

**Klonale Analysen im embryonalen Gehirn
von *Drosophila* mit besonderem Fokus
auf die Entwicklung der Pilzkörper**

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

Eingereicht im Fachbereich Biologie
an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
von

Thomas Kunz
geboren am 11.09.1978
in Wadern (Saar)

Mainz, Februar 2012

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Datum der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | X |
| TABELLENVERZEICHNIS..... | XII |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | XIII |
| 1 EINLEITUNG..... | 16 |
| 1.1 Die frühe Embryonalentwicklung | 16 |
| 1.2 Mitotische Domänen | 17 |
| 1.3 Ursprung und Organisation des Nervensystems | 18 |
| 1.3.1 Die Entwicklung des embryonalen ventralen Nervensystems | 20 |
| 1.3.2 Die Entwicklung des embryonalen Gehirns | 22 |
| 1.4 Der Pilzkörper | 25 |
| 1.4.1 Der Pilzkörper der Insekten | 25 |
| 1.4.2 Der Pilzkörper von <i>Drosophila melanogaster</i> | 25 |
| 1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit | 28 |
| 2 MATERIAL UND METHODE..... | 30 |
| 2.1 Fliegenhaltung und Eiablage | 30 |
| 2.2 Verwendete Fliegenstämme | 30 |
| 2.3 Verwendete Sonden | 31 |
| 2.4 Verwendete primäre Antikörper | 31 |
| 2.5 Verwendete sekundäre Antikörper | 32 |
| 2.6 Verwendete Chemikalien | 32 |
| 2.7 Verwendete Lösungen | 33 |
| 2.8 Verwendete Geräte | 34 |
| 2.9 Verwendete Software | 35 |
| 2.10 Antikörperfärbungen | 36 |
| 2.10.1 Fixierung der Embryonen | 36 |
| 2.10.2 Inkubation primärer Antikörper | 36 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.10.3 | Inkubation sekundärer Antikörper..... | 37 |
| 2.10.4 | Dokumentation fluoreszenzgefärbter Präparate | 37 |
| 2.11 | <i>in-Situ</i> Hybridisierung..... | 38 |
| 2.12 | Iontophoretische Dil Einzelzellmarkierungen | 39 |
| 2.12.1 | Präparation und Fixierung der St.17 Embryonen..... | 39 |
| 2.12.2 | Präparation und Fixierung der L1-Larven | 41 |
| 2.12.3 | Einzelzellmarkierungen an fixierten Nervensystemen | 42 |
| 2.12.3.1 | Befüllen der Kapillare | 42 |
| 2.12.3.2 | Injektion von Dil und Nachfixierung der Präparate | 42 |
| 2.13 | Dil-Markierung von NE-Zellen zwecks Darstellung von Zellklonen | 43 |
| 2.13.1 | Präparation der frühen Embryonen | 43 |
| 2.13.2 | Herstellung der Fluoreszenzfarbstoff/Öl Lösung..... | 44 |
| 2.13.3 | Schleifen der Kapillaren..... | 44 |
| 2.13.4 | Befüllen der Kapillaren | 45 |
| 2.13.5 | Markierung einer NE-Zelle und Bestimmung ihrer Position | 46 |
| 2.13.6 | Kontrolle des Zellverhaltens | 47 |
| 2.13.7 | Entwicklung der Embryonen nach Dil-Markierung..... | 47 |
| 2.13.8 | Präparation der St.17 Embryonen | 48 |
| 2.13.9 | Präparation der L1-Larven..... | 49 |
| 2.14 | Dokumentation von Dil Markierten Präparaten am konfokalen Mikroskop..... | 50 |
| 2.15 | Ablationen..... | 51 |
| 2.15.1 | Schleifen der Kapillare..... | 51 |
| 2.15.2 | Ablation von Dil markierten NBen bzw. ihrer Nachkommenzellen..... | 51 |
| 2.16 | 4D-Mikroskopie..... | 52 |
| 2.16.1 | DIC 4D-Mikroskopie | 52 |
| 2.16.2 | Fluoreszenz 4D-Mikroskopie | 53 |
| 2.16.3 | Auswertung der 4D-Aufnahmen | 54 |
| 2.17 | Photokonversion Dil markierter Präparate..... | 54 |
| 2.17.1 | Dokumentation der Präparate..... | 55 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.18 | Amira Rekonstruktionen..... | 55 |
| 2.19 | Bestimmung von Zellzahlen mit Hilfe der Amira Software | 56 |
| 3 | ERGEBNISSE 57 | |
| 3.1 | Charakterisierung von mitotischen Domänen mittels 4D-Mikroskopie | 57 |
| 3.1.1 | Charakterisierung der δB | 57 |
| 3.1.2 | Charakterisierung der $\delta 24$ | 60 |
| 3.2 | Herkunft der Pilzkörperneuroblasten und Embryonalentwicklung der Pilzkörper auf Ebene individueller Vorläufer und ihrer Zellstammbäume | 63 |
| 3.2.1 | Charakterisierung der pilzkörperspezifischen OK107 Expression | 63 |
| 3.2.2 | Jeder Pilzkörperneuroblast entsteht aus einer einzelnen NE-Zelle der δB | 65 |
| 3.2.3 | Pilzkörperneuroblasten gehen aus benachbarten Zellen derselben proneuralen Domäne hervor..... | 67 |
| 3.2.4 | Jeder Pilzkörperneuroblast exprimiert eine individuelle Kombination von Transkriptionsfaktoren | 69 |
| 3.2.5 | Die Zellstammbäume der vier Pilzkörperneuroblasten | 71 |
| 3.2.5.1 | Der Pilzkörperzellstammbaum 1..... | 73 |
| 3.2.5.2 | Der Pilzkörperzellstammbaum 2..... | 75 |
| 3.2.5.3 | Der Pilzkörperzellstammbaum 3..... | 77 |
| 3.2.5.4 | Der Pilzkörperzellstammbaum 4..... | 79 |
| 3.2.6 | PKNBen bringen verschiedene Neuronentypen in aufeinanderfolgenden Zeitfenstern hervor | 81 |
| 3.2.7 | Die Entwicklung des Pedunkel, der Loben und der Calyx erfolgt in klon-spezifischer Weise..... | 84 |
| 3.2.7.1 | Unterschiede im zeitlichen Auswachsen der Axone der γ -Neurone | 85 |
| 3.2.7.2 | Unterschiede in der zeitlich-räumlichen Innervation der Loben und der Calyx | 88 |
| 3.2.7.3 | Unterschiede in der räumlichen Innervation des Pedunkel | 90 |
| 3.2.8 | PKZSB1 hat keine Pionierfunktion bei der Entwicklung des Pilzkörperneuropil .. | 90 |
| 3.2.9 | Apoptose hat keinen Einfluß auf die Anzahl der γ -Neurone | 91 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.2.10 | Viele embryonal entstehende γ -Neurone differenzieren erst in der postembryonalen Entwicklung | 91 |
| 3.2.11 | Embryonal geborene γ -Neurone innervieren beide Loben durch Bifurkation ihres Axons | 92 |
| 3.3 | Weitere Neuroblastenzellstammbäume aus δB und $\delta 1$ | 93 |
| 3.3.1 | Neuronale Zellstammbäume, die in der ventralen Hälfte von δB entstehen | 94 |
| 3.3.1.1 | δB NB-ZSB1 | 94 |
| 3.3.1.2 | δB NB-ZSB2 | 95 |
| 3.3.1.3 | δB NB-ZSB3 | 98 |
| 3.3.1.4 | δB NB-ZSB4 | 101 |
| 3.3.1.5 | δB NB-ZSB5 | 103 |
| 3.3.1.6 | δB NB-ZSB8 | 105 |
| 3.3.1.7 | δB NB-ZSB9 | 107 |
| 3.3.1.8 | δB NB-ZSB10 | 109 |
| 3.3.1.9 | δB NB-ZSB11 | 111 |
| 3.3.2 | Die proneurale Domäne innerhalb der ventralen Hälfte der δB bringt einen Neuroglioblasten hervor | 112 |
| 3.3.2.1 | δB NGB-ZSB1 | 112 |
| 3.3.3 | NB-ZSBe, die in der dorsalen Hälfte der δB entstehen | 113 |
| 3.3.3.1 | δB NB-ZSB6 | 113 |
| 3.3.3.2 | δB NB-ZSB7 | 114 |
| 3.3.3.3 | δB NB-ZSB12 | 115 |
| 3.3.4 | Neuronale ZSBe aus $\delta 1$ | 117 |
| 3.3.4.1 | $\delta 1$ NB-ZSB1 | 117 |
| 3.3.4.2 | $\delta 1$ NB-ZSB2 | 119 |
| 3.3.4.3 | $\delta 1$ NB-ZSB3 | 121 |
| 3.3.4.4 | $\delta 1$ NB-ZSB4 | 123 |
| 3.3.5 | Epidermale ZSBe aus $\delta 1$ | 125 |
| 3.4 | Untersuchung von Gal4-Stämmen mit Expression in PKZSBen..... | 127 |
| 3.4.1 | Charakterisierung des dacGal4 Expressionsmusters | 129 |
| 3.4.1.1 | Dil-Markierungen von PKZSBen in dacGal4>CD8::GFP | 129 |
| 3.4.1.2 | Spätembryonale Ey-Expression im dacGal4>CD8::GFP Hintergrund | 130 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.4.1.3 | Charakterisierung der Dac-Protein- und dacGal4-Expression im Verlauf der embryonalen Gehirnentwicklung | 131 |
| 3.5 | Molekulare Marker für Nachkommenzellen der PKZSBe1-3 | 135 |
| 3.5.1 | Charakterisierung der Ey- und Dac-Expression in γ - und ni-Neuronen im späten Embryo | 135 |
| 3.5.2 | Twin-of-eyeless wird im St.17 in Subsets von γ - und ni-Neuronen exprimiert ... | 137 |
| 3.5.3 | Extradenticle wird im St.17 in einem einzigen ni-Neuron exprimiert. | 138 |
| 3.5.4 | Sloppy-paired1 wird im St.17 in zwei γ - oder ni-Typ2-Neuronen exprimiert | 139 |
| 3.5.5 | Expression der temporären Spezifizierungsgene <i>hunchback</i> , <i>Krüppel</i> und <i>pdm1</i> in St.17 PKZSBen..... | 140 |
| 4 | DISKUSSION..... | 143 |
| 4.1 | Dil-Markierungen ermöglichen die Charakterisierung vollständiger, embryonaler Gehirnzellstammbäume..... | 143 |
| 4.2 | 4D-Mikroskopie in Kombination mit Dil-Markierungen ermöglicht die Erstellung von hochauflösenden fate maps | 144 |
| 4.3 | Entstehung von unterschiedlichen Stammzellen in δB und $\delta 1$ | 145 |
| 4.4 | Embryonale PKNBen generieren individuelle ZSBe bestehend aus unterschiedlichen Neuronentypen, die in einer festgelegten Reihenfolge entstehen | 147 |
| 4.5 | Die Embryonalentwicklung der Neuropilstrukturen des Pilzkörpers | 150 |
| 4.6 | Embryonale γ -Neurone begehen keine Apoptose und persistieren bis in das adulte Nervensystem | 151 |
| 4.7 | Parallelen zwischen ni-Typ2-Neuronen in <i>Drosophila</i> und Typ 3 Kenyonzellen in anderen Insekten..... | 152 |
| 4.8 | Evolutionäre Betrachtungen der Pilzkörper | 153 |
| 4.9 | Zellzahlen und Projektionsverläufe der protocerebralen Zellstammbäume | 154 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 157 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 159 |
| 7 | ANHANG..... | 166 |
| 7.1 | Lebenslauf | 166 |
| 7.2 | Eidesstattliche Erklärung | 167 |
| 7.3 | Danksagung..... | 168 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abb. 1 Die frühe Embryonalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> | 17 |
| Abb. 2 Die mitotischen Domänen nach Foe (1989)..... | 18 |
| Abb. 3 Ursprung, Entwicklung und Organisation des ZNS..... | 19 |
| Abb. 4 Die NBen des embryonalen Gehirns..... | 24 |
| Abb. 5 Die Pilzkörper..... | 27 |
| Abb. 6 4D-mikroskopische Analyse der δB | 59 |
| Abb. 7 4D-mikroskopische Analyse der $\delta 24$ | 62 |
| Abb. 8 Charakterisierung der pilzkörperspezifischen OK107 Expression..... | 64 |
| Abb. 9 Unterteilung des Gehirnneuropil und des Pilzkörperneuropil in verschiedene Regionen..... | 65 |
| Abb. 10 Jeder PKNB entsteht aus einer einzelnen NE-Zelle aus δB | 67 |
| Abb. 11 PKNBen gehen aus benachbarten Zellen derselben proneuralen Domäne hervor..... | 68 |
| Abb. 12 Ey, Dac und Drx Expression erlauben das Ansprechen der PKNBen im Verlauf der Embryonalentwicklung..... | 70 |
| Abb. 13 Jeder PKZSB besetzt einen ihm eigenen Bereich innerhalb des Pilzkörpers | 72 |
| Abb. 14 Der Pilzkörperzellstammbaum 1..... | 74 |
| Abb. 15 Der Pilzkörperzellstammbaum 2..... | 76 |
| Abb. 16 Der Pilzkörperzellstammbaum 3..... | 78 |
| Abb. 17 Der Pilzkörperzellstammbaum 4..... | 80 |
| Abb. 18 Ablation von PKNBen und frühen Nachkommenzellen..... | 84 |
| Abb. 19 Das Auswachsen der γ -Neurone und die Innervation der Loben zeigt klonspezifische Unterschiede..... | 87 |
| Abb. 20 Iontophoretische Dil-Markierungen von γ -Neuronen in $OK107 > CD8::GFP$.. | 90 |
| Abb. 21 δB NB-ZSB1..... | 95 |
| Abb. 22 δB NB-ZSB2..... | 98 |
| Abb. 23 δB NB-ZSB3..... | 100 |
| Abb. 24 δB NB-ZSB4..... | 102 |
| Abb. 25 δB NB-ZSB5..... | 104 |
| Abb. 26 δB NB-ZSB8..... | 106 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 27 δ B NB-ZSB9..... | 109 |
| Abb. 28 δ B NB-ZSB10..... | 110 |
| Abb. 29 δ B NB-ZSB11..... | 112 |
| Abb. 30 δ B NGB-ZSB1..... | 113 |
| Abb. 31 δ B NB-ZSB6..... | 114 |
| Abb. 32 δ B NB-ZSB7..... | 115 |
| Abb. 33 δ B NB-ZSB12..... | 116 |
| Abb. 34 δ 1 NB-ZSB1..... | 118 |
| Abb. 35 δ 1 NB-ZSB2..... | 120 |
| Abb. 36 δ 1 NB-ZSB3..... | 122 |
| Abb. 37 δ 1 NB-ZSB4..... | 124 |
| Abb. 38 Epidermaler ZSB aus δ 1..... | 125 |
| Abb. 39 Dil-Markierungen in $\text{dacGal4}>\text{CD8::GFP}$ | 129 |
| Abb. 40 Ey Antikörperfärbung im $\text{dacGal4}>\text{CD8GFP}$ Hintergrund..... | 131 |
| Abb. 41 $\text{dacGal4}>\text{CD8::GFP}$ und Dac Expression der PKZSBe1-3 im Verlauf der Embryonalentwicklung..... | 134 |
| Abb. 42 Ey und Dac Expression in St.17 PKZSBen..... | 137 |
| Abb. 43 Toy-Expression in den PKZSBen 1-3 im St.17..... | 138 |
| Abb. 44 Extradenticle wird im St.17 in einem einzigen ni-Neuron exprimiert..... | 139 |
| Abb. 45 Slp1 Expression in St.17 PKZSBen..... | 140 |
| Abb. 46 Hb, Kr Pdm1 Expression in den PKZSBen 1-3 im St.17..... | 141 |
| Abb. 47 Die sequentiell generierten Neuronentypen der PKNBen..... | 149 |
| Abb. 48 <i>Drosophila</i> ni-Typ2-Neurone und Typ 3 Kenyonzellen der Bienenlarve..... | 153 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Tabelle 1 Statistiken über Pilzkörperzellstammbäume im St.17 und L1 | 81 |
| Tabelle 2 Statistiken δB und $\delta 1$ ZSBe..... | 126 |
| Tabelle 3 Gal4 Stämme, die auf eine Expression im embryonalen Pilzkörper hin untersucht wurden..... | 128 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---------------------------------|
| a | anterior |
| A1-9/10 | abdominale Neuromere 1-9/10 |
| Abb. | Abbildung |
| ACT | antennocerebraler Tract |
| AK | Antikörper |
| AL | Antennalloben |
| ALH | nach Schlupf der Larve |
| AN | Antennalnerv |
| APF | nach Verpuppung |
| api | amnioproctodeale Invagination |
| C1-3 | gnathale Neuromere |
| Ca | Calyx |
| cf | cephale Furche |
| d | dorsal |
| <i>dac</i> | <i>dachshund</i> |
| DC | Deutocerebrum |
| DIC | Differentialinterferenzkontrast |
| dML | dorsale Mittellinie |
| <i>Dtk</i> | <i>Drosophila</i> tachykinin |
| <i>exd</i> | <i>extradenticle</i> |
| <i>ey</i> | <i>eyeless</i> |
| GFP | Grün Fluoreszierendes Protein |
| GMZ | Ganglienmutterzelle |
| <i>hb</i> | <i>hunchback</i> |
| <i>Kr</i> | <i>Krüppel</i> |
| Kx | Pilzkörperkortex |
| KZ | Kenyonzellkörper |
| l | lateral |
| L1,L2,L3 | Larvalstadien 1,2,3 |
| IA | lateraler Appendix |
| LH | Lateral Horn |
| Lj | Lobe-junction |
| LSM | Laserscan-Mikroskop |

| | |
|------------------|--|
| m | medial |
| MBEN | pilzkörperextrinsische Neurone |
| MBIN | pilzkörperintrinsische Neurone |
| min. | Minute(n) |
| mL | medialer Lobus |
| ML | Mittellinie |
| NB/NBen | Neuroblast/en |
| NE | Neuroektoderm |
| NGB | Neuroglioblast |
| NHL | frisch geschlüpfte Larve |
| ni-Neurone | nicht-intrinsische Pilzkörperneuroblasten-Neurone |
| ni-Typ2-Neurone | nicht-intrinsische Pilzkörperneuroblasten-Neurone vom Typ2 |
| p | posterior |
| PC | Protocerebrum |
| <i>pdm1</i> | <i>POU domain protein 1</i> |
| Pe | Pedunkel |
| PKNB/ PKNBen | Pilzkörperneuroblast/ Pilzkörperneuroblasten |
| PKZSB/ PKZSBe(n) | Pilzkörperzellstammbaum/ Pilzkörperzellstammbäume(n) |
| pNE | procephales Neuroektoderm |
| rNE | Rumpf-Neuroektoderm |
| rpm | revolutions per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S1-S5 | Segregationswellen 1-5 |
| <i>slp1</i> | <i>sloppy paired 1</i> |
| Sp | Spur |
| St. | Embryonalstadium |
| T1-3 | thorakale Neuomere |
| TC | Tritocerebrum |
| <i>toy</i> | <i>twin of eyeless</i> |
| u.a. | unter anderem |
| v | ventral |
| vf | ventrale Furche |
| vL | vertikaler Lobus |

| | |
|--------------|----------------------------------|
| VNS | ventrales Nervensystem |
| WT | Wildtyp |
| z.B | zum Beispiel |
| Zk | Zellkörper |
| ZNS | zentrales Nervensystem |
| ZSB/ ZSBe(n) | Zellstammbaum/ Zellstammbäume(n) |
| δ | mitotische Domäne |

1 Einleitung

1.1 Die frühe Embryonalentwicklung

Die Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* beginnt mit der Befruchtung der Eizelle. Während der ersten vier Embryonalstadien (St.1-4; Stadien nach (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997) finden in der ca. 0,5 x 0,2 mm großen Zygote synchrone Kernteilungen statt, die eine syncytiale Organisation des frühen Embryos zur Folge haben (Abb. 1 A). Die anfänglich im Inneren der Eizelle gelegenen Zellkerne wandern während des St.2 in die Peripherie der Zygote, wobei sie mitotisch noch aktiv sind. Dort angelangt treten die letzten Kernteilungszyklen auf und es findet im St.5 ein als Zellularisierung bezeichneter Prozess statt, in dem jeder in der Peripherie gelegene Zellkern durch das Einwachsen einer Zellmembran umhüllt wird (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Foe and Alberts, 1983). Die eben beschriebenen Prozesse haben zur Folge, dass ein *Drosophila* Embryo nach seiner Zellularisierung aus ca. 5000-6000 in der Peripherie gelegenen Zellen besteht, die den zentral gelegenen Dotter umgeben (Abb. 1 A). Direkt nach der Zellularisierung kommt es, während des St.6, zur Gastrulation, bei der die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm gebildet werden. Äußere morphologische Anzeichen der Gastrulation sind die Ausbildung der cephalen und der ventralen Furche, die durch das Einwandern von Zellverbänden in das Innere des Embryos entstehen (Abb. 1 B) (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Foe, 1989). Kurz nach Beginn der Gastrulation im St.7 werden die ersten Zellteilungen auf der Oberfläche des Embryos sichtbar, welche im Muster von mitotischen Domänen erfolgen (Foe, 1989).

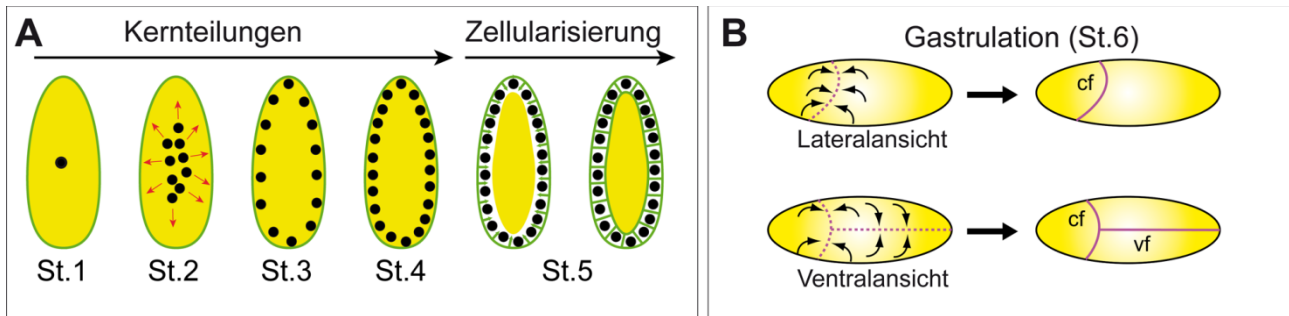


Abb. 1 Die frühe Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*

A Schematische Darstellung der Kernteilungen und der Zellularisierung während der frühen Embryonalentwicklung. Dotter: gelb; Zellmembran: grün; Zellkerne: schwarz; anterior oben. Im St.1 finden die Befruchtung der Eizelle und die ersten beiden Kernteilungszyklen statt. Im St.2 kommt es zu den Kernteilungszyklen 3-8 und die Zellkerne wandern aus dem Inneren in die Peripherie (rote Pfeile). Während der Stadien 3 und 4 treten die letzten Kernteilungszyklen auf (Zyklus 9 bzw. 10-13). St.5 ist gekennzeichnet durch die Zellularisierung, bei der jeder in der Peripherie gelegene Zellkern von einer einwachsenden Zellmembran umschlossen wird. **B** Schematische Darstellung der Gastrulation während des St.6. Anterior links. Äußere morphologische Anzeichen der Gastrulation sind die Bildung der cephalen (cf) und ventralen (vf) Furche (magenta Linien, rechts), die an definierten Stellen des Embryos (magenta gestrichelte Linien, links) durch das Einwandern von Zellverbänden entstehen (schwarze, gebogene Pfeile).

1.2 Mitotische Domänen

Während die Kernteilungen im syncytialen Embryonalstadium von *Drosophila* (1.-13. Mitosezyklus) annähernd synchron verlaufen (Foe and Alberts, 1983), ändert sich dieses synchrone Mitoseverhalten mit der Zellularisierung (= zelluläres Blastoderm). Der 14. mitotische Zyklus (= 1. Mitose nach Zellularisierung) erfolgt im Muster von mitotischen Domänen (Foe, 1989). Diese entstehen dadurch, dass in bestimmten Bereichen, des zu diesem Zeitpunkt noch aus einem einschichtigen den Dotter umgebenden Epithel bestehenden *Drosophila* Embryos, Gruppen von Zellen synchron ihre Mitosen beginnen (= mitotische Domänen). Der Eintritt der einzelnen Zellgruppen in die Mitose erfolgt in einer zeitlich und räumlich genau festgelegten Reihenfolge. Diese Stereotypie ermöglicht ein zuverlässiges Ansprechen der einzelnen Domänen. Foe (1989) identifizierte 25 verschiedene mitotische Domänen ($\delta 1$ - $\delta 25$), die sie gemäß der eben erwähnten zeitlichen Abfolge durchnummerierte, wobei $\delta 1$ Zellen als erste und $\delta 25$ Zellen als letzte ihren 14. mitotischen Zyklus durchlaufen. Zusätzlich beschrieb sie zwei Domänen (δN , δM), in denen Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg in keinem erkennbaren Muster in ihre Mitose eintreten und zwei weitere Domänen (δA , δB) deren Zellen, während der von ihr untersuchten Embryonalstadien (St.5-10), keine Mitosen aufweisen (Abb. 2 A, B).

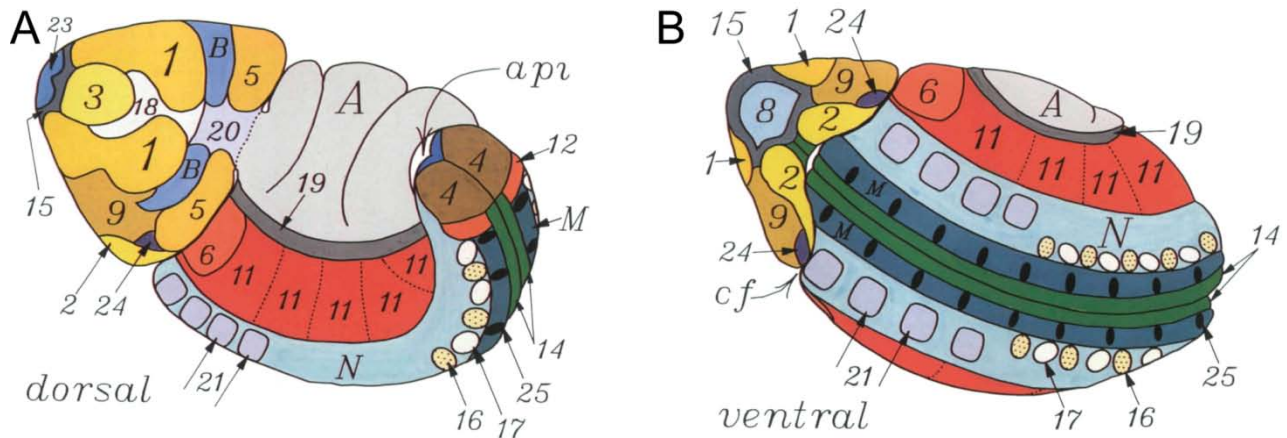


Abb. 2 Die mitotischen Domänen nach Foe (1989)

A+B Schema der mitotischen Domänen eines *Drosophila* Embryos in Dorsal- (A) und Ventralansicht (B), anterior links. Abbildung aus (Foe, 1989). Die mitotischen Domänen wurden gemäß ihrem zeitlichen Auftreten durchnummeriert (1-25). Neben diesen mitotischen Domänen finden sich noch zwei Domänen (N, M), in denen Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg in keinem erkennbaren Muster in ihre Mitose eintreten und zwei weitere Domänen (A, B), deren Zellen keine Mitosen aufweisen. **Abkürzungen:** cf: cephalic Furche; api: amnioproctodeale Invagination

1.3 Ursprung und Organisation des Nervensystems

Das Nervensystem entsteht durch Proliferation von neuronalen Stammzellen (= Neuroblasten (NBen)), die aus bestimmten Regionen des Ektoderms hervorgehen. Diese Regionen, die das Potential haben sowohl NBen als auch Stammzellen der Epidermis (= Epidermoblasten) zu bilden, werden Neuroektoderm (NE) genannt. Das zentrale Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* besteht aus einem Gehirn, das von den Nachkommenzellen der NBen des procephalen NE (pNE) aufgebaut wird und dem ventralen Nervensystem (VNS), das aus NBen des Rumpf-NE (rNE) hervorgeht (Abb. 3 A). Das Gehirn unterteilt sich in drei unterschiedlich große Abschnitte: das anterior (in Neuralachse; siehe Abb. 3 F) gelegene verhältnismäßig große Protocerebrum, das posterior an dieses angrenzende kleinere Deutocerebrum und eine posterior gelegene kleinste Einheit, das Tritocerebrum. Das sich posterior an das Gehirn anschließende VNS besteht aus 16 Neuromeren die von anterior nach posterior in drei gnathale Neuromere (C1-C3), drei thorakale Neuromere (T1-T3) und 10 abdominale Neuromere (A1-A9/10) unterteilt werden (Abb. 3 F). Die Mittellinie teilt jedes Neuomer in zwei spiegelbildliche Hälften, die sogenannten Hemineuromere (Abb. 3 A).

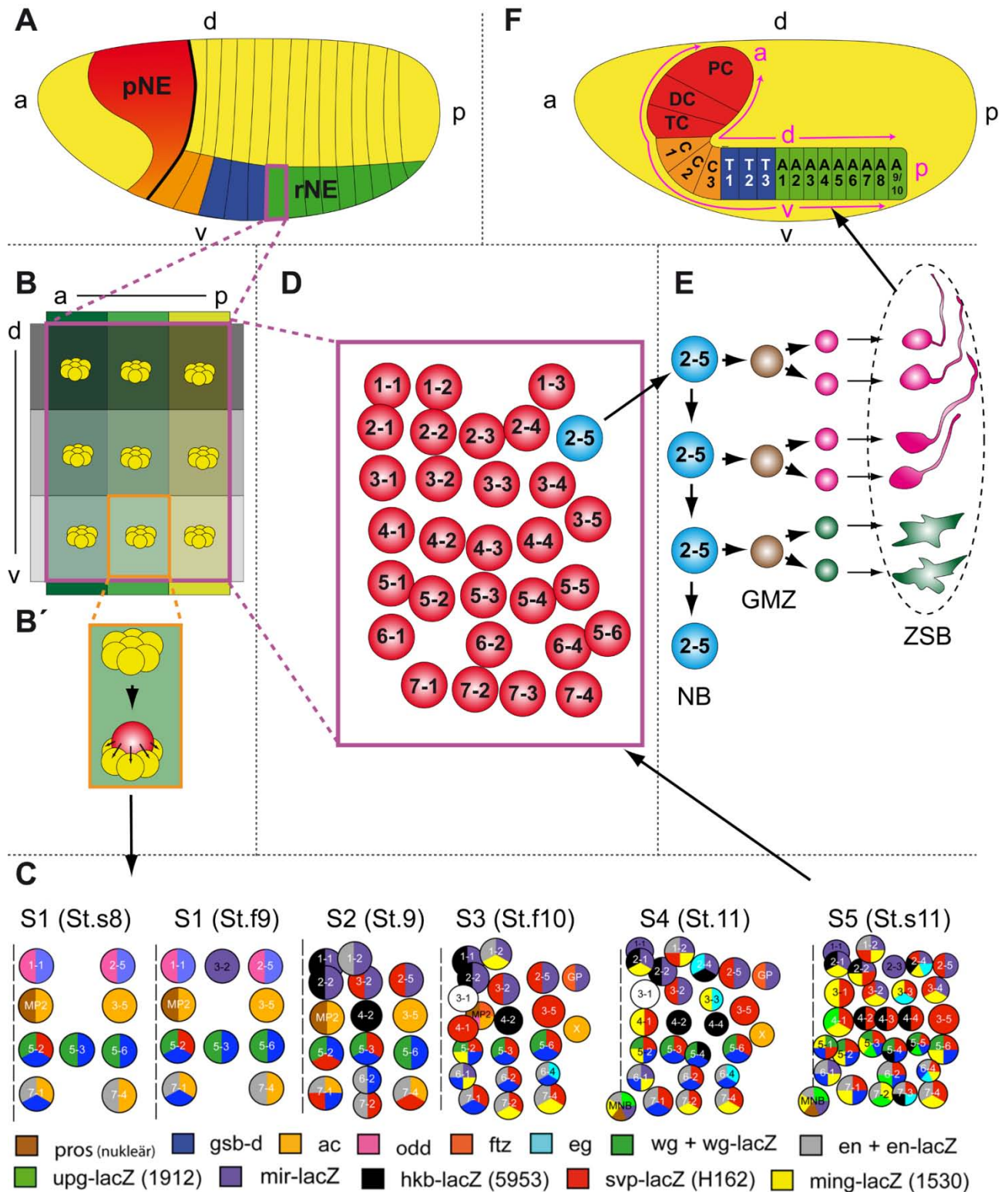


Abb. 3 Ursprung, Entwicklung und Organisation des ZNS

A Schema des procephalen (pNE) und Rumpf-NE (rNE), aus denen die NBen des Gehirns bzw. VNS hervorgehen. Schematische Darstellung von lateral. Farben deuten die Bereiche innerhalb des NE an, aus denen die verschiedenen Neuroomere des ZNS hervorgehen (vergleiche (F)). Das magentafarbene Rechteck umrandet ein Hemisegment. **B+B'** Spezifizierung von NBen im rNE. **B** Schema eines Hemisegments (magenta umrandet) und den

darin auftretenden proneuralen Clustern (gelbe Sphären). Die proneuralen Cluster liegen in einem kartesischen Koordinatensystem, das durch die Überlagerung der in anteroposteriorer Richtung exprimierten Segmentpolaritätsgene (grün) und der in dorsoventraler Richtung exprimierten dorsoventralen Musterbildungsgene (grau) entsteht. **B'** Delamination eines NB (rot) aus einem proneuralen Cluster (gelb). Der NB signalisiert den anderen Zellen des Clusters sich zu Epidermoblasten zu entwickeln (schwarze Pfeile) und delaminiert ins Innere des Embryos. **C** Die 5 Segregationswellen (S1-S5) der NBen-Delamination eines Hemisegments. In jeder Segregationswelle delaminiert ein definiertes Set an NBen ins Innere des Embryos. Jeder NB hat, spezifiziert durch die Segmentpolaritäts- und dorsoventralen Musterbildungsgene, eine eigene Identität, die sich auch durch seine individuelle Genexpression ausdrückt. Abbildung verändert nach (Broadus and Doe, 1995; Doe, 1992). **D** Die 30 NBen (rot bzw. blau) eines embryonalen Hemisegments (magenta Umrandung). **E** Proliferation der NBen im Stammzellmodus (hier am Beispiel von NB 2-5): Der NB (blau) schnürt mehrfach kleinere Gangliemutterzellen ab (GMZ, braun), die sich jeweils ein einziges Mal teilen und zwei postmitotische Tochterzellen hervorbringen (magenta bzw. grün). Diese differenzieren sich (schwarzer Pfeil) zu Neuronen und/oder Gliazellen (magenta bzw. grün) und konstituieren den typischen ZSB des NB. Die ZSBs aller NBen des pNE und rNE bilden das ZNS (siehe (F)). **F** Organisation des spätembryonalen/frühhlarvalen ZNS. Schematische Darstellung von Lateral. Das Gehirn (rot) unterteilt sich in die drei Neuromere: Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC). Das VNS unterteilt sich in die gnathalen Neuromere (C1-C3, orange), die thorakalen Neuromere (T1-T3, blau) und die 10 abdominalen Neuromere (A1-A9/10, grün). Magenta Buchstaben (a,p,d,v) geben die Orientierung in Neuralachse an; schwarze Buchstaben (a,p,d,v) beziehen sich auf die Körperachsen des Embryos, die nicht äquivalent zu den Neuralachsen sind! **Abkürzungen:** a: anterior; p: posterior; d: dorsal; v: ventral; S1-S5: Segregationswellen 1-5; GMZ: Gangliemutterzelle; ZSB: Zellstammbaum; pNE: procephales NE; rNE: Rumpf-NE; s: spät; f: früh

1.3.1 Die Entwicklung des embryonalen ventralen Nervensystems

Untersuchungen, die im rNE durchgeführt wurden, konnten aufzeigen, wie es zur Spezifizierung von neuralen versus epidermalen Stammzellen kommt. Bei dieser Spezifizierung wird im rNE aus einer Gruppe von 5-7 Zellen, die initial alle das Potential haben zu neuralen Stammzellen zu werden (= proneurales Cluster) (Abb. 3 B, B'), stets eine einzige Zelle auserwählt, die ihr neurales Entwicklungsschicksal beibehält und die den anderen Zellen des proneuralen Clusters signalisiert sich zu epidermalen Stammzellen zu entwickeln (= laterale Inhibition; Abb. 3 B') (Campos-Ortega, 1993; Skeath and Thor, 2003). Diese Zell-Zell Kommunikation verläuft über den Notch/Delta Signalweg. Dieser bewirkt, dass die Expression der proneuralen Gene des *achaete/scute*-Komplexes (*achaete*, *scute*, *lethal of scute*) nur im prospektiven NB aufrecht erhalten wird, während den übrigen Zellen des proneuralen Clusters signalisiert wird die Expression der proneuralen Gene herunterzuregulieren und die neurogenen Gene des *Enhancer of split Komplexes* zu exprimieren. Diese sind notwendig für die Spezifizierung eines epidermalen Schicksals (Cabrera et al., 1987; Campos-Ortega, 1994; Jimenez and Campos-Ortega, 1990; Lecourtois and Schweisguth, 1995; Skeath and Carroll, 1992). Die Identität des auf die eben beschriebene Weise spezifizierten NB wird über die in anteroposteriorer Richtung exprimierten Segmentpolaritätsgene und die in dorsoventraler Richtung exprimierten

dorsoventralen Musterbildungsgene festgelegt (Abb. 3 B). Durch die Überlagerung der Expressionsdomänen der Mitglieder dieser beider Gengruppen entsteht im rNE ein kartesisches Koordinatensystem, innerhalb dessen jedes proneurale Cluster und die daraus hervorgehende neurale Stammzelle unter dem Einfluss einer einzigartigen Kombination dieser Genexpressionen steht, wodurch ihre Identität festgelegt wird (Skeath, 1999; Skeath and Thor, 2003; Technau et al., 2006). Auf diese Weise werden im VNS pro Hemineuomer 30 NBen spezifiziert (Abb. 3 C, D), die alle eine unterschiedliche Identität besitzen, welche sich durch den Zeitpunkt und Ort ihrer Entstehung, eine individuelle Genexpression und durch ein charakteristisches Set von Nachkommenzellen (= Zellstammbaum (ZSB)) ausdrückt (Bossing et al., 1996; Broadus and Doe, 1995; Doe, 1992; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Nach ihrer Spezifizierung löst sich die neurale Stammzelle aus dem proneuralen Cluster und segregiert ins Innere des Embryos (= Delamination) (Abb. 3 B'). Im rNE erfolgt die Delamination der 30 NBen eines Hemineuomers während der Embryonalstadien 8-11 in fünf aufeinanderfolgenden stereotypen Segregationswellen (S1-S5) (Abb. 3 C) (Bossing et al., 1996; Doe, 1992; Schmidt et al., 1997). Eine Segregationswelle zeichnet sich durch das zeitgleiche Delaminieren einer definierten Subpopulation der 30 Stammzellen aus. Nach ihrer Delamination beginnen die NBen mit der Generierung ihrer Nachkommenzellen im Stammzellmodus (Abb. 3 E). Bei diesem Modus schnürt der NB nacheinander eine für ihn charakteristische Anzahl von kleineren sogenannten Ganglienmutterzellen ab, die durch jeweils einmalige Teilung zwei postmitotische Tochterzellen hervorbringen (Hartenstein et al., 1987; Karcavich, 2005). Diese beiden Tochterzellen differenzieren sich zu Neuronen und/oder Gliazellen. Die aus den 30 NBen eines embryonalen Hemineuomers hervorgehenden Zellstammbäume (ZSBe) konnten durch Markierungen mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff Dil charakterisiert werden (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Die ZSBe entstehen durch Proliferation der NBen bis in die späten Embryonalstadien (St.15/16). Im St.15/16 treten die neuralen Stammzellen in eine Phase des mitotischen Arrests ein. Dieser Arrest dauert bis in das frühe Larvenstadium 2 (L2) an (Prokop and Technau, 1994). Bis zu diesem Arrest, haben die NBen alle Zellen des embryonalen Nervensystems hervorgebracht. Diese embryonal entstandenen Nachkommenzellen konstituieren das funktionelle VNS der Larvalstadien des Tieres (Abb. 3 E, F). Nachdem die NBen ihre Proliferation im frühen L2 Stadium wieder aufgenommen

haben beginnen sie mit der Generierung weiterer Zellen, die das funktionelle adulte VNS benötigt (Truman et al., 2004). Diese sekundäre Proliferationsphase dauert bis zur frühen Metamorphose (Ito and Hotta, 1992; Prokop and Technau, 1994).

