



Genetische Mechanismen der dorsoventralen Musterbildung im embryonalen Gehirn von *Drosophila*

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie
an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von
Janina Seibert

geboren am 19.11.1976
in Rüsselsheim

Mainz, Juni 2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die embryonale Neurogenese des ventralen Nervensystems von <i>Drosophila</i>	2
1.2 Die embryonale Neurogenese im Gehirn von <i>Drosophila</i>	6
1.3 Ziel dieser Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Fliegenzucht	13
2.2 Herstellung von Apfelagarröhrchen für Eiablagen	13
2.3 Eiablagen	13
2.4 Fliegenstämme	13
2.5 Genetische Kreuzungen	15
2.5.1 Balancieren letaler Mutationen	15
2.6 Das UAS/Gal4-System	15
2.7 Molekularbiologische Methoden	17
2.7.1 Herstellung von RNA-Sonden	17
2.7.2 Verwendete RNA-Sonden	17
2.8 Fixierung der Embryonen für Antikörperfärbung und <i>in-Situ</i> Hybridisierung	18
2.9 Immunohistochemie	18
2.9.1 Verwendete Antikörper	18
2.9.2 Inkubation mit primären Antikörpern	19
2.9.3 Inkubation mit sekundären Antikörpern	19
2.9.4 Signaldetektion über alkalische Phosphatase	20
2.9.5 Signaldetektion über Biotin (DAB)	20
2.9.6 TSA Biotin System	21
2.10 <i>in-Situ</i> Hybridisierung (ISH)	22
2.10.1 Einfache ISH	22
2.10.2 Doppel-ISH	23
2.10.3 ISH oder Doppel-ISH mit anschließender Antikörperfärbung	23
2.11 Präparation der Embryonen	24
2.12 Auswertung und Dokumentation	26

2.12.1	Auswertung von MAPK-Expression im Wildtyp in Bezug zu den DV-Genen	26
2.13	Chemikalien und Lösungen	27
2.14	Gebrauchsmaterialien	29
2.15	Geräte	29
2.16	Software	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Unterschiede in der räumlich-zeitlichen Expression der DV-Gene <i>vnd</i> , <i>ind</i> und <i>msh</i> im NE des VNS und der Gehirnanlage	31
3.2	Dorsoventrale Regionalisierung der frühen Gehirnanlage durch Expression von <i>Nkx6</i> und den DV-Genen <i>vnd</i> , <i>ind</i> und <i>msh</i>	34
3.3	Gegenseitige Repression zwischen <i>Nkx6</i> und <i>Msh</i> sorgt für die Stabilisierung der Grenze zwischen intermediärem und dorsalem NE in TC und DC	35
3.4	<i>Msh</i> und <i>Ind</i> interagieren als gegenseitige Repressoren an der intermediär/dorsalen Grenze in TC und DC	37
3.4.1	<i>Msh</i> stabilisiert die dorsale Grenze der <i>ind</i> -Expression im NE des VNS	42
3.5	Für die Aktivierung der <i>Nkx6</i> -Expression in TC und DC ist <i>Vnd</i> erforderlich ...	43
3.5.1	<i>Nkx6</i> reprimiert <i>ind</i> -Expression in intermediären NB des VNS	43
3.5	<i>Vnd</i> ermöglicht die Aktivierung von <i>Nkx6</i> in TC und DC durch Repression von <i>msh</i>	44
3.6	<i>Vnd</i> reprimiert <i>msh</i> im intermediären DC und ermöglicht somit die Aktivierung der <i>ind</i> -Expression	45
3.7	<i>Msh</i> und <i>Ind</i> besitzen die Kompetenz, <i>vnd</i> -Expression in der frühen Gehirnanlage zu reprimieren	49
3.8	Das cephalo Lückengen <i>empty spiracles</i> ist erforderlich, um die Expression von <i>Nkx6</i> , <i>ind</i> und <i>msh</i> in TC und DC zu aktivieren	51
3.9	<i>ems</i> -Expression im intermediären DC wird durch einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus zwischen <i>Ems</i> und <i>Nkx6/Ind</i> reguliert	53
3.10	<i>Vnd</i> und <i>Ems</i> agieren im frühen NE des TC und DC als gegenseitige Repressoren	55
3.12	<i>Nkx6</i> -Expression im PC ist abhängig von <i>Ems</i> , jedoch nicht von <i>Vnd</i>	57
3.13	<i>Engrailed</i> reprimiert <i>msh</i> im posterioren TC und DC	59
3.14	<i>En</i> reprimiert <i>ind</i> im posterioren DC, ist jedoch ebenfalls für die	

Aktivierung der <i>ind</i> -Expression im dorso-posterioren TC erforderlich	62
3.15 En hält die Expression von <i>Vnd</i> im posterioren DC aufrecht	63
3.15 Im intermediären NE des VNS hält En die <i>ind</i> -Expression aufrecht und wirkt gleichzeitig negativ auf <i>msh</i> -Expression	65
3.16 EGFR ist an der DV-Regionalisierung des NE in der frühen Gehirnanlage beteiligt	67
3.17 EGFR ist notwendig für die Aufrechterhaltung der <i>vnd</i> -Expression im NE des TC und DC, sowie in einem Anteil des PC	69
3.18 EGFR ist notwendig für die Aufrechterhaltung der <i>Nkx6</i> -Expression im intermediären TC und DC	72
3.19 EGFR ist vermutlich nur ein indirekter, negativer der <i>msh</i> -Expression im NE der frühen Gehirnanlage	74
3.20 EGFR ist für die Aktivierung der <i>ind</i> -Expression in TC, DC und PC erforderlich	75
4 Diskussion	81
4.1 Unterschiede in der Expressionsdynamik bedingen eine segment-spezifische Regulation der DV-Gene <i>vnd</i> , <i>ind</i> und <i>msh</i> im NE von Gehirnanlage und VNS	81
4.2 <i>Nkx6</i> fungiert in der frühen Gehirnanlage als DV-Musterbildungsgen und interagiert durch wechselseitige Repression mit <i>msh</i>	82
4.3 Gegenseitige Repression zwischen DV-Genprodukten ist notwendig, um Grenzen zwischen den DV-Expressionsdomänen in der Gehirnanlage festzulegen und zu stabilisieren	83
4.4 Wechselseitige Repression zwischen dem cephalen Lückengen <i>ems</i> und dem DV-Gen <i>vnd</i> sorgen für eine vorläufige dorsoventrale Unterteilung von TC und DC	86
4.5 Integration von DV- und AP-Signalen legt die NE-Domänen von <i>Nkx6</i> -, <i>ind</i> - und <i>msh</i> -Expression in TC und DC fest	88
4.6 <i>Engrailed</i> reguliert Aspekte der räumlich begrenzten Expression der DV-Gene <i>vnd</i> , <i>ind</i> und <i>msh</i>	89
4.7 EGFR-Aktivität ist notwendig für die Expression der DV-Gene <i>vnd</i> , <i>Nkx6</i> und <i>ind</i> in spezifischen Anteilen des pNE, reguliert die Expression von <i>msh</i> jedoch nur indirekt	91

4.8	Das genregulatorische Netzwerk der DV-Musterbildung in TC und DC setzt sich im Wesentlichen aus transkriptionellen Repressoren zusammen	95
4.9	Evolutionäre Betrachtungen zur DV-Musterbildung im Gehirn von <i>Drosophila</i> und Vertebraten	96
5	Zusammenfassung	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Anhang	109
7.1	Abbildungen	109
7.2	Abbildungsverzeichnis	112
7.3	Tabellenverzeichnis	114
7.4	Lebenslauf	114
7.5	Eidesstattliche Erklärung	116
7.6	Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

a	anterior
A1-A8	abdominale Segmente 1-8
Abb.	Abbildung
AN	Antennensegment
AP	anteroposterior
AP-Färbung	alkalische Phosphatase-Färbung
as/en-as	antennaler <i>engrailed</i> -Streifen
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project
BMP	Bone morphogenetic growth factor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C1-C3	prägnathale Segmente 1-3
CF	cephalic Furrow (cephale Furche)
CO ₂	Kohlendioxid
d	dorsal
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Deutocerebrum
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpp	Decapentaplegic
DSHB	Develeopmental Studies Hybridoma Bank
DV	dorsoventral
EB	Epidermoblast
<i>EGFR/EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor
<i>ems/Ems</i>	empty spiracles
<i>en/En</i>	engrailed
et al.	und andere
EST	expressed sequence tag

FG	foregut (Vorderdarmanlage)
Fitc	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
g	Gramm
Gal	Galaktosidase
GHS	Gehirnhemisphäre
GMZ	Ganglienmutterzelle
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hs	<i>engrailed</i> head spot
HS	Hemisegment
i	intermediär
IN	Interkalarsegment
<i>ind/Ind</i>	intermediate neuroblasts defective
Inv	Invected
<i>is/en-is</i>	interkalarer <i>engrailed</i> -Streifen
ISH	<i>in-Situ</i> Hybridisierung
LA	Labialsegment
LR	Labralsegment
M	Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD	Mandibularsegment
mds	mandibularer <i>engrailed</i> -Streifen
mg	Milligramm
Min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
ML	Mittellinie
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
<i>msh/Msh</i>	muscle segment homeobox
MX	Maxillarsegment
n	Anzahl
NB	Neuroblast
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid

NE	Neuroektoderm
<i>Nkx6/Nkx6</i>	Nk6 homeobox
OC	Okularsegment
p	posterior
PC	Protocerebrum
pNE	procephales Neuroektoderm
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S1-S5	Segregationswelle 1-5
<i>sca</i>	scabrous
ssDNA	salmon sperm DNA
sSpi	sekretiertes Spitz
St.	Stadium
Std.	Stunde
T1-T3	thorakale Segmente 1-3
Tab.	Tabelle
TC	Tritocerebrum
u. a.	unter anderem
UAS	Upstream Activating Sequence
Wt	Wildtyp
v	ventral
<i>vnd/Vnd</i>	ventral nervous system defective
vNR	ventrale neurogene Region
VNS	ventrales Nervensystem
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Natur ist konservativ und nutzt erfolgreiche Konzepte, verbunden mit sich entsprechenden Genen, in allen Organismen einschließlich des Menschen. Daher ist es möglich, einen vergleichsweise einfachen Organismus wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modell zu nutzen, um Gene und molekulare Mechanismen zu identifizieren, die in modifizierter Form in nahezu allen höheren Organismen von funktionaler Bedeutung sind (Arendt und Nübler-Jung, 1999). *Drosophila* wurde bereits kurz nach Beginn des 20. Jahrhunderts (1908) von dem Amerikaner T. H. Morgan als Modellorganismus für die genetische Forschung eingeführt. Dieser Organismus verfügt über nur vier Chromosomenpaare und somit über ein relativ kleines Genom (ca. 20 000 Gene) dessen Entschlüsselung im Jahr 2000 veröffentlicht wurde (Adams et al., 2000). Für Untersuchungen im *Drosophila*-Embryo stehen eine Reihe molekulargenetischer, mikromanipulativer und analytischer Techniken, sowie eine Vielzahl an *Drosophila*-spezifischen Antikörpern und mRNA-Sonden zur Verfügung. Zudem ist es vergleichsweise einfach, in vitro rekombinierte DNA in die Keimbahn der Fliege einzuschleusen und transgene Organismen herzustellen. So lässt sich anhand einer künstlich erzeugten mutanten Situation (z. B. Überexpression oder eliminieren eines bzw. mehrerer Gene) die Funktion und Wirkungsweise von Genen und ihren Produkten studieren. Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die einfache Zucht der Tiere und ihren kurzen Generationszyklus.

Die Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS), welches aus ventralem Nervensystem (VNS; *Drosophila*) bzw. Rückenmark (Vertebraten) und Gehirn gebildet wird, beinhaltet in Vertebraten und Invertebraten die Umwandlung einer zweidimensionalen Schicht neuroektodermaler Zellen in eine komplexe dreidimensionale Struktur, die sich aus einer Vielzahl verschiedener neuraler Zelltypen zusammensetzt. Die Spezifizierung dieser neuralen Zelltypen ist in frühen Stadien der Embryogenese ein mehrstufiger Prozess, welcher entscheidend von der Vermittlung positioneller Informationen innerhalb des Neuroektoderms (NE) an multipotente neurale Stammzellen abhängt. Die diesen Vorgängen zugrunde liegenden molekulargenetischen Mechanismen wurden ausführlich im embryonalen VNS untersucht (zusammengefasst in Dessaud et al., 2008; Skeath und Thor, 2003), sind im Bezug auf die Gehirnentwicklung hingegen noch weitestgehend unverstanden .

1.1 Die embryonale Neurogenese des ventralen Nervensystems von

Drosophila

In *Drosophila* wird das VNS aus segmental angeordneten, neuronalen Stammzellen generiert, den sogenannten Neuroblasten (NB), welche aus dem NE des Rumpfes (ventrale neurogene Region; vNR) delaminieren (Abb. 1-1). Die Identität eines NB wird durch eine Kombination an positionellen Informationen in dem korrespondierenden NE festgelegt, welche wiederum von den Produkten früher Musterbildungsgene bereitgestellt werden, die entlang der anteroposterioren (AP) und dorsoventralen (DV) Achse wirken (zusammengefasst in Skeath und Thor, 2003). Die gradientenförmigen Aktivitäten des kernständig lokalisierten Faktors Dorsal, und der BMP/Dpp- und „Epidermal growth factor receptor“ (EGFR)- Signalwege legen die DV-Grenzen innerhalb des NE fest (Abb. 1-2 A) und regulieren ferner die Expression einer Gruppe evolutionär konservierter DV-Musterbildungsgene (Hong et al., 2008; Mizutani et al., 2006; Skeath, 1998; von Ohlen und Doe, 2000). Durch die Expression der sogenannten „DV-Gene“ wird das NE des VNS entlang der DV-Achse in drei longitudinale Spalten unterteilt: *ventral nervous system defective (vnd)* wird in der ventralen, *intermediate neuroblasts defective (ind)* in der intermediären und *muscle segment homeobox (msh; Drop – FlyBase)* in der dorsalen NE-Spalte exprimiert (Abb. 1-2 B) (Buescher und Chia, 1997; Chu et al., 1998; D’Alessio und Frasch, 1996; Isshiki et al., 1997; Jiménez et al., 1995; Mellerick und Nirenberg, 1995; Weiss et al., 1998). Diese Homöoboxgene interagieren in einer hierarchischen Kaskade transkriptioneller Repression, welche notwendig zum Aufbau und der Aufrechterhaltung der scharfen Grenzen zwischen ihren jeweiligen Expressionsdomänen ist. Demzufolge reprimiert Vnd *ind* (und *msh*) im ventralen NE und Ind reprimiert *msh* im intermediären NE (Cowden und Levine, 2003). Zudem kontrollieren *vnd*, *ind* und *Egfr* die Entstehung von NB, wohingegen sowohl DV-Gene als auch die entlang der AP-Achse exprimierten Segmentpolaritätsgene für zentrale Regulatoren der NB-Spezifizierung codieren; für *msh* konnte bisher jedoch keine Beteiligung an der Entstehung von NB nachgewiesen werden (z.B. Bhat und Schedl, 1997; Buescher et al., 2006; Chu et al., 1998; Chu-LaGraff und Doe, 1993; Desphande et al., 2001; Jiménez und Campos-Ortega, 1990; McDonald und Doe, 1997; McDonald et al., 1998; Shao et al., 2002; Skeath et al., 1994; Skeath et al., 1995).

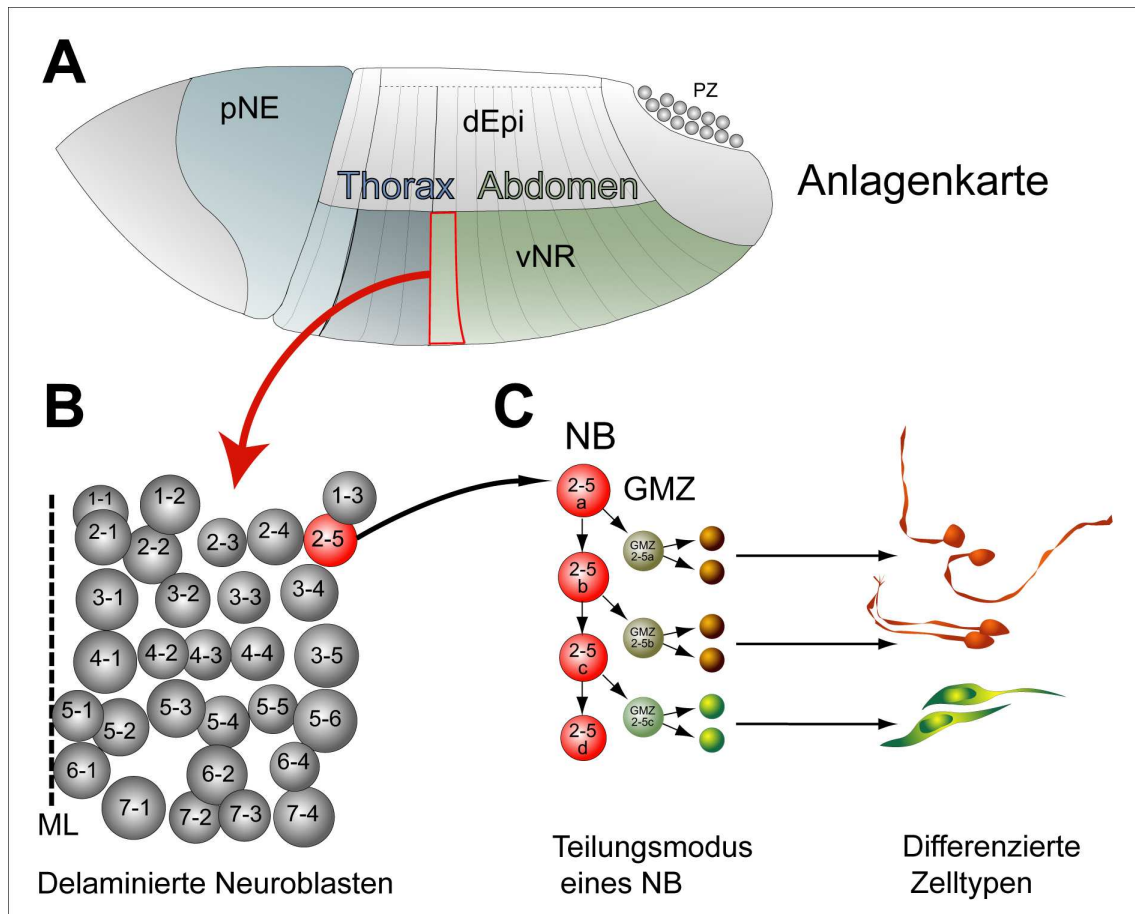


Abb. 1-1: Anlagenskarte eines *Drosophila*-Embryos und Entstehung individueller Zellstammbäume aus NB des VNS

(A) Anlagenskarte eines *Drosophila*-Embryos im frühen Gastrulastadium, anterior ist links. Aus der ventralen neurogenen Region (vNR) geht im Laufe der Entwicklung das ventrale Nervensystem (VNS) hervor und aus dem procephalen Neuroektoderm (pNE) bildet sich das Gehirn. (B) Pro Hemisegment delaminieren etwa 30 Neuroblasten (NB) in einem zeitlich und räumlich stereotypen Muster aus der vNR ins Innere des Embryos. Die Benennung der NB erfolgt anhand ihrer Lage innerhalb eines kartesischen Koordinatensystems, wobei die erste Zahl die Position des NB in DV- und die zweite Zahl seine Position in AP-Achse beschreibt. (C) Entstehung eines charakteristischen Zellstammbaums exemplarisch an NB2-5 dargestellt. Der NB teilt sich im Stammzellmodus und generiert dabei erneut einen NB sowie eine Gangliemutterzelle (GMZ), aus der nach einer symmetrischen Teilung zwei postmitotische Zellen hervorgehen, welche sich im Folgenden zu Neuronen (orange) und/oder Gliazellen (grün) differenzieren. ML = ventrale Mittellinie, dEpi = dorsale Epidermis, PZ = Polzellen. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von C. Berger)

Zunächst besitzen alle Zellen des NE das Potential sich zu einem neuronalen oder epidermalen Vorläufer zu entwickeln, jedoch delaminieren nur etwa 25% der neuroektodermalen Zellen als NB in den Embryo hinein (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984). Das Auswählen von NB aus den neuroektodermalen Zellen wird durch die Aktivität sogenannter proneuraler und neurogener Gene erreicht. Die Gene des *achaete/scute*-Komplexes besitzen proneurale Funktion und sind notwendig, um Gruppen von äquivalenten Zellen (sogenannte proneurale Cluster) die Kompetenz für

den neuralen Entwicklungsweg zu vermitteln (Abb. 1-2 C). Die Position und Größe dieser proneuralen Cluster wird durch die gemeinsamen Aktivitäten von DV- und Paarregel-Genen festgelegt (Skeath und Carroll, 1992; Skeath et al., 1994; Skeath und Thor, 2003). Durch einen von den neurogenen Genen vermittelten Prozess, die laterale Inhibition, wird erreicht, dass nur eine Zelle aus jedem proneuralen Cluster als NB delaminiert (Abb. 1-2 C). Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Vorgang: alle Zellen innerhalb eines proneuralen Clusters exprimieren den Transmembranrezeptor Notch sowie dessen spezifischen Liganden Delta gleichermaßen, bis eine der Zellen, durch einen bisher nicht geklärten Prozess, die Delta-Expression erhöht. Mittels Zell-Zell-Interaktion führt dies in den Nachbarzellen zu einer verstärkten Aktivierung des Notch-Rezeptors, wodurch wiederum die Expression proneuraler Gene reprimiert wird und die entsprechenden Zellen entwickeln sich zu Epidermoblasten. Somit hindert eine der Zellen innerhalb des proneuralen Clusters mittels verstärkter Delta-Expression ihre Nachbarn daran, ebenfalls als NB zu delaminieren (zusammengefasst in Skeath und Carroll, 1994; Pi und Chien, 2007).

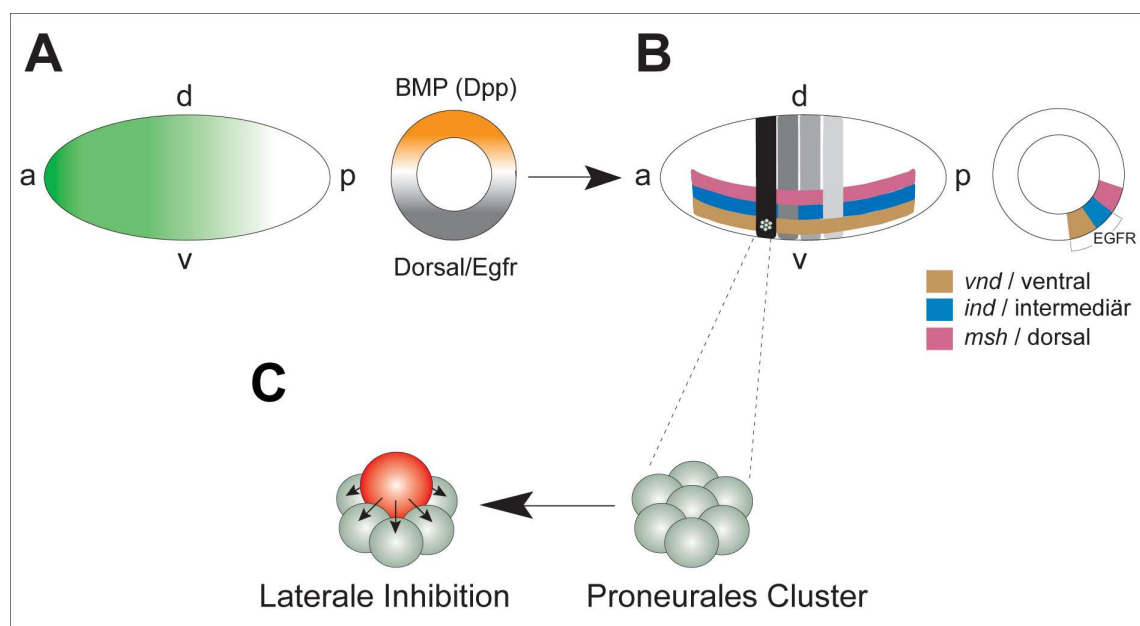


Abb. 1-2: Erste Schritte der embryonalen Neurogenese des VNS von *Drosophila*

(A) Überlagerung der gradientenförmigen Aktivitäten spezifischer Musterbildungsgene (grün, orange, grau) entlang der AP- und DV-Achse im frühen Embryo führt zur (B) Expression von Segmentpolaritäts- (schwarz, grau) und DV-Genen (braun, blau, magenta) in diskreten Domänen, welche das NE schachbrettartig unterteilen. Im Folgenden sorgt dies dafür, dass jede neurale Äquivalenzgruppe (weiße Punkte) eine individuelle Kombination an Regulatorgenen exprimiert. (C) Die gleichförmige Expression proneuraler Gene innerhalb einer neuralen Äquivalenzgruppe (proneurales Cluster) vermittelt diesen Zellen die Kompetenz für den neuralen Entwicklungsweg. Durch den Prozess der lateralen Inhibition wird letztendlich jedoch nur eine der Zellen des proneuralen Clusters zum NB (rot), welcher die Nachbarzellen (grau)

daran hindert, das gleiche Schicksal einzuschlagen (für Details siehe Text). a = anterior, d = dorsal, p = posterior, v = ventral. (Abb. modifiziert nach Skeath und Thor, 2003)

Morphologisch besteht das VNS von *Drosophila* aus 14 Segmenten, die von anterior nach posterior in drei gnathale (C1-C3), drei thorakale (T1-T3) und acht abdominale (A1-A8) Segmente unterteilt werden, wobei die neuralen Anteile der Segmente auch als Neuromere bezeichnet werden. Pro Hemineuromer (Hälfte eines Neuromers) delaminieren ca. 30 NB in fünf aufeinanderfolgenden Segregationswellen (S1-S5) aus dem NE (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Doe, 1992; Skeath et al., 1995; Bossing et al., 1996), wobei jeder NB durch seine typische Position, den Delaminationszeitpunkt und eine spezifische Kombination an exprimierten Genen charakterisiert ist (Abb. 1-1 B und Abb. 1-3). Im weiteren Verlauf der Embryogenese absolviert ein NB eine Reihe asymmetrischer Teilungen (Stammzellmodus) und generiert dabei jedes Mal wieder einen NB sowie eine kleinere Ganglienmutterzelle (GMZ) (Abb. 1-1 C). Aus jeder GMZ gehen durch einmalige symmetrische Teilung zwei postmitotische Zellen hervor, die sich anschließend zu Neuronen und/oder Gliazellen differenzieren (Abb. 1-1 C) (Hartenstein et al., 1987).

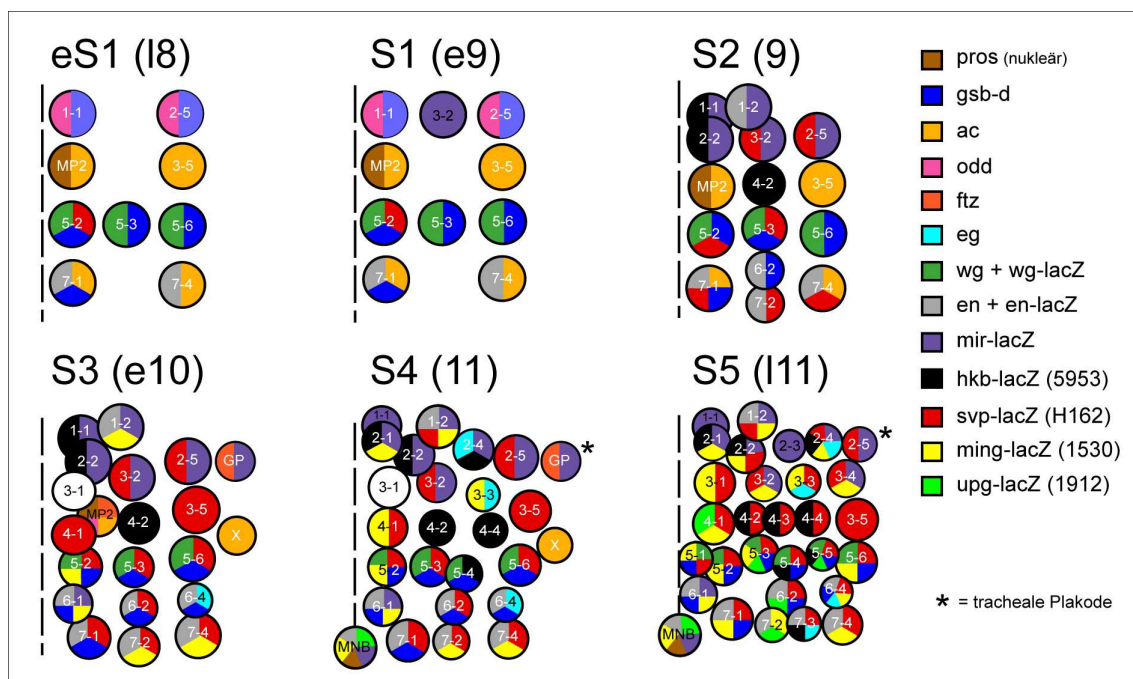


Abb. 1-3: Segregationswellen und NB-Markerepression im VNS

Jeder der 30 NB, welche pro Hemisegment aus der vNR delaminieren, ist individuell durch seinen Delaminationszeitpunkt (innerhalb der Segregationswellen S1-S5), seine Position innerhalb des Hemisegments und der kombinatorischen Expression spezifischer Markergene charakterisiert (deren Farbcode auf der rechten Seite angegeben ist). Dargestellt ist jeweils ein Hemisegment und eine gestrichelte schwarze Linie kennzeichnet die ventrale Mittellinie; anterior ist oben. (Abb. nach Doe, 1992; Broadus und Doe, 1995)

Somit wird im NE durch Überlagerung von AP- und DV-Genaktivitäten ein kartesisches Koordinatensystem positioneller Informationen errichtet, welches spezifische Identitäten auf neuroektodermale Äquivalenzgruppen (proneurale Cluster) überträgt, aus denen jeweils ein NB hervorgeht (zusammengefasst in Skeath, 1999) dessen Individualität sich letztendlich in der Entstehung eines spezifischen Zellstammbaums widerspiegelt (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997).

1.2 Die embryonale Neurogenese im Gehirn von *Drosophila*

Im Vergleich zum VNS sind die genetischen Mechanismen welche die Musterbildung in der Gehirnanlage von *Drosophila* kontrollieren weitaus weniger verstanden und auch die exakte segmentale Organisation des Gehirns ist noch immer umstritten (z.B. Schmidt-Ott et al., 1994; Hirth et al., 1995; Haas et al., 2001b). Expressionsanalysen der Segmentpolaritäts-Gene *engrailed* (*en*) und *wingless* (*wg*) sprechen allerdings für die Existenz von vier prägnathalen Segmenten: dem interkalaren, antennalen, okularen und labralen Segment (Schmidt-Ott und Technau, 1992; Schmidt-Ott et al., 1994), welchen jeweils auch ein entsprechendes Neuromer zugeordnet werden konnte (Urbach und Technau, 2003a). Somit können das procephale Neuroektoderm (pNE) (Abb. 1-1 A) und die hieraus hervorgehende Population an Gehirn-NB von anterior nach posterior in Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC) unterteilt werden, welche sich jeweils aus dem okular/labralen, antennalen und interkalaren Segment ableiten lassen (Abb. 1-4 A, B) (Urbach und Technau, 2003a).

Zudem wurden für das adulte Gehirn von *Drosophila* (und anderer Insekten) hochkomplexe Neuropil-Strukturen beschrieben, die keine Entsprechung im vergleichsweise einfacher organisierten VNS finden. Dabei handelt es sich beispielsweise um die Antennalloben, Pilzkörper oder den Zentralkomplex (Abb. 1-4 C), welche u.a. für olfaktorisches Lernen, sowie für Gedächtnisleistung und zur Kontrolle des Bewegungsapparats benötigt werden (z. B. Hanesch et al., 1989; Heisenberg, 1998; Strausfeld et al., 2009).

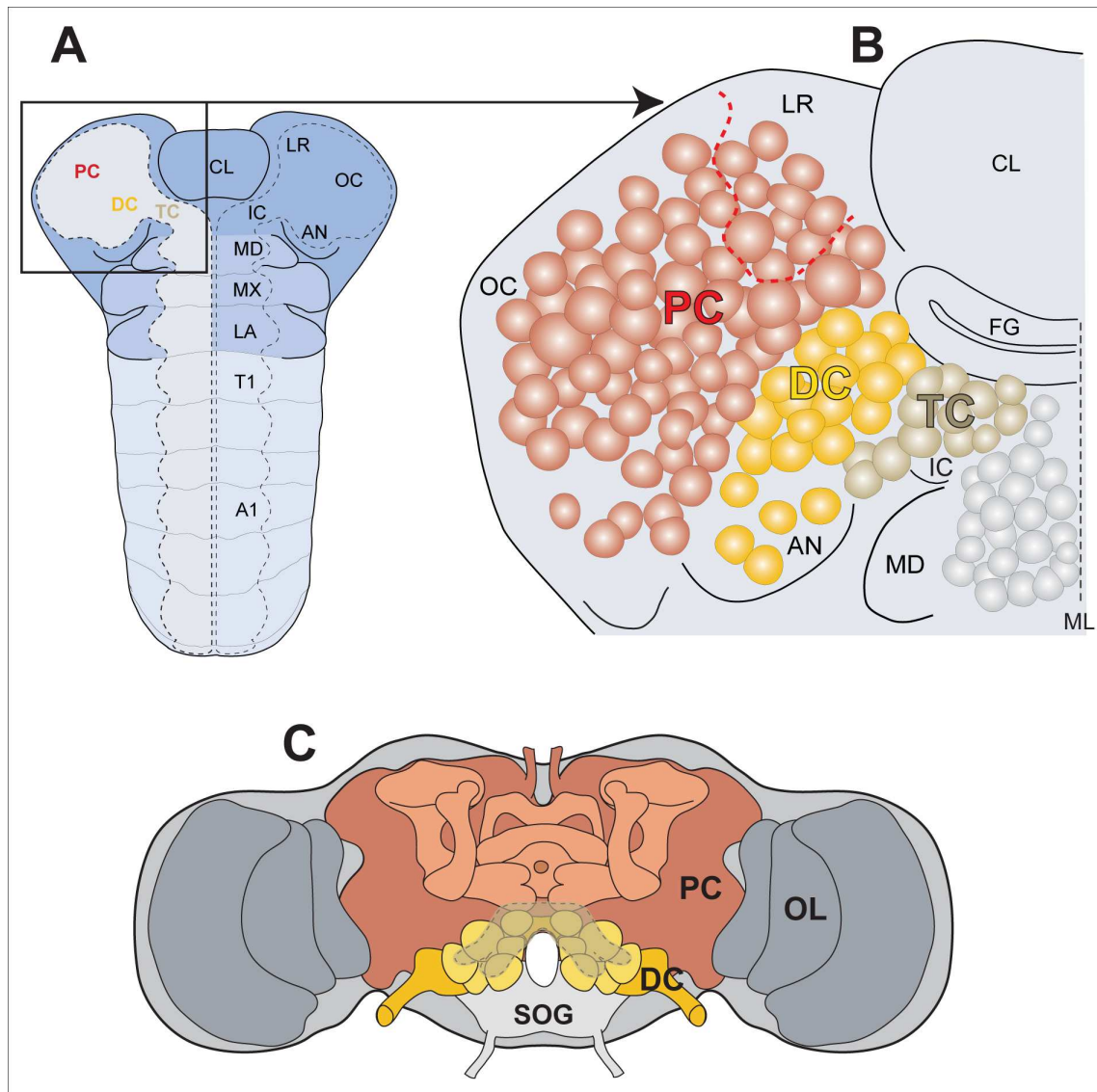


Abb. 1-4: Organisation des embryonalen und adulten Gehirns von *Drosophila*

(A) Schematische Darstellung der Filetpräparation eines Embryos im Stadium (St.) 11, anterior ist oben. Die prägnathalen Segmente (rechte Hemisphäre: IC, AN, OC, LR) sind dunkelblau und die zugehörigen Neuromere (linke Hemisphäre: TC, DC, PC) in grau unterlegt. Zudem sind die gnathalen (blau), sowie die thorakalen und ein Teil der abdominalen Segmente (hellblau) zu sehen. (B) Detaillierte Schemazeichnung der linken Gehirnhemisphäre des Embryos in A, inklusive der Unterteilung des pNE in Tritocerebrum (TC; grau-grün), Deutocerebrum (DC, gelb) und Protocerebrum (PC, rot-braun), sowie eine Andeutung der aus dem jeweiligen Neuomer hervorgehenden NB. (C) Schematische Frontalansicht der adulten Gehirnstrukturen welche aus TC (grau-grün), DC (gelb) und PC (rot) hervorgehen; die dem PC zugehörigen Pilzkörper und der Zentralkomplex sind in hellrot unterlegt, die aus dem DC entstehenden Antennalloben in hellgelb (für Details siehe Strausfeld, 1976). IC = interkalares Segment, AN = antennales Segment, OC = okulares Segment, LR = labrales Segment, MD = Mandibularsegment, MX = Maxillarsegment, LA = Labialsegment, ML = ventrale Mittellinie, T1 = erstes thorakales Segment, A1 = erstes abdominales Segment, CL = Clypeolabrum, FG = Vorderdarmanlage („foregut“), OL = optischer Lobus, SOG = suboesophagiales Ganglion. (Abb. modifiziert nach Urbach und Technau, 2004)

Auch über die genetischen Mechanismen der AP- und DV-Regionalisierung im sich entwickelnden Gehirn ist, im Vergleich zum VNS, nicht viel bekannt. Es konnte indes

gezeigt werden, dass sowohl die Expression der DV-Gene (*vnd*, *ind*, *msh*) als auch die der AP-Musterbildungsgene (wie z. B. die cephalen Lückengene oder Segmentpolaritätsgene) segment-spezifische Unterschiede im pNE und den hieraus hervorgehenden Gehirn-NB aufweisen (Urbach und Technau, 2003a/b; Urbach et al., 2006). Des Weiteren stellte sich heraus, dass *vnd* die Expression von *msh* und *ind* im Gehirn auf segment-spezifische Weise kontrolliert und dieses wiederum weitestgehend in anderer Weise erfolgt als für das VNS bekannt, und dass *vnd* sowohl für die korrekte Entwicklung des ventralen pNE, sowie für die Bildung und Spezifizierung der Identität der hieraus entstehenden Gehirn-NB benötigt wird. Diese Experimente ließen vermuten, dass die Funktion von *vnd/Nkx2* während der Gehirnentwicklung starke Parallelen zwischen Vertebraten und *Drosophila* aufweist (Urbach et al., 2006). Im Unterschied zu NB des VNS, wird jedoch in mehr als der Hälfte der identifizierten Gehirn-NB keines der drei bekannten DV-Gene exprimiert, was auf die Beteiligung weiterer Faktoren an der DV-Organisation des pNE hinweist.

Die genetische Regulation der NB-Entstehung wird wie im VNS durch die Expression proneuraler und neurogener Gene vermittelt. Die Größe der proneuralen Cluster im pNE ist jedoch variabel und die Domänen welche die Gene des *achaete/scute*-Komplexes exprimieren sind generell größer als im VNS und auch nicht segmental angeordnet (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003). Paarregel-Gene, welche gemeinsam mit den DV-Genen die Expression proneuraler Gene im VNS steuern (Skeath und Carroll, 1992), werden im pNE nicht exprimiert (Jürgens und Hartenstein, 1993). Stattdessen wird vermutet, dass die cephalen Lücken-Gene diese Aufgabe übernehmen und die Gene des *achaete/scute*-Komplexes im pNE aktivieren (Younossi-Hartenstein et al., 1997). Zudem würde die ausgedehnte Expression der Lücken-Gene (Urbach und Technau, 2003b; Younossi-Hartenstein et al., 1997) eine mögliche Erklärung für die Größe der meisten proneuralen Expressionsdomänen liefern.

Der Prozess der lateralen Inhibition spielt auch im pNE eine wichtige Rolle bei der Entscheidung, welche Zellen aus den proneuralen Expressionsdomänen zu NB und welche zu Epidermoblasten werden. Im Unterschied zu der Situation im VNS konnte jedoch gezeigt werden, dass aus einer zentralen Region des pNE (Domäne B; siehe auch Abb. 1-5) benachbarte Zellen aus demselben „proneuralen Cluster“ zu NB werden, was möglicherweise auf eine weniger effiziente oder gänzlich fehlende laterale Inhibition in dieser NE-Region zurückzuführen ist (Urbach et al., 2003). Die Formation von Gehirn-

NB erfolgt nach einem räumlich und zeitlich stereotypen Muster; jedoch im Gegensatz zum VNS, in welchem Gruppen von NB in aufeinanderfolgenden Wellen segregieren (Abb. 1-3), läuft die Entstehung neuer NB während der Entwicklung der Gehirnanlage kontinuierlich ab (Urbach et al., 2003). Zudem konnten im pNE unterschiedliche Arten der NB-Entstehung beobachtet werden, welche mit der jeweiligen mitotischen Domäne (Foe, 1989) in Zusammenhang stehen, aus welcher sie delaminieren (Abb. 1-5) (Urbach und Technau, 2003b).

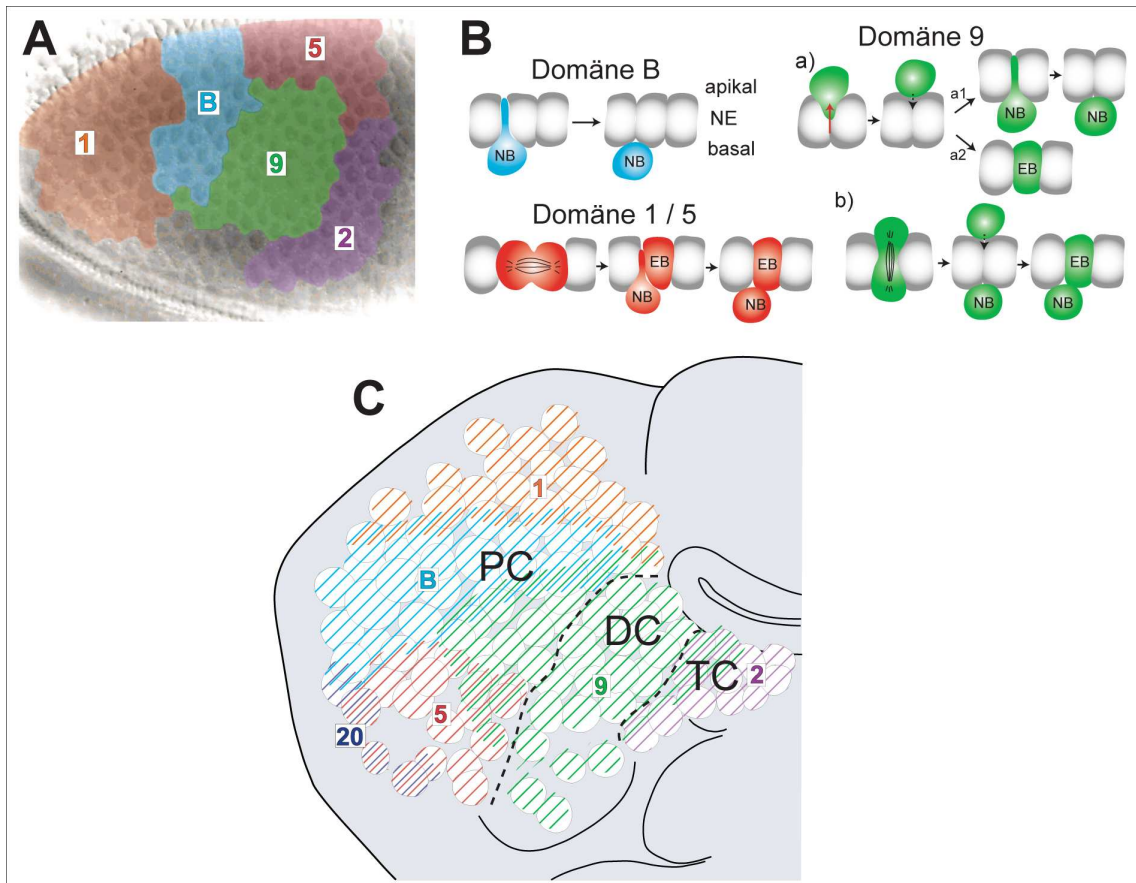


Abb. 1-5: Mechanismen der NB-Delamination in unterschiedlichen mitotischen Domänen des pNE

(A) Laterale Ansicht der Gehirnregion eines Embryos im Blastodermstadium; anterior ist links. Die farblich markierten Flächen kennzeichnen die räumliche Anordnung der mitotischen Domänen 1 (hellrot), 2 (lila), 9 (grün), 5 (dunkelrot) und B (hellblau) zueinander. (B) Neurale Vorläuferzellen in Domäne B (hellblau) teilen sich nicht im peripheren Ektoderm, sondern delaminieren direkt als NB. In Domänen 1 und 5 (rot) teilen sich neuroektodermale Vorläuferzellen parallel zur ektodermalen Oberfläche; eine der Tochterzellen verbleibt als Epidermoblast (EB) im peripheren Ektoderm, die zweite delaminiert als NB. In Domäne 9 wandern manche neuronalen Vorläuferzellen nach apikal (roter Pfeil in Ba) und integrieren sich nachfolgend wieder in die ektodermale Zellschicht um von dort als NB zu delaminieren (Ba1) oder verbleiben im Ektoderm und entwickeln sich zu EB (Ba2). Andere Zellen in Domäne 9 teilen sich senkrecht zur ektodermalen Oberfläche (Bb); danach wandert eine der Tochterzellen nach apikal, integriert sich später jedoch wieder als EB in das Neuroektoderm und die zweite Tochterzelle delaminiert basal als NB. (C) Gehirn-NB stammen aus unterschiedlichen mitotischen Domänen im pNE. Die farbigen Schraffierungen bezeichnen NB die aus

verschiedenen mitotischen Domänen (siehe A) delaminieren und die gestrichelten Linien stellen die Neuomergrenzen zwischen Trito (TC)-, Deuto (DC)- und Protocerebrum (PC) dar. (modifiziert nach Urbach und Technau, 2004)

Pro Gehirnhemisphäre delaminieren etwa 100 NB aus dem pNE, wobei sich jeder einzelne während unterschiedlicher Stadien der frühen Neurogenese (Stadium 9-11) anhand der spezifischen Expression einer Kombination molekularer Marker identifizieren lässt (Abb. 1-6), was darauf hindeutet, dass jeder NB ein individuelles Schicksal annimmt (Urbach et al., 2003; Urbach und Technau, 2003b). Darüber hinaus erlaubt die Erstellung einer NB-Markerkarte (Abb. 1-6) (Urbach und Technau, 2003b) einen präziseren Vergleich mit NB des VNS und die Identifikation seriell homologer NB. Diese wurden bisher nur im posterioren Anteil des pNE (TC und DC) gefunden, welcher sich weniger vom VNS unterscheidet als der anteriore Bereich (PC) (Urbach und Technau, 2004). Gemeinsamkeiten bezüglich des Delaminationszeitpunkts, der relativen Position innerhalb des NB-Musters und der absoluten Position innerhalb eines Hemisegments, sowie die Co-Expression spezifischer molekularer Marker können auf serielle Homologie zwischen NB verschiedener Segmente hinweisen (Urbach und Technau, 2004). Schon innerhalb des VNS konnten segment-spezifische Unterschiede in seriell homologen Zellstammbäumen beobachtet werden (Udolph et al., 1993; Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997) und diese könnten innerhalb der Gehirnsegmente bzw. zwischen Gehirn und VNS noch deutlicher ausfallen (Urbach und Technau, 2004).

