zu prüfen, haben wir die Funktionsverlustmutante von *invadolysin* untersucht. In den homozygot mutanten Embryonen erscheinen die

axonalen Trakte wildtypisch. Auch die Spezifizierung der Gliazellen scheint nicht betroffen zu sein, allerdings kann man einen schwachen Phänotyp in der Positionierung der LGs feststellen (Daten werden nicht gezeigt). Eine Erklärung für den schwachen Defekt könnte in redundanten Funktionen von anderen Metalloproteasen liegen. Für Vertebraten konnte bereits gezeigt werden, dass Metalloproteasen *in vitro* viele Überlappungen in ihren Substraten zeigen. Anhand von Doppelmutanten konnte *in vivo* Redundanz und Kompensation für Metalloproteasen nachgewiesen werden (Page-McCaw *et al.*, 2003). Es wäre also durchaus möglich, dass *invadolysin* eine Rolle in der Differenzierung und der Migration der LGs spielt, der Effekt der Funktionsverlustmutante aber von anderen Metalloproteasen kompensiert wird. Vielleicht wird diese Kompensation durch *neprilysin4* bewirkt, welches das gleiche Expressionsmuster wie *invadolysin* zeigt. Mitglieder der Neprilysin Familie der Metalloendopeptidasen existieren in *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans*, und viele ihrer enzymatischen Eigenschaften sind im Laufe der Evolution konserviert. Es ist also möglich, dass Metalloproteasen in *Drosophila* eine ähnliche Funktion übernehmen, wie in Vertebraten. Für die Erforschung der Funktionen von Metalloproteasen bieten sich auch hier Invertebraten als Modellorganismen an, da sie genetisch viel leichter zu manipulieren sind als Vertebraten.

Gliazellen sind in der Lage, die Homöostase in der Umgebung von Synapsen und Axonen zu regulieren. Transporter-Proteine regeln dabei den Austausch von Natrium- und Kaliumionen. Im Säugergehirn, wie auch in *Drosophila*, benutzen die Typ1 Synapsen der neuromuskulären Verbindungen L-Glutamat als excitatorischen Neurotransmitter. Dieser Neurotransmitter wird durch spezielle Proteine, den excitatorischen Aminosäuren-Transportern (EAAT) abgebaut und recycelt. Soustelle *et al* konnte zwei solcher Transporter (dEAAT1 und dEAAT2) in *Drosophila* identifizieren. Wir konnten die Expression von *dEAAT1*-Gal4 in CBGs und in NRGs nachweisen. Für *dEAAT1* konnte kürzlich gezeigt werden, dass es in der adulten Fliege in Gliazellen nahe der NMJs exprimiert wird und für deren Aktivität benötigt wird (Rival *et al.*, 2006).

Zusammengefasst kann man sagen, dass sich unter den analysierten Markern viele Kandidaten für eine Subtyp-spezifische Funktion befinden, die zum Teil bekannt und beschrieben ist, zum Teil aber auch nicht.

Gene	molekulare Funktion	biologischer Prozess	Marker
Lückengen			
<i>huckebein</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	<i>hkb-lacZ</i>
Paarregelgene			
<i>fushi tarazu</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	<i>ftz-lacZ</i>
<i>odd paired</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	3-66 <i>lacZ</i>
Segmentpolaritätsgene			
<i>wingless</i>	sekretiertes Signalprotein	Embryonalentwicklung	<i>wg-acZ</i>
<i>engrailed</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	α -Inv
<i>gooseberry_{p+d}</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	α -Gsb
<i>mirror</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	<i>mirr-lacZ</i>
<i>ladybird</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	α -Lbe
temporäre Spezifizierungsgene			
<i>hunchback</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	α -Hb
<i>pdm</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	α -Pdm
<i>castor</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	<i>cas-Gal4</i> und α -Cas
Kolumnargene			
<i>msh</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	α -Msh
<i>vnd</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	Sonde
verschiedene Transkriptionsfaktoren			
<i>prospero</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	α -Pros
<i>spalt major</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	<i>salm-lacZ</i>
<i>zfh1</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	
<i>zfh2</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	
<i>seven up</i>	Transkriptionsfaktor	Embryonalentwicklung	<i>svp-lacZ</i>
<i>deadpan</i>	Transkriptionsfaktor	paneurales Gen	α -Deadpan
Transmembranproteine			
<i>spinster</i>	Transmembranprotein	ZNS Remodelierung	201- <i>lacZ</i>
<i>rolling stone</i>	Integrales Plasmamembranprotein	Embryonalentwicklung	Mz813, n- GFP
gliale Differenzierungsgene			
<i>repo</i>	Transkriptionsfaktor	gliale Differenzierung	α -Repo
<i>gliotactin</i>	Esterase-Aktivität	Bildung der Blut-Hirn-Schranke und der „septate junctions“	J29- <i>lacZ</i>
<i>fire exit</i>			Y15- <i>lacZ</i>
<i>nervana2</i>	Na ²⁺ /K ⁺ -ATPase	Bildung der Blut-Hirn-Schranke und der „septate junctions“	<i>nerv2-Gal4</i>
Signalproteine			
CG4322/ <i>moody</i>	G-Protein Rezeptor	gekoppelter	Bildung der Blut-Hirn-Schranke und der „septate junctions“
CG11910	G-Protein Signalweg		Oberflächenrezeptor-vermittelte Signaltransduktion
CG15860/ <i>painless</i>	Ionenkanalaktivität		Signaltransduktion von mechanischen Reizen, wie Schmerz und Kälte
Enzyme			
<i>invadolysin</i>	Metalloendopeptidase		Zellzyklus, Nervensystementwicklung
<i>nepriysin4</i> SP2637	Metalloendopeptidase Asparaginamidohydrolase		Proteolyse, Signaltransduktion “N-end-rule” Signalweg zur Proteindegradation
CG12078	Hydrolaseaktivität		Embryonalentwicklung

Metabolismus			
CG3168	DNA-Bindeprotein	DNA-Metabolismus	Sonde
<i>pumilio</i>	RNA-Bindeprotein	Zellschicksalsdeterminierung	3-101-lacZ
CG7433	Transaminase	Aminosäuren-Metabolismus	Sonde
CG6218	Carbohydratkinase	Carbohydrat-Metabolismus	Sonde
Transporter			
CG2893	Ca ²⁺ /Na ²⁺ Antiporter	Kationen-Transport	Sonde
CG6783	Fettsäure-bindend	Transporterfunktion	Sonde
<i>dEAAT1</i>	Aminosäuren-Transporter	Aminosäuretransport und -metabolismus	<i>dEAAT1</i> - Gal4
unbekannte Gene			
CG30358	-----	-----	M84-lacZ
CG14148	-----	-----	P101-lacZ
CG1631	-----	-----	201-lacZ
CG5080	-----	-----	Sonde
CG16876	-----	-----	Sonde
CG9336/8	-----	-----	Sonde
CG8965	-----	-----	Sonde

Tabelle 13: Klassifizierung der molekularen Marker nach Proteinklassen

4.3 Die Gliazellen im peripheren Nervensystem

Die peripheren Gliazellen unterscheiden sich von den Gliazellen im ZNS vor allem durch ihr Migrationsverhalten. Sie wandern im Laufe der Embryogenese entlang der axonalen Trakte in die Peripherie aus. Die im ZNS geborenen PGs dienen als Wegweiser für den auswachsenden Wachstumskegel des ebenfalls in die Peripherie ziehenden Pionierneurons aCC, an dem die PGs dann im Gegenzug entlang wandern. Dabei verlässt eine Pioniergliazelle das ZNS als erste und führt die anderen PGs an. Diese Gliazellen unterscheiden sich von den anderen durch eine verstärkte Bildung von Filopodien, mit denen sie ihre Umgebung abtasten (Sepp und Auld 2003). Eine der PGs umhüllt den Segmentalnerv (SN). Alle andere reihen sich perlschnurartig am Intersegmentalnerv (ISN) auf. Diese Zellen migrieren nach dorsal bis sie auf die zellulären Ausläufer einer in der Peripherie entstandenen PG treffen. Am Ende der Embryonalentwicklung liegen zwölf Repo positive PGs in der Peripherie, wo sie mit der Umhüllung der axonalen Bündel beginnen, und die sensorischen und motorischen Nerven von ihrer Umgebung isolieren.