Während die Entwicklung des embryonalen VNS bezüglich der Entstehung und Spezifizierung von NBen und ihrer Nachkommenzellen bereits intensiv erforscht wurde, fehlen entsprechende Untersuchungen für die Entwicklung des embryonalen Gehirns weitgehend.

1.3.2 Die Entwicklung des embryonalen Gehirns

Wie oben bereits erwähnt, ist die Entwicklung des embryonalen Gehirns weitaus weniger gut verstanden als die Entwicklung des embryonalen VNS. Erste Untersuchungen haben jedoch bereits Unterschiede, aber auch Gemeinsamkeiten, bei der Embryonalentwicklung von VNS und Gehirn aufgezeigt. Die Delamination der NBen des Gehirns findet wie im VNS während der Embryonalstadien 8-11 statt (Urbach et al., 2003; Urbach and Technau, 2003b). Im Gegensatz zum VNS delaminieren im Gehirn die NBen jedoch nicht in Segregationswellen sondern vereinzelt (Urbach et al., 2003; Urbach and Technau, 2003b). Ein weiterer auffälliger Unterschied zwischen procephalem und rNE findet sich in der Größe der proneuralen Cluster, aus dem die neuralen Stammzellen hervorgehen. Die proneuralen Domänen des Gehirns, ansprechbar wie im VNS durch die Expression der Gene des *achaete/scute*-Komplexes, sind deutlich größer als im VNS (Urbach et al., 2003; Younossi-Hartenstein et al., 1996). 4D-mikroskopische Untersuchungen des pNE erbrachten darüber hinaus erste Hinweise, dass im pNE benachbarte Zellen, die wahrscheinlich einer gemeinsamen proneuralen Domäne zuzuordnen sind, als NBen delaminieren können. Delamination von benachbarten NE-Zellen wurde besonders häufig in der mitotischen Domäne B (δB) beobachtet. Dies spricht dafür, dass der Prozess der lateralen Inhibition im pNE weniger effektiv ist oder nicht stattfindet (Urbach et al., 2003). Der Ablauf der Spezifizierung der neuralen Stammzellen konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die an der anteroposterioren Musterbildung im Gehirn beteiligten cephalen Lückengene und Segmentpolaritätsgene eine spezifische Expression im pNE und den daraus hervorgehenden neuralen Stammzellen zeigen (Urbach et al., 2003; Urbach and Technau, 2003a). Ebenso werden dorsoventrale

Musterbildungsgene spezifisch im pNE und den NBen des Gehirns exprimiert. Ihre Regulation erscheint jedoch weitaus komplexer als im rNE (Seibert and Urbach, 2010; Seibert et al., 2009; Urbach and Technau, 2003a).

Jede Gehirnhemisphäre wird durch ca. 100 NBen gebildet, die ihre Nachkommenzellen im Stammzellmodus generieren. Jeder dieser NBen hat eine eigene Identität, die sich durch eine individuelle Genexpression und ihren Delaminationszeitpunkt ausdrückt (Abb. 4 A, B) (Urbach et al., 2003; Urbach and Technau, 2003b). Die embryonalen ZSBe der Gehirnneuroblasten konnten bisher jedoch nicht aufgeklärt werden.

Die überwiegende Mehrzahl der NBen des Gehirns vollziehen in definierten Zeitperioden, ähnlich den NBen des VNS, eine Phase des mitotischen Arrests, beginnend in den späten Embryonalstadien und andauernd bis in das späte L1 Stadium. Nach diesem Arrest nehmen sie ihre Teilungsaktivität wieder bis in die frühe Metamorphose auf (Ito and Hotta, 1992; Prokop and Technau, 1994). Ebenso wie im VNS bilden die embryonal entstandenen Nachkommenzellen der NBen das funktionelle Gehirn der Larve und die larval/pupal entstandenen Nachkommenzellen werden für das funktionelle Gehirn des adulten Tieres benötigt. In jeder Gehirnhemisphäre findet man jedoch fünf NBen die keinen mitotischen Arrest aufweisen, sondern die von der frühen Phase der Embryonalentwicklung bis in die Metamorphose durchgängig proliferieren. Bei diesen NBen handelt es sich um den deutocerebralen sogenannten Lateralen Neuroblasten und die im Protocerebrum gelegenen vier Pilzkörperneuroblasten (PKNBen) (Prokop and Technau, 1994; Stocker et al., 1995). Die Nachkommenzellen der PKNBen bilden ein in seiner Postembryonalentwicklung bereits gut untersuchtes Gehirnzentrum, den Pilzkörper.

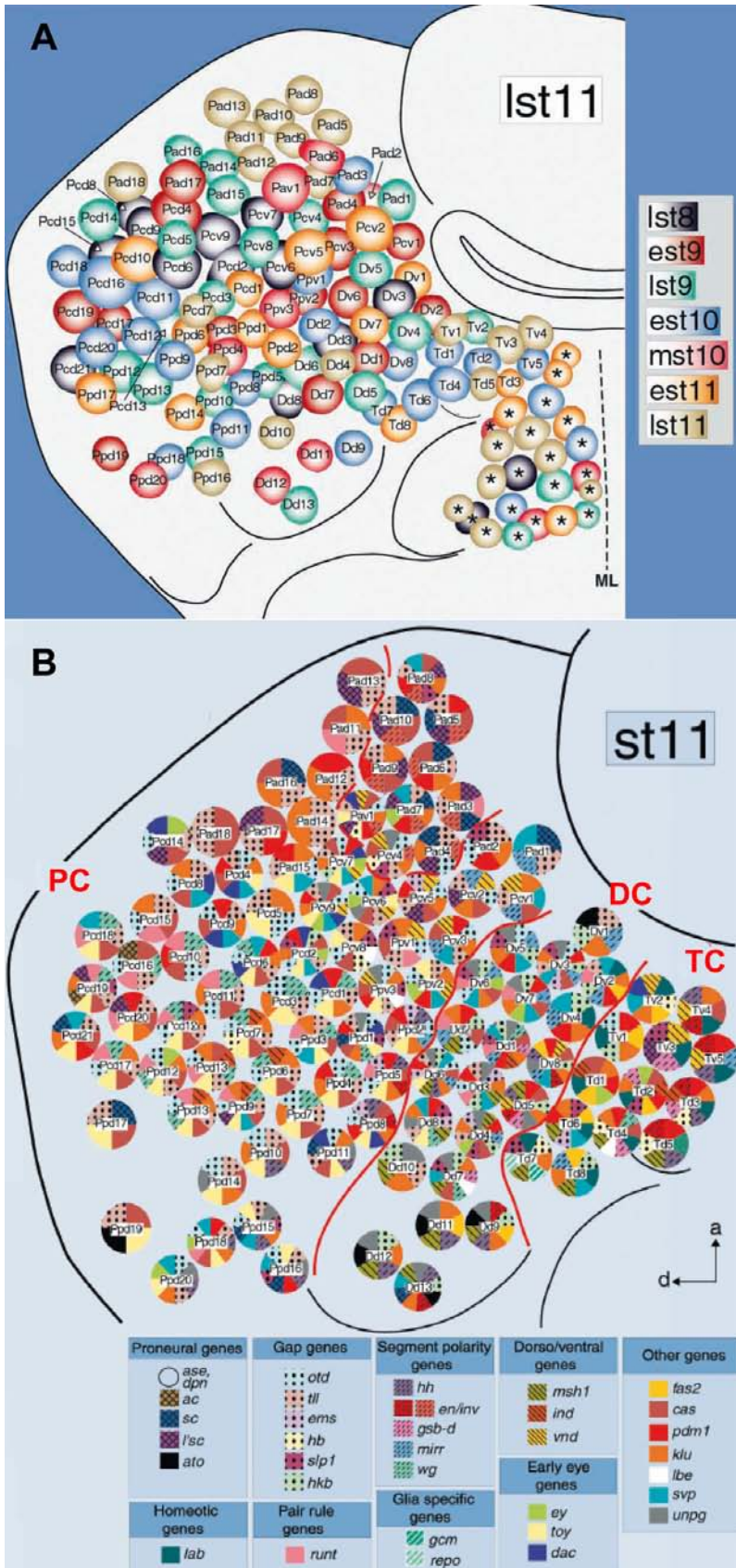


Abb. 4 Die NBen des embryonalen Gehirns

A Neuroblastenkarte des procephalen NE im späten St.11 (I11). In diesem Stadium sind bereits alle NBen delaminiert. Verschiedene Farben kennzeichnen die unterschiedlichen Stadien, in denen die NBen jeweils delaminieren. Die Stadien wurden unterteilt in spät (l) mittel (m) bzw. früh (e).

B Neuroblastenkarte im St.11. Gezeigt sind die individuellen Genexpressionskombinationen, die die Gehirnneuroblasten aufweisen (für Details siehe (Urbach and Technau, 2003b)). Abbildungen aus (Urbach et al., 2003; Urbach and Technau, 2003b) **Abkürzungen:** PC: Protocerebrum; DC: Deutocerebrum; TC: Tritocerebrum; ML: Mittellinie

1.4 Der Pilzkörper

1.4.1 Der Pilzkörper der Insekten

Pilzkörper sind paarige Gehirnzentren, die in vielen marinen Anneliden und der Mehrzahl der Arthropoden, mit Ausnahme der Crustaceen, vorkommen (Strausfeld et al., 1998). Erstmals beschrieben vom französischen Biologen Dujardin im Jahre 1850 (Dujardin, 1850), wurden Pilzkörper seither von Generationen von Biologen untersucht und innerhalb der Arthropoden am eingehendsten in den Insekten. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass trotz Variationen die Pilzkörper einen gemeinsamen Grundbauplan aufweisen. Pilzkörper sind Neuropilstrukturen, die aus einer großen Zahl (einige hundert bis hundertausende) parallel verlaufender Axone aufgebaut werden, die von basophilen Zellen (= Kenyonzellen; benannt nach ihrem Entdecker F.C Kenyon (Kenyon, 1896)) im Bereich des dorsalen Protocerebrums ausgehen. Typischerweise bilden deren Neuriten, proximal der Zellkörper aus denen sie hervorgehen, ein oder mehrere dendritische Felder, die Calyx, aus. Die parallel verlaufenden Axone der Kenyonzellen formen eine als Pedunkel bezeichnete Struktur, die in ihrem distalen Bereich zumeist in zwei oder mehreren Loben endet (Abb. 5 A) (Fahrbach, 2006; Strausfeld et al., 1998).

1.4.2 Der Pilzkörper von *Drosophila melanogaster*

Der Pilzkörper von *D. melanogaster* wird von Nachkommenzellen (= Kenyonzellen) der vier protocerebralen PKNBen gebildet, die ohne Arrest von den frühen Embryonalstadien bis in die Metamorphose proliferieren. Die Pilzkörper zeigen den typischen Aufbau der Insektenpilzkörper: Die Zellkörper der Kenyonzellen liegen im dorsoposterioren Protocerebrum und bilden mit ihren Neuriten das Pilzkörperneuopil (Abb. 5 B-E). Dieses Neuopil besteht aus dem Pedunkel, der durch den parallelen Verlauf der Kenyonzellaxone gebildet wird und der sich embryonal und während des L1 bis frühen dritten Larvenstadiums (L3) in zwei Loben aufteilt: den medialen und den vertikalen Lobus (Abb. 5 C). Proximal des Bereiches, in dem die Kenyonzellkörper liegen (= Pilzkörperkortex), bilden die Neuriten der Kenyonzellen ein dendritisches Feld, die Calyx (Abb. 5 B-E).

An den Pilzkörpern von *Drosophila* wurden, ermöglicht durch die Verfügbarkeit von molekulargenetischen und manipulativen Methoden und dem Vorhandensein vieler mutanter- und Gal4-Fliegenstämme, auch verhaltensbiologische Studien durchgeführt. Diese belegen, dass die Pilzkörper sowohl larval als auch adult bei der Prozessierung von olfaktorischen Informationen und bei Lern- und Gedächtnisprozessen eine Rolle spielen (Connolly et al., 1996; de Belle and Heisenberg, 1994; Heisenberg, 1998; Heisenberg et al., 1985; Pauls et al., 2010).

Durch Untersuchungen mit der MARCM Technik und mittels verschiedener Gal4-Treiberstämme konnte die Existenz von drei Kenyonzelltypen belegt werden: Von der Embryonalphase bis zum frühen L3 bringen die vier PKNBen γ -Neurone hervor, vom frühen L3 bis zum Beginn der Metamorphose werden sogenannte α'/β' -Neurone gebildet und von der frühen bis zur späten Metamorphose entstehen die α/β -Neurone (Crittenden et al., 1998; Ito et al., 1997; Lee et al., 1999; Pauls et al., 2010; Tettamanti et al., 1997). Charakterisiert sind diese drei Kenyonzelltypen durch die Innervation von fünf Loben im adulten Tier: α/β -Neurone bilden durch Bifurkation den α - und den β -Lobus und die α'/β' -Neurone bauen, ebenfalls durch Bifurkation, den α' - und den β' -Lobus auf. Die Axone der γ -Neurone, die während der Embryonal- und Larvalphase den medialen und den vertikalen Lobus konstituieren (siehe oben), werden während der Metamorphose reorganisiert (Lee et al., 1999; Technau and Heisenberg, 1982) und bilden im adulten Tier einen einzigen nach medial verlaufenden Lobus, den γ -Lobus (Abb. 5 C). Es konnte gezeigt werden, dass postembryonal jeder der vier PKNBen ein identisches Set der oben erwähnten drei Kenyonzelltypen hervorbringt, so dass der postembryonale Pilzkörper eine Vierfachstruktur darstellt, die aus morphologisch identischen Zellstammbäumen besteht (Abb. 5 D) (Ito et al., 1997). Von den funktionellen Verbindungen, die die postembryonalen Pilzkörper mit anderen Gehirnbereichen eingehen, sind diejenigen mit den Antennalloben am eingehendsten untersucht. Die Pilzkörper erhalten Input von den Antennalloben über sogenannte Projektionsneurone, die den antennocerebralen Tract bilden, der olfaktorische Informationen zur Calyx der Pilzkörper leitet (Abb. 5 E) (Jefferis et al., 2001; Marin et al., 2005; Stocker, 1994). Weitere Verknüpfungen, hauptsächlich von den Loben der Pilzkörper mit anderen Gehirnbereichen, werden von pilzkörperextrinsischen Neuronen (MBEN) hergestellt (Ito et al., 1998; Tanaka et al., 2008). Kürzlich wurde ein weiterer Typ von Neuronen beschrieben, die Verknüpfungen nur innerhalb des Pilzkörperneuropil

Einleitung

ausbilden (= pilzkörperintrinsic Neurone ((MBIN); (Tanaka et al., 2008)), obwohl diese Neurone nicht Teil des Pilzkörperkortex und damit keine Nachkommenszellen der PKNBen sind (Abb. 5 E).

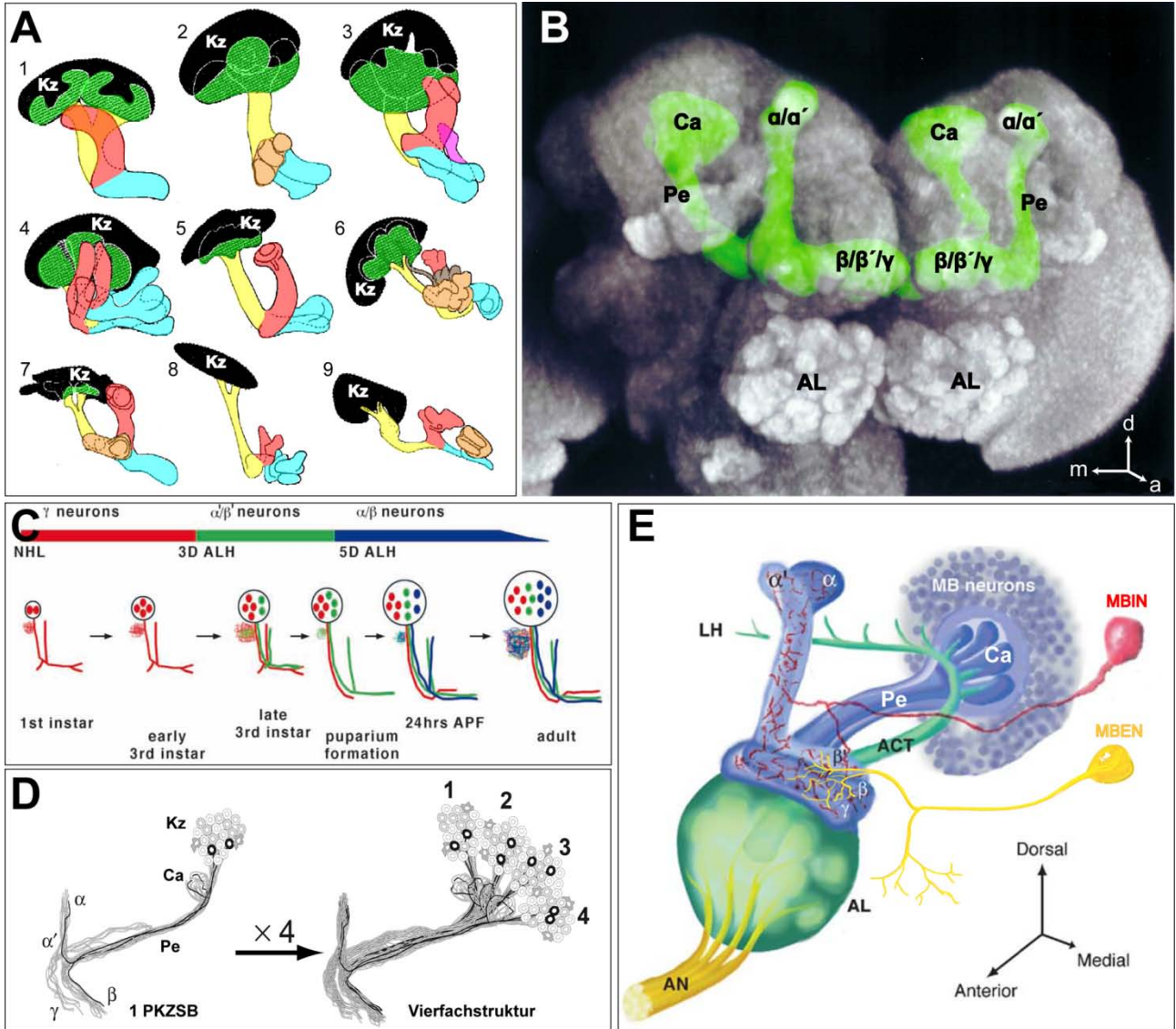


Abb. 5 Die Pilzkörper

A Die Pilzkörper verschiedener Insekten (verändert nach (Strausfeld et al., 1998)). Die Abbildung verdeutlicht den gemeinsamen Grundbauplan der Pilzkörper und deren speziesspezifische Variationen. Dargestellt ist jeweils nur der Pilzkörper der linken Gehirnhemisphäre. Schwarz: Bereich der Kenyonzellkörper (KZ); grün: Calyx/Calyces; gelb: Pedunkel; rot: vertikale(r) Lobus/en; blau: mediale(r) Lobus/en; orange: frontale(r) Lobus/en; magenta: rückläufiger Lobus; braun: Satellitenneuropil. 1: *Periplaneta americana* (Blattodea); 2: *Barytettix psolus* (Acrididae); 3: *Acheta domesticus* (Acrididae); 4: *Labidura riparia* (Dermaptera); 5: *Calosoma scrutator* (Coleoptera); 6: *Huebneriana trifolii* (Lepidoptera); 7: *Dytiscus marginalis* (Coleoptera); 8: *Notonecta undulata* (Hemiptera); 9: *Argia sp.* (Odonata). **B** Die Lage der beiden Pilzkörper im Protocerebrum des adulten Gehirns von *D. melanogaster*. Gezeigt sind die beiden Hemisphären und ihre Pilzkörperneuropile (grün), die sich jeweils in verschiedene Bereiche unterteilen: Calyx (Ca), Pedunkel (Pe), die beiden nach dorsal gerichteten Loben (α/α') und die drei medial orientierten Loben (β/β' und γ). AL: Antennalloben (Abbildung modifiziert aus (Zars, 2000)). **C** Die sequentielle Entstehung der postembryonalen Kenyonzelltypen (Abb. aus (Lee et al., 1999)). Vom L1 Larvenstadium bis zum frühen L3

Larvenstadium generieren die PKNBen γ -Neurone (rot). Im L3 Stadium werden α'/β' Neurone (grün) gebildet und von der frühen bis zur späten Metamorphose bringen die PKNBen α/β (blau) Neurone hervor. Die γ -Neurone werden während der Metamorphose reorganisiert und bilden adult einen der drei medialen Loben. **D** Der Pilzkörper ist eine Vierfachstruktur aus morphologisch identischen ZSBen (verändert nach (Ito et al., 1997)). Links: eine der vier Untereinheiten des adulten Pilzkörpers. Jede der vier Untereinheiten trägt mit ihren Kenyonzellen zum Aufbau der Calyx (Ca), des Pedunkel (Pe) und aller Loben bei (α , α' , β' , β und γ). Anmerkung: der β obus wurde erst in späteren Arbeiten beschrieben (siehe z.B. (Crittenden et al., 1998) und ist hier noch nicht aufgeführt). Rechts: der adulte Pilzkörper setzt sich aus 4 morphologisch identischen Untereinheiten zusammen. **E** Verbindungen der Pilzkörper zu anderen Gehirnbereichen im adulten Gehirn. Die Calyx (Ca) der Pilzkörper erhält ihren Hauptinput über den antennocerebralen Tract (ACT), der Informationen von den Antennalloben (AL) weiterleitet. Verbindungen innerhalb des Pilzkörperneuropil werden über Pilzkörper intrinsische Neurone, die jedoch nicht von den PKNBen abstammen (MBIN, rot) und Verbindungen des Pilzkörperneuropil mit anderen Gehirnbereichen werden über extrinsische Neurone (MBEN, gelb) hergestellt. Abbildung verändert nach (Davis, 2005). **Abkürzungen:** LH: Lateral Horn; AN: Antennalnerv; NHL: frisch geschlüpfte Larve; ALH: nach Schlupf der Larve; APF: nach Verpuppung; Kz: Kenyonzellkörper

1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit

ZSBe sind die aus neuralen Stammzellen hervorgehenden Module des ZNS. Das Wissen um die Entstehung, zelluläre Komposition und Morphologie dieser Module, sowie ihre Zuordnung zum NB, aus dem sie hervorgehen, ist essentiell für ein Verständnis der Zusammenhänge, die der Entwicklung des embryonalen Nervensystems zu Grunde liegen. Dieses Wissen ist jedoch nicht nur wichtig als Voraussetzung und Referenz für manipulative Eingriffe in den Entwicklungsablauf (z.B. Mutantanalyse), vielmehr ermöglicht die Kenntnis der wildtypischen Situation per se schon aufschlussreiche Einblicke, etwa in evolutionäre Anpassungen oder Konservierungen durch vergleichende Studien mit anderen Organismen oder in die funktionellen Spezialisierungen bestimmter Neuromere innerhalb des ZNS einer Spezies (z.B. Gehirn versus VNS). Außerdem lässt das Wissen um die wildtypische Gehirnarchitektur Rückschlüsse auf funktionelle Verknüpfungen des ZNS zu, was wiederum wichtig für verhaltensbiologische Fragestellungen ist. Während für das VNS Wildtypbeschreibungen der ZSBe bezüglich ihres Ursprungsneuroblasten, ihrer zellulären Komposition und Morphologie vorliegen (Bossing et al., 1996; Rickert et al., 2011; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997), fehlen solche Beschreibungen für das embryonale Gehirn nahezu vollständig. Um diese Wissenslücke zu schließen und somit eine Grundlage für die weitere Erforschung der embryonalen Gehirnentwicklung zu schaffen, begann ich mit der Charakterisierung der wildtypischen, embryonalen Gehirnzellstammbäume des Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. Ziel der Charakterisierung war die Bestimmung des neuroektodermalen

Einleitung

Ursprungs, der Zellzahlen, der Zelltypen, der Projektionsmuster und der Lage der ZSBe im Gehirnkortex. Im Fokus dieser Untersuchungen standen dabei die vier embryonalen Zellstammbäume, aus welchen der Pilzkörper hervorgeht.

2 Material und Methode

2.1 Fliegenhaltung und Eiablage

Die Fliegen wurden in zylindrischen Plastikröhren, die an ihrem oberen Ende mit einem Stopfen aus Schaumstoff verschlossen wurden gehalten. Als Nahrung diente ein, den Boden der Gefäße bedeckender, Nahrungsbrei bestehend aus: Soja, Mais, Malzextrakt, Hefe, Sirup und Agar; konserviert durch Zugabe von Nipagin und Propionsäure. Die Fliegen wurden bei Haltung auf 25°C alle 2-3 Wochen und bei Haltung bei 18°C alle 4-6 Wochen auf frische Zuchtröhren transferiert.

Um Eiablagen für die Experimente zu gewinnen, wurden die jeweils benötigten Fliegen in speziellen Ablagekäfigen gehalten. Deren Boden bestand aus mit Apfelsaftagar [28gr/Liter] ausgegossenen Petrischalen. Für die Eiablage wurde etwas Trockenhefe auf den Apfelsaftagar gestreut.

2.2 Verwendete Fliegenstämme

| Bezeichnung | Genotyp | Herkunft |
|--------------|--|------------------------------|
| Oregon-R1 | WT | Institut für Genetik (Mainz) |
| dac-Gal4 | dac-Gal4/Cyo; Actin-GFP | S. Thor |
| OK107-Gal4 | ::: P{GawB}eyOK107 | Bloomington Stock Center |
| UAS-mCD8-GFP | y[1]w[*];P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 P{w[+mC]=UASmCD8::GFP.L}LL5; P{UAS-mCD8::GFP.L}LL6 | Institut für Genetik (Mainz) |
| Ubi-GFPnls | w*; P{Ubi-GFP.nls}3L1 P{Ubi-GFP.nls}3L2 P{FRT(w[hs])}2A P{neoFRT}82B | Bloomington Stock Center |
| H99 | Df(3L)H99/TM3, Sb | Bloomington Stock Center |
| NP6649 | w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}CG14709[NP6649] / TM3, Sb[1] Ser[1] | DGRC |
| NP3208 | y[*] w[*] P{w[+mW.hs]=GawB}NP3208 / FM7c | DGRC |
| NP2748 | y[*] w[*] P{w[+mW.hs]=GawB}pigs[NP2748] / FM7c | DGRC |

| | | |
|------------|---|------------------|
| NP3061 | w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}CG8379[NP3061] | DGRC |
| NP3291 | w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}neur[NP3291] | DGRC |
| NP5286 | w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}CG17834[NP5286] / CyO, P{w[-]=UAS-lacZ.UW14}UW14 | DGRC |
| NP7060 | w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}scb[NP7060] / CyO, P{w[-]=UAS-lacZ.UW14}UW14 | DGRC |
| NP7175 | P{w[+mW.hs]=GawB}hfw[NP7175] w[*] / FM7c | DGRC |
| NP6024 | y[*] w[*] P{w[+mW.hs]=GawB}NP6024 / FM7c | DGRC |
| UASGFP T10 | w[*]; P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}T10 | Christian Berger |

2.3 Verwendete Sonden

| Bezeichnung | erstellt aus (Herkunft) | Vektor | Restriktionsenzym | RNA-Polymerase | Verdünnung Sonde |
|---------------------|-------------------------|-------------|-------------------|----------------|------------------|
| achaete-Dig | cDNA (S.Marcelini) | pBs SK(-) | XhoI | T3 | 1:1000 |
| scute-Dig | cDNA (S.Marcelini) | pGEM-T easy | NcoI | SP6 | 1:1000 |
| lethal of scute-Dig | EST-Klon RE59335 (BDGP) | pFLC1 | PstI | T3 | 1:1000 |

2.4 Verwendete primäre Antikörper

| Bezeichnung | Spezies | Konzentration | Bezugsquelle |
|-------------|-----------------|---------------|---------------------------|
| anti-Ey | Kaninchen | 1:1000 | U. Walldorf |
| anti-Dac | Maus | 1:250 | DSHB |
| anti-GFP | Huhn | 1:500 | Millipore |
| anti-Hb | Meerschweinchen | 1:500 | J. Urban |
| anti-Kr | Kaninchen | 1:500 | Bestand Inst. für Genetik |
| anti-Pdm1 | Kaninchen | 1:500 | Bill Chia |
| anti-GFP | Maus | 1:125 | Roche |
| anti-Toy | Kaninchen | 1:300 | U.Walldorf |
| anti-Exd | Maus | 1:5 | Bestand Inst. für Genetik |
| anti-Slp1 | Ratte | 1:300 | W.Gehring |
| anti-Dig-AP | Schaf | 1 : 1000 | Roche |

2.5 Verwendete sekundäre Antikörper

| Bezeichnung | Spezies | Verdünnung | Bezugsquelle |
|----------------------------|---------|------------|-------------------------|
| anti Huhn FITC | Esel | 1:250 | Jackson Immuno Research |
| anti Maus FITC | Esel | 1:250 | Jackson Immuno Research |
| anti Kaninchen FITC | Ziege | 1:250 | Jackson ImmunoResearch |
| anti Kaninchen Dylight 488 | Esel | 1:250 | Jackson ImmunoResearch |
| anti Kaninchen Cy3 | Esel | 1:250 | Jackson ImmunoResearch |
| anti Kaninchen Cy5 | Esel | 1:250 | Jackson ImmunoResearch |
| anti Meerschwein Cy5 | Ziege | 1:250 | Jackson ImmunoResearch |
| anti-Maus Cy3 | Ziege | 1:250 | Jackson ImmunoResearch |
| anti-Maus Cy5 | Ziege | 1:250 | Jackson ImmunoResearch |
| Alexa488 | Esel | 1:500 | Invitrogen |

2.6 Verwendete Chemikalien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|-----------------------|
| 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin perchlorat (DiI) | Molecular Probes Inc. |
| 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzenesulfonate (DiD) | Molecular Probes Inc. |
| 3H-Indolium, 5-[[[4-(chloromethyl)benzoyl]amino]methyl]-2-[3-(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-octadecyl-2H-indol-2-ylidene)-1-propenyl]-3,3-dimethyl-1-octadecyl-, chloride (CM-DiI) | Molecular Probes Inc. |
| 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) | Sigma |
| Agar | Roth |
| Cello 31.39; Klebstoff zur Herstellung von Heptankleber | Tesa |
| Chlorbleiche | Roth |
| Ethanol 100% unvergällt | Roth |

| | |
|--------------------------|------------------|
| Formaldehyd-Lösung 37% | Merck |
| Glycerin | Merck |
| Heptan | Aldrich |
| Immersionsöl | Lehmann&Voss |
| 10S-Voltalef-Öl | Lehmann&Voss&Co. |
| LiCl | Fluka |
| Methanol | Roth |
| Triton X-100 | Merck KGaA |
| Poly-L-Lysine (0,1mg/ml) | Biochrom AG |
| Heptan | Roth |
| Ethanol (unvergällt) | Roth |
| Mounting-Medium | Vectashield |