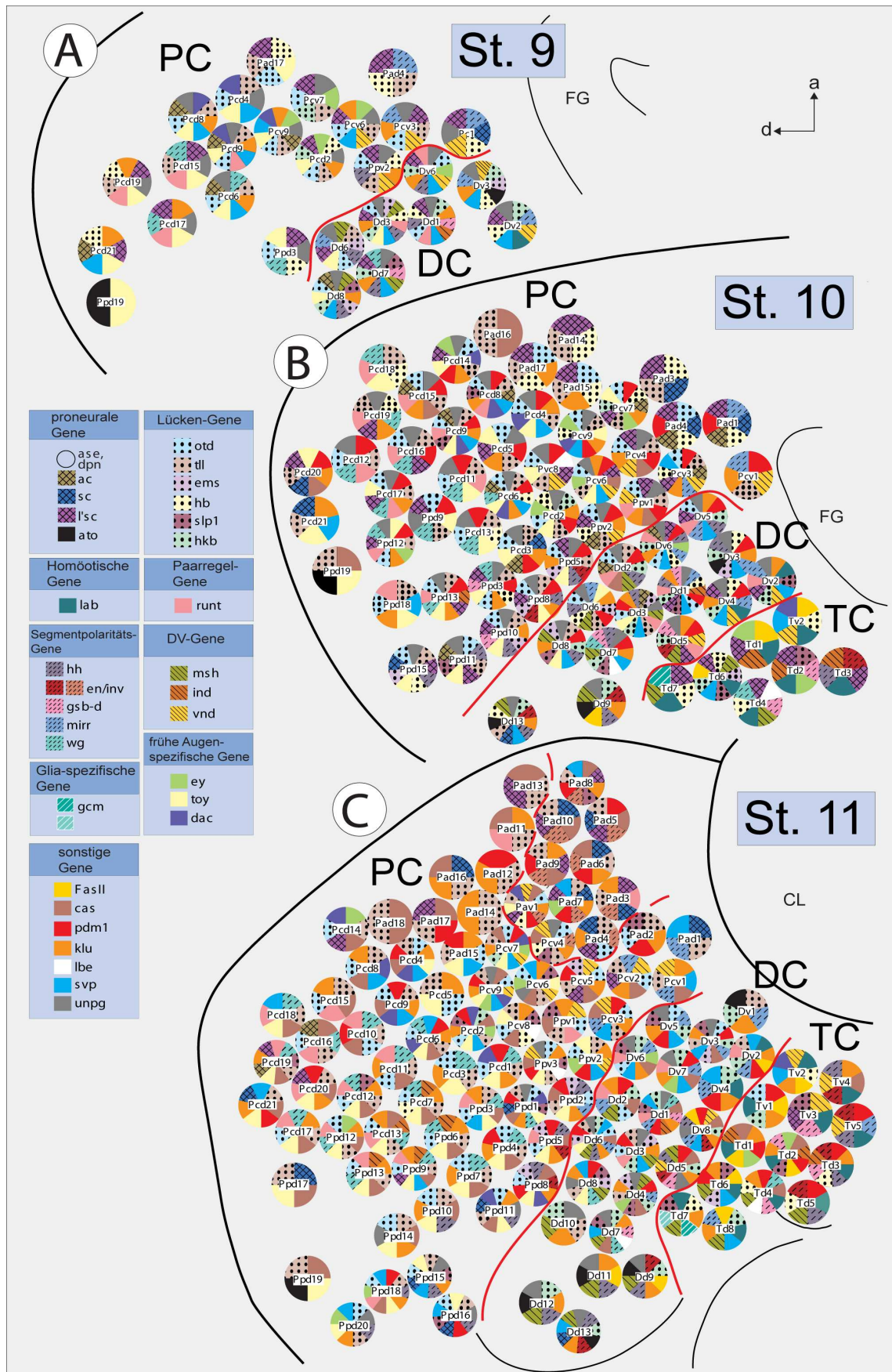


Abb. 1-6: Expression molekularer Marker in Gehirn-NB während verschiedener Stadien der frühen Neurogenese
 Jeder der etwa 100 Gehirn-NB exprimiert eine spezifische Kombination molekularer

Markergene (siehe Farbcode) durch welche er individuell in Stadium (St.) 9 (A), St. 10 (B) und St. 11 (C; wenn die gesamte Population an Gehirn-NB delaminiert ist) identifizierbar ist. Rote Linien markieren die Neuromergrenzen zwischen Trito (TC)-, Deuto (DC)- und Protocerebrum (PC), eine gestrichelte rote Linie die Grenze zwischen okularem und labralem PC; anterior (a) ist oben. d = dorsal, FG = Vorderdarmanlage („foregut“), CL = Clypeolabrum. Zur Nomenklatur der Gehirn-NB siehe Urbach et al. (2003). (Abb. aus Urbach und Technau, 2003b)

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die frühen Musterbildungsprozesse im NE des ZNS sind essenziell für die korrekte Entstehung und Spezifizierung von neuronalen Stammzellen oder NB. Das individuelle NB-Schicksal wird jedoch nicht durch ein einziges regulatorisches Gen bestimmt, sondern ist das Ergebnis der kombinierten Aktivität einer Vielzahl von Genen, welche einen spezifischen Code für jeden NB bereitstellen. Eine unabdingbare Voraussetzung dafür stellt die präzise Kontrolle der Expression regulatorischer Gene im NE entlang der AP- und DV-Achse dar, wodurch diese auf spezifische Domänen beschränkt bleiben. Dementsprechend ist das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen welche diese Kontrolle gewährleisten von größter Bedeutung.

Basierend auf ersten Grundlagen, wie den Daten zur Expression der DV-Gene (*ind*, *vnd*, *msh*) (Urbach und Technau, 2003a) sowie ersten Daten zur Funktion von *vnd* im pNE (Urbach et al., 2006), bestand das Hauptziel der vorliegenden Arbeit darin, die Kenntnisse bezüglich der frühen DV-Musterbildung im sich entwickelnden Gehirn zu erweitern, und diese mit der Situation im NE des VNS zu vergleichen. Neben der detaillierten Analyse der Expressionsdynamik von *vnd*, *ind*, *msh* und *Egfr* im pNE sowie deren genetischen Interaktionen untereinander, beinhaltete die Zielsetzung auch die Identifikation und Charakterisierung weiterer Faktoren, welche an der DV-Regionalisierung des pNE beteiligt sind. Da in einem großen Anteil des pNE keines der drei bekannten DV-Gene (*vnd*, *ind*, *msh*) exprimiert wird, deutet dies auf die Existenz weiterer Regulatoren hin, welche in die DV-Organisation der frühen Gehirnanlage involviert sind.

2. Material und Methoden

2.1 Fliegenzucht

Fliegen, die man für Experimente benötigt, werden auf Standardmedium in Kulturgefäßen (Röhrchen) bei 25°C gehalten und zur Verbreiterung alle drei bis vier Tage auf neue Röhrchen umgeschüttelt. Bei dieser Umgebungstemperatur beträgt die Dauer des Generationszyklus 220 Stunden (Std.) (Ashburner *et al.*, 1982). Fliegenstämme die gerade keine Verwendung finden werden bei 18°C gehalten („Stammsammlung“), wodurch sich die Generationsdauer auf etwa 440 Std. verdoppelt.

2.2 Herstellung von Apfelagarröhrchen für Eiablagen

Zur Herstellung von Apfelagarröhrchen werden 26-28 g Agar abgewogen und in einem Liter handelsüblichen Apfelsaft in einer Mikrowelle aufgeköcht und gelöst bis die Flüssigkeit klar ist. Danach wird der Apfelsaftagar in vorbereitete Röhrchen (Fliegenzuchtgefäße, Abschnitt 2.1) gegossen, abkühlen lassen und diese Gefäße mit Schaumstoffstopfen verschlossen. Die Röhrchen können nun sofort weiterverwendet oder für etwa eine Woche bei 4°C gelagert werden.

2.3 Eiablagen

Bevor man Fliegen zur Eiablage verwendet, werden sie zunächst über zwei bis drei Tage auf Standardmedium mit Trockenhefe angefütert. Danach werden die Fliegen auf Apfelagarröhrchen umgesetzt, die ebenfalls zuvor mit etwas Hefe bestreut wurden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden hauptsächlich Übernachtablagen, jedoch auch dreistündige Ablagen verwendet, um den Anteil an sehr jungen Embryonen (Stadium (St.) 6-8) zu erhöhen.

2.4 Fliegenstämme

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

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft/Referenz
OregonR	Wildtyp	Stammsammlung Institut für Genetik
Mutante Stämme		
<i>EGFR</i> ²	<i>EGFR</i> ² / CyO, <i>twi-lacZ</i>	J. Skeath (Clifford und Schüpbach,

		1994)
<i>ems</i> ^{9H83}	<i>ems</i> ^{9H83} / Tm6c, <i>twi-lacZ</i>	U. Walldorf (Jürgens et al., 1984)
<i>en</i> ⁵⁸	<i>en</i> ⁵⁸ / CyO, <i>twi-lacZ</i>	Bloomington BL-1648 (Andrew et al., 1997)
<i>en</i> ⁵⁹	<i>en</i> ⁵⁹ / CyO, <i>twi-lacZ</i>	Bloomington BL-5343 (Gustavson et al., 1996)
<i>ind</i> ^{16.2}	<i>ind</i> ^{16.2} / Tm3, <i>ftz-lacZ</i>	J. Skeath (Weiss et al., 1998)
<i>msh</i> ⁶⁸	<i>msh</i> ⁶⁸ / Tm6c, <i>twi-lacZ</i>	T. Isshiki (Isshiki et al., 1997)
<i>Nkx6</i> ^{D25}	<i>Nkx6</i> ^{D25} / Tm3, <i>ftz-lacZ</i>	J. Skeath (Broihier et al., 2004)
<i>vnd</i> ⁶	<i>vnd</i> ⁶ / Fm7, <i>ftz-lacZ</i>	F. Jiménez (Jiménez und Campos-Ortega, 1990)
<i>vnd</i> ⁶ ; <i>msh</i> ⁶⁸	<i>vnd</i> ⁶ / Fm7, <i>ftz-lacZ</i> ;; <i>msh</i> ⁶⁸ / Tm6c, <i>twi-lacZ</i>	eigene Kreuzung
Gal4-Linien		
<i>Mata</i> -Gal4	<i>Mata</i> -Gal4-VP16	Bloomington BL-7062 (Häcker und Perrimon, 1998)
<i>sca</i> -Gal4	<i>sca</i> -Gal4	Klaes et al., 1994
UAS-Linien		
UAS- <i>ems</i>	UAS- <i>ems</i>	J. Castelli-Gair Hombria (Lovegrove et al., 2006)
UAS- <i>en</i>	UAS- <i>en</i>	A. Brand (Yoffe et al., 1995)
UAS- <i>ind</i>	UAS- <i>ind</i>	T. von Ohlen (von Ohlen et al., 2007a)
UAS- <i>msh</i>	UAS- <i>msh-m25-m6</i>	A. Nose (Isshiki et al., 1997)
UAS- <i>Nkx6</i>	UAS- <i>Nkx6</i>	J. Skeath (Broihier et al., 2004)
UAS- <i>sSpi</i>	UAS- <i>sSpi</i>	J. Skeath (Zhao et al., 2007b)
UAS- <i>vnd</i>	UAS- <i>vnd</i>	S. Sprecher (Chu et al., 1998)
Defizienzen		
<i>Df(3L)XG3</i>	<i>Df(3L)XG3</i> / Tm6b	Bloomington BL-6549
Balancer-Stämme		
w; CyO, <i>twi-lacZ</i> / <i>Pm</i> ; Tm6b, <i>iab2-lacZ</i> , <i>Ant</i> ^{Hu} , <i>e</i> / CxD		O. Vef
Fm7a;; UAS- <i>bi</i> ^{omb} / Tm3, <i>Sb</i> , <i>e</i> , <i>ftz-lacZ</i>		O. Vef
Fm7a;; UAS- <i>bi</i> ^{omb} / Tm6b, <i>Tb</i> , <i>e</i> , <i>Ant</i> ^{Hu}		O. Vef
<i>Dr</i> / Tm6c, <i>Sb</i> , <i>Tb</i> , <i>twi-lacZ</i>		O. Vef
w; CyO, <i>ftz-lacZ</i> / <i>Pm</i>		O. Vef
CyO, <i>twi-lacZ</i> / <i>Gla</i> , <i>Bc</i>		O. Vef
w; CyO, <i>twi-lacZ</i> / <i>noc</i> ^{Sc^o} , DTS		O. Vef

2.5 Genetische Kreuzungen

Zur Durchführung von Kreuzungsexperimenten müssen von einem der beiden Ausgangsfliegenstämme jungfräuliche Weibchen gesammelt werden, wofür zunächst alle Parentalfliegen aus dem Röhrchen zu entfernen sind. *Drosophila* kann sich erst erfolgreich paaren wenn ihre Kutikula und damit auch der Geschlechtsapparat vollständig ausgehärtet ist, ein Prozess, der bei 25°C mindestens 5 Stunden dauert. Daher genügt es, die frisch geschlüpften Weibchen in Intervallen von etwa 4 Std. zu entfernen und in einem separaten Röhrchen zu sammeln. Wenn genug jungfräuliche Weibchen vorhanden sind, kann man diese mit Männchen des zweiten Fliegenstammes verkreuzen. Die Kreuzung wird bei 25°C gehalten und die Fliegen nach 3-4 Tagen in ein neues Röhrchen umgesetzt, um einerseits die angesetzte Kreuzung zu verbreitern und andererseits die Parentalfliegen von den F1-Nachkommen zu trennen. Nach 10-12 Tagen beginnt die F1-Generation zu schlüpfen und Fliegen des gewünschten Genotyps können für weitere Kreuzungen abgesammelt werden.

2.5.1 Balancieren letaler Mutationen

Homozygot letale Mutationen müssen innerhalb eines Fliegenstammes stabilisiert werden, da sie andernfalls im Laufe mehrerer Generationen verloren gehen würden. Hierfür werden sogenannte Balancer-Chromosomen verwendet, welche durch vielfältige Aberrationen eine Rekombination verhindern, gleichzeitig aber auch rezessive Letalfaktoren tragen, sodass sie homozygot nicht lebensfähig sind. Dieses System erlaubt es, dass Mutationen im heterozygoten Zustand gehalten werden können. In dieser Arbeit wurden sogenannte „Blaue Balancer“ verwendet, die durch ein spezifisches β -Gal-Expressionsmuster gekennzeichnet sind, so dass sich beim Färben der Embryonen zweifelsfrei die homo- von den heterozygoten Individuen unterscheiden lassen.

2.6 Das Gal4/UAS-System

Das von Brand und Perrimon (1993) entwickelte Gal4/UAS-System ermöglicht es, jedes klonierte Gen in einem räumlich und zeitlich spezifischen Muster in *Drosophila* zu exprimieren. Dieses System setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, welche beide aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammen: dem transkriptionellen Aktivator Gal4 und dessen Zielsequenz, die „Upstream Activating Sequence“ (UAS). Die Fliegen des einen Stammes, die als sogenannte Treiber- oder auch Gal4-Linie

bezeichnet werden, tragen ein transposables Element (P-Element) auf dem sich das Gal4-Gen unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers befindet. Ein zweiter transgener Fliegenstamm trägt ein P-Element auf welchem sich das gewünschte Gen X hinter mehreren aufeinanderfolgenden UAS-Sequenzen befindet (die sogenannte Responder- oder UAS-Linie). Kreuzt man Fliegen der Gal4-Linie mit Fliegen der UAS-Linie, so wird in der F1-Generation das Gen X unter der Kontrolle des gewählten endogenen Enhancers exprimiert (Abb. 2-1). Die Auswahl geeigneter Gal4-Linien erlaubt es, die Funktion gewünschter Gene in spezifischen Geweben und zu spezifischen Entwicklungszeitpunkten zu analysieren.

In dieser Arbeit wurden zwei Treiberlinien für Überexpressionsexperimente verwendet (siehe Tab. 2-1): *Mata*-Gal4 schaltet die Expression des Zielgens X etwa ab St. 5/6 an und unter Verwendung von *sca*-Gal4 wird das Zielgen etwa ab St. 8 exprimiert. Wenn nun beispielsweise das Gen *ind* (UAS-*ind*) unter der Kontrolle des *sca*-Enhancers (*sca*-Gal4) exprimiert wurde, ist diese Kreuzung im Text und den Abbildungen als *sca*>*ind* bezeichnet.

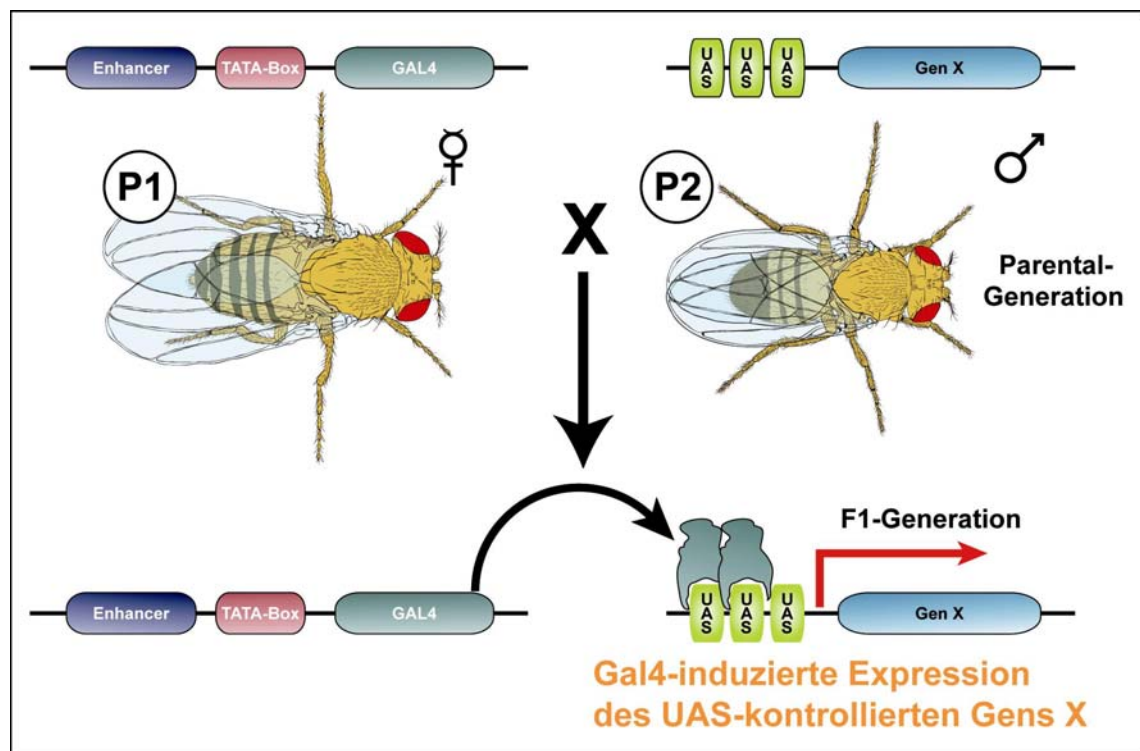


Abb. 2-1: Ektopische Genexpression mithilfe des Gal4/UAS-Systems

In Fliegen des Gal4-Stammes (Treiberlinie, P1) wird Gal4 unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers exprimiert. Diese Fliegen werden mit Fliegen des UAS-Stammes (Responderlinie, P2) verkreuzt, in welchen mehrere UAS-Sequenzen vor ein Gen X geschaltet sind. In den Nachkommen aus dieser Kreuzung (F1-Generation) kann das Gal4-Protein an die UAS-Sequenzen binden und die Transkription des Gens X im zeitlich-räumlichen Expressionsmuster

des endogenen Enhancers katalysieren. Für detaillierte Erläuterungen siehe Text. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von C. Berger)

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Herstellung von RNA-Sonden

Die Herstellung von RNA-Sonden wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt und die hier gebrauchten Lösungen mit DEPC-haltigem Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$) angesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten RNA-Sonden, sowie die zu deren Herstellung benötigten Restriktionsenzyme, Polymerasen und Vektoren sind in Tab. 2-2 (Abschnitt 2.7.2) zu finden.

Der Vektor welcher die gewünschte cDNA enthält, wird mithilfe des entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert, anschließend aufgereinigt, gefällt und das entstandene Pellet in 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst. Während der *in vitro*-Transkription wird die Sonde von einer RNA-Polymerase synthetisiert und mit Digoxigenin (Dig)- oder Fluorescein (Fic)-gekoppelten UTPs markiert. Der Transkriptionsansatz beinhaltet 13.5 μl der gewünschten cDNA, 0.5 μl RNase-Inhibitor, 2 μl RNA-Labeling-Mix (Dig oder Fic; Fa. Boehringer), 2 μl 10x Transkriptionspuffer sowie 2 μl der entsprechenden RNA-Polymerase und wird für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Zum Ausfällen der markierten RNA-Sonde werden 2 μl 4M Lithiumchlorid (LiCl_2) und 50 μl 100%iges Ethanol ($\text{EtOH}_{\text{abs.}}$) zu dem Transkriptionsansatz gegeben und dieser über Nacht auf -20°C gestellt. Am nächsten Tag wird die Lösung für 1 Std. bei 4°C zentrifugiert (14000 rpm), das entstandene Pellet mit 100 μl kaltem EtOH (70%) überschichtet und noch mal für 10 Min. zentrifugiert (4°C, 14000 rpm). Der Überstand wird verworfen und das Pellet gut trocknen lassen (Thermocycler, 37°C), um letzte Reste von EtOH zu entfernen. Zum Schluß wird das getrocknete Pellet in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst und kann bei -20°C aufbewahrt werden.

Die so hergestellten RNA-Sonden wurden an Wildtyp-Embryonen getestet und nachfolgend in den in Tab. 2-2 (Abschnitt 2.7.2) angegebenen Verdünnungen verwendet.

2.7.2 Verwendete RNA-Sonden

Von jeder in Tab. 2-2 beschriebenen RNA-Sonde wurde jeweils eine Dig- und eine Fic-markierte Variante hergestellt (Abschnitt 2.7.1).

Tab. 2-2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten RNA-Sonden

Bezeichnung	erstellt aus (Herkunft)	Vektor	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase	Verdünnung Sonde
<i>ind</i> -Dig <i>ind</i> -Fitc	cDNA (E. Bier)	pBS SKII(+)	<i>Xho</i> I	T7	1 : 800
<i>msh</i> -Dig <i>msh</i> -Fitc	cDNA (E. Bier)	pBS SKII(+)	<i>Hind</i> III	T7	1 : 1000
<i>Nkx6</i> -Dig <i>Nkx6</i> -Fitc	EST-Klon RE18506 (BDGP)	<i>pFLC1</i>	<i>Sph</i> I	T3	1 : 2000
<i>vnd</i> -Dig <i>vnd</i> -Fitc	cDNA (E. Bier)	pBS SKII(+)	<i>Sac</i> I	T7	1 : 1000

2.8 Fixierung der Embryonen für Antikörperfärbung und *in-Situ*

Hybridisierung

Die Embryonen werden mit 6%iger Chlorbleiche überschichtet, für circa 3 Minuten (Min.) dechorionisiert und anschließend mit Wasser in ein abgeschnittenes Falcon mit Netzchen eingespült. Nach mehrmaligem Spülen werden die Embryonen in ein EppendorfCap mit vorbereitetem Fixativ überführt und 20 Min. auf einem Schüttler (900 rpm) bei Raumtemperatur fixiert. Danach wird die untere Phase des Fixativs abgezogen und verworfen, durch Methanol ersetzt und die Embryonen für 1-2 Min. auf höchster Frequenz gevortext. Dies führt zur Devitellinisierung der fixierten Embryonen, welche auf den Boden des EppendorfCaps hinabsinken. Dieser Schritt wird nochmals wiederholt und anschließend die gesamte Lösung dreimal gegen frisches Methanol ausgetauscht, um das restliche Heptan zu entfernen. Die so behandelten Embryonen können nun bei -20°C für mehrere Monate aufbewahrt oder sofort für eine Antikörperfärbung oder *in-Situ* Hybridisierung weiterverwendet werden.

2.9 Immunohistochemie

Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler (100 rpm).

2.9.1 Verwendete Antikörper

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Verdünnungen der primären Antikörper (Tab. 2-3) mit Antikörper-Stammlösung angesetzt und sekundäre Antikörper (Tab. 2-4) mit PBTriton oder PBTween verdünnt.

Tab. 2-3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
anti-β-Gal	Hühnchen	1 : 1000	Abcam
anti-β-Gal	Kaninchen	1 : 2000	Promega
anti-β-Gal	Maus	1 : 750	Promega
anti-Dig-AP	Schaf	1 : 1000	Roche
anti-Ems	Ratte	1 : 1000	U. Walldorf
anti-En	Kaninchen	1 : 800	Santa Cruz Biotechnology
anti-Fitc-AP	Schaf	1 : 1000	Roche
anti-Inv	Maus	1 : 7	DSHB
anti-MAPK	Maus	1 : 1000 (in PBT)	Sigma
anti-Nkx6	Ratte	1 : 1000	J. Skeath
anti-Vnd	Kaninchen	1 : 1000	M. Nirenberg

Tab. 2-4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
anti-Hühnchen-AP	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson
anti-Hühnchen-Biotin	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson
anti-Kaninchen-AP	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson
anti-Kaninchen-Biotin	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson
anti-Maus-AP	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson
anti-Maus-Biotin	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson
anti-Ratte-AP	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson
anti-Ratte-Biotin	Esel	1 : 500	Dianova/Jackson

2.9.2 Inkubation mit primären Antikörpern

Die fixierten Embryonen (Abschnitt 2.8) werden mehrmals mit PB-Triton gespült und gewaschen, um das restliche Methanol zu entfernen, und danach für 30-60 Min. mit Antikörper-Stammlösung inkubiert (Blockierungsschritt). Dies dient dazu, unspezifische Anfärbungen im Gewebe zu verhindern und dadurch entstehende Hintergrundfärbung zu reduzieren. Anschließend werden die Embryonen für 24-48 Std. bei 4°C mit primärem Antikörper inkubiert (Tab.2-3).

2.9.3 Inkubation mit sekundären Antikörpern

Der primäre Antikörper wird von den Embryonen entfernt und bei 4°C zur Wiederverwendung aufbewahrt. Nach mehrmaligem spülen und waschen mit PB-Triton werden die Embryonen über Nacht bei 4°C oder optional 2 Std. bei RT mit sekundärem Antikörper inkubiert (Tab.2-4). Nach Entfernen des Sekundärantikörpers durch

mehrmaliges spülen und waschen mit PBTrition können die in den Abschnitten 2.9.4 und 2.9.5 beschriebenen Nachweisreaktionen durchgeführt werden; sekundäre Antikörper für sichtbare Färbungen sind entweder mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Biotin konjugiert.

2.9.4 Signaldetektion über alkalische Phosphatase

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Farbsysteme verwendet deren Farbreaktion durch das Enzym alkalische Phosphatase katalysiert wird und zur Bildung eines blauen (NBT/BCIP) bzw. roten (VectorRed) Farbkomplexes führt. Zur Durchführung einer Farbreaktion mit NBT/BCIP werden die Embryonen nach Entfernen des Sekundärantikörpers (Abschnitt 2.9.3) zunächst 10 Min. mit Detektionspuffer inkubiert. Danach wird die Färbelösung auf die Embryonen gegeben und diese in ein weißes Wägeschälchen überführt, um den Verlauf der Färbung besser kontrollieren zu können. Die Farbreaktion wird mithilfe eines Binokulars beobachtet und nach genügend starker Färbung werden die Embryonen wieder in ein EppendorfCap überführt und die Farbreaktion durch mehrmaliges spülen mit PBTrition und 10 Min. waschen mit Methanol abgebrochen. Zum einen wird durch den Methanol-Waschschritt die alkalische Phosphatase inaktiviert und zum anderen die rote Farbkomponente der NBT/BCIP-Reaktion herausgewaschen, sodass eine dunkelblauer Farbniederschlag zurückbleibt. Für einen Farbnachweis über VectorRed werden die Embryonen anstelle von Detektionspuffer 10 Min. mit Tris-HCl inkubiert, dieses dann gegen die Färbelösung ausgetauscht und die Embryonen weiterbehandelt wie oben beschrieben. Um die Farbreaktion zu beenden, wird sehr gründlich mit PBTrition gespült und gewaschen, bis die Lösung nicht mehr gelblich ist und die Embryonen zur Inaktivierung des Enzyms (AP) 5 Min. nachfixiert. Nach mehrmaligem spülen mit PBTrition und PBS können die Embryonen in Glycerol (70%ig) bei RT aufbewahrt werden.

2.9.5 Signaldetektion über Biotin (DAB)

Bei dieser Nachweismethode werden die Embryonen nach Entfernen des Sekundärantikörpers (Abschnitt 2.9.3) für 1 Std. mit zuvor angesetztem AB-Komplex inkubiert. Hierbei handelt es sich um ein Verstärkersystem, welches sich aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) zusammensetzt. Dieser Komplex lagert sich an den Biotin-gekoppelten

Sekundärantikörper an und führt so zu einer hoch sensitiven Verstärkung. Das Enzym HRP katalysiert später die Reaktion mit der DAB-Färbelösung.

Durch mehrmaliges spülen und waschen mit PB-Triton wird der AB-Komplex entfernt, danach die durch Zugabe von 2 µl H₂O₂ aktivierte DAB-Färbelösung auf die Embryonen gegeben und weiterverfahren wie oben beschrieben (Abschnitt 2.9.4). Zum Abbruch der Farbreaktion, aus welcher ein braunes Farbendprodukt resultiert, wird mehrfach mit PB-Triton gespült und optional können die Embryonen noch für 5 Min. nachfixiert werden. Die Aufbewahrung erfolgt in 70%igem Glycerol bei RT.

Wird eine Antikörperfärbung sowohl mit Biotin- als auch AP-gekoppelten Sekundärantikörpern gleichzeitig durchgeführt, sollte zuerst die Signaldetektion über AP erfolgen, um verstärkte Hintergrundfärbung sowie ein möglicherweise abgeschwächtes AP-Signal zu vermeiden.

2.9.6 TSA Biotin System

Das TSA (Tyramide Signal Amplification) Biotin System ist ein weiteres Verstärkersystem, welches zusätzlich zu dem in Abschnitt 2.9.5 beschriebenen AB-Komplex verwendet werden kann, d.h. zuvor muß die Inkubation mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper erfolgen. In dieser Arbeit wurde das TSA Biotin System einerseits zur Signalamplifizierung des relativ schwachen Primärantikörpers anti-Invested (Tab.2-3), als auch für Antikörperfärbungen die nach einer ISH durchgeführt wurden benutzt.

Nach Inkubation mit sekundärem Antikörper (Abschnitt 2.9.3) wird dieser durch mehrmaliges spülen mit PB-Triton entfernt. Danach wird einmal mit TNB-Puffer gespült, die Embryonen dann nochmal eine halbe Std. in TNB-Puffer gewaschen und schließlich für weitere 30 Min. mit Streptavidin-HRP inkubiert. Daraufhin folgen drei zehnminütige Waschschrte mit TNT-Puffer, sowie die Inkubation mit biotinyliertem Tyramid für genau 5 Minuten. Es ist wichtig diese Zeitvorgabe einzuhalten, da es bei längerer Inkubation mit Tyramid während der DAB-Reaktion verstärkt zu unspezifischer Hintergrundfärbung kommen kann. Das Tyramid wird durch mehrmaliges waschen mit PB-Triton entfernt, die Embryonen für 1 Std. mit AB-Komplex inkubiert und anschließend weiterbehandelt wie in Abschnitt 2.9.5 beschrieben.

2.10 *in-Situ* Hybridisierung (ISH)

Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen, sofern nicht anders beschrieben, bei RT auf einem Schüttler (100 rpm).

2.10.1 Einfache ISH

Die ersten Schritte des ISH-Protokolls werden mit Handschuhen und unter Verwendung steriler gestopfter Spitzen durchgeführt, um eine Verunreinigung oder Degradierung der RNA-Sonden zu vermeiden. Die fixierten Embryonen (siehe Abschnitt 2.8) werden mehrmals mit PBTween_{DEPC} gewaschen, 5 Min. in PBTween_{DEPC}/Hybridisierungslösung (im Verhältnis 1:1) und noch einmal 5 Min. in Hybridisierungslösung inkubiert. Anschließend werden 500 µl Hybridisierungslösung zusammen mit 5 µl ssDNA („salmon sperm DNA“) auf die Embryonen gegeben und diese für mindestens 1 Std. bei 55°C im Thermocycler prähybridisiert (350 rpm). Die geeignete Verdünnung der RNA-Sonde wird angesetzt, wie hier am Beispiel von *vnd-Dig* (Endverdünnung 1:1000, siehe Tab. 2-2) gezeigt: 500 µl Hybridisierungslösung, 5 µl ssDNA (10 mg/ml) und 0.5 µl RNA-Sonde. Dieser Ansatz wird für 10 Min. bei 95°C im Heizblock denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und anschließend auf die Embryonen gegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 55°C im Thermocycler.

Am nächsten Tag wird die Sonde von den Embryonen abgezogen und zur mehrfachen Wiederverwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Embryonen werden bei 65°C im Thermocycler (300 rpm) 30 Min. in Hybridisierungslösung und noch einmal 30 Min. in PBTween_{DEPC}/Hybridisierungslösung (im Verhältnis 1:1) gewaschen. Danach kann ohne Handschuhe, mit normalen Spitzen und DEPC-freien Lösungen weitergearbeitet werden. Es folgen vier zwanzigminütige Waschschrte mit PBTween bei 65°C und ein letzter Waschschrte von 10 Min. bei RT. Für den Sondennachweis werden die Embryonen 1.5 Std. mit AP-gekoppeltem anti-Dig (anti-Dig-AP; 0.5 µl anti-Dig-AP in 500 µl PBTween) inkubiert; im Falle einer Fitc-markierte Sonde wird anti-Fitc-AP verwendet. Der Antikörper wird verworfen, die Embryonen mehrmals mit PBTween gespült und gewaschen und nachfolgend zweimal 5 Min. mit Detektionspuffer (NBT/BCIP oder VectorRed) inkubiert. Die Signaldetektion erfolgt wie in Abschnitt 2.9.4 beschrieben und kann zwischen 30 Min. und 3 Std. dauern. Nach Abstoppen der Reaktion wird mehrmals mit PBTween gespült und die Embryonen für 5 Min. bei RT auf einem Schüttler nachfixiert (900 µl PBTween, 100 µl Formaldehyd). Es folgt

mehrmaliges spülen mit PBTween, zweimal spülen mit PBS und die Aufbewahrung der Embryonen in 70%igem Glycerol bei RT.

2.10.2 Doppel-ISH

Eine Doppel-ISH wird ähnlich der einfachen ISH in Abschnitt 2.10.1 durchgeführt, jedoch mit folgenden Änderungen:

- 1) Die Verdünnung der RNA-Sonden erfolgt in einem gemeinsamen Ansatz, wobei die schwächere Sonde möglichst Dig- und die stärkere Sonde Fitc-markiert sein sollte: z.B. 500 µl Hybridisierungslösung, 5 µl ssDNA (10 mg/ml), 0.5 µl *vnd*-Dig und 0.5 µl *msh*-Fitc.
- 2) Die schwächere Sonde wird zuerst nachgewiesen (d.h. Inkubation mit anti-Dig-AP) und hierfür NBT/BCIP (blaues Farbprodukt) verwendet. Nach Abstoppen der Farbreaktion wird mehrmals mit PBTween gespült und anschließend zweimal 5 Min. mit Glycin-Puffer gewaschen, woraufhin sowohl überschüssiger als auch gebundener anti-Dig-AP ausgewaschen wird. Dies ist notwendig, da auch die Nachweisreaktion der zweiten Sonde von alkalischer Phosphatase katalysiert wird. Durch mehrmaliges spülen und waschen mit PBTween werden Reste des Glycin-Puffers entfernt, die Embryonen 5 Min. nachfixiert, wieder mehrmals mit PBTween gewaschen und danach erfolgt die Inkubation mit anti-Fitc-AP über Nacht (bei 4°C auf einem Schüttler).
- 3) Für den Nachweis der stärkeren Sonde wird VectorRed (rotes Farbprodukt) verwendet (siehe Abschnitt 2.9.4).

2.10.3 ISH oder Doppel-ISH mit anschließender Antikörperfärbung

Einfache oder doppelte ISH werden durchgeführt wie in den Abschnitten 2.10.1 und 2.10.2 beschrieben, wobei jedoch in beiden Fällen die Nachfixierung entfällt (bei einer Doppel-ISH wird nur am Ende der ersten Farbreaktion nachfixiert). Die Embryonen werden mehrmals mit PBTween gespült und danach erfolgt ein zehnminütiger H₂O₂-Waschschritt (100 µl H₂O₂ in 900 µl PBTween); hierdurch werden freie Peroxidasen abgefangen und unspezifische Hintergrundfärbung beim Nachweis des Antikörpers reduziert. Anschließend wird mehrmals mit PBTween gewaschen, mindestens 30 Min. mit Antikörper-Stammlösung geblockt und die Embryonen mit primärem Antikörper (siehe Tab. 2-3) über Nacht inkubiert (bei 4°C auf dem Schüttler).

Am nächsten Tag erfolgt die Inkubation der Embryonen mit Biotin-gekoppeltem sekundärem Antikörper (Abschnitt 2.9.3 und Tab. 2-4) für 2 Std. und eine Signalverstärkung über das TSA Biotin System (Abschnitt 2.9.6). Die Nachweisreaktion über DAB ist in Abschnitt 2.9.5 beschrieben.

2.11 Präparation der Embryonen

Die in 70%igem Glycerol gelagerten Embryonen werden in Dreierblockschälchen gegeben, die gewünschten Stadien herausgesucht und die Embryonen anschließend auf einen Hohlschliffobjektträger transferiert. Für die unter dem Binokular stattfindende Filetpräparation werden eine flache, abgerundete und eine flache, scharfkantige Präpariernadel verwendet. Embryonen der Stadien 7-11 werden wie folgt präpariert: der Embryo wird auf die Seite gedreht (anterior ist links), mit der abgerundeten Präpariernadel stabilisiert und mit der scharfen Präpariernadel wird der obere Teil des Keimstreifs aufgeklappt (Abb. 2-2 A) und entfernt. Danach wird der Embryo so gedreht, dass er mit der ventralen Seite auf dem Objektträger aufliegt. Die Kopfkapsel wird entlang der dorsalen Mittellinie (ML) mit der scharfen Präpariernadel aufgeschnitten und anschließend mithilfe beider Präpariernadeln vorsichtig auseinander geklappt (Abb. 2-2 B) sowie Reste von Dotter daraus entfernt. Bei Embryonen der Stadien 5-6 wird zunächst das posteriore Ende entfernt, anschließend wird der Embryo mit der scharfen Präpariernadel entlang der gesamten dorsalen ML geöffnet, zu beiden Seiten hin aufgeklappt (siehe Abb. 3-1 A im Ergebnisteil) und der Dotter vorsichtig entfernt.

Die so angefertigten Filetpräparate werden einzeln in 90%igem Glycerol eingebettet. Dafür gibt man 45 µl Glycerol (90%) auf die Mitte eines großen Deckglases (24x60mm) und rechts und links daneben zwei Abstandshalter aus Alufolie. Der präparierte Embryo wird auf das Deckglas transferiert und in Glycerol mit der ventralen Seite nach unten (d.h. mit Blick auf das freigelegte ZNS) senkrecht zum Deckglas abgelegt (Abb. 2-2 C). Nachfolgend wird ein kleines Deckglas (18x18mm) am äußeren Rand eines Abstandshalters aufgesetzt und über den im Glycerol befindlichen Embryo gelegt, wobei das Deckglas rechts und links vorsichtig mit den Zeigefingern fixiert wird, um ein abrutschen zu verhindern. Durch vorsichtiges bewegen des kleinen Deckglases wird Glycerol in die Kopfkapsel gedrückt, welche sich daraufhin öffnet. Sobald sich das gesamte Glycerol unter dem kleinen Deckglas verteilt hat, wird es an allen Seiten mit Filterpapierchen bedeckt, um überschüssiges Glycerol aufzusaugen.

Anschließend wird das kleine Deckglas rundherum mit Nagellack versiegelt und bis zum nächsten Tag trocknen lassen. Wenn sich das kleine Deckglas durch Trocknen des Nagellacks tiefer auf den Embryo herabsenkt, sorgen die Abstandshalter dafür, dass der Embryo nicht zerdrückt wird.

Zur Analyse der Embryonen unter dem Mikroskop wird das fertige Präparat umgedreht (d.h. die glatte Seite des großen Deckglases nach oben) auf einen Objektträger gelegt und mit zwei kleinen Aufklebern rechts und links befestigt. Dadurch lässt sich nach Verwendung von Öl-Objektiven das Öl leicht mit EtOH (90%) von den Präparaten entfernen, ohne diese dabei zu beschädigen.

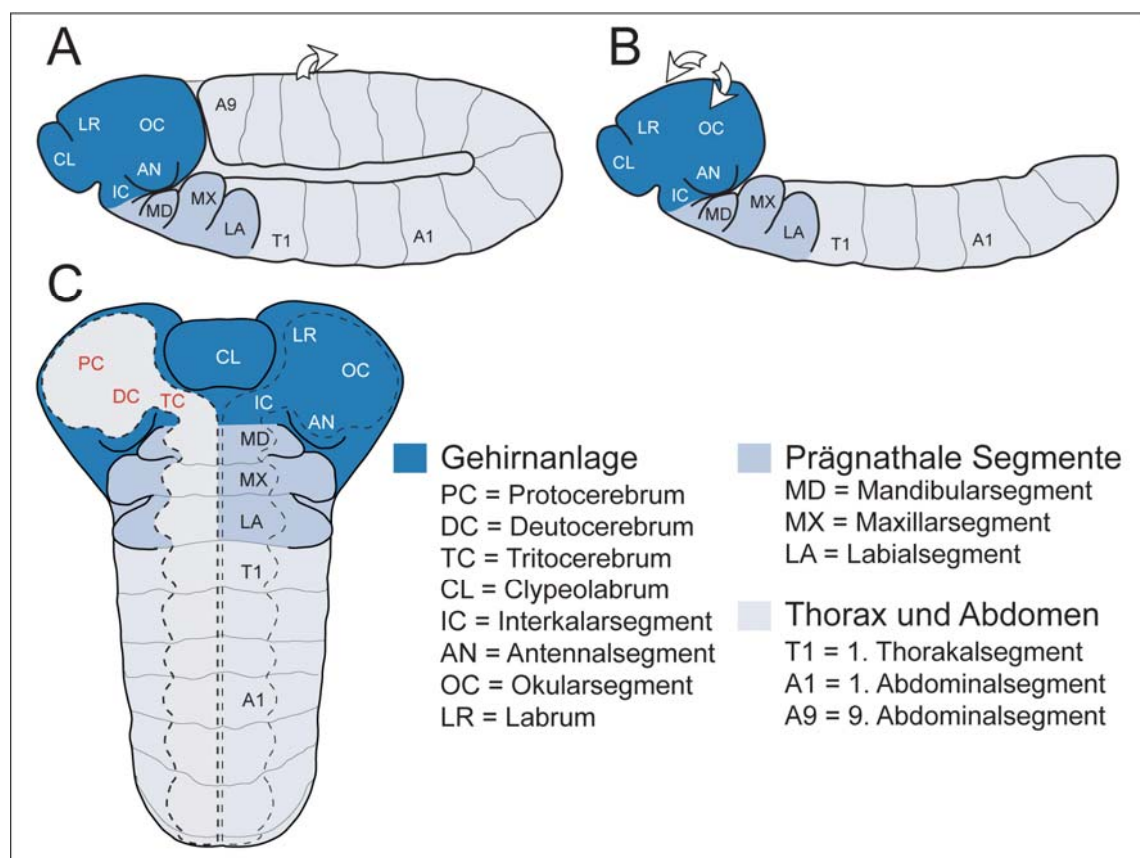


Abb. 2-2: Filetpräparation eines *Drosophila*-Embryos

Schematische Darstellung der Filetpräparation eines Embryos im St. 11. (A, B) Laterale Ansicht, anterior ist links. (C) Ansicht von dorsal auf den geöffneten Embryo mit Blick auf das ZNS (mit schwarz gestrichelter Linie umrandet), anterior ist oben. Die Gehirnanlage ist in blau, die prägnathalen Segmente in hellblau und die thorakalen und abdominalen Segmente in grau unterlegt. Für detaillierte Erläuterungen siehe Text. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von R. Urbach; modifiziert)

2.12 Auswertung und Dokumentation

Zur statistischen Auswertung der homozygot mutanten Embryonen wurden die Gehirnhemisphären (GHS) ausgezählt und das Vorhandensein des jeweiligen Phänotyps in Prozent (%) angegeben, wobei die drei Gehirnneuromere TC, DC und PC jeweils einzeln behandelt wurden. So bedeutet beispielsweise „60%, n = 18 GHS“, dass der Phänotyp in 60% der 18 ausgezählten Gehirnhemisphären auftrat, wobei mindestens neun verschiedene Embryonen analysiert wurden. Für die Auswertung im VNS wurden die Hemisegmente (HS) von T1-A1 ausgezählt, d.h. vom ersten thorakalen bis zum ersten abdominalen Segment.

Mithilfe einer an das Durchlichtmikroskop integrierten Kamera (siehe Abschnitt 2.15) wurden Bildstapel der präparierten Embryonen in verschiedenen Fokusebenen von ventral nach dorsal aufgenommen. Diese Bildstapel wurden in Adobe Photoshop (siehe Abschnitt 2.16) bearbeitet und verschiedene Fokusebenen in einem Bild zusammengefügt. Die Schemata wurden durch Analyse vieler verschiedener Präparate und unter Verwendung einer „Camera lucida“ rekonstruiert und anschließend in Adobe Illustrator (siehe Abschnitt 2.16) erstellt.