4.3.1 Die Identität der peripheren Gliazellen

Die Analyse der molekularen Marker zeigt, dass die PGs unterschiedliche Kombinationen an Markern exprimieren und damit eine eigene Identität besitzen. Bis

auf die beiden NB2-5 generierten Gliazellen können wir nun die PGs voneinander unterscheiden und einzeln ansprechen. Wir konnten außerdem zeigen, dass die Reihenfolge, in der die PGs auswandern, und ihre finale Position am Ende der Embryogenese stereotyp sind (von Hilchen *et al.*, in Vorbereitung). Zusammen mit den Ergebnissen der Positionsauswertung der Zellen schaffte die Markergenanalyse die Grundlage für eine neue, einheitliche Nomenklatur der PGs. Die Identität der Zellen äußert sich also nicht nur in der Expression bestimmter Gene, sondern auch darin, dass die einzelnen PGs den Zeitpunkt ihrer Wanderung, die Assoziation mit ihrem Nerv und ihre Endposition zu kennen scheinen. Wie die Zellen diese Informationen erhalten, ist nicht klar. Die individuellen Eigenschaften der Zellen könnten 1) mit der klonalen Herkunft oder 2) durch Zell-Zell-Interaktionen während der Migration oder 3) durch beides festgelegt werden. Die Analyse des Homöoboxgens *ladybird* (De Graeve *et al.*, 2004) deutet darauf hin, dass die Determination des Zellschicksals, einhergehend mit zellspezifischem Verhalten, von der klonalen Herkunft der Gliazellen abhängt. *ladybird* wird in einzelnen NBs, inklusive des NB5-6, im embryonalen ZNS exprimiert. Die NB5-6 generierte ePG2 exprimiert *Ladybird early* (Lbe). In der *ladybird* Funktionsverlustmutante fehlt die ePG2 in 30% aller Hemisegmente und es liegen mehr Repo positive Zellen im ZNS, während die Überexpression der *ladybird* Gene zu einer erhöhten Anzahl an Gliazellen im Exitbereich führt. De Graeve *et al* nehmen an, dass *ladybird* eher eine Rolle in der Spezifizierung der Gliazellen eines Zellstammbaums spielt, als in der Determinierung des glialen Schicksals (De Graeve *et al.*, 2004). Unsere Analyse der *castor* Funktionsverlustmutante unterstützt diese Hypothese. *castor* wird in der Peripherie in den beiden NB2-5 PGs exprimiert. In *cas* Mutanten fehlen diese beiden Zellen in der Peripherie, und es liegen stattdessen mehr Gliazellen im Exitbereich. Es scheint also, also ob die Zellen zwar als Gliazellen determiniert werden, aber an ihrem Geburtsort verharren, anstatt ihr wildtypisches Wanderungsverhalten zu entwickeln. Der Funktionsverlust von *castor* führt daher entweder zum Verlust der Subtypspezifizierung der ePG6 und 8 oder ihrer Fähigkeit zu wandern.

4.3.2 Migration der peripheren Gliazellen

Zellmigration ist ein wichtiger biologischer Mechanismus in der Entwicklung von Strukturen und Organen und findet in einfachen und komplexen multi-zellulären Organismen statt. Es ist ein temporär kontrollierter Prozess, bei dem sich die Zellen

zunächst aus ihrer Umgebung lösen müssen, um dann Signalen zu folgen, die sie an ihren Zielort leiten. Die Zellen müssen dabei in der Lage sein, die von außen kommenden Signale zu lesen und umzusetzen, damit Richtung, Wanderungsgeschwindigkeit und das Erreichen der endgültigen Position gewährleistet sind. Für alle migrierenden Zellen ist die dynamische Umgestaltung des Aktinzytoskeletts ein wichtiger Prozess. Vanessa Auld und ihre Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die GTPasen RhoA und Rac1 an der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts in PGs während ihrer Wanderung beteiligt sind (Sepp und Auld 2003). Die kleinen RhoGTPasen Rho, Rac und Cdc42 vermitteln die dynamische Umstrukturierung von Aktin bei der Wanderung von Zellen und während der Morphogenese. Die Überexpression verschiedener transgener Konstrukte von RhoA und Rac1 resultieren in der defekten Verteilung der PGs und in fehlerhafter Wegfindung der sensorischen Neurone. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle der beiden GTPasen in der Migration der PGs und der Ummantelung der Axone hin. Cdc42 dagegen zeigt keinen Effekt und erfüllt dementsprechend auch keine Funktion in der Entwicklung des PNS (Sepp und Auld 2003).

Die Interaktion zwischen den Zellen und dem Substrat, auf dem sie wandern, ist ein weiterer wichtiger Faktor bei der Migration (Lin und Forscher 1993; O'Connor und Bentley 1993). In Kommunikation mit Neuronen, z. B. über die Expression bestimmter Signalmoleküle, werden die Gliazellen an ihren Zielort geführt. Es konnte gezeigt werden, dass reziproke Interaktion von PGs und sensorischen Neuronen für die Entstehung des PNS notwendig sind (Sepp und Auld 2003). So führt z. B. die Überexpression des „epidermal growth factor receptors“ (EGFR) Signalwegs zu Wegfindungsdefekten der sensorischen Neurone und zur Runterregulierung des glialen Markers Neuroglian. Über die EGFR Liganden Spitz und Vein kontrolliert der EGFR/Ras Signalweg die gliale Expression von Genen, die für die Entwicklung der Sensorik notwendig sind (Sepp und Auld 2003). Der EGFR Signalweg ist jedoch nicht der einzige Weg über den Neurone und Gliazellen miteinander kommunizieren. Auch Notch und Numb spielen eine wichtige Rolle in der Migration der PGs (Edenfeld *et al.*, 2006). In frühen Embryonalstadien reguliert Notch die Anzahl der Gliazellen, während es in späteren Stadien für die Migration in die Peripherie zuständig ist. Der Funktionsverlust von Notch während der Migration der PGs führt zu einem irregulären Migrationsverhalten der Zellen und zu einer verstärkten Philopodienbildung in den Gliazellen. Die zellspezifische Reduktion der Notch Aktivität durch Expression von

numb zeigt denselben Phänotyp. Numb ist also ausreichend, um die Migration der PGs zu verhindern. Die präzise temporäre und quantitative Regulation von Notch und Numb ist daher in der Differenzierung und Migration der PGs von Bedeutung. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die neuronale Expression des Notch-Liganden Delta die Aktivierung von Notch initiiert, die Feinabstimmung aber auf der Ebene der Numb Lokalisierung und Quantität geregelt wird (Edenfeld *et al.*, 2006).

Um genetischen Prozesse zu identifizieren, die an der Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen beteiligt sind, wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Christian Klämbt (Universität Münster) eine groß angelegte EMS Mutagenese durchgeführt. Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit habe ich die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung und der Kartierung von 34 EMS Mutanten vorgestellt, die Defekte im Muster der peripheren Gliazellen im PNS zeigen. Für zwei EMS-Mutanten konnte Olaf Vef den mutierte Genlocus identifizieren: *numb* und *scar*. Benjamin Altenhein konnte für *numb* eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Migration der peripheren Gliazellen nachweisen. Diese Ergebnisse sind zusammen mit der Charakterisierung von *Notch* in Edenfeld *et al* beschrieben und veröffentlicht worden (siehe vorheriger Absatz) (Edenfeld *et al.*, 2006). Die detaillierte Charakterisierung von EMS^{scar} wird von Christian von Hilchen bearbeitet. SCAR hat eine wichtige Aufgabe in der Regulierung des kortikalen Aktinzytoskeletts. Zusammen mit Wasp stellt SCAR einen potenziellen Aktivator des Arp2/3-Komplexes dar (Miller 2002). Die Aktivierung von SCAR erfolgt über Rac1 (Eden *et al.*, 2002; Hummel *et al.*, 2000; Miki *et al.*, 1998), eine kleine GTPase, der bereits eine Rolle in der Migration von Gliazellen nachgewiesen wurde (siehe oben) (Sepp und Auld 2003). Die durch SCAR vermittelte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes ist erforderlich für die dynamische Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts, welches für die Ausbildung von Membranausläufern im Zuge der Migration erforderlich ist. Die beiden in der EMS-Mutagenese identifizierten Gene sind also gute Kandidatengene für die Regulation der Migration von PGs.