2.7 Verwendete Lösungen

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|---|
| Apfelsaftagar | 28g Agar in 1L Apfelsaft so lange aufkochen, bis das Gemisch klar ist. Heiß abfüllen und abkühlen lassen. |
| Dil-Lösung (für iontophoretische Dil Einzelzellmarkierung) | 1mg Dil; 1ml Ethanol 100% unvergällt |
| Fixativ (Dil-Markierungen; Photokonversion) | Formaldehyd (37%)/PBS [2:10] |
| Fixativ (Antikörperfärbung) | 600µl Heptan; 70µl Formaldehyd (37%); 450µl 0,1M PBT (0,3% Triton) |
| Glycerol 70% | Glycerin (100%) verdünnt mit PBS |
| LiCl-Lösung | 4,24g LiCl; 100ml Aqua dest. |
| PBS | Für 1L 20x Stammlösung: 151,92 g NaCl; 19,88 g Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) und 8,28 g NaH ₂ PO ₄ in Aqua dest. Lösen. Vor Gebrauch mit Aqua dest. Entsprechend verdünnen. |
| PBT (0,1M) | 0,3% Triton X-100; 1x PBS |
| Dil/Öl | 5mg/ml (=gesättigt) |
| CM-Dil/Öl | 3mg/ml (=gesättigt) |
| DiD/Öl | 10mg/ml |
| Poly-L-Lysin/Aqua.Dest | [1:7] |
| Chlorbleichlösung | Chlorbleiche auf 15% mit Leitungswasser |

Material und Methode

| | |
|--|---|
| | verdünnen |
| Heptankleber | Cello 31.39 mit Heptan durch rühren im Verhältnis von ungefähr 2:1 vermischen. |
| DAB-Lösung | 2-3 mg DAB in 100 mM Tris-HCl; pH, 7.4 |
| Formaldehydlösung (Fixierung Dil markierter Präparate) | Formaldehyd (37%)/PBS [2:10] |
| PBTween | 0,1% Tween20; 1xPBS |
| PBTween _{DEPC} (<i>in situ</i>) | PBTween; angesetzt mit RNase-freiem H ₂ O _{DEPC} und PBS _{DEPC} |
| Hybridisierungslösung (<i>in situ</i>) | 12.5 ml SSC 20x; 12.5 ml H ₂ O _{DEPC} ; 25 ml Formamid; 50 µl Tween20 |
| Detektionspuffer NBT/BCIP (<i>in situ</i>) | 41.2 ml H ₂ O _{dest} ; 1 ml NaCl (5M); 2.5 ml MgCl ₂ (1M); 5 ml Tris (1M, pH 9.5); 50 µl Tween20 |
| Färbelösung NBT/BCIP (<i>in situ</i>) | 1 ml Detektionspuffer; 3 µl NBT; 1.5 µl BCIP |
| ssDNA (<i>in situ</i>) | Salmon sperm DNA |

2.8 Verwendete Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Verwendung |
|------------------|-------------------------------------|--|
| Mikroskope | Leica Fluovert FU | Photokonversion und Dil Injektion für Zellstammbaumanalyse |
| | Olympus BX 50 WI | iontophoretische Dil Injektion |
| | Zeiss Axioskop 2 mot plus | Aufnahme photokonvertierter Präparate |
| | Leica SP2 | Aufnahme AK-Färbungen, Dil markierte ZSBs, fluoreszente 4D Mikroskopie |
| | Zeiss Axioskop2 | DIC 4D Mikroskopie |
| | Olympus BX50WI | Kontrolle AK gefärbter Fluoreszenzpräparate |
| Binokular | Leica MZ 8 | Präparation der Embryonen |
| Kapillaren | Science Products GMBH; GB 100 TF 8P | iontophoretische Dil Injektion |
| | Hilgenberg normal Meterware | Präparation der Embryonen; Kapillaren für Dil Injektion bei der Zellstammbaumanalyse |
| Kapillarenpuller | Sutter Instruments Co.Model P-97 | Herstellung der Kapillaren (iontophoretische Dil Injektion, Dil Injektion für |

Material und Methode

| | | |
|---|---|--|
| | | Zellstammbaumanalyse und Präparation von Embryonen) |
| Iontophoreseeinheit | Cornerstone ION-100 | iontophoretische Dil-Injektion |
| Netzteil der Iontophoreseeinheit | Dagan Corporation PS-10 | iontophoretische Dil-Injektion |
| Mikroskopkamera | Sony 3 CCD Color Video Camera | Aufnahme photokonvertierter Präparate |
| Injektionspritzen | Braun Omnifix 5ml Braun Omnifix 10ml | Dil Injektion bei der Zellstammbaumanalyse (5ml); "ausblasen" der Kapillare nach dem schleifen (10ml). |
| Injektionsschlauch | Wird von Karin Luer-Kirsch hergestellt | Dil Injektion bei der Zellstammbaumanalyse |
| Kapillarschleifer | Kapillarschleifer Bachofer Type 462 | anschleifen der Injektionskapillare für ZSB Markierung |
| Feuchte Kammer (Große Petrischale, die zwei feuchte Papierhandtücher enthält und mit Alufolie verkleidet wurde) | --- | Aufbewahrung von Präparaten und Embryonen |

2.9 Verwendete Software

| Bezeichnung | Hersteller | Verwendung |
|---|-------------------|--|
| AxioVision4 | Zeiss | Aufnahme photokonvertierter Präparate |
| Illustrator CS4 | Adobe | Zeichnungen |
| Photoshop CS4 | Adobe | Bearbeitung von Bildern |
| Leica SP2 confocal Software LCS | Leica | konfokalmikroskopische LSM Aufnahme von fluoreszenten Präparaten, 4D-Mikroskopie von ubiGFPnls Embryonen |
| Amira 4.0 | Amira | 3D-Rekonstruktion der ZSBe und Bestimmung von Zellzahlen |
| Simi Biocell | Simi | Auswertung der 4D-mikroskopischen Aufnahmen |
| Aufnahmesoftware für DIC 4D Mikroskopie | Dr. Ralf Schnabel | Aufnahme der Embryonen |
| QuickTime Player Ink. | Apple | Herstellung von Filmen aus Einzelbildern |

2.10 Antikörperfärbungen

2.10.1 Fixierung der Embryonen

Material

- Chlorbleiche
- Leitungswasser
- Fixativ
- Methanol
- Ethanol (unvergällt)
- Pipetten
- Vortexer
- Schüttler
- 1,5 ml Reaktionsgefäß

Methode

Die Embryonen wurden für 3 min. in 15% Chlorbleiche dechorionisiert, gründlich mit Wasser gespült, in ein Reaktionsgefäß überführt und im Anschluss auf dem Schüttler (circa 800-900 rpm) für 20 min. fixiert. Danach wurde zweimal die folgende Prozedur durchgeführt: die untere Phase des Fixativs wurde verworfen, es wurde 1 ml Methanol hinzugefügt und 2 min. bei höchster Umdrehungszahl gevortext. Nach dem zweiten Mal vortexen wurde die gesamte Lösung abgezogen, es wurde 3x mit Methanol gespült und im Anschluss für 10 min. auf dem Schüttler mit Methanol gewaschen. Im Falle von GFP exprimierenden Embryonen wurde statt des Methanol Ethanol verwendet. Nach dem Waschen wurden die Embryonen bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiter verwendet.

2.10.2 Inkubation primärer Antikörper

Material

- PBT
- Pipetten
- primärer Antikörper verdünnt in PBT
- Schüttler

Methode

Die fixierten Embryonen wurden zunächst durch 3x spülen und 3x jeweils 10 min. waschen (Schüttler ca. 100 rpm) mit PBT von Methanol bzw. Ethanol befreit. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBT soweit wie möglich abgesaugt und die Lösung mit primärem Antikörper (im jeweils erforderlichen Verhältnis mit PBT gemischt) auf die Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgte danach im Dunkeln für 1-2 Tage bei 4°C auf einem langsam eingestellten Schüttler (ca. 100 rpm).

2.10.3 Inkubation sekundärer Antikörper

Material

- PBT
- Pipetten
- Glycerol-Mounting-Medium [ca. 3:1]
- sekundärer Antikörper verdünnt in PBT
- Schüttler

Methode

Die Lösung mit dem primären Antikörper wurde soweit wie möglich abgesaugt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt (kann normalerweise mehrfach verwendet werden). Danach folgten 3x spülen und 3x 10 min. waschen mit PBT (Schüttler ca. 100 rpm). Nach dem letzten Waschgang wurde das PBT soweit wie möglich abgezogen und gegen die Lösung mit sekundärem Antikörper (im jeweils erforderlichen Verhältnis mit PBT gemischt) ausgetauscht. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler (ca. 100 rpm). Die Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern musste im Dunkeln erfolgen, da die Antikörper unter Lichteinstrahlung ausbleichen. Nach der Inkubation wurde die Lösung mit sekundärem Antikörper verworfen und es folgten drei Spülschritte und 3x 10 min waschen mit PBT. Nach dem Waschen wurde zweimal mit PBS gespült und die Präparate wurden mit einem Gemisch aus 70%igem Glycerol und Mounting-Medium überschichtet. Die Embryonen wurden bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.10.4 Dokumentation fluoreszenzgefärbter Präparate

Material

- Binokular
- Stahlpräpariernadeln
- große Deckgläschen (60x24mm) mit Rähmchen aus Klebefolie
- kleine Deckgläschen (22x22mm)
- Glycerol-Mounting-Medium [ca. 3:1]
- Nagellack
- Objektträger
- Fluoreszenzmikroskop
- konfokales Mikroskop
- Pipetten (1000µl + 100µl)

Methode

Von den fluoreszenzgefärbten Präparaten wurden zunächst die gewünschten Stadien herausgesucht, mit Hilfe einer Pipette (1000µl) auf einem Objektträger platziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf ihre Färbung hin überprüft. Die am geeignetsten

erscheinenden Embryonen wurden danach einzeln in einen kleinen Tropfen (ca.20µl) des Glycerol-Mounting-Medium-Gemischs transferiert, der zuvor auf ein, mit einem Rahmen aus Klebefolie versehenes, Deckglas (60x24mm) gegeben wurde. Der Embryo wurde mit der Stahlpräpariernadel in die geeignete Position für eine Dokumentation ausgerichtet und es wurde ein kleines Deckglas (22x22mm) auf den Klebefolienrahmen aufgelegt. Durch Verschieben dieses Deckglases konnte die Lage des Embryos, falls notwendig, nachkorrigiert werden. War der Embryo in der gewünschten Lage, wurde das kleine Deckglas mit Nagellack an seinen vier Ecken mit dem darunter liegenden großen Deckglas verbunden. Für die Dokumentation am konfokalen Mikroskop wurde das Deckglas auf einen Objektträger gelegt. Die Dokumentation erfolgte mit einem 40er Ölimmersionsobjektiv wobei die Vergrößerung, von Präparat zu Präparat variierend, mit Hilfe des digitalen Zooms angepasst wurde.

2.11 *in-Situ* Hybridisierung

Material

- Handschuhe
- sterile gestopfte Spitzen
- PBTween_{DEPC}
- PBTween
- PBS
- Hybridisierungslösung
- ssDNA (salmon sperm DNA)
- Methanol
- Thermocycler
- Schüttler
- Sonden [1:1000]
- Heizblock
- anti-Dig-AP in PBTween [1:1000]
- 70% Glycerol
- Binokular
- Färbelösung (NBT/BCIP)
- Detektionspuffer (NBT/BCIP)

Methode

Die *in-Situ* Hybridisierung wurde unter Verwendung von Handschuhen und steriler, gestopfter Spritzen durchgeführt. Auf diese Weise wurde eine Verunreinigung oder Degradierung der RNA-Sonden verhindert. Fixierte Embryonen (siehe 2.10.1) wurden mehrmals mit PBTween_{DEPC} gewaschen, danach 5 min. in PBTween_{DEPC}/Hybridisierungslösung (im Verhältnis 1:1) und zuletzt noch einmal 5 min. in Hybridisierungslösung inkubiert. Nun wurden 500 µl Hybridisierungslösung gemischt mit 5 µl ssDNA („salmon sperm DNA“) auf die Embryonen gegeben und diese wurden im Thermocycler bei 55°C für eine Stunde prähybridisiert (ca. 350 rpm). Die Sonden wurden mit einer Endverdünnung von 1:1000 eingesetzt (500 µl Hybridisierungslösung + 5 µl

ssDNA + 0,5 µl Sonde). Nach dem Ansetzen wurde das Gemisch für 10 min. bei 95°C im Heizblock denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und anschließend auf die Embryonen gegeben. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C im Thermocycler. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgezogen und bei -20°C aufbewahrt (kann mehrfach verwendet werden). Nach abziehen der Lösung werden die Embryonen 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. Nach diesem Schritt konnte ohne sterile, gestopfte Spitzen weiter gearbeitet werden. Nach vier zwanzigminütigen Waschschritten mit PBTween bei 65°C folgte ein letzter Waschschriff von 10 min. bei Raumtemperatur (RT). Für den Sondennachweis wurden die Embryonen 1,5 Std. mit AP-gekoppeltem anti-Dig (anti-Dig-AP; 0.5 µl anti-Dig-AP in 500 µl PBTween) inkubiert. Nach Inkubation wurde der Antikörper verworfen, die Embryonen mehrmals mit PBTweengespült und gewaschen und nachfolgend zweimal 5 min. mit Detektionspuffer (NBT/BCIP) inkubiert. Zur Signaldetektion wurde die Färbelösung auf die Embryonen gegeben und die Farbreaktion unter einem Binokular kontrolliert. Zum Abbrechen der Farbreaktion wurden die Embryonen mehrfach mit PBT gespült und danach für 10 min. in Methanol gewaschen. Nach dem Waschen erfolgten wiederum mehrmalige Spülschritte mit PBT. Zuletzt wurden die Embryonen mit PBS gespült und in 70% Glycerol bei RT aufbewahrt.

2.12 Iontophoretische Dil Einzelzellmarkierungen

2.12.1 Präparation und Fixierung der St.17 Embryonen

Material

- Binokular
- Skalpell
- mit doppelseitigem Klebeband beklebtes, kleines Deckglas (22x22mm)
- Objektträger
- Präpariernadel
- Glaspräpariernadeln
- Pasteurpipetten
- 60x24mm Deckglas
- 2 zurechtgeschnittene Agarblöckchen (2x2cm)
- 1 großes, sehr dünn mit Heptankleber beschichtetes, Deckglas
- aus Klebefolie zurechtgeschnittene Rähmchen (ca. 2x2cm)
- PBS
- Fixativ: Formaldehyd (37%)/PBS [2:10]
- Lysin-Aqua.Dest Lsg. [1:7]

Methode

Zunächst wurde ein 60x24mm Deckglas mit einem aus Klebefolie zurechtgeschnittenen Rähmchen beklebt. Danach wurden in dieses Rähmchen mittels einer Pipette einige Tropfen der Lysin-Aqua.Dest-Lösung gegeben. Diese Lösung wurde danach mit Hilfe eines weiteren Deckgläschens so verstrichen, dass sie das gesamte Klebefolien-Rähmchen ausfüllte. Das so präparierte Deckglas wurde beiseite gestellt und abgedeckt, damit kein Staub in die Lösung gelangte bis das Wasser verdunstet war (ca. 15-30 min). Durch diese Prozedur bildete sich ein sehr dünner Lysin-Film auf dem Deckglas, der sehr gute Klebeeigenschaften hatte. Nun erfolgte die Präparation der Embryonen. Dazu wurden Embryonen im St.17 für die nachfolgende Dil-Markierung wie folgt präpariert: Die beiden Agarblöckchen wurden in einem Abstand von ca. 1 cm nebeneinander auf den Objektträger gelegt. Auf die Agarblöckchen wurde nun das mit Klebestreifen beklebte Deckglas aufgelegt und die Embryonen mit Hilfe einer Präpariernadel vom Agar auf den Klebestreifen überführt. Nach kurzem Warten (circa 3 min.), damit die Chorion-Hülle der Embryonen etwas antrocknete, konnten die Embryonen durch vorsichtiges Anstupsen mit der Präpariernadel dechorionisiert werden. Die dechorionisierten Embryonen wurden bis zur weiteren Präparation auf einem der zurechtgeschnittenen Agarblöckchen mit der Ventralseite nach oben aufbewahrt (verhinderte Austrocknung). Auf das mit getrocknetem Heptankleber beschichtete Deckglas (1 Tropfen Heptankleber auf Deckglas geben, mit einem kleinen Deckglas sehr dünn ausstreichen und mindestens 10 min. antrocknen lassen) wurde nun das Rähmchen aufgeklebt, welches als Abgrenzung für das später aufzutragende PBS und das Fixativ diente. Das mit dem Kleber beschichtete Deckglas wurde auf die mit der Ventralseite nach oben liegenden dechorionisierten Embryonen vorsichtig aufgedrückt, wodurch sie vom Agarblock auf das Deckglas übertragen wurden. Zur besseren Handhabung wurde das Deckglas auf einen Objektträger gelegt. Im Anschluss wurden die Embryonen mit einigen Tropfen PBS überschichtet und aufpräpariert. Dies geschah indem die Embryonen zunächst mit einer Glaspräpariernadel aus der Vitellinhülle entfernt und danach mit Hilfe zweier Pinzetten aufpräpariert wurden. Hierzu wurde der Embryo mit einer Pinzette am rostralen Ende und mit der anderen Pinzette am mittleren/posterioren Bereich gepackt. Durch Auseinanderziehen der Pinzetten riss der Embryo auf und das ZNS nebst anderer Organe wurde freigelegt. Das ZNS wurde soweit wie möglich von Gewebefetzen befreit und danach mit dem VNS auf

dem Heptankleber des Deckglases festgeklebt. Nachdem alle Embryonen auf die eben beschriebene Weise in PBS präpariert worden waren, wurden sie für circa 15 min. fixiert, anschließend 3-4x mit PBS gespült und nachfolgend mit einigen Tropfen PBS überschichtet. Danach wurden die Embryonen auf das mit Lysin-beschichtete Deckglas überführt. Dazu wurde das Lysin mit einigen Tropfen PBS überschichtet, so dass das Rähmchen vollständig ausgefüllt war. Die fixierten Nervensysteme wurden nun mit Hilfe einer Glaspräpariernadel vom Heptankleber gelöst und danach mit Hilfe derselben in das PBS des Lysin-Deckgläschens überführt. Für die nachfolgende Markierung wurden die Nervensysteme mit der Ventralseite der Hemisphären (bezogen auf die Neuralachse) auf das Lysin aufgeklebt. Es musste darauf geachtet werden, dass der Bereich der Hemisphären in dem die Pilzkörper liegen (anterior in Neuralachse) in die Richtung zeigte, die dem Mikromanipulator mit der Injektionskapillare (siehe 2.12.3.2) zugewandt lag.

2.12.2 Präparation und Fixierung der L1-Larven

Material

- Binokular
- Objektträger
- 60x24mm Deckgläschen
- aus Klebefolie
- zurechtgeschnittene Rähmchen (ca. 2x2 cm)
- PBS
- Fixativ: Formaldehyd (37%)/PBS [2:10]
- Glaspräpariernadeln
- Stahlpräpariernadel
- Lysin-Aqua.Dest Lsg. [1:7]
- Pasteurpipetten

Methode

Zunächst wurde ein Rähmchen aus Klebefolie auf einen Objektträger geklebt und anschließend mit PBS gefüllt. Die L1-Larven wurden mittels einer Stahlpräpariernadel vom Agar in das PBS überführt und danach mit Hilfe zweier Pinzetten wie im Abschnitt 2.12.1 für St.17 Embryonen beschrieben aufpräpariert. Die freipräparierten Nervensysteme wurden danach mit Hilfe einer Glaspräpariernadel in einen weiteren identisch präparierten Objektträger überführt und mit dem VNS aufgeklebt (wurde das ZNS sauber präpariert, klebte das VNS recht gut auf dem Glas und ließ sich auch wieder leicht ablösen). Nachdem alle Nervensysteme auf die beschriebene Weise präpariert und transferiert worden waren, erfolgte eine Fixierung für 15 Minuten. Nach der Fixierung wurde das Fixativ wieder abgesaugt und es wurde 3-4x mit PBS gespült. Danach wurden die

Nervensysteme mit PBS überschichtet und auf ein mit Lysin-beschichtetes Deckgläschen überführt (siehe 2.12.1).

2.12.3 Einzelzellmarkierungen an fixierten Nervensystemen

Material

- Fluoreszenzmikroskop mit 50 Watt Hg-Lampe, 50er Wasserimmersionsobjektiv und Rhodaminfilter
- Mikromanipulator
- Iontophoreseapparatur
- 1 kleines Reaktionsgefäß (200 µl)
- eine über dem Bunsenbrenner sehr dünn ausgezogene Pasteurpipette
- Injektionskapillaren (GB100 TF 8P)
- CM-Dil/Ethanol-Lsg [1mg/ml]
- Klebeband
- Pipette
- LiCl-Lösung
- PBS
- Fixativ: Formaldehyd (37%)/PBS [2:10]
- feuchte Kammer
- Präpariernadel

Methode

2.12.3.1 Befüllen der Kapillare

Nach dem Ziehen der Kapillare mit dem Kapillarenpuller (Einstellungen: Pressure (P): 250; HEAT: 492; PULL: 255; Velocity (VEL): 80; TIME: 200) wurde ein kleines Reaktionsgefäß, dessen Deckel mit einer Präpariernadel durchstoßen wurde, mit ein wenig Dil befüllt (circa 40 µl). Danach wurde die Kapillare mit ihrem stumpfen Ende durch das Loch im Deckel in das Dil eingetaucht, bis sich die Spitze der Kapillare mit Dil gefüllt hatte (1-2 min.). Das Loch im Deckel des Reaktionsgefäßes wurde nach dem Befüllen der Kapillare abgedeckt um Verdunstung zu vermeiden. Nach Befüllung wurde in das untere Ende der Kapillare, mit Hilfe der sehr dünn ausgezogenen Pasteurpipette LiCl-Lösung injiziert. Das Ende der Kapillare musste soweit gefüllt sein, dass die im Folgenden eingeführte Elektrode der Iontophoreseapparatur Kontakt mit der Lösung hatte.

2.12.3.2 Injektion von Dil und Nachfixierung der Präparate

Die Präparate wurden unter das Mikroskop gelegt und eine der Elektroden der Iontophoreseapparatur wurde in das die präparate überschichtende PBS (siehe 2.12.1, 2.12.2) eingetaucht und mit Klebeband fixiert. Die andere Elektrode wurde in das mit LiCl-Lösung befüllte Ende der Kapillare eingeführt und diese dann in den Mikromanipulator eingespannt. Unter Fluoreszenzlicht wurden die OK107>CD8::GFP exprimierenden

Pilzkörper lokalisiert und die Kapillare in einen der Zellkörper eingestochen. Die Markierung mit CM-Dil erfolgte danach unter Sichtkontrolle am Mikroskop durch Erhöhung der Spannung von -1nV auf +20nV (Eject-Schalter) für bis zu einer Minute (Anmerkung: Damit es nach Erhöhung der Spannung tatsächlich zu einer CM-Dil Abgabe kam musste der "Overrange" Knopf der Iontophoreseapparatur leuchten. Genauso musste, um die Abgabe von CM-Dil nach Erniedrigung der Spannung zu stoppen, der "Overrange" Knopf aufhören zu leuchten). Nach Markierung aller Präparate wurde für 15 min. fixiert. Nach Fixierung wurde 3x mit PBS gespült und die Präparate wurden bis zur Dokumentation am konfokalen Mikroskop in einer feuchten Kammer unter PBS bei 4°C aufbewahrt.

2.13 Dil-Markierung von NE-Zellen zwecks Darstellung von Zellklonen

2.13.1 Präparation der frühen Embryonen

Material

- Binokular
- Skalpell
- mit doppelseitigem Klebeband beklebtes, kleines Deckglas (22x22mm)
- Objektträger
- Voltalef-Öl 10S
- feuchte Kammer
- 2 zurechtgeschnittene Agarblöckchen
- 1 großes (60x24mm), sehr dünn mit Heptankleber beschichtetes, Deckglas
- aus Klebefolie zurechtgeschnittene Rähmchen

Methode

Die Embryonen wurden zunächst wie unter 2.12.1 beschrieben mechanisch dechorionisiert und mit der Dorsalseite nach oben auf dem vorbereiteten Agarblöckchen aufgereiht. Danach erfolgte der Transfer auf das mit Heptankleber beschichtete Deckglas. Hierzu wurde das Deckglas auf jeden Embryo einzeln vorsichtig aufgedrückt, so dass dieser mit seinem dorsolateralen cephalen Bereich aufklebte (ermöglichte bestmögliche Sicht auf dorsale Mittellinie und δB , was eine Markierung von δB Zellen erst ermöglichte). Damit jedes Ei einzeln aufgeklebt werden konnte, musste der Bereich des Agarblöckchens, auf dem sie lagen, mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten werden. Nachdem alle Embryonen derart aufgeklebt worden waren mussten sie noch antrocknen, um eine Penetration der Vittelinmembran bei der nachfolgenden Markierung zu

ermöglichen. Die optimale Trocknung war erreicht, wenn unter dem Binokular die Lichtreflektion einer Kaltlichtlampe auf der Vitellinmembran der Eier nicht mehr glatt sondern etwas gekräuselt erschien (ca. 2-8 min. stark abhängig von Temperatur und Luftfeuchtigkeit). War dieser Trocknungsgrad erreicht, wurden die Embryonen mit Voltaleföl überschichtet und bis zur Markierung in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

2.13.2 Herstellung der Fluoreszenzfarbstoff/Öl Lösung

Die fluoreszenten, lipophilen Farbstoffe wurden mit handelsüblichem Pflanzenöl (z.B Rapsöl) in den Konzentrationen Dil [5mg/ml], CM-Dil [3mg/ml], DiD [10mg/ml] gemischt und im Dunkeln bei RT für 3-5 Stunden langsam geschüttelt (ca. 200 rpm). Nach Aliquotierung konnten die Fluoreszenzfarbstoff/Öl Lösungen eingefroren (-20°C) und über Jahre hinweg verwendet werden.

2.13.3 Schleifen der Kapillaren

Material

- Kapillarschleifer mit Binokular
- ausgezogene Kapillaren (Hilgenberg normal Meterware)
- Injektionsspritze (10ml) mit Injektionsschlauch
- Aqua Dest.
- große Petrischale mit einem Streifen Knetgummi (dient der staubfreien Aufbewahrung der Injektionsnadeln)
- Färbeschälchen
- Kapillarenpuller

Methode

Die auf dem Kapillarenpuller ausgezogenen Kapillaren (Einstellungen: Pressure (P): 250; HEAT: 492; PULL: 95; Velocity (VEL): 80; TIME: 200) wurden in die dafür vorgesehene Einrichtung am Kapillarschleifer eingespannt (Winkel: 25-30°). Die Schleifscheibe des Kapillarschleifers wurde in Rotation versetzt und stetig aus dem dafür vorgesehenen Schlauch mit Aqua Dest. befeuchtet. Nun wurde die eingespannte Kapillare unter Sichtkontrolle (Binokular) langsam auf die rotierende Schleifscheibe abgesenkt, bis die Spitze der Kapillare die Schleifscheibe berührte. Sobald die Spitze der Kapillare angeschliffen wurde, erkannte man dies daran, dass etwas Aqua Dest. in die Kapillarenspitze gelangte. Um die Größe der geschliffenen Öffnung zu beurteilen, wurde die Kapillare am Ende des mit der Injektionsspritze verbundenen Injektionsschlauches

befestigt und danach in Aqua Dest., das in ein Färbeschälchen gefüllt wurde, ausgeblasen. Wenn die Luftblasen bei guter Beleuchtung gerade noch erkennbar waren, war die Kapillare für eine Injektion geeignet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kapillaren zum Schutz vor Staub in einer verschlossenen Petrischale auf einem Streifen Knetgummi aufbewahrt.

2.13.4 Befüllen der Kapillaren

Material

- geschliffene Injektionskapillaren (Hilgenberg normal)
- Injektionspritze (5ml) mit Injektionsschlauch
- DiI/Öl oder CM-DiI/Öl oder DiD/Öl
- Mikromanipulator
- Pipette (10 μ l)
- inverses Mikroskop mit Halogenlampe
- großes Deckglas (60x24mm)

Methode

Für die Markierungen einzelner NE-Zellen wurde, wenn möglich, CM-DiI/Öl Lösung verwendet, da sich herausstellte, dass dieser lipophile Fluoreszenzfarbstoff die stärkste Fluoreszenz aufweist. Auf ein großes Deckglas wurde ein winziger Tropfen CM-DiI/Öl Lösung (1 μ l) gegeben und unter dem Mikroskop platziert. Die Injektionskapillare (verbunden mit Injektionsschlauch und Injektionspritze) wurde in den Mikromanipulator eingespannt und unter Sichtkontrolle am Mikroskop, mit ihrer Spitze in den CM-DiI/Öl Tropfen abgesenkt. Durch Ziehen am Spritzenkolben wurde etwas Lösung in die Kapillarenspitze gesaugt. Die CM-DiI/Öl Lösung wurde bis zur nächsten Befüllung dunkel und staubfrei gelagert (maximal einen Tag).

2.13.5 Markierung einer NE-Zelle und Bestimmung ihrer Position

Material

- befüllte Injektionskapillare
- Injektionsspritze mit Injektionsschlauch
- Mikromanipulator
- inverses Mikroskop mit Halogenlampe und Rhodaminfilter

Methode

Nach dem Befüllen der Kapillare (siehe 2.13.4) wurde das Deckgläschen mit den Voltalef-Öl überschichteten Embryonen (siehe 2.13.1) unter das Mikroskop gelegt. Für die Markierung, Positionsbestimmung und die Bestimmung des optimalen Markierungszeitpunktes wurde eine 625-Fache Vergrößerung verwendet (50er Ölimmersionsobjektiv x 12,5facher Okularvergrößerung). Die Markierungen wurden in einem klimatisierten Raum (19-20°C) durchgeführt. Durch die Verlangsamung der Entwicklung bei diesen Temperaturen wurde das Zeitfenster, in dem eine Markierung des Embryos erfolgen konnte, auf ca. 8-10 Minuten verlängert. Sobald einer der Embryonen das optimale Stadium für eine Injektion erreicht hatte (spätes St.7, wenn δ B-Zellen und dorsale Mittellinie bedingt durch die Mitosen der Zellen in angrenzenden mitotischen Domänen erkennbar waren), wurde die Kapillare, mit Hilfe des Mikromanipulators, an die für die Markierung bestimmte Zelle hingesteuert (welche zuvor durch Auszählen der Zellzahlen ausgehend von der dorsalen Mittellinie bestimmt wurde). Um die Vittelinmembran zu penetrieren, wurde danach der Kreuztisch des Mikroskops langsam auf die Kapillarenspitze zubewegt, bis diese die Vittelinmembran durchstieß. Nun konnte durch vorsichtiges Drücken des Spritzenkolbens ein winziger Tropfen Dil/Öl-Lösung (Durchmesser ca. 2 μ m) abgegeben werden (Durchmesser einer NE-Zelle ca. 5-6 μ m). Nach der so erfolgten Markierung und dem Herausziehen der Kapillare aus dem Embryo wurde unter Fluoreszenzlicht die Markierung kontrolliert und nun wiederum unter Durchlicht die Anzahl der Zellreihen von der markierten Zelle bis zu dorsalen Mittellinie bestimmt. Auf diese Weise erfolgte die Bestimmung der dorsoventralen Position der markierten Zelle in Bezug zur dorsalen Mittellinie. Die anteroposteriore Position konnte anhand der Lage der markierten Zelle eher angrenzend an δ 1 (= anterior) oder eher angrenzend an δ 5 (= posterior) bestimmt werden.

2.13.6 Kontrolle des Zellverhaltens

Im Allgemeinen erfolgte 1 Stunde nach Markierung der NE-Zelle (bei einer RT von 19-20°C entspricht dies dem späten St. 8/frühen St.9) eine Kontrolle über das Verhalten der markierten Zelle. Unter dem Mikroskop unter dem auch die Markierungen durchgeführt worden waren, wurde das Zellverhalten unter Fluoreszenzlicht (Halogenlampe) kontrolliert (625-fache Vergrößerung). Dabei wurde darauf geachtet, ob die Zelle keine Mitose begangen hatte (letztendliches Kriterium für die Markierung einer δ B Zelle) und ob die Zelle delaminiert war und sich somit zu einem frühen NB entwickelt hatte (siehe (Urbach et al., 2003)).

2.13.7 Entwicklung der Embryonen nach Dil-Markierung

Material

- feuchte Kammer

Methode

Nachdem alle Embryonen auf die oben beschriebene Weise markiert worden waren (siehe 2.13.5), wurden sie für ihre weitere Entwicklung in einer feuchten Kammer über Nacht bei 18°C, 22°C, oder 25°C aufbewahrt und am nächsten Tag aufpräpariert, wenn sie das gewünschte Stadium erreicht hatten (für St.17 siehe 2.13.8; für Stadium früh L1 siehe 2.13.9).

2.13.8 Präparation der St.17 Embryonen

Material

- Binokular
- Heptan
- Pinzetten
- Glaspräpariernadeln
- Objektträger
- Mikroskop (mit Halogenlampe)
- kleine Färbeschälchen
- Deckgläschen (60x24mm) mit Heptankleber beschichtet und mit Rähmchen aus Klebefolie beklebt
- Fixativ: Formaldehyd (37%)/PBS [2:10]
- PBS
- Glasschneider

Methode

Zuerst wurden die Embryonen am Mikroskop auf Entwicklung eines Zellstammbaumes hin überprüft. Die Überprüfung fand dabei nur mit einer Halogenlampe als Lichtquelle statt, da die Lichtintensität stärkerer Lichtquellen (z.B. Hg-Lampe) zu Apoptose der markierten Zellen führte. Als nächstes musste das die Embryonen überschichtende Voltalef-Öl entfernt werden. Dazu wurde mit einem Glasschneider das Deckgläschen so zurechtgeschnitten, dass nur noch das Stück des Deckgläschens übrigblieb, welches den Klebefolienrahmen und die darin enthaltenen Embryonen trug. Dieses Stück wurde hochkant in ein kleines Färbeschälchen gestellt, sodass ein Großteil des Voltaleföls von den Embryonen ablaufen konnte. Danach wurde das Deckglasstück in ein weiteres Färbeschälchen gelegt und sehr kurz mit Heptan überschichtet (ca. 1 ml Heptan für 3-5 Sekunden) und dabei leicht geschwenkt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Heptan nicht den Heptankleber und damit die Embryonen ablöste. Nun wurde das Heptan/Voltalefölgemisch abgezogen und es wurde gewartet bis die vorhandenen Heptanreste vollständig verdunstet waren (optische Kontrolle Binokular), bevor die Embryonen mit PBS überschichtet wurden. Die Embryonen wurden mit einer Glaspräpariernadel von posterior nach anterior durchstoßen und durch Anheben der Nadel aus der Vitellinhülle gehoben. Danach wurden sie auf ein mit Heptankleber präpariertes und mit PBS überschichtetes Deckgläschen mit Rahmen überführt. Nach der Überführung wurden die Nervensysteme mit Hilfe zweier Pinzetten herauspräpariert und fixiert (wie unter 2.12.1 beschrieben). Bis zur Dokumentation (siehe 2.14) oder Photokonversion (siehe 2.17) wurden die Nervensysteme in einer feuchten Kammer im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

2.13.9 Präparation der L1-Larven

Material

- Stahlpräpariernadel
- Binokular
- Pinzetten
- Glaspräpariernadeln
- Deckgläschen (60x24mm) mit Rähmchen aus Klebefolie beklebt
- Fixativ: Formaldehyd (37%)/PBS [2:10]
- PBS
- Objektträger
- Mikroskop (mit Halogenlampe)
- Pasteurpipetten

Methode

Zunächst wurden die Präparate am Mikroskop (mit Halogenlampe siehe 2.13.8) auf die Entwicklung eines markierten Zellstammbaumes hin überprüft. Diese Überprüfung fand noch vor dem Schlupf der Larven statt, da Larven nach ihrem Schlüpfen auf dem Deckgläschen herumwandern und eine Zuordnung der Larven zu ihren Markierungsdaten (NE-Position der Zelle, Delamination, Mitose siehe 2.13.5 und 2.13.6) eventuell unmöglich wird. Die späten Embryonen, die einen markierten ZSB enthielten, wurden sofort nach ihrem Schlüpfen mit Hilfe einer Stahlpräpariernadel aus dem Voltaleföhl herausgehoben und vereinzelt. Dies ermöglichte eine Zuordnung zu ihren Markierungsdaten. Die Präparation, Fixierung, das Spülen und Waschen fand wie unter 2.12.2 beschrieben statt. Die Nervensysteme wurde danach jedoch nicht auf ein Lysin-beschichtetes Deckglas aufgeklebt (siehe 2.12.2), sondern sie wurden bis zur Dokumentation (siehe 2.14) in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt.