2.12.1 Auswertung von MAPK-Expression im Wildtyp in Bezug zu den DV-Genen

Für die Untersuchung von *ind*-, *msh*- und *Nkx6*-Expression standen in dieser Arbeit hauptsächlich RNA-Sonden zur Verfügung (Tab. 2-2). Für den Nachweis von EGFR-Aktivität im pNE wurde der Antikörper anti-MAPK verwendet (siehe Abschnitt 3.17 im Ergebnisteil), welcher im Anschluss an eine ISH (Abschnitt 2.10) nur in sehr seltenen Fällen ein einigermaßen brauchbares Ergebnis liefert. Die Regionen in welchen MAPK nur schwach exprimiert wird, sind nach einer ISH meistens gar nicht mehr detektierbar. Zur Beschreibung der DV-Genexpressionen relativ zueinander wurden u. a. Färbungen gegen Vnd oder En/Inv in Kombination mit *ind*, *Nkx6* und/oder *msh* verwendet. Auch anti-MAPK wurde mit Antikörperfärbungen gegen Vnd und En kombiniert.

Daher war es unter Verwendung von Vnd und En als gemeinsamem Nenner möglich, die Expressionsmuster der DV-Gene mit MAPK-Expression schematisch in Relation zu setzen wie in Abb. 3-19 dargestellt (Abschnitt 3.17 im Ergebnisteil).

2.13 Chemikalien und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck, MBI Fermentas, PerkinElmer, Roche, Roth, Sigma und Vector Laboratories. Abweichungen hiervon werden an entsprechender Stelle erwähnt.

PBS 20x (PBS-Stammlösung)

151.94 g NaCl
19.88 g Na₂HPO₄
8.28 g NaH₂PO₄
1000 ml H₂O_{dest.}

Der pH-Wert wird mit HCl auf 7.4 eingestellt.

PBS 1x

PBS-Stammlösung wird mit H₂O_{dest.} 1:20 verdünnt und diese Lösung wird im folgenden als PBS bezeichnet.

PBTriton (0.3%)

250 ml PBS
1.5 ml TritonX (30%)

PBTween (0.1%)

47.5 ml H₂O_{dest.}
2.5 ml PBS 20x
50 µl Tween20

Für eine ISH werden RNase-freies H₂O_{DEPC} und PBS_{DEPC} (20x) verwendet und diese Lösung als PBTween_{DEPC} bezeichnet.

Fixativ für Antikörperfärbung und *in-Situ* Hybridisierung

600 µl Heptan
70 µl Formaldehyd (FA, 37%)
450 µl PBTriton

Lösung zur Verdünnung primärer Antikörper („Antikörper-Stammlösung“)

9 ml PBTriton
1 ml Kalbsserum
200 µl NaN₃
1 Spatelspitze BSA

Glycerol (70%, 90%)

Glycerin (100%) für die jeweilige Konzentration mit PBS verdünnt.

Detektionspuffer NBT/BCIP

41.2 ml H₂O_{dest.}
1 ml NaCl (5M)
2.5 ml MgCl₂ (1M)

5 ml Tris (1M, pH 9.5)
50 µl Tween20

Färbelösung NBT/BCIP

1 ml Detektionspuffer
3 µl NBT
1.5 µl BCIP

Detektionspuffer VectorRed (Tris-HCl)

1.21 g Tris/ 100 ml (0.1M)

Der Tris-Puffer wird mit HCl auf pH 8.2-8.5 eingestellt und danach werden 0.1% Tween20 dazugegeben.

Färbelösung VectorRed

1 ml Tris-HCl
16 µl Lösung 1
16 µl Lösung 2
16 µl Lösung 3

AB-Komplex

300 µl PBT (Triton oder Tween)
4 µl Lösung A (Avidin)
4 µl Lösung B (Biotin-gekoppelte HRP)

Der AB-Komplex muß 1 Std. vor Verwendung angesetzt werden, damit sich Avidin und biotinyliertes HRP aneinanderlagern können (Schüttler, RT).

DAB

35 ml PB-Triton
1 Tablette DAB (10 mg/Tabl.)

Die mit Alufolie umwickelte Glasflasche wird unter dem Abzug auf einen Magnetrührer gestellt bis die DAB-Tablette gelöst ist. Danach wird die DAB-Lösung in Aliquots zu 400 µl bei -20°C aufbewahrt.

Färbelösung DAB

600 PBT (Triton oder Tween)
400 µl DAB

TNT Block-Puffer (TSA Biotin System)

0.1 M Tris-HCl pH 7.5 (1.21 g Tris/ 100 ml H₂O_{dest.})
0.15 M NaCl (0.87 g NaCl/ 100 ml H₂O_{dest.})
0.5 % Blocking-Reagenz (0.5g / 100 ml H₂O_{dest.})

TNB Wasch-Puffer (TSA Biotin System)

0.1 M Tris-HCl pH 7.5 (1.21 g Tris/ 100 ml H₂O_{dest.})
0.15 M NaCl (0.87 g NaCl/ 100 ml H₂O_{dest.})
0.05 % Tween20 (50 µl/ 100 ml H₂O_{dest.})

Streptavidin-HRP (TSA Biotin System)

500 µl TNB-Puffer
1.7 µl Streptavidin-HRP

Biotin-gekoppeltes Tyramid (TSA Biotin System)

140 µl Verstärkungslösung (Amplification Diluent)
2 µl Biotin-gekoppeltes Tyramid

Glycin-Puffer (pH 2.3)

0.038 g Glycin (0.01 M)
1.46 g NaCl (0.5 M)
0.05 g BSA
50 µl Triton
49.95 ml H₂O_{dest.}

Hybridisierungslösung

12.5 ml SSC 20x
12.5 ml H₂O_{DEPC}
25 ml Formamid
50 µl Tween20

Weitere Chemikalien

DEPC (Diethylpyrocarbonat), Wasserstoffperoxid (H₂O₂ 30%), Chlorbleiche (6%), Ethanol (EtOH), Methanol, Lithiumchlorid (LiCl₂).

2.14 Gebrauchsmaterialien

Objekträger, Deckgläser (18x18mm, 22x22mm, 24x60mm), Tesafilm, Nagellack, Aufkleber, Gaze, EppendorfCaps (1.5ml, 2ml), Falcons (15ml, 50ml), Alufolie, Filterpapier, Parafilm, handelsübliche Laborflaschen, Trockenhefe, Pipettenspitzen, weiße Wägeschälchen, Präparationsnadeln, Polyethylenschlauch, Pasteur- und Eppendorfpipetten, Dreierblockschälchen, Nitril-Handschuhe, Hohlschliffobjekträger.

2.15 Geräte

Tab. 2-5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Binokular MS5	Leica
CCD Kamera ProgRes 3012	Kontron Elektronik
Durchlichtmikroskop Axioplan (mit „Camera lucida“ Einrichtung und CCD Kamera ProgRes 3012)	Zeiss
Gelkamera Quickstore	MS Laborgeräte
Heizblock	Biometra

Inkubator Fricocell WTB Binder	MMM Medcenter Labotec
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Minigelapparatur HE33 Gel Circle	Hoeter
pH-Meter CG840	Schott
Schüttler Rotamax 120	Heidolph
Thermomixer compact	Eppendorf
Vortexer VF2	Jahnke & Kunkel
Waage PM 4600 AM50	Mettler Mettler
Zentrifuge	Eppendorf

2.16 Software

Tab. 2-6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software

Software	Hersteller
Axiovision 4.1.1	Zeiss
Endnote 9	Thomson
Illustrator 10	Adobe
Office 2003	Microsoft
Photoshop CS2	Adobe

3. Ergebnisse

Die Expression komplexer Kaskaden von Musterbildungsgenen unterteilen den frühen *Drosophila*-Embryo in bestimmte Bereiche entlang der anteroposterioren (AP) und dorsoventralen (DV) Achse und spezifizieren somit die Schicksale der an entsprechenden Positionen aus dem Neuroektoderm (NE) delaminierenden Stammzellen, den sogenannten Neuroblasten (NB) (zusammengefasst in Skeath und Thor, 2003). Das zentrale Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* setzt sich aus Gehirn und ventralem Nervensystem (VNS) zusammen, wobei bislang hauptsächlich das relativ einfach strukturierte VNS im Fokus der Untersuchungen dorsoventraler Musterbildungsvorgänge im frühen Embryo lag (u.a. zusammengefasst in Skeath, 1998; von Ohlen und Doe, 2000; Cornell und von Ohlen, 2003). Aufgrund der weitaus höheren Komplexität des Gehirns ist nur vergleichsweise wenig darüber bekannt, wie die Regionalisierung in DV-Achse dort reguliert wird (z.B. Urbach und Technau, 2003a; Urbach et al., 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, die genetischen Mechanismen der DV-Musterbildung im sich entwickelnden Gehirn, im Vergleich zum VNS aufzuklären. Hierzu wurde eine detaillierte Analyse der Expression der bekannten DV-Gene *vnd*, *ind*, *msh* und *EGFR* vorgenommen, sowie deren genetische Interaktionen entschlüsselt. Diese Untersuchungen umfassten auch die Suche nach weiteren Kandidatengenen, welche sowohl durch ihre eigene Expressionsdynamik als auch durch Interaktion mit den bekannten DV-Genen zur dorsoventralen Regionalisierung der frühen Gehirnanlage beitragen.

3.1 Unterschiede in der räumlich-zeitlichen Expression der DV-Gene

vnd, *ind* und *msh* im NE des VNS und der Gehirnanlage

Das Gehirn von *Drosophila*, welches aus dem procephalen Neuroektoderm (pNE) hervorgeht, wird von anterior nach posterior in Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC) unterteilt. Diese antero-posterioren Subregionen können weiterhin in bestimmte DV-Domänen untergliedert werden, basierend auf der spezifischen Expression der DV-Gene *vnd* (ventral), *ind* (intermediär) und *msh* (dorsal) (Urbach und Technau, 2003a). Der Expressionsbeginn von *vnd*, *ind* und *msh* sowie die

räumliche Anordnung ihrer Expressionsdomänen weist Unterschiede sowohl im NE von VNS und früherer Gehirnanlage, als auch zwischen den drei Gehirnneuromeren (TC, DC, PC) selbst auf. Aufgrund des sehr dynamischen Expressionsverlaufs, welchen die DV-Gene im pNE im Gegensatz zum VNS aufweisen, wurden die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster in TC, DC und PC anhand einer Dreifachfärbung gegen *vnd*, *ind* und *msh* während der frühen Gehirnentwicklung miteinander verglichen (Abb. 3-1).

Das erste im VNS exprimierte DV-Gen ist *vnd* (vor Stadium (St.) 5), gefolgt von *ind*- und etwas später *msh*-Expression, d.h. die zeitliche Abfolge der Genexpression verläuft von ventral nach dorsal (von Ohlen und Doe, 2000). Auch im NE des TC und DC wird zunächst nur *vnd* exprimiert (vor St. 5), im Gegensatz zum VNS folgt hier jedoch kurz darauf die Expression von dorsalem *msh*, dessen Expressionsdomäne direkt an die *vnd*-Domäne angrenzt (Abb. 3-1 A-B'). Des Weiteren wird *ind* vorerst nur im intermediären DC aktiviert (ab St. 6), co-exprimiert mit *vnd* (Abb. 3-1 C, C'), und erst viel später im intermediären TC (frühes St. 9), hier jedoch nicht bevor *vnd*-Expression weitestgehend aus dem intermediären NE verschwunden ist (Abb. 3-1 D, D') (Urbach und Technau, 2003a). Im St. 11 schließen sich *ind*- und *vnd*-Expression in DC (und TC) dann jedoch gegenseitig aus (Abb. 3-1 E, E'). In gleicher Weise beginnt *vnd*-Expression (ventral) vor *ind* (intermediär/dorsal) im NE des PC; entgegengesetzt der Situation in TC und DC grenzen die Domänen von *vnd* und *ind* jedoch nicht aneinander und *msh* wird in diesem Entwicklungszeitraum gar nicht im PC exprimiert (Abb. 3-1 C, C') (Urbach und Technau, 2003a). Insgesamt deuten diese Unterschiede im zeitlichen und räumlichen Erscheinungsbild der DV-Genexpressionen auch auf Abweichungen in ihrer Regulation und mögliche Unterschiede im Bezug auf Interaktionspartner der DV-Gene in den drei Gehirnneuromeren und dem VNS hin. In der Tat konnten wir in einer früheren Arbeit auch schon erste Gehirn-spezifische regulatorische Interaktionen zwischen den DV-Genen identifizieren (Urbach et al., 2006). Viele Fragen bezüglich möglicher Interaktionen (und weiterer Interaktionspartner) zwischen *vnd*, *ind* und *msh* in der frühen Gehirnanlage blieben jedoch offen und ihre Beantwortung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

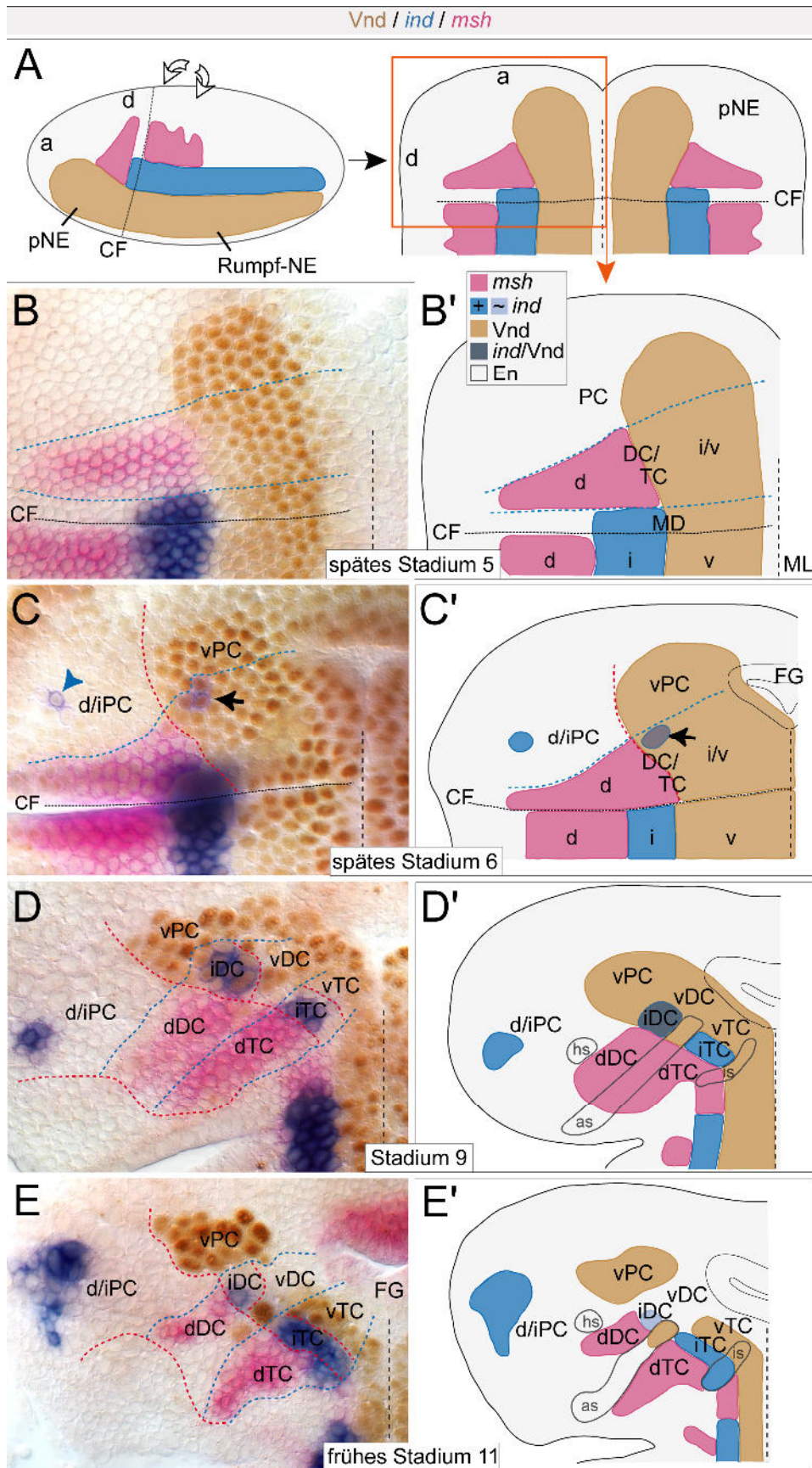


Abb. 3-1: Zeitlich-räumliche Expression der DV-Gene *Vnd*, *ind* und *msh* während der Entwicklung der frühen Gehirnanlage

Für alle Abbildungen, soweit nicht anders beschrieben, gilt folgendes: dargestellt werden

Ausschnitte von Filetpräparaten, welche das Kopfektoderm einer linken Gehirnhemisphäre zeigen; anterior ist oben und eine schwarze gestrichelte Linie kennzeichnet die ventrale Mittellinie (ML). Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Stadienangaben jeweils auf das mittlere Entwicklungsstadium.

(A) Schematische Darstellung eines *Drosophila*-Embryos („whole mount“) im späten Stadium (St.) 5 in lateraler Ansicht (anterior ist links), sowie eine ventrale Ansicht desselben Embryos als Filetpreparation (anterior ist oben), bei welchem Kopf und Rumpf, separiert durch die cephalo Furche (CF), entlang der dorsalen Mittellinie geöffnet wurden (siehe auch Material und Methoden, Abschnitt 2.11). Das Kopfektoderm der linken Gehirnhemisphäre inklusive procephalem Neuroektoderm (pNE), aus welchem sich das Gehirn entwickelt, ist durch Umrandung mit einem orangefarbenen Kästchen hervorgehoben. (B-E') Wildtypische Expression von *ind*, *msh* und *Vnd* (das Expressionsmuster von *Vnd*-Protein entspricht dem von *vnd*-mRNA, bleibt jedoch etwas länger aufrecht erhalten). B', C', D' und E' sind schematische Darstellungen von B, C, D und E. Unterschiedliche DV-Regionen sind durch rot gestrichelte Linien gekennzeichnet, Neuromergrenzen durch blau gestrichelte Linien angezeigt. (B, B') Im späten St. 5 werden *msh* (dorsal; d) und *Vnd* (intermediär/ventral; i/v) in aneinandergrenzenden NE-Domänen in Trito (TC)- und Deutocerebrum (DC) exprimiert, wohingegen im Protocerebrum (PC) nur *Vnd*-Expression detektierbar ist und *ind* noch in keinem der drei Gehirnneuromere aktiviert wurde. (C, C') Im späten St. 6 beginnt *ind*-Expression im intermediären DC (schwarzer Pfeil), co-exprimiert mit *Vnd*, sowie im intermediär/dorsalen PC (blaue Pfeilspitze, C). (D, D') *ind*-Expression im intermediären TC beginnt im frühen St. 9, einem Zeitpunkt, zu dem *Vnd* schon fast gänzlich aus dem entsprechenden NE verschwunden ist. (E, E') Im St. 11 sind *ind*- und *Vnd*-Expression im DC komplementär zueinander und *ind* wird zusätzlich in einem kleinen Bereich des dorsalen TC exprimiert. Die Engrailed (En)-Streifen in D' und E' kennzeichnen die posteriore Grenze jedes Gehirnneuromers (TC: is = interkalärer *en*-Streifen, DC: as = antennaler *en*-Streifen, PC: hs = *en* „head spot“). FG = Vorderdarmanlage („foregut“), MD = mandibulares Segment.

3.2 Dorsoventrale Regionalisierung der frühen Gehirnanlage durch

Expression von *Nkx6* und den DV-Genen *vnd*, *ind* und *msh*

Die durch spezifische Expression der DV-Gene (*vnd*, *ind*, *msh*) gegebene Untergliederung der frühen Gehirnanlage in distinkte dorsoventrale Domänen, ist im St. 9 besonders deutlich sichtbar (Abb. 3-1 D, D') (Urbach und Technau, 2003a). In Relation zu diesen Expressionsdomänen habe ich das Expressionsmuster von *Nkx6* untersucht (Abb. 3-2 A-L), da es, wie *vnd*, zur Familie der evolutionär konservierten *Nk(x)*-Homöoboxgene gehört, welche für Transkriptionsfaktoren codieren. *Nkx6*-Expression beginnt im St. 6 im pNE (Abb. 3-2 A, C) (siehe auch Uhler et al., 2002), in einer Region aus der später das intermediäre DC hervorgeht, und bis St. 8 vergrößert sich die *Nkx6*-Domäne weiter nach posterior hinein ins TC (siehe Abb. 3-11 B). Im St. 8 findet man ebenfalls Expression in der Hinterdarmanlage, sowie in den Vorläuferzellen der ventralen Mittellinie (ML). *Nkx6*-Expression im NE des VNS beginnt erst im frühen St. 9 und beschränkt sich auf die gnathalen Segmente (mandibular, maxillar und labial) (siehe auch Uhler et al., 2002). Im St. 8/9 weist die *Nkx6*-Expression deutlich segment-

spezifische Unterschiede im Kopf auf: *Nkx6* wird sowohl im ventralen (co-exprimiert mit *vnd*, Abb. 3-2 J) als auch intermediären NE (co-exprimiert mit *ind*, Abb. 3-2 K) des TC exprimiert, ist jedoch nur im intermediären DC (co-exprimiert mit *ind*, Abb. 3-2 K) zu finden und dementsprechend komplementär zu dorsal exprimiertem *msh* in TC und DC (Abb. 3-2 A, L). *Nkx6* ist zudem in bestimmten Subgruppen früh- und spät-entstehender trito- und deutocerebraler NB detektierbar (siehe Abb. 7-1 im Anhang), welche aus *Nkx6*-positivem NE entstehen (Abb. 3-2 D, E, F, L). Dies steht im Gegensatz zum VNS, wo einige ventrale und intermediäre NB ebenfalls *Nkx6* exprimieren (ab St. 10), jedoch aus *Nkx6*-negativem NE hervorgehen (Uhler et al., 2002). Im NE des größten Gehirnneuromers, dem PC, wird *Nkx6* ebenfalls nicht exprimiert, im St. 11 jedoch in einem einzigen protocerebralen NB detektierbar (Ppd5, Abb. 3-2 F).

Die durchgeführte Expressionsanalyse zeigt, dass ein hohes Level an *Nkx6*-Transkript und dessen Vorhandensein schon in frühen Embryonalstadien (ab St. 6) nur spezifisch im NE und in NB des TC und DC zu finden ist, was auf mögliche Unterschiede in der Funktion und Regulation von *Nkx6* zwischen Rumpf und Gehirn, sowie zwischen TC/DC und PC hinweist.

3.3 Gegenseitige Repression zwischen *Nkx6* und *Msh* sorgt für die

Stabilisierung der Grenze zwischen intermediärem und dorsalem NE in TC und DC

Wie bereits zuvor von Urbach und Technau (2003a) beschrieben, grenzen die Expressionsdomänen von *vnd* und *msh*, im Unterschied zum Rumpf, im NE des TC und DC aneinander (Abb. 3-2 B, C, L) und *msh* wird (intermediär/ventral) von *Vnd* reprimiert (Urbach et al., 2006). *vnd*-Expression wird relativ früh während der Entwicklung im intermediären sowie großen Teilen des ventralen NE in beiden Gehirnneuromeren herunterreguliert (Urbach et al., 2006), wodurch sich die Frage ergibt, wie die Repression von *msh* in dieser Region nach Verschwinden von *vnd* aufrechterhalten wird. *Nkx6*-Expression beginnt im intermediären TC und DC bevor *vnd* dort herunterreguliert und die Expression von *ind* (einem bekannten *msh*-Repressor im VNS; Weiss et al., 1998) aktiviert wird (Abb. 3-2 A, D und Abb. 3-3 B, C). Da *Nkx6* und *msh* komplementär zueinander exprimiert werden (Abb. 3-2 A und Abb. 3-3 A), bestand die Vermutung, dass *Nkx6* als Repressor von *msh* agieren könnte.

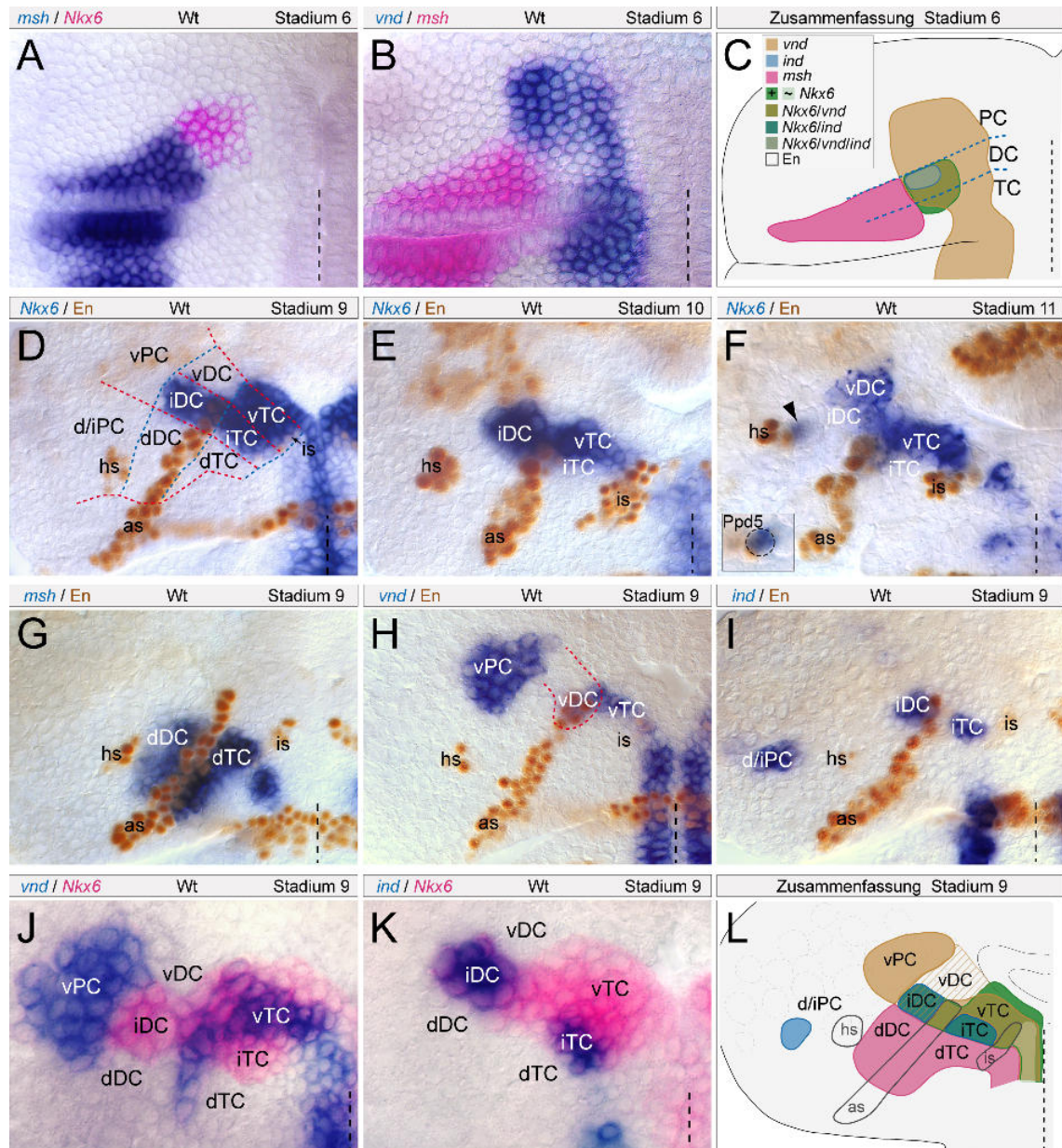


Abb. 3-2: Expression von *vnd*, *ind*, *msh* und *Nkx6* unterteilt die frühe Gehirnanlage von *Drosophila* in distinkte dorsoventrale Domänen

(A-C) *Nkx6/msh* (A) und *vnd/msh* (B) werden komplementär zueinander exprimiert, wie in (C) schematisch zusammengefasst (siehe Farbcode). (D-K) Expression von *Nkx6*, *msh*, *vnd* oder *ind*, teilweise kombiniert mit Engrailed. (D) Im St. 9 ist *Nkx6*-Expression im intermediären DC und intermediär/ventralen TC, jedoch nicht im PC zu finden. (E) Während St. 9/10, beginnt *Nkx6* langsam aus dem intermediären TC zu verschwinden. (F) Im St. 11 ist *Nkx6*-Expression zusätzlich im Neuroblasten (NB) Ppd5 (Pfeilspitze und vergrößerter Ausschnitt) des PC detektierbar. Im St. 9 wird *msh* im dorsalen (G), *vnd* im ventralen (H) und *ind* im intermediären (I) NE des TC und DC exprimiert. (J) Co-Expression von *Nkx6* und *vnd* im ventralen TC. (K) Co-Expression von *Nkx6* und *ind* im intermediären TC und DC. (L) Schematische Zusammenfassung der Expression dorsoventraler Musterbildungsgene (DV-Gene) im NE des embryonalen Gehirns im St. 9; die hellbraun-gestreifte Region deutet ein schwaches Level von Vnd-Protein an. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und zur Nomenklatur von Gehirn-NB siehe Urbach et al. (2003).

Diese Hypothese unterstützend, weisen Embryonen von *Nkx6*^{D25}-Mutanten im St. 10/11 ektopische *msh*-Expression im intermediären TC (70%, n = 20 Gehirnhemisphären (GHS)), sowie im intermediär/ventralen DC (95%, n = 20 GHS) auf (Abb. 3-3 D-E'). Zudem wurde *Nkx6* mithilfe der Treiberlinie *sca*-Gal4 (siehe UAS/Gal4-System, Abschnitt 2.6 in Material und Methoden) etwa ab St. 8 ektopisch im gesamten NE exprimiert, was zu einer Repression von *msh* im dorsalen NE des TC und DC führt (10% vollständige Repression, 90% starke Reduktion von *msh*, n = 35 GHS) (Abb. 3-3 F, F'). Hieraus folgt, dass *Nkx6* den Verlust von *vnd* kompensieren kann und an dessen Stelle als Repressor von *msh* agiert, um weiterhin dorsalisierende Signale aus dem intermediär/ventralen NE von TC und DC herauszuhalten.

Um festzustellen, ob Msh wiederum in der Lage ist, *Nkx6* im dorsalen TC und DC zu reprimieren, habe ich *Nkx6*-Expression in *msh*⁶⁸-Mutanten analysiert. In diesen Embryonen ist ektopische *Nkx6*-Expression im gesamten dorsalen NE von TC und DC zu finden (n = 28 GHS) (Abb 3-7 A, A', D, D'). Im umgekehrten Fall, wenn *msh* unter Verwendung von *Mata*-Gal4 ektopisch getrieben wird, ist eine stark reduzierte (83%, n = 18 GHS) und teilweise sogar gänzlich fehlende (17%, n = 18 GHS) *Nkx6*-Expression zu beobachten (Abb. 3-7 E, E').

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass *Nkx6* und *Msh* durch gegenseitige Repression die Grenze zwischen intermediärem und dorsalem NE in TC und DC aufrechterhalten.

3.4 *Msh* und *Ind* interagieren als gegenseitige Repressoren an der intermediär/dorsalen Grenze in TC und DC

Es konnte gezeigt werden, dass *msh*-Expression im intermediären NE (und in NB) des VNS durch *Ind* reprimiert wird, und dass in *ind*-Mutanten die Expression von *msh* in das intermediäre NE expandiert (Weiss et al., 1998; Skeath et al., 1999). Da *msh* und *ind* in TC und DC, vergleichbar dem VNS, in benachbarten Domänen exprimiert werden (Abb. 3-1 C-E') (Urbach und Technau, 2003a), scheinen Interaktionen zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren, welche jenen im Rumpf entsprechen, auch im pNE möglich.

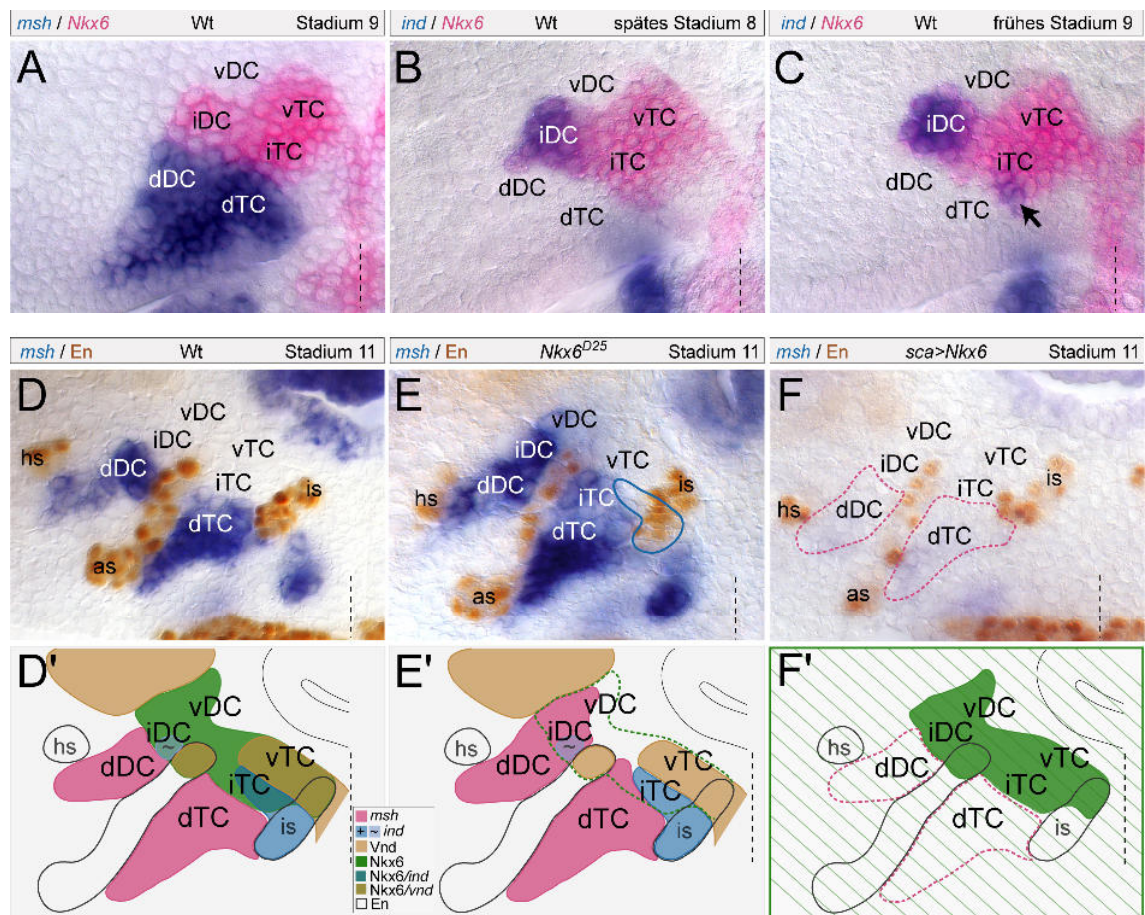


Abb. 3-3: Gegenseitige Repression von Nkx6 und Msh im NE von TC und DC

In den Schemata deuten farblich ausgefüllte Felder das Vorhandensein und leere, von einer gestrichelten Linie umrandete Felder das Fehlen bestimmter Genexpressionen an (siehe Farbcode); Schraffierungen über das gesamte Schema hinweg kennzeichnen die ektopische Expression eines Gens. Dies gilt, soweit nicht anders beschrieben, auch für alle folgenden Abbildungen. (A) *Nkx6* (in intermediär/ventralem TC und intermediärem DC) und *msh* (dorsales TC und DC) werden komplementär zueinander exprimiert. (B) Co-Expression von *Nkx6* und *ind* im intermediären DC. (C) *ind*-Expression im intermediären TC beginnt im frühen St. 9 (Pfeil), co-exprimiert mit *Nkx6*. (D-F') Die *En*-Domänen werden als Landmarke für die ventrale Grenze der *msh*-Expression in TC und DC verwendet. D', E' und F' sind schematische Darstellungen von D, E und F. (D,D') Wildtyp. Im Schema (D') ist auch die Expression von *Nkx6*-Protein im intermediären TC während St.10/11 berücksichtigt (Daten nicht gezeigt). (E, E') In *Nkx6*^{D25}-Mutanten wird *msh* im intermediären und schwach im ventralen DC, sowie zum Teil auch im intermediären TC dereprimiert; *ind*-Expression ist unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt. (F, F') *sca*-Gal4-getriebene ektopische Expression von *Nkx6* führt zu einer Repression von *msh* im dorsalen TC und DC. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst die Expression von *msh* in *ind*^{16.2}-Mutanten untersucht, welche gegenüber der Wildtypsituation jedoch unverändert bleibt (n = 25 GHS; Daten nicht gezeigt), was möglicherweise durch die Anwesenheit von zwei weiteren *msh*-Repressoren, nämlich *Vnd* (Urbach et al., 2006) und *Nkx6* (siehe Abschnitt 3.3), bedingt sein könnte. Beide Faktoren werden mit *ind* co-exprimiert (*vnd*

im intermediären DC, *Nkx6* im intermediären TC und DC) und sind dementsprechend ebenfalls komplementär zu der dorsalen *msh*-Domäne (Abb. 3-2 J-L). Die Expression von *vnd* und *Nkx6* im NE von TC und DC ist in *ind*^{16.2}-Mutanten nicht beeinträchtigt (n = 32 GHS; Daten nicht gezeigt) und scheint ausreichend, die *msh*-Expression auf den dorsalen Anteil des NE zu begrenzen. Die Herstellung einer *ind/Nkx6*-Doppelmutante war leider nicht möglich, da beide Gene auf demselben Chromosom nahe beieinander liegen, was eine erfolgreiche Rekombination aussichtslos erscheinen ließ. Daher wurde die Veränderung in der Expression von *msh* in *vnd*⁶- und *Nkx6*^{D25}-Mutanten, mit der *msh*-Expression in einer kleinen Defizienz (*Df(3L)XG3*) verglichen, in welcher die Loci von *ind* und *Nkx6*, jedoch von keinem anderen bekannten DV-Musterbildungsgen, fehlen. Wenn *Ind* also ebenfalls an der Repression von *msh* in TC und DC beteiligt ist, wäre eine stärkere *msh*-Expansion in intermediäres NE zu erwarten, ansteigend von *Nkx6*^{D25} (nur *Nkx6*-Expression fehlt), über *Df(3L)XG3* (*ind*- und *Nkx6*-Expression fehlen), bis hin zu *vnd*⁶ (*vnd*- und *Nkx6*-Expression fehlen vollständig, *ind*-Expression jedoch nur zum größten Teil; siehe auch Urbach et al., 2006). Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, zeigen *Nkx6*-mutante Embryonen eine Derepression von *msh* im gesamten intermediären DC, sowie auch in einem Anteil des intermediären TC, in welchem *ind*-Expression schon aus dem NE verschwunden ist (Abb. 3-3 E, E'). In Übereinstimmung mit obiger Vermutung ist zu beobachten, dass ektopische *msh*-Expression in *Df(3L)XG3*-Embryonen weiter in intermediäres TC hinein expandiert (n = 12 GHS) (Abb. 3-4 A-B'), es ist hingegen kein Unterschied im Hinblick auf das Ausmaß der *msh*-Derepression im DC zwischen *Nkx6*^{D25} und Embryonen der Defizienz zu finden (n = 12 GHS) (Abb. 3-3 E, E' und 3-4 B, B'). Dies könnte sich durch eine mögliche Restaktivität von *Vnd*, oder der Tatsache, dass *Nkx6* der wirksamere *msh*-Repressor im intermediären DC zu sein scheint, erklären lassen (siehe auch Diskussion Abschnitt 4.2). In *vnd*⁶-Mutanten, in welchen zusätzlich noch die Expression von *Nkx6* (Uhler et al., 2002) und (größtenteils) *ind* (Urbach et al., 2006) fehlt, ist eine ausgedehnte *msh*-Expression schon ab *st5/6* im kompletten intermediären NE des TC und DC zu finden (siehe Abb. 7-2 im Anhang). Das Ergebnis aus einem Überexpressionsexperiment, in welchem *ind* mittels *sca*-Gal4 ektopisch im gesamten NE getrieben wurde, liefert weitere Unterstützung für die Hypothese, dass *Ind* als Repressor von *msh* im pNE fungiert, da *msh*-Expression in diesen Embryonen im dorsalen TC und DC signifikant reduziert ist (13% vollständige Repression, 87% starke Reduktion von *msh*, n = 30 GHS) (Abb. 3-4 C, C').

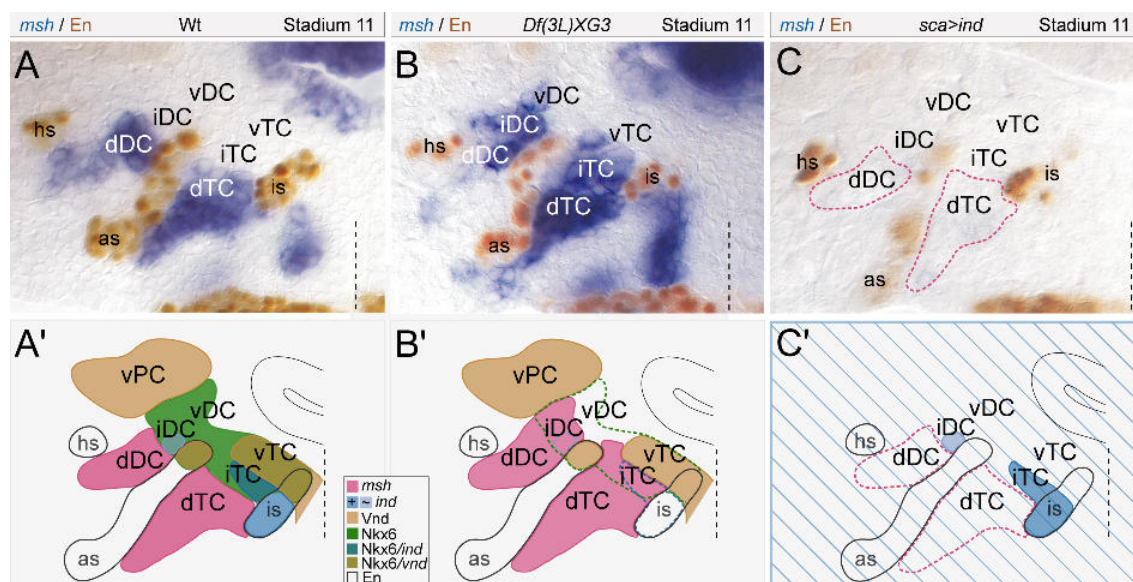


Abb. 3-4: Ind fungiert als Repressor von *msh* in TC und DC

(A-C') *msh/En* im Wildtyp und mutanten Embryonen. A', B' und C' sind schematische Darstellungen von A, B, und C. (A, A') Wildtyp. (B, B') In der Defizienz *Df(3L)XG3*, bei Abwesenheit von sowohl *ind* als auch *Nkx6*, expandiert *msh*-Expression vollständig in intermediäres TC und DC hinein. (C, C') *sca*-Gal4-getriebene ektopische Expression von *ind* führt zu einer starken Reduktion von *msh* im dorsalen TC und DC. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob Msh ebenso die Fähigkeit besitzt die Expression von *ind* im embryonalen Gehirn zu reprimieren, wie bereits für *Nkx6* gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.3). In *msh*⁶⁸-Mutanten expandiert die *ind*-Expression in TC und DC in dorsales NE hinein (n = 54 GHS) (Abb. 3-5 A-B'), wohingegen die *ind*-Domäne bei ektopischer *msh*-Expression (*sca*>*msh*) im TC stark reduziert (10% vollständige Repression, 90% starke Reduktion von *ind*, n = 80 GHS) (Abb. 3-5 C-D'), und im DC vollständig verschwunden ist (n = 80 GHS) (Abb. 3-5 D, D'); auch im PC ist die Expression von *ind* signifikant reduziert (23% starke Reduktion, 77% leichte Reduktion von *ind*, n = 80 GHS) (Abb. 3-5 D, D') Dies deutet darauf hin, dass *ind*-Expression im dorsalen TC und DC in der Tat von Msh reprimiert wird.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Ind und Msh als wechselseitige Repressoren in TC und DC fungieren, um die Grenze zwischen dorsalem und intermediärem NE zu stabilisieren, und obwohl Msh im frühen PC nicht endogen exprimiert wird, verfügt es dennoch über die Fähigkeit, *ind* dort zu reprimieren.