Die von uns beobachteten Phänotypen zeigen fast alle Defekte, die die Spezifizierung und/oder Differenzierung von einzelnen PGs betreffen, nie von allen PGs. Entweder wandern bestimmte PGs nicht in die Peripherie aus oder bestimmte PGs werden nicht generiert. Wir konnten keine Mutante entdecken, bei der die Migration komplett geblockt ist und keine Gliazelle wandert. Ebenso gibt es keine Mutante, bei der die Gliazellen in die falsche Richtung oder entlang der falschen peripheren Trakte wandern.

Es scheint eher so, dass die Migration von den individuellen Eigenschaften der Zellen abhängt und vielleicht auch individuell in jeder Zelle reguliert wird. Dabei können viele Faktoren und Prozesse eine Rolle spielen: 1. die Identität der peripheren Gliazelle, festgelegt durch die klonale Herkunft und/oder Zell-Zell-Interaktion mit den benachbarten PGs, 2. Zellteilung oder Zelltod, 3. eine reziproke Interaktion mit den sensorischen oder motorischen Axonen der peripheren Trakte, 4. intrinsische und extrinsische Faktoren (z. B. Signalwege) und 5. die Fähigkeit der PGs zu wandern in Abhängigkeit vom Zytoskelett. Das wichtigste Ziel für nachfolgende Arbeiten an den EMS-Mutanten ist die Identifizierung der mutierten Gene und die funktionelle Charakterisierung.

4.4 Die Zusammensetzung der glialen Anteile in den Zellklonen der Neuroblasten ist unveränderlich

In den früheren Beschreibungen der Zellstammbäume gibt es NBs, die immer den gleichen glialen Anteil produzieren, wohingegen in anderen Zellstammbäumen der gliale Anteil variiert (Bossing *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1997). Was ist der Grund für diese Unterschiede? Liegt es an der Variabilität in der Positionierung individueller Gliazellen oder sind einzelne NBs in der Lage, ihren glialen Anteil an die Bedürfnisse ihres Hemisegments anzupassen? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Dil Markierungen der NBs in verschiedenen GFP-Linien wiederholt. Die markierten Zellklone konnten im Zusammenhang aller lateralen Gliazellen (*repo-Gal4*) oder einzelner Gliazellen (*Mz97-Gal4*) ausgewertet werden. So waren wir in der Lage, die Gliazellen in den Klonen genau zu identifizieren und zu zeigen, dass die Zusammensetzung der Gliazellen in einem Zellstammbaum unveränderlich ist. Die Variabilität in der Positionierung resultierte offensichtlich aus der falschen Identifizierung der Zellidentität.

Die Dil Markierungen in der gliaspezifischen Enhancer Trap Linie *Mz97-Gal4* konnten die Zusammensetzung des glialen Anteils der NBs 1-3, 5-6 und 7-4 klären (siehe Tabelle 5). Für den NB5-6, z. B. war beschrieben, dass er eine EG, die MV-SPG, die DL-SPG und die MD-SPG generiert. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die EG⁵⁻⁶, die MV-SPG und beide lateralen SPGs (DL-SPG und VL-SPG) die Nachkommenszellen vom NB5-6 sind. Dieses Ergebnis wird durch die Expressionsanalysen der Marker

bestätigt, da diese vier Zellen alle *wg-lacZ* exprimieren, einen Marker für die NBs der fünften Zellreihe (Broadus *et al.*, 1995). Die MD-SPG wird dagegen vom NB1-3 generiert und ist *wg-lacZ* negativ. Dieses Beispiel zeigt, wie gut die Ergebnisse der Zellstammbaumanalysen und die Ergebnisse der Markerexpressionen ineinander greifen und sich gegenseitig vervollständigen.

Zudem konnten die DiI Markierungen in spezifischen GFP-Linien die klonale Herkunft aller peripheren Gliazellen aufdecken. Dabei konnten wir zeigen, dass zwei PGs, von denen man bis jetzt angenommen hatte, dass sie von einem NB im ZNS abstammen, von einem SOPs in der Peripherie generiert werden.

4.5 Phänotypische Charakterisierung der *castor* Funktionsverlustmutante mithilfe der molekularen Marker

Um die Brauchbarkeit der molekularen Marker bei der Analyse von Mutanten zu demonstrieren, haben wir den Phänotyp einer Funktionsverlustmutante von *castor* charakterisiert. *castor* (*cas*) ist eines der temporären Spezifizierungsgene und ist, zusammen mit *pdm*, an der Determination des Zellschicksals der spät geborenen Nachkommenzellen eines Neuroblasten beteiligt (Grosskortenhans *et al.*, 2006; Kambadur *et al.*, 1998). Am Ende der Embryonalentwicklung wird *cas* spezifisch in vier Gliazellen im ZNS (V-CG und D-CG, A-SPG und LV-SPG) und in zwei Gliazellen im PNS (ePG6 und 8) exprimiert. Viele Neurone sind ebenfalls *cas* positiv. Die Gliazellen von NB1-1a (Prokop und Technau 1994; Udolph *et al.*, 1993) sind in *cas* Mutanten wildtypisch, wohingegen die NB7-4 generierten CGs beide falsch positioniert sind. Die glialen Nachkommen vom NB2-5 wandern ebenfalls nicht in die Peripherie. Sowohl die CGs, als auch die PGs adaptieren das gliale Schicksal (sie sind Repo positiv), wandern aber nicht an ihre wildtypischen Positionen und bleiben an ihrem Geburtsort liegen. *cas* scheint also keinen Einfluss auf die gliale Determinierung zu haben, sondern ist eher in die Spezifizierung und/oder in das Verhalten der Gliazellen involviert. Im NB7-4 Zellstammbaum scheint *cas* noch eine andere Rolle zu spielen: die L-ISNG ist *Inv* negativ im Wildtyp, zeigt aber in homozygoten *cas^{ilc2}*-Embryonen eine deutliche *inv* Expression. Die verschiedenen Auswirkungen von *cas* innerhalb des Zellstammbaums vom NB7-4 könnten Zelltyp-spezifisch sein, indem in den CGs die

Beweglichkeit und die Wanderung kontrolliert werden, und *cas* in der L-ISNG die Expression von Zielgenen reguliert. Eine andere mögliche Aufgabe von *cas* liegt in der Determinierung von Zellschicksalen. Wenn also *cas* nicht exprimiert wird, nehmen die Nachkommenzellen eine andere Identität an, die sich dann z. B. in der Expression von anderen Markern ausdrückt. Um den Phänotyp von *cas* zu verstehen, bedarf es noch weiterführender Experimente. Die Charakterisierung dieser Funktionsverlustmutante demonstrierte aber deutlich, wie nützlich die analysierten molekularen Marker in der Untersuchung von mutanten Phänotypen sind. Obwohl die Gliazellen an anderen Positionen liegen als im Wildtyp, kann man sie mit Hilfe der Marker individuell ansprechen.