2.14 Dokumentation von Dil Markierten Präparaten am konfokalen Mikroskop

Material

- Nagellack
- PBS
- Deckgläschen (60x24mm) mit Rähmchen aus Klebefolie beklebt
- Objektträger
- Binokular
- Objektträger
- Pasteurpipetten
- Deckgläschen (22x22mm)
- Glaspräpariernadeln

Methode

Wichtig bei der Dokumentation der Dil markierten ZSBe am konfokalen Mikroskop war, dass man zum Einbetten der Präparate PBS, aber keinesfalls das sonst übliche Glycerol verwendete, da sich die lipophilen Farbstoffe in Glycerol lösten. Da eine Einbettung also nur in dem wässrigen PBS erfolgen konnte, musste wegen der Gefahr der Verdunstung des PBS, jedes Präparat nur einzeln und erst unmittelbar vor der Aufnahme am Mikroskop vorbereitet werden. Hierzu wurde ein mit einem Klebefolienrähmchen beklebtes Deckgläschen mit Hilfe zweier Beschriftungsaufkleber auf einen Objektträger fixiert und mit PBS befüllt. Danach wurde eines der fixierten Nervensysteme (siehe 2.13.8, 2.13.9) mit Hilfe einer Glaspräpariernadel in das PBS transferiert und mit der Ventralseite des VNS aufgeklebt. Nun wurde sehr vorsichtig, um ein Ablösen des Präparats vom Deckglas zu vermeiden, ein 22x22mm Deckglas auf das Klebefolienrähmchen gelegt. Durch Verschieben des aufgelegten Deckglases konnten nun die Gehirnhemisphären, die in leichtem Kontakt zu diesem standen, in die für eine Aufnahme bestmögliche Position gebracht werden. Danach wurde das Deckglas an seinen vier Ecken jeweils mit einem kleinen Tropfen Nagellack auf dem darunter liegenden, großen Deckglas fixiert und das Präparat unverzüglich am konfokalen Mikroskop dokumentiert.

2.15 Ablationen

2.15.1 Schleifen der Kapillare

Material

Siehe 2.13.3 "Schleifen der Kapillaren"

Methode

Die Kapillaren wurden am Kapillarenpuller gezogen (Einstellungen: Pressure (P): 500; HEAT: 477; PULL: 95; Velocity (VEL): 80; TIME: 200) und wie zuvor unter 2.13.3 beschrieben angeschliffen. Der Durchmesser der Öffnung nach dem Schleifen betrug ca. 2 μm .

2.15.2 Ablation von Dil markierten NBen bzw. ihrer Nachkommenzellen

Material

Gleiches Setup wie unter 2.13.5 angegeben.

Methode

Für die Ablation wurden Embryonen verwendet, die zuvor wie unter 2.13.5 beschrieben einer Dil-Markierung unterzogen worden waren und die sich, wie unter 2.13.7 beschrieben, bis ins gewünschte Stadium entwickelt hatten. Die eigentliche Ablation lief wie folgt ab: Zunächst wurde die Ablationskapillare am Injektionsschlauch befestigt, in den Mikromanipulator eingespannt und in das, die Embryonen umgebende, Voltaleföl eingesenkt. Nun wurde unter Fluoreszenzlicht (Lichtquelle: Halogenlampe) die zu ablatierende Zelle ausgesucht und die Kapillare wurde mit Hilfe des Mikromanipulators an den Embryo herangesteuert ohne die Vitellinmembran jedoch zu penetrieren (das Navigieren der Kapillare erfolgte unter Durchlicht). Für die eigentliche Ablation war es hilfreich neben dem Fluoreszenzlicht auch das Durchlicht anzuschalten, allerdings bei sehr schwacher Intensität, damit das Fluoreszenzsignal nicht überdeckt wird. Dies hatte den Vorteil, dass man sowohl das Fluoreszenzsignal der zu ablatierenden Zelle(n) sehen konnte, gleichzeitig aber auch die Kapillarenspitze und das Gewebe des Embryos sichtbar war. Unter der genannten Kombination von Fluoreszenz- und Durchlicht wurde nun die

Vitellinmembran durchstoßen. Dies geschah, in dem man den Kreuztisch des Mikroskops langsam auf die Kapillarenspitze zubewegt, bis diese die Vitellinmembran penetrierte. War die Kapillarenspitze im Inneren des Embryos musste sie nun bis zu der/den für die Ablation bestimmten Zelle(n) hingesteuert werden. Dies geschah wiederum durch sehr vorsichtiges Bewegen des Kreuztisches bzw. durch sehr vorsichtiges Justieren der Kapillarenposition mit Hilfe des Mikromanipulators (war angebracht wenn die z-Position der Kapillare verändert werden musste). Hatte die Kapillarenspitze die zu ablatierende Zelle erreicht, konnte(n) die Zelle(n) durch vorsichtiges Ziehen am Kolben der Injektionsspritze abgesaugt werden. Das Absaugen erfolgte ohne Durchlicht, nur mit Fluoreszenzlicht. Die ablatierten Embryonen wurden, bis sie das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht hatten, wie unter 2.13.7 beschrieben aufbewahrt. Im Anschluß wurden sie aufpräpariert, fixiert (siehe 2.12.1) und dokumentiert (siehe 2.14).

2.16 4D-Mikroskopie

2.16.1 DIC 4D-Mikroskopie

Material

Für die Präparation wurden die gleichen Materialien verwendet wie unter 2.13.1. angegeben. Zusätzlich wurde jedoch noch ein mit Abstandshaltern versehener Objektträger benötigt. Hierzu wurden mit einem Glasschneider aus einem Objektträger zwei quadratische Stücke ausgeschnitten (ca. 2x2 cm) und im Abstand von ca. 2 cm auf einen weiteren Objektträger geklebt. Dieser Objektträger diente dann als Auflage für die, auf das große Deckglas geklebten und mit Voltaleföl überschichteten, Embryonen (siehe Methode).

Methode

Die Präparation und das Aufkleben der Embryonen erfolgt wie unter 2.13.1 angegeben. Im Falle von 4D-mikroskopischen Aufnahmen der $\delta 24$ wurde die posteriore, ventrolaterale Region des procephalen Bereichs aufgeklebt, was eine optimale Sicht auf ventrale und cephalo Furche sowie $\delta 24$ und die angrenzenden mitotischen Domänen ermöglichte. Nach dem Aufkleben und der Überschichtung der Embryonen mit Voltaleföl, wurden diese bis zu ihrer Aufnahme in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Für die Aufnahme wurde das

große Deckglas mit den Embryonen auf den Objektträger mit den Abstandshaltern aufgelegt und zwar in der Weise, dass die Seite mit dem Voltalefölnach unten zeigte. Hatten die Embryonen St.7 erreicht (cephale Furche war bereits ausgebildet, es waren jedoch noch keine mitotischen Domänen ansprechbar) wurde das gewünschte Präparat fokussiert und die Aufnahme wurde gestartet. Die Aufnahmen wurden mit einem 63er Ölimmersionsobjektiv und Normarski Optik durchgeführt. Der Zeitraum zwischen der Aufnahme der einzelnen Bildstapel betrug 20 Sekunden. Der Abstand zwischen den einzelnen Bildern eines Bildstapels betrug 1 μ m. Der Zeitraum der Gesamtaufnahme betrug, von Präparat zu Präparat variierend, ca. 2 Stunden.

2.16.2 Fluoreszenz 4D-Mikroskopie

Material

Material für die Präparation (siehe 2.16.1)

Methode

Der Ablauf war mit dem in 2.16.1 beschriebenen identisch. Für die fluoreszente 4D-Mikroskopie von ubi-GFPnls Embryonen wurde jedoch ein konfokales Mikroskop verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 40er Ölimmersionsobjektiv, wobei die jeweilige aufzunehmende Region durch Einstellen des digitalen Zooms vergrößert wurde. Der Zeitraum zwischen der Aufnahme der einzelnen Bildstapel betrug, von Präparat zu Präparat variierend, 40-70 Sekunden. Der Abstand zwischen den einzelnen Bildern eines Bildstapels betrug 1 μ m. Der Zeitraum der Gesamtaufnahme betrug ca. 1,2 Stunden.

2.16.3 Auswertung der 4D-Aufnahmen

Material

- Simi Biocell Software

Methode

Die 4D-mikroskopischen Aufnahmen (DIC und konfokal) wurden mit Hilfe der Simi Biocell Software ausgewertet. Jede Zelle wurde dabei mit Hilfe der Software individuell markiert und über den gesamten Zeitraum der Aufnahme hinweg verfolgt. Auf diese Weise ergab sich ein vollständiges Bild über Zellbewegungen und Zellverhalten (Mitosen, Delamination), wodurch die mitotischen Domänen angesprochen und charakterisiert werden konnten.

2.17 Photokonversion Dil markierter Präparate

Material

- inverses Mikroskop (Objektiv 50er Öl) mit 100Watt Hg-Lampe und Rhodaminfilter
- DAB-Lösung
- Fixativ: Formaldehyd (37%)/PBS [2:10]
- PBS
- Glycerin (70%)
- große Deckgläser (60x24 mm)
- Klebefolie
- 1 Binokular
- Glaspräpariernadeln
- Handzentrifuge
- Pasteurpipetten
- Pipetten

Methode

Die Embryonen wurden zuvor wie unter 2.13.8 beschrieben präpariert. Aus der Klebefolie wurden kleine Rähmchen, entsprechend der Anzahl der Präparate, zurechtgeschnitten und auf eine entsprechende Anzahl von großen Deckgläsern geklebt. In ein Rähmchen wurde PBS gegeben und ein Präparat mit Hilfe einer Glaspräpariernadel in das PBS überführt. Danach wurde der PBS-Tropfen gegen einen Tropfen DAB-Lösung, die zuvor kurz abzentrifugiert wurde, ausgetauscht. Das mit DAB-Lösung überschichtete Präparat wurde nun unter optischer Kontrolle unter dem Mikroskop bei eingeschalteter Hg-Lampe und Rhodaminfilter unter einem 50er Ölobjektiv für ca. 10-20 min photokonvertiert, bis sich anstelle der Fluoreszenzmarkierung eine satte Braunfärbung erkennen ließ. Im Anschluss an die Photokonversion wurde die DAB-Lösung wieder abgezogen, es wurde 3-4x mit PBS gespült und für circa 12 min. fixiert. Danach wurde erneut 3-4x mit PBS gespült, ein Tropfen PBS über dem Präparat belassen und das Präparat mit Hilfe einer

Glaspräpariernadel in einen circa 22-23 μ l großen Glycerintropfen auf einem großen Deckglas überführt. Nun wurde vorsichtig ein kleines Deckglas aufgelegt und überschüssiges Glycerin mit etwas Zellstoff abgesaugt. Die vier Ecken des kleinen Deckglases wurden jeweils durch einen Tropfen Nagellack mit dem darunter liegenden großen Deckglas verbunden. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden auch die Seiten mit Nagellack versiegelt.

2.17.1 Dokumentation der Präparate

Material

- Mikroskop mit angeschlossenem Computer
- AxioVision4 (Aufnahmesoftware)
- Quicktimeplayer (Filmsoftware)

Methode

Die photokonvertierten Präparate wurden unter einem 63er Ölobjectiv und Nomarski Optik abgefilmt. Mit Hilfe der Aufnahmesoftware wurden von den Präparaten Einzelbilder in dorsoventraler Richtung im Abstand von 1 μ m aufgenommen und im TIF-Format als Bildstapel gespeichert. Start und Endpunkt der Aufnahme wurden so gewählt, dass die Aufnahme die gesamte dorsoventrale Ausdehnung der Hemisphären beinhaltet. Die einzelnen Bilder der Bildstapel konnten danach mit Hilfe des QuickTime Players zu einem Film zusammengefügt und analysiert werden.

2.18 Amira Rekonstruktionen

Die ZSBe wurden unter Verwendung der am konfokalen Mikroskop angefertigten Bildstapel mit Hilfe der Amira 4.0 Software rekonstruiert. In der Amira Software wurden dazu eine Kombination der Funktionen "Treshold" und manuelles markieren verwendet. "GFP-Kanal" und "CM-Dil-Kanal" der konfokalen Aufnahme wurden getrennt voneinander rekonstruiert.

2.19 Bestimmung von Zellzahlen mit Hilfe der Amira Software

Zur Bestimmung von großen Zellzahlen wurde in der Amira Software für jeden "Zelltyp" ein Set von "Landmarks" erstellt. Anschließend konnte jede Zelle individuell markiert werden. Dies verhinderte ein versehentliches mehrmaliges Auszählen derselben Zelle, so wie ein eventuelles Übersehen auszuwertender Zellen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von mitotischen Domänen mittels 4D-Mikroskopie

3.1.1 Charakterisierung der δB

δB ist eine der mitotischen Domänen, die zum procephalen NE gehören (Robertson et al., 2003; Urbach et al., 2003) und eine der beiden mitotischen Domänen des *Drosophila* Embryos, in denen keine Mitosen stattfinden (Foe, 1989; Urbach et al., 2003). Dieses Fehlen von Mitosen in δB grenzt diese deutlich von ihren angrenzenden mitotischen Domänen ab ($\delta 1$, $\delta 5$, $\delta 9$, $\delta 18$, $\delta 20$; siehe Abb. 2 A) und bietet somit die Möglichkeit NE-Zellen in δB zweifelsfrei zu identifizieren. Die gute Ansprechbarkeit der δB NE-Zellen und ihre experimentell relativ gute Zugänglichkeit machte δB zu einer attraktiven Domäne für eine Zellstammbaumanalyse mittels der Dil-Technik (Bossing and Technau, 1994). Eine Voraussetzung für eine solche Analyse war eine genaue Kenntnis von Lage, Zellzahl und Anordnung der δB Zellen. Des Weiteren mussten geeignete morphologische Landmarken gefunden werden, die bei der Markierung einer Zelle als Orientierungs- und Referenzpunkte dienen konnten. Durch solche Landmarken wurde das reproduzierbare Markieren von Zellen und die Bestimmung ihrer Lage innerhalb der δB ermöglicht. Ein geeignetes Mittel, um die eben genannten Punkte zu klären, stellte die 4D-Mikroskopie dar. Für die Aufnahmen am konfokalen Laserscan-Mikroskop wurden zunächst ubi-GFPnls *Drosophila* Embryonen verwendet, die bereits in frühen Embryonalstadien noch vor der Zellularisierung eine deutliche GFP-Expression in allen Zellkernen des Embryos aufweisen (eigene Beobachtung). Der Mitose-Eintritt einer Zelle resultiert in einer starken Abnahme der GFP-Fluoreszenzintensität (bedingt durch Zerfall der Kernmembran und der daraus resultierenden Verteilung des GFP in der gesamten Zelle). Um mögliche Fehlentwicklungen auszuschließen, wurden von den 4D-Aufnahmen diejenigen für eine Analyse der δB ausgewählt, bei denen der dokumentierte Embryo bis zum Schlupf überlebte (n=5). Diese Aufnahmen ermöglichten eine genaue zeitliche und räumliche

Analyse des Auftretens der an δB angrenzenden mitotischen Domänen und somit, durch das Charakteristikum des "nicht-mitotischen" Verhaltens der δB Zellen, auch eine Analyse derselben (Abb. 6 A). Die Auswertung der Aufnahmen zeigte, dass δB aus 41 ± 5 Zellen besteht, die sich, direkt angrenzend an die dorsale Mittellinie, 18 Zellreihen in dorsoventraler Ausdehnung erstrecken, wobei δB im ventralen Drittel etwas nach anterior gebogen ist. Die anteroposteriore Ausdehnung der δB beträgt im dorsalsten Bereich 1-2 Zellen, im mittleren Bereich 3 Zellen und im ventralen Drittel wiederum 1-2 Zellen (Abb. 6 B). Anhand dieser Analyse wurde ein Schema der δB erstellt, welches genutzt wurde, um die dorsoventrale und anteroposteriore Position von Dil markierten NE-Zellen festzuhalten (Abb. 6 B'). Als Referenz/Orientierungspunkt stellte sich die dorsale Mittellinie als geeignet heraus, da sie aufgrund der jeweils bilateral-symmetrischen Entstehung von $\delta 1$ und $\delta 5$ auf beiden Seiten des Embryos sehr gut zu erkennen ist (Abb. 6 B). In einer zweiten Reihe von 4D-Mikroskopaufnahmen an WT Embryonen unter Nomarski-Optik konnte außerdem die Grenze zwischen $\delta 1$ und $\delta 9$ ermittelt werden. Die Zellen dieser beiden Domänen lassen sich anhand ihres unterschiedlichen Mitoseverhaltens unterscheiden. $\delta 1$ Zellen teilen sich parallel zur Oberfläche, wohingegen sich $\delta 9$ Zellen senkrecht zur Oberfläche teilen (Foe, 1989; Urbach et al., 2003). In den 4D-mikroskopischen Aufnahmen konnte dieses unterschiedliche Mitoseverhalten analysiert werden, wodurch sich herausstellte, dass die Grenze zwischen $\delta 1$ und $\delta 9$ an dorsoventral-Position 14/15 verläuft (Abb. 6 B'). Der Verlauf dieser Grenze bestätigte sich auch durch die Kontrolle des Teilungsverhaltens von Dil-markierten NE-Zellen (siehe 2.13.6, 3.3.4). Durch ihre Bestimmung konnten auch Markierungen, die außerhalb der δB erfolgten, einer der mitotischen Domänen ($\delta 1$ bzw. $\delta 9$) zugeordnet werden.

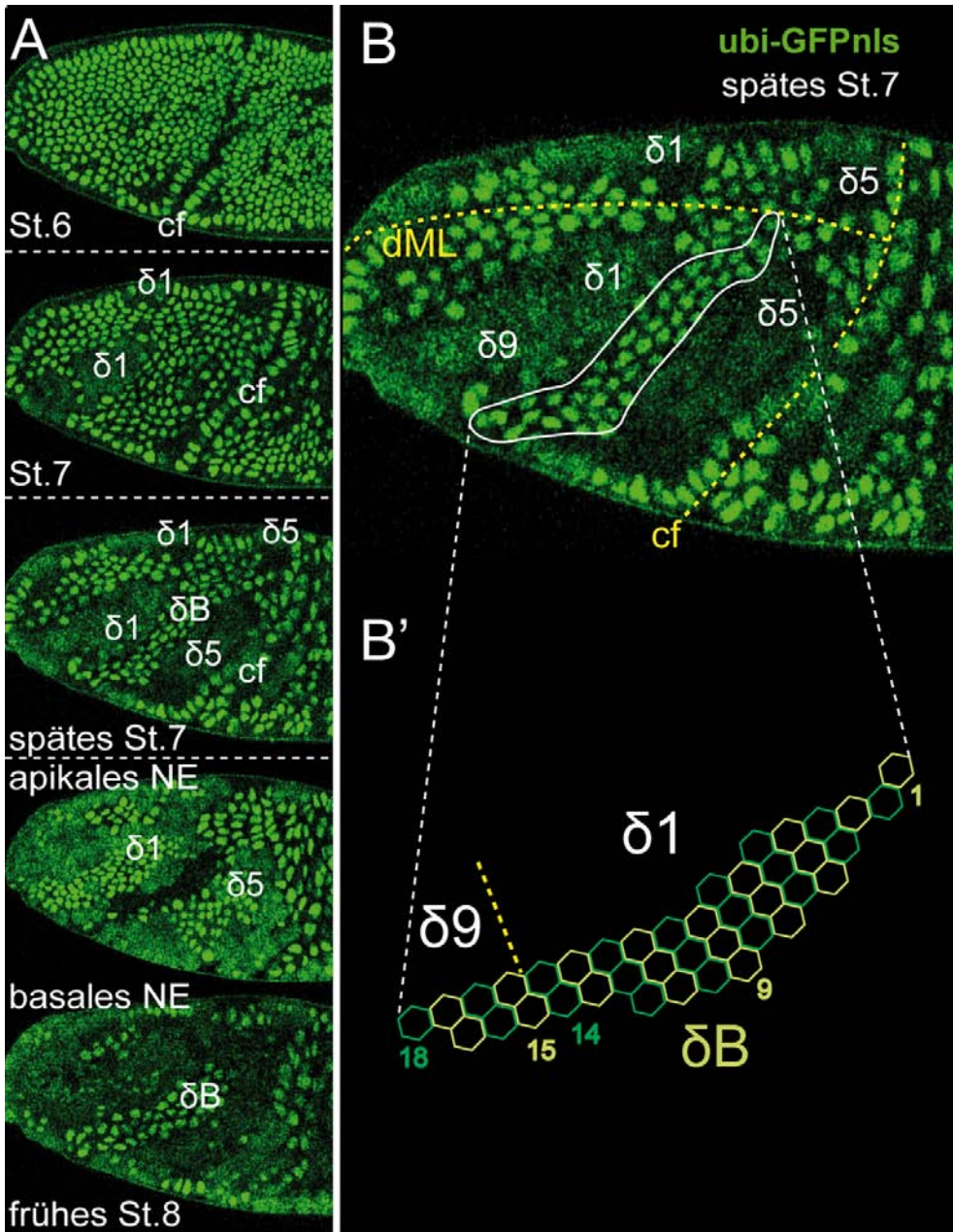


Abb. 6 4D-mikroskopische Analyse der δB

A Einzelaufnahmen aus einer 4D-mikroskopischen Aufnahme eines ubi-GFPnl5 Embryos in verschiedenen Stadien seiner frühen Entwicklung. Im St.6 fängt die cephale Furche (cf) an sich zu bilden. Im St.7 beginnen die ersten Zellen aus $\delta 1$ spiegelbildlich auf beiden Seiten des procephalen NE mit ihren Mitosen. Im späten St.7 treten immer mehr $\delta 1$ Zellen und auch Zellen aus $\delta 5$, wiederum spiegelbildlich, in ihre Mitose ein. Die nicht-mitotischen Zellen aus δB sind ansprechbar. Im frühen St.8 reformieren sich die Zellkerne der Zellen aus $\delta 1$ und $\delta 5$ (apikales NE). In diesem Stadium liegen die Zellen der δB etwas weiter im Inneren des Embryos (basales NE). **B** Abbildung eines ubi-GFPnl5 Embryos im späten St.7. In diesem Stadium können δB Zellen, bedingt durch die spiegelbildlich auf beiden Seiten des Embryos stattfindenden Mitosen von $\delta 1$, $\delta 5$ und $\delta 9$ Zellen, sehr gut angesprochen werden. **B'** schematisches Modell der δB im späten St.7. Die gelbe, gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen $\delta 1$ und $\delta 9$ an (für Details siehe Text). **Abkürzungen** cf: cephale Furche; dML: dorsale Mittellinie

3.1.2 Charakterisierung der $\delta 24$

$\delta 24$ ist eine der kleinsten mitotischen Domänen des *Drosophila* Embryos. Wie ihre Bezeichnung bereits verrät, ist sie eine der sich zuletzt teilenden mitotischen Domänen. $\delta 24$ befindet sich im lateralen Bereich des Embryos anterior der cephalen Furche (Foe, 1989). Da sie vollständig von sich früh teilenden mitotischen Domänen umgeben ist ($\delta 2,5,9$) und sie sich somit durch den Zeitpunkt ihrer Mitosen deutlich von den Zellen der umgebenden Domänen abgrenzt, scheint ein zweifelfreies Ansprechen von $\delta 24$ Zellen und damit die Aufklärung ihres Entwicklungsschicksals mittels der Dil-Markierungstechnik möglich. Besonders interessant ist, dass $\delta 24$ von mitotischen Domänen umgeben ist, die zum pNE gehören (Robertson et al., 2003; Urbach et al., 2003). Das Schicksal der $\delta 24$ Zellen ist jedoch vollkommen unbekannt. Man hat Hinweise darauf gefunden, dass mitotische Domänen Zellschicksalsdomänen darstellen (Cambridge et al., 1997; Namba and Minden, 1999; Robertson et al., 2003). Besonders unter diesem Gesichtspunkt erscheint es interessant, welche Strukturen aus dieser kleinen mitotischen Domäne hervorgehen. Um die von Foe (1989) gemachten Beobachtungen zu verifizieren und $\delta 24$ bezüglich ihrer Zellzahlen und ihrer Lage in Bezug zu morphologischen Landmarken zu charakterisieren, wurden 4D-mikroskopische Analysen (n=3) am konfokalen Laserscan-Mikroskop an ubi-GFPnls Embryonen durchgeführt (im Rahmen eines von mir betreuten F2-Praktikums von Frau Sonja Faßbender). Diese Analysen ergaben, dass sich alle Zellen der die $\delta 24$ umgebenden mitotischen Domänen ($\delta 2,5,9$) 15 min (25°C) nach dem Beginn der ersten Mitosen in $\delta 2$ geteilt haben. Für die verbleibende Zeit der Aufnahmen (bis zu 21 min. (25°C)) konnte keine Mitose in $\delta 24$ Zellen erkannt werden. In einem Fall konnte jedoch unmittelbar vor Ende der Aufnahmezeit (im späten St.8/ frühen St.9) eine Delamination einer $\delta 24$ Zelle beobachtet werden, die sich vermutlich zu einem NB entwickelt (Abb. 7 C). Dies deutet auf das neurogene Schicksal zumindest einer der $\delta 24$ Zellen hin. $\delta 24$ könnte somit eine weitere, bisher unbekannte Domäne des pNE darstellen. Bezüglich Lage und Zellzahl von $\delta 24$ zeigte sich, dass sie aus 5-6 Zellen besteht, die nach Bildung der cephalen Furche direkt anterior derselben liegen (Abb. 7 A, D) und die sich erst im Verlauf der weiteren Embryonalentwicklung weiter nach anterior verlagern (Abb. 7 A-C). Diese Verlagerung ist wahrscheinlich auf die im procephalen Bereich stattfindenden Rotationsbewegungen zurückzuführen (Schmidt-Ott and Martin Technau, 1994). Daher musste, um die Lage der Zellen für Dil-Markierungen möglichst genau zu bestimmen, ein

fester Zeitpunkt gewählt werden, an dem die Position der Zellen in Bezug zu morphologischen Landmarken bestimmt wurde. Als morphologische Landmarken wurden die cephalere Furche und die ventrale Furche gewählt. Diese bilden sich im St.6 zu Beginn der Gastrulation noch vor dem Auftreten der ersten mitotischen Domänen. Der Punkt auf der ventralen Seite des Embryo, an dem sich cephalere und ventrale Furche treffen, kann als Ursprung eines Koordinatensystems fungieren, von dem aus Zellzahlen zuverlässig bestimmt werden können (Abb. 7 D). Eine geeignete stereotype und gut zu erkennende "zeitliche Landmarke" stellen die ersten Mitosen in $\delta 2$ dar, die während des St.7 stattfinden (Abb. 7 A). Beim Auftreten der ersten Mitosen in $\delta 2$ ist einerseits sichergestellt, dass bereits alle Zellen in die cephalere Furche eingewandert sind (d.h., dass sie sich bereits vollständig ausgebildet hat), zum anderen ist sichergestellt, dass sich zu diesem Zeitpunkt die $\delta 24$ noch nicht weiter nach anterior verlagert hat. Die Lage der $\delta 24$ Zellen wurde also aus den genannten Gründen im St.7, zu Beginn der Mitosen von $\delta 2$ Zellen, in Bezug zu cephaler und ventraler Furche bestimmt. Es stellte sich heraus, dass zu diesem Zeitpunkt die 5-6 $\delta 24$ Zellen im Bereich 16-18 Zellreihen dorsal der ventralen Furche und direkt anterior der cephalen Furche liegen (Abb. 7 D). Zusammengefasst bestätigte sich, dass sich $\delta 24$ Zellen durch ihre späten Mitosen sehr deutlich von Zellen benachbarter mitotischer Domänen ($\delta 2$, 5, 9) abgrenzen (Foe). Im Weiteren konnte die Lage der 5-6 $\delta 24$ Zellen, bezüglich ventraler und cephaler Furche im St.7, genau bestimmt werden und es fanden sich Hinweise, dass $\delta 24$ eine bisher unbekannte mitotische Domäne des pNE darstellt. Die hier vorliegende Charakterisierung der $\delta 24$ stellt eine Grundvoraussetzung für eine zukünftige Aufklärung des Entwicklungsschicksals ihrer Zellen mittels der Dil-Technik dar.

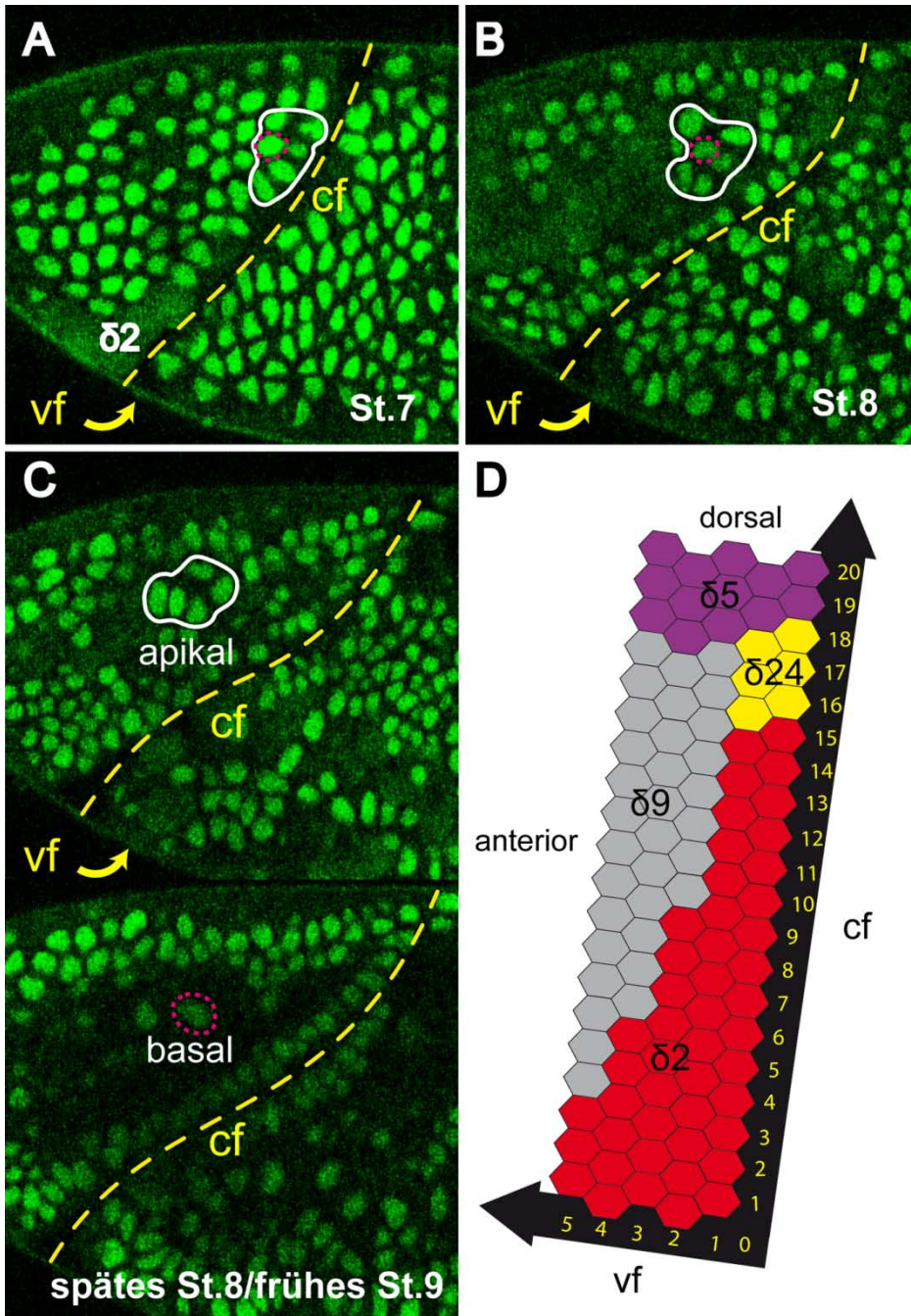


Abb. 7 4D-mikroskopische Analyse der $\delta 24$

A-C Einzelaufnahmen aus einer 4D-mikroskopischen Analyse eines ubi-GFPnls Embryos. Anterior links, dorsal oben. **A** St.7. Man sieht die sechs $\delta 24$ Zellen (weiß umrandet), die sich in diesem Stadium direkt anterior der cephalen Furche (cf) befinden. Die magenta umrandete Zelle wird im späten St.8/frühen St.9 delaminieren. **B** Aufnahme des ubi-GFPnls Embryos im St.8. Die sechs $\delta 24$ Zellen liegen nun etwas weiter anterior der cf als im St.7. Die magenta umrandete Zelle ist noch nicht delaminiert. **C** Aufnahme des ubi-GFPnls Embryos im späten St.8/frühen St.9. Apikal im NE liegen nun nur noch fünf der sechs $\delta 24$ Zellen (weiß umrandet, obere Aufnahme), die sechste $\delta 24$ Zelle ist delaminiert (magenta umrandete Zelle, untere Aufnahme). **D** Schematische Darstellung der Lage der $\delta 24$ Zellen im St.7. Die sechs Zellen befinden sich 16-18 Zellreihen dorsal der ventralen Furche (vf) und direkt anterior angrenzend an die cephalen Furche (cf).

3.2 Herkunft der Pilzkörperneuroblasten und Embryonalentwicklung der Pilzkörper auf Ebene individueller Vorläufer und ihrer Zellstammbäume

Durch die Etablierung von Landmarken und die Aufschlüsselung des invarianten Zellmusters der δB und benachbarter mitotischer Domänen waren die Voraussetzungen für eine systematische Untersuchung der ZSBe gegeben, die aus δB oder angrenzenden mitotischen Domänen hervorgehen (siehe 3.1.1). Insgesamt wurden 21 ZSBe charakterisiert. Die Charakterisierung beinhaltet die frühe Neurogenesephase der Neuroblasten und die Morphologie der ZSBe im spätembryonalen St.17 bzw. im frühen L1-Stadium. Mein besonderes Interesse galt dabei der Entstehung der vier PKNBen und der Embryonalentwicklung ihrer vier ZSBe.

3.2.1 Charakterisierung der pilzkörperspezifischen OK107 Expression

Sowohl die spätembryonalen PKNBen als auch ihre γ -Neurone exprimieren das Augenentwicklungsgen *eyeless* (*ey*) (Kurusu et al., 2000; Noveen et al., 2000). OK107 ist ein Gal4 Stamm, der Gal4 unter der Kontrolle des pilzkörperspezifischen *ey*-Enhancers exprimiert (Adachi et al., 2003). Expression des Reportergens CD8::GFP unter Kontrolle von OK107 (OK107>CD8::GFP) kann in PKNBen und ihren Nachkommen, den γ -Neuronen, ab dem St.15 detektiert werden. Die Intensität des Reportersignals nimmt im Laufe der weiteren Entwicklung zu und ist ab dem St.17 sehr prominent (Abb. 8 A, E). Antikörperfärbungen gegen *Ey* bestätigten, dass OK107 in allen PKNBen und γ -Neuronen exprimiert (Abb. 8 E). Mit Hilfe des membranständigen CD8::GFP kann somit die Morphologie der Pilzkörper sichtbar gemacht werden (Abb. 8 A-E). Fliegenembryonen des Genotyps OK107>CD8::GFP eignen sich daher hervorragend, um zu entscheiden, ob bei einer Dil-Markierung einer der vier PKZSBe markiert wurde, da man in einem solchen Fall eine Kolo-kalisation von Dil und CD8::GFP im St.17 bzw. L1-Pilzkörper findet.

Anhand der pilzkörperspezifischen OK107 Expression wurde eine Unterteilung des Gehirnneuropil in verschiedene Regionen vorgenommen (Abb. 9 A). Diese Regionalisierung wurde genutzt, um die Projektionsmuster der Dil markierten ZSBe im

Neuropil möglichst genau zu beschreiben. Die Lage der Zellkörper der markierten ZSBe wurde in Bezug zu den PKNBen bzw. ihren γ -Neuronen beschrieben.