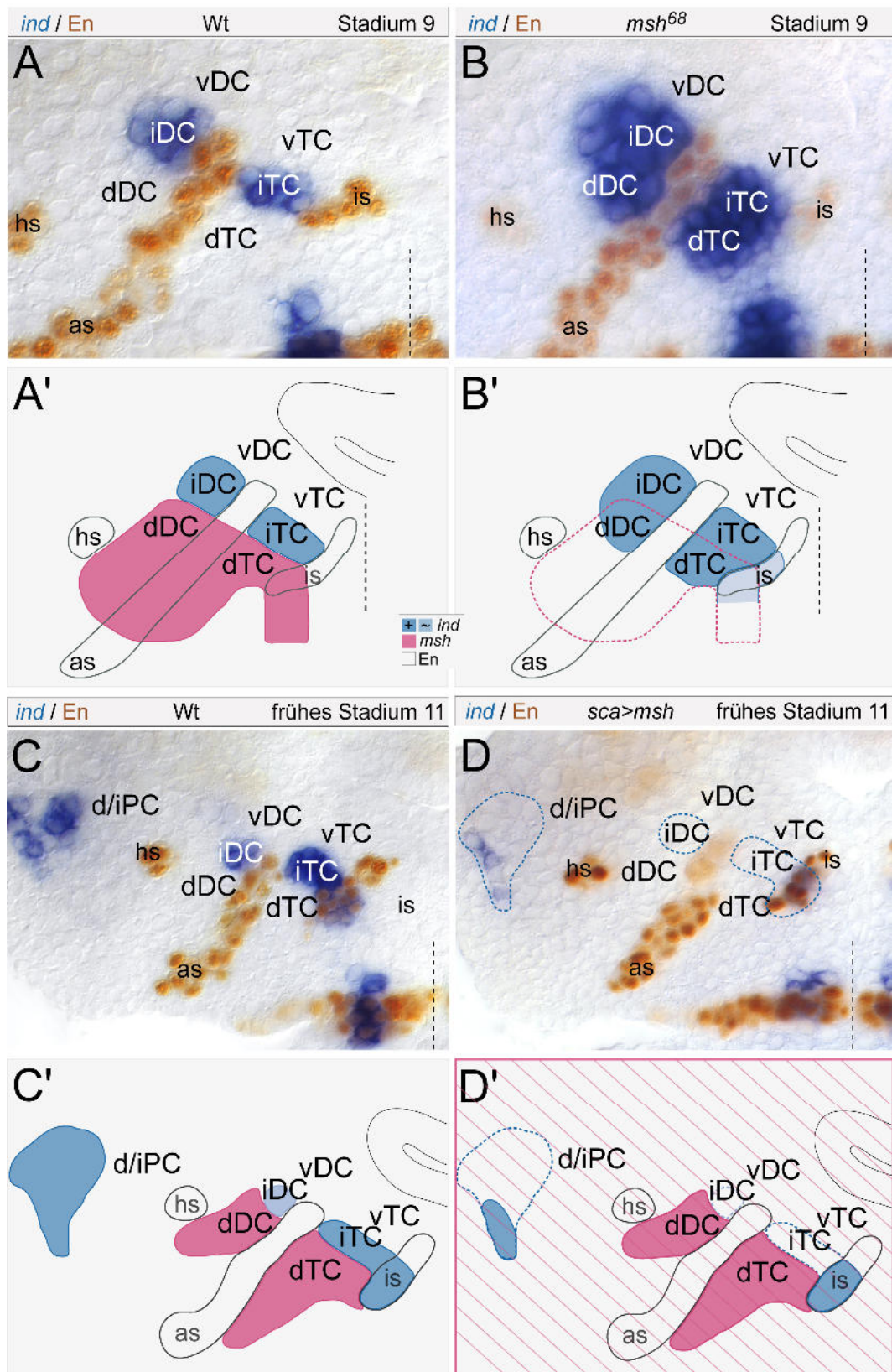


Abb. 3-5: Msh fungiert als Repressor von *ind* in TC und DC

(A-D') *ind/En* im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A', B', C' und D' sind schematische Darstellungen von A, B, C und D. (A, A') Wildtyp. (B, B') In *msh⁶⁸*-Mutanten expandiert *ind*-Expression in dorsales TC und DC hinein. (C, C') Wildtyp. (D, D') Mithilfe von *sca*-Gal4 ektopisch getriebenes *msh* führt zu einer starken Repression von *ind* in TC, DC und PC. hs = *en*

„head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

3.4.1 Msh stabilisiert die dorsale Grenze der *ind*-Expression im NE des VNS

Während der Untersuchung der *ind*-Expression in der Gehirnanlage von *msh*⁶⁸-Mutanten stellte sich heraus, dass *ind* auch im VNS nicht vollkommen unbeeinträchtigt bleibt. Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, ist Msh in der Lage *ind*-Expression in TC und DC zu reprimieren und dies scheint auch für das VNS zuzutreffen. Endogen wird *ind* nur in der intermediären NE-Spalte exprimiert (Abb. 3-6 A) (siehe auch Weiss et al., 1998), in *msh*⁶⁸-Mutanten findet sich *ind*-Expression jedoch auch partiell im dorsalen NE wodurch eine nach dorsal hin „unscharfe“ Grenze der *ind*-Domäne entsteht (blaue Pfeile in Abb. 3-6 B). Dies könnte bedeuten, dass Msh durch Repression von *ind* an der dorsal/intermediären Grenze für eine Präzisierung der *ind*-Domäne in dorsaler Richtung sorgt. Wie bereits bekannt, wird *msh* seinerseits im intermediären NE des VNS von Ind reprimiert (Weiss et al., 1998), sodass die Aufrechterhaltung der intermediär/dorsalen Grenze anscheinend, wie auch kürzlich für die ventral/intermediäre Grenze zwischen Vnd und Ind beschrieben (Zhao et al., 2007b), durch gegenseitige Repression von Ind und Msh in eben diesem Grenzbereich erreicht wird. Dass Msh auch im VNS in der Lage ist *ind* zu reprimieren, wird zudem durch den Befund in *sca*>*msh*-Embryonen deutlich, in welchen *ind* nach ektopischer Expression von *msh* fast vollständig aus dem intermediären NE verschwunden ist (Abb. 3-6 C).

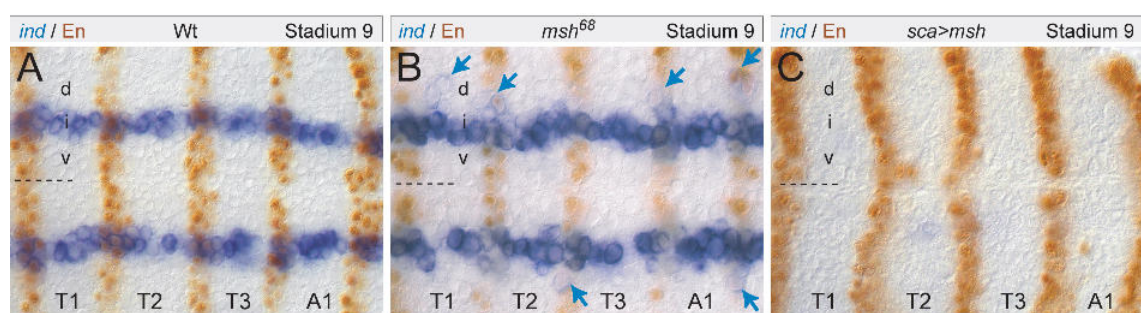


Abb. 3-6: Msh agiert als Repressor von *ind* im VNS

Dargestellt sind Filetpräparate, welche die Rumpfsegmente vom ersten thorakalen (T1) bis hin zum ersten abdominalen (A1) Segment zeigen; anterior ist links und eine schwarz gestrichelte Linie kennzeichnet die ventrale Mittellinie. (A-C) *ind/En* im Wildtyp und mutanten Embryonen. (A) Wildtyp; *ind* wird im intermediären NE des VNS exprimiert. (B) In *msh*⁶⁸-Mutanten wird *ind* teilweise im dorsalen NE exprimiert (blaue Pfeile), wodurch die dorsale Grenze der *ind*-Expression „unscharf“ erscheint. (C) *sca*-Gal4-getriebene ektopische Expression von *msh* führt zur Repression von *ind* im intermediären NE. v = ventral, i = intermediär, d = dorsal, T1-T3 = thorakale Segmente, A1 = erstes abdominales Segment.

3.5 Für die Aktivierung der *Nkx6*-Expression in TC und DC ist *Vnd* erforderlich

Die Beobachtung, dass *Nkx6* in spezifischen neuroektodermalen DV-Domänen in TC und DC exprimiert wird, wirft die Frage auf, wie *Nkx6*-Expression in diesen Regionen reguliert wird. Im ventralen TC findet man *Nkx6* co-exprimiert mit *vnd*, sowie eine Überlappung mit *ind* und *vnd* (transient) im intermediären TC und DC (Abb. 3-2 J, K). Wie schon im Vorfeld gezeigt werden konnte, ist *Vnd* ein positiver Regulator von *Nkx6* im Kopf-NE (Uhler et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesem Befund, ergibt die Analyse von *Nkx6*-Expression in *vnd⁶*-Mutanten ein vollständiges Fehlen von *Nkx6* im NE von TC und DC (n = 20 GHS) (Abb. 3-8 A-B'). Da *Vnd* für die Aktivierung von *ind* im intermediären DC benötigt wird (Urbach et al., 2006), wäre es möglich, dass *Vnd* die Expression von *Nkx6* indirekt über *ind* steuert. In *ind^{16.2}*-Mutanten zeigt sich *Nkx6*-Expression aber weder im TC noch im DC beeinträchtigt (n = 16 GHS; Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet dass *Nkx6* von *Vnd* und nicht von *Ind* abhängig ist. Andersherum besteht hingegen die Möglichkeit, dass *ind*-Expression von *Nkx6* beeinflusst werden könnte. Da sich diese Vermutung nach Betrachtung der *ind*-Expression in *Nkx6^{D25}*-Mutanten jedoch nicht bestätigt (n = 26 GHS; Daten nicht gezeigt), ist es wahrscheinlich, dass sowohl *Nkx6* als auch *ind* im intermediären DC, parallel durch *Vnd* reguliert werden.

3.5.1 *Nkx6* reprimiert *ind*-Expression in intermediären NB des VNS

In der frühen Gehirnanlage scheinen *Nkx6* und *ind* keinen Einfluss aufeinander zu haben (siehe Abschnitt 3.5), obwohl sie im NE von TC und DC co-exprimiert werden (Abb. 3-2 C, K, L) und gemeinsam für die Repression von *ems* im intermediären DC sorgen (beschrieben in Abschnitt 3.10). Auch im VNS ist keines der beiden Gene notwendig für die Aktivierung des jeweils anderen und *Nkx6* bleibt sowohl in *ind^{16.2}*-Mutanten als auch bei Überexpression von *ind* (mithilfe von *sca*-Gal4) unbeeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). In *Nkx6^{D25}*-Mutanten ist jedoch zu beobachten, dass intermediäre NB im St. 11 eine verstärkte *ind*-Expression aufweisen (Abb. 3-7 A-B'); zudem bleibt *ind*-Expression in den NB 3-2 und 4-2, welche im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt eigentlich *Nkx6* exprimieren (Uhler et al., 2002), auch länger aufrecht erhalten (in Abb. 3-7 A' und B' mit orange gestrichelten Kreisen umrandet). Nach ektopischer Expression von *Nkx6* (*sca*>*Nkx6*) ist *ind* in keinem der intermediären NB mehr

detektierbar (Abb. 3-7 C). Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass *Nkx6* in intermediären NB des VNS als Repressor von *ind* agiert.

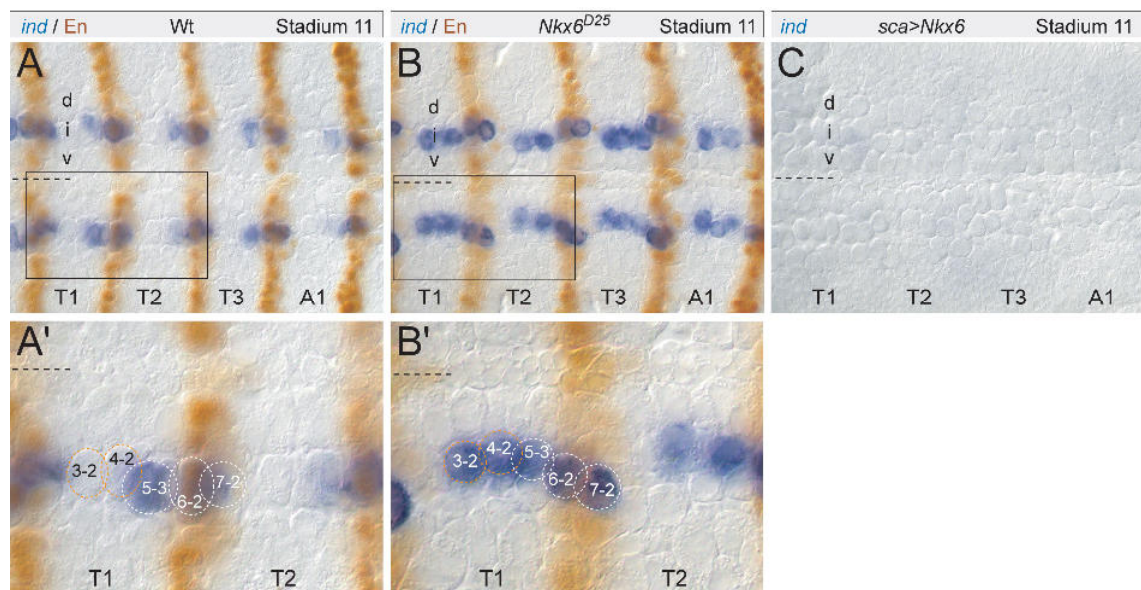


Abb. 3-7: Repression von *ind* durch *Nkx6* in intermediären NB des VNS

Dargestellt sind Filetpräparate, welche die Rumpfsegmente vom ersten thorakalen (T1) bis hin zum ersten abdominalen (A1) Segment zeigen; anterior ist links und eine schwarz gestrichelte Linie kennzeichnet die ventrale Mittellinie. (A, A') Expression von *ind* und *En* im Wildtyp; im St. 11 wird *ind* nur noch in drei (von fünf) intermediären NB (NB; NB5-3, NB6-2, NB7-2) exprimiert. (B, B') In *Nkx6^{D25}*-Mutanten kommt es in NB3-2 und NB4-2 (mit orange gestrichelten Kreisen umrandet) zu einer Derepression von *ind*. (C) Nach ektoptischer Expression von *Nkx6* (getrieben mit *sca*-Gal4) ist *ind* in keinem intermediären NB mehr detektierbar. v = ventral, i = intermediär, d = dorsal, T1-T3 = thorakale Segmente, A1 = erstes abdominales Segment. Zur Nomenklatur von NB im VNS siehe Doe (1992), sowie Broadus und Doe (1995).

3.6 Vnd ermöglicht die Aktivierung von *Nkx6* in TC und DC durch

Repression von *msh*

Obwohl es Hinweise auf eine positive Regulation von *Nkx6* in TC und DC durch Vnd gibt (siehe auch Uhler et al., 2002), war bislang unklar ob diese direkt oder indirekt erfolgt. In beiden Gehirnneuromeren fungiert Vnd als Repressor von *msh* (Urbach et al., 2006) und in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Msh wiederum als Repressor von *Nkx6* agiert (siehe Abschnitt 3.3). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass *Nkx6* nur indirekt durch Vnd reguliert wird, und zwar durch Repression von *msh*. Dieser Vermutung entsprechend, ist keine *Nkx6*-Expression in *vnd⁶*-Mutanten zu finden, in welchen interessanterweise eine Derepression von *msh* im intermediär/ventralen TC und DC erfolgt (Abb. 3-8 B, B') (Urbach et al., 2006), analog der Situation nach ektoptischer

Expression von *msh* (Abb. 3-8 E, E'). Im Gegensatz dazu führt Überexpression von *vnd* zu einer Repression von *msh* (Urbach et al., 2006), und zudem lässt sich eine signifikante Expansion der *Nkx6*-Expression in dorsales NE des TC und DC hinein beobachten (n = 25 GHS) (Abb. 3-8 C, C'), ähnlich dem Phänotyp, welcher in *msh*⁶⁸-Mutanten für *Nkx6* beobachtet werden kann (Abb. 3-8 D, D'). Obgleich all diese Daten nahe legen, dass Vnd *Nkx6* nur indirekt durch Repression von *msh* reguliert, bleibt die Möglichkeit einer direkten Interaktion zwischen Vnd und *Nkx6* nicht ausgeschlossen. Um diese Frage zu klären, wurde die *Nkx6*-Expression in *vnd*⁶; *msh*⁶⁸-Doppelmutanten untersucht. Falls Vnd tatsächlich kein direkter Aktivator von *Nkx6* ist und nur für die Repression von *msh* benötigt wird, sollte *Nkx6* in eben diesen Embryonen in seiner endogenen Expressionsdomäne zu finden sein (trotz Abwesenheit von Vnd), sowie zusätzlich in dorsales NE expandieren, da die Repressorfunktion von Msh auf *Nkx6* in diesem genetischen Hintergrund ebenfalls fehlt. Exakt dieses Expressionsmuster zeigt *Nkx6* in *vnd*⁶; *msh*⁶⁸-doppelmutanten Embryonen im NE des TC und DC (n = 10 GHS) (Abb. 3-8 F, F'), woraus sich folgern lässt, dass Vnd die Expression von *Nkx6* durch Unterdrückung des *Nkx6*-Repressors *msh* ermöglicht.

3.7 Vnd reprimiert *msh* im intermediären DC und ermöglicht somit die Aktivierung der *ind*-Expression

In *vnd*-mutanten Embryonen ist keine *ind*-Expression im NE des DC und TC detektierbar (mit Ausnahme des posterioren TC in welchem *ind* spezifisch im interkalaren Engrailed-Streifen (*en-is*) exprimiert wird; Urbach et al., 2006; Abb. 3-9 A-B'). Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, ist Msh in der Lage *ind* in TC und DC zu reprimieren (Abb. 3-5 D, D') und es ist bekannt, dass *msh* in Abwesenheit von Vnd schon in St. 5/6 in intermediär/ventralem NE dereprimiert wird (Abb. 7-2 im Anhang), d.h. zu einem Zeitpunkt bevor endogene *ind*-Aktivierung in beiden Neuromeren stattfinden würde. Aufgrund dessen scheint es in *vnd*⁶-Mutanten möglich, dass ektopisches Msh sowohl die Aktivierung von *ind* im DC als auch in Teilen des TC verhindern könnte (Abb. 3-9 B, B'). Bereits in einer früheren Publikation stellten wir die Vermutung auf, dass *ind*-Expression im intermediären DC der positiven Regulation durch Vnd unterliegt, obwohl mithilfe von *sca*-Gal4 getriebener ektopischer Vnd-Expression keine Expansion von *ind* in dorsales DC herbeigeführt werden konnte, trotz erfolgter Repression von *msh* (Urbach et al., 2006).

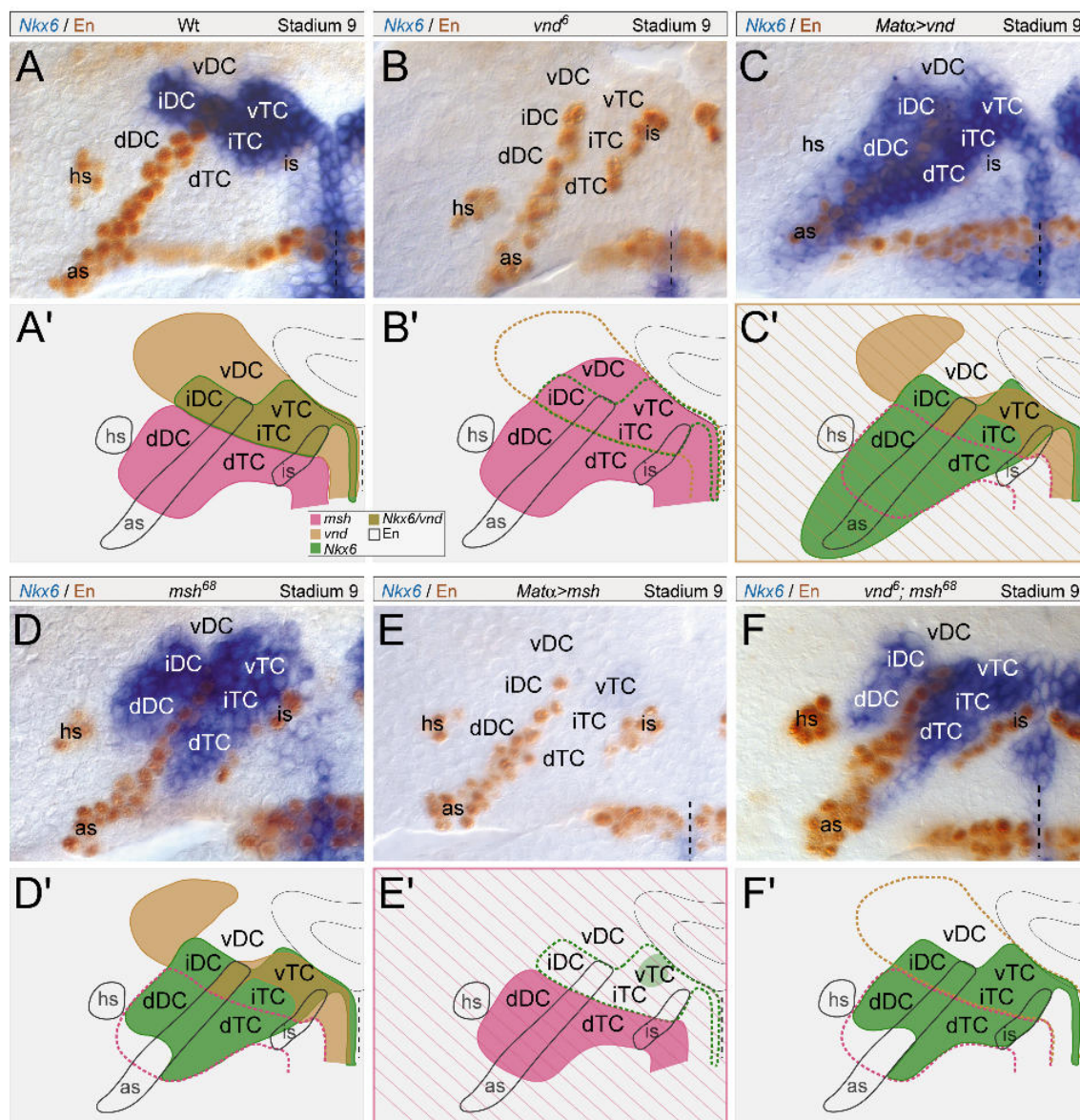


Abb. 3-8: *Nkx6*-Expression im NE des TC und DC nach Verlust oder ektopischer Expression von *vnd* und *msh*

(A-F') Expression von *Nkx6* und En im Wildtyp (A) und mutanten Embryonen (B-F). A'-F' sind schematische Darstellungen von A-F. (B, B') In *vnd*⁶-Mutanten fehlt *Nkx6*-Expression in TC und DC vollständig und *msh*-Expression expandiert in ventral/intermediäres NE hinein. (C, C') Ektopisches *vnd* (getrieben mit *Mata*-Gal4) reprimiert *msh* und *Nkx6*-Expression expandiert bis in das dorsalste NE hinein. (D, D') In *msh*⁶⁸-Mutanten expandiert *Nkx6* in dorsales NE hinein. (E, E') *Mata*-Gal4-getriebene Expression von *msh* führt (ab St. 9) zu einer Repression von *Nkx6* im ventral/intermediären TC und DC. (F, F') In *vnd*⁶;*msh*⁶⁸-Doppelmutanten ist *Nkx6*-Expression endogen im intermediär/ventralen TC und intermediären DC, sowie ektopisch im dorsalen TC und DC detektierbar. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Da die ektopische Expression von *vnd* mittels *sca*-Gal4 möglicherweise zu spät beginnt (nicht vor St. 8), wurde dieses Experiment mit der früheren Treiberlinie *Mata*-Gal4 (etwa ab St. 5/6) wiederholt. In der Tat ließ sich in *Mata*>*vnd*-Embryonen eine

Expansion von *ind* in dorsales NE hinein beobachten (n = 20 GHS) (Abb. 3-9 C-D'), was darauf hinweist, dass Vnd für die Aktivierung von *ind* im DC notwendig ist. Um herauszufinden, ob es sich hierbei um eine direkte oder indirekte Regulation handelt, wurde *ind*-Expression, analog zu der Situation für *Nkx6* (siehe Abschnitt 3.6), in der *vnd⁶; msh⁶⁸*-Doppelmutante untersucht. Unter diesen experimentellen Bedingungen zeigt sich, dass *ind* in seiner endogenen Domäne aktiviert wird (was Vnd als direkten Aktivator ausschließt) und außerdem, aufgrund fehlender Repression durch Msh, ektopisch im dorsalen NE des DC zu finden ist (n = 10 GHS) (Abb. 3-9 E, E'). Zusammengefasst weisen obige Ergebnisse darauf hin, dass Vnd die Aktivierung von *ind*-Expression im DC dadurch ermöglicht, dass der *ind*-Repressor Msh auf dorsales NE beschränkt bleibt.

Die Vermutung, dass Vnd im TC dagegen als Repressor von *ind* arbeitet (Urbach et al., 2006), kann durch die Beobachtung unterstützt werden, dass die tritocerebrale *ind*-Domäne nach ektopischer Expression von *vnd* (*Mata>vnd*) stark reduziert ist (45% vollständiger Verlust, 55% sehr starke Reduktion von *ind*, n = 20 GHS) (Abb. 3-9 D, D'; siehe auch Urbach et al., 2006). In *vnd⁶*-Mutanten ist eine Derepression von *ind* hingegen nur im ventralen Anteil des tritocerebralen Engrailed-Streifens (*en-is*) zu beobachten (Abb. 3-9 A-B'; siehe auch Urbach et al., 2006) und dieser geht ein Verlust von *msh*-Expression in besagten Zellen voraus (siehe Abb. 7-3 im Anhang). Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass *ind* in *vnd⁶*-Mutanten deshalb nicht in der Lage ist in das verbleibende ventrale TC zu expandieren, weil dies durch den *ind*-Repressor Msh verhindert wird. In Übereinstimmung damit, erfolgt eine Expansion von *ind* in ventrales NE im *vnd⁶; msh⁶⁸*-doppelmutanten Hintergrund (n = 20 GHS) (Abb. 3-9 E, E'). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *ind*-Expression in TC und DC auf unterschiedliche Weise durch Vnd affiziert wird: während Vnd im TC, ähnlich dem VNS (Weiss et al., 1998), als Repressor von *ind* fungiert (Urbach et al., 2006), gewährleistet Vnd die *ind*-Expression im DC, indem es für die Beschränkung des Repressors Msh auf dorsales NE sorgt.

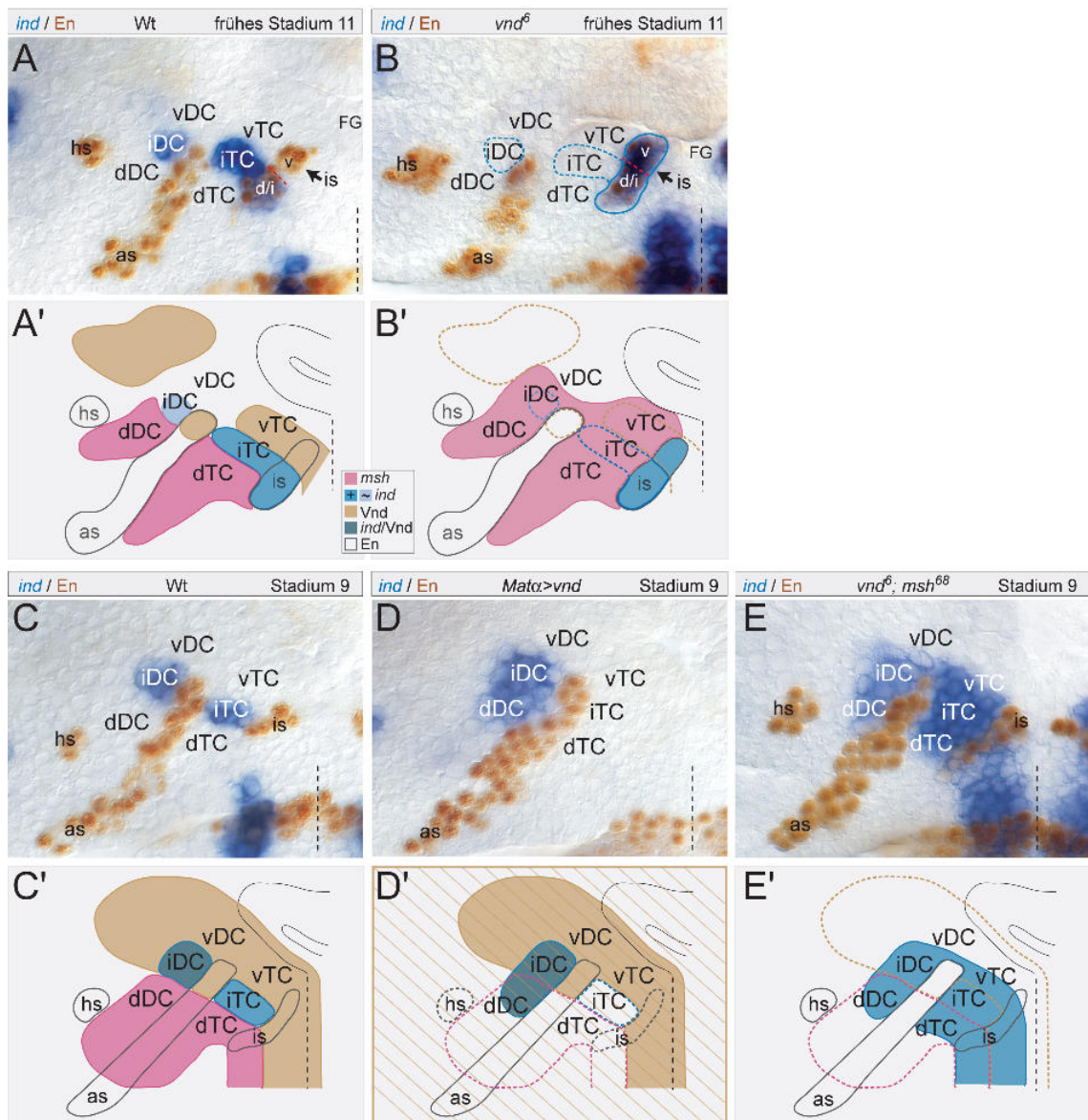


Abb. 3-9: Vnd reguliert die *ind*-Expression in TC und DC auf unterschiedliche Weise

(A-E') Expression von *ind* kombiniert mit *En* im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A'-E' sind schematische Darstellungen von A-E. (A, A') Wildtyp. (B, B') In *vnd*⁶-Mutanten wird *ind*-Expression in TC und DC von nach intermediär expandiertem *Msh* reprimiert (siehe B'), mit Ausnahme einer Region im posterioren TC, in welcher *ind* und *En* co-exprimiert werden; zudem ist auch ektopisches *ind* im ventralen Bereich des *en*-is detektierbar. (C, C') Wildtyp. (D, D') Bei Überexpression von *vnd* (mithilfe von *Mata*-Gal4) expandiert *ind* in dorsales DC hinein, wird im intermediären TC jedoch von *Vnd* reprimiert; *msh*-Expression wird in dorsalem TC und DC reprimiert (D'). (E, E') In *vnd*⁶; *msh*⁶⁸-Doppelmutanten wird *ind*-Expression normal aktiviert (intermediäres TC und DC), ist jedoch zusätzlich in ventralem und dorsalem TC, sowie in dorsalem DC dereprimiert. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = intercalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

3.8 Msh und Ind besitzen die Kompetenz, *vnd*-Expression in der frühen Gehirnanlage zu reprimieren

Im Unterschied zum VNS stoßen die Expressionsdomänen von *vnd* und *msh* in der frühen Gehirnanlage (St. 5) direkt an der Grenze zwischen intermediärem und dorsalem NE im zukünftigen TC und DC aneinander (Abb. 3-1 B, B'), was auf eine mögliche Interaktion dieser beiden Genen hindeutet. Wie schon zuvor gezeigt werden konnte, reprimiert *Vnd* im intermediär/ventralen NE die Aktivierung der *msh*-Expression und verhindert somit, dass diese Zellen (und die daraus hervorgehenden NB) ein dorsales Schicksal annehmen (Urbach et al., 2006; Abschnitt 3.3 und 3.4). Zur Beantwortung der Frage, ob umgekehrt *Msh* in der Lage ist, *vnd* in dorsalem NE zu reprimieren, wurde *vnd*-Expression bei Verlust von *Msh* sowie in der Überexpressions-Situation untersucht. In *msh*⁶⁸-Mutanten ist keine Expansion von *vnd* in dorsales NE des TC und DC zu beobachten (n = 23 GHS; Daten nicht gezeigt). Wenn *msh* jedoch mithilfe von *sca*-Gal4 (*sca*>*msh*) im gesamten NE ektopisch exprimiert wird, führt dies zu einer starken Reduktion von *vnd*-Signal im ventralen TC (vollständiger Verlust in 68%, starke *vnd*-Reduktion in 32%, n = 28 GHS), DC (vollständiger Verlust von *vnd*, n = 28 GHS) und PC (starke *vnd*-Reduktion, n = 28 GHS) (Abb. 3-10 A-B'). Diese Befunde zeigen, dass *Msh* die Kompetenz besitzt *vnd*-Expression in allen drei Gehirnneuromeren zu reprimieren. Obwohl *Msh* also in der Lage ist *vnd* zu reprimieren, scheint es dennoch nicht am Aufbau der dorsalen Grenze von *vnd*-Expression beteiligt zu sein.

Im TC grenzen die Expressionsdomänen von *ind* (intermediär) und *vnd* (ventral) ebenfalls aneinander (Abb. 3-1 D-E') (Urbach und Technau, 2003a), wohingegen beide Faktoren im intermediären NE des DC (jedoch nicht in dem hieraus hervorgehenden NB Dd1) transient co-exprimiert werden (Abb. 3-1 C-D') (Urbach und Technau, 2003a). Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von *Ind* auf die *vnd*-Expression, wurde die Expression von *vnd* zunächst in *ind*^{16.2}-Mutanten analysiert. Obwohl diese im NE von TC und DC in Abwesenheit von *Ind* unverändert bleiben (n = 24 GHS; Daten nicht gezeigt), kann dennoch in allen Fällen ektopisches *vnd* im intermediären NB Dd1 des DC detektiert werden (n = 24 GHS) (Abb. 3-10 C, C').

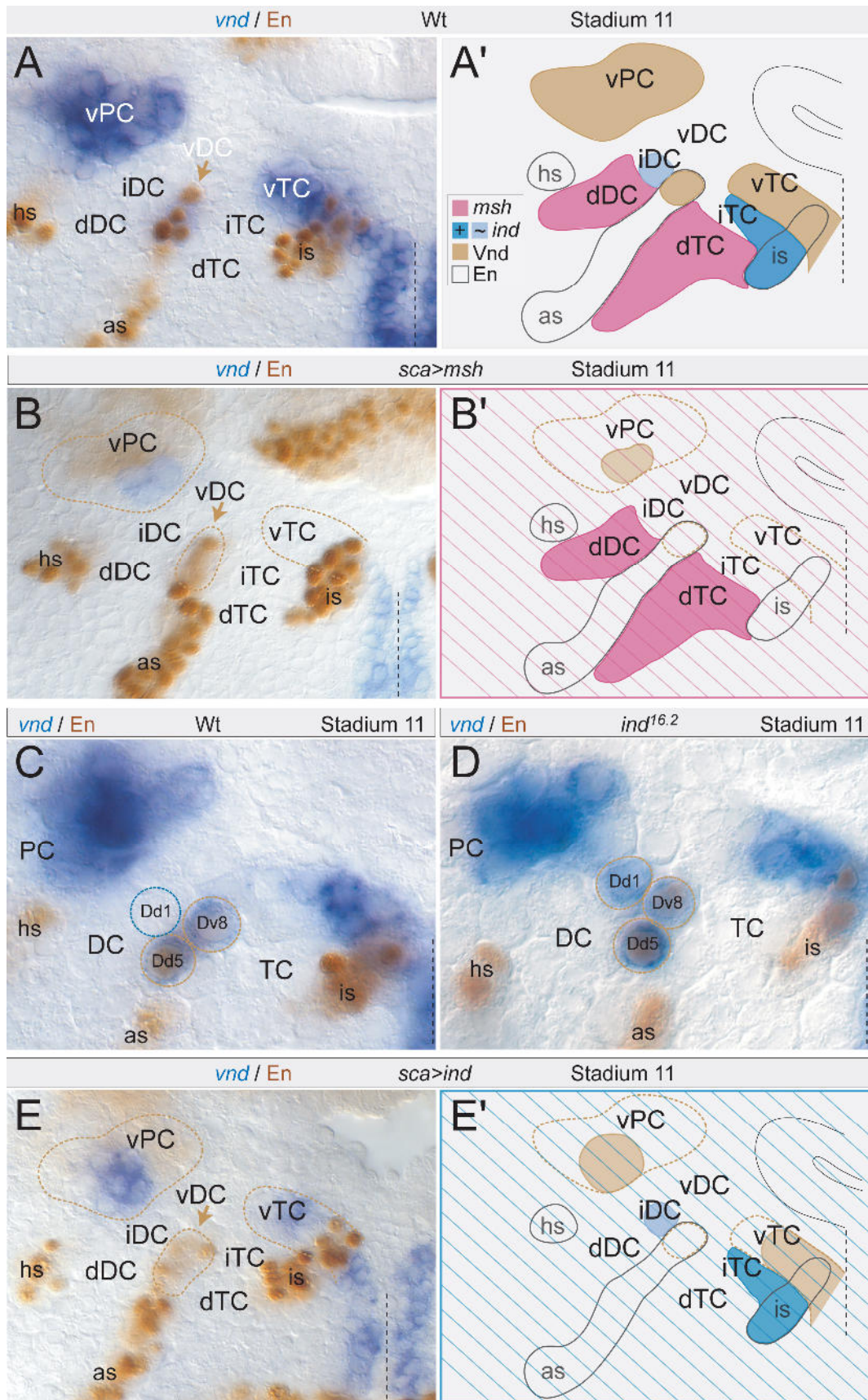


Abb. 3-10: Ind und Msh können als Repressoren von vnd fungieren

(A-E') Expression von *vnd* und *En* im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A', B' und E' sind schematische Darstellungen von A, B und E. (A, A') Wildtyp; *vnd* wird im ventralen TC und PC exprimiert und ist im ventralen DC auf den ventralen Anteil des antennalen *en*-Streifens

beschränkt (as, brauner Pfeil in A). (B, B') *sca*-Gal4-getriebene ektopische *msh*-Expression führt zu einer vollständigen Repression von *vnd* in TC und DC, sowie einer starken *vnd*-Reduktion im PC. (C) Im Wildtyp exprimieren die deutocerebralen NB Dd5 und Dv8 *vnd* (braun gestrichelte Kreise) und der NB Dd1 exprimiert *ind* (blau gestrichelter Kreis). (D) In *ind^{16.2}*-Mutanten wird *vnd* in dem intermediären NB Dd1 ektopisch exprimiert (braun gestrichelter Kreis). (E, E') *sca*-Gal4-getriebene Überexpression von *ind* reduziert *vnd*-Expression stark in TC und PC, sowie in den meisten Fällen vollständig im DC. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3. Bezüglich Nomenklatur der Gehirn-NB siehe Urbach et al. (2003).

Daraufhin wurde überprüft, ob ektopisches Ind (*sca>ind*) im ventralen NE in der Lage ist, die *vnd*-Expression zu beeinflussen. In dieser Situation zeigt sich *vnd*-Expression reduziert im NE des TC (vollständiger Verlust in 12%, leichte *vnd*-Reduktion in 65%, n = 26 GHS) und PC (92%, n = 26 GHS), sowie in den meisten Fällen vollständig fehlend im DC (in 89%, sowie starke Reduktion von *vnd* in 11%, n = 26 GHS) (Abb. 3-10 E, E'); die Repression von *vnd* durch Ind setzt allerdings nicht vor St. 9 ein. Obwohl Ind demzufolge die Fähigkeit besitzt, *vnd* im NE aller drei Gehirnneuromere zu reprimieren, erfolgt dies anscheinend endogen doch nur im NB Dd1. Somit scheint Ind nicht, wie für das VNS berichtet (Zhao et al., 2007b), an der Regulation der *vnd*-Expression im NE der Gehirnanlage beteiligt zu sein.

3.9 Das cephalen Lückengen *empty spiracles* ist erforderlich, um die

Expression von *Nkx6*, *ind* und *msh* in TC und DC zu aktivieren

Die scharfen Domänengrenzen der *Nkx6*-Expression im anterioren DC und posterioren TC (Abb. 3-2 D) deuten auf die Beteiligung von einem oder mehreren regulatorischen Faktoren hin, die entlang der AP-Achse arbeiten. Überraschenderweise stellte sich das cephalen Lückengen *empty spiracles* (*ems*) als entsprechender Faktor heraus. Die Expression von *ems* beginnt im Blastoderm in einem Streifen rings um das Procephalon (Walldorf und Gehring, 1992), welcher sich nachfolgend in drei kleinere Domänen aufteilt, die später Anteile des TC, DC und PC umfassen (siehe Abb. 3-11 C) (Hirth et al., 1995; Urbach und Technau, 2003a). Anhand von Doppelfärbungen stellte sich heraus, dass *Nkx6*-Expression im procephalen Ektoderm (dem späteren intermediären DC) innerhalb der *Ems*-Domäne beginnt (St. 6; Abb. 3-11 A) und dass kurz darauf die anterioren Grenzen von *Nkx6*- und *Ems*-Expression exakt übereinstimmen. *Nkx6* wird nachfolgend in Zellen des TC aktiviert, welche zuvor eine starke *Ems*-Expression

zeigen (Abb. 3-11 B). Im St. 8, wenn sich die *Nkx6*-Domäne in TC und DC vollständig aufgebaut hat, korrelieren auch die Grenzen von *Nkx6*- und *Ems*-Expression im posterioren TC exakt miteinander (Abb. 3-11 B). Folglich scheint *Ems* die AP-Begrenzung der *Nkx6*-Expression in TC und DC zu definieren, eine Beobachtung, die sich auch bei Überexpression von *vnd* (Abb. 3-8 C, C') oder in *msh*⁶⁸-Mutanten (Abb. 3-8 D, D') zeigt, in welchen die *Nkx6*-Domäne in dorsales NE hinein expandiert: in beiden Fällen erfolgt keine ektopische *Nkx6*-Expression über die AP-Grenzen der frühen *Ems*-Domäne hinaus. Da diese Expressionsdaten eine mögliche Funktion für *Ems* bezüglich *Nkx6*-Aktivierung implizieren, wurde die Expression von *Nkx6* in *ems*^{9H83}-Mutanten untersucht. Interessanterweise ist in solchen Embryonen weder *Nkx6*-Expression im TC noch im DC zu detektieren (n = 25 GHS) (Abb. 3-11 J), was darauf hindeutet, dass das AP-Musterbildungsgen *ems* für die Aktivierung von *Nkx6* benötigt wird. Neben *Nkx6* umfasst die frühe procephale *Ems*-Domäne ebenfalls diejenigen Regionen in TC und DC, in welchen *ind* und *msh* aktiviert werden (Abb. 3-11 D, E, G, H). *ind*-Expression beginnt (wie *Nkx6*) im intermediären DC, wo die anterioren Grenzen der *ind*- und *Ems*-Domänen genau miteinander korrespondieren (Abb. 3-11 D, E), weshalb sich vermuten lässt, dass *Ems* auch die anteriore Expansion der *ind*-Expression im DC regulieren könnte. Die Analyse von *ind* (n = 32 GHS) und *msh* (n = 24 GHS) in *ems*^{9H83}-Mutanten ergab, dass die Expression beider Gene sowohl im TC als auch im DC gänzlich fehlt (Abb. 3-11 K, L). Hieraus lässt sich schließen, dass *ems* ebenfalls bei die Aktivierung von *ind* und *msh* eine wichtige Rolle spielt.

Die zuvor geschilderten Resultate werfen die Frage auf, ob *Ems* allein in der Lage ist *Nkx6*, *ind* oder *msh* zu aktivieren. Da endogenes *ems* schon sehr früh (St. 5) im gesamten NE des TC und DC exprimiert wird, wurden die möglichen Auswirkungen auf *Nkx6*, *ind* und *msh* im PC und im NE des VNS bei Überexpression von *Ems* untersucht. In *Mata>ems*- bzw. *sca>ems*-Embryonen ist eine kleine Domäne ektopischer *msh*-Expression im zentralen PC zu finden (Abb. 3-12 A, B), wohingegen die Expression von *Nkx6* und *ind* unbeeinträchtigt erscheint (Daten nicht gezeigt). Auch im NE des VNS ist keine ektopische Expression der analysierten DV-Gene feststellbar (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Ems* zumindest in einem bestimmten Bereich des PC ausreicht, um *msh*-Expression zu initiieren, für die Aktivierung von *Nkx6* oder *ind* hier jedoch keine Rolle spielt. Möglicherweise ist dies auf eine Beeinträchtigung durch PC-spezifische Faktoren, wie beispielsweise den *ems*-Repressor *tailless* (Hartmann et al., 2001), oder im NE des VNS speziell vorkommende

Faktoren zurückzuführen, wo *ems*-Funktion durch die Aktivität homöotischer Gene reprimiert wird (Schöck et al., 2001). Überdies scheint ein hohes Maß an Ems-Protein zu einem frühen Zeitpunkt ausschlaggebend zu sein, sodass Beginn und Intensität von ektopisch exprimierten Ems hier eventuell nicht ausreichen, um eine Aktivierung der DV-Gene zu induzieren. Dennoch lieferte die Analyse von *msh*⁶⁸-Mutanten einen Hinweis darauf, dass Ems tatsächlich als Aktivator von *Nkx6* fungieren könnte. Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, kann in *msh*⁶⁸-Mutanten eine Expansion von ektopischem *Nkx6* in das vollständige dorsale NE des TC und DC beobachtet werden (Abb. 3-8 C, C'). Da Ems ebenfalls in dieser NE-Region exprimiert wird (Abb. 3-11 A, B), ist es möglicherweise in der Lage, *Nkx6* in Abwesenheit von Msh dorsal zu aktivieren.

3.10 *ems*-Expression im intermediären DC wird durch einen negativen

Rückkopplungs-Mechanismus zwischen Ems und *Nkx6*/Ind reguliert

Ab St. 9 werden Ems und *Nkx6* bzw. Ems und *ind* in zueinander komplementären NE-Domänen (sowie korrespondierenden NB-Subpopulationen) in TC und DC exprimiert (Abb. 3-11 C, F und Abb. 3-14 A), was die Möglichkeit beinhaltet, dass einer oder auch beide Faktoren beginnen könnten, *ems* zu reprimieren. Daher wurde Ems-Expression in *Nkx6*^{D25}- und *ind*^{16.2}-Mutanten, sowie in der jeweiligen Überexpressions-Situation (unter Verwendung von *sca*- und *Mata*-Gal4) analysiert. Die Expression von Ems bleibt jedoch unter allen oben genannten Bedingungen unverändert (Daten nicht gezeigt), was zumindest darauf hinweist, dass weder Ind noch *Nkx6* allein ausreicht, um *ems* zu reprimieren. Dagegen zeigt sich bei Abwesenheit beider Faktoren in der Defizienz *Df(3L)XG3* eine spezifische Derepression von Ems im intermediären DC, einer Region, in welcher *ind* und *Nkx6* normalerweise co-exprimiert werden (Abb. 3-2 K, L). Eine Derepression von Ems in defizienten Embryonen ist jedoch nicht vor St. 10 zu beobachten (vollständige Derepression in 44%, starke Derepression in 56%, n = 25 GHS) (Abb. 3-12 C, D), da bis zu diesem Zeitpunkt noch Vnd im entsprechenden NE zu finden ist (Urbach et al., 2006). Da Vnd während der frühen Gehirnentwicklung als *ems*-Repressor agiert (siehe Abschnitt 3.11), später jedoch aus dem intermediären DC verschwindet, liegt die Vermutung nahe, dass (die von Vnd initiierte) *ems*-Repression nachfolgend von Ind und *Nkx6* gemeinsam aufrecht erhalten wird.