5. Zusammenfassung

Im embryonalen ZNS von *Drosophila* wird gliales Schicksal durch das Anschalten des Transkriptionsfaktors *glial cells missing (gcm)* determiniert. Die sich entwickelnden Gliazellen werden, aufgrund morphologischer Gemeinsamkeiten, in verschiedene Klassen eingeteilt, die mit den drei Grundstrukturen des Bauchmarks (Oberfläche, Kortex und Neuropil) assoziiert sind und voraussichtlich spezifische Funktionen übernehmen. Der Mechanismus, der zu dieser Spezifizierung und Differenzierung führt, ist bis jetzt nicht bekannt. In meiner Arbeit habe ich die Expressionsmuster von 46 Genen, vornehmlich Transkriptionsfaktoren, in allen lateralen Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems (ZNS und PNS) analysiert und die molekulare Klassifizierung mit der bestehenden positionellen und morphologischen Klassifizierung verglichen. Ich konnte zeigen, dass durch die Expression von bestimmten Markern, die ursprüngliche Klassifizierung bestätigt werden kann. Zudem zeigt fast jede Gliazelle eine spezifische Kombination an Markergenexpression, die es uns ermöglicht, die Zellen individuell anzusprechen. Dies schafft auf der einen Seite ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung spezifischer Zellschicksale in mutanten Hintergründen. Auf der anderen Seite spielt jedes Markergen möglicherweise selbst eine Rolle in der Differenzierung oder Spezifizierung von glialen Subtypen oder im Aufbau und in der Aufrechterhaltung von Subtyp-spezifischen Funktionen. Mit der Analyse der *castor* Funktionsverlustmutante konnte ich demonstrieren, dass die Gliazellen, die im Wildtyp *castor* exprimieren, in der Mutante zwar geboren werden, zum Teil aber nicht an ihre wildtypische Position wandern. *Castor* scheint keinen Einfluss auf die gliale Determinierung zu haben, sondern ist eher in der Spezifizierung und/oder in das Verhalten der Gliazellen involviert. Der Effekt von *castor* ist außerdem abhängig von der klonalen Herkunft der Gliazellen.

Auf der Basis der Expressionsmusteranalysen der molekularen Marker und der klonalen Herkunft und schon bestehender Namen haben wir in dieser Arbeit eine einheitliche Nomenklatur der Gliazellen im ZNS und PNS geschaffen.

Der zweite Teil meiner Doktorarbeit behandelt die Analyse von EMS-Mutanten zur Identifizierung von Genen, die eine Rolle in der Differenzierung und Migration der peripheren Gliazellen spielen. Diese speziellen Gliazellen legen im Laufe der Embryonalentwicklung zum Teil weite Strecken entlang der peripheren Nerven zurück,

bis sie ihre endgültige Position erreichen. Die im ersten Teil geschaffenen Kenntnisse über die Identität, Position und Herkunft der Gliazellen im Wildtyp ermöglichte eine detaillierte phänotypische Charakterisierung von 34 EMS Mutanten. Die untersuchten Phänotypen wurden in Klassen eingeteilt, die Defekte in der Anzahl, in der Positionierung und/oder im Wanderungsverhalten der peripheren Gliazellen aufwiesen. Gleichzeitig wurden die Mutationen der EMS Linien über Komplementationsanalysen soweit wie möglich kartiert.

6. Literatur

Akiyama, Y., Hosoya, T., Poole, A. M. und Hotta, Y. (1996). "The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in *Drosophila* and mammals." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14912-6.

Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. und Hotta, Y. (1998). "Alteration of cell fate by ectopic expression of *Drosophila* glial cells missing in non-neural cells." *Dev Genes Evol* 208(10): 578-85.

Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D. und Technau, G. M. (2006). "Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis." *Dev Biol* 296(2): 545-60.

Arendt, D. und Nubler-Jung, K. (1999). "Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates." *Development* 126(11): 2309-25.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. und Lake, R. J. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* 284(5415): 770-6.

Ashburner, M., Carson, H. L. und Thompson Jr., J. N. (1982). *The Genetics and Biology of *Drosophila**.

Badenhorst, P. (2001). "Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS." *Development* 128(20): 4093-101.

Badenhorst, P., Finch, J. T. und Travers, A. A. (2002). "Tramtrack co-operates to prevent inappropriate neural development in *Drosophila*." *Mech Dev* 117(1-2): 87-101.

Bainton, R. J., Tsai, L. T., Schwabe, T., DeSalvo, M., Gaul, U. und Heberlein, U. (2005). "moody encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*." *Cell* 123(1): 145-56.

Barolo, S., Carver, L. A. und Posakony, J. W. (2000). "GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*." *Biotechniques* 29(4): 726, 728, 730, 732.

Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., Hoskins, R. A. und Spradling, A. C. (2004). "The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes." *Genetics* 167(2): 761-81.

Bodmer, R., Carretto, R. und Jan, Y. N. (1989). "Neurogenesis of the peripheral nervous system in *Drosophila* embryos: DNA replication patterns and cell lineages." *Neuron* 3(1): 21-32.

Bodmer, R. und Jan, Y. N. (1987). "Morphological differentiation of the embryonic peripheral neurons in *Drosophila*." *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196: 69-77.

- Bossing, T. und Technau, G. M.** (1994). "The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling." *Development* 120(7): 1895-906.
- Bossing, T., Technau, G. M. und Doe, C. Q.** (1996). "huckebein is required for glial development and axon pathfinding in the neuroblast 1-1 and neuroblast 2-2 lineages in the *Drosophila* central nervous system." *Mech Dev* 55(1): 53-64.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. und Technau, G. M.** (1996). "The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm." *Dev Biol* 179(1): 41-64.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-15.
- Broadus, J. und Doe, C. Q.** (1995). "Evolution of neuroblast identity: seven-up and prospero expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and *Schistocerca*." *Development* 121(12): 3989-96.
- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. und Doe, C. Q.** (1995). "New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system." *Mech Dev* 53(3): 393-402.
- Brody, T. und Odenwald, W. F.** (2002). "Cellular diversity in the developing nervous system: a temporal view from *Drosophila*." *Development* 129(16): 3763-70.
- Brody, T. und Odenwald, W. F.** (2005). "Regulation of temporal identities during *Drosophila* neuroblast lineage development." *Curr Opin Cell Biol* 17(6): 672-5.
- Buescher, M. und 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(3): 673-81.
- Bullock TH, H. G.** (1965). "Structure and function in the nervous system of invertebrates." San Francisco, London: Freeman.
- Campos-Ortega, J. A. u. H., V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*.
- Carlson, S. D., Hilgers, S. L. und Juang, J. L.** (1997). "First developmental signs of the scolopale (glial) cell and neuron comprising the chordotonal organ in the *Drosophila* embryo." *Glia* 19(3): 269-74.
- Carlson, S. D., Hilgers, S. L. und Juang, J. L.** (1997). "Ultrastructure and blood-nerve barrier of chordotonal organs in the *Drosophila* embryo." *J Neurocytol* 26(6): 377-88.
- Carlson, S. D., Juang, J. L., Hilgers, S. L. und Garment, M. B.** (2000). "Blood barriers of the insect." *Annu Rev Entomol* 45: 151-74.

- De Graeve, F., Jagla, T., Daponte, J. P., Rickert, C., Dastugue, B., Urban, J. und Jagla, K.** (2004). "The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells." *Dev Biol* 270(1): 122-34.
- De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C. und Giangrande, A.** (2006). "Huckebein-mediated autoregulation of *Glide/Gcm* triggers glia specification." *Embo J* 25(1): 244-54.
- Doe, C. Q.** (1992). "Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system." *Development* 116(4): 855-63.
- Doe, C. Q., Hiromi, Y., Gehring, W. J. und Goodman, C. S.** (1988). "Expression and function of the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* neurogenesis." *Science* 239(4836): 170-5.
- Dumstrei, K., Wang, F. und Hartenstein, V.** (2003). "Role of DE-cadherin in neuroblast proliferation, neural morphogenesis, and axon tract formation in *Drosophila* larval brain development." *J Neurosci* 23(8): 3325-35.
- Ebens, A. J., Garren, H., Cheyette, B. N. und Zipursky, S. L.** (1993). "The *Drosophila* anachronism locus: a glycoprotein secreted by glia inhibits neuroblast proliferation." *Cell* 74(1): 15-27.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. und Kirschner, M. W.** (2002). "Mechanism of regulation of *WAVE1*-induced actin nucleation by *Rac1* and *Nck*." *Nature* 418(6899): 790-3.
- Edenfeld, G., Altenhein, B., Zierau, A., Cleppien, D., Krukkert, K., Technau, G. und Klambt, C.** (2006). "Notch and Numb are required for normal migration of peripheral glia in *Drosophila*." *Dev Biol*.
- Edwards, J. S., Swales, L. S. und Bate, M.** (1993). "The differentiation between neuroglia and connective tissue sheath in insect ganglia revisited: the neural lamella and perineurial sheath cells are absent in a mesodermless mutant of *Drosophila*." *J Comp Neurol* 333(2): 301-8.
- Ellis, M. C., Weber, U., Wiersdorff, V. und Mlodzik, M.** (1994). "Confrontation of scabrous expressing and non-expressing cells is essential for normal ommatidial spacing in the *Drosophila* eye." *Development* 120(7): 1959-69.
- Fredieu, J. R. und Mahowald, A. P.** (1989). "Glial interactions with neurons during *Drosophila* embryogenesis." *Development* 106(4): 739-48.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E. und Doe, C. Q.** (2003). "Unwrapping glial biology: *Gcm* target genes regulating glial development, diversification, and function." *Neuron* 38(4): 567-80.
- Freeman, M. R. und Doe, C. Q.** (2001). "Asymmetric Prospero localization is required to generate mixed neuronal/glial lineages in the *Drosophila* CNS." *Development* 128(20): 4103-12.

- Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. und Klämbt, C.** (1997). "Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes." *Development* 124(12): 2307-16.
- Granderath, S., Bunse, I. und Klämbt, C.** (2000). "gcm and pointed synergistically control glial transcription of the *Drosophila* gene loco." *Mech Dev* 91(1-2): 197-208.
- Granderath, S., Stollewerk, A., Greig, S., Goodman, C. S., O'Kane, C. J. und Klämbt, C.** (1999). "loco encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation." *Development* 126(8): 1781-91.
- Griffiths, R. L. und Hidalgo, A.** (2004). "Prospero maintains the mitotic potential of glial precursors enabling them to respond to neurons." *Embo J* 23(12): 2440-50.
- Grigliatti, T.** (1986). *Mutagenesis. Drosophila: a practical approach.* D. B. E. Roberts. IRL, Oxford, Washington DC: 39-58.
- Grosskortenhaus, R., Robinson, K. J. und Doe, C. Q.** (2006). "Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage." *Genes Dev* 20(18): 2618-27.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. und Technau, G. M.** (1995). "The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*." *Development* 121(2): 317-32.
- Hama, C., Ali, Z. und Kornberg, T. B.** (1990). "Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter." *Genes Dev* 4(7): 1079-93.
- Hidalgo, A. und Booth, G. E.** (2000). "Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS." *Development* 127(2): 393-402.
- Hidalgo, A., Kinrade, E. F. und Georgiou, M.** (2001). "The *Drosophila* neuregulin vein maintains glial survival during axon guidance in the CNS." *Dev Cell* 1(5): 679-90.
- Higashijima, S., Shishido, E., Matsuzaki, M. und Saigo, K.** (1996). "eagle, a member of the steroid receptor gene superfamily, is expressed in a subset of neuroblasts and regulates the fate of their putative progeny in the *Drosophila* CNS." *Development* 122(2): 527-36.
- Hitier, R., Chaminade, M. und Preat, T.** (2001). "The *Drosophila* castor gene is involved in postembryonic brain development." *Mech Dev* 103(1-2): 3-11.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. und Hotta, Y.** (1995). "glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*." *Cell* 82(6): 1025-36.
- Hummel, T., Leifker, K. und Klämbt, C.** (2000). "The *Drosophila* HEM-2/NAP1 homolog KETTE controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization." *Genes Dev* 14(7): 863-73.

- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. und Doe, C. Q.** (2001). "Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny." *Cell* 106(4): 511-21.
- Ito, K., Urban, J. und Technau, G.** (1995). "Distribution, classification, and development of Drosophila glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord." *Roux's Arch. Dev. Biol.* 204: 284-307.
- Jacobs, J. R., Hiromi, Y., Patel, N. H. und Goodman, C. S.** (1989). "Lineage, migration, and morphogenesis of longitudinal glia in the Drosophila CNS as revealed by a molecular lineage marker." *Neuron* 2(6): 1625-31.
- Jimenez, F. und Campos-Ortega, J. A.** (1990). "Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of *D. melanogaster*." *Neuron* 5(1): 81-9.
- Jones, B. W.** (2005). "Transcriptional control of glial cell development in Drosophila." *Dev Biol* 278(2): 265-73.
- Jones, B. W., Abeysekera, M., Galinska, J. und Jolicoeur, E. M.** (2004). "Transcriptional control of glial and blood cell development in Drosophila: cis-regulatory elements of glial cells missing." *Dev Biol* 266(2): 374-87.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. und Goodman, C. S.** (1995). "glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate." *Cell* 82(6): 1013-23.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. und Odenwald, W. F.** (1998). "Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the Drosophila CNS." *Genes Dev* 12(2): 246-60.
- Kammerer, M. und Giangrande, A.** (2001). "Glide2, a second glial promoting factor in Drosophila melanogaster." *Embo J* 20(17): 4664-73.
- Kidwell, M. G.** (1986). P-M mutagenesis. *Drosophila: a practical approach*. D. B. E. Roberts. IRL, Oxford, Washington, DC: 59-82.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. und Klämbt, C.** (1994). "The Ets transcription factors encoded by the Drosophila gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS." *Cell* 78(1): 149-60.
- Klämbt, C.** (1993). "The Drosophila gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells." *Development* 117(1): 163-76.
- Klämbt, C. und Goodman, C. S.** (1991). "Role of the midline glia and neurons in the formation of the axon commissures in the central nervous system of the Drosophila embryo." *Ann N Y Acad Sci* 633: 142-59.
- Klämbt, C. und Goodman, C. S.** (1991). "The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the Drosophila embryo." *Glia* 4(2): 205-13.

- Klämbt, C., Hummel, T., Menne, T., Sadlowski, E., Scholz, H. und Stollewerk, A.** (1996). "Development and function of embryonic central nervous system glial cells in *Drosophila*." *Dev Genet* 18(1): 40-9.
- Larsen, P. H., DaSilva, A. G., Conant, K. und Yong, V. W.** (2006). "Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice." *J Neurosci* 26(8): 2207-14.
- Larsen, P. H. und Yong, V. W.** (2004). "The expression of matrix metalloproteinase-12 by oligodendrocytes regulates their maturation and morphological differentiation." *J Neurosci* 24(35): 7597-603.
- Lee, T. und Luo, L.** (1999). "Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis." *Neuron* 22(3): 451-61.
- Lin, C. H. und Forscher, P.** (1993). "Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions." *J Cell Biol* 121(6): 1369-83.
- Lindsley, D.-L. u. Z., G. G.** (1992). "The genome of *Drosophila melanogaster*." *Academic Press, San Diego, C. A.* .
- McHugh, B., Krause, S. A., Yu, B., Deans, A. M., Heasman, S., McLaughlin, P. und Heck, M. M.** (2004). "Invadolysin: a novel, conserved metalloprotease links mitotic structural rearrangements with cell migration." *J Cell Biol* 167(4): 673-86.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. und Simon, M. A.** (1997). "mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye." *Genes Dev* 11(8): 1073-82.
- Miki, H., Suetsugu, S. und Takenawa, T.** (1998). "WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac." *Embo J* 17(23): 6932-41.
- Miller, A. A., Bernardoni, R. und Giangrande, A.** (1998). "Positive autoregulation of the glial promoting factor glide/gcm." *Embo J* 17(21): 6316-26.
- Miller, K. G.** (2002). "Extending the Arp2/3 complex and its regulation beyond the leading edge." *J Cell Biol* 156(4): 591-3.
- Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S. und Rubin, G. M.** (1990). "The *Drosophila* seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates." *Cell* 60(2): 211-24.
- Nelson, H. B. und Laughon, A.** (1993). "*Drosophila* glial architecture and development: analysis using a collection of new cell-specific markers." *Developmental Biology* 202: 341-354.
- Novotny, T., Eiselt, R. und Urban, J.** (2002). "Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system." *Development* 129(4): 1027-36.