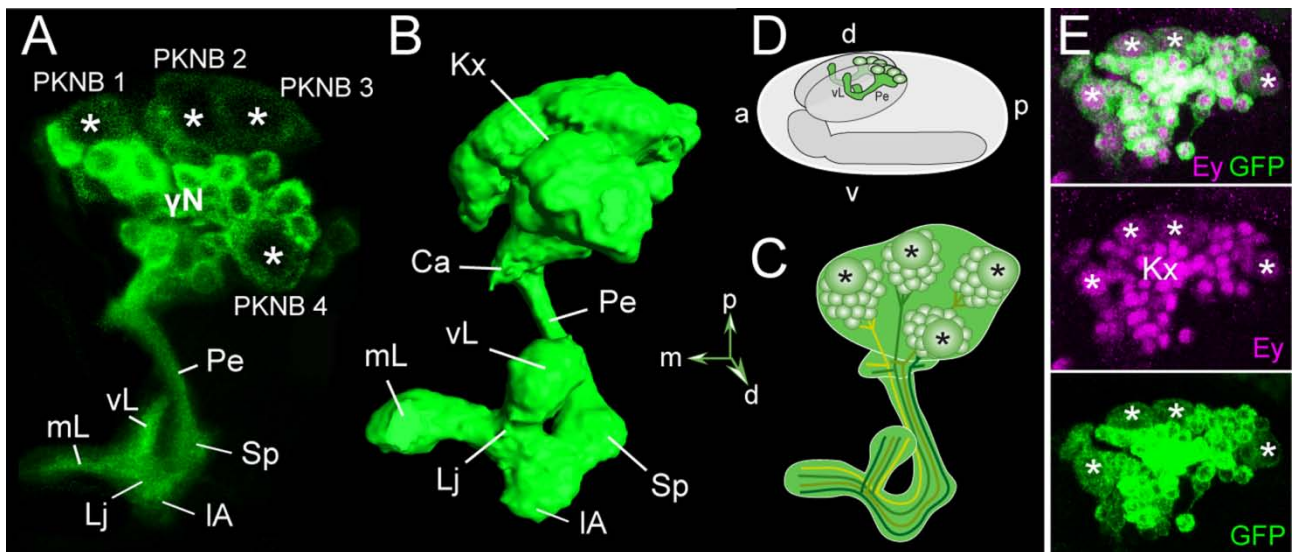


Abb. 8 Charakterisierung der pilzkörperspezifischen OK107 Expression

A OK107>CD8::GFP Expression im Pilzkörper eines St.17 Embryos. Anterior oben (in Neuralachse), Ansicht von dorsal. Sowohl die 4 PKNBen (☞) als auch ihre γ -Neurone und das Pilzkörperneuropil sind deutlich markiert. **B** Amira Rekonstruktion eines frühen L1 Pilzkörpers markiert durch OK107>CD8::GFP. Alle Strukturen des Pilzkörpers, d.h. Pilzkörperkortex (Kx) und die verschiedenen Regionen des Pilzkörperneuropil, können angesprochen werden. **C** Schematische Zeichnung eines frühen L1 Pilzkörpers. Man sieht die Lage der PKNBen (*), ihre darunter liegenden γ -Neurone sowie deren Axone, die das Pilzkörperneuropil konstituieren. **D** Schematische Darstellung der Lage der Pilzkörper (grün) im ZNS und in Bezug zu den Körperachsen eines St.17 Embryos bzw. der frühen L1 Larve. Ansicht von lateral. **E** Antikörperfärbung gegen Ey (magenta) in OK107>CD8::GFP (grün) im St.17. Man sieht die Koexpression des Reportergens und Ey in den 4 PKNBen (☞) und allen γ -Neuronen. **Abkürzungen:** PKNB1-4: Pilzkörperneuroblast 1-4; γ N: γ -Neurone; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; IA: lateraler Appendix; Lj: Lobe-junction; vL: vertikaler Lobus; mL: medialer Lobus; Kx: Pilzkörperkortex; a: anterior; p: posterior; d: dorsal; v: ventral; m: medial

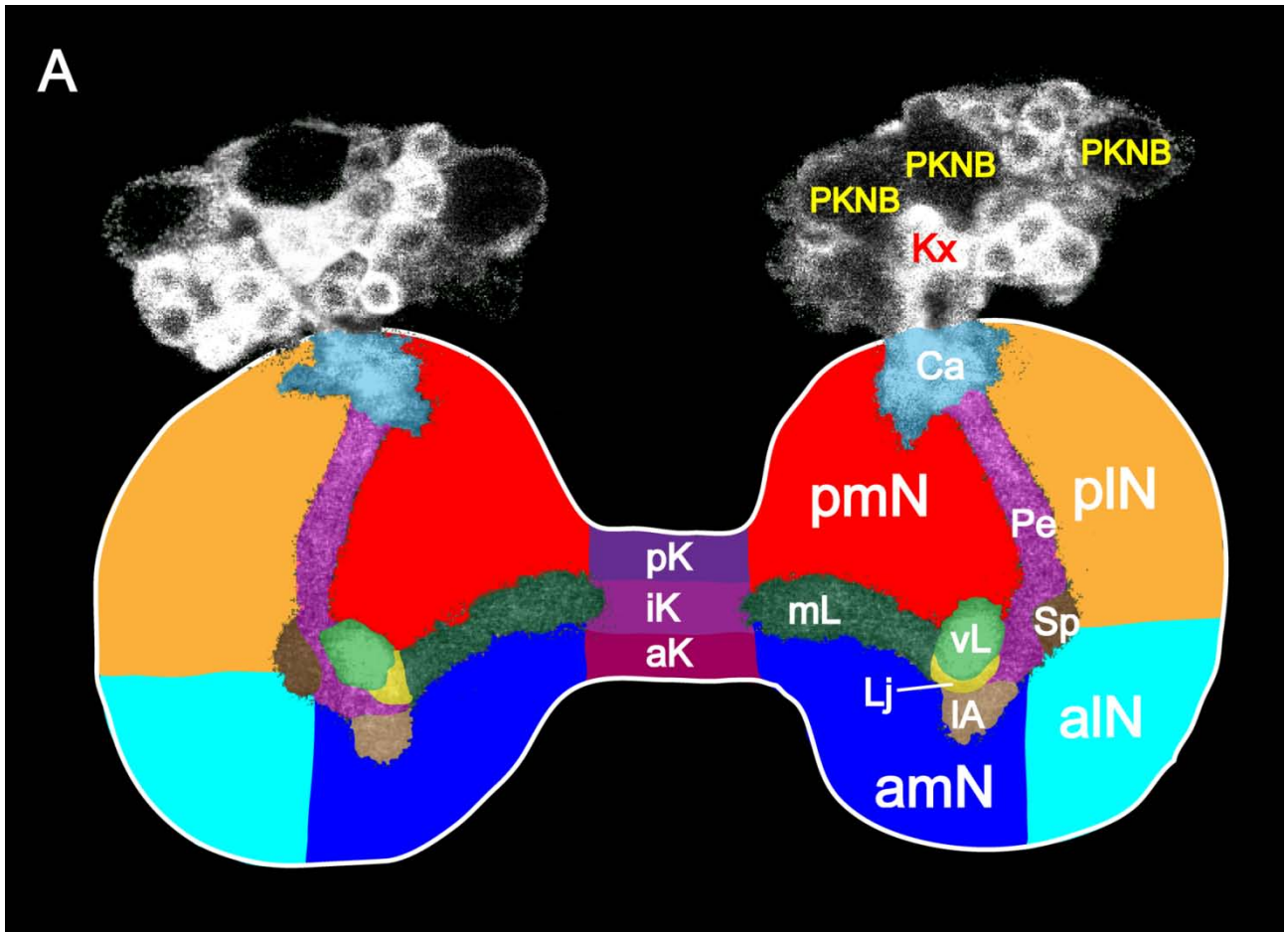


Abb. 9 Unterteilung des Gehirnneuropil und des Pilzkörperneuropil in verschiedene Regionen

A Unterteilung des Gehirnneuropil (weiß umrandet) und des Pilzkörperneuropil, dargestellt an der Rekonstruktion des pilzkörperspezifischen Expressionsmusters einer frühen L1 OK107>CD8::GFP Larve. Die anteroposterior Achsenbezeichnung lehnt sich an die Körperachse an, d.h. anterior unten, Ansicht von dorsal. Das Gehirnneuropil und die Kommissur wurden in 4 (pmN,pIN,amN,aIN) bzw. 3 (aK, iK, pK) Bereiche unterteilt. Das Pilzkörperneuropil wurde in 7 Bereiche unterteilt (Ca, Pe, Sp, IA, Lj, vL, mL). Die neuritischen Projektionen der Dil-markierten ZSBe werden in Bezug zu diesen Unterteilungen beschrieben. Zusätzlich wird, im Falle von nicht-PKZSBen, die Lage ihrer Zellkörper in Bezug zum Pilzkörperkortex (Kx) bzw. der PKNBen angegeben. **Abkürzungen:** pmN: posteromediales Neuropil; pIN: posterolaterales Neuropil; amN: anteromediales Neuropil; aIN: anterolaterales Neuropil; aK: anteriorer Bereich der Kommissur; iK: intermediärer Bereich der Kommissur; pK: posteriorer Bereich der Kommissur; Ca: Calyx; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; IA: lateraler Appendix; Lj: Lobe-junction; vl: vertikaler Lobus; mL: medialer Lobus; Kx: Pilzkörperkortex; PKNB: Pilzkörperneuroblast

3.2.2 Jeder Pilzkörperneuroblast entsteht aus einer einzelnen NE-Zelle der δB

Wie sich bei der Zellstammbaumanalyse herausstellte (siehe 3.2.5), entstehen die PKNBen aus den NE-Zellen der δB . Außerdem zeigten die erfolgten Kontrollen über das Zellverhalten eine Stunde nach Markierung, dass sie zu der Population der am frühesten

delaminierenden Gehirnneuroblasten gehören (Delamination im späten St.8) (Urbach et al., 2003). Die Position der NE-Zellen, aus denen die Pilzkörper hervorgehen, konnte mit Hilfe des durch 4D-Mikroskopie erstellten schematischen Modells genau kartiert werden. Demnach entstammen die PKNBen dem ventralen Drittel der δ B (Abb. 10 A, A'). Die Positionen der markierten NE-Zellen zeigen, dass es in diesem Bereich eine Population von 10-12 Zellen gibt, die das Potential haben sich zu PKNBen zu entwickeln. Man erkennt, dass jeder der vier PKNBen (die individuell unterscheidbar sind, siehe 3.2.4 und 3.2.5) präferentiell aus bestimmten, sich jedoch teilweise überlappenden Anteilen dieser Zellgruppe hervorgeht (Abb. 10 A'). So delaminieren die PKNB1, PKNB2 und PKNB3 aus dem anterioren Bereich in einer dorsoventralen Reihenfolge (PKNB1: ventral, PKNB2: intermediär, PKNB3: dorsal). PKNB4 delaminiert präferentiell aus dem posteroventralen Bereich der Zellgruppe. Neben der Lokalisation des Entstehungsortes der PKNBen konnte auch erstmalig der Entstehungsmodus der vier PKNBen in *Drosophila* aufgezeigt werden. In allen Fällen (n=119) führte die Markierung einer einzelnen NE-Zelle zur Entwicklung von nur einem PKNB und eines einzelnen PKZSB (Abb. 10 B2). Dieser Entstehungsmodus unterscheidet sich somit von bereits bekannten Modi in anderen Insekten. So entstehen die großen Populationen der PKNBen in der holometabolen Honigbiene und in hemimetabolen Insekten durch wiederholt symmetrische Teilungen einer oder weniger Vorläuferzellen (Abb. 10 B1) (Urbach and Technau, 2003c).

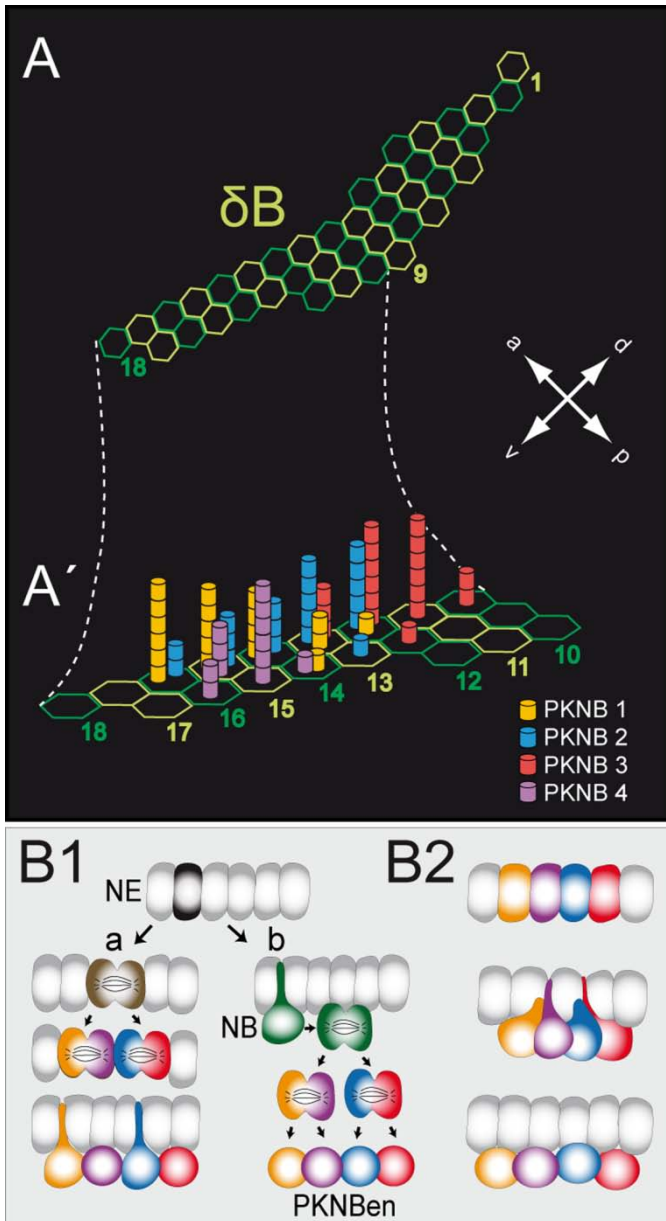


Abb. 10 Jeder PKNB entsteht aus einer einzelnen NE-Zelle aus δB

A Schematisches Modell der δB . Dieses Modell wurde genutzt, um die Positionen der Dil markierten NE-Zellen zu dokumentieren. **A'** Ventraler Bereich des in (A) gezeigten Schemas der δB . Die Zylinder geben die Position der markierten NE-Zelle an, aus der die PKNBen hervorgehen. Jeder Zylinder steht für eine Markierung in einem anderen Individuum. Verschiedene Farben stehen für die verschiedenen PKNBen, die aus der Markierung einer NE-Zelle resultierten. Gelb: PKNB1; blau: PKNB2; rot PKNB3; lila: PKNB4. **B** Mögliche Modi der Entstehung der PKNBen. **B1** Modus der Pilzkörperneuroblastenentstehung ähnlich wie bei hemimetabolen Insekten und der Honigbiene: Ausgehend von einer NE-Zelle (schwarz), die sich entweder noch im NE mehrfach teilt (a), oder die erst als Neuroblast delaminiert (b), worauf dieser sich mehrfach teilt, kommt es zur Entstehung der 4 PKNBen. **B2** Modus der Pilzkörperneuroblastenentstehung, wie er durch die Dil-Markierungen belegt wurde: Jeder der 4 PKNBen entsteht aus einer individuellen NE-Zelle. **Abkürzungen** PKNB1-4: Pilzkörperneuroblasten 1-4; a: anterior; p: posterior; d: dorsal; v: ventral

3.2.3 Pilzkörperneuroblasten gehen aus benachbarten Zellen derselben proneuralen Domäne hervor

Wie gezeigt entstehen PKNBen aus einer 10-12 Zellen umfassenden neuroektodermalen δB Zellgruppe. Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Gruppe um eine proneurale Domäne des procephalen NE handelt, wurden *in situ* Hybridisierungen gegen die proneuralen Gene *achaete*, *scute* und *lethal of scute* durchgeführt. Im St.8 (also kurz vor der Delamination der PKNBen) exprimieren die NE-Zellen in der ventraler Hälfte von

Domäne B, in welcher die PKNBen entstehen, die proneuralen Gene *achaete*, *scute* und *lethal of scute* (Abb. 11 A-A''). Dies zeigt, dass diese 10-12 NE Zellen zu einer gemeinsamen proneuralen Domäne gehören. Alle NE-Zellen dieser proneuralen Domäne exprimieren hohe mRNA Level aller drei proneuralen Gene in der kurzen Periode, in welcher aus dieser die PKNBen und andere protocerebrale NBen entstehen. Da die meisten oder vielleicht alle Zellen dieser proneuralen Domäne zu neuronalen Stammzellen werden (Urbach et al., 2003), entwickeln sich die PKNBen und andere Gehirnneuroblasten sehr wahrscheinlich aus benachbarten neuroektodermalen δ B Zellen. Um dies zu beweisen, wurden in der proneuralen Domäne Markierungen von benachbarten NE-Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen (Dil oder DiD) durchgeführt. Diese resultierten in der Markierung zweier PKZSBs (n=3) (Abb. 11 B) oder eines PKZSB und eines weiteren protocerebralen ZSB (n=4) (Abb. 11 C). In keinem Fall wurde ein epidermaler ZSB erhalten.

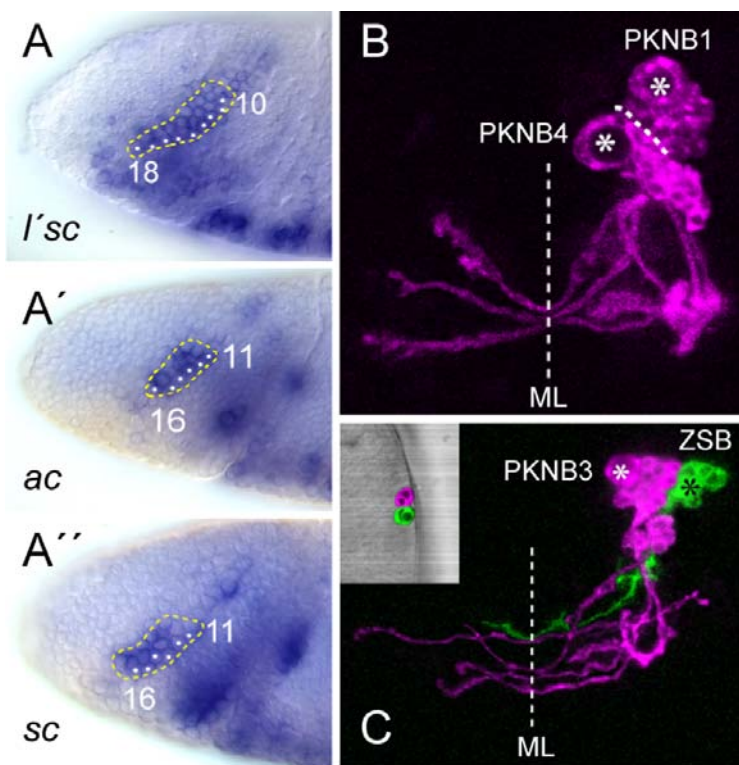


Abb. 11 PKNBen gehen aus benachbarten Zellen derselben proneuralen Domäne hervor

A-A'' *in situ* Hybridisierungen gegen *l'sc*, *ac* und *sc* in St.8 WT Embryonen. Anterior links, dorsal oben. **A** *l'sc* wird in der ventralen Hälfte de δ B in den Zellreihen 10 -18 exprimiert (gelbe Umrandung). **A'** *ac* wird in dem 10-12 Zellen umfassenden Zellcluster exprimiert, aus dem die PKNBen delaminieren (gelbe Umrandung, Zellreihen 11-16). **A''** *sc* wird wie *ac* in den Zellreihen 11-16 exprimiert (gelbe Umrandung) **B** PKZSB1 und PKZSB4, die aus der Markierung zweier benachbarter NE-Zellen hervorgegangen sind. **C** Der PKZSB3 (magenta) und ein weiterer protocerebraler ZSB (grün), die aus der Markierung zweier benachbarter δ B Zellen (Inlay) mit zwei verschiedenfarbigen, lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen (CM-Dil bzw. DiD) resultierten. **Abkürzungen:** *l'sc*: *lethal of scute*; *ac*: *achaete*; *sc*: *scute*; PKNB: Pilzkörperneuroblast; ML: Mittellinie

3.2.4 Jeder Pilzkörperneuroblast exprimiert eine individuelle Kombination von Transkriptionsfaktoren

In vorherigen Arbeiten konnten alle Gehirnneuroblasten ab dem Zeitpunkt ihrer Entstehung im späten St.8 bis ins St.11 identifiziert und molekular charakterisiert werden (Urbach et al., 2003; Urbach and Technau, 2003b). Diese Arbeiten zeigten, dass jeder Gehirnneuroblast zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem definierten Ort entsteht und eine einzigartige Kombination von molekularen Markern exprimiert, durch die sich jeder NB individuell von allen anderen NBen unterscheidet. Diese Eigenschaften implizieren, dass jeder Gehirnneuroblast eine individuelle Identität besitzt. Dennoch war bislang die Identität der vier PKNBen innerhalb der etablierten Neuroblastenkarte noch unklar. Um nun eine Zuordnung der PKNBen zu der damals erstellten Neuroblastenkarte durchzuführen, wurden Markergene verwendet, die spezifisch in den vier PKNBen des St.17 Embryos exprimiert werden (*dachshund (dac)*, (*ey*), *seven up-LacZ (svp-lacZ)* (Kurusu et al., 2000; Noveen et al., 2000) und *Drosophila retinal homeobox (Drx)* (Kunz et al., 2012). Sehr hilfreich für dieses Vorhaben war außerdem die Beobachtung, dass PKNBen in den Embryonalstadien 13-17 größer sind als andere Gehirnneuroblasten, und dass sich ihre relative Lage sowohl zueinander als auch in Relation zu den anderen Gehirnneuroblasten nicht verändert (Abb. 12 D-I). Durch Verwendung der eben genannten molekularen Markern und morphologischen Kriterien konnten die vier PKNBen, trotz der während der Embryonalentwicklung stattfindenden morphogenetischen Verlagerungen des procephalen NE (Schmidt-Ott and Martin Technau, 1994), von ihrer Position im St.17 (dorsoposteriores Protocerebrum) bis hin zu den frühen Embryonalstadien zurückverfolgt und dadurch der Neuroblastenkarte zugeordnet werden (Abb. 12 A, D, G). Demnach entsprechen die PKNBen1,2,3 und 4, in dieser Reihenfolge, den NBen Pcv9, Pcd4, Pcd9 und Pcd2 (Abb. 12 A-J).

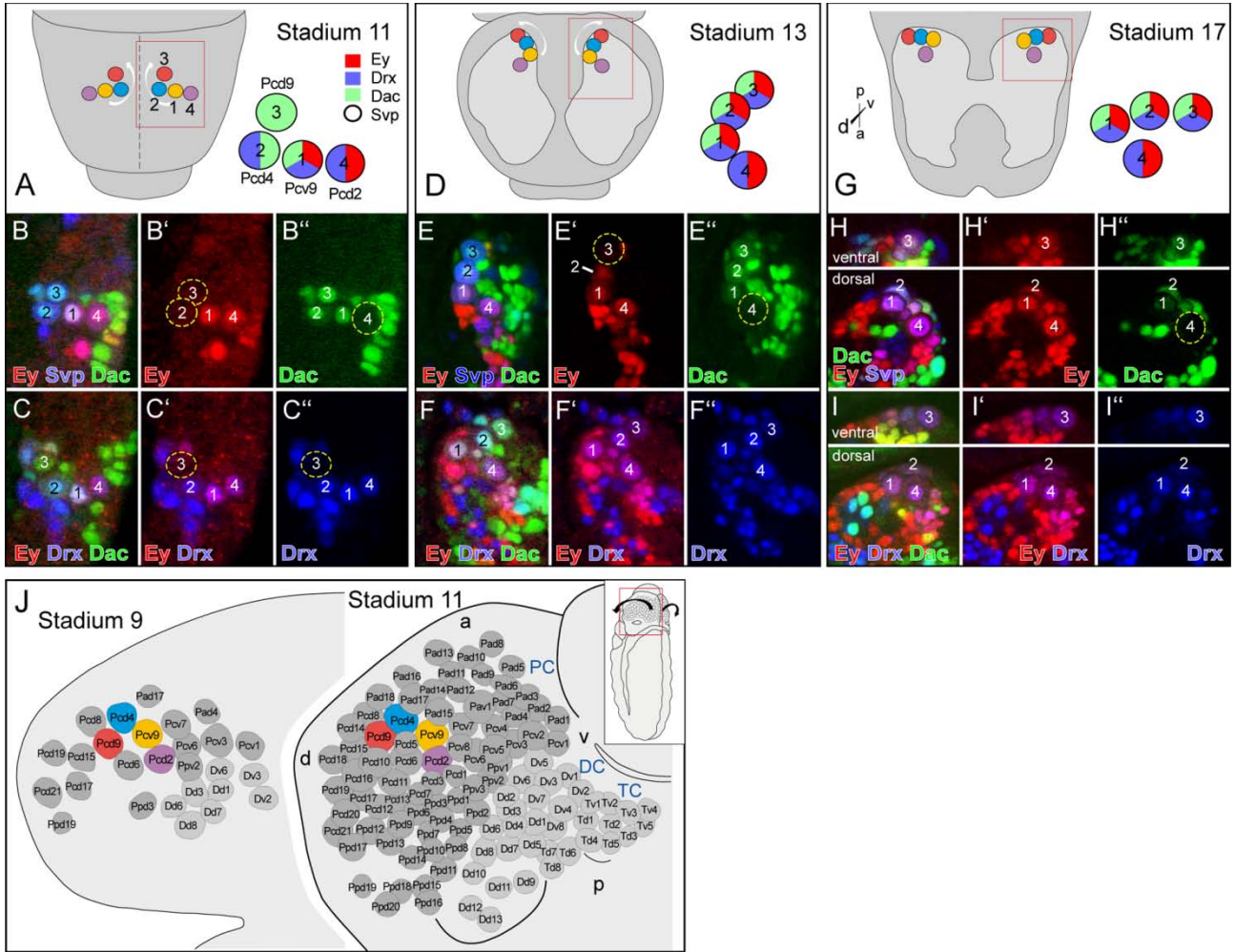


Abb. 12 Ey, Dac und Drx Expression erlauben das Ansprechen der PKNBen im Verlauf der Embryonalentwicklung

A,D,G Linke Seite der Abbildungen: Dorsalansicht auf Kopf und Gehirn (hellgrau in D, G) in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Schemata zeigen die Rotation der PKNBen (PKNB1: gelb; PKNB2: blau; PKNB3: rot und PKNB4: lila) im Verlauf der Embryonalentwicklung, welche sie von ihrem Entstehungsort in δB bis ins dorsoposteriore Protocerebrum im St.17 verlagert. Die rot umrandeten Bereiche deuten die in (B-I) gezeigten Regionen an. Rechte Seite der Abbildungen: Zusammenfassung der Genexpression der einzelnen PKNBen im gezeigten Stadium.

B,E,H Rekonstruktion konfokalmikroskopischer LSM Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen Ey, Dac und svp-LacZ oder **C,F,I** Ey, Dac und Drx. **B** Frühes St.11. svp-LacZ wird von allen 4 PKNBen exprimiert. Ey Expression findet sich nur in den PKNBen 1 und 4. Dac wird in den PKNBen1-3, aber nicht in PKNB4 exprimiert. **C** Spätes St.11. Drx wird in den PKNBen1,2,4 aber nicht in PKNB3 exprimiert. **E** Frühes St.13. svp-LacZ wird in allen 4 PKNBen exprimiert. Dac-Expression findet sich nur in den PKNBen1-3 und Ey Expression beginnt nun auch in den PKNBen2 und 3 **F** Spätes St.13. Drx Expression findet sich nun in allen 4 PKNBen. Die PKNBen werden anhand ihrer Position und Größe identifizierbar. **H,I** Die PKNBen haben ihre finale Position im dorsoposterioren Protocerebrum erreicht. Die Markergenexpression (svp-LacZ, Ey, Dac, Drx) hat sich seit dem späten St.13 nicht verändert. **J** Schematische Darstellung von Filetpräparationen in den Stadien 9 bzw. 11. Gezeigt sind die im jeweiligen Stadium delaminierten NBen. Die PKNBen sind farbig gekennzeichnet. (Pcv9=PKNB1: gelb; Pcd4=PKNB2: blau; Pcd9=PKNB3: rot; Pcd2=PKNB4: lila). Inlay oben rechts: schematische Darstellung der Vorgehensweise bei einer Filetpräparation in frühen Embryonalstadien. Der Embryo wird an der dorsalen Mittellinie aufgetrennt und die beiden Kopfhälften werden heruntergeklappt. Nach Entfernung des Dotters ermöglicht diese Art der Präparation eine optimale Sicht auf das NE und die darunter liegenden NBen.

3.2.5 Die Zellstammbäume der vier Pilzkörperneuroblasten

Es zeigte sich, dass die Dil-markierten ZSBe der vier PKNBen nicht nur aus den, den Pedunkel und die Loben konstituierenden, γ -Neuronen bestehen, sondern, dass neben diesen auch Neurone markiert wurden, die eine andere Morphologie aufweisen. So finden sich bei allen vier PKZSBen Neurone, die nicht zum Aufbau des Pilzkörpers beitragen (nicht-intrinsische Pilzkörperneuroblasten-Neurone = ni-Neurone), sondern in die contralaterale Hemisphäre bzw. bis ins VNS projizieren (siehe 3.2.5.1-3.2.5.4). Neben diesem Zelltyp findet man, jedoch nur bei den Nachkommenzellen des PKZSB1, einen weiteren Zelltyp, dessen Axone zwar durch den Pedunkel verlaufen, die dann aber nicht die Loben innervieren, sondern den Pedunkel im Bereich des Spur verlassen und in einen Bereich ventral des Pedunkels projizieren (siehe 3.2.5.1). Da diese Zellen also nicht zum Aufbau der Loben beitragen, wurden sie als nicht-intrinsische-Typ2-Neurone bezeichnet (ni-Typ2-Neurone). Durch Verwendung von OK107>CD8::GFP Embryonen zeigte sich außerdem, dass man in ni-Neuronen keine Kolo-kalisation von Dil und GFP erkennt und dass sie somit (zumindest im späten Embryo/frühen L1) kein Ey exprimieren. Ni-Neurone unterscheiden sich also sowohl morphologisch als auch bezüglich ihrer Genexpression von γ -Neuronen. Vergleicht man die Projektionsmuster der ni-Neurone der vier PKZSBe, so fällt auf, dass jeder der ZSBe ni-Neurone mit unterschiedlichen Projektionsmustern hervorbringt. Die PKZSBe lassen sich demnach anhand der axonalen Verläufe ihrer ni-Neurone morphologisch voneinander unterscheiden. Im Gegensatz dazu weisen die ausdifferenzierten γ -Neurone der vier PKZSBe keine zellstammbaumspezifischen, offensichtlichen morphologischen Besonderheiten auf (Abb. 20 A2-D2'). In einer weiteren Serie von Dil-Markierungsexperimenten in Embryonen, die GFP unter der Kontrolle des glia-spezifischen *reversed polarity*-Enhancers (*repo*) exprimieren, konnte Frau K. Kraft darüber hinaus zeigen, dass PKNBen während der Embryonalentwicklung keine Gliazellen hervorbringen (Kunz et al., 2012). Dies stellt möglicherweise einen Unterschied zur Postembryonalentwicklung der Pilzkörper dar, da über die postembryonale Generierung von Gliazellen durch die PKNBen bisher widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden (Ito et al., 1997; Lai and Lee, 2006). Durch die Möglichkeit PKZSBe anhand ihrer Morphologie individuell ansprechen zu können, konnte die Lage der einzelnen PKZSBe innerhalb der spätembryonalen/früharvalen Pilzkörperanlage untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass jeder PKNB und seine Nachkommenzellen einen ihnen jeweils eigenen

Bereich innerhalb der Pilzkörperanlage besetzen (Tabelle 1). So bilden die Zellkörper der PKNB1-Nachkommenzellen bzw. die des PKNB3 jeweils den medialen bzw. lateralen Bereich des Pilzkörpers. Zwischen diesen beiden Zellclustern liegen an intermediärer Position die Nachkommenzellen des PKNB2. PKNB4-Nachkommenzellen liegen im Bereich anterior der eben genannten drei PKZSBe (Abb. 13 A-A'').

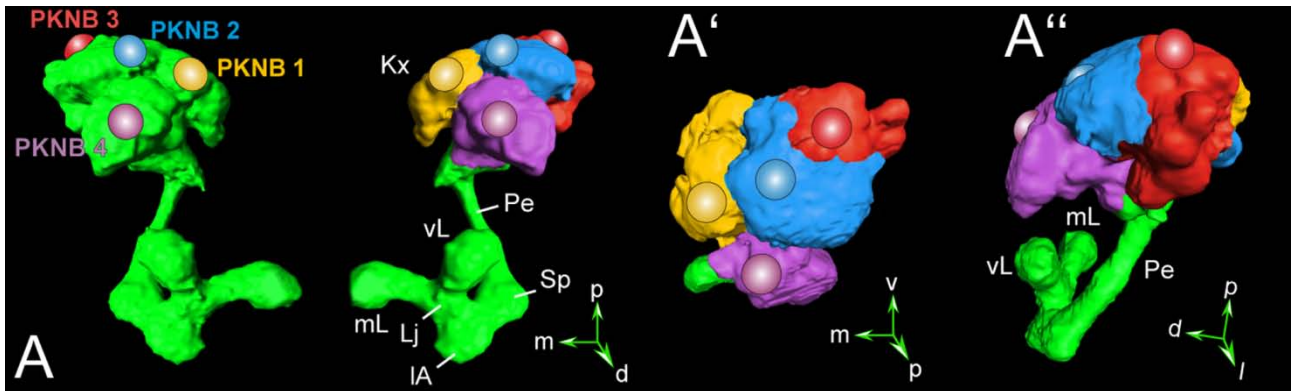


Abb. 13 Jeder PKZSB besetzt einen ihm eigenen Bereich innerhalb des Pilzkörpers

A-A''' Amira-Rekonstruktion des pilzkörperspezifischen OK107 Expressionsmusters in einer frühen L1 Larve. Gezeigt ist die Lage der 4 PKNB und ihrer γ -Neurone innerhalb des Pilzkörperkortex (Kx). Man erkennt, dass jeder PKNB und seine γ -Neurone einen ihnen eigenen Bereich innerhalb des Pilzkörperkortex besetzen. **A** Dorsalansicht auf die beiden Pilzkörper eines Gehirns. Links sind nur die PKNB eingezeichnet (PKNB1: gelb; PKNB2: blau; PKNB3: rot; PKNB4: lila), rechts sind die PKNB und die Bereiche im Kx, die von ihren γ -Neuronen besetzt werden, eingezeichnet (jeweils in der gleichen Farbe, wie der PKNB von dem sie abstammen). **A'** Ansicht von posterior auf den Kx. **A''** Ansicht von lateral auf den Pilzkörper. **Abkürzungen** PKNB1-4: Pilzkörperneuroblast 1-4; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; IA: lateraler Appendix; Lj: Lobe-junction; vL: vertikaler Lobus; mL: medialer Lobus; Kx: Pilzkörperkortex; p: posterior; d: dorsal; m: medial; l: lateral

3.2.5.1 Der Pilzkörperzellstammbaum 1

PKZSB1 bildet mit seinen Zellen den medialen Bereich des Pilzkörpers (Abb. 13 A-A''). Er besteht im St.17 aus insgesamt $34,7 \pm 3,6$ Zellen ($n=14$). Die Markierungen in OK107>CD8::GFP zeigten, dass sich diese Gesamtzellzahl im St.17 aus $22,6 \pm 4,1$ γ -Neuronen, $4,0 \pm 1$ ni-Typ2-Neuronen und $8,1 \pm 1,5$ ni-Neuronen zusammensetzt (Abb. 14 A-A''; für Zellzahlen L1 siehe Tabelle 1). Die ni-Neurone des PKZSB1 bilden zwei Faszikel. Eines projiziert durch den posterioren Bereich der präoralen Gehirnkommisur in die contralaterale Gehirnhemisphäre und endet dort im posteromedialen Neuropil (Abb. 14 A-B). Das andere Faszikel verbleibt ipsilateral und endet ventral im anteromedialen Neuropil, wahrscheinlich im Bereich des Deutocerebrum (Abb. 14 A-B). Die ni-Typ2-Neurone bilden Neuriten aus, die sich in etwa auf Höhe der Calyx in zwei Äste aufgabeln. Einer der Äste projiziert nach ventromedial und endet im ventralen Bereich des posteromedialen Neuropil der ipsilateralen Hemisphäre (Abb. 14 A-C). Der zweite Ast projiziert durch den Pedunkel, innerviert dann jedoch nicht die Loben, sondern verlässt den Pedunkel im Bereich des Spur und endet, ähnlich dem ersten Ast, in einem ventral gelegenen Bereich des posteromedialen, ipsilateralen Neuropil (Abb. 14 A-C). Es ist auffällig, dass die beiden Regionen, die von den Neuriten der ni-Typ2-Neurone innerviert werden, sehr nahe beieinander liegen (Abb. 14 C''). Zusammengenommen stellen ni-Typ2-Neurone von ihrer Morphologie her einen Zwischentyp zwischen γ -Neuronen und ni-Neuronen dar.