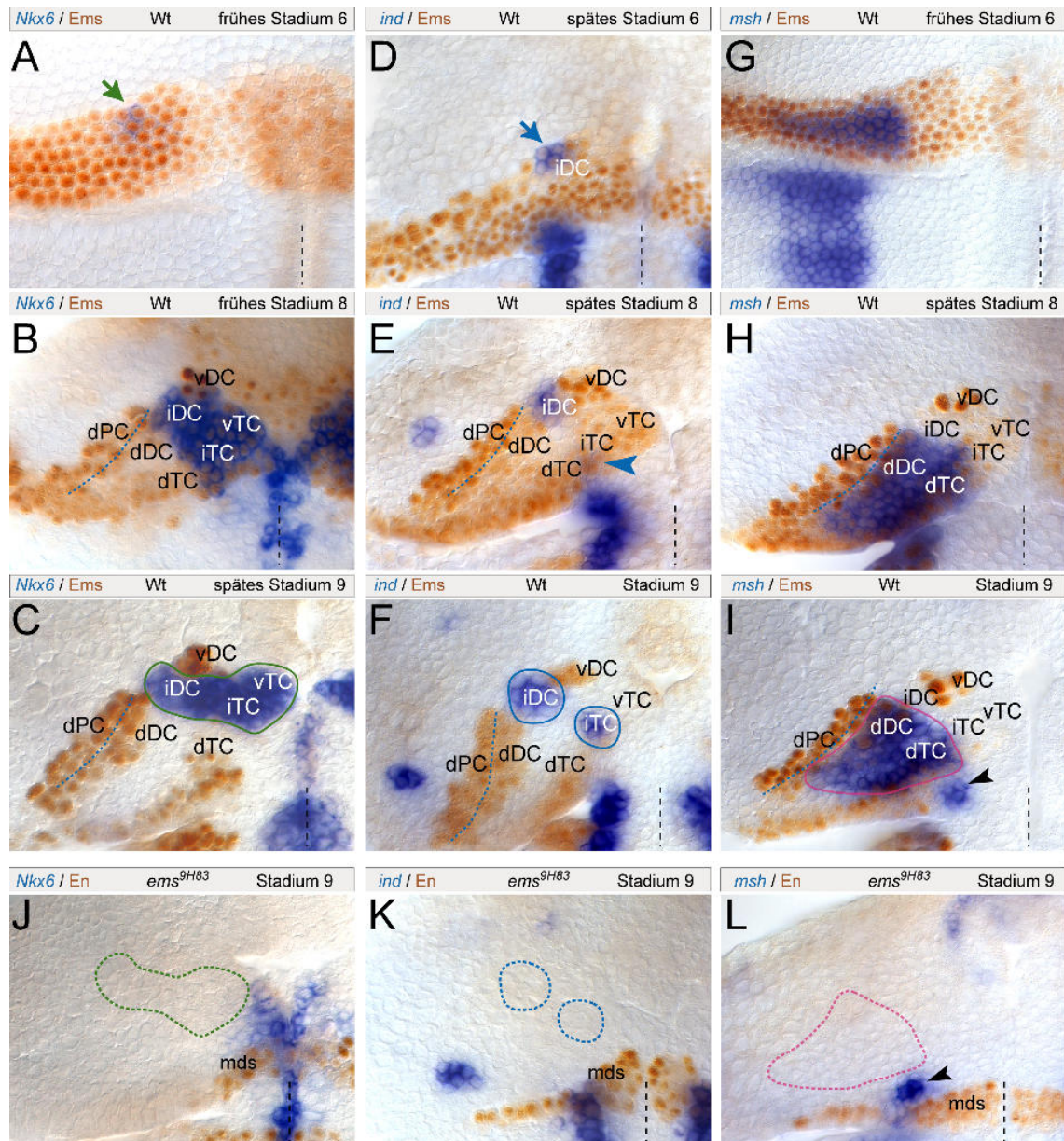


Abb. 3-11: Ems reguliert die Expression von *Nkx6*, *ind* und *msh* im NE des TC und DC

(A-C) *Nkx6*-Expression beginnt im intermediären DC (Pfeil), co-exprimiert mit Ems (A), und wird nachfolgend im intermediären und ventralen TC aktiviert (B). Im späten St. 9 schließen sich die Expressionsdomänen von Ems und *Nkx6* in TC und DC gegenseitig aus (C). (D-F) Die Expression von *ind* beginnt im intermediären DC (Pfeil), co-exprimiert mit Ems (D). (E) Ems-Expression im intermediären DC ist reduziert und *ind*-Expression beginnt nun auch im intermediären TC (Pfeilspitze). (F) *ind* und Ems werden in TC und DC komplementär zueinander exprimiert. (G-I) *msh*-Expression beginnt im dorsalen NE, überlappend mit der Ems-Domäne (G). Im St. 8/9 ist Ems-Expression größtenteils aus der *msh*-Domäne verschwunden (H, I; die Pfeilspitze markiert die mandibulare *msh*-Expression). (J-L) *Nkx6* (J), *ind* (K) oder *msh* (L) kombiniert mit En. In *ems*^{9H83}-Mutanten werden *Nkx6*, *ind* und *msh* weder im NE des TC noch im DC aktiviert (die fehlenden Expressionsdomänen sind durch gestrichelte Linien angedeutet). hs = en „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen, mds = mandibularer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Zusammengenommen spricht dies für die Regulation der *ems*-Expression durch einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus („negative-feedback loop“) im intermediären DC, wobei Ems benötigt wird, um seine eigenen (späteren) Repressoren Nkx6 und Ind zu aktivieren.

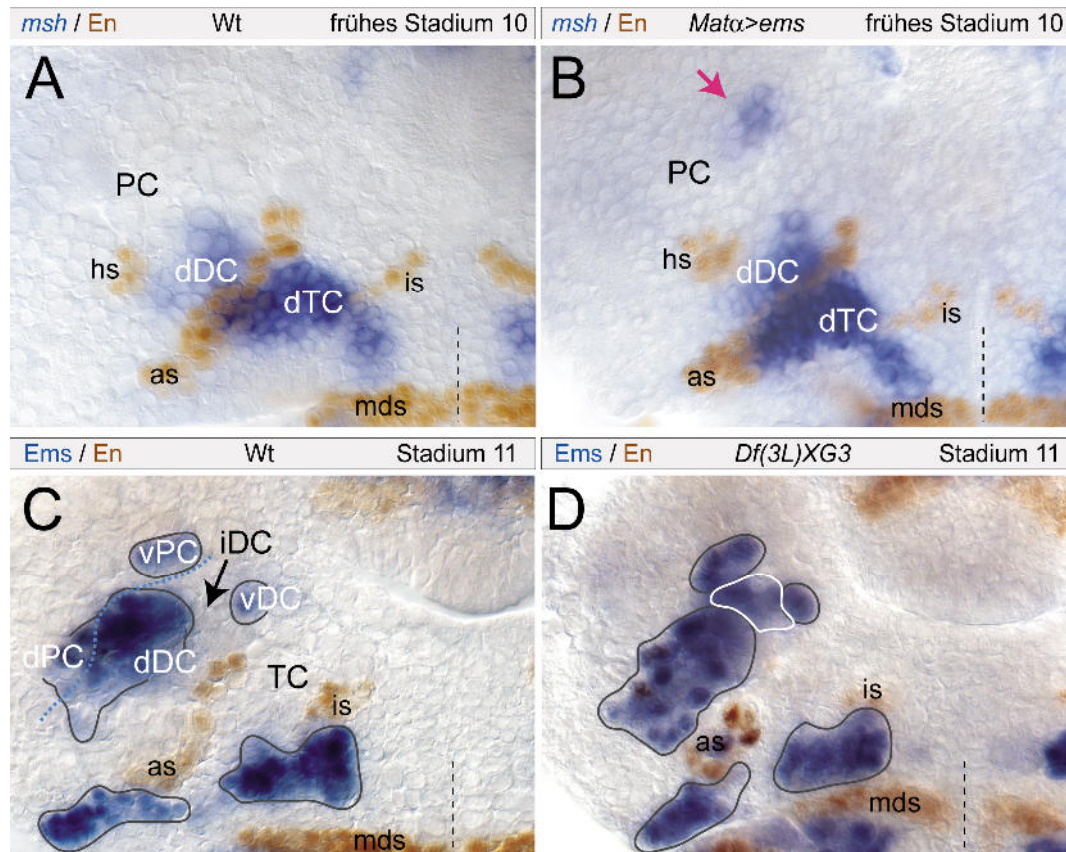


Abb. 3-12: Ems ist in der Lage, ektopische *msh*-Expression im PC zu induzieren und wird im intermediären DC durch Nkx6 und Ind reprimiert

(A, B) Expression von *msh* und *En* im Wildtyp (A) und bei Überexpression von *ems* (B; unter Verwendung von *Mata*-Gal4). (B) Bei Überexpression von *ems* ist eine ektopische *msh*-Expressionsdomäne im ventralen PC zu beobachten (Pfeil). (C, D) Expression von Ems und *En* im Wildtyp (C) und in der Defizienz *Df(3L)XG3* (D); die Ems-Domänen sind hellgrau umrandet. (D) In der Defizienz ist eine ektopische Expression von Ems im intermediären DC zu finden (weiß umrandet). hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen, mds = mandibularer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

3.11 Vnd und Ems agieren im frühen NE des TC und DC als gegenseitige Repressoren

vnd spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und Spezifizierung von Gehirn-NB. Im Unterschied zum Rumpf unterliegt die *vnd*-Expression im sich entwickelnden Gehirn einer starken Dynamik und wird schrittweise auf drei ventrale Domänen im posterioren

TC, DC und PC beschränkt (Sprecher et al., 2006; Urbach et al., 2003). Es stellte sich heraus, dass *vnd* auch transient im intermediären NE des TC und DC exprimiert wird (Abb. 3-1 C, C'), wodurch eine frühere Hypothese bestätigt werden kann, nach welcher die in *vnd*⁶-Mutanten beobachteten Defekte in Bildung und Spezifizierung intermediärer NB ebenfalls zell-autonom verursacht werden (Urbach et al., 2006). Dennoch konnte bisher nicht geklärt werden, wie die Expression von *vnd* im intermediären und großen Teilen des ventralen NE in TC und DC herunterreguliert wird. Wie sich zeigte, ist das cephalo Lückengen *ems* auch an der Regulation von *vnd*-Expression im embryonalen Gehirn beteiligt. In Doppelfärbungen gegen das Ems-Protein kombiniert mit einer ISH gegen *vnd*-mRNA ist zu beobachten, dass Ems und *vnd* zunächst (ab St. 5) im NE des späteren intermediär/ventralen TC und DC überlappend exprimiert werden (Abb. 3-13 A, A'). Während St. 6/7 beginnt die *vnd*-Expression im DC innerhalb der Ems-Domäne im intermediären und in verschiedenen Bereichen des ventralen NE verloren zu gehen (Abb. 3-13 B-C'). Die Reduktion von *vnd*-Expression zu diesem frühen Zeitpunkt, weist auf eine mögliche Repression von *vnd* durch Ems hin. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde zunächst die Expressionsdynamik von *vnd* in *ems*-mutanten Embryonen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die *vnd*-Expression (mindestens bis St. 11) in eben diesen NE-Domänen in TC und DC aufrecht erhalten bleibt (n = 26 GHS) (Abb. 3-13 I, J), in denen *vnd*-Expression normalerweise zwischen St. 6-9 herunterreguliert wird (Abb. 3-13 A-E'). Daraus folgt, dass Ems benötigt wird, um *vnd* im intermediären sowie weiten Teilen des ventralen NE in TC und DC zu reprimieren. Ems sorgt jedoch nicht für die vollständige Repression von *vnd* im zukünftigen ventralen NE des TC und DC. Interessanterweise ist nämlich zu beobachten, dass Zellen mit einem hohen Level an *vnd*-mRNA beginnen, Ems-Expression im St. 7/8 zu verlieren (Abb. 3-13 C, C'). Demzufolge teilt sich während St. 8 das verbliebene Ems/*vnd*-exprimierende NE schließlich in Ems- oder *vnd*-positive Subdomänen auf (Abb. 3-13 D, D'), sodass Ems- und *vnd*-Expressionsdomänen im St. 9, bei Einsetzen der Neurogenese, größtenteils komplementär zueinander vorliegen (Abb. 3-13 E, E'). Dies deutet darauf hin, dass Vnd umgekehrt auch als Repressor von *ems* agieren kann. Dieser Vermutung entsprechend, wird Ems in Abwesenheit von *vnd* ektopisch im intermediären DC, sowie im ventralen TC exprimiert (n = 30 GHS) (Abb. 3-13 F, G). Das entgegengesetzte Experiment zeigt, dass die Überexpression von *vnd* (*Mata*>*vnd*) zu einem fast vollständigen Verlust von Ems in TC und DC führt, mit Ausnahme einer kleinen Domäne im ventralen DC, in welcher Ems nur noch sehr schwach exprimiert

wird (n = 18 GHS) (Abb 3-13 F, H; siehe auch Urbach et al., 2006). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Vnd sowohl notwendig als auch ausreichend ist, um *ems* zu reprimieren. Insgesamt lassen obige Resultate darauf schließen, dass Ems und Vnd, nach einer Phase der blastodermalen Co-Expression, als gegenseitige Repressoren agieren.

3.12 *Nkx6*-Expression im PC ist abhängig von Ems, jedoch nicht von Vnd

Während der Expressionsanalyse von *Nkx6* konnte im St. 11 ein NB (Ppd5) im PC zusätzlich zu jenen in TC/DC entdeckt werden, wobei das darüber liegende NE jedoch kein *Nkx6* exprimiert (Abb. 3-2 F und Abb. 3-14 A). Neben *Nkx6* ist auch Ems-Expression im NB Ppd5, sowie dem NE aus welchem dieser NB delaminiert, detektierbar, wohingegen *vnd* nicht in Ppd5 exprimiert wird (Abb. 3-14 A, B). Wie zu erwarten, zeigt sich *Nkx6*-Expression in Ppd5 in *vnd*⁶-Mutanten daher auch nicht beeinträchtigt (n = 42 GHS) (Abb. 3-14 C). Dass *Nkx6* im PC einer von *vnd* unabhängigen Regulation unterliegt, wird zudem durch die Ergebnisse aus Überexpressionsexperimenten (*sca*>*vnd* und *Mata*>*vnd*) unterstützt, in welchen keine ektopische *Nkx6*-Expression im PC durch Vnd induziert werden kann (Abb. 3-7 C und Abb. 3-14 D; siehe auch Uhler et al., 2002). Demgegenüber fehlt *Nkx6*-Expression immer an Position des Ppd5 in *ems*^{9H83}-Mutanten (n = 22 GHS) (Abb. 3-14 E, Pfeil), was die Beteiligung von Ems an der Aktivierung von *Nkx6* im PC nahelegt. An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass die Entwicklung von Gehirn-NB in *ems*-Mutanten affektiert ist (Younossi-Hartenstein et al., 1997) und obwohl NB an Position von Ppd5 gebildet werden, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Verlust von *Nkx6*-Expression nur um einen sekundären Effekt durch das Fehlen von Ppd5 handelt.

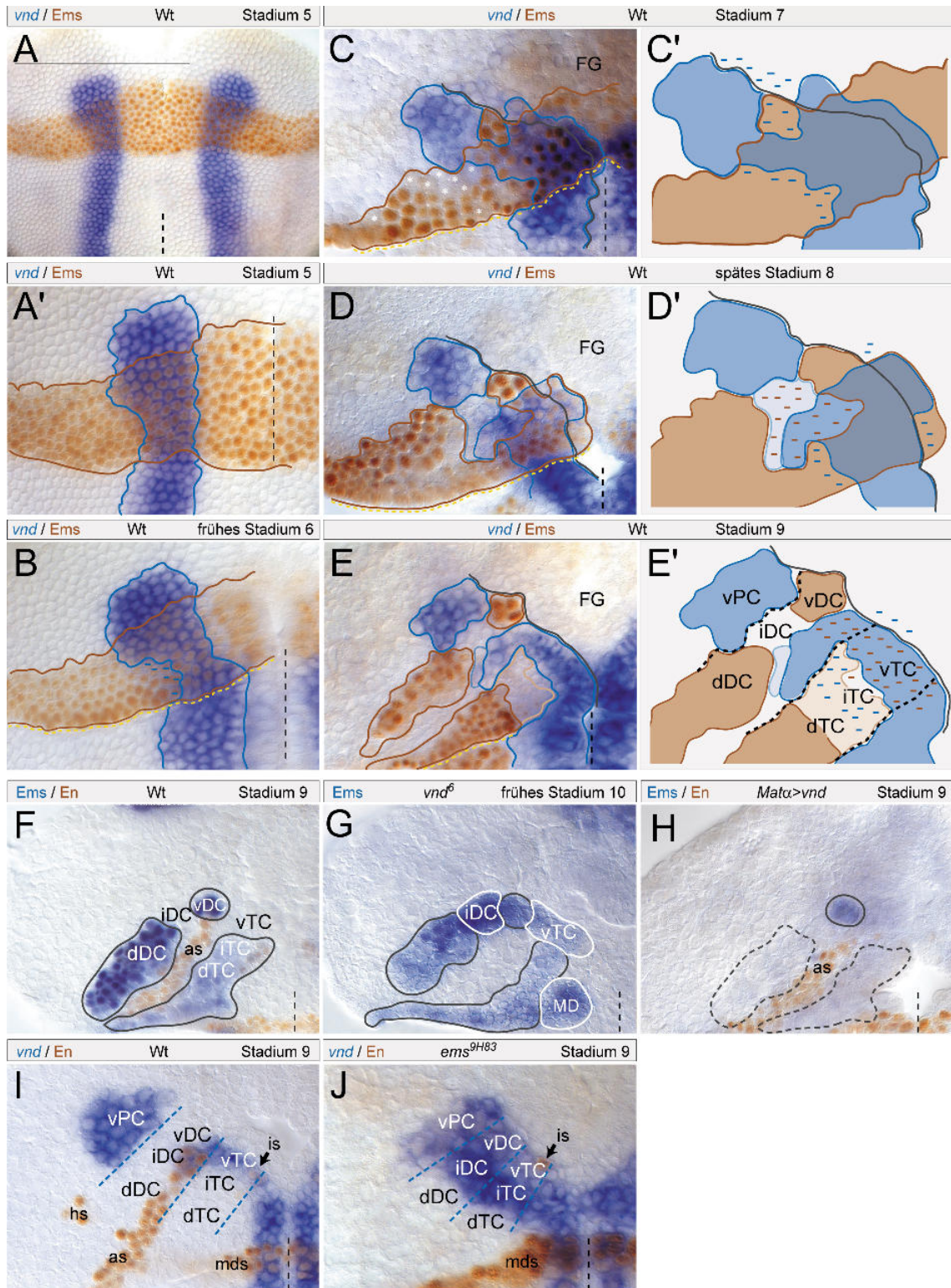


Abb. 3-13: Gegenseitige Repression reguliert *ems*- und *vnd*-Expression im NE von TC und DC

(A, A') *Ems* und *vnd* werden im St. 5 im NE des zukünftigen ventral/intermediären TC und DC co-exprimiert; A' zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von A. C', D' und E' sind schematische Darstellungen von C, D und E. (B-C') Im St. 6 beginnt *vnd*-Expression aus dem intermediären DC (B) und während St. 7 aus dem ventralen DC zu verschwinden (C, C'), was in den Schemata durch blaue Balken verdeutlicht ist. Weiße Sternchen markieren Zellen, welche sich in Mitose befinden und transient *Ems*- bzw. *vnd*-Expression verlieren. Die Expressionsdomänen von *Ems* sind in braun, diejenigen von *vnd* in blau umrandet (die Schemata in Abb. 3-13 stellen

die einzige Abweichung von dem in Abb. 3-1 eingeführten Farbcode dar, weil die dynamischen Veränderungen in den Expressionsdomänen von *Ems* und *vnd* ansonsten nur schwer nachvollziehbar sind). Hell- oder dunkelfarbige Bereiche deuten eine schwache bzw. starke Expression des jeweiligen Gens an. Die gelb gestrichelte Linie kennzeichnet die cephale Furche und die schwarze durchgezogene Linie markiert die Grenze zwischen Mesektoderm (direkt im Anschluß an die Vorderdarmanlage (FG)) und NE. (**D, D'**) Die *Ems*-Expression nimmt während St. 8 an Stärke ab (im Schema angezeigt durch braune Balken). (**E, E'**) Im St. 9 schließen sich die neuroektodermalen Expressionsdomänen von *Ems* und *vnd* gegenseitig aus. (**F-H**) Expression von *Ems* und *En* im Wildtyp (F), in *vnd*⁶-Mutanten (G) oder nach *Mata-Gal4*-getriebener Überexpression von *vnd* (H). Die endogenen *Ems*-Domänen sind in dunkelgrau, ektopische *Ems*-Expression in weiß umrandet. (G) In *vnd*⁶-Mutanten ist ektopische Expression von *Ems* im intermediären DC und ventralen TC zu beobachten. (H) Bei Überexpression von *vnd* fehlt *Ems* in TC und DC, mit Ausnahme einer kleinen *Ems*-exprimierenden Domäne im ventralen DC. (**I, J**) *vnd*- und *En*-Expression im Wildtyp (I) und in *ems*^{9H83}-Mutanten. (J) In Abwesenheit von *Ems* bleibt *vnd*-Expression im NE des ventral/intermediären DC und intermediären TC aufrecht erhalten. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen, mds = mandibularer *en*-Streifen, MD = mandibulares Segment. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Um herauszufinden ob *Msh* (welches in dem untersuchten Zeitfenster normalerweise nicht im PC exprimiert wird) auch im PC mit *Nkx6* interagieren kann, wurde *msh* in dieser Gehirnregion ektopisch exprimiert (*sca>msh*). Unter diesen Bedingungen fehlt *Nkx6*-Expression im NB Ppd5 (n = 24 GHS) (Abb. 3-14 F, Pfeilspitze und vergrößerter Ausschnitt), was zeigt, dass *Msh*, ähnlich der Situation in TC und DC, auch im PC in der Lage ist *Nkx6* zu reprimieren. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass *Ems* notwendig ist, um die Expression von *Nkx6* in dem protocerebralen NB Ppd5 zu induzieren. Im Gegensatz zu TC und DC, spielt *Vnd* keine Rolle bezüglich der protocerebralen Regulation der *Nkx6*-Expression, was möglicherweise mit dem Fehlen des *Nkx6*-Repressors *Msh* im frühen PC zusammenhängt.

3.13 Engrailed reprimiert *msh* im posterioren TC und DC

Wie sich während der Expressionsanalyse der DV-Gene herausstellte, geht die Expression von *msh* spezifisch in dem Engrailed (*En*)-exprimierenden NE des TC (*en-is*; St. 9/10) und DC (*en-as*; St. 10/11) verloren. Hierdurch wird die frühe *msh*-Domäne (welche das dorsale NE des mandibularen Segments (MD), sowie von TC und DC als durchgehende Domäne umfasst; Abb. 3-1 D, D') in drei kleinere Domänen aufgeteilt (Abb. 3-1 E, E').

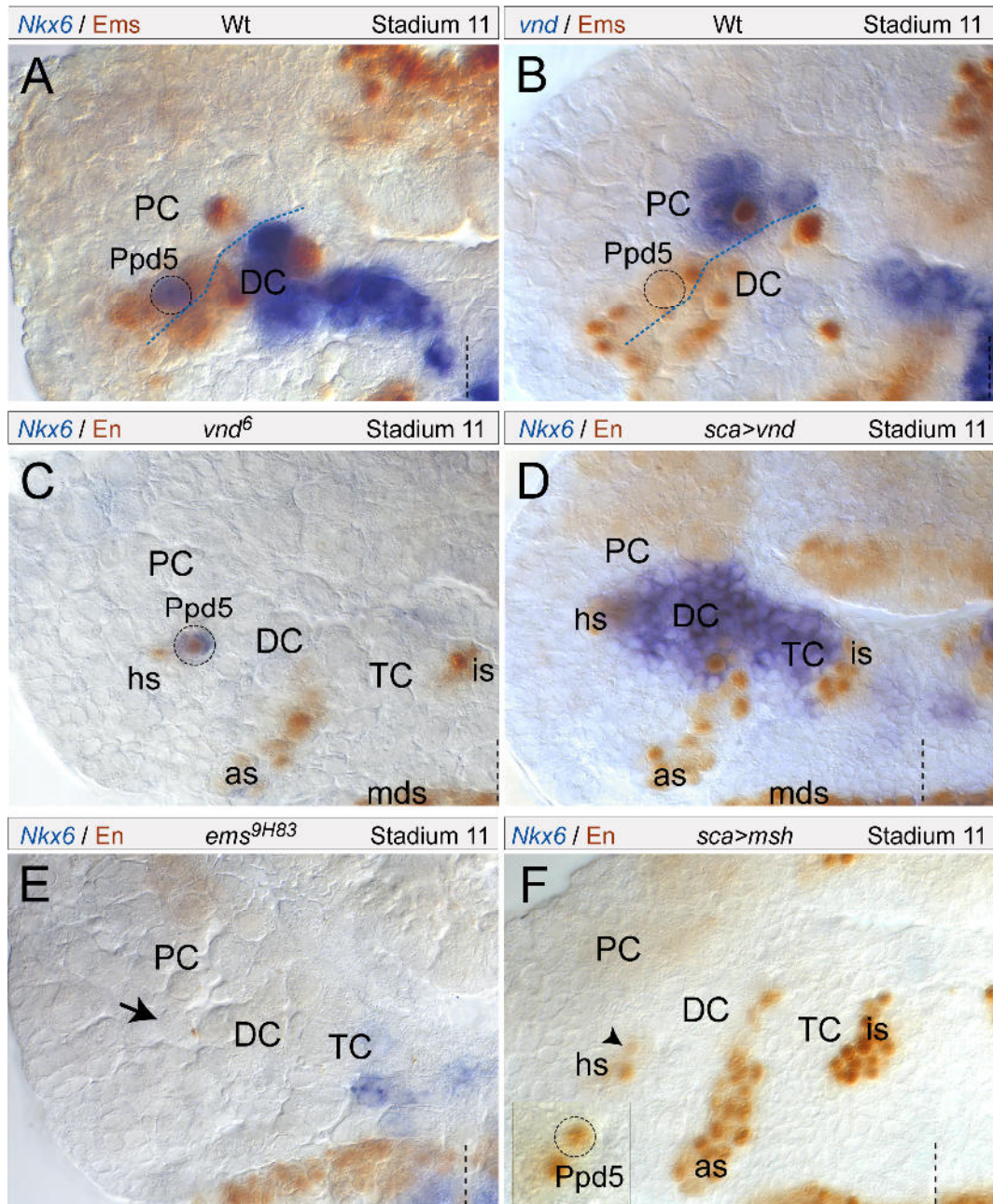


Abb. 3-14: Regulation der *Nkx6*-Expression im PC verläuft unterschiedlich zu der Situation in TC und DC

(A, B) In dem protocerebralen NB Ppd5 wird *Nkx6* mit *Ems* (A), jedoch nicht mit *vnd* co-exprimiert (B). (C, D) *Nkx6*-Expression in Ppd5 ist in *vnd*⁶-Mutanten unverändert (C). Nach *sca*-Gal4-getriebener Überexpression von *vnd* ist kein ektopisches *Nkx6* im PC zu finden, im Gegensatz zu TC und DC, in welchen die *Nkx6*-Domäne in dorsales NE hinein expandiert (D). (E, F) In *ems*^{9H83}-Mutanten fehlt *Nkx6*-Expression an Position von Ppd5 (E, Pfeil) und nach Überexpression von *msh*, mithilfe von *sca*-Gal4, ist ebenfalls kein *Nkx6* in Ppd5 detektierbar (F, Pfeilspitze und Ausschnitt). hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen, mds = mandibularer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Frage, ob En eventuell an einer negativen Regulation von *msh* beteiligt sein könnte, woraufhin die *msh*-Expression in zwei voneinander unabhängigen *en*-mutanten Allelen untersucht wurde (*en*⁵⁸ und *en*⁵⁹). Da beide *en*-Allele den gleichen Phänotyp zeigen (sowohl im Bezug auf *msh*-, als auch für *ind*- und *vnd*-Expression, welche in Abschnitt 3.14 und 3.15 beschrieben sind), werden im folgenden lediglich die Ergebnisse für *en*⁵⁸ präsentiert. In Abwesenheit von En findet die Auftrennung der *msh*-Domäne in den meisten Fällen nicht mehr statt, weshalb die Expressionsdomänen in MD, TC und DC weiterhin miteinander verbunden bleiben (mandibulare mit tritocerebraler *msh*-Domäne in 61% verbunden, trito- mit deutocerebraler *msh*-Domäne in 82% verbunden, n = 28 GHS) (Abb. 3-15 A-B'), was für eine Funktion von En bei der Herunterregulierung der *msh*-Expression spricht. Diese Vermutung unterstützend, kann eine signifikante Reduktion von *msh*-Expression in TC und DC als Folge von ubiquitär exprimiertem En (*Mata*>*en*) beobachtet werden (23% starke Reduktion, 77% leichte Reduktion von *msh*, n = 44 GHS) (Abb. 3-15 C, C'), wobei die *msh*-Expression im DC meist stärker betroffen ist. Zusammengefasst veranschaulichen diese Ergebnisse, dass En für die Repression von *msh* in den posterioren Kompartimenten des TC und DC sowohl notwendig als auch ausreichend ist.

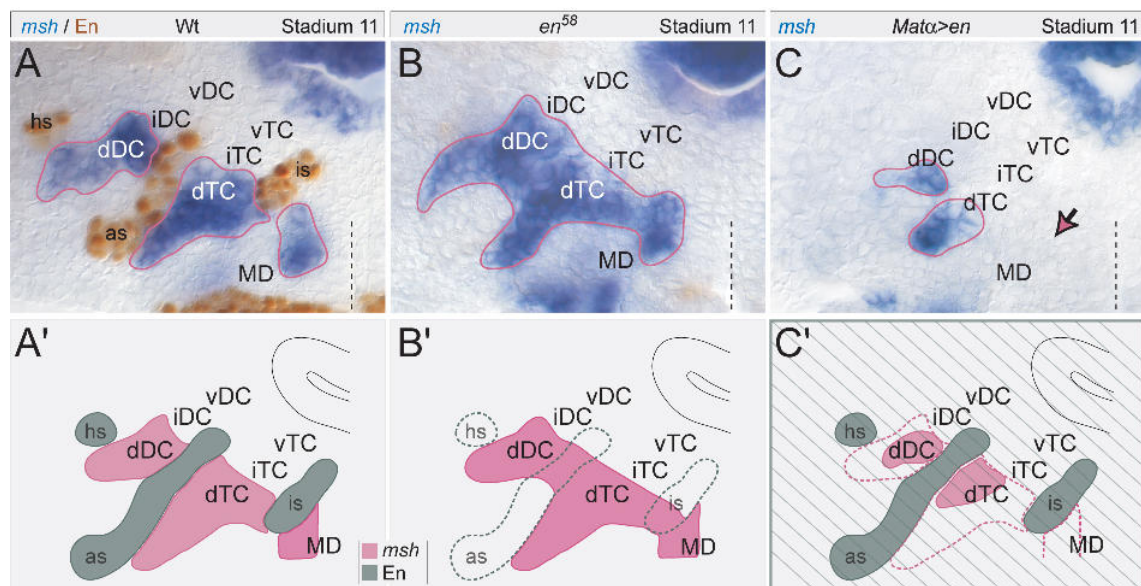


Abb. 3-15: En reprimiert *msh*-Expression in TC und DC

(A-C') Expression von *msh* und En im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A'-C' sind schematische Darstellungen von A-C. (A, A') Wildtyp. (B, B') In Abwesenheit von En, wird *msh* in den posterioren Anteilen des TC und DC dereprimiert. (C, C') Ektopische *en*-Expression (mittels *Mata*-Gal4) führt zu einer starken Reduktion von *msh* im dorsalen TC und DC (und im mandibularen Segment (MD), Pfeil in C). hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is =

interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

3.14 En reprimiert *ind* im posterioren DC, ist jedoch ebenfalls für die Aktivierung der *ind*-Expression im dorso-posterioren TC erforderlich

En- und *ind*-Expression sind im DC in sich ausschließenden Domänen zu finden, wohingegen beide Faktoren im posterioren TC ab St. 10/11 co-exprimiert werden (Abb. 3-16 A, A'). Um herauszufinden, ob En auch die Expression von *ind* reguliert, wurde diese ebenfalls in *en*⁵⁸-Mutanten überprüft. In Abwesenheit von *en* expandiert die *ind*-Expression im DC in den mutierten En-Streifen (*en-as*) hinein (68%, n = 56 GHS), wodurch die trito- und deutocerebrale *ind*-Domäne über den fehlenden *en-as* miteinander verbunden werden (Pfeil in Abb. 3-16 B, B'). Dieses Ergebnis deutet auf eine negative Regulation der *ind*-Expression durch En im posterioren DC hin. Dementsprechend kann bei ektopischer *en*-Expression (*Mata*>*en*) im intermediären NE des DC eine starke Reduktion der *ind*-Expression beobachtet werden (vollständiger Verlust in 81%, starke *ind*-Reduktion in 19%, n = 21 GHS) (Abb. 3-16 C, C').

Im Gegensatz dazu zeigt sich die *ind*-Domäne im posterioren TC in *en*⁵⁸-Mutanten reduziert (95%, n = 56 GHS) (Abb. 3-16 B, B'); speziell 4-6 Zellen im dorsalen Anteil des mutierten En-Streifens verlieren *ind*-Expression und zeigen stattdessen eine Derepression von *msh*. Wenn *en* ubiquitär im NE exprimiert wird (*sca*>*en*), erscheint die tritocerebrale *ind*-Domäne jedoch unbeeinflusst (n = 21 GHS) (Abb. 3-16 C, C'). Zieht man in Betracht, dass En als Repressor von *msh* fungiert (siehe Abschnitt 3.13) und Msh wiederum *ind*-Expression unterdrücken kann (siehe Abschnitt 3.4), so deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass En *ind* indirekt durch Herunterregulieren der *msh*-Expression im posterioren TC aktiviert.

Zusammenfassend scheint En in einer segment-spezifischen Art und Weise mit Ind zu interagieren: En wirkt als positiver Regulator auf die *ind*-Expression im dorso-posterioren TC (*en-is*), reprimiert *ind* jedoch im posterioren DC (*en-as*).

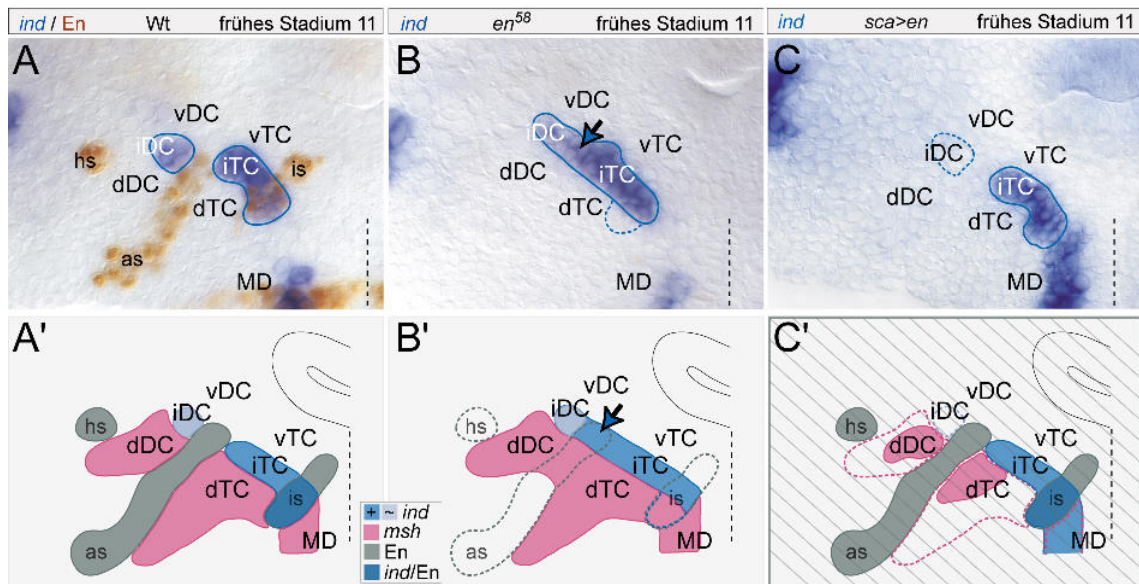


Abb. 3-16: En reguliert *ind*-Expression unterschiedlich in TC und DC

(A-C') Expression von *ind* kombiniert mit *En* im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A'-C' sind schematische Darstellungen von A-C. (A, A') Wildtyp. (B, B') In en^{58} -Mutanten expandiert *ind*-Expression in posteriores DC hinein (Pfeil), die *ind*-Domäne im posterioren TC hingegen ist teilweise reduziert (mit blau gestrichelter Linie umrandet). (C, C') *sca*-Gal4-getriebene Überexpression von *en* führt zu einer vollständigen Reduktion von *ind* im DC, hat jedoch keinen Effekt auf *ind*-Expression im TC. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

3.15 En hält die Expression von *Vnd* im posterioren DC aufrecht

Wie bereits in Abschnitt 3.11 beschrieben, verhält sich die *Vnd*-Expression im frühen Gehirn sehr dynamisch und wird während der Entwicklung schrittweise (bis St. 11) auf drei ventrale Domänen im posterioren TC, DC und PC eingegrenzt (Urbach et al., 2003). Die Expressionsdomänen von *En* und *Vnd* weisen Überlappungen im posterioren TC und DC auf (Abb. 3-1 D, D' und Abb. 3-17 A, A'), wodurch die Möglichkeit einer genetischen Interaktion zwischen beiden Faktoren besteht, und somit auch *Vnd*-Expression in en^{58} -Mutanten untersucht wurde. In den entsprechenden Embryonen bleibt die *Vnd*-Expression im St. 11 im TC unbeeinträchtigt ($n = 64$ GHS), zeigt sich im posterioren DC jedoch stark reduziert (34%, $n = 64$ GHS) bzw. fehlt gänzlich (60%, $n = 64$ GHS) (Abb. 3-17 B, B'); im Wildtyp überlappt die verbliebene deutocerebrale *Vnd*-Domäne zu diesem Zeitpunkt vollständig mit *En*-Expression (Abb. 3-17 A, A'). Dagegen trennt sich die ursprüngliche *Vnd*-Domäne nach Überexpression von *en* (*Mata>en*) nicht mehr bis St. 11 in ihre drei Subdomänen in TC, DC und PC auf. In diesen Embryonen ist infolge einer weitestgehenden Aufrechterhaltung von *Vnd*-

Expression (61%, n = 18 GHS) in Regionen, in denen Vnd während der Entwicklung normalerweise verloren geht, stattdessen eine zusammenhängende Vnd-Domäne zu beobachten, welche alle drei Gehirnneuromere umfasst (Abb. 3-17 C, C').

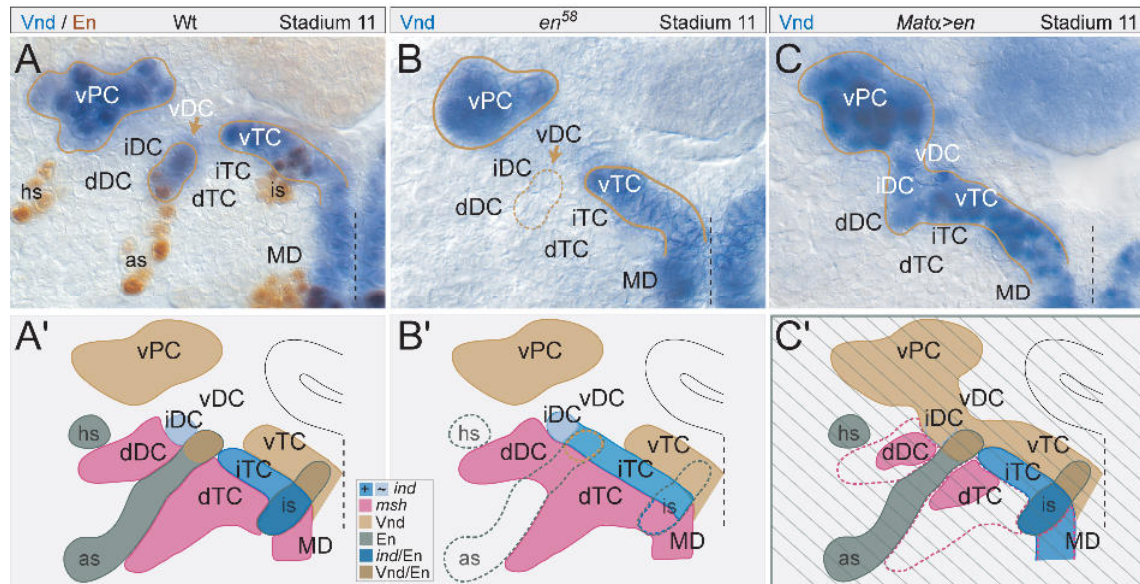


Abb. 3-17: En hält *vnd*-Expression im DC aufrecht

(A-C') Expression von Vnd und En im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A'-C' sind schematische Darstellungen von A-C. (A, A') Wildtyp. (B, B') In *en*⁵⁸-Mutanten fehlt Vnd-Expression im posterioren DC, die tritocerebrale Vnd-Domäne hingegen bleibt unverändert. (C, C') Nach Überexpression von *en* (mithilfe von *Mata*-Gal4) wird Vnd-Expression in bestimmten Bereichen von TC und DC nicht herunter reguliert, sondern bleibt größtenteils aufrecht (was zu einer großen, von TC nach PC reichenden Vnd-Domäne führt). hs = *en* „head spot“, as = antenraler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Dies deutet insgesamt darauf hin, dass En für die Aufrechterhaltung der Vnd-Expression im posterioren DC (*en*-as) erforderlich ist, im posterioren TC (*en*-is) hingegen verzichtbar, auch wenn ektopisch getriebenes *en* (*Mata*>*en*) in der Lage ist, die Zeitspanne der Vnd-Expression im TC zu verlängern (Abb. 3-17 C, C').

Auch die Expression von *Nkx6*, welche im posterioren TC und DC mit En überlappt (Abb. 3-2 D), wurde in *en*⁵⁸-Mutanten und bei Überexpression von *en* untersucht, erscheint jedoch in beiden Situationen unverändert (Daten nicht gezeigt).

Da hier gezeigt werden konnte, dass Ind die Fähigkeit besitzt, *vnd*-Expression im posterioren DC zu reprimieren (Abschnitt 3.8 und Abb. 3-11 E, E') und *ind*-Expression seinerseits von En reprimiert werden kann (Abschnitt 3.14 und Abb. 3-16 B, B'), liegt die Vermutung nahe, dass Repression von *ind* durch En eine grundlegende Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Vnd-Expression im posterioren DC darstellt.

3.16 Im intermediären NE des VNS hält En die *ind*-Expression

aufrecht und wirkt gleichzeitig negativ auf *msh*-Expression

Während der Untersuchung der Expression von DV-Genen in *en*⁵⁸-Mutanten und bei Überexpression von *en* zeigte sich, dass En auch bei der Regulation von mindestens zwei DV-Genen im VNS eine Rolle spielt. *ind*, welches schon sehr früh (St. 5) im gesamten intermediären NE des VNS exprimiert wird, ist in St. 10/11 nur noch in einer kleinen posterioren Domäne pro Hemisegment zu finden, co-exprimiert mit En (Abb. 3-18 A, B). Bei Abwesenheit von En (*en*⁵⁸) ist zu diesem Zeitpunkt kaum noch *ind*-Expression im intermediären NE zu finden (*ind*-Expression vollständig fehlend in 79%, stark reduziert in 21%, n = 56 Hemisegmente (HS)) (Abb. 3-18 C) und nur noch in den entsprechenden NB detektierbar, welche im Wildtyp weiterhin En exprimieren (NB6-2, 7-2; Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu, verlängert ektopische Expression von *en* (*sca>en*) die Aufrechterhaltung von *ind*-Expression im intermediären NE erheblich (n = 64 HS) (Abb. 3-18 D). Zusammengefasst weisen die Resultate aus obigen Experimenten darauf hin, dass En für die Aufrechterhaltung der *ind*-Expression im postero-intermediären NE (jedoch nicht in NB) des VNS benötigt wird.

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass *msh*, welches im wildtypischen Hintergrund zunächst nur im dorsalen NE des VNS exprimiert wird, in St. 10/11 dann jedoch zusätzlich in intermediärem NE zu finden ist (Abb. 3-18 A, E). Während *msh*- und En-Expression im dorsalen NE teilweise überlappen, werden beide Gene im intermediären NE komplementär zueinander exprimiert (Abb. 3-18 E). In *en*⁵⁸-Mutanten expandiert *msh*-Expression in den intermediären Anteil der mutierten *en*-Domäne hinein (84%, n = 64 HS), wohingegen sich kein Effekt im dorsalen NE zeigt (n = 64 HS) (Abb. 3-18 F). Umgekehrt ist ein Verlust der *msh*-Expression im intermediären NE von *sca>en*-Embryonen zu beobachten (91%, n = 80 HS), während das dorsale NE wiederum unbeeinträchtigt bleibt (n = 80 HS) (Abb. 3-18 G).