- O'Connor, T. P. und Bentley, D.** (1993). "Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues in situ." *J Cell Biol* 123(4): 935-48.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Sante, J. M. und Rubin, G. M.** (2003). "Drosophila matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development." *Dev Cell* 4(1): 95-106.
- Pfrieger, F. W. und Barres, B. A.** (1997). "Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro." *Science* 277(5332): 1684-7.
- Pizzi, M. A. und Crowe, M. J.** (2007). "Matrix metalloproteinases and proteoglycans in axonal regeneration." *Exp Neurol* 204(2): 496-511.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1994). "Early tagma-specific commitment of Drosophila CNS progenitor NB1-1." *Development* 120(9): 2567-78.
- Rival, T., Soustelle, L., Cattaert, D., Strambi, C., Iche, M. und Birman, S.** (2006). "Physiological requirement for the glutamate transporter dEAAT1 at the adult Drosophila neuromuscular junction." *J Neurobiol* 66(10): 1061-74.
- Robitaille, R.** (1998). "Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction." *Neuron* 21(4): 847-55.
- Schmid, A., Chiba, A. und Doe, C. Q.** (1999). "Clonal analysis of Drosophila embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets." *Development* 126(21): 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. und Technau, G. M.** (1997). "The embryonic central nervous system lineages of Drosophila melanogaster. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm." *Dev Biol* 189(2): 186-204.
- Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U. und Gaul, U.** (2005). "GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in drosophila." *Cell* 123(1): 133-44.
- Schweisguth, F.** (2004). "Regulation of notch signaling activity." *Curr Biol* 14(3): R129-38.
- Sepp, K. J. und Auld, V. J.** (2003). "Reciprocal interactions between neurons and glia are required for Drosophila peripheral nervous system development." *J Neurosci* 23(23): 8221-30.
- Sepp, K. J. und Auld, V. J.** (2003). "RhoA and Rac1 GTPases mediate the dynamic rearrangement of actin in peripheral glia." *Development* 130(9): 1825-35.
- Sepp, K. J., Schulte, J. und Auld, V. J.** (2000). "Developmental dynamics of peripheral glia in Drosophila melanogaster." *Glia* 30(2): 122-33.

- Sepp, K. J., Schulte, J. und Auld, V. J.** (2001). "Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone." *Dev Biol* 238(1): 47-63.
- Shandala, T., Takizawa, K. und Saint, R.** (2003). "The dead ringer/retained transcriptional regulatory gene is required for positioning of the longitudinal glia in the *Drosophila* embryonic CNS." *Development* 130(8): 1505-13.
- Skeath, J. B. und Carroll, S. B.** (1992). "Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo." *Development* 114(4): 939-46.
- Soustelle, L., Besson, M. T., Rival, T. und Birman, S.** (2002). "Terminal glial differentiation involves regulated expression of the excitatory amino acid transporters in the *Drosophila* embryonic CNS." *Dev Biol* 248(2): 294-306.
- Spana, E. P. und Doe, C. Q.** (1996). "Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates." *Neuron* 17(1): 21-6.
- Thomas, G. B. und van Meyel, D. J.** (2007). "The glycosyltransferase Fringe promotes Delta-Notch signaling between neurons and glia, and is required for subtype-specific glial gene expression." *Development* 134(3): 591-600.
- Truman, J. W. und Bate, M.** (1988). "Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* 125(1): 145-57.
- Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. und Technau, G. M.** (1993). "A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants." *Development* 118(3): 765-75.
- Udolph, G., Rath, P. und Chia, W.** (2001). "A requirement for Notch in the genesis of a subset of glial cells in the *Drosophila* embryonic central nervous system which arise through asymmetric divisions." *Development* 128(8): 1457-66.
- Urbach, R. und Technau, G. M.** (2003). "Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*." *Development* 130(16): 3621-37.
- Van De Bor, V. und Giangrande, A.** (2001). "Notch signaling represses the glial fate in fly PNS." *Development* 128(8): 1381-90.
- Van De Bor, V., Walther, R. und Giangrande, A.** (2000). "Some fly sensory organs are gliogenic and require glide/gcm in a precursor that divides symmetrically and produces glial cells." *Development* 127(17): 3735-43.
- Vef, O., Cleppien, D., Loffler, T., Altenhein, B. und Technau, G. M.** (2006). "A new strategy for efficient in vivo screening of mutagenized *Drosophila* embryos." *Dev Genes Evol* 216(2): 105-8.
- Vincent, S., Vonesch, J. L. und Giangrande, A.** (1996). "Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurons and glia." *Development* 122(1): 131-9.

Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A. und Montell, C. (1994). "repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the Drosophila nervous system." *Genes Dev* 8(8): 981-94.

Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W. C., Hiromi, Y. und Okano, H. (2003). "Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors." *Development* 130(11): 2419-28.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	anterior
a	abdominal
A1-A8	Abdominalsegment eins bis acht
Abb.	Abbildung
aCC	anterior corner cell
AG	Arbeitsgruppe
AP	anterioposterior
AP-Färbung	alkalische Phosphatase
BCIP	X-Phosphat; 5-bromo-4chloro-3indolyl-phosphat
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
ca.	zirka
CBG	cell body glia
CG	channel glia
cM	Zentimorgan
cm	Zentimeter
D	dorsal
d	distal
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dbd	dorsal bipolar dendritic neuron
DEPC-H ₂ O	mit Diethylcarbonat behandeltes Wasser
DIG	Digoxigenin-markiert
DiI	1,1'Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocynidperchlorat
DL	dorsolateral
DLN	dorsaler longitudinaler Nerv
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTS	dominant temperatur sensitive
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
DV	dorsoventral
<i>et al</i>	und Weitere
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EG	Exitglia
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMS	Ethylmethylsulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EST	expressed sequence tag
F1	Filialgeneration
FISH	Fluoreszenz <i>in Situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
G1-G3	Gnathalsegmente eins bis drei
Gal	Galaktosidase
GB	Glioblast
GDP	Guanindiphosphat

GFP	green fluorescence protein
GMZ	Gangliennutterzelle
GPCR	G-protein coupled receptor
GTP	Guanintriphosphat
HRP	horse redish peroxidase
ISN	Intersegmentalnerv
ISNG	Intersegmentalnervglia
ISH	<i>in Situ</i> Hybridisierung
kBP	kilo basepair
L	lateral
L3	drittes Larvalstadium
lacZ	β -Galaktosidase
lch	laterales chordotonalorgan
LG	longitudinale Glia
LGB	longitudinaler Glioblast
LiCl	Lithiumchlorid
LP	lateroposterior
LV	lateroventral
M	Molar
M	medial
m	medial
MD	mediodorsal
mg	Milligramm
ml	Milliliter
ML	mediolateral
MM	medialmost
MMP	Matrix metalloprotease
MV	medioventral
μ l	Mykroliter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NB	Neuroblast
NGB	Neuroglioblast
nGFP	nuclear green fluorescence protein
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMJ	neuromuscular junctions
NRG	nerve root glia
Oe	Öozyten
ori	origin of replication
P	posterior
p	proximal
PCR	polymerase chain reaction
RGS	regulator of G-protein signalling
pNR	procephale neurogene Region
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S1-S5	Segregationswellen eins bis fünf
SN	Segmentalnerv
SNG	Segmentalnervglia
SOP	sensory organ precursor

SPG	subperineurial glia
t	thorakal
T1-T3	Thorakalsegmente eins bis drei
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
TN	Transversalnerv
TZ	Transitionszone
UAS	upstream activating sequence
UTP	Uridintriphosphat
V	ventral
vch	ventral chordotonal organ
v'ch	ventral' chordotonal organ
vNR	ventrale neurogene Region
vNS	ventrales Nervensystem
VL	ventrolateral
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