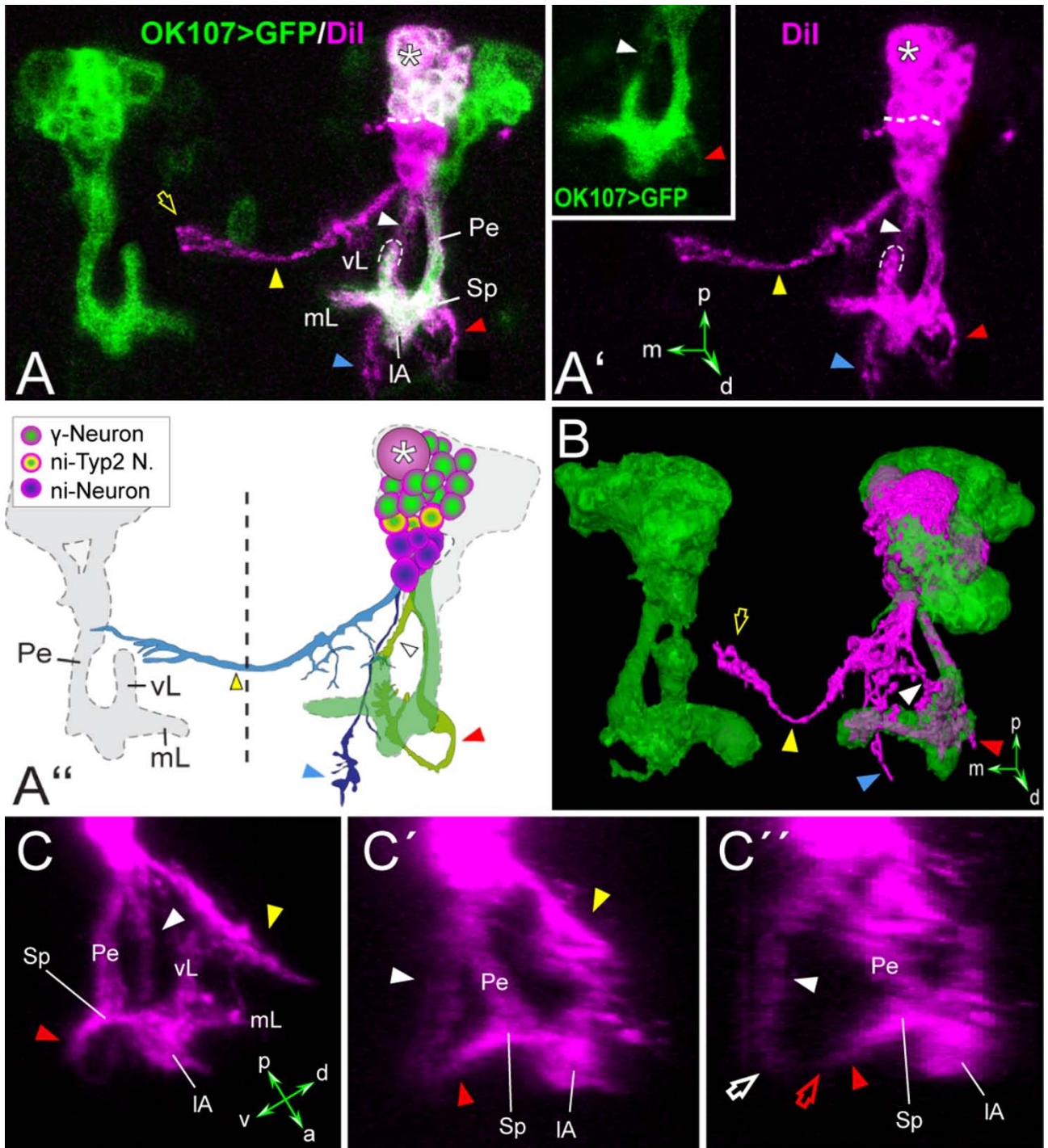









Abb. 14 Der Pilzkörperzellstammbaum 1

A Dil Markierung des PKZSB1 in OK107>CD8::GFP. St.17 Embryo. Ansicht von dorsal. Man sieht den GFP/Dil positiven PKNB1 (✱) und die darunterliegenden GFP/Dil positiven γ -Neurone und ni-Typ2-Neurone (weiß). Unterhalb der γ - und ni-Typ2-Neurone befinden sich die Dil positiven/GFP negativen ni-Neurone (magenta, gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen γ -/ni-Typ2- und ni-Neuronen an). Die ni-Neurone des PKZSB1 bilden zwei Faszikel, wovon eines (▶) durch den posterioren Bereich der Gehirnkommisur projiziert und im posteromedialen Neuropil endet (◀). Das zweite Faszikel verbleibt im ipsilateralen Neuropil und endet im ventralen Bereich des anteromedialen Neuropil (▶). Die ni-Typ2-Neurone des PKZSB1 bilden zwei Äste aus (▶ und ▶). ▶ projiziert nach medial und ventral und endet im ventralen Bereich des posteromedialen Neuropil in der ipsilateralen Hemisphäre. ▶ projiziert

durch den Pedunkel, verlässt diesen im Bereich des Spur und innerviert einen ventral gelegenen Bereich im posteromedialen ipsilateralen Neuropil in der Nähe der von  innervierten Region. **A'** Dil-Markierung des in (A) gezeigten PKZSB1 ohne GFP. Inlay: GFP Expression im Bereich des Pilzkörperneuropil. Man sieht, dass die Faszikel der ni-Typ2-Neurone (, ) GFP-positiv sind. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **A''** Zeichnung der GFP Expression der Pilzkörper (grau) und des in (A) gezeigten PKZSB1. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B** 3D Amira Rekonstruktion eines frühen L1 PKZSB1 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **C-C''** Dil-Markierung des PKZSB1 im späten St.17. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **C** Ansicht von Lateral. Man sieht den Verlauf der beiden Äste der ni-Typ2-Neurone (, ). **C'** Eine im Vergleich zu (C) um 20° nach rechts gedrehte Ansicht. **C''** Eine im Vergleich zu (C) um 40° nach rechts gedrehte Ansicht. Man sieht, wie die beiden Äste im ventralen Bereich des posteromedialen, ipsilateralen Neuropil enden ( bzw. ). **Abkürzungen** Pe: Pedunkel; Sp: Spur; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; vL: vertikaler Lobus; p: posterior; a: anterior; d: dorsal; v: ventral; m: medial

3.2.5.2 Der Pilzkörperzellstammbaum 2

PKZSB2 bildet mit seinen Zellen den intermediären Bereich des Pilzkörpers (Abb. 13 A-A'). Im St.17 besteht er aus insgesamt $32,9 \pm 3,7$ Zellen (n=8). Durch die Markierungen in OK107>UAS-CD8::GFP wird deutlich, dass sich diese Gesamtzellzahl aus $17,6 \pm 2,7$ γ -Neuronen und $15,3 \pm 3,7$ ni-Neuronen zusammensetzt (für Zellzahlen L1 siehe Tabelle 1). Vergleicht man die Anzahl der ni-Neurone der vier PKNBen, so erkennt man, dass PKNB2 die Größte Anzahl von ni-Neuronen hervorbringt (Tabelle 1). Die ni-Neurone dieses ZSB bilden drei Faszikel. Zwei der Faszikel projizieren in die contralaterale Gehirnhemisphäre (Abb. 15 A-A'', C, C'); eines der beiden verläuft durch den posterioren Bereich der präoralen Gehirnkommisur und endet im posteromedialen Neuropil, posterior des medialen Pilzkörperlobus. Das andere Faszikel verläuft durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur und gabelt sich im contralateralen Neuropil ventral des medialen Lobus in einen anterioren und einen posterioren Ast auf. Der posteriore Ast kontaktiert den medialen Lobus durch boutonartige Strukturen, während der anteriore Ast, ebenfalls durch boutonartige Strukturen, Kontakt zum lateralen Appendix des contralateralen Pilzkörpers aufnimmt (Abb. 15 C'). Das dritte Faszikel deszendiert ipsilateral in das ventrale Nervensystem (VNS) (Abb. 15 A-C), verläuft weit medial im Konnektiv und endet bereits in der L1 im Neuropil des terminalen abdominalen Neuromer (Abb. 15 B). PKNB2 bildet somit ni-Neurone, die sowohl das Gehirn mit den abdominalen Neuromeren verbinden, als auch ni-Neurone, die die Pilzkörper der contralateralen Hemisphäre kontaktieren.

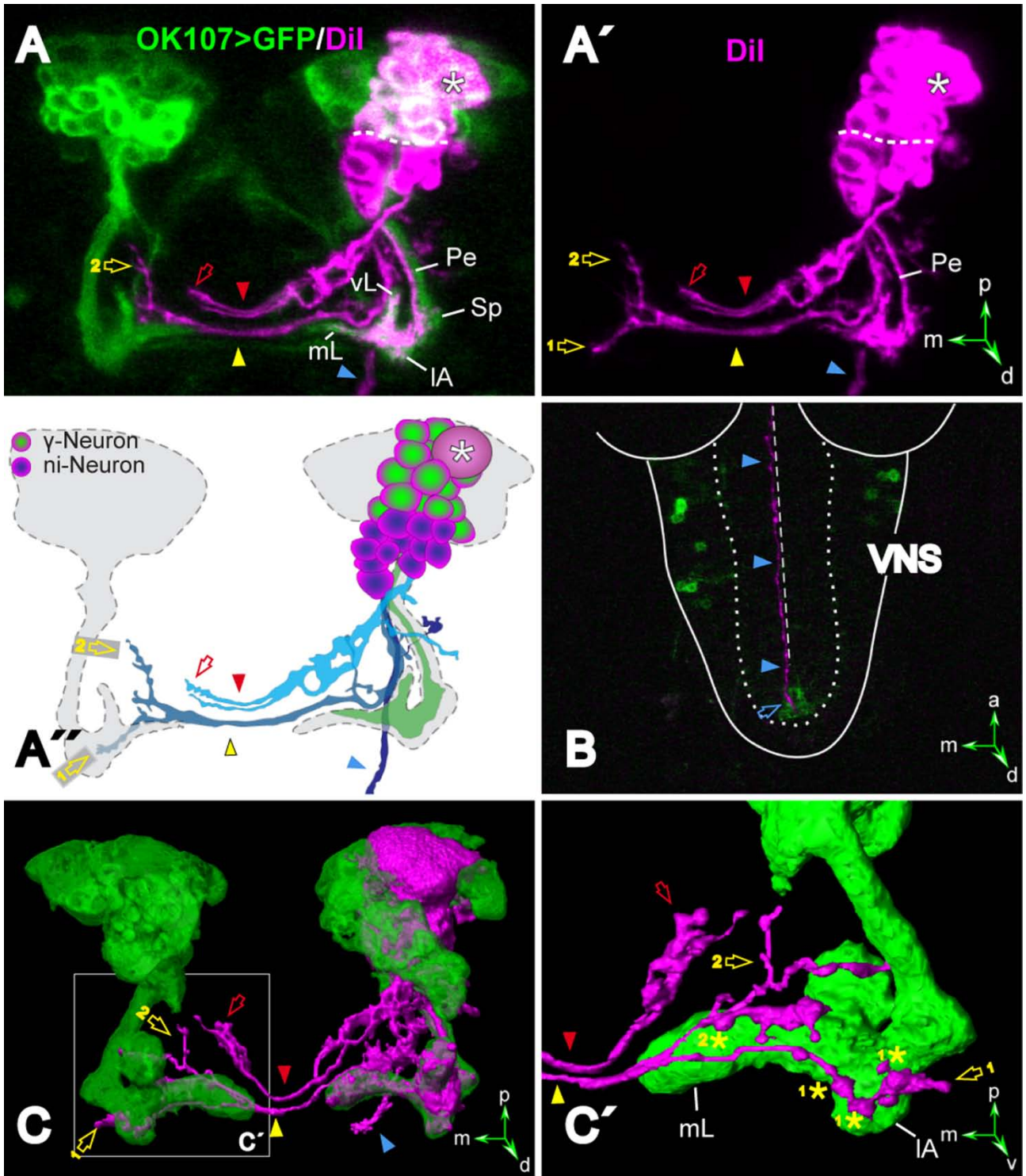











Abb. 15 Der Pilzkörperzellstammbaum 2

A Dil-Markierung des PKZSB2 in $OK107>CD8::GFP$. St.17 Embryo. Ansicht von dorsal. Man sieht den GFP/Dil positiven PKNB2 (*). Die darunterliegenden GFP/Dil positiven γ -Neurone. Unterhalb der γ -Neurone befinden sich die Dil positiven/GFP negativen ni-Neurone (magenta, gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen γ - und ni-Neuronen an). Die ni-Neurone des PKZSB2 bilden 3 Faszikel, wovon 2 contralateral durch die Gehirnkommisur projizieren (▶ und ▶). ▶ verläuft durch den posterioren Bereich der Kommissur und endet im posteromedialen, contralateralen Neuropil, posterior des medialen Pilzkörperlobus (◀). ▶ verläuft durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur und gabelt sich ventral des

medialen Lobus in einen anterioren (siehe (A', A'', C, C')) und einen posterioren () Ast auf. Das dritte Faszikel () deszendiert ins VNS. **A'** Dil-Markierung des in (A) gezeigten PKZSB2 ohne GFP. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Zusätzlich sieht man in dieser Ansicht auch den anterioren Ast () von **A''**. **A''** Zeichnung der GFP Expression der Pilzkörper (grau) und des in (A) gezeigten PKZSB2. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A'). **B** Rekonstruktion konfokalmikroskopischer LSM Aufnahmen des ventralen Nervensystems (VNS). Man sieht den Verlauf des ipsilateralen, deszendierenden Faszikels () im Neuropil des VNS und wie es im terminalen abdominalen Neuromer endet (). **C** 3D Amira Rekonstruktion eines frühen L1 PKZSB2 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A'). **C'** Ventrale Detailansicht des in (C) umrahmten Bereiches der Region des contralateralen Pilzkörperneuropil. Man sieht, wie neuritische Endigungen des anterioren Astes () boutonartige Strukturen im Bereich des lateralen Appendix bilden () und wie eine neuritische Endigung des posterioren Astes () mit ihren boutonartigen Strukturen den medialen Lobus kontaktiert (). **Abkürzungen** Pe: Pedunkel; Sp: Spur; lA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; vL: vertikaler Lobus; VNS: ventrales Nervensystem; p: posterior; a: anterior; d: dorsal; v: ventral; m: medial

3.2.5.3 Der Pilzkörperzellstammbaum 3

PKZSB3 bildet den lateralen Bereich des Pilzkörpers (Abb. 13 A-A'). Seine Gesamtzellzahl im St.17 beträgt $29,2 \pm 1,9$ Zellen (n=6). Markierungen in OK107>CD8::GFP zeigten, dass sich diese Gesamtzellzahl aus $18,3 \pm 1$ γ -Neuronen und $10,8 \pm 1,0$ ni-Neuronen zusammensetzt (für Zellzahlen L1 siehe Tabelle 1). PKNB3 bringt somit die geringste Anzahl an Zellen hervor. Der Unterschied in der Zellzahl, verglichen mit den drei anderen PKZSBen, ist bedingt durch die geringe Zahl an γ -Neuronen, die der PKZSB3 enthält (Tabelle 1). Die ni-Neurone bilden vier contralateral projizierende Faszikel, von denen eines durch den posterioren Bereich der präoralen Gehirnkommisur projiziert. In seinem weiteren Verlauf im contralateralen Neuropil projiziert das Faszikel durch den Bereich zwischen vertikalem Lobus und Pedunkel, bevor es im posterolateralen Neuropil endet (Abb. 16 A-B'). Zwei der Faszikel der ni-Neurone verlaufen durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur. Eines der beiden projiziert nach Eintritt ins contralaterale Neuropil dorsal am medialen Lobus vorbei nach posterior und endet im dorsalen Bereich des posteromedialen Neuropil (Abb. 16 A-B'). Das andere der intermediär durch die Kommisur projizierenden Faszikel endet im Bereich ventral des Spur und bildet boutonartige Strukturen auf der Oberfläche des medialen Lobus aus (Abb. 16 A-B'). Das vierte Faszikel verläuft in engem Kontakt mit dem Bereich der Lobe-junction des ipsilateralen Pilzkörpers (Abb. 16 B''), projiziert weiter durch den anterioren Bereich der Gehirnkommisur (Abb. 16 A-B') und endet im contralateralen Neuropil ventral der Region des lateralen Appendix, wobei ein Ausläufer den Bereich der Lobe-junction mit einer boutonartigen Struktur kontaktiert (Abb. 16 B').

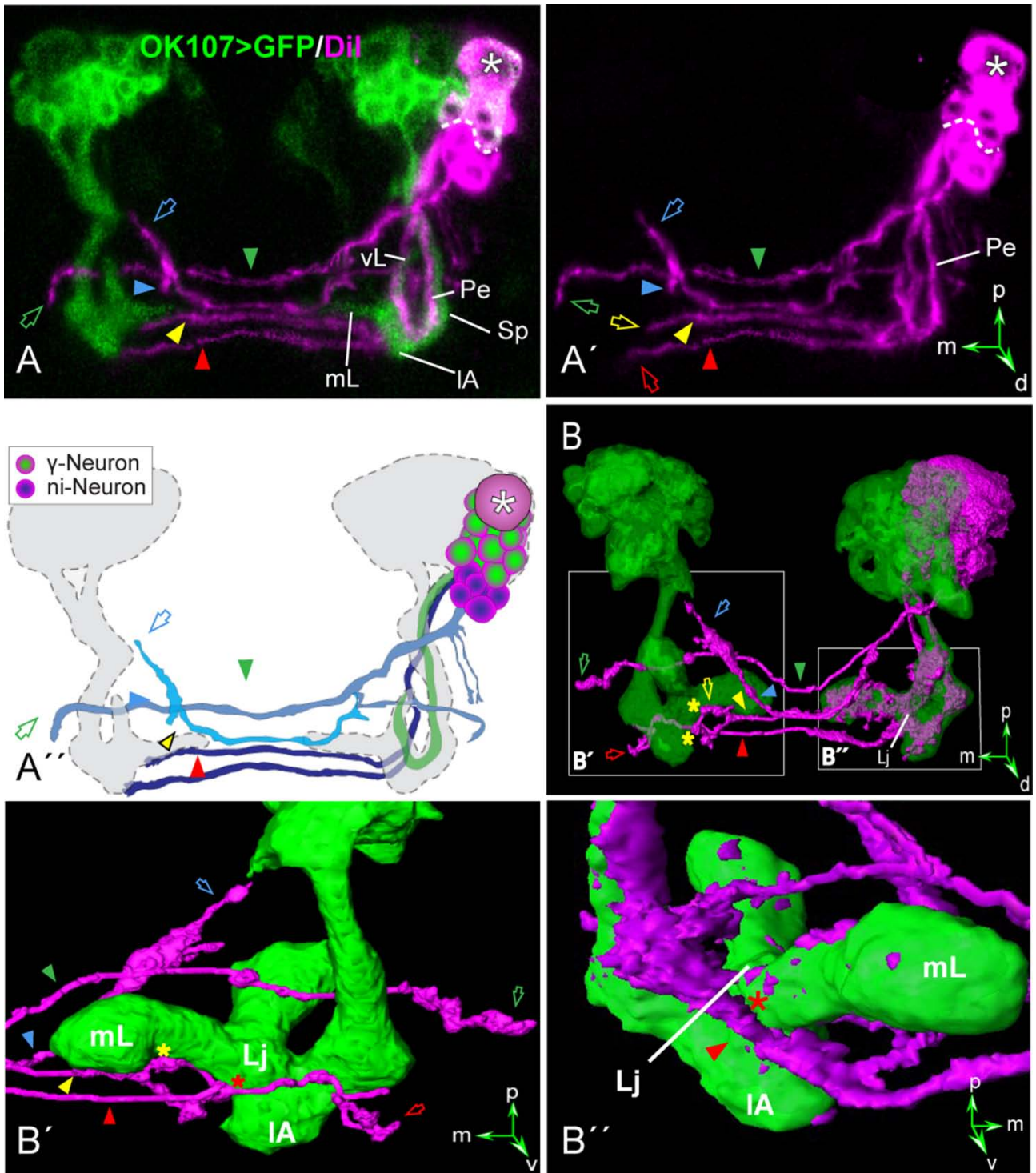
















Abb. 16 Der Pilzkörperzellstammbaum 3

A Dil-Markierung des PKZSB3 in $OK107>CD8::GFP$. St.17 Embryo. Ansicht von dorsal. Man sieht den GFP/Dil positiven PKNB3 (☒) und die darunterliegenden GFP/Dil positiven γ -Neurone. Unterhalb der γ -Neurone befinden sich die Dil positiven/GFP negativen ni-Neurone (magenta, gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen γ - und ni-Neuronen an). Die ni-Neurone bilden 4 contralateral projizierende Faszikel (▶, ▶, ▶ und ▶). ▶ verläuft durch den posterioren Bereich der Kommissur, projiziert im contralateralen Neuropil durch den Bereich zwischen vertikalem Lobus und Pedunkel und endet im posterolateralen Neuropil (◁). ▶ und ▶ verlaufen durch den intermediären Bereich der Kommissur. ▶ verläuft nach Austritt aus der

Kommissur nach posterior und endet im dorsalen Bereich des posteromedialen Neuropil (◀).  projiziert in einen Bereich ventral des Spur.  verläuft durch den anterioren Bereich der Kommissur und projiziert in einen Bereich ventral des lateralen Appendix. **A'** Dil-Markierung des in (A) gezeigten PKZSB3 ohne GFP. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Zusätzlich sieht man in dieser Ansicht auch das Ende () des Faszikels  und das Ende () des Faszikels . **A''** Zeichnung der GFP Expression der Pilzkörper (grau) und des in (A) gezeigten PKZSB3. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B** 3D Amira Rekonstruktion eines frühen L1 PKZSB3 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A'). Zusätzlich sieht man in dieser Ansicht den Kontakt des Faszikels  mit dem proximalen Bereich des contralateralen, medialen Pilzkörperlobus in Form von boutonartigen Strukturen () **B'** Ventrale Detailansicht des in (C) umrahmten Bereiches der Region des contralateralen Pilzkörperneuopil. Gezeigt ist der Kontakt des Faszikel  mit dem proximalen Bereich des medialen Pilzkörperlobus () und der Kontakt des Faszikel  mit der contralateralen Lobe-junction (). **B''** Detailansicht des in (C) umrahmten Bereiches der Region der ipsilateralen PK Loben. Das Faszikel  verläuft in sehr engem Kontakt () mit der ipsilateralen Lobe-junction. **Abkürzungen** Pe: Pedunkel; Sp: Spur; lA: lateraler Appendix; Lj: Lobe-junction; mL: medialer Lobus; vL: vertikaler Lobus; p: posterior; d: dorsal; v: ventral; m: medial

3.2.5.4 Der Pilzkörperzellstammbaum 4

PKZSB4 bildet mit seinen Nachkommenzellen den anterodorsalen Bereich des Pilzkörperkortex (Abb. 13 A-A'). Im St.17 beträgt seine Gesamtzellzahl $44,6 \pm 6,0$ Zellen ($n=8$). Dil-Markierungen in OK107>CD8::GFP Embryonen zeigen, dass sich diese Gesamtzellzahl aus $35,9 \pm 6,1$ γ -Neuronen und $8,8 \pm 1,8$ ni-Neuronen zusammensetzt (für Zellzahlen L1 siehe Tabelle 1). PKNB4 bildet also den größten der vier Pilzkörperzellstammbäume. Dies ist bedingt durch die deutlich größere Zahl an γ -Neuronen, die dieser ZSB im Vergleich zu den drei anderen ausbildet (Tabelle 1). Seine ni-Neurone bilden vier Faszikel aus. Eines verbleibt ipsilateral, projiziert ventral am medialen Lobus des ipsilateralen Pilzkörper vorbei und endet danach ventral im anteromedialen Neuropil der ipsilateralen Hemisphäre, in einer Region, die wahrscheinlich dem Deutocerebrum zuzuordnen ist (Abb. 17 A-A'). Die drei anderen Faszikel projizieren contralateral. Das erste verläuft posterior durch die Gehirnkommissur und endet posterior des medialen Pilzkörperlobus im posteromedialen Bereich des Gehirnneuopil (Abb. 17 A-B'). Die beiden anderen Faszikel verlaufen durch den intermediären Bereich der Kommissur. Eines der beiden verläuft ventral des medialen Lobus (Abb. 17 A-B') und kontaktiert den Bereich der Lobe-junction des contralateralen Pilzkörpers mit boutonartigen Verdickungen (Abb. 17 B'). Das andere verläuft anterior des medialen Lobus und innerviert eine Region anterior des lateralen Appendix (Abb. 17 A-B'), wobei es mit einem Ausläufer auch Kontakt zu diesem aufnimmt (Abb. 17 B').

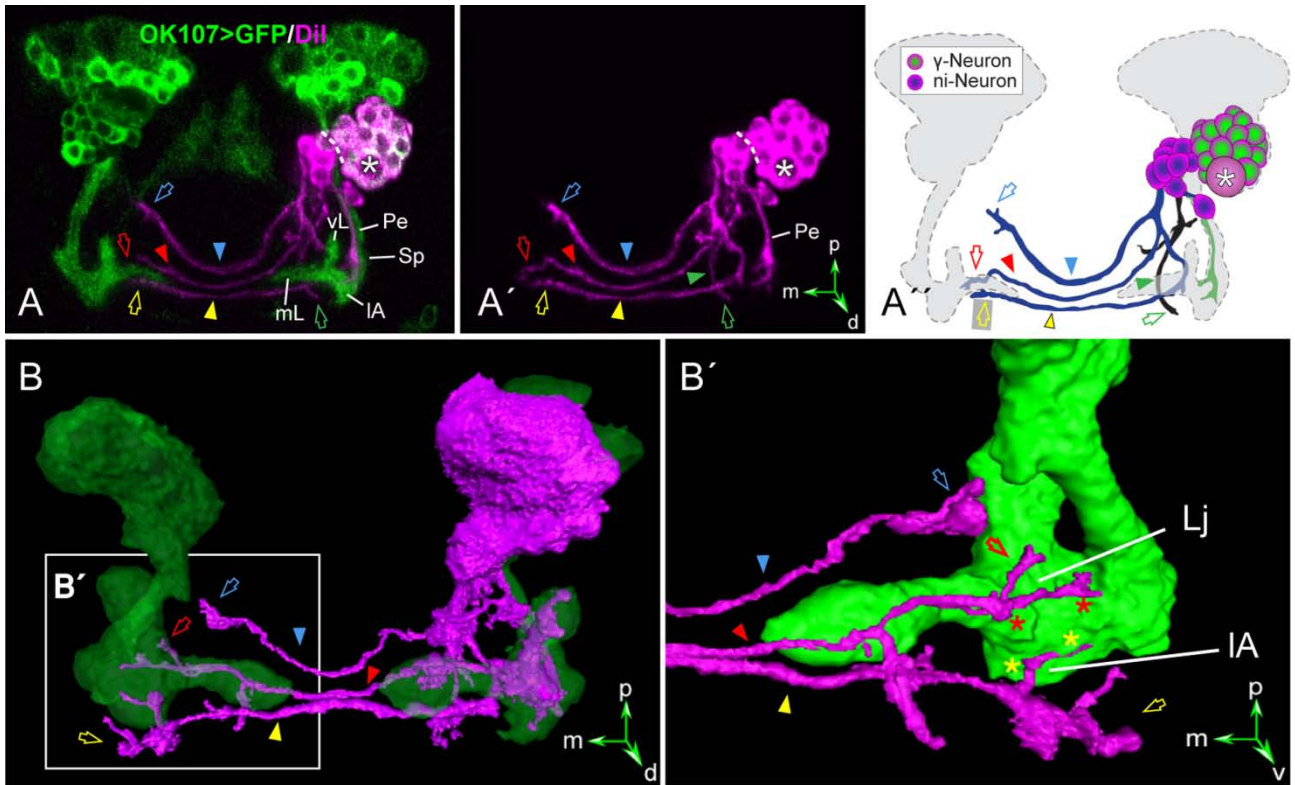


Abb. 17 Der Pilzkörperzellstammbaum 4

A Dil Markierung des PKZSB4 in OK107>CD8::GFP. St.17 Embryo. Ansicht von dorsal. Man sieht den GFP/Dil positiven PKNB4 (☒) und die darunterliegenden GFP/Dil positiven γ -Neurone. Unterhalb der γ -Neurone befinden sich die Dil positiven/GFP negativen ni-Neurone (magenta, gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen γ - und ni-Neuronen an). Die ni-Neurone bilden 3 contralateral projizierende Faszikel (▶, ▶ and ▶) und ein im ipsilateralen Neuropil verbleibendes Faszikel (▶). ▶ projiziert durch den posterioren Bereich der Kommissur und endet posterior des medialen Pilzkörperlobus im posteromedialen Bereich des Gehirnneuropil (▶). ▶ verläuft durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur und endet ventral des medialen Pilzkörperlobus (▶). ▶ projiziert ebenfalls durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur, verläuft anterior des medialen Lobus und endet im Bereich anterior des lateralen Appendix (▶). ▶ verbleibt im ipsilateralen Neuropil, wobei es ventral des medialen Lobus verläuft und im anteromedialen Neuropil der ipsilateralen Hemisphäre, wahrscheinlich im Deutocerebrum, endet (▶). **A'** Dil-Markierung des in (A) gezeigten PKZSB4 ohne GFP. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **A''** Zeichnung der GFP Expression der Pilzkörper (grau) und des in (A) gezeigten PKZSB4. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B** 3D Amira Rekonstruktion eines frühen L1 PKZSB4 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B'** Ventrale Detailansicht des in (B) umrahmten Bereiches der Region des contralateralen Pilzkörperneuropil. Man sieht, wie neuritische Endigungen des Faszikels ▶ den Bereich der Lobe-junction des contralateralen Pilzkörpers kontaktieren (★) und wie das Faszikel ▶ den lateralen Appendix kontaktiert (▶). **Abkürzungen** Pe: Pedunkel; Sp: Spur; IA: lateraler Appendix; Lj: Lobe-junction; mL: medialer Lobus; vL: vertikaler Lobus; p: posterior; d: dorsal; v: ventral; m: medial

| PKNB | Stadium 17 | | | | frühes L1 (1-3 Std. nach Schlupf) | | | | ni-Neuronen Faszikel | | Position NB und Nachkommenzellen in der PK-Anlage | Delaminationszeitpunkt des NB |
|------------------------|------------|------------|-------------------|-----------------|-----------------------------------|------------|-------------------|-----------------|----------------------|--------------|---|-------------------------------|
| | Zellzahl | ni-Neurone | γ -Neurone | ni-Typ2-Neurone | Zellzahl | ni-Neurone | γ -Neurone | ni-Typ2-Neurone | contra-lateral | ipsi-lateral | | |
| PKNB1 (Pcv9) (n=14) | 34,7 ± 3,6 | 8,1 ± 1,5 | 22,6 ± 4,1 | 4,0 ± 1,0 | 42,3 ± 7,5 (n=3) | 7,3 ± 1,5 | 31,0 ± 7,2 | 4,0 ± 1,0 | 1 | 1 (DC?) | medial | spätes St.8 |
| PKNB2 (Pcd4) (n=8) | 32,9 ± 3,7 | 15,3 ± 3,7 | 17,6 ± 2,7 | - | 39,3 ± 2,7 (n=6) | 13,5 ± 1,0 | 25,8 ± 3,3 | - | 2 | 1 (VNS) | intermediär | spätes St.8 |
| PKNB3 (Pcd9) (n=6) | 29,2 ± 1,9 | 10,8 ± 1,0 | 18,3 ± 1,0 | - | 36,2 ± 1,9 (n=6) | 10,5 ± 1,9 | 25,7 ± 1,4 | - | 4 | - | lateral | spätes St.8 |
| PKNB4 (Pcd2) (n=8) | 44,6 ± 6,0 | 8,8 ± 1,8 | 35,9 ± 6,1 | - | 48,0 ± 1,7 (n=3) | 7,0 ± 0,0 | 41,0 ± 1,7 | - | 3 | 1 (DC?) | anterior | spätes St.8 |

Tabelle 1 Statistiken über Pilzkörperzellstammbäume im St.17 und L1
 Abkürzungen: DC: Deutocerebrum; VNS: ventrales Nervensystem

3.2.6 PKNBen bringen verschiedene Neuronentypen in aufeinanderfolgenden Zeitfenstern hervor

Vergleicht man die Lage der von den PKNBen hervorgebrachten Neurone (γ -Neurone, ni-Typ2-Neurone (im Falle von PKNB1) und ni-Neurone) innerhalb des Kortex, so fällt einem ihre Schichtung von apikal (γ -Neurone) nach basal (ni-Neurone) auf. Im Falle des PKZSB1 liegen seine ni-Typ2-Neurone zwischen γ - und ni-Neuronen. Für das embryonale VNS wurden solche Schichtungen in Zusammenhang mit der zeitlichen Abfolge der Entstehung von Zellen aufgezeigt (Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998; Pearson and Doe, 2003). Um zu untersuchen, ob die PKNBen die erwähnten Neuronentypen in aufeinanderfolgenden Zeitfenstern hervorbringen, was die zu beobachtende Schichtung erklären würde, wurden Ablationsexperimente unternommen. Hierbei wurde, nach erfolgter Dil-Markierung (in OK107>CD8::GFP), eine Ablation des durch seine Größe eindeutig zu erkennenden PKNB in den St.11-14 durchgeführt. Im St.17 wurde dann der ZSB auf das Vorhandensein und die Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen hin untersucht (Abb. 18 E). Auf diese Weise konnte ermittelt werden, wie viele Zellen von welchem Zelltyp von dem PKNB bis zu seiner Ablation gebildet worden waren. Ablationen in den

PKNBen, die nur γ - und ni-Neurone hervorbringen (PKNB2-4), ergaben, dass im Falle des PKNB2 Ablationen im St.13 oder später (n=4) zu einer wildtypischen Anzahl von ni-Neuronen, jedoch zu einer stark reduzierten Anzahl von γ -Neuronen führten (Abb. 18 C, C'). Ablationen im St.12 (n=3) ergaben, dass nun keine γ -Neurone mehr vorhanden waren und zusätzlich die Zahl der noch vorhandenen ni-Neurone reduziert war. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der PKNB2 im St.13 von der Produktion von ni-Neuronen auf die Produktion von γ -Neuronen umschaltet (Abb. 18 G). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Ablationen von PKNB3 (n=3; Abb. 18 D, D') und PKNB4 (n=3; Abb. 18 B, B') erhalten. Diese ZSBe schalten jedoch bereits früher von der Produktion von ni-Neuronen auf die Produktion von γ -Neuronen um. So bildet PKNB3 im St.12 die ersten γ -Neurone und PKNB4 bereits ab St.11 (Abb. 18 G). Die Ablationsergebnisse für PKNB1 (n=6) (Abb. 18 A, A') ergaben, dass dieser bis ins St.11 ni-Neurone bildet, dann bis ins St.12 ni-Typ2-Neurone produziert und danach mit der Bildung von γ -Neuronen beginnt (Abb. 18 G). Durch die erfolgten Ablationen konnte auch auf die Anzahl der vorhandenen ni-Typ2-Neurone geschlossen werden. Demnach bildet PKNB1 ca. vier ni-Typ2-Neurone (Tabelle 1). Es zeigte sich also bei allen vier PKNBen, dass sie nach ihrer Delamination zuerst eine Population von Neuronen hervorbringen, die nicht unmittelbar am Aufbau des Pilzkörpers beteiligt sind (ni-Neurone) und erst danach (ausgenommen ist der PKNB1, der nach den ni-Neuronen noch ni-Typ2-Neurone bildet), in den St. 11-13 (abhängig vom jeweiligen PKNB), die ersten γ -Neurone generieren. Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurden auch Ablationen der frühen Nachkommenszellen (Abb. 18 F) von PKNB1 (n=2; Abb. 18 A, A'') und PKNB4 (n=2; Abb. 18 B, B'') im St. 12 durchgeführt. Die Resultate dieser Ablationen waren konsistent mit der soeben beschriebenen Geburtenreihenfolge der verschiedenen Zelltypen. Die Ablationen der frühen Nachkommenszellen führten zu St.17 PKZSBen mit fehlenden oder in ihrer Anzahl stark verringerten ni- bzw. ni-Typ2-Neuronen. Die Anzahl der γ -Neurone war hingegen nicht reduziert.