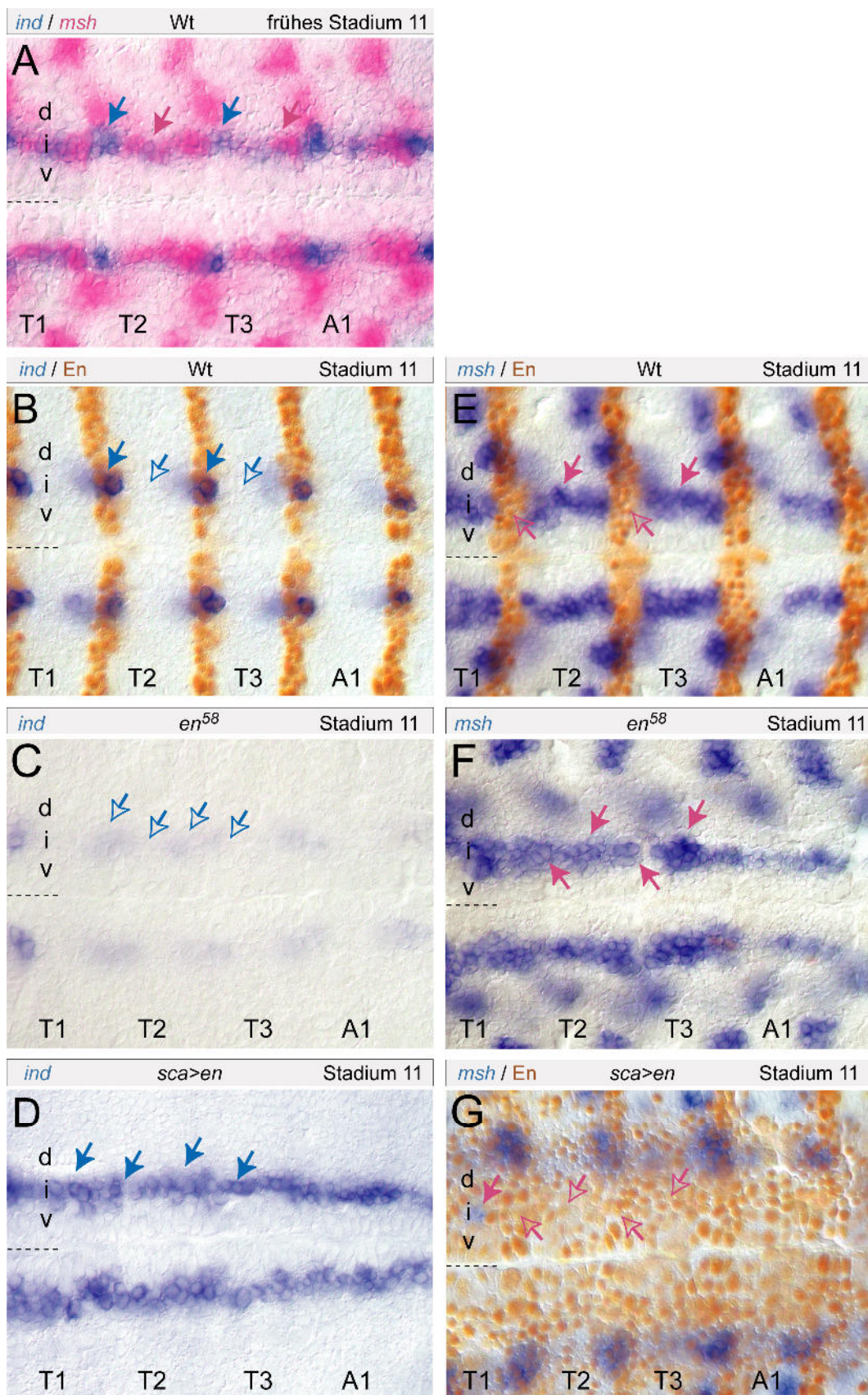


Abb. 3-18: En ist an der Regulation der *ind*- und *msh*-Expression im VNS beteiligt

Dargestellt sind Filetpräparate, welche die Rumpfsegmente vom ersten thorakalen (T1) bis hin zum ersten abdominalen (A1) Segment zeigen; anterior ist links und eine schwarz gestrichelte Linie kennzeichnet die ventrale Mittellinie. Ausgefüllte Pfeilspitzen bedeuten das Vorhandensein, leere Pfeilspitzen das Fehlen bestimmter Genexpressionen (magenta = *msh*-

Expression, blau = *ind*-Expression). (A) Wildtyp; alternierende *ind/msh*-Expression in der intermediären (i) NE-Spalte. (B) Wildtyp; *ind*-Expression ist auf die En-exprimierenden Streifen beschränkt. (C) In *en*⁵⁸-Mutanten bleibt *ind*-Expression nur in den NB (Daten nicht gezeigt), jedoch nicht im korrespondierenden NE aufrecht erhalten. (D) Nach *sca*-Gal4-getriebener ektopischer Expression von *en* bleibt *ind*-Expression auch zwischen den En-Streifen aufrecht erhalten. (E) Wildtyp; im St. 11 wird *msh* nicht nur dorsal, sondern auch im intermediären NE zwischen den En-Streifen exprimiert. (F) In *en*⁵⁸-Mutanten wird *msh* im intermediären NE der mutierten En-Streifen dereprimiert. (G) In *sca*>*en*-Embryonen fehlt *msh*-Expression fast vollständig im intermediären NE. v = ventral, i = intermediär, d = dorsal, T1-T3 = thorakale Segmente, A1 = erstes abdominales Segment.

Zudem wurde die mögliche Beteiligung von En an der Regulation der *vnd*-Expression untersucht, jedoch weder eine Veränderung derselben in *en*⁵⁸-Mutanten (n = 74 HS; Daten nicht gezeigt) noch bei Überexpression von *en* (*sca*>*en*) gefunden (n = 56 HS; Daten nicht gezeigt). Folglich ist En für *vnd*-Expression im VNS nicht notwendig, was im Gegensatz zu den Ergebnissen für *vnd*-Regulation im DC steht (Abschnitt 3.15). Analoge Experimente in *en*-mutanten und *sca*>*en* Embryonen zeigen, dass im NE des VNS auch die Expression von *Nkx6* unabhängig von En zu sein scheint (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen folgern, dass En im postero-intermediären NE des VNS (1) die Expression von *ind* aufrecht erhält, und (2) negativ auf die Expression von *msh* einwirkt. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Ind möglicherweise allein oder zusammen mit En für die Repression von *msh* im intermediären NE des VNS verantwortlich ist.

3.17 EGFR ist an der DV-Regionalisierung des NE in der frühen Gehirnanlage beteiligt

Der “*Drosophila* Epidermal growth factor receptor” (EGFR) spielt in einer Vielzahl unterschiedlichster embryonaler Entwicklungsvorgänge eine große Rolle (zusammengefasst in Shilo, 2003; 2005), welche auch seine Funktion als einer der Hauptfaktoren für die Determinierung von Zellschicksalen (NE und NB) entlang der DV-Achse des VNS beinhalten (Schweitzer und Shilo, 1997). Im VNS aktiviert EGFR die Expression von *ind* im intermediären NE, erhält die Expression von *vnd* im ventralen NE aufrecht, und ist zudem an der Bildung und Spezifizierung intermediärer NB, sowie an der Spezifizierung ventraler NB beteiligt (zusammengefasst in Skeath, 1999). Durch die Regulation der *ind*-Expression ist EGFR daneben auch indirekt in die Begrenzung von *msh* auf dorsales NE involviert (D’Alessio und Frasch, 1996; von

Ohlen und Doe, 2000). Der EGFR codiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, welche wiederum über den kanonischen Ras-Signalweg die sequenzielle Aktivierung von Proteinkinasen veranlasst (Seeger und Krebs, 1995). EGFR wird während der Entwicklung zwar ubiquitär exprimiert, wird jedoch nicht überall aktiviert (Zak et al., 1990). Daher wurde zur Darstellung und Expressionsanalyse des in der pNE aktiven EGFR-Signalwegs ein Antikörper gegen die aktivierte, diphosphorylierte Form von MAPK („mitogen-activated protein kinase“) verwendet (Gabay et al., 1996; Zhao et al., 2007b) (Abb. 3-19 A-F).

Um die räumlich-zeitliche Aktivität von EGFR in der pNE zu analysieren und diese in Bezug zur Expressionsdynamik der DV-Gene zu setzen, wurden vornehmlich Antikörper-Doppelfärbungen gegen MAPK kombiniert mit Vnd oder En verwendet (Abb. 3-19 und Abb. 7-3 im Anhang). So umfasst die MAPK-Expression im St. 5/6 das intermediäre und ventrale NE von TC und DC vollständig, ist jedoch nicht im dorsalen NE zu finden; außerdem wird MAPK noch in zwei intermediär/dorsal gelegenen Domänen im PC, sowie in einem an das DC anschließenden Bereich im ventralen PC exprimiert (Abb. 3-19 A). Im St.9 ist MAPK-Expression noch sehr stark im ventralen TC und DC, sowie in den protocerebralen Domänen detektierbar (Abb. 3-19 B). Im intermediären DC ist MAPK im anterioren NE noch deutlich exprimiert, im posterioren DC zeigt sich MAPK-Expression dagegen schon relativ schwach und ist aus dem intermediären TC schon vollständig verschwunden (Abb. 3-19 B); zudem ist eine MAPK-Domäne dorsal im nicht-neuronalen Ektoderm des DC detektierbar (Abb. 3-19 B, schwarzer Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt beginnt die anfangs großflächig kräftige MAPK-Expression auch in bestimmten Bereichen des PC schwächer zu werden (Abb. 3-19 B). Dies setzt sich während St. 10 weiter fort und die vom TC zum PC reichende MAPK-Domäne wird durch Herunterregulieren der Expression in unterschiedlichen NE-Bereichen in zahlreiche kleinere Domänen unterteilt (Abb. 3-19 C), wobei dieser Vorgang (zwischen St.9 und St.11) einer sehr starken Dynamik unterliegt.

Zur Beantwortung der Frage, ob EGFR auch im NE der frühen Gehirnanlage eine Rolle bei der Regulation der DV-Gene spielt, wurde die Expression von *vnd*, *Nkx6*, *msh* und *ind* in *EGFR*²-Mutanten sowie bei ektopischer Aktivierung von *EGFR* (durch Überexpression von sekretiertem Spitz (sSpi)) analysiert.

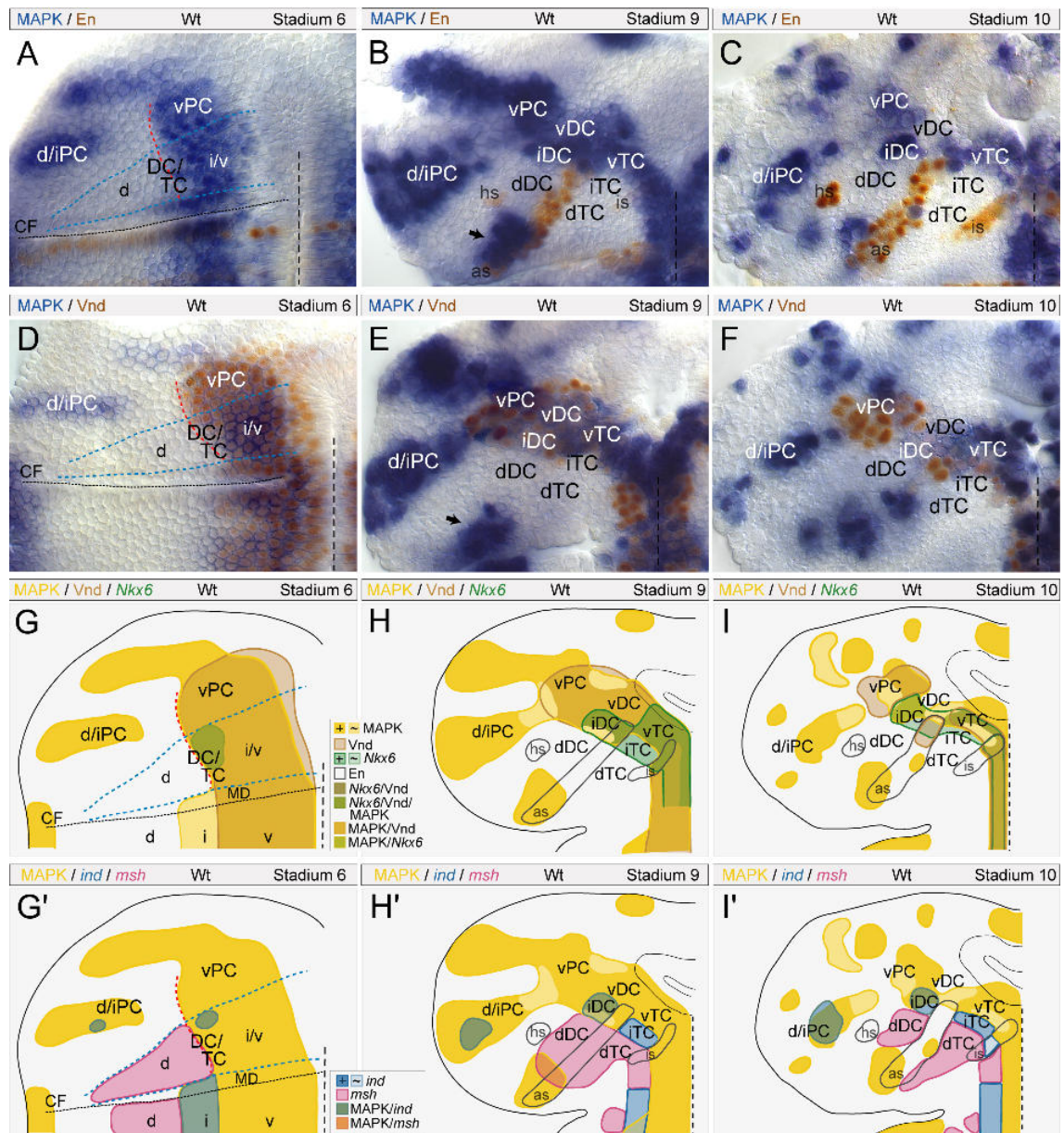


Abb. 3-19: MAPK-Expression in der frühen Gehirnanlage im räumlich-zeitlichen Bezug zu den Expressionsdomänen der DV-Gene *vnd*, *ind*, *msh* und *Nkx6*

(A-F) Expression von MAPK kombiniert mit der von *En* (A-C) oder *Vnd* (D-F) im Wildtyp in den Stadien 6, 9 und 10; für weitere Erläuterungen siehe Text (Abschnitt 3.17 und 3.18). (G-I') Schematische Abbildungen von A-F sind jeweils in Kombination mit *vnd*- und *Nkx6*-Expression (G, H, I) bzw. mit *ind*- und *msh*-Expression (G', H', I') dargestellt; für weitere Erläuterungen siehe Text (Abschnitt 3.18 (*vnd*), 3.19 (*Nkx6*), 3.20 (*msh*) und 3.21 (*ind*)). *hs* = *en* „head spot“, *as* = antennaler *en*-Streifen, *is* = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

3.18 EGFR ist notwendig für die Aufrechterhaltung der *vnd*-Expression

im NE des TC und DC, sowie in einem Anteil des PC

Co-Expression von MAPK und *vnd* ist während der Gehirnentwicklung schon sehr früh (St. 5/6) im intermediär/ventralen TC und DC, sowie im ventralen PC zu finden (Abb.

3-19 D, G). Im St. 9 überlappen die Expressionsdomänen von MAPK und *vnd* noch immer fast vollständig, mit Ausnahme des intermediären TC, in welchem zu diesem Zeitpunkt weder MAPK noch *vnd* exprimiert werden (Abb. 3-19 E, H). Bis St. 10 hat sich die große MAPK-Domäne schon weitestgehend in viele kleine Expressionsdomänen aufgespaltet und wird nur noch in einem sehr kleinen Bereich des ventralen PC und DC, jedoch vollständig im ventralen TC mit *vnd* co-exprimiert (Abb. 3-19 F, I).

Um zu prüfen, inwieweit *vnd* und *EGFR* interagieren, wurde die *vnd*-Expression in *EGFR*²-Mutanten untersucht. Die *vnd*-Expression wird in diesen mutanten Embryonen in allen drei Gehirnneuromeren normal aktiviert, bleibt im NE des TC und DC jedoch nicht lange genug aufrechterhalten (beginnt ab St. 8 aus dem NE zu verschwinden) und ist bis St. 10 im ventralen TC bereits sehr stark reduziert (n = 25) und im DC etwas schwächer affiziert (*vnd*-Reduktion in *en-as* in 83%, n = 25) (Abb. 3-20 A-B'). Die *vnd*-Domäne im ventralen PC zeigt ebenfalls eine leichte Reduktion (83%, n = 25). Der ventralste Anteil des *en-as* im DC exprimiert weiterhin *vnd*, wenn auch in den meisten Fällen etwas schwächer, was höchstwahrscheinlich durch eine partielle Aufrechterhaltung der *vnd*-Expression durch En zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 3.15). Insgesamt scheint die schwache *vnd*-Expression im ventralen Anteil des *en-as* auch mit einem teilweise reduzierten Level an En-Expression in *EGFR*²-Mutanten zu korrelieren (Abb. 3-20 B). Demnach ist nicht auszuschließen, dass EGFR, zumindest im *en-as*, die Expression von *vnd* über die Regulation der En-Expression aufrecht hält.

Nach *sca*-Gal4-getriebener ektopischer Aktivierung von *EGFR* (*sca*>*sSpi*) kommt es zu einer Derepression von *vnd* (beginnend im späten St. 9) im intermediären, sowie zu einer ektopischen Expression von *vnd* im dorsalen NE des TC (88%, n = 48) und DC (79%, n = 48) (Abb. 3-20 C-D'). Die *vnd*-Expressionsdomäne im PC bleibt nach ektopischer Aktivierung des *EGFR* hingegen unbeeinträchtigt (Abb. 3-20 D, D').

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass EGFR-Aktivität bei der Aktivierung der *vnd*-Expression in der Gehirnanlage keine Rolle spielt, jedoch für deren Aufrechterhaltung im ventralen NE von TC und DC (sowie einem Anteil des PC) benötigt wird, was der Funktion von EGFR in der ventralen NE-Spalte des VNS entspricht (Zhao and Skeath, 2002).

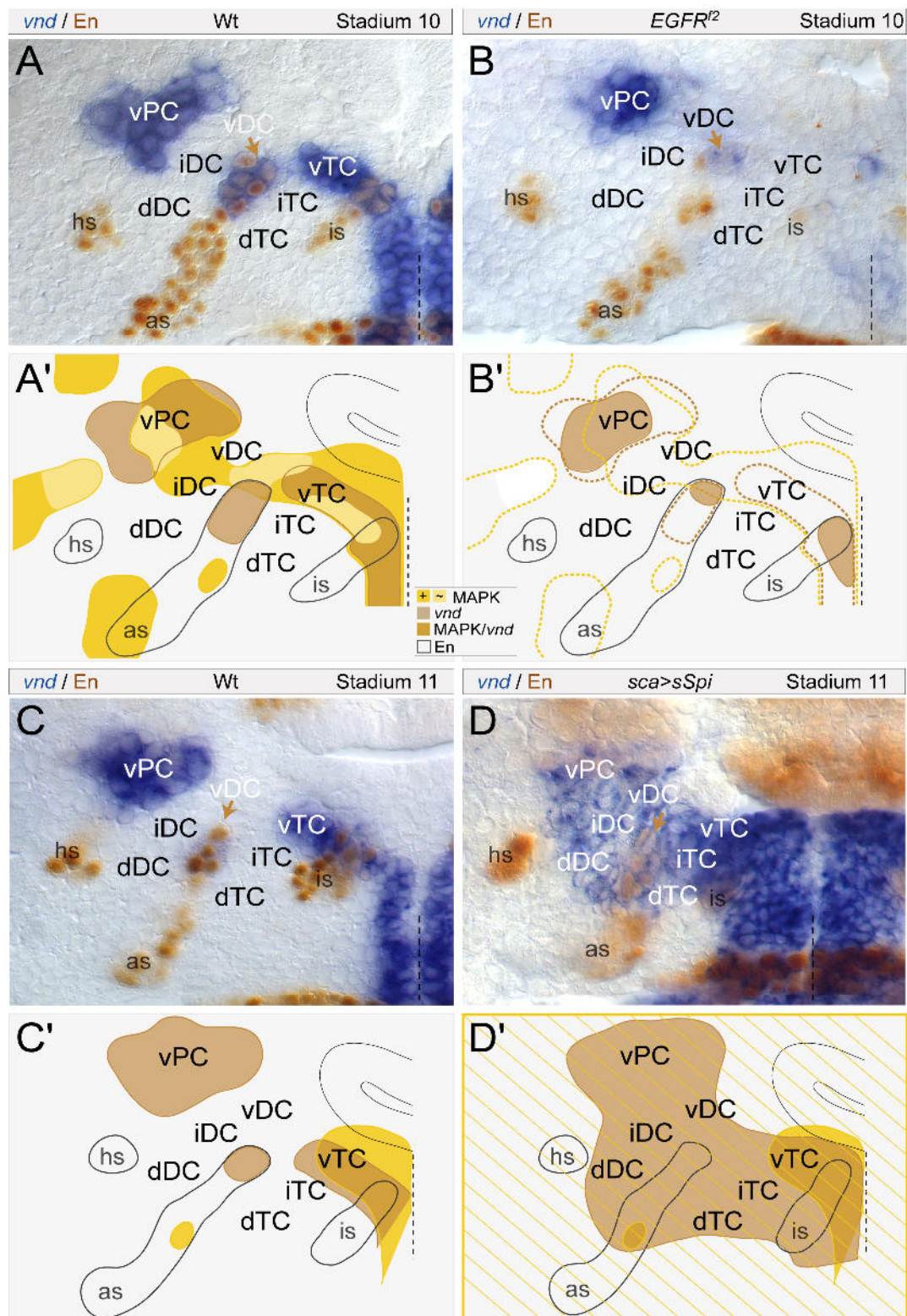


Abb. 3-20: EGFR-Aktivität hält *vnd*-Expression im NE von TC und DC (und teilweise im PC) aufrecht

(A-D') Expression von *vnd* und En. A'-D' sind schematische Darstellungen von A-D. (A, A') Wildtyp, St. 10. (B, B') Reduktion der *vnd*-Expression im NE von TC, DC und PC in $EGFR^2$ -Mutanten. (C, C') Wildtyp, St. 11; MAPK und *vnd* sind nur noch im ventralen NE co-exprimiert (C'). (D, D') Nach ektopischer Aktivierung von *EGFR* (getrieben mit *sca*-Gal4; $sca>sSpi$) bleibt *vnd* im intermediären TC und DC länger aufrecht erhalten und expandiert zusätzlich in dorsales NE. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur

Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

3.19 EGFR ist notwendig für die Aufrechterhaltung der *Nkx6*-Expression im intermediären TC und DC

Nkx6-Expression beginnt im intermediären DC (St. 6; siehe Abschnitt 3.2), wo es zu diesem Zeitpunkt nicht nur mit *vnd* (Abb. 3-2 C) und *ems* (Abb. 3-11 A), sondern auch mit MAPK co-exprimiert wird (Abb. 3-19 G). Im späten St. 8 überlappt die *Nkx6*-Domäne im intermediär/ventralen TC und intermediären DC vollständig mit MAPK-Expression (nicht gezeigt), im St. 9 ist im intermediären TC jedoch nur noch *Nkx6*-Expression zu finden (Abb. 3-19 H). Im St. 10 ist Co-Expression von *Nkx6* und MAPK schließlich auf den posterioren Anteil des intermediären DC sowie auf das ventrale TC beschränkt (Abb. 3-19 I). Da *Nkx6*-Expression also von Beginn an und über einen relativ langen Zeitraum mit MAPK-Expression überlappt, ist auch hier eine regulatorische Interaktion denkbar. Aus diesem Grund wurde die *Nkx6*-Expression in *EGFR*^{f2}-Mutanten und nach ektopischer Aktivierung von EGFR analysiert.

Die Aktivierung von *Nkx6* in der frühen Gehirnanlage bleibt in *EGFR*^{f2}-Mutanten unbeeinträchtigt (nicht gezeigt). Dagegen ist zu beobachten, dass die Aufrechterhaltung der *Nkx6*-Expression bei Fehlen von EGFR-Aktivität nicht normal verläuft und partiell im NE des TC und DC verfrüht verloren geht (beginnend im intermediären DC im späten St. 8; Daten nicht gezeigt). Dementsprechend zeigt sich *Nkx6*-Expression im St. 9 leicht reduziert im anterioren Bereich des intermediären TC (73%, n = 30; dunkelgrüner Pfeil in Abb. 3-21 B), und sehr stark reduziert (83%, n = 30; hellgrüner Pfeil in Abb. 3-21 B) bis vollständig fehlend (17%, n = 30) im intermediären DC (Abb. 3-21 A-B'). Der protocerebrale NB Ppd5, welcher im St. 11 *Nkx6* exprimiert (Abb. 3-2 I), ist hingegen nicht affiziert, da auch weder der NB selbst noch das NE, aus welchem er hervorgeht, endogen MAPK exprimieren (nicht gezeigt). Wenn *EGFR* jedoch mit Hilfe von *sca*-Gal4 ektopisch aktiviert wird (*sca*>*sSpi*), ist eine Expansion der *Nkx6*-Expression in dorsales TC (starke Expansion in 79%, schwach in 21%, n = 42) und DC (starke Expansion in 90%, schwach in 10%, n= 42), aber nicht im PC zu beobachten (Abb. 3-21 C-D').

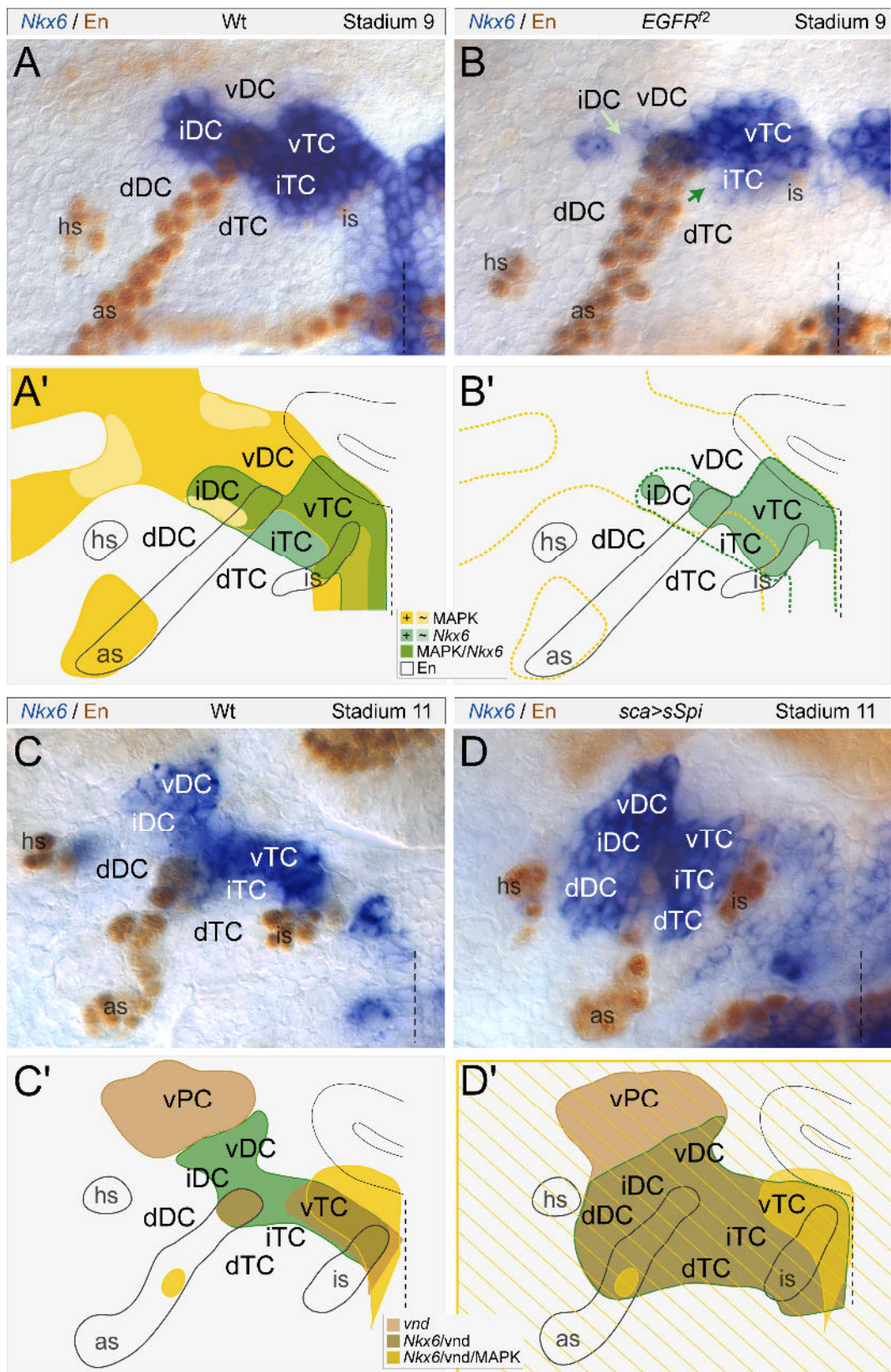


Abb. 3-21: EGFR-Aktivität ist notwendig, um *Nkx6*-Expression im intermediären TC und DC aufrecht zu erhalten

(A-D') Expression von *Nkx6* und En im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A'-D' sind schematische Darstellungen von A-D. (A, A') Wildtyp, St. 9. (B, B') In *EGFR²²*-Mutanten ist *Nkx6*-Expression im intermediären DC stark (hellgrüner Pfeil), im intermediären TC schwächer reduziert (dunkelgrüner Pfeil). (C, C') Wildtyp, St. 11; MAPK und *Nkx6* sind nur noch im

ventralen TC co-exprimiert (C'). (D, D') Nach *sca*-Gal4-getriebener ektopischer Aktivierung von *EGFR* (*sca>sSpi*), ist ektopische *Nkx6*-Expression im dorsalen NE von TC und DC detektierbar. hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse aus beiden Experimenten dafür, dass EGFR-Aktivität erforderlich ist, um *Nkx6*-Expression im intermediären NE des TC und DC aufrecht zu erhalten. Dass EGFR in der Lage ist, *Nkx6*-Expression auch direkt zu aktivieren ist dagegen eher unwahrscheinlich, obwohl *Nkx6* in *sca>sSpi*-Embryonen ektopisch im dorsalen TC und DC exprimiert wird. Zum einen ist die dorsale Expansion von *Nkx6* erst ab dem spätem St. 10 und somit nach Einsetzen von, unter diesen Bedingungen, ektopischer dorsaler *vnd*-Expression detektierbar (siehe Abschnitt 3.18). Zum anderen scheint *Nkx6*-Expression auch nicht über die dorsale Grenze der ektopischen *vnd*-Domäne hinaus zu expandieren (Abb. 3-20 D und Abb. 3-21 D, D'), trotz pan-neuroektodermaler EGFR-Aktivität. Dies deutet eher darauf hin, dass die Expression von ektopischem *Nkx6* von *Vnd* abhängt (siehe auch Abschnitt 3.20). Dass EGFR dennoch die Fähigkeit besitzt, *Nkx6* direkt zu aktivieren, ist aufgrund der aktuellen Datenlage jedoch auch nicht auszuschließen.

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass EGFR-Aktivität zwar nicht für die Aktivierung von *Nkx6*, aber für die nachfolgende Aufrechterhaltung der *Nkx6*-Expression im intermediären TC und DC erforderlich ist.

3.20 EGFR ist vermutlich nur ein indirekter, negativer Regulator der *msh*-Expression im NE der frühen Gehirnanlage

Da MAPK fast ausschließlich im intermediären und ventralen NE des TC und DC exprimiert wird (Abb. 3-19 A-C), ist es von Beginn an komplementär zu dorsal exprimiertem *msh* (Abb. G'-I' und Abb. 7-3 im Anhang), mit Ausnahme der kleinen MAPK-Domäne im dorsalsten DC (Abb. 3-19 B, schwarzer Pfeil). Diese vornehmlich komplementäre Lage der Expressionsdomänen zueinander könnte auf eine repressive Interaktion zwischen *Msh* und EGFR hindeuten. Wie sich zeigte, kommt es in *EGFR^{f2}*-Mutanten im St. 10 in der Tat zu einer leichten Expansion der *msh*-Expression in den anterioren NE-Anteil des intermediären DC (56%, n = 27) und intermediär/ventralen TC (48%, n = 27) (Abb. 3-22 A-B'). Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass die Expression der *msh*-Repressoren *Nkx6* (Abschnitt 3.19) und *Ind* (beschrieben im

folgenden Abschnitt 3.21) genau in dieser NE-Region nicht aufrecht erhalten bleibt (*Nkx6* beginnt vor St. 9 aus dem NE zu verschwinden und *ind*-Expression ist ebenfalls schon früh betroffen) (Abb. 3-22 B, B'). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Derepression von *msh* im intermediären TC und DC auf den vorzeitigen Verlust der *msh*-Repressoren *Nkx6* und *Ind* aus dem intermediären NE zurückzuführen ist und nur indirekt auf das Fehlen von EGFR-Aktivität.

Um zu überprüfen, ob EGFR nicht doch in der Lage ist *msh* direkt zu reprimieren, wurde *msh*-Expression nach *Mata*-Gal4-getriebener, ektopischer Aktivierung von *EGFR* (*Mata>sSpi*) analysiert. Es stellte sich heraus, dass die *msh*-Domänen in TC und DC in den meisten Fällen stark reduziert sind (74%, in 26% sehr schwache aber nicht reduzierte *msh*-Expression, n = 46) (Abb. 3-22 C-D'). Da unter diesen Bedingungen die *msh*-Repressoren *Vnd* und *Nkx6* im dorsalen NE ektopisch aktiviert werden, deuten diese Ergebnisse ebenso auf eine indirekte Repression von *msh* durch EGFR-Aktivität hin (siehe Abschnitt 3.18). Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die *msh*-Expression in TC und DC nach ektopischer Aktivierung von *EGFR* zwar reduziert ist, jedoch nie vollständig fehlt. Des Weiteren korrespondiert die ventrale Grenze der verbleibenden *msh*-Domänen genau mit der dorsalen Grenze der in dorsales NE expandierten *vnd*-Domäne (bzw. *Nkx6*-Domäne) (Abb. 3-22 D, D').

Zusammengefasst deuten obige Ergebnisse darauf hin, dass EGFR eher indirekt als Repressor von *msh* in TC und DC fungiert, und zwar durch Regulation der *msh*-Repressoren *Vnd*, *Ind* und *Nkx6*. Auch im VNS scheint EGFR nur indirekt über die Regulation von *ind*-Expression auf *msh* einwirken zu können (von Ohlen und Doe, 2000).

3.21 EGFR ist für die Aktivierung der *ind*-Expression in TC, DC und PC erforderlich

Die Expression von *ind* beginnt im St. 6 im NE des intermediären DC und dorsal/intermediären PC überlappend mit MAPK-Expression (Abb. 3-19 G'). MAPK wird in frühen Stadien zwar im intermediären TC exprimiert (Abb. 3-19 A, G'), verschwindet jedoch interessanterweise vor Aktivierung von *ind* aus dem NE, sodass *ind* (intermediär) und MAPK (ventral) im St. 9 komplementär zueinander exprimiert werden. Im Gegensatz dazu werden beide Faktoren im intermediären DC, sowie im dorsal/intermediären PC weiterhin co-exprimiert sind (Abb. 3-19 B, H').

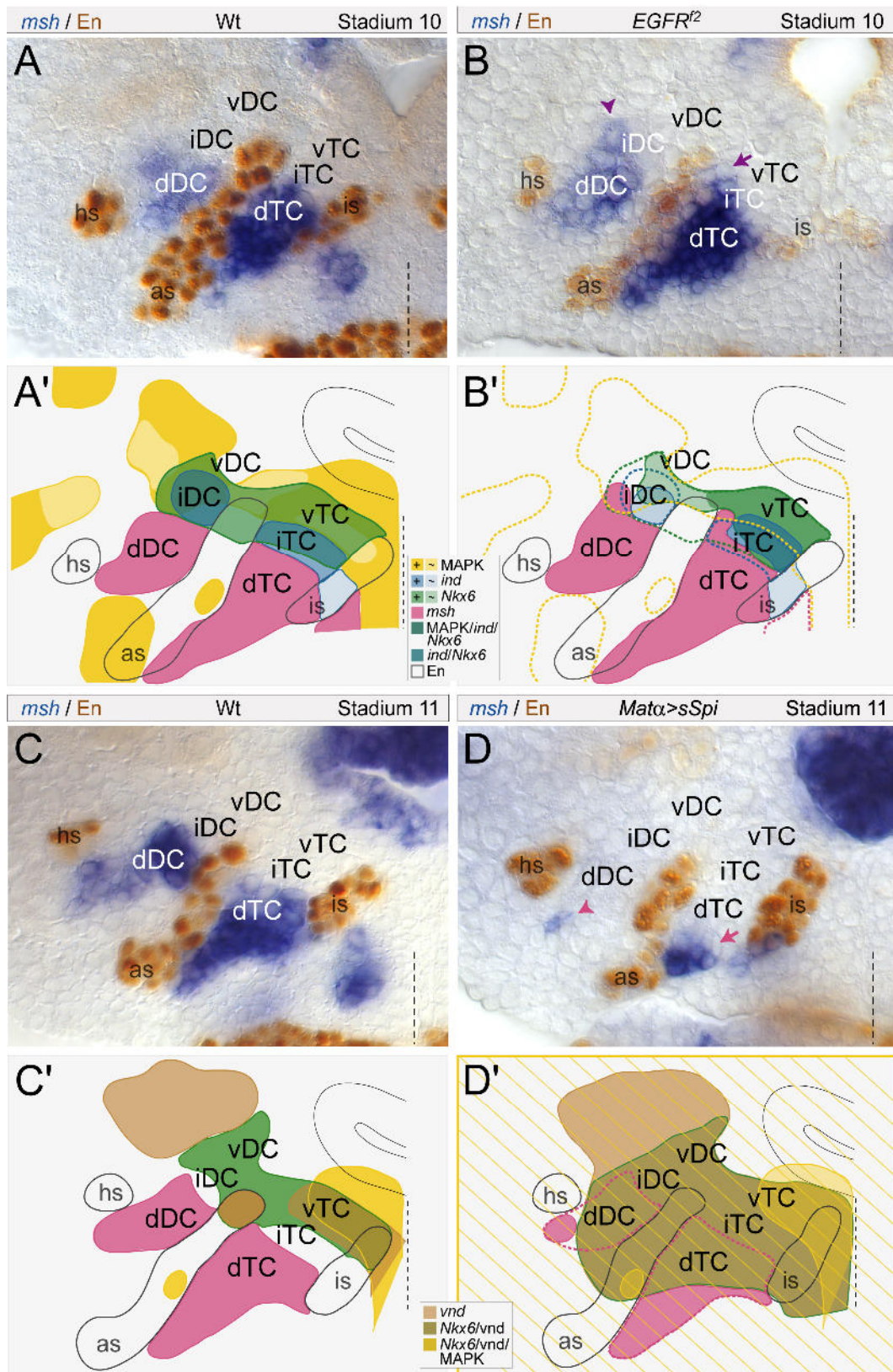


Abb. 3-22: EGFR scheint *msh*-Expression indirekt durch Regulation der *msh*-Repressoren Vnd, Ind und Nkx6 zu kontrollieren

(A-D') *msh* und *En* im Wildtyp und in mutanten Embryonen. A'-D' sind schematische Darstellungen von A-D. (A, A') Wildtyp, St. 10. (B, B') In Abwesenheit von EGFR-Aktivität beginnt *msh* in antero-intermediäres TC (Pfeil) und DC (Pfeilspitze) zu expandieren; Expression von *ind* und *Nkx6* fehlt in den entsprechenden NE-Bereichen (B'). (C, C') Wildtyp, St. 11. (D, D') Nach ektoptischer Aktivierung von *EGFR* (*Mata>sSpi*) ist *msh* im dorsalen TC (Pfeil) und

DC (Pfeilspitze) stark reduziert; die Expressionsdomänen von *vnd* und *Nkx6* expandieren in dorsales NE hinein (D'). hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

Im St. 10 findet sich Co-Expression von MAPK und *ind* noch im postero-intermediären Anteil der deutocerebralen und in großen Anteilen der protocerebralen *ind*-Domäne (Abb. 3-18 I').

Um zu klären, ob EGFR-Aktivität auch die Expression von *ind* in der Gehirnanlage beeinflusst, wurde diese nachfolgend in Abwesenheit von EGFR und nach ektopischer *EGFR*-Aktivierung untersucht. In *EGFR*²-Mutanten wird die *ind*-Expression im TC zum normalen Zeitpunkt (St. 9) aktiviert, die *ind*-Domäne scheint jedoch von ihrer räumlichen Lage her nach ventral verschoben zu sein (in Bezug zu den En-Domänen in TC und DC als räumliche Referenzmarken) (n = 35) und dabei nicht nur intermediäres, sondern auch Zellen des angrenzenden ventralen NE des TC zu umfassen (Abb. 3-23 A, B). Dementsprechend geht *ind* Expression im dorsalen Anteil des intermediären TC verloren und wird nun in angrenzenden Zellen des ventralen NE dereprimiert, vermutlich bedingt durch den frühzeitigen Verlust von *vnd* (siehe Abschnitt 3.18). Es fällt zudem auf, dass die *ind*-Expression im anterioren TC in vielen Fällen leicht reduziert ist (65%, n = 40; dunkelblauer Pfeil in Abb. 3-23 B, siehe auch Abb. 3-22 B'). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass EGFR-Aktivität zumindest partiell, d.h. im anterioren und dorsalen Anteil des intermediären TC, für die Aktivierung der *ind*-Expression notwendig ist.

Nach *Mata*-Gal4-getriebener ektopischer Aktivierung von *EGFR* (*Mata*>*sSpi*) kann in einigen Embryonen im St. 9 eine schwache Expansion von *ind* in dorsales TC beobachtet werden (25%, n = 32) (Abb. 3-23 C und hellblauer Pfeil in D). Im St. 11 hingegen ist die *ind*-Expression im TC entweder stark reduziert (47%, leichte *ind*-Reduktion in 12%, n = 34) oder fehlt vollständig (41%, n = 34) (Abb. 3-23 E-F'). Die Reduktion bzw. der Verlust von *ind*-Expression bis St. 11 ist höchstwahrscheinlich auf eine, unter diesen Bedingungen bestehende, Aufrechterhaltung von *vnd* zurückzuführen (Abb. 3-23 F'), welches im TC als Repressor von *ind* agiert (siehe Abschnitt 3.7). Die zuvor stattfindende Expansion von *ind* in das dorsale TC (Abb. 3-23 D) lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass eine schwache Konzentration von Vnd bereits ausreicht, um den *ind*-Repressor Msh dorsal zu reprimieren. Dies könnte die Aktivierung von *ind* im dorsalen NE erlauben, da die Vnd-Konzentration zu diesem

Zeitpunkt möglicherweise noch nicht stark genug ist, um auch *ind* zu reprimieren (was dann aber zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt, Abb. 3-23 F, F'). Möglicherweise kann *ind* aber auch, wie im VNS, durch ektopische EGFR-Aktivität im dorsalen NE aktiviert werden (Zhao et al., 2007b).

Im intermediären DC von *EGFR^{f2}*-Mutanten setzt *ind*-Expression entweder stark verspätet ein (etwa ab St. 9, anstelle von St. 6) und ist zudem häufig stark reduziert (87%, n = 35) oder fehlt sogar vollständig (13%, n = 35) (Abb. 3-23 B, blaue Pfeilspitze). Diese Daten weisen darauf hin, dass EGFR ebenfalls zur Aktivierung der *ind*-Expression im DC benötigt wird. Interessanterweise korreliert das Aufkommen der *ind*-Expression ungefähr mit dem Zeitpunkt, zu dem der *ind*-Repressor Vnd im intermediären DC nur noch sehr schwach oder gar nicht mehr detektierbar ist. Im Unterschied zu der Situation im TC, bleibt die *ind*-Expression im DC von *Mata>sSpi*-Embryonen jedoch unverändert (n = 34; St. 11) (Abb. 3-23 D, F). Das widerspricht zunächst der Annahme, dass EGFR als Aktivator von *ind* fungiert, da dann zu erwarten gewesen wäre, dass sich die deutocerebrale *ind*-Domäne bei ektopischer Aktivierung von *EGFR* vergrößert. Es ist jedoch möglich, dass die unter diesen Bedingungen durch ektopisches Vnd erfolgende *msh*-Repression zu spät einsetzt, sodass die NE-Zellen im dorsalen DC nicht mehr kompetent sind *ind*-Expression zu aktivieren, trotz hoher EGFR-Aktivität.

Auch im PC von *EGFR^{f2}*-Mutanten beginnt die *ind*-Expression zu einem signifikant späteren Zeitpunkt (nicht vor St. 10, anstelle von St.6) und ist ebenfalls stark reduziert (n = 35), was darauf hinweist, dass EGFR auch bei der Aktivierung der *ind*-Expression im PC erforderlich ist. Dementsprechend ist die protocerebrale *ind*-Domäne nach ektopischer *EGFR*-Aktivierung vergrößert und nach posterior bis an den *engrailed* „head spot“ (hs) heran expandiert (n = 34; St. 11) (Abb. 3-23 D, F, F').

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass EGFR-Aktivität erforderlich ist, um die *ind*-Expression im TC (zumindest im anterioren und dorsalen Anteil des intermediären NE), DC und PC zu aktivieren. Ob diese Aktivierung direkt oder indirekt erfolgt (ähnlich der Situation zwischen *ind* und Vnd im intermediären DC, siehe Abschnitt 3.7) konnte jedoch nicht geklärt werden.

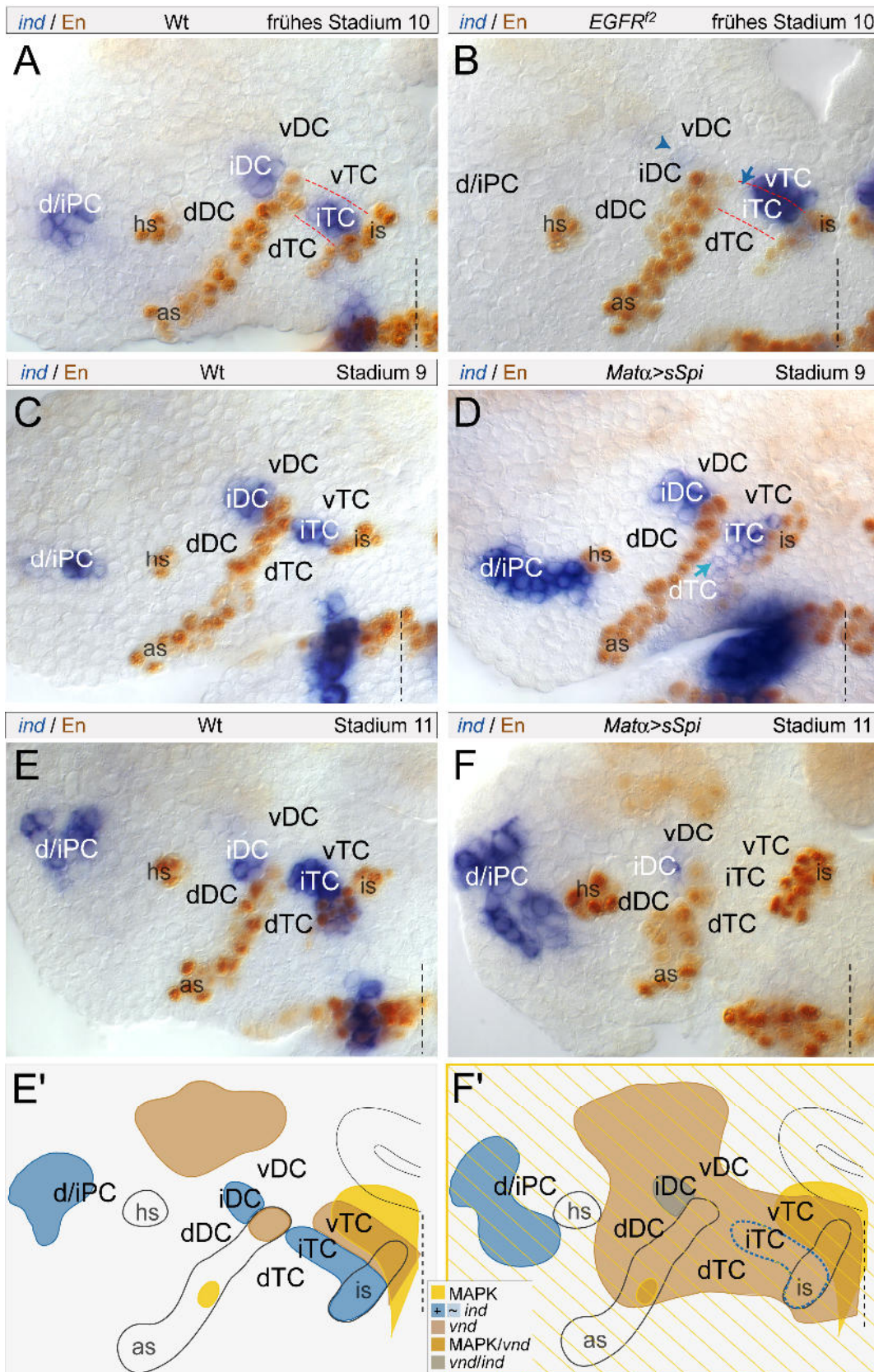


Abb. 3-23: EGFR ist für die Aktivierung der *ind*-Expression in TC, DC und PC erforderlich

(A-F') Expression von *ind* und *En* im Wildtyp und in mutanten Embryonen. E' und F' sind schematische Darstellungen von E und F. Die rot gestrichelten Linien in A und B verdeutlicht die Grenzen zwischen ventral/intermediärem sowie intermediär/dorsalem NE. (A) Wildtyp, St.