7.2 Namen und Abkürzungen der Gliazellen

L-CBG	lateral cell body glia
M-CBG	medial cell body glia
MM-CBG	medialmost cell body glia
D-CG	dorsal channel glia
V-CG	ventral channel glia
A-LG	anterior longitudinal glia cluster
LP-LG	lateroposterior longitudinal glia
M-LG	medial longitudinal glia cluster
P-LG	posterior longitudinal glia cluster
L-ISNG	lateral intersegmental nerve root glia
M-ISNG	medial intersegmental nerve root glia
L-SNG	lateral segmental nerve root glia
A-SPG	A subperineurial glia
B-SPG	B subperineurial glia
DL-SPG	dorsolateral subperineurial glia
LV-SPG	lateroventral subperineurial glia
MD-SPG	mediodorsal subperineurial glia
ML-SPG	mediolateral subperineurial glia
MV-SPG	medioventral subperineurial glia
VL-SPG	ventrolateral subperineurial glia
EG ⁵⁻⁶	exit glia (NB5-6)
dEG ¹⁻³	distal exit glia (NB1-3)
pEG ¹⁻³	proximal exit glia (NB1-3)
dPG	dorsal peripheral glia
mPG	medial peripheral glia
vPG	ventral peripheral glia
dPG ¹⁻³	distal peripheral glia (NB1-3)

pPG ¹⁻³	proximal peripheral glia (NB1-3)
dPG ²⁻⁵	distal peripheral glia (NB2-5)
pPG ²⁻⁵	proximal peripheral glia (NB2-5)
ePG11	dorsal bipolar dendritic neuron support glia
EPG12	transversal nerv peripheral glia

7.3 Namen und Abkürzungen der Gene

<i>ana</i>	<i>anachromism</i>
<i>cas</i>	<i>castor</i>
<i>cycE</i>	<i>cyclinE</i>
<i>dEAT1 und 2</i>	<i>Drosophila excitatory aminoacid transporter 1 und 2</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>fas2</i>	<i>fascilin2</i>
<i>fie</i>	<i>fire exit</i>
<i>ftz</i>	<i>fushi tarazu</i>
<i>gcm</i>	<i>glial cells missing</i>
<i>gcm2</i>	<i>glial cells missing 2</i>
<i>gr</i>	<i>grainyhead</i>
<i>gsb</i>	<i>gooseberry</i>
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
<i>hkb</i>	<i>huckebein</i>
<i>inv</i>	<i>invected</i>
<i>kr</i>	<i>kriippel</i>
<i>ldb</i>	<i>ladybird</i>
<i>lbd</i>	<i>ladybird early</i>
<i>loco</i>	<i>locomotion defects</i>
<i>mirr</i>	<i>mirror</i>
<i>msh</i>	<i>muscle segment homeobox</i>
<i>nep4</i>	<i>neprilysin4</i>
<i>nerv2</i>	<i>nervana2</i>
<i>opa</i>	<i>odd paired</i>
<i>pdm 1 und 2</i>	<i>POU-domain protein 1 und 2</i>
<i>pnt</i>	<i>pointed</i>
<i>pros</i>	<i>prospero</i>
<i>repo</i>	<i>reversed polarity</i>
<i>salm</i>	<i>spalt major</i>
<i>svp</i>	<i>seven up</i>
<i>ttk</i>	<i>tramtrack</i>
<i>tub</i>	<i>tubulin</i>
<i>vnd</i>	<i>ventral nervous system defective</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>zfh1 und 2</i>	<i>zincfinger homeodomain protein 1 und 2</i>

7.4 Integrationsorte der P-Elementlinien

Stamm	benachbarte genomische Sequenz			
201-lacZ	CTCCAGCCGG	TTCAGCCGA	ACGCCACCGA	CGTCAAACGA
	TTGCCTGAGC	CGAGCGGCCA	CGAGAGGACA	ACGAGGCTAC
209-lacZ	GAACGTTAAC	GTCGTTGTCG	GACGATTCGA	CTCGCGTCTC
	TCTAAGTTTG	TTGTTCGTGC	CAACCACCCC	CGCCGGTACC
250-lacZ	AACAAAAACC	GCTATTAAGC	TCCGTATTTT	TATGCGTCTC
	TCTTCGTACA	TTGGCCTTTG	CGGAATGGCC	AAAATAAAAT
3-66-lacZ	CGCTCCAGAG	TCGGACAGAA	GAGCACAGAG	GCTGCGCACT
	CAGTCCAATT	GGAACCCACC	CGACCATAGC	GCCCTCTCGC
3-101-lacZ	GGAGAGCCGA	TGAATGCAAT	ATTTTAGAAG	AGAACTGAAT
	AGAAGAGACT	CTCTTTTTAT	TTCCCATTCG	GTGTAGATTT
M84-lacZ	AGGACCCAGC	AATCGCAATC	ATCAGCATAA	GTAGCAACAG
	CAAAGGAGCA	GCAGCAACAA	CAGCAGCAAC	AACATCGGCA
Mz97-Gal4	CTCGGGAGAG	AGCAGCGACT	CGTCGTGGGG	TCCAATTAGA
	TTACCGGCAA	CAACATGCGC	TCCCTTTCTG	CCCAACGCAC
Mz813-Gal4	GTACAGAGGG	ATGGGATTGT	GGGGAGCTAT	TGGGGGGGGA
	GCTGATCGAG	TTGACACGCG	CACTCGAGCT	CTTCGAACGG

7.5 Liste der Defizienzen

Defizienzen 2. Chromosom sortiert nach Bloomington Stammnummer	
0090 Df(2L)C144, dpp[d-ho] ed[1]/In(2LR)Gla, Gla[1] Bc[1] Egfr[E1]	023A01-02;023C03-05
0097 Df(2L)JS32, dpp[d-ho]/ CyO, P(sevRas1.V12)FK1	023C03-05;023D01-02
0140 Df(1)w67c23, y[1]; Df(2L)Trf-C6R31/CyO	028DE (within)
0167 Df(2L)TW161, cn[1] bw[1]/CyO	038A06-B01;040A04-B01
0179 In(1)w[m4h], y[1]; Df(2L)TE29Aa-11/CyO	028E04-07;029B02-C01
0190 Df(2R)en-A/CyO	047D03;048B02
0198 w[118]; Df(2R)H3C1/CyO	043F;044D03-08
0201 w[118]; Df(2R)H3E1/CyO	044D01-04;044F12
0282 Dp(1;Y)y[+]/y[1]; Df(2R)X58-12/SM5	058D01;059A
0420 Df(2L)TW137, cn[1] bw[1]/CyO, Dp(2;2)M(2)m[+]	036C02-04;037B09-C01
0442 Df(2R)CX1, b[1] pr[1]/SM1	049C01-04;050C23-D02
0447 Df(2R)stan1, P{neoFRT}42D cn[1] sp[1]/ CyO	046D07-09;047F15-16
0490 In(1)w[m4]; Df(2L)E110/CyO	025F03-026A01;026D03-11
0543 Df(2R)017/SM1	056F05;056F015
0693 Df(2L)sc19-8/SM6b; Dp(2;1)B19, y[1], ed[1] dp[o2] cl[1]	024C02-08;025C08-09
0739 Df(2R)M41A4/SM1	041A
0749 In(2R)bw[VDe2L]Cy[R]/In(2LR)Gla, Gla[1]	041A-B;042A02-03
0750 Df(2R)Px1, al[1] dp[ov1] pwn[1]/SM5	060B08-10;060D01-02
0754 Df(2R)vg-C/ CyO, P{sevRas1.V12};FK1	049A04-13;049E07-F01
0757 y[*] w[*]/Dp(1;Y)y[+]; Df(2R)P34/CyO	055E02-04;056C01-11
0781 Df(2L)cl-h3/SM6b	025D02-04;026B02-05
1007 Df(2R)nap9/In(2LR)Gla, Dp(2;2)BG, Gla[1]	042A01-02;042E06-F01
1045 Df(2L)Mdh, cn[1]/Dp(2;2)Mdh3, cn[1]	030D-30F;031F
1145 Df(2R)en30/SM5; Dp(1;Ybb[-])B[S]	048A03-04;048C06-08
1357 Df(2L)J-H/SM5	027C02-09;028B03-04
1469 Df(2L)J39/In(2L)Cy; Dp(2;Y)cb50, Dp(1;Y)B[S]Yy[+]/C(1)RM	031C-D;032D-E
1491 Df(2L)r10, cn[1]/CyO	035D01;036A06-07
1547	