Ergebnisse

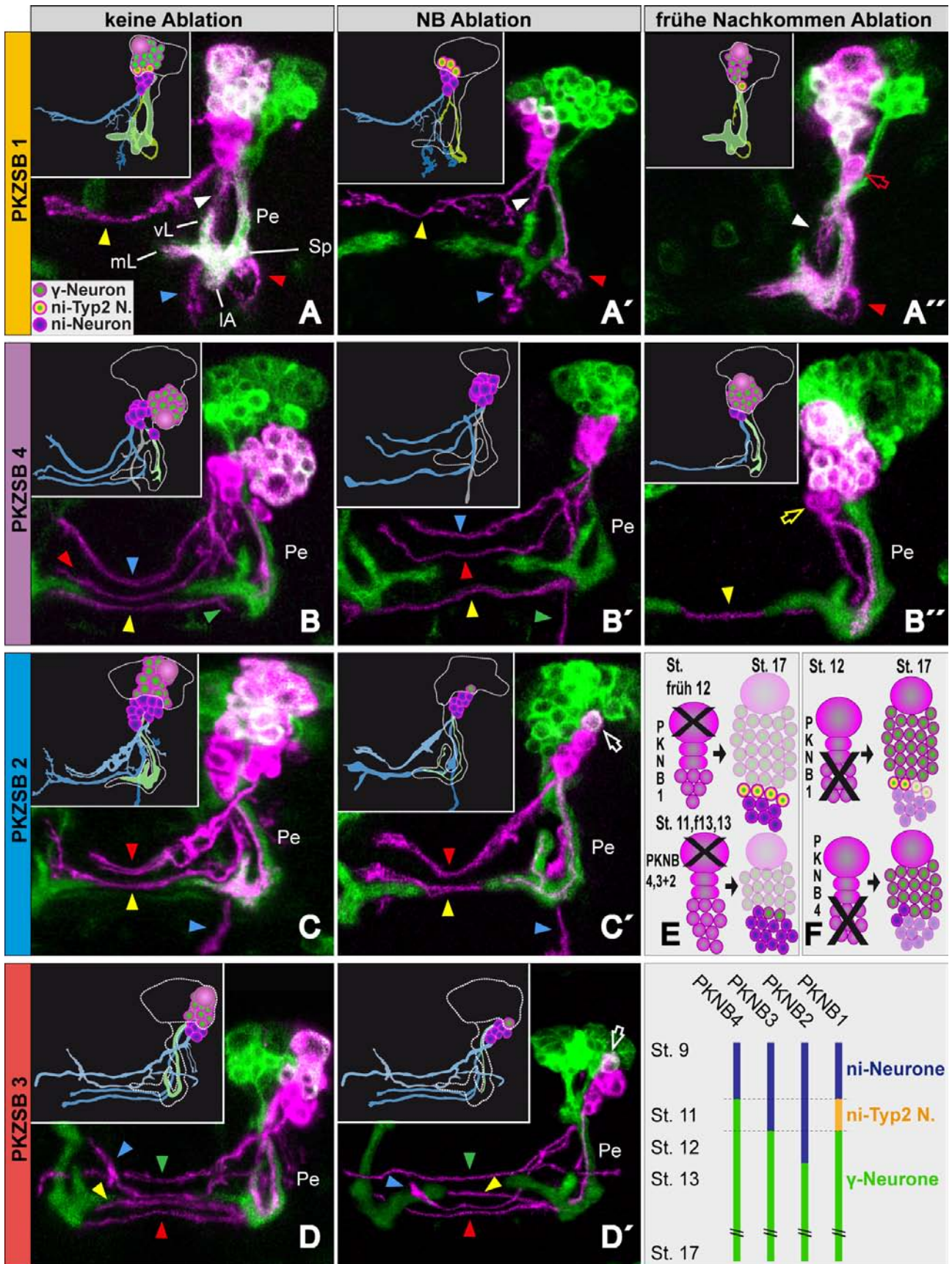


Abbildung 18

Abb. 18 Ablation von PKNBen und frühen Nachkommenzellen

A-D' Die PKZSB_e1-4 im St.17 in OK107>CD8::GFP. Ansicht von anterodorsal (Körperachse). Die Inlays oben links zeigen jeweils ein Schema des gezeigten PKZSB. **A** PKZSB1 unablatiert. Man sieht die beiden Faszikel der ni-Neurone (■ und ▲) und die beiden Äste der bifurkierenden ni-Typ2-Neurone (▣ und ▤). Pedunkel und Loben werden von den γ-Neuronen (weiß) innerviert. **A'** PKZSB1, bei dem im frühen St.12 der NB ablatiert wurde. Der ZSB zeigt sowohl alle ni-Neuronen-Faszikel (■ und ▲) als auch die beiden Äste der bifurkierenden ni-Typ2-Neurone (▣ und ▤). PKNB1 hat vor seiner Ablation keine γ-Neurone gebildet (keine Dil-positiven Axone im Bereich der Loben). **A''** PKZSB1, bei dem im St.12 die frühen Tochterzellen ablatiert wurden. Der ZSB zeigt keine ni-Neuronen Faszikel mehr. Man erkennt jedoch noch die beiden Äste der bifurkierenden ni-Typ2-Neurone (▣ und ▤), die von einem nicht ablatierten ni-Typ2-Neuron stammen (◊). Der ZSB weist die volle Anzahl an γ-Neuronen auf (weiß), die den Pedunkel und die Loben innervieren. **B** PKZSB4 unablatiert. Man sieht die 4 Faszikel der ni-Neurone (▲, ▤, ■ und ▥). Die γ-Neurone (weiß) innervieren den Pedunkel. **B'** PKZSB4, bei dem im frühen St.11 der NB ablatiert wurde. Der ZSB zeigt alle ni-Neuronen-Faszikel (▲, ▤, ■ und ▥), weist jedoch keine γ-Neurone auf. **B''** PKZSB4, bei dem im St.12 die frühen Tochterzellen ablatiert wurden. Der ZSB zeigt nur noch wenige ni-Neurone (■) und nur noch eines der 4 ni-Neuronen Faszikel (▥). Die Anzahl der γ-Neurone (weiß) wurde durch die Ablation nicht beeinträchtigt. **C** PKZSB2 unablatiert. Man sieht die 3 Faszikel der ni-Neurone (▤, ■ und ▲) und die Innervation des Pedunkels und der Loben durch die γ-Neurone (weiß). **C'** PKZSB2, bei dem im St.13 der NB ablatiert wurde. Der ZSB zeigt alle ni-Neuronen-Faszikel (▤, ■ und ▲), weist jedoch nur noch ein einziges γ-Neuron (◊) auf. **D** PKZSB3 unablatiert. Man sieht die 4 Faszikel der ni-Neurone (▲, ▤, ■ und ▥) und die Innervation des Pedunkels und des vertikalen Lobus durch die γ-Neurone (weiß). **D'** PKZSB3, bei dem im frühen St.13 der NB ablatiert wurde. Der ZSB zeigt alle ni-Neuronen-Faszikel (▲, ▤, ■ und ▥), weist jedoch nur noch ein einziges γ-Neuron (◊) auf. **E** Schematische Darstellung der Ablation von PKNBen. Nach der Ablation des PKNB verbleiben nur noch die Zellen, die der NB bis zum Zeitpunkt seiner Ablation gebildet hat. Oben: Ablation des PKNB1 im frühen St.12. Der resultierende PKZSB1 im St.17 enthält nur noch ni-Neurone und ni-Typ2-Neurone. Unten: Ablation des PKNB4 (im St.11), PKNB3 (im frühen St. 13) und PKNB2 (im St.13). Ablatiert man den PKNB_{4,3} bzw. 2 zu den angegebenen Stadien, so enthält der resultierende ZSB im St.17 nur noch ni-Neurone und keine (oder nur sehr wenige) γ-Neurone. **F** Ablation der frühen Nachkommenzellen des PKNBen1 (oben) und PKNBen4 (unten) im St.12. Die resultierenden ZSB_e beinhalten die volle Anzahl an γ-Neuronen. Im Falle des PKNB1 findet man keine ni-Neurone und eine verminderte Anzahl an ni-Typ2-Neuronen. Im Falle des PKNB4 fehlt der größte Teil der ni-Neurone. **G** Schematische Darstellung der zeitlichen Entstehung der verschiedenen Neuronentypen der PKNBen. **Abkürzungen:** Pe: Pedunkel; Sp: Spur; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; vL: vertikaler Lobus; ni-Typ2: ni-Typ2-Neuron

3.2.7 Die Entwicklung des Pedunkel, der Loben und der Calyx erfolgt in klon-spezifischer Weise

Wie gezeigt hat jeder PKNB eine eigene Identität, welche sich durch individuelle Genexpression (siehe 3.2.4) sowie durch Komposition, Anzahl und Geburtszeitpunkt seiner Nachkommenzellen ausdrückt (siehe 3.2.5 - 3.2.6). Diese Individualität stellt einen Unterschied zur postembryonalen Entwicklung der Pilzkörper dar, während derer die vier PKNBen nicht voneinander zu unterscheidende Sets von Nachkommenzellen hervorbringen (Ito et al., 1997). Angesichts der gefundenen Individualität der embryonalen PKNBen stellte ich mir die Frage, ob sich diese Individualität auch in der Entwicklung ihrer γ-Neurone widerspiegelt. Diese Frage konnte nun beantwortet werden, da die klonalen Analysen mittels der Dil-Technik es erstmalig ermöglichten die Differenzierung des

Pilzkörperneuropils auf Ebene einzelner PKZSBe zu untersuchen, bzw., im Falle von iontophoretischen Einzelzellmarkierungen, auf Ebene individueller γ -Neurone. Durch Verwendung von OK107>CD8::GFP Embryonen wurden der Pedunkel, die Calyx und die Loben durch die Expression des GFP-Reportergens sichtbar gemacht. Die GFP-Expression konnte demnach als Referenz genutzt werden, anhand derer man den Differenzierungsgrad der γ -Neurone eines Dil-markierten PKNB-Klons oder einer markierten Einzelzelle im Kontext der gesamten Pilzkörperneuropilenwicklung untersuchen konnte. Beim Vergleich des zeitlich-räumlichen Ablaufs der Differenzierung der γ -Neurone wurden klon-spezifische Unterschiede ersichtlich.

3.2.7.1 Unterschiede im zeitlichen Auswachsen der Axone der γ -Neurone

Untersucht man individuelle PKZSBe während der Differenzierung des Pedunkels und der Loben (frühes St.17 bis L1), so erkennt man, dass die γ -Neurone der PKZSBe in einer zeitlichen Abfolge zum Aufbau der eben genannten Strukturen beitragen. Als Referenzpunkt wurde dabei das distale Ende der Gesamtheit aller auswachsenden γ -Neurone (GFP-positiv) gewählt und mit dem jeweils distalen Ende der Dil-markierten γ -Neurone eines jeden der vier PKZSBe verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die γ -Neurone des PKZSB1 als erste mit ihrem Auswachsen beginnen. Die Wachstumskegel der γ -Neurone des PKZSB1 lagen stets gleichauf mit der distalsten Grenze der GFP-exprimierenden γ -Neurone (n=8) (Abb. 19 A-C'). Im Vergleich dazu lagen die Wachstumskegel der γ -Neurone von PKZSB2 (n=6) und PKZSB3 (n=9) während der Pedunkelentwicklung weiter hinter dieser Grenze zurück (Abb. 19 E-F' bzw. Abb. 19 H-I'). PKZSB4 γ -Neurone (Abb. 19 K, K') lagen in vergleichbaren Stadien stets am weitesten hinter dieser distalen Grenze zurück (n=8), was impliziert, dass diese zuletzt auswachsen. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich folgende Reihenfolge für das Auswachsen der γ -Neurone der vier verschiedenen PKZSBe: 1. PKZSB1, 2. PKZSB2+3, 3. PKZSB4 (Abb. 19 M).

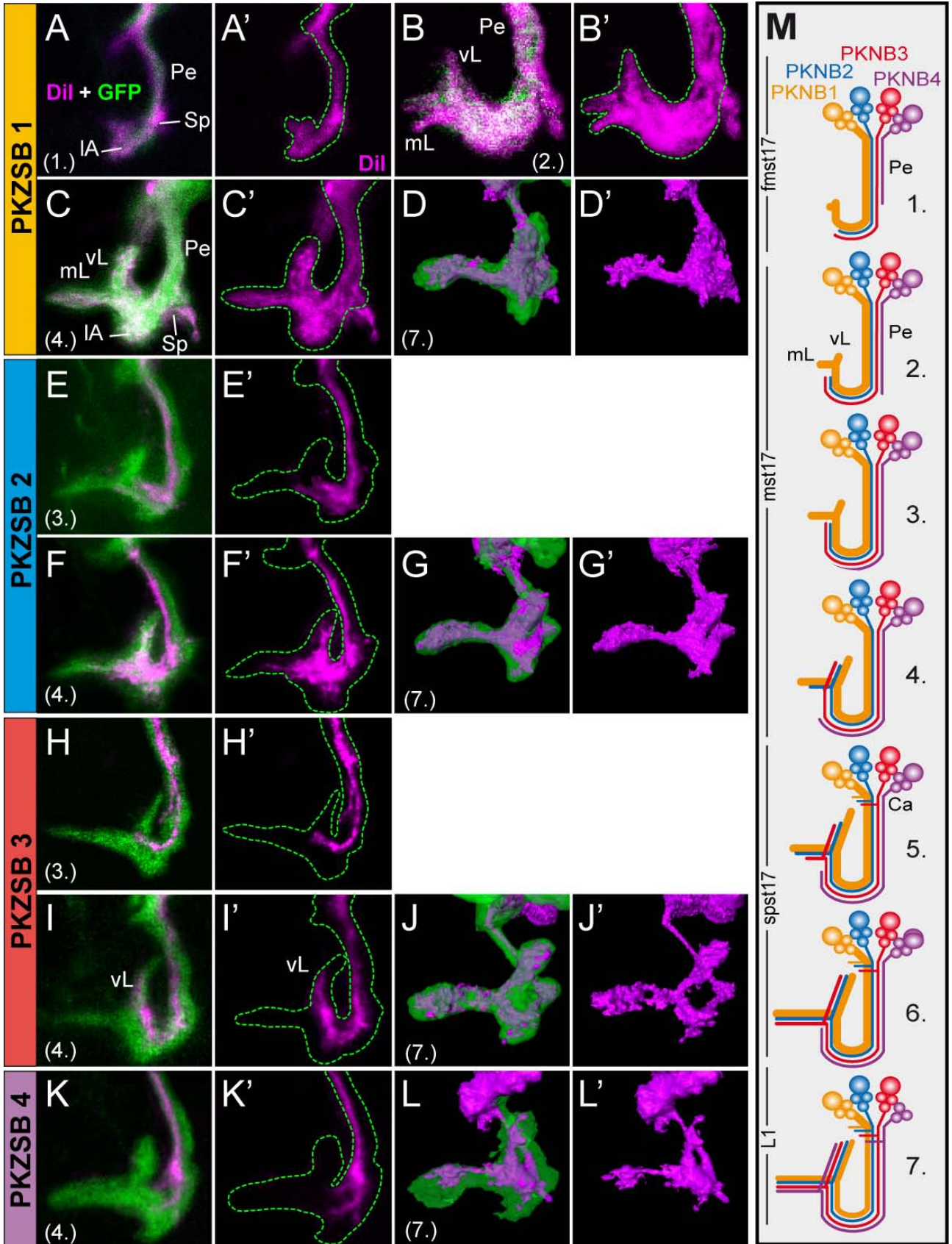


Abbildung 19

Abb. 19 Das Auswachsen der γ -Neurone und die Innervation der Loben zeigt klonspezifische Unterschiede

A-L Die PKZSB_e1-4 in St.17 Embryonen und frühen L1 Larven. Alle Markierungen wurden in OK107>CD8::GFP durchgeführt. Gezeigt sind der Pedunkel und die Loben. Ansicht von dorsal, anterior unten (Körperachse), medial links. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf feinere Unterteilungen des St.17 (siehe (M)). **A** Dil-Markierung des PKZSB1 im St.17(1). Die γ -Neurone beginnen simultan mit der Bildung des medialen und vertikalen Lobus. Die Wachstumskegel der Axone (magenta) befinden sich auf gleicher Höhe wie das GFP Signal (grün). Die Axone verteilen sich über den gesamten Bereich des Pedunkels. **A'** Dil Signal der in (A) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **B** Dil-Markierung des PKZSB1 im St.17(2). Die γ -Neurone fahren mit der Bildung des medialen und vertikalen Lobus fort. Die axonalen Endigungen (magenta) befinden sich auf gleicher Höhe wie das GFP Signal (grün). Die Axone verteilen sich über den gesamten Bereich des Pedunkels. **B'** Dil Signal der in (B) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **C** Dil-Markierung des PKZSB1 im St.17(4). Die axonalen Endigungen (magenta) befinden sich auf gleicher Höhe wie das GFP Signal (grün). Die Axone verteilen sich über den gesamten Bereich des Pedunkels. **C'** Dil Signal der in (C) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **D** Amira Rekonstruktion des Pedunkels und der Loben des PKZSB1 einer L1 Larve. Beide Loben werden innerviert. **D'** Amira Rekonstruktion des Dil Signals der in (D) gezeigten Abbildung. **E** Dil-Markierung des PKZSB2 im St.17(3). Die γ -Neurone stehen kurz vor der Innervation des medialen und vertikalen Lobus. Die Axone (magenta) liegen nicht auf gleicher Höhe mit dem GFP Signal (grün). Die Axone verteilen sich nicht über den gesamten Pedunkelquerschnitt. **E'** Dil Signal der in (E) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **F** Dil-Markierung des PKZSB2 im St.17(4). Die γ -Neurone innervieren simultan den medialen und vertikalen Lobus. Die Axone (magenta) liegen nicht auf gleicher Höhe mit dem GFP Signal (grün). Die Axone verteilen sich nicht über den gesamten Pedunkelquerschnitt. **F'** Dil Signal der in (F) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **G** Amira Rekonstruktion des Pedunkels und der Loben des PKZSB2 einer L1 Larve. Beide Loben werden innerviert. **G'** Amira Rekonstruktion des Dil Signals der in (G) gezeigten Abbildung. **H** Dil-Markierung des PKZSB3 im St.17(3). Die γ -Neurone stehen kurz vor der Innervation des vertikalen Lobus. Die Axone (magenta) liegen nicht auf gleicher Höhe mit dem GFP Signal (grün). Die Axone verteilen sich nicht über den gesamten Pedunkelquerschnitt. **H'** Dil Signal der in (H) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **I** Dil-Markierung des PKZSB3 im St.17(4). Die γ -Neurone innervieren nur den vertikalen Lobus. Die Axone (magenta) liegen nicht auf gleicher Höhe mit dem GFP Signal (grün). Die Axone verteilen sich nicht über den gesamten Pedunkelquerschnitt. **I'** Dil Signal der in (I) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **J** Amira Rekonstruktion des Pedunkels und der Loben des PKZSB3 einer L1 Larve. Beide Loben werden von den γ -Neuronen des PKZSB3 innerviert. **J'** Amira Rekonstruktion des Dil Signals der in (J) gezeigten Abbildung. **K** Dil-Markierung des PKZSB4 im St.17(4). Die Loben werden noch nicht innerviert. Die Axone (magenta) liegen weit hinter dem distalen Ende des GFP Signals zurück (grün). Die Axone verteilen sich nicht über den gesamten Pedunkelquerschnitt. **K'** Dil Signal der in (K) gezeigten Abbildung. Die gestrichelte Linie gibt die Kontur des GFP Signals wider. **L** Amira Rekonstruktion des Pedunkels und der Loben des PKZSB4 einer L1 Larve. Beide Loben werden von den γ -Neuronen des PKZSB4 innerviert. **L'** Amira Rekonstruktion des Dil Signals der in (L) gezeigten Abbildung. **M** Schema zur Verdeutlichung der zellstammbaumspezifischen Unterschiede bei der Entwicklung des Pilzkörperneuropil. St.17 wurde weiter untergliedert (1.-6.). Mit (7.) wird das frühe L1 Stadium bezeichnet.

Abkürzungen: Pe: Pedunkel; Sp: Spur; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; vL: vertikaler Lobus; Ca: Calyx; fmst17: frühes, mittleres St.17; mst17: mittleres St.17; spst17: spätes St.17

3.2.7.2 Unterschiede in der zeitlich-räumlichen Innervation der Loben und der Calyx

In der gleichen zeitlichen Abfolge, die zuvor für das Auswachsen der Axone der γ -Neurone beschrieben wurde, erfolgt auch die Innervation der beiden Loben. Zuerst wachsen die γ -Neurone des PKNB1 im frühen, mittleren St.17 in die Loben ein. Darauf folgen die γ -Neurone der PKNBen2+3 und zuletzt beginnen die γ -Neurone des PKNB4 mit der Innervation der Loben (Abb. 19 M). Neben diesen unterschiedlichen zeitlichen Aspekten der Lobenbildung erkennt man aber auch klonspezifische Unterschiede in der räumlichen Innervation der Loben. Während sowohl die Axone von PKZSB1 (Abb. 19 B, B', C, C', M) als auch die von PKZSB2 (Abb. 19 F, F', M) simultan in den medialen und vertikalen Lobus einwachsen, innervieren die Axone des PKZSB3 zunächst nur den vertikalen Lobus (Abb. 19 I, I', M). Erst im späten St.17 erfolgt eine Innervation des medialen Lobus (Abb. 19 M; Abb. 20 C1, C1'). Bedingt durch die starke zeitliche Verzögerung des Auswachsens der γ -Neurone von PKZSB4, beginnen diese erst zum Zeitpunkt des Schlüpfens mit der Innervation der Pilzkörperloben. Es tragen also erst ab der frühen L1 Larve die γ -Neurone aller vier PKZSBs zum Aufbau der Loben bei (Abb. 19 D, D', G, G', J, J', L, L', M; Abb. 20 A2-D2'). Bei der Innervation der Calyx findet man ähnliche zeitliche Unterschiede wie bei der Lobeninnervation. Während die γ -Neurone der PKZSBs1-3 bereits embryonal zum Aufbau der Calyx beitragen (Abb. 20 A1-C1'), wobei in diesen Fällen keine zeitliche Abfolge erkannt werden konnte, trägt PKZSB4 erst larval zur Calyx bei (Abb. 20 D1-D2').

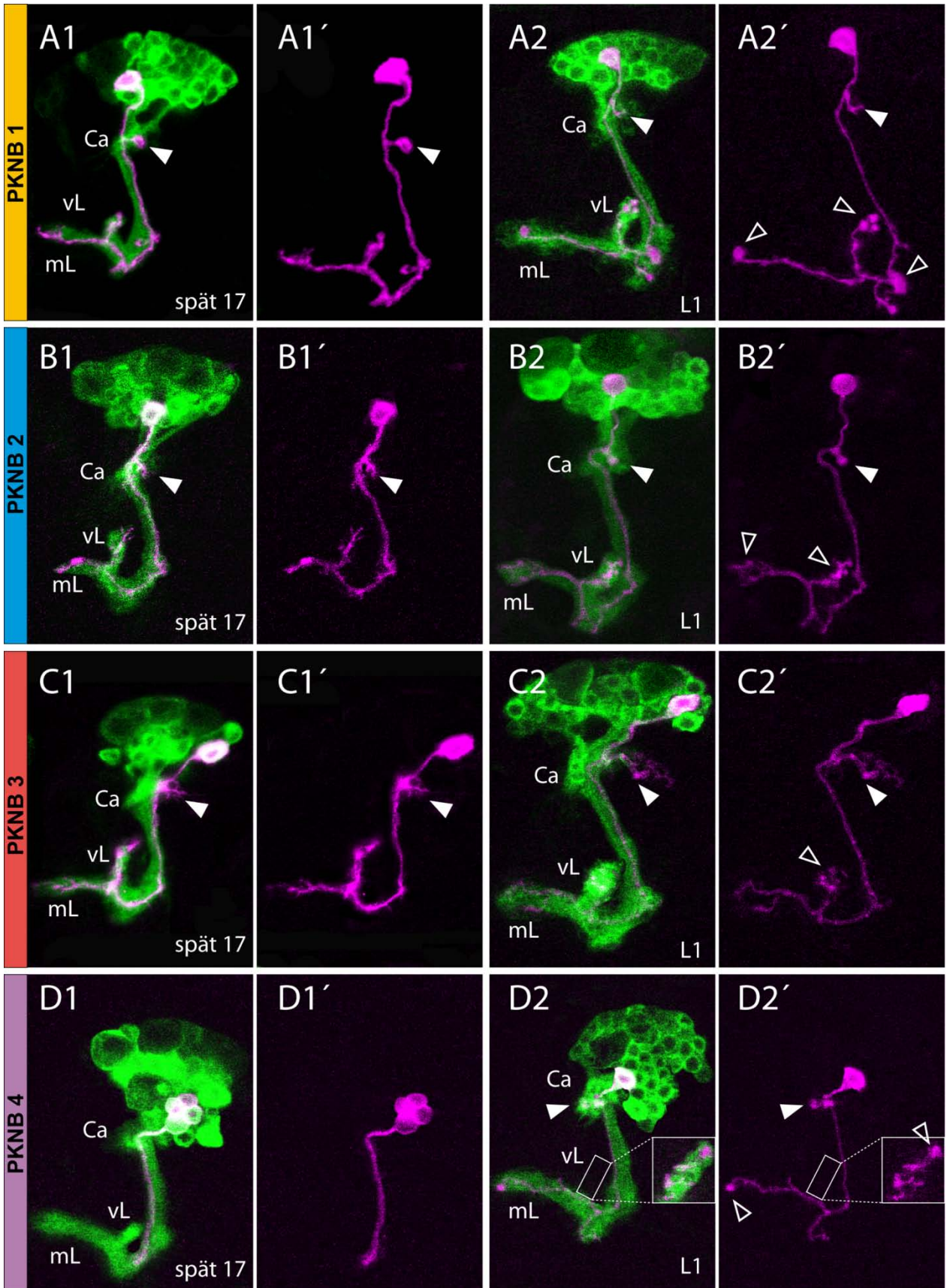


Abbildung 20

Abb. 20 Iontophoretische Dil-Markierungen von γ -Neuronen in OK107>CD8::GFP

A1,B1,C1 Iontophoretische Dil-Markierung eines einzelnen γ -Neurons des PKZSB1 (A1), PKZSB2 (B2) und PKZSB3 (C1) in späten St.17 OK107>CD8::GFP Embryonen. Man sieht die Innervation der Calyx (▶) und des medialen und vertikalen Lobus. **A1',B1',C1'** geben jeweils das Dil-Signal der in A1,B1,C1 gezeigten γ -Neurone wider. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in A1,B1,C1. **D1** Iontophoretische Markierung von 4 γ -Neuronen des PKZSB4 im späten St.17. Weder die Calyx noch die Loben werden innerviert. **D1'** Dil Signal der in (D1) gezeigten Abbildung. **A2,B2,C2,D2** Markierung eines einzelnen γ -Neurons des PKZSB1 (A2), PKZSB2 (B2), PKZSB3 (C2) bzw. PKZSB4 (D2) in frühen L1 OK107>:CD8::GFP Larven. Man sieht die Innervation der Calyx (▶) und des medialen und vertikalen Lobus. **A2',B2',C2',D2'** geben jeweils das Dil Signal der in A2,B2,C2,D2 gezeigten γ -Neurone wider. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in A2,B2,C2,D2. Man sieht Anzeichen der Differenzierung axonaler Endigungen (▶), Boutons und/oder Varikositäten). **Abkürzungen:** Ca:Calyx; mL: medialer Lobus; vL: vertikaler Lobus

3.2.7.3 Unterschiede in der räumlichen Innervation des Pedunkel

Klonspezifische Unterschiede findet man auch bei der räumlichen Innervation des Pedunkels. Während sich die Axone der γ -Neurone des PKZSB1 über das gesamte Volumen des Pedunkels verteilen (Abb. 19 A-D'), verlaufen die Axone der γ -Neurone der PKZSB2-4 nur in Teilbereichen des Pedunkels (Abb. 19 E-L').

3.2.8 PKZSB1 hat keine Pionierfunktion bei der Entwicklung des Pilzkörperneuropil

Die oben beschriebenen Beobachtungen bezüglich des zellstammbaum-spezifischen Auswachsens der γ -Neurone in zeitlicher und räumlicher Dimension (3.2.7.1, 3.2.7.2), legten die Vermutung nahe, dass PKZSB1, dessen γ -Neurone zuerst auswachsen, möglicherweise eine Pionierfunktion bei der Entstehung des Pilzkörperneuropil hat. Ablationsexperimente, bei denen PKNB1 ablatiert wurde (n=3), bevor er die ersten γ -Neurone hervorgebracht hat, belegen jedoch, dass seine γ -Neurone nicht maßgebend für die Entwicklung des Pilzkörperneuropil sind. Auch in Abwesenheit der γ -Neurone des PKNB1 entwickelten sich Pedunkel, Loben und Calyx normal (Abb. 18 A'). Das gleiche gilt auch für die Ablation der drei übrigen PKNBen. In keinem der Fälle, in denen einer dieser drei PKNBen ablatiert wurde, bevor er γ -Neurone hervorbringen konnte, wurde eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Pilzkörperneuropils beobachtet (PKNB2 (n=2), PKNB3 (n=2), PKNB4 (n=1)).

3.2.9 Apoptose hat keinen Einfluß auf die Anzahl der γ -Neurone

Ich konnte zeigen, dass die spätembryonalen PKNB-Klone sich in erheblichen Maße in der Anzahl ihrer γ -Neurone unterscheiden (3.2.5.1-3.2.5.4; Tabelle 1). Um zu überprüfen, ob Apoptose bei der Regulation der Zellzahlen von embryonal geborenen γ -Neuronen eine Rolle spielt, wurden Antikörperfärbungen gegen das in allen γ -Neuronen exprimierte Ey-Protein in Wildtyp und apoptose-defizienten (H99) Fliegenembryonen durchgeführt (White et al., 1994). Im Anschluss wurde die Anzahl der γ -Neurone in späten St.17 WT und H99 Embryonen bestimmt. Es zeigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede in der γ -Neuronen-Anzahl im WT (\bar{x} 93 \pm 7, n=14 Hemisphären) verglichen mit H99 (\bar{x} 93 \pm 7, n=12 Hemisphären) gibt ($p=0,89$). Diese Ergebnisse legen somit nahe, dass Apoptose keinen Einfluß auf die Anzahl der embryonal gebildeten γ -Neurone hat. Dies wurde auch durch Untersuchungen von Frau K. Kraft bestätigt, die zeigten, dass die unterschiedlich großen Zellzahlen an γ -Neuronen der PKZSBe durch unterschiedliche Proliferationsraten der PKNBen zustande kommen (Kunz et al., 2012).

3.2.10 Viele embryonal entstehende γ -Neurone differenzieren erst in der postembryonalen Entwicklung

Bei der Aufklärung der embryonalen ZSBe des VNS wurden ZSBe charakterisiert, die, gemessen an ihrer Zellzahl, vergleichsweise dünne axonale Faszikel aufweisen. Aufgrund dieses Befundes wurde vermutet, dass einige der embryonal geborenen Neurone dieser ZSBe erst postembryonal ein Axon ausdifferenzieren (Schmidt et al., 1997). Diese Beobachtungen erinnern an die γ -Neurone der PKZSBe2-4, welche ebenfalls vergleichsweise dünne Faszikel ausbilden (siehe 3.2.7.3). Eine mögliche Erklärung dafür wäre das postembryonale Ausdifferenzieren embryonal geborener γ -Neurone.

Um sich über diesen Punkt Klarheit zu verschaffen, wurden Einzelzellmarkierungen von γ -Neuronen in frühen L1 Larven (0-3 Stunden nach Schlupf) durchgeführt und der Differenzierungsgrad ihrer Axone untersucht.

Insgesamt wurden 74 (=100%) auswertbare Einzelzellmarkierungen durchgeführt, die gleichmäßig über den Bereich der gesamten Pilzkörperanlage verteilt waren. Von diesen markierten Zellen waren 47 (=64%) ausdifferenziert, das heißt, sie zeigten eine bereits

weit fortgeschrittene Innervation der Loben und größtenteils auch Anzeichen der Differenzierung axonaler Endigungen in Form von boutonartigen Verdickungen. (Abb. 20 A2-D2´). Sieben (=9%) der markierten Zellen hatten ein im Auswachsen begriffenes Axon, das jedoch die Loben noch nicht erreicht hatte. Die restlichen 20 (=27%) der markierten Zellen waren noch undifferenziert und zeigten kein Axon. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass in der Tat eine größere Anzahl embryonal entstandener γ -Neurone im frühen ersten Larvalstadium noch undifferenziert ist und somit ein nicht geringer Teil der embryonal gebildeten γ -Neurone erst postembryonal ausdifferenziert.

3.2.11 Embryonal geborene γ -Neurone innervieren beide Loben durch Bifurkation ihres Axons

In bisherigen Untersuchungen zur Embryonalentwicklung der Pilzkörper wurden Gal4-Stämme oder molekulare Marker verwendet, die in allen oder sehr vielen γ -Neuronen exprimiert werden (Crittenden et al., 1998; Noveen et al., 2000; Tettamanti et al., 1997). Aussagen über die Lobenentwicklung bezogen sich daher auf das Gesamtbild, ließen jedoch keine detaillierteren Aussagen zu. So war bisher ungeklärt, ob medialer und vertikaler Lobus möglicherweise durch zwei verschiedene Populationen von γ -Neuronen gebildet werden, von denen ein Typ exklusiv in den medialen und der andere exklusiv in den vertikalen Lobus projiziert, oder ob die Axone embryonaler γ -Neurone wie in der Postembryonalentwicklung bifurkieren und auf diese Weise die beiden Loben aufbauen (Lee et al., 1999).

Iontophoretische Dil-Markierungen ermöglichten die Untersuchung der Axonmorphologie auf Ebene einzelner, ausdifferenzierter γ -Neurone. Diese zeigten, dass die Innervation beider Loben immer durch Bifurkation der γ -Neuronen-Axone erfolgt (Abb. 20 A2-D2´); in keinem Fall wurde ein γ -Neuron im späten St.17 oder der frisch geschlüpften L1 markiert, das exklusiv den medialen oder vertikalen Lobus innervierte (n =47).

3.3 Weitere Neuroblastenzellstammbäume aus δB und $\delta 1$

Dil-Markierungen brachten den experimentellen Beweis, dass PKNBen und andere NBen aus benachbarten δB NE-Zellen hervorgehen (siehe 3.2.2, 3.2.3). Darüber hinaus zeigten *in situ* Hybridisierungen gegen die proneuralen Gene *achaete*, *scute* und *lethal of scute*, dass diese NE-Zellen zu derselben proneuralen Domäne gehören (siehe 3.2.3).

Diese Befunde stellen einen signifikanten Unterschied zur Entstehung von NBen im rNE dar, in dem aus einem proneuralen Cluster, bedingt durch den Prozess der lateralen Inhibition, stets nur ein NB entsteht (Campos-Ortega, 1993; Skeath and Thor, 2003). Bei dem in δB stattfindenden Modus der Neuroblastenentstehung stellte sich die Frage, inwiefern aus benachbarten NE-Zellen derselben proneuralen Domäne hervorgehende Stammzellen Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der zellulären Komposition der von ihnen hervorgebrachten ZSBe aufweisen. Entstehen zum Beispiel nur rein neuronale ZSBe oder auch solche mit glialen Anteilen? Entstehen unterschiedliche Neuronentypen (z.B. lokale, intersegmentale, contra- oder ipsilaterale Interneurone oder neurosekretorische Neurone)? In welchen Dimensionen bewegen sich die Zellzahlen der ZSBe? Existieren ZSBe mit klonalen Anteilen, die möglicherweise ein epidermales Schicksal einschlagen?