10; *ind*-Expression ist im intermediären TC und DC, sowie dem dorsal/intermediären PC zu finden. (B) In *EGFR²*-Mutanten ist die *ind*-Expression in DC (blaue Pfeilspitze) und PC sehr stark reduziert und die tritocerebrale *ind*-Domäne scheint insgesamt nach ventral verschoben und ist anterior ebenfalls leicht reduziert (blauer Pfeil). (C) Wildtyp, St. 9. (D) Nach ektopischer Aktivierung von *EGFR* (*Mata>sSpi*) bleibt *ind*-Expression im St. 9 im DC unbeeinträchtigt, im TC expandiert *ind* jedoch nach dorsal (hellblaue Pfeilspitze) und die protocerebrale *ind*-Domäne vergrößert sich in Richtung *en* „head spot“. (E, E') Wildtyp, St. 11. (F, F') Im St. 11 ist im TC von *Mata>sSpi*-Embryonen keine *ind*-Expression mehr detektierbar; *vnd* bleibt im intermediären TC aufrecht und expandiert zudem in dorsales TC (F'). hs = *en* „head spot“, as = antennaler *en*-Streifen, is = interkalärer *en*-Streifen. Zur Orientierung der Abbildungen, weiteren Symbolen und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und Abb. 3-3.

4. Diskussion

4.1 Unterschiede in der Expressionsdynamik bedingen eine segment-spezifische Regulation der DV-Gene *vnd*, *ind* und *msh* im NE von Gehirnanlage und VNS

Die zeitliche Reihenfolge in welcher die DV-Gene (*vnd*, *ind*, *msh*) in den Gehirnneuromeren aktiviert werden unterscheidet sich von jener im VNS, und diese Unterschiede scheinen ursächlich für die segment-spezifische Regulation und räumliche Anordnung von *vnd*-, *ind*- und *msh*-Expression zu sein. Im frühen TC und DC, ist *vnd*-Expression nicht nur im ventralen sondern auch im intermediären NE zu finden, wo gegenseitige Repression zwischen Vnd und dorsal exprimiertem Msh die Grenze zwischen intermediärem und dorsalem NE stabilisiert. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Msh zusätzlich auch als Repressor von *ind* arbeitet, scheint die Repression von *msh* durch Vnd eine Voraussetzung für die Aktivierung von *ind* im intermediären TC (anterior) und DC zu sein. Im Rumpf beginnt *ind*-Expression im intermediären NE vor *msh* im dorsalen NE (von Ohlen und Doe, 2000) und die Expressionsdomänen von *msh* und *vnd* grenzen nicht aneinander; demzufolge ist eine gegenseitige Repression von Msh und Vnd hier auch nicht notwendig.

Im TC agiert Vnd nicht nur als Repressor von *msh* sondern auch von *ind*, im Gegensatz zum DC. Wenn das Level an Vnd-Protein im intermediären TC mit der Zeit abnimmt (herunter reguliert durch Ems), wird *ind* schrittweise in den Zellen mit niedrigster Vnd-Konzentration aktiviert. In TC und DC führt eine ansteigende Konzentration von Ind gemeinsam mit dem hier neu entdeckten *msh*-Repressor Nkx6 (siehe Abschnitt 4.2) schließlich die von Vnd begonnene Aufgabe fort, *msh*-Expression auf dorsales NE zu begrenzen.

Der auffälligste Unterschied in der Regulation der DV-Gene führt zu der Frage wie es möglich ist, dass *vnd* und *ind* im anterioren DC transient co-exprimiert werden können (zwischen Stadium (St.) 6 und 9), wenn einerseits Vnd als Repressor von *ind* arbeitet (Weiss et al., 1998; McDonald et al., 1998; von Ohlen und Doe, 2000), auf der anderen Seite Ind aber ebenfalls in der Lage ist, *vnd* zu reprimieren (Zhao et al., 2007b). Wie kürzlich im VNS gezeigt werden konnte, scheint die Repressoraktivität von Ind bezüglich *vnd* stadienabhängig zu sein und nicht vor St. 9 stattzufinden (Zhao et al., 2007b; von Ohlen und Moses, 2009). Im Gegensatz dazu, scheint sich *ind*-Repression

durch Vnd jedoch auf keinen bestimmten Entwicklungszeitraum zu begrenzen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Vnd-Aktivität durch den EGFR-Signalweg beeinflusst werden kann, wodurch vermutlich die selektive Interaktion von Vnd mit Co-Faktoren affektiert wird, die notwendig für die Vermittlung von Repression oder Aktivierung von Zielgenen sind (Zhao und Skeath, 2002; Zhao et al., 2007a; Zhang et al., 2008). Eine begrenzte Verfügbarkeit solcher Co-Faktoren könnte ebenfalls erklären, weshalb *vnd* und *ind* spezifisch während früher Entwicklungsstadien im anterioren DC co-exprimiert werden können.

4.2 *Nkx6* fungiert in der frühen Gehirnanlage als DV-Musterbildungsgen und interagiert durch wechselseitige Repression mit *msh*

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist *Nkx6* spezifisch in die DV-Musterbildung des TC und DC involviert. Neben der zu einem späteren Zeitpunkt stattfindenden Repression von *ems* (gemeinsam mit Ind), besteht eine weitere zentrale Funktion von *Nkx6* darin, Vnd als *msh*-Repressor im intermediär/ventralen TC und DC zu ersetzen. Da *Nkx6*-Expression in beiden Gehirneuromeren sowohl früher beginnt als auch länger aufrecht erhalten bleibt als die Expression von *ind* (Abb. 4-1 A), und *msh* nur in *Nkx6*^{D25}- nicht aber in *ind*^{l6.2}-Mutanten in intermediäres NE hinein expandiert, weist dies auf *Nkx6* als den effizienteren *msh*-Repressor hin. Demzufolge scheint *Nkx6* durch Repression von *msh* (und *ems*) indirekt an der korrekten Spezifizierung von NB-Identitäten im sich entwickelnden Gehirn beteiligt zu sein. Es sind jedoch weitere Experimente erforderlich um nachzuweisen, ob *Nkx6* auch unmittelbar an der Spezifizierung der Schicksale von NB und ihren Tochterzellen in der Gehirnanlage beteiligt ist. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da *Nkx6* in fünf tritocerebralen, acht deutocerebralen und einem protocerebralen NB exprimiert wird (siehe Abb. 7-1 im Anhang). So konnte eine solche Funktion für das VNS gezeigt werden, wo *Nkx6* das Schicksal ventral projizierender Motoneurone fördert und jenes der dorsal projizierenden unterdrückt (Broihier et al., 2004).

Des Weiteren zeigten die hier erhaltenen Ergebnisse, dass sich *Nkx6* und *Msh* gegenseitig reprimieren (Abb. 4-1 B). Diese in TC und DC erfolgende negative Interaktion scheint notwendig zu sein, um die Grenze zwischen dorsalem und intermediärem NE zu stabilisieren und eine regionalisierte Expression von *Nkx6* und *msh* über die Zeit zu garantieren. Möglicherweise interagieren *Nkx6* und *Msh* mit dem Co-

Repressor Groucho (Gro), um für eine wechselseitige Repression auf transkriptioneller Ebene zu sorgen (Andersson et al., 2006; Broihier und Skeath, 2002; Muhr et al., 2001; Uhler et al., 2002; Syu et al., 2009). Interessanterweise scheinen Aspekte der genetischen Interaktion zwischen *Nkx6* und *Msh/Msx* evolutionär konserviert zu sein: beispielsweise reprimiert *Msx1*, welches im Mesencephalon (Mittelhirn) von Vertebraten exprimiert wird und dort als entscheidender Faktor bei der Spezifizierung von dopaminergen Neuronen fungiert, *Nkx6.1*-Expression in dopaminergen Vorläuferzellen des ventralen Mesencephalon von Mäusen (Andersson et al., 2006).

4.3 Gegenseitige Repression zwischen DV-Genprodukten ist notwendig, um Grenzen zwischen den DV-Expressionsdomänen in der Gehirnanlage festzulegen und zu stabilisieren

Wie sich während dieser Arbeit immer deutlicher herausstellte, scheint gegenseitige Repression zwischen Paaren von Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren in der sich entwickelnden Gehirnanlage von *Drosophila* (d.h. im TC und DC) essenziell für die Errichtung und Aufrechterhaltung diskreter DV-Genexpressionsdomänen zu sein (Abb. 4-1 B und Abb. 4-2). Früh in der Entwicklung sorgt die wechselseitige Repression zwischen *Ems* und *Vnd* für eine vorläufige dorsoventrale Regionalisierung des NE in TC und DC (siehe Abschnitt 4.4). Gegenseitige Repression zwischen *Msh* und *Nkx6* sowie zwischen *Msh* und *Ind* halten nachfolgend die dorsal/intermediäre Grenze im NE von TC und DC aufrecht, und Repression zwischen *Ind* und *Vnd* stabilisiert die intermediär/ventrale Grenze im TC. All diese genetischen Interaktionen sowie die Beobachtung, dass *Msh* und *Vnd* als wechselseitige Repressoren agieren, sind nicht mit dem „Konzept der ventralen Dominanz“ in Einklang zu bringen. Hierbei handelt es sich um eine für das NE des VNS aufgestellte Hypothese, der zufolge ventrale Gene die weiter dorsal exprimierten Gene reprimieren (Weiss et al., 1998; McDonald et al., 1998; Cowden und Levine, 2003; zusammengefasst in Cornell und von Ohlen, 2000). Die im pNE gewonnenen Daten unterstützen dagegen eher ein Modell, in welchem die gegenseitige Repression zwischen DV-Faktoren entscheidend für die Stabilisierung ihrer Expressionsgrenzen ist. Interessanterweise konnten kürzlich von Zhao et al. (2007b) repressive Interaktionen zwischen *Ind* und *Vnd* im NE des VNS nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen darüber hinaus, dass dorsales *Msh* auch im VNS in der Lage ist ventraler exprimiertes *ind* zu reprimieren.

Demzufolge ist das „Konzept der ventralen Dominanz“ (z.B. Cowden und Levine, 2003) nicht nur für das pNE ungültig, sondern vermutlich auch für das NE des VNS nicht anwendbar.

Obwohl *Msh* und *Ind* im TC und DC die Fähigkeit besitzen *vnd* zu reprimieren, scheint keiner der beiden Faktoren auszureichen, um die dorsale Grenze der *vnd*-Expression präziser zu definieren, wie dies für *Ind* im NE des VNS gezeigt werden konnte (ab St. 9; Zhao et al., 2007b). Anstatt diese Grenze durch wechselseitige Repression zu verstärken, könnte die dorsale Grenze der *vnd*-Expressionsdomäne in der Gehirnanlage in konzentrationsabhängiger Weise durch einen potentiellen Aktivator, wie z.B. Dorsal (wie schon für das VNS gezeigt wurde; von Ohlen und Doe, 2000), oder über Repression durch BMP/Dpp reguliert werden (Mizutani et al., 2006).

Des Weiteren lassen sich neuromer-spezifische Unterschiede bei der Limitierung von *ind*- und *msh*-Expression entlang der DV-Achse beobachten. *Vnd* legt die ventrale Grenze von *ind*-Expression im NE des VNS (Weiss et al., 1998) und TC (Abschnitt 3.7 und Urbach et al., 2006), jedoch nicht in DC (siehe Abschnitt 3.7) oder PC fest (in welchem die Expressionsdomäne von *ind* und *vnd* nicht einmal aneinander grenzen). Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die dorsale Begrenzung der *ind*-Expression in TC und DC mittels Repression durch *Msh* erreicht wird, was jedoch weder für das PC (wo *msh* nicht vor St. 11 exprimiert wird; Urbach und Technau, 2003a) noch für das VNS zu gelten scheint (Cowden und Levine, 2003). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass *Msh* für die Präzisierung, wenn auch nicht den initialen Aufbau, der dorsalen *ind*-Grenze im VNS verantwortlich ist (siehe Abschnitt 3.4.1). Zieht man in Betracht, dass *ind*-Expression in *msh*⁶⁸-Mutanten nicht vollständig in das dorsale NE von TC und DC hinein expandiert, könnte dies ebenfalls auf eine Beteiligung des nukleären Dorsal-Gradienten bei der Festlegung der dorsalen *ind*-Grenze hindeuten, möglicherweise in Kombination mit gradueller *Egfr*-Aktivität (wie im NE des VNS gezeigt; von Ohlen und Doe, 2000) oder BMP/Dpp (wodurch *ind* im Rumpf-NE reprimiert wird; Mizutani et al., 2006).

Während *Vnd* in TC und DC von Beginn an für die Beschränkung von *msh*-Expression auf dorsales NE verantwortlich ist (Urbach et al., 2006), ist es im NE des VNS nur indirekt am Aufbau der ventralen Grenze der *msh*-Expression beteiligt (von Ohlen und Doe, 2000). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, übernimmt *Ind* gemeinsam mit *Nkx6* zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt die Aufgabe, die Repression von *msh* in

Vergleich mit den Expressionsmustern der orthologen Gene im Mäusegehirn.

(A) Schematische Zusammenfassung der räumlich-zeitlichen Expression von DV-Genen (*vnd*, *ind*, *msh*, *Nkx6*) und *ems* im NE des TC und DC. (B) Modell genetischer Interaktionen zwischen DV-Genen und *ems* im NE des TC und DC im Vergleich mit dem ventralen Nervensystem (VNS). Schwarze Symbole stehen für bekannte genetische Interaktionen, blaue Symbole repräsentieren die in dieser Arbeit beschriebenen neuen Interaktionen und rote Symbole weisen auf Unterschiede in genetischen Interaktionen zwischen TC und DC hin. Grüne und gelbe Symbole kennzeichnen den negativen Rückkopplungs-Mechanismus zwischen *Ems* und *Nkx6/Ind* im intermediären DC. Eine durchgezogene Linie kombiniert mit einem Balken (—) bedeutet Repression und eine gestrichelte Linie (----) weist auf positive Regulation hin. (C) Vergleich der Expression von *ems/Emx2* (Rubenstein et al., 1998; Shimamura et al., 1995; Urbach und Technau, 2003b) und den DV-Genen (*msh/Msx* (Ramos und Roberts, 2005; Urbach und Technau, 2003a), *Nkx6* und *vnd/Nkx2* (Prakash et al., 2009; Rubenstein et al., 1998; Shimamura et al., 1995; Urbach und Technau, 2003a)) zwischen Maus (Embryonaltag 8 (E8) und E10 (wenn sich das Neuralrohr zur Neuralplatte aufgefaltet hat)) und *Drosophila* (St. 9). *Msx1* ist hauptsächlich im dorsalen NE des Mäusegehirns exprimiert (Ramos und Roberts, 2005), jedoch zusätzlich auch im ventralen Mittelhirn zu finden (Andersson et al., 2006). v = ventral, i = intermediär, d = dorsal, NB_{St.11} = *Nkx6* reprimiert *ind*-Expression in intermediären NB des VNS, FB = Prosencephalon/Vorderhirn (forebrain), MB = Mesencephalon/Mittelhirn (midbrain), HB = Rhombencephalon/Hinterhirn (hindbrain). Für detailliertere Informationen siehe Diskussion.

4.4 Wechselseitige Repression zwischen dem cephalen Lückengen *ems* und dem DV-Gen *vnd* sorgen für eine vorläufige dorsoventrale Unterteilung von TC und DC

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass das evolutionär konservierte Homöodomänenprotein *Ems* ein wesentlicher Bestandteil des genregulatorischen Netzwerkes ist, welches die DV-Musterbildung in den posterioren Neuromeren (TC, DC) der Gehirnanlage steuert (Abb. 4-1 A, B). Diese neue Funktion war überraschend, da *ems* bisher ausschließlich mit Musterbildungsprozessen entlang der AP-Achse in Verbindung gebracht wurde. Es wird vermutet, dass die Kopfsegmente durch die kombinierte Aktivität der Lückengene *ems*, *buttonhead* und *orthodenticle* (*ocelliless* - FlyBase) generiert werden (Cohen und Jürgens, 1990; Grossniklaus et al., 1994) und das *ems*-Mutanten sowohl Defekte bei der Entstehung des interkalaren und antennalen Segments (Cohen und Jürgens, 1990; Schmidt-Ott et al., 1994), als auch im korrespondierenden TC und DC aufweisen (Hirth et al., 1995; Younossi-Hartenstein et al., 1997); diese Defekte stimmen mit dem Muster früher *ems*-Expression überein (Dalton et al., 1989; Walldorf und Gehring, 1992; Urbach und Technau, 2003b). Zudem besitzt *ems* sehr wahrscheinlich auch eine homöotische Funktion, da es bei der Spezifizierung der interkalaren Segmentidentität mitwirkt (Schöck et al., 2000). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen darauf hin, dass eine weitere entscheidende Funktion von *Ems* in der wechselseitigen repressiven

Interaktion mit Vnd liegt (Abb. 4-1 B). Schon im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass *vnd*-Expression in der Gehirnanlage sehr dynamisch verläuft und spezifische Unterschiede in TC und DC aufweist (Urbach et al., 2006). In dieser Arbeit stellte sich nun heraus, dass Ems an der Regulation gehirnspezifischer Unterschiede der *vnd*-Expression beteiligt ist und dass Vnd wiederum als Repressor von *ems* in bestimmten Anteilen von TC und DC agiert (Abb. 4-1 B). Durch diese Interaktionen werden die (zu Beginn teilweise überlappenden) Expressionsdomänen von *vnd* und *ems* bis zum Einsetzen der Neurogenese in sich gegenseitig ausschließende Bereiche aufgeteilt; dies ist von entscheidender Bedeutung, da beide Gene positionelle Informationen liefern, wodurch nachfolgend die Identitäten individueller Gehirn-NB festgelegt werden (Urbach und Technau, 2003b). Je nach Kontext kann Vnd/Nkx2 als transkriptioneller Aktivator oder Repressor agieren, beispielsweise durch Interaktion mit dem Co-Repressor Gro, welcher die Repression verstärkt (Chu et al., 1998; Cowden und Levine, 2003; Muhr et al., 2001; McDonald et al., 1998; Stepchenko und Nirenberg, 2004; Uhler et al., 2007; Yu et al., 2005). Interessanterweise ließ sich beobachten, dass Ems die Expression von zwei *Nkx*-Genen auf gegensätzliche Weise reguliert: es reprimiert *vnd/Nkx2*, wird jedoch benötigt damit *Nkx6* aktiviert werden kann. Die Repressorfunktion von Ems ist möglicherweise ebenfalls Gro-abhängig, da berichtet wurde, dass Ems in der Lage ist Gro in vitro zu binden (Goldstein et al., 2005).

In *ems*-Mutanten sind Defekte in proneuraler Genexpression (*lethal of scute* und *achaete*) auf solche NE-Regionen begrenzt, in denen *ems* normalerweise während der frühen Neurogenese exprimiert wird, was lediglich zu dem Verlust einer Subpopulation von NB in TC und DC führt (Younossi-Hartenstein et al., 1997; Hartmann et al., 2000). In späten *ems*-mutanten Gehirnen ist hingegen eine starke Reduktion bzw. das vollständige Fehlen von TC und DC zu beobachten (Hirth et al., 1995). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die korrekte Entwicklung einer größeren NE-Domäne und/oder eines großen Anteils der NB in TC und DC affektiert sein muß. Dennoch erscheint die Organisation des frühen pNE bis St. 9/10 in *ems*-Mutanten unbeeinträchtigt und Anzeichen von Zelltod (Apoptose) sind ebenfalls nicht detektierbar (Hartmann et al., 2000). Ein mögliche Erklärung für den Verlust von TC und DC könnte sein, dass es in *ems*-Mutanten einerseits zu einer Derepression von *vnd* in das ventral/intermediäre NE beider Neuromere kommt und andererseits die Expression von *msh*, *ind* und *Nkx6* nicht aktiviert wird. Wie wir bereits in einer früheren Publikation zeigen konnten, verhindert ektopisches *vnd* die Expression einer Vielzahl von Genen die für die Festlegung der

NB-Identitäten wichtig sind (Urbach et al., 2006). In Übereinstimmung damit wurde auch für *ems*-Mutanten die fehlende Expression einer großen Anzahl molekularer Marker in der Gehirnanlage beschrieben (Hartmann et al., 2000). Es ist daher vorstellbar, dass manche NB im TC und DC von *ems*-Mutanten nicht gebildet werden, als Konsequenz aus fehlender *ems*- und ektopischer *vnd*-Expression (sowie der nicht stattfindenden Aktivierung proneuraler Gene). Hinzu kommt, dass möglicherweise andere NB inklusive ihrer Tochterzellen trotz der Mis-Spezifizierung des NE (in welchem die Expression neuraler Identitätsgene fehlt oder verändert ist) gebildet werden, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt degenerieren.

4.5 Integration von DV- und AP-Signalen legt die NE-Domänen von *Nkx6*-, *ind*- und *msh*-Expression in TC und DC fest

Bisher war weitestgehend unklar wie *Nkx6*-Expression in der Gehirnanlage reguliert wird, auch wenn vermutet wurde, dass *Vnd* hierbei als positiver Regulator fungiert (Uhler et al., 2002). Im Blastodermstadium ist Co-Expression von *ems* und *vnd* nur im intermediären und ventralen NE von TC und DC zu beobachten, was eventuell die Begrenzung der frühen *Nkx6*-Expression auf das entsprechende NE der Gehirnanlage und ein Fehlen im NE des VNS bedingt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Ems* und *Vnd* gemeinsam die Aktivierung von *Nkx6* in der frühen Gehirnanlage ermöglichen. Eine hohe Konzentration von *Ems*-Expression geht der Aktivierung von *Nkx6* in TC und DC voraus (Abb. 4-1 A) und zusammen mit der Tatsache, dass *Nkx6*-Expression in *ems*-Mutanten vollständig fehlt, deutet dies darauf hin, dass *Ems* als direkter Aktivator fungieren und so die Ausdehnung der *Nkx6*-Domäne entlang der AP-Achse kontrollieren könnte. *Vnd* hingegen ist nur indirekt am Aufbau der *Nkx6*-Domäne entlang der DV-Achse beteiligt, indem es den *Nkx6*-Repressor *Msh* reprimiert. Dass DV-Musterbildung im pNE auch AP-Signale mit einschließt, wird weiterhin dadurch unterstützt, dass *Ems* auch für die Aktivierung von *ind* und *msh* benötigt wird und folglich ein zentraler Regulator bei der DV-Musterbildung in TC und DC zu sein scheint. Zudem liefern die Daten Hinweise auf einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus innerhalb des DV-Netzwerks, in welchem *Ems* erforderlich ist um seine eigenen (späteren) Repressoren, *Nkx6* und *Ind*, zu aktivieren (Abb. 4-1 B).

Zusammengefasst lassen diese Daten nicht nur darauf schließen, dass Ems die Expression aller DV-Gene reguliert (Aktivierung von *Nkx6*, *ind*, *msh* und Repression von *vnd*), sondern umgekehrt, dass DV-Faktoren (*Nkx6*, *Ind* und *Vnd*) auch die Expression von *ems* kontrollieren, was darauf hindeutet, dass die Integration von DV- und AP-Musterbildungssignalen auf unterschiedlichen Ebenen innerhalb des genregulatorischen DV-Netzwerks stattfindet.

4.6 Engrailed reguliert Aspekte der räumlich begrenzten Expression der DV-Gene *vnd*, *ind* und *msh*

Der Transkriptionsfaktor Engrailed (En), welcher sowohl als Repressor wie auch als Aktivator fungieren kann (Alexandre und Vincent, 2003), wird mit einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen in *Drosophila* in Verbindung gebracht, wie beispielsweise der Kompartimentierung im frühen Embryo (zusammengefasst in Vincent, 1998), Modulation von Hox-Genexpression (Gebelein und Mann, 2007) oder der Regulation von Faktoren, welche für die axonale Wegfindung von Bedeutung sind (z.B. *frazzled*; Joly et al., 2007). In dieser Arbeit konnte eine neue Funktion von En im frühen Embryo aufgezeigt werden, welche darin besteht, die räumlich begrenzte Expression der DV-Gene in den posterioren Bereichen von DC, TC und im VNS zu kontrollieren.

Im posterioren Kompartiment des DC reprimiert En die Expression von *msh* und *ind*, hält aber andererseits die Expression von *vnd* aufrecht. Da *Ind*, wie sich herausstellte, (zu einem späteren Zeitpunkt) als *vnd*-Repressor agieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass En die Aufrechterhaltung von *vnd*-Expression durch Repression von *ind* im posterioren DC sicher stellt. Im posterioren Kompartiment des TC ist En ebenfalls für das Herunterregulieren der *msh*-Expression erforderlich, wird hier jedoch auch, im Gegensatz zum DC, für die Aktivierung von *ind* benötigt (in 4-6 Zellen innerhalb des dorsalen Anteils des interkalaren *en*-Streifens). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *Msh* als *ind*-Repressor fungiert, scheint En wiederum durch Repression von *msh* dafür zu sorgen, dass *ind* im posterioren TC aktiviert werden kann; es ist jedoch nicht auszuschließen, dass En daneben auch als direkter Aktivator von *ind* arbeitet. Ähnlich der Situation im TC, scheint En die Expression von *msh* im NE des VNS negativ, *ind*-Expression hingegen positiv (bezüglich der Aufrechterhaltung von *ind*-Expression) zu regulieren.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das Segmentpolaritätsgen *en* eine entscheidende Rolle bei der präzisen Regionalisierung der Expressionsdomänen bestimmter DV-Gene im posterioren Kompartiment der Neuromere des Gehirns und VNS einnimmt. Dies stellt ein weiteres Beispiel für die Integration eines AP-Musterbildungsgens in das DV-Genregulatorische Netzwerk des pNE dar (Abb. 4-2). Wie oben beschrieben, reguliert *En* die jeweiligen DV-Genen in unterschiedlicher Art und Weise; es gibt bisher jedoch keinen Hinweis darauf, dass die DV-Gene umgekehrt auch in der Lage sind die Expression von *en* zu kontrollieren, wie dies für *ems* gezeigt werden konnte (Abschnitte 4.4 und 4.5). *En* kann sowohl als negativer wie auch als positiver Regulator auf Transkriptionsebene agieren, in Abhängigkeit von dem jeweiligen Zielgen und segmentalen Kontext (Alexandre und Vincent, 2003). Die DV-Gene kontrollieren die Entstehung und Spezifizierung bestimmter Gehirn-NB (Urbach et al., 2006; und eigene Beobachtungen). Da die hier aufgezeigten genetischen Interaktionen zwischen *En* und den DV-Genen während eines Entwicklungszeitraums stattfinden, in welchem NB gebildet werden, ist es sehr wahrscheinlich, dass *En* die Entstehung und das Schicksal bestimmter NB in der Gehirnanlage durch Regulation von DV-Genexpression kontrolliert.

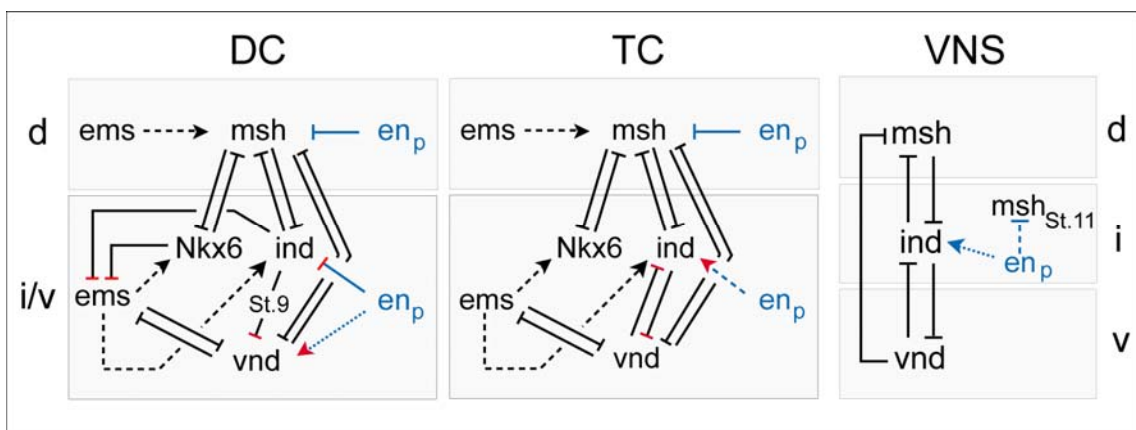


Abb. 4-2: Modell der genetischen Interaktionen zwischen DV- und AP-Musterbildungsgenen im NE der frühen Gehirnanlage und des VNS

Erweiterung des Modells genetischer Interaktionen aus Abb. 4-1 B. Zur besseren Übersicht sind nur die neuen genetischen Interaktionen mit *En* in blau und die in Abb. 4-1 B schon beschriebenen Interaktionen in schwarz dargestellt sind; rote Symbole weisen dabei auf Unterschiede in genetischen Interaktionen zwischen TC und DC hin. Eine durchgezogene Linie zusammen mit einem Balken (—) bedeutet Repression, eine gepunktete Linie (····) steht für Aufrechterhaltung der Genexpression, eine gestrichelte Linie kombiniert mit einer Pfeilspitze (--->) weist auf positive Regulation hin und eine gepunktete Linie kombiniert mit einem Balken (----|) steht für negative Regulation. v = ventral, i = intermediär, d = dorsal, en_p = *en* reguliert die entsprechende Genexpression im posterioren Anteil des Neuromers.

4.7 EGFR-Aktivität ist notwendig für die Expression der DV-Gene *vnd*, *ind* und *Nkx6* in spezifischen Anteilen des pNE, reguliert die Expression von *msh* jedoch nur indirekt

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist auch der EGFR-Signalweg im sich entwickelnden Gehirn durch unterschiedliche Interaktionen mit den DV-Genen in das genregulatorische Netzwerk integriert, welches die dorsoventrale Regionalisierung des pNE steuert (Abb. 4-3).

Die Analyse von *EGFR^{f2}*-Mutanten ergab, dass die Aufrechterhaltung der *vnd*-Expression im NE des TC, DC und einem Anteil des PC nicht gewährleistet ist, was auf EGFR-Aktivität als aufrechterhaltenden Faktor hindeutet. Doch zumindest im posterioren DC scheint EGFR-Signal alleine nicht auszureichen, da hier auch En bei der Aufrechterhaltung der *vnd*-Expression eine wichtige Rolle spielt (siehe Abschnitt 4.6 und Abb. 4-2). Zudem gibt es aus anderen Arbeiten Hinweise darauf, dass Vnd im VNS in der Lage ist, die eigene Expression durch Autoregulation aufrecht zu erhalten (Yu et al., 2005; Wang et al., 2005). Auch wenn EGFR-Aktivität und En eindeutig an der Aufrechterhaltung von *vnd*-Expression im pNE beteiligt sind, so schließt dies eine zusätzliche Autoregulation durch Vnd dennoch nicht aus. Eine sich hieraus ergebende Hypothese wäre, dass En und EGFR parallel an der Aufrechterhaltung der *vnd*-Expression im posterioren DC beteiligt sind: En reprimiert den *vnd*-Repressor Ind, und EGFR-Aktivität sorgt möglicherweise durch Phosphorylierung von Vnd oder eines Co-Faktors dafür, dass Vnd seine eigene Expression aufrecht erhalten kann oder verhindert eventuell den Abbau von bereits vorhandenem Vnd-Protein. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine stark erhöhte Aktivität des EGFR (ausgelöst durch Überexpression von sSpi) in der Lage ist, *vnd*-Expression im dorsalen NE des TC und DC zu aktivieren. Im intermediären NE ist *vnd* allerdings, im Gegensatz zum VNS, schon (transient) endogen exprimiert; die *vnd*-Expression wird hier sehr wahrscheinlich durch ektopische EGFR-Aktivität länger aufrecht erhalten. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant zu sehen, ob Ems, welches *vnd* im Wildtyp im intermediären TC und DC reprimiert, bei Überexpression von sSpi oder in *EGFR^{f2}*-Mutanten ebenfalls affiziert ist.

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse eine große Ähnlichkeit zu der Situation im VNS auf, wo EGFR-Aktivität ebenfalls erforderlich ist, um *vnd*-Expression im ventralen NE aufrecht zu erhalten (zusammengefasst in Skeath, 1999). Zudem konnte

von Zhao et al. (2007b) beobachtet werden, dass *vnd* im intermediären und dorsalen NE des VNS durch erhöhte EGFR-Aktivität aktiviert werden kann.

Auch für die Aufrechterhaltung der *Nkx6*-Expression im intermediären TC und DC ist EGFR-Aktivität notwendig. Da eine direkte Aktivierung durch *Vnd* ausgeschlossen werden konnte, wäre auch hier (wie für *Vnd*) vorstellbar, dass *Nkx6* selbst das Ziel der Phosphorylierung durch aktivierte MAPK ist oder ein bisher unbekannter *Nkx6*-Repressor inhibiert werden soll. Es ist jedoch nicht bekannt, ob *Nkx6* überhaupt mögliche MAPK-Phosphorylierungsstellen besitzt, wie dies für *Vnd* gezeigt werden konnte (Zhang et al., 2008), und für eine genaue Klärung sind weitere Experimente erforderlich. Insgesamt scheint die durch EGFR-Aktivität vermittelte Aufrechterhaltung von *Nkx6*-Expression im pNE ein gehirn-spezifischer Prozess zu sein, da *Nkx6* im NE von Thorax und Abdomen nicht exprimiert wird. Eine Ausnahme hiervon bildet die sehr kurze Phase kaum detektierbarer *Nkx6*-Expression im ventralen NE des VNS (Abb. 4-1 C), kurz vor Delamination der ventralen NB, welche jedoch nicht von EGFR-Aktivität abhängig zu sein scheint.

An der negativen Regulation der *msh*-Expression in TC und DC scheint EGFR nur indirekt beteiligt zu sein, da sich die im Expressionsmuster von *msh* auftretende Veränderung sowohl bei Fehlen wie auch verstärkter Aktivierung von EGFR durch das Verhalten der anderen DV-Gene in der entsprechenden Situation erklären lässt (siehe auch Abschnitt 3.20 im Ergebnisteil). So ist die in *EGFR^{f2}*-Mutanten zu beobachtende Derepression von *msh* im intermediären TC und DC höchstwahrscheinlich auf das Fehlen der *msh*-Repressoren *Vnd*, *Ind* und *Nkx6* zurückzuführen, und die Reduktion der *msh*-Expression nach verstärkter EGFR-Aktivierung eine Folge der Expansion von *Vnd* und *Nkx6* in dorsales NE. Ein weiterer Hinweis darauf, dass EGFR nicht als direkter Repressor von *msh* agiert liefern Untersuchungen in *vnd^Δ*-Mutanten. Hier zeigt sich, dass *msh* in Abwesenheit von *Vnd* schon ab St. 5/6 bis in ventralstes TC und DC hinein dereprimiert ist, obwohl EGFR zu diesem Zeitpunkt noch im gesamten intermediär/ventralen NE aktiv ist. Davon ausgehend, dass auch im Gehirn EGFR-Signal in der Hierarchie über *vnd* steht, sollte EGFR-Aktivität demnach in *vnd^Δ*-Mutanten nicht affektiert sein, was bisher allerdings noch nicht experimentell untersucht wurde.

Auch im VNS gibt es bisher keine Hinweise auf eine direkte Kontrolle der *msh*-Expression durch EGFR-Aktivität und es wird vermutet, dass EGFR hier ebenfalls durch Regulation von Vnd und Ind negativ auf die *msh*-Expression einwirkt (von Ohlen und Doe, 2000).

Wie die Analyse von *EGFR*^{f2}-Mutanten außerdem zeigte, ist ein funktionierender EGFR-Signalweg Voraussetzung für die korrekte Expression von *ind* in TC, DC und PC. In *EGFR*^{f2}-Mutanten wird *ind*-Expression in DC und PC erst später aktiviert und ist zudem, ebenso wie die *ind*-Domäne im TC, stark reduziert (siehe Abschnitt 3.21 im Ergebnisteil). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass EGFR-Aktivität zwar erforderlich ist, allerdings nicht als alleiniger Faktor für die Aktivierung von *ind*-Expression im pNE verantwortlich sein kann. Interessanterweise kann der Co-Repressor Gro, welcher ubiquitär exprimiert wird (Zak et al., 1990), durch die Aktivität des EGFR-Signalwegs, d.h. Phosphorylierung durch MAPK, inaktiviert werden (Cinnamon et al., 2008). In *EGFR*^{f2}-Mutanten würde diese Inaktivierung jedoch nicht stattfinden und Gro daher in seiner aktiven Form vorliegen. In Abschnitt 4.1 wurde die Frage aufgeworfen, wie es möglich sein kann, dass *vnd* und *ind* im intermediären DC co-exprimiert werden. Vnd ist durch Interaktion mit aktivem Gro in der Lage, Zielgene zu reprimieren (Yu et al., 2005) und wie in *EGFR*^{f2}-Mutanten beobachtet werden konnte, beginnt die reduzierte *ind*-Expression im DC etwa zu dem Zeitpunkt wenn *vnd* dort nicht mehr detektierbar ist. Da EGFR-Aktivität anscheinend nicht in der Lage ist, eine Expansion des *ind*-Repressors Msh in intermediäres NE zu verhindern, wird vor Beginn der *ind*-Aktivierung der *msh*-Repressor Vnd benötigt. Weil Vnd aber auch die Fähigkeit besitzt, *ind* zu reprimieren, wäre es vorstellbar, dass EGFR-Aktivität die Aktivierung von *ind*-Expression im intermediären DC durch Inaktivierung von Gro gewährleistet und Vnd somit der zur *ind*-Repression benötigte Co-Faktor fehlt. Obwohl *ind* weder im TC noch im PC mit *vnd* co-exprimiert wird, jedoch beide Expressionsdomänen in *EGFR*^{f2}-Mutanten reduziert sind, könnte sich auch hier die möglicherweise fehlende Phosphorylierung von Gro in Kombination mit einem weiteren Repressor negativ auf die *ind*-Expression auswirken.

Für das VNS ist bekannt, dass bei der Aktivierung von *ind*-Expression sowohl Dorsal als auch EGFR benötigt werden, wobei Dorsal der kompetentere Aktivator zu sein scheint (von Ohlen und Doe, 2000). Andererseits konnte von Dubnicoff et al. (1997) gezeigt werden, dass Dorsal durch Interaktion mit Gro von einem Aktivator in einen

Repressor umfunktioniert werden kann. Somit wäre die folgende Hypothese vorstellbar, in welcher Vnd, EGFR und Dorsal gemeinsam die *ind*-Expression im pNE kontrollieren: Vnd hält durch Repression den *ind*-Repressor Msh aus dem intermediären NE des TC und DC heraus (siehe auch Abschnitt 3.7 im Ergebnisteil). EGFR sorgt durch Inaktivierung von Co-Repressoren (z.B. Gro) dafür, dass Vnd oder Dorsal (oder möglicherweise unbekannte Faktoren) nicht als Repressoren von *ind* in spezifischen Bereichen des pNE agieren können. Der Dorsal-Gradient beschränkt die konzentrationsabhängige Aktivierung der *ind*-Expression auf intermediäres NE in TC und DC, sowie auf intermediär/dorsales NE im PC.

Zusammengenommen deuten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten darauf hin, dass EGFR ebenfalls als DV-Gen während der Regionalisierung der Gehirnanlage fungiert und, ähnlich wie im VNS, durch Regulation der anderen DV-Genen für die korrekte Bildung und Spezifizierung von NB-Subpopulationen sorgt.

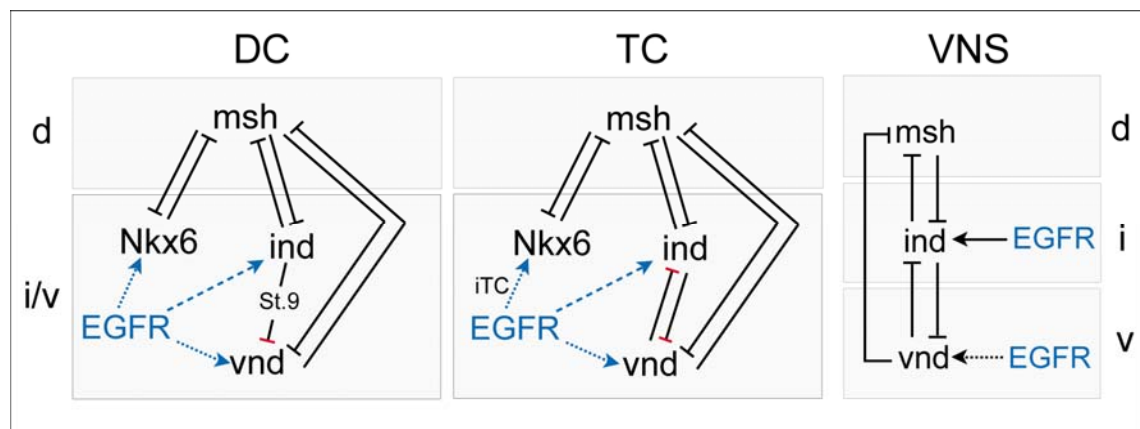


Abb. 4-3: Modell der genetischen Interaktionen zwischen EGFR und anderen DV-Genen in DC, TC und VNS

Zur besseren Übersicht sind nur die neuen genetischen Interaktionen mit EGFR in blau und die in Abb. 4-1 B schon beschriebenen Interaktionen in schwarz dargestellt sind; rote Symbole weisen auf Unterschiede in genetischen Interaktionen zwischen TC und DC hin. Eine durchgezogene Linie zusammen mit einem Balken (—|) bedeutet Repression, eine durchgezogene Linie kombiniert mit einer Pfeilspitze (→) steht für Aktivierung, eine gepunktete Linie (····) bedeutet Aufrechterhaltung der Genexpression und eine gestrichelte Linie (---) weist auf positive Regulation hin. v = ventral, i = intermediär, d = dorsal.

4.8 Das genregulatorische Netzwerk der DV-Musterbildung in TC und DC setzt sich im Wesentlichen aus transkriptionellen Repressoren zusammen

Ein vorherrschendes Charakteristikum des hier beschriebenen gehirn-spezifischen DV-genetischen Netzwerks und ein allgemeines Konstruktionsmerkmal genregulatorischer Netzwerke (Levine und Davidson, 2005), ist die massive Nutzung transkriptioneller Repression zur Regulation der räumlich-zeitlichen Expression von Zielgenen. Fast alle in diesem Netzwerk involvierten Faktoren arbeiten als Repressoren (mit Ausnahme von EGFR sowie Ems, welches neben der Repression von *vnd* möglicherweise auch als Aktivator fungiert), entweder durch gegenseitige Repression (zwischen Ems und Vnd, Nkx6 und Msh, Ind und Msh), einen doppelt-negativen Mechanismus (Vnd reprimiert Msh, welches wiederum Nkx6 und Ind reprimiert; En reprimiert den *ind*-Repressor Msh) oder einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus (Ems wird benötigt um Nkx6 und Ind zu aktivieren, welche dann im Folgenden Ems reprimieren) (Abb. 4-1 B, Abb. 4-2 und Abb. 4-3). Die räumliche und zeitliche Komplexität der hier entschlüsselten Interaktionen weist darauf hin, dass dem höchstwahrscheinlich eine ähnlich vielschichtige cis-regulatorische Kontrolle der beteiligten Faktoren zugrunde liegt. Zum Beispiel wird die Ausdehnung und Regionalisierung der *msh*-Expression durch mindestens vier transkriptionelle Repressoren in unterschiedlichen Entwicklungszeitfenstern gesteuert (Vnd früh, Nkx6, Ind und En später) und mindestens drei Repressoren regulieren die Expressionsdynamik von *ems* (Vnd früh, Nkx6 und Ind später). Das gehirn-spezifische DV-Netzwerk beinhaltet mit Sicherheit noch weitere Gene und es ist sehr wahrscheinlich das Interaktionen mit anderen mutmaßlichen Regulatoren (z.B. Dorsal und Dpp) das derzeitige Modell vervollständigen werden. Insgesamt bilden die in dieser Arbeit erworbenen Kenntnisse eine gute Basis, um systematische Vergleiche zwischen verschiedenen Tierarten bezüglich der DV-Regionalisierung des Gehirns auf der Ebene genregulatorischer Netzwerke durchzuführen.

Die DV-Gene beinhalten alle eine Eh1-Repressordomäne, ebenso wie En und Ems, und sind in der Lage mit dem Co-Repressor Groucho (Gro) zu interagieren (Smith und Jaynes, 1996; Yu et al., 2005; Uhler et al., 2007; von Ohlen et al., 2007a; Syu et al., 2009), wodurch sie fähig sind Repression ihrer entsprechenden Zielgene zu vermitteln (ebenso wie sich gegenseitig zu reprimieren). Wie ist es jedoch möglich, dass alle DV-Gene mit dem gleichen Co-Repressor interagieren können um die Grenzen von

Expressionsdomänen zu stabilisieren? Zunächst einmal weisen die DV-Gene räumliche sowie auch zeitliche Unterschiede in ihrer Expression auf. Zusätzlich könnten auch Konformationsänderungen in der Proteinstruktur nötig sein, um den Co-Faktor Gro zu binden, was zumindest für Nkx6 gezeigt werden konnte (Syu et al., 2009). Zhang et al. konnten beobachten, dass Vnd durch aktivierte MAPK phosphoryliert werden kann und somit verschiedene Isoformen des Vnd-Proteins im sich entwickelnden Embryo vorliegen (Zhang et al., 2008), was höchstwahrscheinlich auch zu einer Veränderung bei der Bindung möglicher Co-Faktoren führt. Ein anderer entscheidender Punkt könnte auch die Inaktivierung von Co-Repressoren sein, im Fall von Gro ebenfalls durch Phosphorylierung über MAPK (Cinnamon et al., 2008), oder die Modifizierung von Zielgenen, um eine Bindung des Repressorkomplexes zu verhindern. Dass alle DV-Gene die Fähigkeit besitzen mit Gro zu interagieren schließt jedoch nicht aus, dass ihre Repressoraktivität auch unabhängig von Gro sein kann, da zumindest in Vnd, Ind und Nkx6 neben der Eh1- auch andere Repressor-Domänen (sowie Aktivator-Domänen) gefunden wurden (Yu et al., 2005; von Ohlen et al., 2007a/b; von Ohlen und Moses, 2009; Syu et al., 2009). Ob die Produkte der DV-Gene als Repressoren oder Aktivatoren fungieren, scheint demzufolge sowohl von der Verfügbarkeit der Co-Faktoren als auch von dem jeweiligen Zielgen selbst abhängig zu sein (Yu et al., 2005; von Ohlen und Moses, 2009; Syu et al., 2009), da nicht nur das Vorhandensein einer Transkriptions-bindungsstelle, sondern auch deren Zugänglichkeit in diesem Kontext limitierend ist (Kulkarni und Arnosti, 2005).