Df(2R)PC4/CyO	055A;055F
1567 Df(2L)JS17, dpp[d-ho]/CyO, P{ry[+t7.2]=en1}wg[en11]	023C01-02;023E01-02
1682 Df(2R)or-BR6, cn[1] bw[1] sp[1]/In(2LR)lt[G16L]bw[V32gR]	059D05-10;060B03-08
1702 Df(2R)X1, Mef2[X1]/CyO, Adh[nB]	046C;047A01
1743 w[1118]; Df(2R)B5, px[1] sp[1]/CyO, Adh[nB]	046A;046C
1888 Df(2R)ST1, Adh[n5] pr[1] cn[*]/CyO	042B03-05;043E15-18
2471 Df(2R)M60E/In(2LR)bw[V32g], bw[V32g]	060E02-03;060E11-12
2583 Df(2L)cact-255rv64, cact[chif64]/ CyO; ry[506]	035F-036A;036D
2604 Df(2R)Px2/SM5	060C05-06;060D09-10
2892 Df(2L)N22-14/CyO	029C01-02;030C08-09
3064 Df(2R)Pcl7B/CyO	054E08-F01;055B09
3077 Df(2L)spd, al[1] dp[ov1]/CyO	027D-E;028C
3079 Df(2L)Prl, Prl[1] nub[Prl]/CyO	032F01-03;033F01-02
3084 Df(2L)ast2/SM1	021D01-02;022B02-03
3133 Df(2L)dp-79b, dp[DA] cn[1]/In(2LR)bw[V1], ds[33k] b[1] bw[V1] !	022A02-03;022D05-E01
3138 Df(2L)b87e25/CyO	034B12-C01;035B10-C01
3157 Df(2R)ES1, b[1] pr[1] cn[1] wx[wxt] Kr[If-1]/SM1	060E06-08;060F01-02
3180 Df(2L)H20, b[1] pr[1] cn[1] sca[1]/CyO	036A08-09;036E01-02
3189 Df(2L)TW50, cn[1]/CyO, Dp(2;2)M(2)m[+]	036E04-F01;038A06-07
3344 Df(2L)prd1.7, b[1] Adh[n2] pr[1] cn[1] sca[1]/CyO, P{elav-lacZ.H}YH2	033B02-03;034A01-02
3368 Df(2R)cn9/CyO Roi[1] sp[*]	042E;044C
3467 Df(2R)AA21, c[1] px[1] sp[1]/SM1	056F09-17;057D11-12
3518 w[a] N[fa-g]; Df(2R)Jp1/CyO	051D03-08;052F05-09
3520 w[a] N[fa-g]; Df(2R)Jp8, w[+]/CyO	052F05-09;052F10-53A01
3548 Df(2L)al/In(2L)Cy, Cy[1]	021B08-C01;021C08-D01
3571 Df(2L)Dwee-delta5/Dp(?;2)bw[D], S[1] wg[Sp-1] Ms(2)M[1] bw[D]/CyO	027A;028A
3573 In(2LR)DTD16[L]DTD42[R], bw[1] sp[1]/CyO != Df(2L)23C;23E3-6	023C;023E03-06
3588 Df(2L)TE35BC-24, b[1] pr[1] pk[1] cn[1] sp[1]/CyO	035B04-06;035F01-07
3591 w[1]; Df(2R)Np5, In(2LR)w45-32n, cn[1]/CyO	044F10;045D09-E01
3638 Df(2L)net-PMF/SM6a	021A01;021B07-08
3813	

Df(2L)sc19-4/In(2L)Cy[L]t[R] In(2R)Cy, Cy[1] Roi[1] cn[2] sp[2] (or[*]); Dp(2;1)B19, y[1] ac[1] sc[1] pn[1] ed[1] dp[o2] cl[1]	025A05;025E05
3909 w[*]; Df(2R)59AD/SM1	059A01-03;059D01-04
4954 Df(2L)S2590/CyO, P{sevRas1.V12}FK1	023D02;023E3
4955 Df(2L)XE-2750/CyO, P{sevRas1.V12}FK1	028B02;028D03
4959 Df(2L)C'/CyO	040h35;040h38L
4960 Df(2R)CB21/CyO; ry[506]	048E;049A
4961 Df(2R)Kr10, b1 pr1 B11 c1/CyO	060F01;060F05
4966 w[1]; Df(2R)w45-30n cn[1]/CyO	045A06-07;045E02-03
5246 Df(2R)Egfr5, b[1] pr[1] cn[1] sca[1]/CyO, P{sevRas1.V12}FK1057	D02-08;058D01
5330 Df(2L)ed1/CyO; P{ftz/lacC}1	024A02;024D04
5574 y[1] w[67c23]; Df(2R)k10408, P{lacW}BEST:GM02553[k10408]/CyO	054C01-04;054C01-04 (?)
5680 Df(2R)robl-c/CyO, y[+]	054B17-C04;054C01-04
5869 Df(2L)FCK-20, dp[ov1] bw[1]/T(2;3)SM6a-TM6B	032D01;032F01-03
5879 Df(2R)BSC3, w[+mC] unch[k15501] cn[1] bw[1] sp[1]/SM6a, bw[k1]	048E12-F04;049A11-B06
6283 Df(2L)BSC4, w[+mC], net[1] cn[1]/SM5	021B07-C01;021C02-03
6299 Df(2L)BSC5, w[+mC]/SM6a	026B01-02;026D01-02
6338 Df(2L)BSC6, dp[ov1] cn[1]/SM6a	026D03-E01;026F04-07
6374 w[1118]; Df(2L)BSC7/CyO	026D10-E01;027C01
6404 y[1]; Df(2R)P803-delta15, cn[1]/ SM1; sv[spa-pol]	053E;053F11
6455 Df(2R)BSC11/SM6a	050E06-F01;051E02-04
6478 Df(2R)BSC17/SM6a	030C03-05;030F01
6502 Df(2L)tim-O2/CyO	023F02-03;023F06-024A01
6507 y[1] w[*]; Df(2L)drm-P2, P{lacW}Pdsw[k10101]/SM6b	023F03-04;024A01-02
6516 Df(2R)BSC18/SM6a	050D01;050D02-07
6608 Df(2L)BSC16, net[1] cn[1]/SM6a	021C03-04;021C06-08
6609 Df(2R)BSC19, cn[1] bw[1]/SM6a	056F12-14;057A04
6647 Df(2R)BSC22/SM6a	056D07-E03;056F09-12
6648 Df(2L)dpp[d14]/In(2LR)Gla, wg[Gla-1]	022E04-F02;022F03-023A01
6779 y[1] w[67c23]; Df(2R)14H10Y-53/SM6a	054D01-02;054E05-07

6780 y[1] w[67c23]; Df(2R)14H10W-35/SM6a	054E05-07;055B05-07
6866 Df(2R)BSC26/CyO	056C04;056D06-10
6875 Df(2L)BSC28/SM6a, bw[k1]	023C05-D01;023E02
6916 w[1118]; Df(2R)ED1, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.Rs5+3.3'}ED1/SM6a	053E10;053F09
6917 Df(2R)BSC29, cn[1] bw[1] sp[1]/CyO	045D03-04;045F02-06
6965 Df(2L)BSC31, net[1] cn[1]/CyO, b[81f2] rk[81f2]	023E05;023F04-05
7142 Df(2L)BSC32/SM6a, bw[k1]	032A01-02;032C05-D01
7143 Df(2L)BSC36/SM6a, bw[k1]	032D01;032D04-E01
7144 Df(2L)BSC37/CyO	022D02-03;022F01-02
7145 Df(2R)BSC39, cn[1] bw[1]/SM6a, bw[k1]	048C05-D01;048D05-E01
7146 Df(2R)BSC40/SM6a	048E01-02;048E02-10
7147 Df(2L)BSC41, dp[ov1] cn[1]/CyO	028A04-B01;028D03-09
7273 Df(2R)vir130/CyO	059B;059D08-E01
7414 Df(2R)BSC44/SM6a	054B01-02;054B07-10

Versicherung gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung

1. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfemittel (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

(Ruth Beckervordersandforth)

Juni 1997

Abitur am Gymnasium Velbert-Langenberg

Publikationen

Beckervordersandforth, R., Rickert, C., Altenhein, B., and Technau, G. M.:

Glial subtypes, marker gene expression, and cell lineage in the late embryonic ventral nerve cord of *Drosophila* (in Vorbereitung)

von Hilchen, C., Beckervordersandforth, R., Rickert, C., Technau, G., and Altenhein, B.:

„Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo“ (in Vorbereitung)