4.9 Evolutionäre Betrachtungen zur DV-Musterbildung im Gehirn von *Drosophila* und Vertebraten

Die in dieser Arbeit analysierten genetischen Faktoren werden nicht nur im Fliegenhirn, sondern auch in größtenteils ähnlichen NE-Domänen und ab frühen Embryonalstadien im anterioren Bereich der Neuralplatte von Vertebraten exprimiert. Interessanterweise ist gegenseitige Repression von Homöodomänen-Proteinen im sich entwickelnden Neuralrohr von Vertebraten gebräuchlich und sogar essenziell für den Aufbau diskreter DV-Vorläuferdomänen (zusammengefasst in Dessaud, et al., 2008), was eine große Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit beschriebenen DV-Musterbildungsvorgängen im Fliegenhirn aufweist.

So wird *Emx2* beispielsweise in der laterodorsalen Region und *Nkx2*-Gene in der ventralen Region des frühen Prosencephalon (Vorderhirn) exprimiert (Abb. 4-1 C). Im Vier-Somiten-Stadium (etwa Embryonaltag (E) 8) grenzen die beiden Expressionsdomänen aneinander (zusammengefasst in Rubenstein et al., 1998; Shimamura et al., 1995), ähnlich der Situation in *Drosophila*, nachdem durch gegenseitige Repression zwischen *Ems* und *Vnd* sich ausschließende Expressionsdomänen der beiden Faktoren entstanden sind. *Msx*-Gene werden hauptsächlich in dorsalen Regionen des posterioren Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon (Hinterhirn) exprimiert (zusammengefasst in Ramos und Roberts, 2005), wohingegen sich die Expression von *Nkx6*-Genen mehr auf lateroventrale Regionen beschränkt und ventral mit der Expression von *Nkx2*-Genen überlappt (Prakash et al., 2009; Rubenstein et al., 1998) (Abb. 4-1 C). Die *ind*-Homologe *Gsh-1* und *Gsh-2* werden in intermediärer Region des Vertebraten-Neuralrohrs exprimiert (Valerius et al., 1995; Hsieh-Li et al., 1995) und eine partielle Überlappung der Expressionsdomänen von *Gsh-2* und dorsalem *Msx1/3* deutet darauf hin, dass *Gsh2* nicht als Repressor der *Msx*-Gene fungiert, im Gegensatz zu der Situation in *Drosophila* (Urbach und Technau, 2008).

Obwohl die Expressionsmuster dieser Gene bestimmte Gemeinsamkeiten zwischen Insekten und Vertebraten aufweisen, so bleibt dennoch in weiteren Experimenten zu zeigen, dass die entsprechenden genetischen Interaktionen ebenfalls konserviert sind. Auch ist bisher kein Zusammenhang zwischen *EGFR* oder *En1/2* in der DV-Musterbildung in Vertebraten bekannt. Zudem wird die Analyse vieler Vertebratengene oft dadurch erschwert, dass mehrere Mitglieder einer Genfamilie mit redundanter Funktion existieren, die häufig auch in überlappenden Domänen exprimiert werden.

5. Zusammenfassung

In Vertebraten und Insekten ist während der frühen Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS), welches sich aus dem Gehirn und dem ventralen Nervensystem (VNS) zusammensetzt, die Unterteilung des Neuroektoderms (NE) in diskrete Genexpressions-Domänen entscheidend für die korrekte Spezifizierung neuraler Stammzellen. In *Drosophila* wird die Identität dieser Stammzellen (Neuroblasten, NB) festgelegt durch die positionellen Informationen, welche von den Produkten früher Musterbildungsgene bereitgestellt werden und das Neuroektoderm in anteroposteriorer (AP) und dorsoventraler (DV) Achse unterteilen. Die molekulargenetischen Mechanismen, welche der DV-Regionalisierung zugrunde liegen, wurden ausführlich im embryonalen VNS untersucht, sind für das Gehirn jedoch weitestgehend unverstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse bezüglich der genetischen Mechanismen gewonnen, welche die frühembryonale Anlage des Gehirns in DV-Achse unterteilen. So konnte gezeigt werden, dass das cephalen Lückengen *empty spiracles* (*ems*), das Segmentpolaritätsgen *engrailed* (*en*), sowie der „*Epidermal growth factor receptor*“ (*EGFR*) und das Gen *Nkx6 homeobox* (*Nkx6*) für Faktoren codieren, die als zentrale Regulatoren die DV Musterbildung in der Gehirnanlage kontrollieren. Diese Faktoren interagieren zusammen mit den ebenso evolutionär konservierten Homöobox-Genen *ventral nervous system defective* (*vnd*), *intermediate neuroblasts defective* (*ind*) und *muscle segment homeobox* (*msh*) in einem komplexen, regulatorischen DV-Netzwerk. Die im Trito (TC)- und Deutocerebrum (DC) entschlüsselten genetischen Interaktionen basieren überwiegend auf wechselseitiger Repression. Dementsprechend sorgen 1) *Vnd* und *Ems* durch gegenseitige Repression für eine frühe DV-Unterteilung des NE, und 2) wechselseitige Repression zwischen *Nkx6* und *Msh*, als auch zwischen *Ind* und *Msh* für die Aufrechterhaltung der Grenze zwischen intermediärem und dorsalem NE. 3) Sowohl *Ind* als auch *Msh* sind in der Lage, die Expression von *vnd* zu inhibieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass *Vnd* durch Repression von *Msh* als positiver Regulator von *Nkx6* fungiert. Überdies beeinflusst *Vnd* die Expression von *ind* in segment-spezifischer Art und Weise: *Vnd* reprimiert *ind*-Expression im TC, sorgt jedoch für eine positive Regulation von *ind* im DC durch Repression von *Msh*. Auch der EGFR-Signalweg ist an der frühen DV-Regionalisierung des Gehirns beteiligt, indem er durch positive Regulation der *msh*-Repressoren *Vnd*, *Ind* und *Nkx6* dazu

beiträgt, dass die Expression von *msh* auf dorsales NE beschränkt bleibt. Ferner stellte sich heraus, dass das AP-Musterbildungsgen *ems* die Expression der DV-Gene kontrolliert und umgekehrt: *Ems* ist für die Aktivierung von *Nkx6*, *ind* und *msh* in TC und DC erforderlich ist, während *Nkx6* und *Ind* zu einem späteren Zeitpunkt benötigt werden, um *ems* im intermediären DC gemeinsam zu reprimieren. Überdies konnte gezeigt werden, dass das Segmentpolaritätsgen *en* Aspekte der Expression von *vnd*, *ind* und *msh* in segment-spezifischer Art und Weise reguliert. *En* reprimiert *ind* und *msh*, hält jedoch *vnd*-Expression im DC aufrecht; im TC wird *En* benötigt, um die Expression von *Msh* herunter zu regulieren und somit die Aktivierung von *ind* dort zu ermöglichen.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass AP Musterbildungsfaktoren in umfangreichen Maß die Expression der DV Gene im Gehirn (und VNS) kontrollieren. Ferner deuten diese Daten darauf hin, dass sich das „Konzept der ventralen Dominanz“, welches für die DV-Musterbildung im VNS postuliert wurde, nicht auf das genregulatorische Netzwerk im Gehirn übertragen lässt, da Interaktionen zwischen den beteiligten Faktoren hauptsächlich auf wechselseitiger (und nicht einseitiger) Repression basieren. Zudem scheint das Konzept der ventralen Dominanz auch für das VNS nicht uneingeschränkt zu gelten, da in dieser Arbeit u.a. gezeigt werden konnte, dass dorsal exprimiertes *Msh* in der Lage ist, intermediäres *ind* zu reprimieren. Interessanterweise ist gegenseitige Repression von Homöodomänen-Proteinen im sich entwickelnden Neuralrohr von Vertebraten weit verbreitet und darüberhinaus essenziell für den Aufbau diskreter DV-Vorläuferdomänen, und weist insofern eine große Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit beschriebenen DV-Musterbildungsvorgängen im frühembryonalen Fliegenhirn auf.

6. Literaturverzeichnis

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

Alexandre, C. und Vincent, J. P. (2003). Requirements for transcriptional repression and activation by Engrailed in *Drosophila* embryos. *Development* **130**, 729-739.

Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T. und Ericson, J. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* **124**, 393-405.

Andrew, D. J., Baig, A., Bhanot, P., Smolik, S. M., Henderson und K. D. (1997). The *Drosophila* *dCREB-A* gene is required for dorsal/ventral patterning of the larval cuticle. *Development* **124**, 181-193.

Arendt, D. und Nübler-Jung, K. (1999). Comparison of early nerve cord development in insects und vertebrates. *Development* **126**, 2309-2345.

Ashburner, M., Carson, H. L. und Thompson Jr., J. N. (1982). The Genetics and Biology of *Drosophila*. **V3b**, 1-59.

Bhat, K. M. und Schedl, P. (1997). Requirement for *engrailed* and *invected* genes reveals novel regulatory interactions between *engrailed/invected*, *patched*, *gooseberry* and *wingless* during *Drosophila* neurogenesis. *Development* **124**, 1675-1688.

Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. und Technau, G. M. (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **179**, 41-64.

Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.

Broadus, J. und Doe, C. Q. (1995). Evolution of neuroblast identity: *seven-up* and *prospero* expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and *Schistocerca*. *Development* **121**, 3989-3996.

Broihier, H. T., Kuzin, A., Zhu, Y., Odenwald, W. und Skeath, J. B. (2004). *Drosophila* homeodomain protein Nkx6 coordinates motoneuron subtype identity and axonogenesis. *Development* **131**, 5233-5242.

Broihier, H. T. und Skeath, J. B. (2002). *Drosophila* homeodomain protein dHb9 directs neuronal fate via crossrepressive and cell-nonautonomous mechanisms. *Neuron* **35**, 39-50.

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**, 673-681.

- Buescher, M., Tio, M., Tear, G., Overton, P. M., Brook, W. J. und Chia, W.** (1996). Functions of the segment polarity genes *midline* and *H15* in *Drosophila melanogaster* neurogenesis. *Dev. Biol.* **292**, 418-429.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V.** (1997). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Clifford, R. und Schüpbach, T.** (1994). Molecular analysis of the *Drosophila* EGF receptor homolog reveals that several genetically defined classes of alleles cluster in subdomains of the receptor protein. *Genetics* **137**, 531-550.
- Chu, H., Parras, C., White, K. und Jimenez, F.** (1998). Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by *vnd* in *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev.* **12**, 3613-3624.
- Chu-LaGriff, Q. und Doe, C. Q.** (1993). Neuroblast specification and formation regulated by *wingless* in the *Drosophila* CNS. *Science* **261**, 1594-1597.
- Cinnamon, E., Helman, A., Ben-Haroush Schyr, R., Orian, A., Jimenez, G. und Paroush, Z.** (2008). Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in *Drosophila* embryogenesis. *Development* **135**, 829-837.
- Cohen, S. M. und Jürgens, G.** (1990). Mediation of *Drosophila* head development by gap-like segmentation genes. *Nature* **346**, 482-485.
- Cornell, R. A. und von Ohlen, T.** (2000). *Vnd/nkx*, *ind/gsh*, and *msh/msx*: conserved regulators of dorsoventral neural patterning? *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 63-71.
- Cowden, J. und Levine, M.** (2003). Ventral dominance governs sequential patterns of gene expression across the dorsal-ventral axis of the neuroectoderm in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **262**, 335-349.
- Dalton, D., Chadwick, R. und McGinnis, W.** (1989). Expression and embryonic function of *empty spiracles*: a *Drosophila* homeobox gene with two patterning functions on the anterior-posterior axis of the embryo. *Genes Dev.* **3**, 1940-1956.
- D'Alessio, M. und Frasch, M.** (1996). *msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech. Dev.* **58**, 217-231.
- Deshpande, N., Dittrich, R., Technau, G. M. und Urban, J.** (2001). Successive specification of *Drosophila* neuroblasts NB 6-4 and NB 7-3 depends on interaction of the segment polarity genes *wingless*, *gooseberry* and *naked cuticle*. *Development* **128**, 3253-3261.
- Dessaud, E., McMahon, A. P. und Briscoe, J.** (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a *sonic hedgehog* morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.
- Doe, C. Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855-863.

- Dubnicoff, T., Valentine, S. A., Guoqing, C., Shi, T., Lengyel, J. A., Paroush, Z. und Courey, A. J.** (1997). Conversion of Dorsal from an activator to a repressor by the global corepressor Groucho. *Genes Dev.* **11**, 2925-2957.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**, 1-22.
- Gabay, L., Scholz, H., Golembo, M., Klaes, A., Shilo, B. Z. und Klämbt, C.** (1996). EGF receptor signaling induces *pointed* P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* ventral ectoderm. *Development* **122**, 3355-3362.
- Gebelein, B. und Mann, R. S.** (2007). Compartmental modulation of abdominal Hox expression by *engrailed* and *sloppy-paired* patterns the fly ectoderm. *Dev. Biol.* **308**, 593-605.
- Goldstein, R. E., Cook, O., Dinur, T., Pisanté, A., Karandikar, U. C., Bidwai, A. und Paroush, Z.** (2005). An eh1-like motif in Odd-skipped mediates recruitment of Groucho and repression in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10711-10720.
- Grossniklaus, U., Cadigan, K. M. und Gehring, W. J.** (1994). Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head. *Development* **120**, 3155-3171.
- Gustavson, E., Goldsborough, A. S., Ali, Z. und Kornberg, T. B.** (1996). The *Drosophila engrailed* and *invected* genes: partners in regulation, expression and function. *Genetics* **142**, 893-906.
- Haas, M. S., Brown, S. J. und Beeman, R. W.** (2001b). Pondering the procephalon: the segmental origin of the labrum. *Dev. Genes Evol.* **211**, 89-95.
- Häcker, U. und Perrimon, N.** (1998). DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**, 274-284.
- Hanesch, U., Fischbach, K. F. und Heisenberg, M.** (1989). Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **257**, 343-366.
- Hartenstein, V. und Campos-Ortega, J. A.** (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 308-326.
- Hartenstein, V., Rudloff, E. und Campos-Ortega, J. A.** (1987). The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**, 473-485.
- Hartmann, B., Hirth, F., Walldorf, U. und Reichert, H.** (2000). Expression, regulation and function of the homeobox gene *empty spiracles* in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **90**, 143-153.

- Hartmann, B., Reichert, H. und Walldorf, U.** (2001). Interaction of gap genes in the *Drosophila* head: *tailless* regulates expression of *empty spiracles* in early embryonic patterning and brain development. *Mech. Dev.* **109**, 161–172.
- Heisenberg, M.** (1998). What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learning and Memory* **5**, 1-10.
- Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W. J., Reichert, H. und Furukubo-Tokunaga, K.** (1995). Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* **15**, 769-778.
- Hong, J. W., Hendrix, D. A., Papatsenko, D. und Levine, M. S.** (2008). How the Dorsal gradient works: insights from postgenome technologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20072-20076.
- Hsieh-Li, H. M., Witte, D. P., Szucsiki, J. C., Weinstein, M., Li, H. und Potter, S. S.** (1995). *Gsh-2*: a murine homeobox gene expressed in the developing brain. *Mech. Dev.* **50**, 177-186.
- Isshiki, T., Takeichi, M. und Nose, A.** (1997). The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* **124**, 3099-3109.
- Jiménez, 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**, 81-89.
- Jiménez, F., Martín-Morris, L. E., Velasco, L., Chu, H., Sierra, J., Rosen, D. R. und White, K.** (1995). *vnd*, a gene required for early neurogenesis of *Drosophila*, encodes a homeodomain protein. *EMBO J.* **14**, 3487-3495.
- Joly, W., Mugat, B. und Maschat, F.** (2007). Engrailed controls the organization of the ventral nerve cord through frazzled regulation. *Genomes and Developmental control* **301**, 542-554.
- Jürgens, G. und Hartenstein, V.** (1993). The terminal regions of the body pattern. In: Bate, C. M. und Martinez-Aria, A., editors. The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 687-746.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Kluding, H.** (1984). *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 283-295.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. und Klämbt, C.** (1994). The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene *pointed* direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149-160.
- Kulkarni, M. M. und Arnosti, D. N.** (2005). cis-regulatory logic of short-range transcriptional repression in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3411-3420.

- Levine, M. und Davidson, E. H.** (2005). Gene regulatory networks for development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 4936-4942.
- Lovegrove, B., Simões, S., Rivas, M. L., Sotillos, S., Johnson, K., Knust, E., Jacinto, A. und Castelli-Gair Hombria, J.** (2006). Coordinated control of cell adhesion, polarity, and cytoskeleton underlies Hox-induced organogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **16**, 2206-2216.
- McDonald, J. A. und Doe, C. Q.** (1997). Establishing neuroblast-specific gene expression in the *Drosophila* CNS: huckebein is activated by Wingless and Hedgehog and repressed by Engrailed and Gooseberry. *Development* **124**, 1079-1087.
- McDonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C. Q. und Mellerick, D. M.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev.* **12**, 3603-3612.
- Mellerick, D. M. und Nirenberg, M.** (1995). Dorsal-ventral patterning genes restrict *NK-2 homeobox* gene expression to the ventral half of the central nervous system of *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* **171**, 306-316.
- Mizutani, C. M., Meyer, N., Roelink, H. und Bier, E.** (2006). Threshold-dependent BMP-mediated repression: a model for a conserved mechanism that patterns the neuroectoderm. *PLoS Biol.* **4**, e313.
- Muhr, J., Andersson, E., Persson, M., Jessell, T. M. und Ericson, J.** (2001). Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **104**, 861-873.
- Pi, H. und Chien, C.-T.** (2007). Getting the edge: neural precursor selection. *J. Biomed. Sci.* **14**, 467-473.
- Prakash, N., Puelles, E., Freude, K., Trümbach, D., Omodei, D., Di Salvio, M., Sussel, L., Ericson, J., Sander, M., Simeone, A. und Wurst, W.** (2009). Nkx6-1 controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain. *Development* **136**, 2545-2555.
- Ramos, C. und Robert, B.** (2005). *msh/Msx* gene family in neural development. *Trends Genet.* **21**, 624-632.
- Rubenstein, J. L., Shimamura, K., Martinez, S. und Puelles, L.** (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 445-477.
- Schmidt-Ott, U. und Technau, G. M.** (1992). Expression of *en* und *wg* in the embryonic head and brain of *Drosophila* indicates a refolded band of seven segment remnants. *Development* **116**, 111-125.
- Schmidt-Ott, U., Gonzalez-Gaitan, M., Jäckle, H. und Technau, G. M.** (1994). Number, identity, and sequence of the *Drosophila* head segments as revealed by neural elements and their deletion patterns in mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8363-8367.

- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. und Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **189**, 186-204.
- Schöck, F., Reischl, J., Wimmer, E., Taubert, H., Purnell, B. A. und Jäckle, H.** (2000). Phenotypic suppression of *empty spiracles* is prevented by *buttonhead*. *Nature* **405**, 351-354.
- Schweitzer, R. und Shilo, B.-Z.** (1997). A thousand and one roles for the *Drosophila* EGF receptor. *Trends Genet.* **5**, 191-196.
- Seger, R. und Krebs, E. G.** (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
- Shilo, B.-Z.** (2003). Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp. Cell Res.* **284**, 140-149.
- Shilo, B.-Z.** (2005). Regulating the dynamics of EGF receptor signalling in space and time. *Development* **132**, 4017-4027.
- Shao, X., Koizumi, K., Nosworthy, N., Tan, D. P., Odenwald, W. und Nirenberg, M.** (2002). Regulatory DNA required for *vnd/NK-2* homeobox gene expression pattern in neuroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 113-117.
- Shimamura, K., Hartigan, D. J., Martinez, S., Puelles, L. und Rubenstein, J. L.** (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* **121**, 3923-3933.
- Skeath, J. B.** (1998). The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **125**, 3301-3312.
- Skeath, J. B.** (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *BioEssays* **21**, 922-931.
- Skeath, J. B. und Carroll, S. B.** (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* **114**, 939-946.
- Skeath, J. B. und Carroll, S. B.** (1994). The *achaete-scute* complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J.* **8**, 714-721.
- Skeath, J. B., Panganiban, G. F. und Carroll, S. B.** (1994). The *ventral nervous system defective* gene controls proneural gene expression at two distinct steps during neuroblast formation in *Drosophila*. *Development* **120**, 1517-1524.
- Skeath, J. B. und Thor, S.** (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 8-15.

- Skeath, J. B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S. B. und Doe, C. Q.** (1995). Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by *gooseberry-distal*. *Nature* **376**, 427-430.
- Smith, S. T. und Jaynes, J. B.** (1996). A conserved region of *engrailed*, shared among *en-*, *gsc-*, *Nk1-*, *Nk2-*, and *msh-*class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* **122**, 3141-3150.
- Sprecher, S. G., Urbach, R., Technau, G. M., Rijli, F. M., Reichert, H. und Hirth, F.** (2006). The columnar gene *vnd* is required for tritocerebral neuromere formation during embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* **133**, 4331-4339.
- Stepchenko, A. und Nirenberg, M.** (2004). Mapping activation and repression domains of the *vnd*/NK-2 homeodomain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13180-13185.
- Strausfeld, N. J.** (1976). Atlas of an insect brain. Heidelberg, Germany: Springer.
- Strausfeld, N. J., Sinakevitch, I., Brown, S. M. und Farris, S. M.** (2009). Ground plan of the insect mushroom body: functional and evolutionary implications. *J. Comp. Neurol.* **513**, 265-291.
- Syu, L. J., Uhler, J., Zhang, H. und Mellerick, D. M.** (2009). The *Drosophila* Nkx6 homeodomain protein has both activation and repression domains and can activate target gene expression. *Brain Res.* **1266**, 8-17.
- 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**, 765-775.
- Uhler, J., Garbern, J., Yang, L., Kamholz, J. und Mellerick, D. M.** (2002). *Nk6*, a novel *Drosophila* homeobox gene regulated by *vnd*. *Mech. Dev.* **116**, 105-116.
- Uhler, J., Zhang, H., Syu, L. J. und Mellerick, D. M.** (2007). The Nk-2 box of the *Drosophila* homeodomain protein, *Vnd*, contributes to its repression activity in a Groucho-dependent manner. *Mech. Dev.* **124**, 1-10.
- Urbach, R., Schnabel, R. und Technau, G. M.** (2003). The pattern of neuroblast formation, mitotic domains, and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* **130**, 3589-3606.
- Urbach, R. und Technau, G. M.** (2003a). Segment polarity and D/V patterning gene expression reveals segmental organization of the *Drosophila* brain. *Development* **130**, 3607-3620.
- Urbach, R. und Technau, G. M.** (2003b). Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**, 3621-3637.
- Urbach, R. und Technau, G. M.** (2004). Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *BioEssays* **26**, 739-751.

- Urbach, R., Volland, D., Seibert, J. und Technau, G. M.** (2006). Segment-specific requirements for dorsoventral patterning genes during early brain development in *Drosophila*. *Development* **133**, 4315-4330.
- Urbach, R. und Technau, G. M.** (2008). Dorsoventral patterning of the brain: a comparative approach. *Adv. Exp. Med. Biol.* **628**, 42-56.
- Vincent, J. P.** (1998). Compartment boundaries: where, why and how? *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 311-315.
- Valerius, M. T., Li, H., Stock, J. L., Weinstein, M., Kaur, S., Singh, G. und Potter S. S.** (1995). *Gsh-1*: a novel murine homeobox gene expressed in the central nervous system. *Dev. Dyn.* **203**, 337-351.
- von Ohlen, T. und Doe, C. Q.** (2000). Convergence of Dorsal, Dpp, and Egfr signaling pathways subdivides the *Drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev. Biol.* **224**, 362-372.
- von Ohlen, T., Harvey, C. und Panda, M.** (2007a). Identification of an upstream regulatory element reveals a novel requirement for Ind activity in maintaining *ind* expression. *Mech. Dev.* **124**, 230–236.
- von Ohlen, T., Syu, L. J. und Mellerick, D. M.** (2007b). Conserved properties of the *Drosophila* homeodomain protein, Ind. *Mech. Dev.* **124**, 925-934.
- von Ohlen, T. und Moses, C.** (2009). Identification of Ind transcription activation and repression domains required for dorsoventral patterning of the CNS. *Mech. Dev.* **126**, 552-562.
- Walldorf, U. und Gehring, W. J.** (1992). *Empty spiracles*, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO Journal* **11**, 2247-2259.
- Wang, L.-H., Chmelik, R., Tang, D. und Nirenberg, M.** (2005). Identification and analysis of *vnd/NK-2* homeodomain binding sites in genomic DNA. *PNAS* **102**, 7097-7102.
- Weiss, J. B., von Ohlen, T., Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. und Scott M. P.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *intermediate neuroblasts defective* homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev.* **12**, 3591-3602.
- Yoffe, K. B., Manoukian, A. S., Wilder, E. L., Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1995). Evidence for *engrailed*-independent *wingless* autoregulation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **170**, 636-650.

- Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Green, P. und Hartenstein, V.** (1996). Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J. Comp. Neurol.* **370**, 313-329.
- Younossi-Hartenstein, A., Green, P., Liaw, G. J., Rudolph, K., Lengyel, J. und Hartenstein, V.** (1997). Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tll*, *otd*, *ems*, and *btd*. *Dev. Biol.* **182**, 270-283.
- Yu, Z., Syu, L. J. und Mellerick, D. M.** (2005). Contextual interactions determine whether the *Drosophila* homeodomain protein, Vnd, acts as a repressor or activator. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1-12.
- Zak, N. B., Wides, R. J., Schejter, E. D., Raz, E. und Shilo, B.-Z.** (1990). Localization of the DER/*flb* protein in embryos: implications on the *faint little ball* lethal phenotype. *Development* **109**, 865-874.
- Zhang, H., Syu, L. J., Modica, V., Yu, Z., von Ohlen, T. und Mellerick, D. M.** (2008). The *Drosophila* homeodomain transcription factor, Vnd, associates with a variety of co-factors, is extensively phosphorylated and forms multiple complexes in embryos. *Febs J.* **275**, 5062-5073.
- Zhao, G. und Skeath, J. B.** (2002). The Sox-domain containing gene *Dichaete/fish-hook* acts in concert with *vnd* and *ind* to regulate cell fate in the *Drosophila* neuroectoderm. *Development* **129**, 1165-1174
- Zhao, G., Boekhoff-Falk, G., Wilson, B. A. und Skeath, J. B.** (2007a). Linking pattern formation to cell-type specification: Dichaete and Ind directly repress *achaete* gene expression in the *Drosophila* CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 3847-3852.
- Zhao, G., Wheeler, S. R. und Skeath, J. B.** (2007b). Genetic control of dorsoventral patterning and neuroblast specification in the *Drosophila* central nervous system. *Int. J. Dev. Biol.* **51**, 107-115.

7. Anhang

7.1 Abbildungen

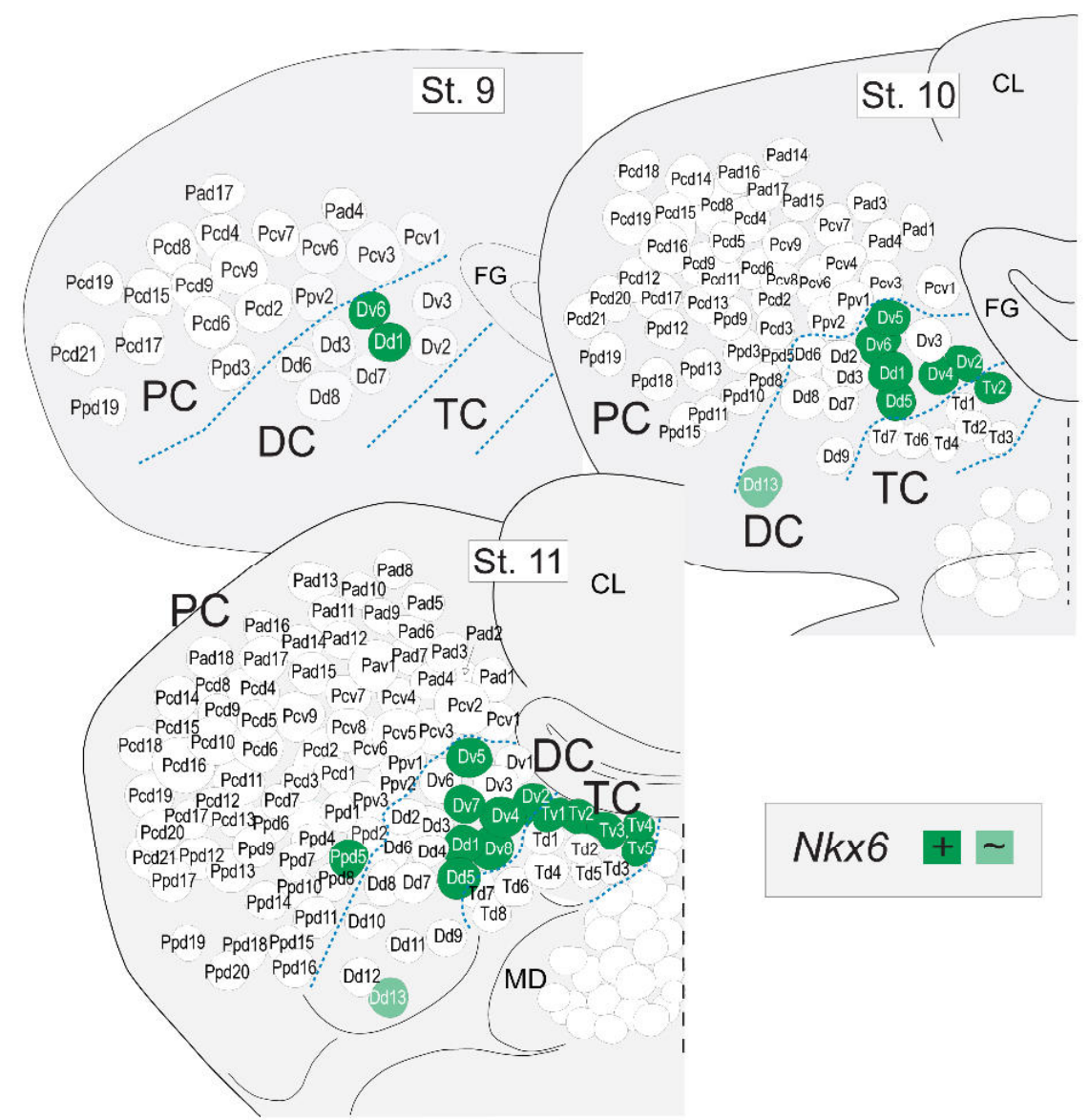


Abb. 7-1: *Nkx6*-Expression in Neuroblasten der frühen Gehirnanlage

Schematische Darstellung der *Nkx6*-Expression in Neuroblasten (NB) der frühen Gehirnanlage in Stadium (St.) 9, St. 10 und St. 11; anterior ist oben. Im Tritocerebrum (TC) wird *Nkx6* in fünf NB (Tv1, Tv2, Tv3, Tv4, Tv5), im Deutocerebrum (DC) in acht NB (Dv2, Dv4, Dv5, Dv6, Dv7, Dv8, Dd1, Dd5) und im Protocerebrum nur in einem NB (Ppd5) exprimiert. Zudem ist *Nkx6* im St. 10/11 schwach in einem sensorischen Vorläufer (SOP, „sensory organ precursor“) detektiert (Dd13). Für weitere Symbole und Abkürzungen siehe Abb. 3-1 und zur Nomenklatur von Gehirn-NB siehe Urbach et al. (2003).

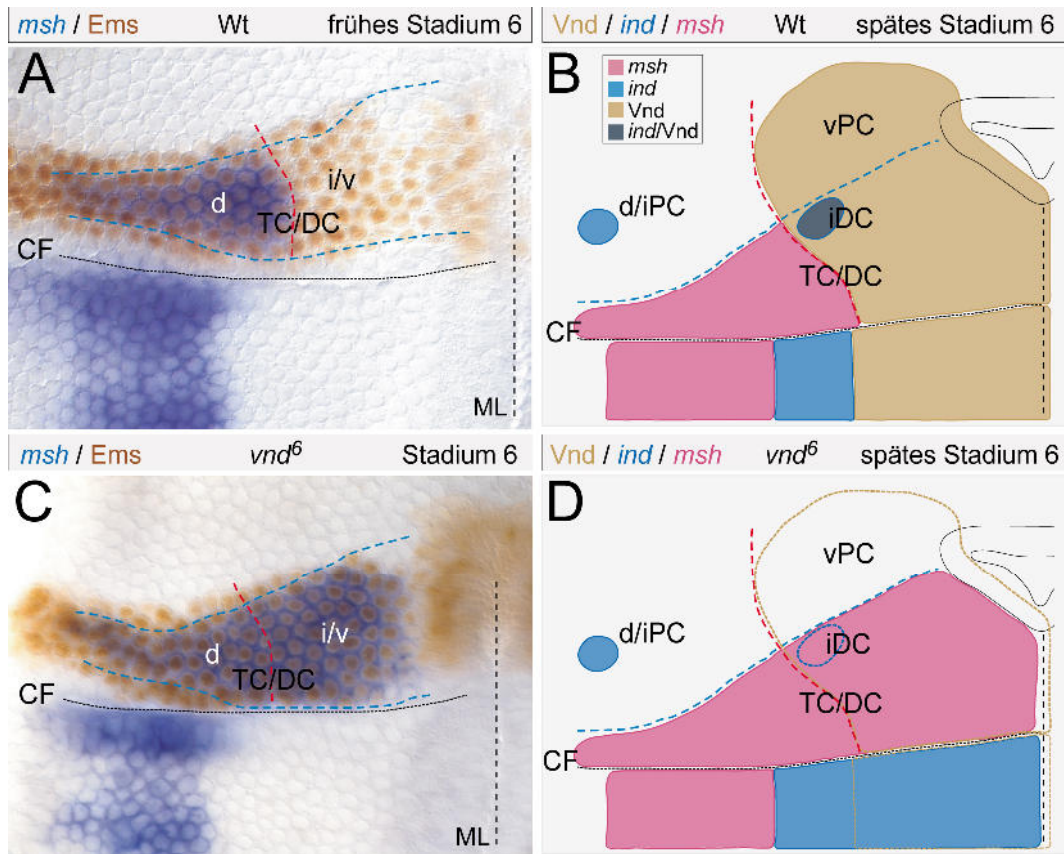


Abb. 7-2: In *vnd⁶*-Mutanten wird *msh* im intermediär/ventralen NE des TC und DC dereprimiert

(A) Expression von *msh* und *Ems* im Wildtyp (Wt); frühes Stadium (St.) 6. (B) Schematische Darstellung von *Vnd*-, *ind*- und *msh*-Expression im Wt; spätes St. 6. (C) Expression von *msh* und *Ems* in *vnd⁶*-Mutanten; *msh*-Expression ist vollständig in intermediär/ventrales NE des TC und DC hinein expandiert. (D) Schematische Darstellung von *Vnd*-, *ind*- und *msh*-Expression in *vnd⁶*-Mutanten (spätes St. 6); *msh* ist in intermediär/ventralem TC und DC dereprimiert und *ind* wird im intermediären DC nicht aktiviert. Für Orientierung der Abbildungen, weitere Symbole und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

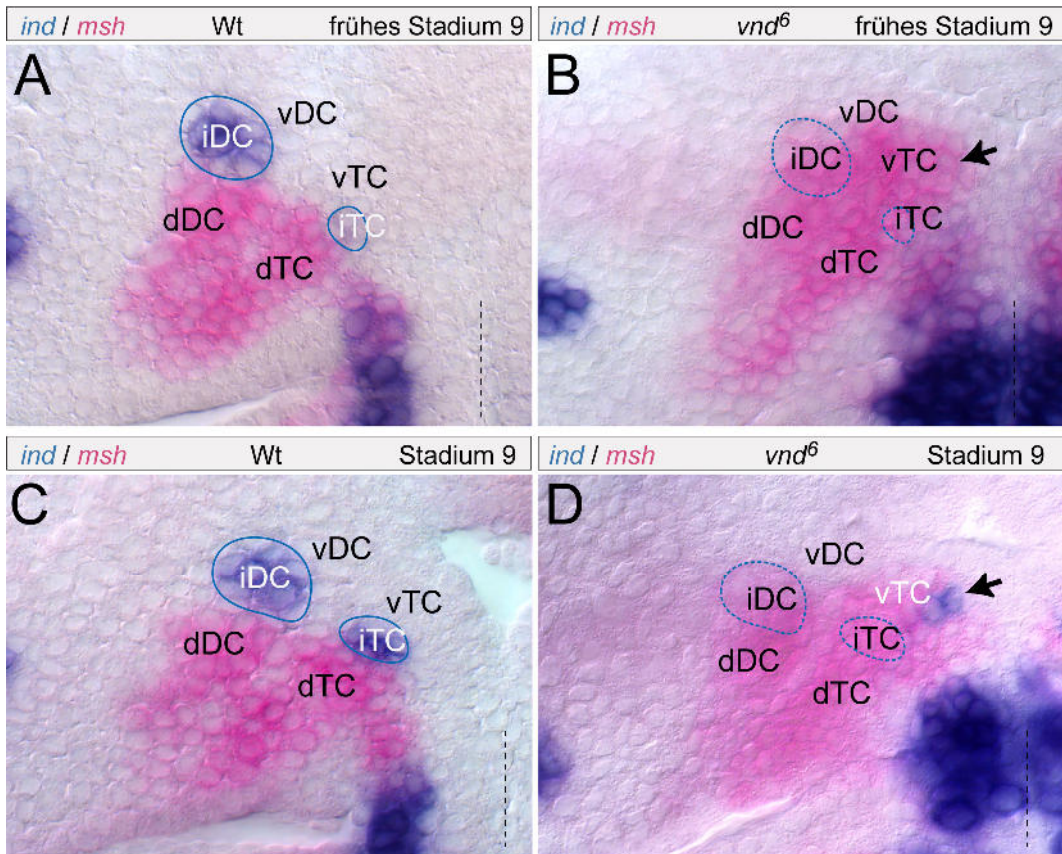


Abb. 7-3: Expression von *ind* und *msh* in *vnd⁶*-Mutanten

(A) *ind/msh* im Wt, frühes St. 9; *msh* wird im dorsalen TC und DC exprimiert, *ind*-Expression ist im intermediären DC zu finden und beginnt auch im intermediären TC aktiviert zu werden. (B) In *vnd⁶*-Mutanten expandiert *msh* vollständig in intermediär/ventrales TC und DC hinein und *ind*-Expression fehlt im intermediären TC und DC (fehlende *ind*-Expressionsdomänen sind mit einer blau gestrichelten Linie umrandet). (C) *ind/msh* im Wt, St. 9. (D) *ind/msh* in *vnd⁶*-Mutanten; *ind* beginnt ectopisch im ventralen TC exprimiert zu werden (schwarzer Pfeil), in einem Bereich aus dem zuvor *msh*-Expression verschwunden ist (siehe auch schwarzen Pfeil in B). Für Orientierung der Abbildungen, weitere Symbole und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

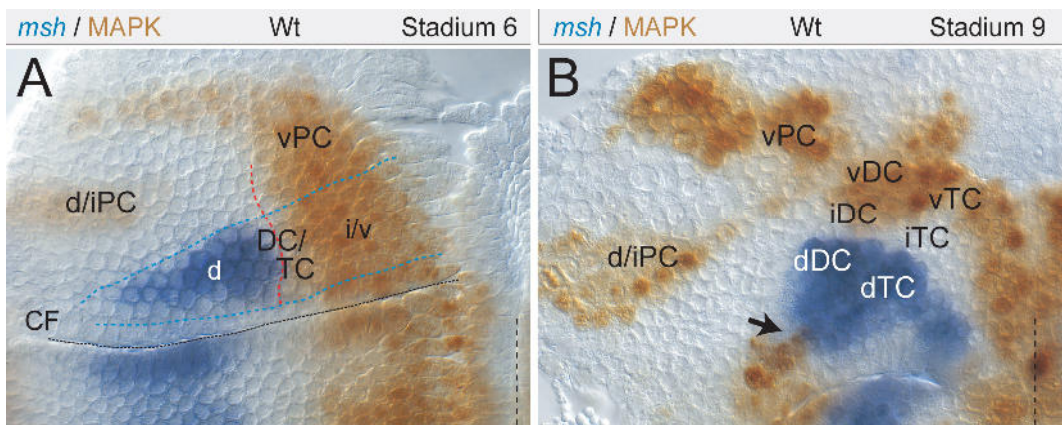


Abb. 7-4: MAPK und *msh* werden in TC und DC komplementär zueinander exprimiert

(A) Expression von *msh* und MAPK im Wt, St.6; *msh* wird im dorsalen, MAPK im intermediär/ventralen NE des TC und DC exprimiert. (B) *msh*/MAPK im Wt, St. 9; Expression von *msh* und MAPK überlappen nur in wenigen Zellen am dorsalsten Ende der *msh*-Domäne in

TC und DC (schwarzer Pfeil). Für Orientierung der Abbildungen, weitere Symbole und Abkürzungen siehe Abb. 3-1.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Anlagenskarte eines <i>Drosophila</i> -Embryos und Entstehung individueller Zellstammbäume aus NB des VNS	3
Abb. 1-2: Erste Schritte der embryonalen Neurogenese des VNS von <i>Drosophila</i>	4
Abb. 1-3: Segregationswellen und NB-Markerexpression im VNS	5
Abb. 1-4: Organisation des embryonalen und adulten Gehirns von <i>Drosophila</i>	7
Abb. 1-5: Mechanismen der NB-Delamination in unterschiedlichen mitotischen Domänen des pNE	9
Abb. 1-6: Expression molekularer Marker in Gehirn-NB während verschiedener Stadien der frühen Neurogenese	11
Abb. 2-1: Ektopische Genexpression mithilfe des Gal4/UAS-Systems	16
Abb. 2-2: Filetpräparation eines <i>Drosophila</i> -Embryos	25
Abb. 3-1: Zeitlich-räumliche Expression der DV-Gene <i>Vnd</i> , <i>ind</i> und <i>msh</i> während der Entwicklung der frühen Gehirnanlage	33
Abb. 3-2: Expression von <i>vnd</i> , <i>ind</i> , <i>msh</i> und <i>Nkx6</i> unterteilt die frühe Gehirnanlage von <i>Drosophila</i> in distinkte dorsoventrale Domänen	36
Abb. 3-3: Gegenseitige Repression von <i>Nkx6</i> und <i>Msh</i> im NE von TC und DC	38
Abb. 3-4: <i>Ind</i> fungiert als Repressor von <i>msh</i> in TC und DC	40
Abb. 3-5: <i>Msh</i> fungiert als Repressor von <i>ind</i> in TC und DC	41
Abb. 3-6: <i>Msh</i> agiert als Repressor von <i>ind</i> im VNS	42
Abb. 3-7: Repression von <i>ind</i> durch <i>Nkx6</i> in intermediären NB des VNS	44
Abb. 3-8: <i>Nkx6</i> -Expression im NE des TC und DC nach Verlust oder ektopischer Expression von <i>vnd</i> und <i>msh</i>	46
Abb. 3-9: <i>Vnd</i> reguliert die <i>ind</i> -Expression in TC und DC auf unterschiedliche Weise	48
Abb. 3-10: <i>Ind</i> und <i>Msh</i> können als Repressoren von <i>vnd</i> fungieren	50
Abb. 3-11: <i>Ems</i> reguliert die Expression von <i>Nkx6</i> , <i>ind</i> und <i>msh</i> im NE des TC und DC	54
Abb. 3-12: <i>Ems</i> ist in der Lage, ektopische <i>msh</i> -Expression im PC zu induzieren und wird im intermediären DC durch <i>Nkx6</i> und <i>Ind</i> reprimiert	55
Abb. 3-13: Gegenseitige Repression reguliert <i>ems</i> - und <i>vnd</i> -Expression im NE	

von TC und DC	58
Abb. 3-14: Regulation der <i>Nkx6</i> -Expression im PC verläuft unterschiedlich zu der Situation in TC und DC	60
Abb. 3-15: En reprimiert <i>msh</i> -Expression in TC und DC	61
Abb. 3-16: En reguliert <i>ind</i> -Expression unterschiedlich in TC und DC	63
Abb. 3-17: En hält <i>vnd</i> -Expression im DC aufrecht	64
Abb. 3-18: En ist an der Regulation der <i>ind</i> - und <i>msh</i> -Expression im VNS beteiligt	66
Abb. 3-19: MAPK-Expression in der frühen Gehirnanlage im räumlich-zeitlichen Bezug zu den Expressionsdomänen der DV-Gene <i>vnd</i> , <i>ind</i> , <i>msh</i> und <i>Nkx6</i>	69
Abb. 3-20: EGFR-Aktivität hält <i>vnd</i> -Expression im NE von TC und DC (und teilweise im PC) aufrecht	71
Abb. 3-21: EGFR-Aktivität ist notwendig, um <i>Nkx6</i> -Expression im intermediären TC und DC aufrecht zu erhalten	73
Abb. 3-22: EGFR scheint <i>msh</i> -Expression indirekt durch Regulation der <i>msh</i> -Repressoren <i>Vnd</i> , <i>Ind</i> und <i>Nkx6</i> zu kontrollieren	76
Abb. 3-23: EGFR ist für die Aktivierung der <i>ind</i> -Expression in TC, DC und PC erforderlich	79
Abb. 4-1: Dynamik der räumlich-zeitlichen Expressionsmuster von DV-Genen und <i>ems</i> in <i>Drosophila</i> , sowie ein Modell der entsprechenden genetischen Interaktionen und ein Vergleich mit den Expressionsmustern der orthologen Gene im Mäusegehirn	85
Abb. 4-2: Modell der genetischen Interaktionen zwischen DV- und AP-Musterbildungsgenen im NE der frühen Gehirnanlage und des VNS	90
Abb. 4-3: Modell der genetischen Interaktionen zwischen EGFR und anderen DV-Genen in DC, TC und VNS	94
Abb. 7-1: <i>Nkx6</i> -Expression in Neuroblasten der frühen Gehirnanlage	109
Abb. 7-2: In <i>vnd^δ</i> -Mutanten wird <i>msh</i> im intermediär/ventralen NE des TC und DC dereprimiert	110
Abb. 7-3: Expression von <i>ind</i> und <i>msh</i> in <i>vnd^δ</i> -Mutanten	111
Abb. 7-4: MAPK und <i>msh</i> werden in TC und DC komplementär zueinander exprimiert	111

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme	13
Tab. 2-2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten RNA-Sonden	18
Tab. 2-3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper	19
Tab. 2-4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper	19
Tab. 2-5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte	29
Tab. 2-6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software	30

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Abs. 3d der Promotionsordnung

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

Mainz, den

Janina Seibert