Um diese Fragen zu klären, wurden Dil-Markierungen von den PKNE-Zellen benachbarten NE-Zellen in WT oder OK107>CD8::GFP Embryonen durchgeführt. Die resultierenden ZSBe wurden im St.17 oder im frühlarvalen L1 Stadium charakterisiert. Zu den erfassten Merkmalen gehörten: mitotische Ursprungsdomäne, Delaminationszeitpunkt des NB, Zelltypen (Glia, Neurone, Epidermis), Zellzahlen, Projektionsmuster der Faszikel, Anzeichen für Apoptose (in Form pyknotischer Zellen oder Zellfragmenten) und Lage der Zellkörper in Relation zum Pilzkörperkortex bzw. den PKNBen. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale der charakterisierten ZSBe findet sich in Tabelle 2.

Da eine Zuordnung dieser Zellstammbäume zu identifizierten Neuroblasten in den frühembryonalen Neuroblastenkarten (Urbach et al., 2003) noch nicht durchgeführt wurde, wurden den Zellstammbäumen vorläufige Bezeichnungen gegeben. Diese Bezeichnung bezieht sich auf die mitotische Domäne, in der die NE-Zelle markiert wurde. Des Weiteren wurde unterschieden, ob es sich um einen NB oder Neuroglioblasten (= NGB) handelt. Innerhalb dieser Unterteilung wurden die ZSBe gemäß ihrer durchschnittlichen Zellzahl,

beginnend mit dem größten, durchnummeriert. (Bsp.: δB NB-ZSB1: ist der größte (= 1), rein neuronale (= NB) Zellstammbaum (= ZSB) aus δB).

3.3.1 Neuronale Zellstammbäume, die in der ventralen Hälfte von δB entstehen

In diesem Abschnitt werden rein neuronale Zellstammbäume vorgestellt, die aus dem *ac-/sc-/l'sc*-coexprimierenden proneuralen Feld in der ventralen Hälfte der δB abstammen, aus dem auch die PKNBen hervorgehen (siehe 3.2.3).

3.3.1.1 δB NB-ZSB1

δB NB-ZSB1 (Abb. 21) besteht aus 27-28 Neuronen ($\emptyset 27,5 \pm 0,7$ n=2). Die NE-Zelle, aus der dieser ZSB hervorgeht, wurde in beiden Fällen an DV-Position 10 jeweils an anteriorer oder intermediärer Position markiert (Abb. 21 C). In einem Fall war bei der Kontrolle eine Stunde nach Markierung eine Delamination erfolgt, im anderen Fall noch nicht. Der δB NB-ZSB1 NB delaminiert also in etwa zum Zeitpunkt, an dem die Kontrollen durchgeführt wurden (spätes St.8/frühes St.9). Die Neurone des ZSB liegen im dorsalen, anterolateralen Protocerebrum einige Zelldurchmesser lateral des Pilzkörperkortex. Sie bilden zwei Faszikel, die ins ipsilaterale Neuropil projizieren. Eines verläuft bogenförmig entlang der posterioren Neuropil-Kortex Grenze und endet im Grenzbereich von anteromedialem und posteromedialem Neuropil auf Höhe der präoralen Gehirnkommisur. Das andere Faszikel endet ebenfalls in diesem Bereich, allerdings etwas lateraler als das zuvor beschriebene (Abb. 21 A, B).

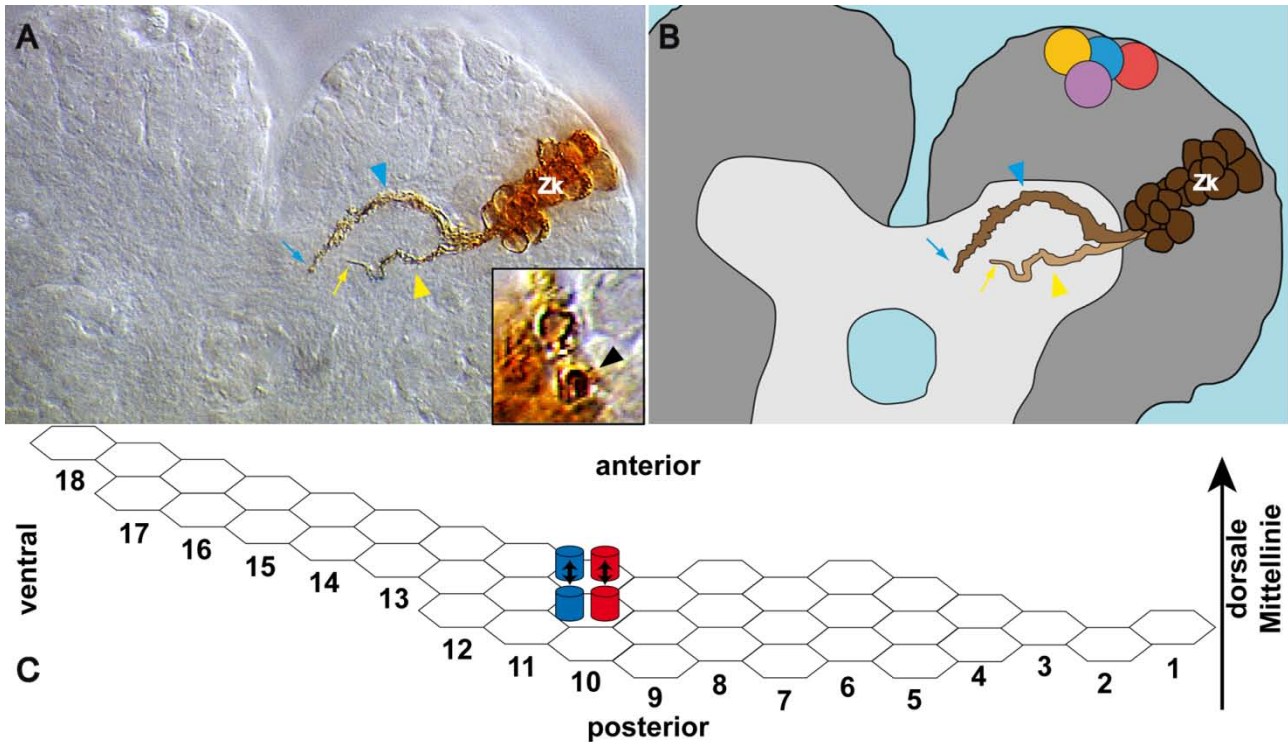


Abb. 21 δ B NB-ZSB1

A Rekonstruktion eines photokontvertierten δ B NB-ZSB1 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet 2 in der ipsilateralen Hemisphäre verbleibende Faszikel aus (▶ bzw. ▢). ▶ verläuft bogenförmig entlang der posterioren Neuropil-Kortex-Grenze und endet auf Höhe der Gehirnkommisur im Grenzbereich von anteromedialem und posteromedialem Neuropil (→). ▢ endet ebenfalls im Grenzbereich von anteromedialem und posteromedialem Neuropil (→), jedoch etwas lateraler als ▶. Inlay: apoptotische δ B NB-ZSB1 Zelle (▣). **B** Zeichnung des photokontvertierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C** δ B Schema. Die Zylinder geben die Position der markierten NE-Zelle an, aus der der gezeigte ZSB resultierte. Verschiedene Farben stehen für Markierungen in verschiedenen Individuen. War es nicht möglich eine Aussage über die genaue Position der markierten Zelle zu machen, wurden alle möglichen Markierungspositionen angegeben (gleichfarbige Zylinder). **Bsp.:** In dem hier gezeigten Fall wurden beide Markierungen (rot bzw. blau) an dorsoventraler Position 10 gesetzt. Es konnte in beiden Fällen jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, ob an anteriorer oder intermediärer Position (schwarze Doppelpfeile). Bei jeder der beiden Markierungen (rot bzw. blau) wurde aber jeweils nur eine NE-Zelle markiert. **Abkürzung:** Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.1.2 δ B NB-ZSB2

δ B NB-ZSB2 (Abb. 22) besteht aus 16-28 Neuronen ($\bar{\Delta}$ 22,5 \pm 4,2 n=10). Die NE-Zelle, die diesen ZSB hervorbringt, lag stets in anteriorer Position in den DV-Positionen 9-12 (Abb. 22 G). Der NB des δ B NB-ZSB2 gehört zu den früh-entstehenden Gehirnneuroblasten. Die Position seiner NE-Vorläuferzelle, direkt dorsal der Positionen der PKNB3 (Pcd9) NE-Zelle (siehe Abb. 10), läßt vermuten, dass der NB Pcd8 diesen ZSB bildet (Urbach et al., 2003).

δB NB-ZSB2 konnte im frühen St.17 (Abb. 22 A, B) und auch in frühen L1 Larven dokumentiert werden (Abb. 22 C-F). Sowohl die Position der Zellkörper im Kortex als auch die Anzahl und das Projektionsmuster der Faszikel sind in beiden Stadien vergleichbar. Jedoch haben sich in L1, besonders in der ipsilateralen Hemisphäre, dendritische/axonale Strukturen deutlich weiter ausdifferenziert als im St.17 (Vergleiche Abb. 22 A, B mit C, D). Die Zellkörper der δB NB-ZSB2 Neurone liegen im posterioren Protocerebrum, direkt ventral angrenzend an den Pilzkörperkortex (Abb. 22 C-E). Die Neurone bilden zunächst zwei Primärfaszikel (Abb. 22 A-E), wovon eines ipsilateral ins VNS deszendiert und sich dort in zwei weitere Faszikel aufspaltet (Abb. 22 F). Das eine der beiden Faszikel verläuft weit medial im Konnektiv und endet im abdominalen Segment A7, das andere verläuft mittig im Konnektiv, endet im Neuropil des terminalen abdominalen Segments und weist in jedem abdominalen Segment Anzeichen von axonalen/dendritischen Differenzierungen auf. Das zweite Primärfaszikel projiziert in Richtung der präoralen Gehirnkommisur und spaltet sich kurz vor dieser in zwei sekundäre Faszikel auf, die intermediär/posterior bzw. anterior durch die Gehirnkommisur ins contralaterale Neuropil projizieren. Das intermediär/posterior projizierende Faszikel endet im posteromedialen Gehirnneuopil etwas dorsoposterior des contralateralen medialen Pilzkörperlobus. Das anterior durch die Gehirnkommisur verlaufende Faszikel spaltet sich nach Austritt aus der Kommisur weiter auf: Ein Ast verbleibt im anteromedialen Gehirnneuopil, der zweite Ast deszendiert contralateral ins VNS (Abb. 22 A-E), wo er sich in drei weitere Faszikel aufspaltet (Abb. 22 F). Zwei dieser Faszikel projizieren bis ins Neuropil des terminalen abdominalen Neuromer (A9/A10). Das dritte Faszikel verläuft mittig durch das Konnektiv und endet im abdominalen Neuromer A8.

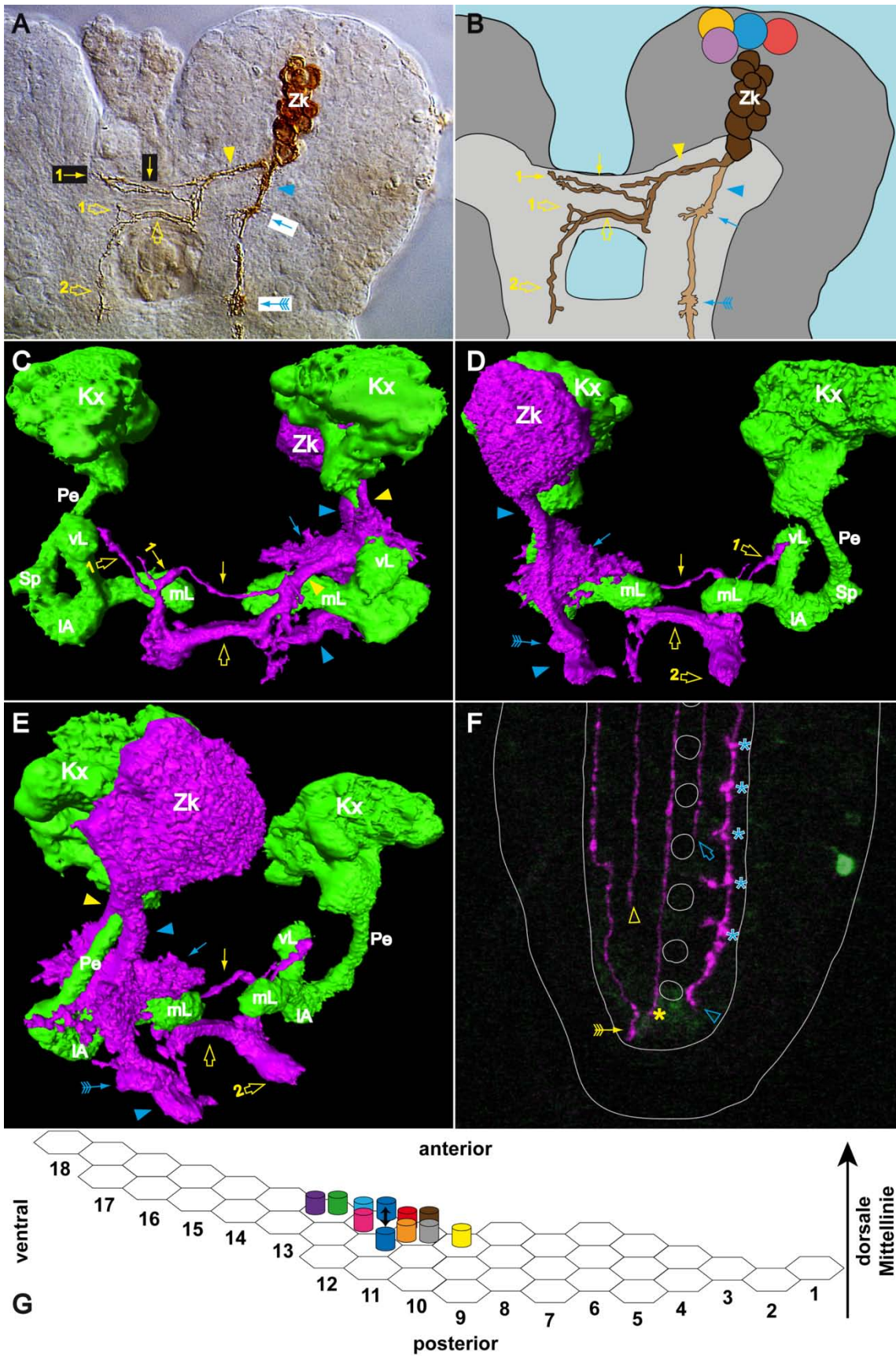


Abbildung 22

Abb. 22 δ B NB-ZSB2

A Rekonstruktion eines photokonvertierten δ B NB-ZSB2 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet ein ipsilateral deszendierendes (▶) und ein in Richtung Gehirnkommisur projizierendes Faszikel (■). ▶ bildet im ipsilateralen Gehirnneuropil und im Bereich der Grenze Tritocerebrum/gnathale Segmente jeweils ein dendritisches/axonales Feld aus (→ bzw. ⇨). ■ spaltet sich vor der Gehirnkommisur in 2 contralateral projizierende Faszikel auf (⇨ bzw. ⇩). ⇨ endet im contralateralen, posteromedialen Gehirnneuropil (⇨); ⇩ spaltet sich nach Austritt aus der Gehirnkommisur in einen im anteriomedialen Gehirnneuropil endenden (⇩) und einen deszendierenden (⇩) Ast auf. **B** Zeichnung des photokonvertierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-E** 3D Amira Rekonstruktion eines frühen L1 δ B NB-ZSB2 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Markierung erfolgte in OK107>CD8::GFP Embryonen. Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. **D** Ventralansicht. **E** Ventrolaterale Ansicht. **F** Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme des VNS einer frühen OK107>CD8::GFP L1 Larve. Man sieht, wie sich die in (A-E) gezeigten deszendierenden Faszikel (▶ bzw. ⇩) im Neuropil des VNS in weitere Faszikel aufspalten: Aus ▶ (siehe A-D) sind 2 Faszikel hervorgegangen. Eines verläuft weit medial im Konnektiv und endet im abdominalen Neuromer A7 (⇨), das andere verläuft mittig durchs Konnektiv, zeigt in jedem Neuromer Anzeichen für dendritische/axonale Verzweigungen (✱) und endet im terminalen abdominalen Neuromer A9/10 (⇨). Das andere deszendierende Faszikel (⇩ siehe A, B, D, E) hat sich in drei Faszikel aufgespalten. Das erste verläuft weit medial im Konnektiv und endet im terminalen abdominalen Neuromer A9/A10 (⇩), das zweite verläuft mittig durch das Konnektiv und endet im abdominalen Neuromer A8 (⇩). Das dritte projiziert lateral durchs Konnektiv und endet im terminalen abdominalen Neuromer A9/10 (⇩). **G** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.1.3 δ B NB-ZSB3

δ B NB-ZSB3 (Abb. 23) besteht aus 20-23 Neuronen (\varnothing 21,8 \pm 1, n=5). Die Zellkörper dieses ZSB liegen im dorsoposterioren Protocerebrum, direkt lateral des Pilzkörperkortex (Abb. 23 A-D). Die NE-Zelle, die diesen NB hervorbringt, wurde innerhalb der δ B in den dorsoventralen Positionen 12-16 markiert, in zwei Fällen an posteriorer Position (Abb. 23 H). Die Kontrolle ca. eine Stunde nach erfolgter Markierung zeigte, dass es sich um einen früh entstehenden NB handelt (Urbach et al., 2003). Ausgehend davon, dass die Position seiner neuroektodermalen Vorläuferzelle an diejenige des PKNB4 (Pcd2) angrenzt (siehe Abb. 10), ist zu vermuten, dass δ B NB-ZSB3 von einem der früh-entstehenden NBen Pcd6 oder Pcv6 gebildet wird.

δ B NB-ZSB3 konnte sowohl im frühen St.17 (Abb. 23 A, B) als auch in frühen L1 Larven dokumentiert werden (Abb. 23 C-G). Der ZSB weist im St.17 zwei Faszikel auf, wovon eines im posteromedialen Bereich des ipsilateralen Neuropil endet. Das zweite Faszikel projiziert dorsal aus der Hemisphäre heraus und innerviert die Ringdrüse (Abb. 23 A, B). Vergleicht man die Morphologie des ZSB im St.17 mit der Morphologie desselben ZSB in der frühen L1 Larve, so findet man in L1 neben dem die Ringdrüse innervierenden

Faszikel (Abb. 23 C, D, F, G) zwei weitere Faszikel, die wahrscheinlich durch Ausdifferenzierung des oben beschriebenen ipsilateralen Faszikels im frühen St.17 entstanden sind (vergleiche Abb. 23 A, B mit Abb. 23 C, F, G). Das eine der beiden Faszikel verbleibt im ipsilateralen Neuropil und endet dorsal des medialen Pilzkörperlobus (Abb. 23 G). Das andere projiziert contralateral und endet in einem Bereich nahe des vertikalen Pilzkörperlobus (Abb. 23 E). Eine Innervation des Lobus durch das Faszikel konnte jedoch nicht beobachtet werden. Des Weiteren zeigt ein Vergleich der Morphologie dieses ZSB im St.17 und der L1 Larve, dass die Elaboration von axonalen Endigungen und Dendriten in L1 bereits weiter fortgeschritten ist. So sind die neuritischen Termini des Faszikels, das die Ringdrüse innerviert, bereits deutlich weiter ausdifferenziert (vergleiche Abb. 23 A, B mit Abb. 23 C, D, F) und man findet im ipsilateralen Neuropil ein großes dendritisches/axonales Feld, das die Region um den vertikalen Lobus des Pilzkörpers innerviert und diesen an seiner Oberfläche kontaktiert (Abb. 23 C, G). Die grundlegenden morphologischen Charakteristika des ZSB sind aber bereits im St.17 erkennbar. Bei den Neuronen, deren Neuriten die Ringdrüse innervieren, handelt es sich sehr wahrscheinlich um die peptidergen, in der L3 Larve beschriebenen „corpora cardiaca innervating neurosecretory neurons of the lateral protocerebrum“ (CC-LP1; CC-LP2) oder um die "corpus allatum innervating neurosecretory neurons of the lateral protocerebrum" (CA-LP1; CA-LP2) (Sigmund and Korge, 2001). Alle übrigen von Sigmund (2001) beschriebenen Neurone, die die Ringdrüse innervieren, konnten aufgrund ihres Projektionsmusters oder ihrer Lage in der Hemisphäre ausgeschlossen werden. Bei δ B NB-ZSB3 handelt es sich also um einen ZSB, der sowohl Interneurone als auch neurosekretorische Neurone hervorbringt.

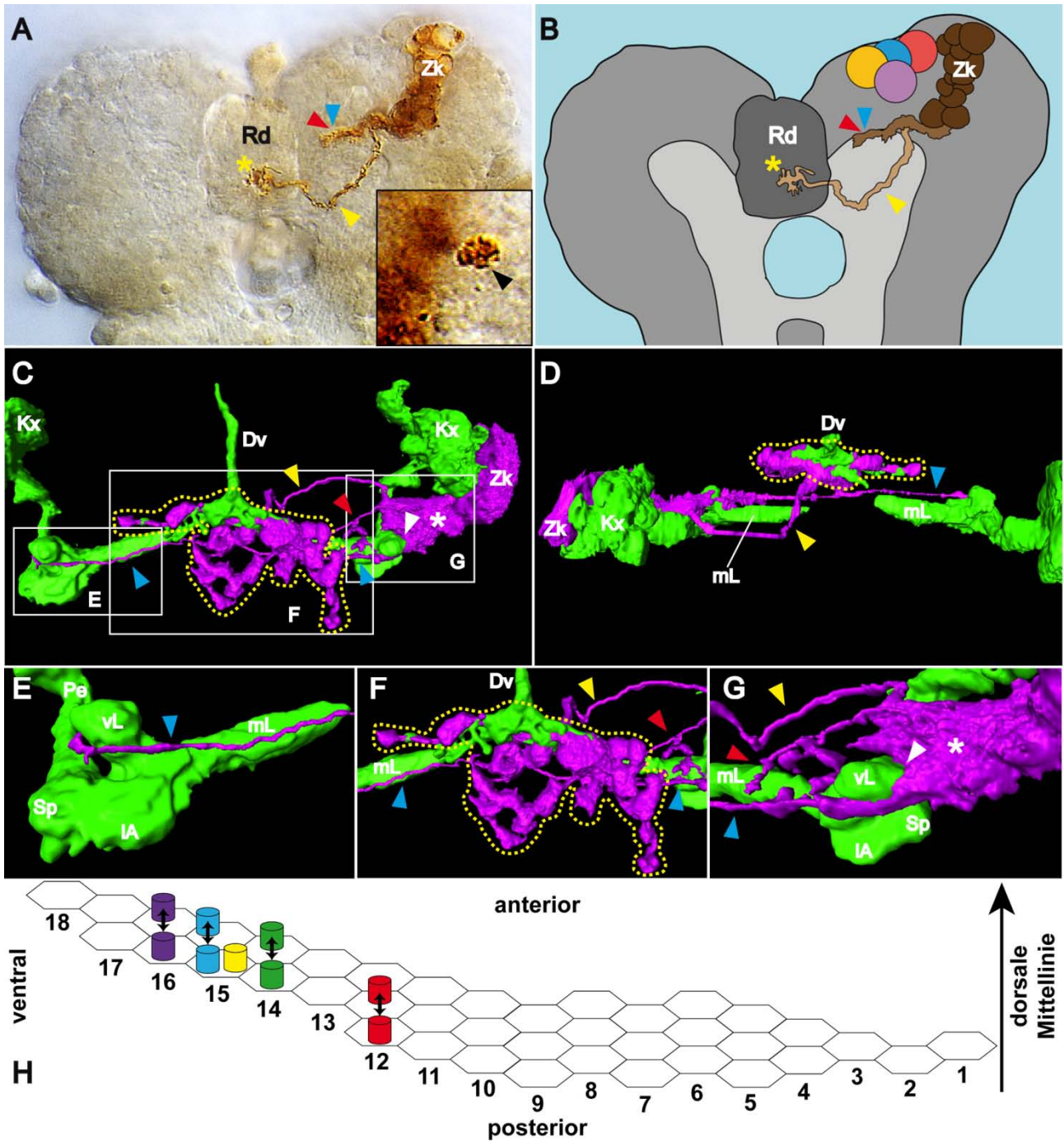


Abb. 23 δ B NB-ZSB3

A Rekonstruktion eines photokonvertierten δ B NB-ZSB3 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB weist 2 Faszikel auf, wovon eines (■) die Rd innerviert (■). Das andere Faszikel (▲ und ►) endet im Neuropil und differenziert sich wahrscheinlich bis zum L1 Stadium in ein ipsilateral verbleibendes und ein kontralateral projizierendes Faszikel aus (siehe C-G). Inlay: apoptotische δ B NB-ZSB3 Zelle (►). **B** Zeichnung des photokonvertieren ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Rd; mittelgrau: Kx; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-G** 3D Amira Rekonstruktion eines frühen L1 δ B NB-ZSB3 (magenta), der Pilzkörper und des Dv (beide in grün. Anm.: das Dv wird von OK107- Zellen innerviert). Die Markierung erfolgte in OK107>CD8::GFP Embryonen. ■: Rd innervierendes Faszikel; gelb gepunktete Umrandung: Innervationsbereich der Rd; ►: ipsilaterales, dorsal über dem medialen Pilzkörperlobus

endendes Faszikel; ►: contralateral projizierendes Faszikel; ◻: großes dendritisches/axonales Feld; ◻: Kontakt zwischen Dendriten/Axonon und vL. **C** Übersichtsaufnahme in Dorsalansicht. **D** Übersichtsaufnahme in posteriorer Ansicht, dorsal oben. **E** Anteriore Detailansicht des in (C) umrahmten Bereichs der contralateralen Pilzkörperloben. Man sieht, dass das Faszikel den vL nicht innerviert. **F** Dorsale Detailansicht des in (C) umrahmten Bereichs der Innervation der Rd. **G** Dorsolaterale Detailansicht des in (C) umrahmten Bereichs des dendritischen/axonalen Feldes und der Pilzkörperloben. **H** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** Dv: dorsal Vessel; Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Rd: Ringdrüse; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.1.4 δ B NB-ZSB4

δ B NB-ZSB4 (Abb. 24) wird von 19-22 Neuronen gebildet (\emptyset 20,5 \pm 2,1 n=2). Seine NE-Zelle wurde in den dorsoventralen Positionen 12 bzw. 13 markiert (Abb. 24 I). Die Zellkörper der Neurone liegen im posterioren Bereich des Protocerebrums, ventral des Pilzkörperkortex (Abb. 24 C, D). Der ZSB weist ein dorsal und ein ventral verlaufendes Faszikel auf (Abb. 24 A, B, D, G). Das ventral verlaufende bildet zunächst einen kurzen Seitenast im posterioren Bereich des Neuropil (Abb. 24 A-D, H), bevor es in den Pedunkel eintritt und dort ein Stück parallel zu den Axonen der γ -Neurone verläuft (Abb. 24 D, G). Im Pedunkel bildet das Faszikel ein dendritisches/axonales Feld, das den Spur innerviert (Abb. 24 F, G). Das Faszikel verlässt den Pedunkel in dessen distalen Bereich und bildet dort ein weiteres dendritisches/axonales Feld, das den medialen Lobus und einen Bereich ventral desselben innerviert (Abb. 24 D). Das dorsal verlaufende Faszikel bildet zunächst kurz nach Eintritt ins Neuropil einen Seitenast, der die Calyx des ipsilateralen Pilzkörpers innerviert (Abb. 24 H). Etwas weiter distal bildet das Faszikel einen weiteren Seitenast aus, der in einem Bereich lateral und dorsal des Pedunkels endet, ohne jedoch Kontakt zum Pedunkel herzustellen (Abb. 24 A-C). Im weiteren Verlauf innerviert das Faszikel mit zwei Seitenästen sowohl die Spitze des vertikalen ipsilateralen Lobus und die ihn umgebende Neuropilregion (Abb. 24 F, G) als auch den lateralen Appendix des ipsilateralen Pilzkörpers (Abb. 24 C, D, G). Das Faszikel projiziert weiter durch den anterior/intermediären Bereich der präoralen Gehirnkommisur in die contralaterale Gehirnhemisphäre und bildet dort ein stark verzweigtes Feld dendritischer/axonaler Endigungen. Diese Endigungen innervieren sowohl den Spur/lateralen Appendix/proximalen Bereich des medialen Lobus und eine Neuropilregion ventral des medialen Lobus als auch die Spitze des contralateralen vertikalen Lobus (Abb. 24 C-E). δ B NB-ZSB4 stellt also einen ZSB dar, der viele Neuropilbereiche der beiden Pilzkörper miteinander verbindet.

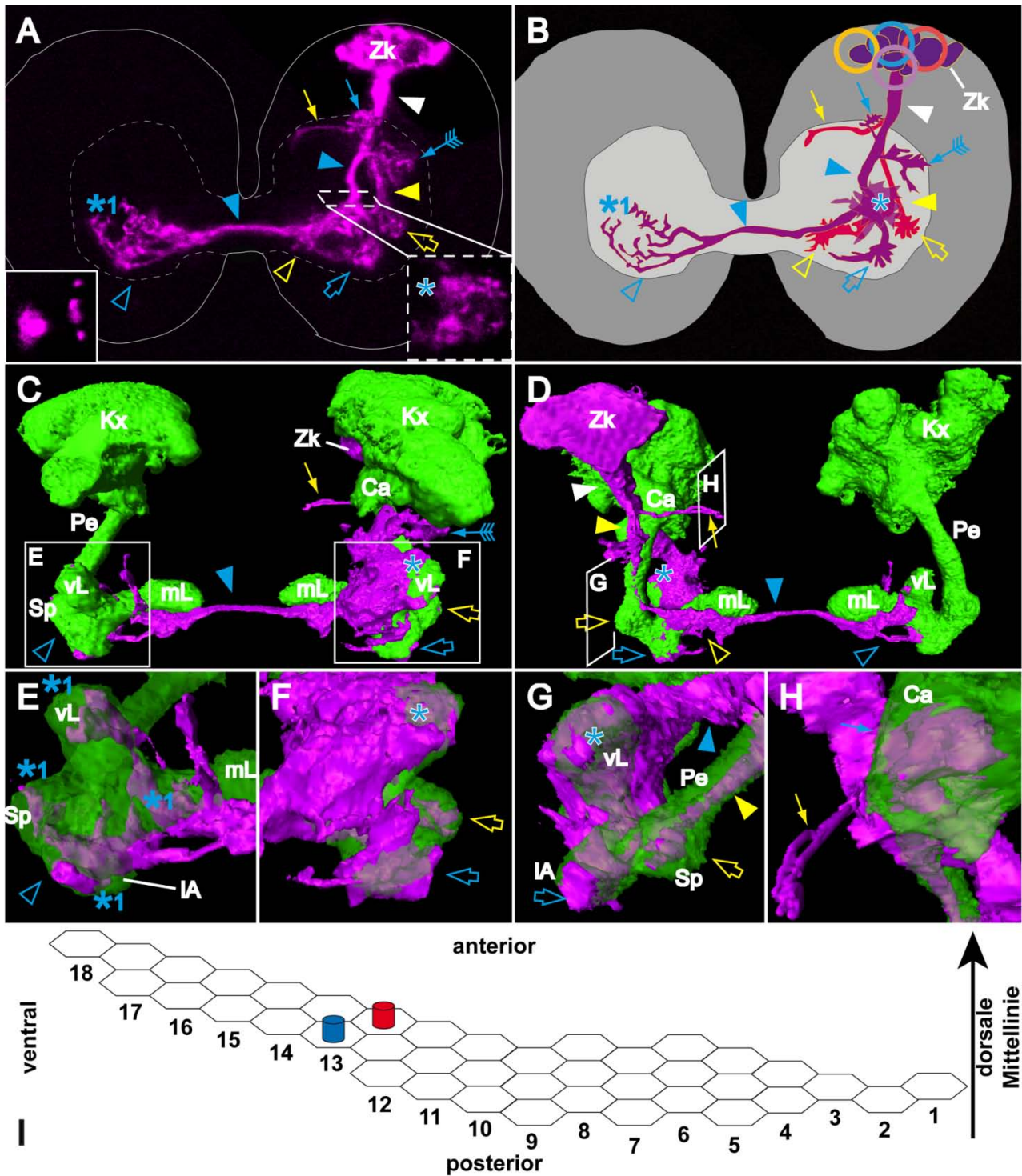


Abb. 24 δ B NB-ZSB4

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines δ B NB-ZSB4 in einer frühen L1 OK107>GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet zunächst ein primäres Faszikel (\blacktriangleleft), welches sich nach Eintritt ins Neuropil in ein dorsales (\blacktriangleright) und ein ventrales (\blacktriangleright) Faszikel aufspaltet. \blacktriangleright bildet zunächst einen kurzen Seitenast (\blacktriangleright), tritt dann in den Pe ein und bildet ein dendritisches/axonales Feld aus, das den Sp innerviert (\blacktriangleright). Nach Verlassen des Pe endet das Faszikel mit einem dendritischen/axonales Feld, das den mL und einen Bereich ventral desselben innerviert (\blacktriangleright). \blacktriangleright bildet nach Eintritt ins Neuropil zunächst einen Seitenast

aus, der die Ca innerviert (→) und etwas weiter distal einen weiteren Seitenast (↗→), der jedoch nicht den Pe kontaktiert. In seinem weiteren Verlauf innerviert das Faszikel sowohl den vL (*) als auch den IA (↔). In der contralateralen Hemisphäre bildet ▶ ein stark verzweigtes Feld dendritischer/axonaler Endigungen (▷), mit denen es den Sp, IA, proximalen mL und die Spitze des vL innerviert (*1). Inlay unten links: Fragmente apoptotischer Zelle(n) **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-H** 3D Amira Rekonstruktion des δ B NB-ZSB4 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. **D** Ventralansicht. **E** Dorsale Detailansicht des in (C) umrahmten Bereiches der Region der contralateralen Pilzkörperloben. Man sieht, wie die dendritischen/axonalen Endigungen (▷) den Sp, IA, den proximalen Bereich des mL und die Spitze des vL innervieren (*1). **F** Dorsale Detailansicht des in (C) umrahmten Bereiches des ipsilateralen vL, des Sp und IA. Man sieht die Innervation des Sp (↘), des IA (↔) und des vL (*). **G** Laterale Detailansicht auf die Region der ipsilateralen Pilzkörperloben und des Pe (in (D) durch den umrahmten Bereich angedeutet). Man sieht, wie das ventrale Faszikel (↘) durch den Pe verläuft und ein dendritisches/axonales Feld im Sp ausbildet (↘). Außerdem sieht man das dorsale Faszikel (▶) und wie es mit seinen Ausläufern die Spitze des vL und den IA innerviert (* bzw. ↔). **H** Laterale Detailansicht auf den Bereich der Ca des ipsilateralen Pilzkörpers (Blickrichtung von medial, in (D) durch den umrahmten Bereich angedeutet). Man sieht den von ↘ gebildeten Seitenast (↘) und den von ▶ gebildeten Seitenast, der die Ca innerviert (→). **I** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** Ca: Calyx; Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB

3.3.1.5 δ B NB-ZSB5

δ B NB-ZSB5 (Abb. 25) besteht aus 18-21 Neuronen (\emptyset 19,5 \pm 2,1 n=2). Die NE-Zelle wurde jeweils anterior in den dorsoventralen Positionen 10 bzw. 12 markiert (Abb. 25 G). Die Zellkörper der Neurone liegen im posterioren Protocerebrum, ventral des Pilzkörperkortex (Abb. 25 C-E). Ihre Neuriten bilden ein primäres Faszikel (Abb. 25 A, B, D, E). Entlang seines ipsilateralen Bereichs weist das Faszikel viele dendritische/axonale Verzweigungen auf (Abb. 25 A-E) und spaltet sich im Bereich der Loben des ipsilateralen Pilzkörpers in ein kurzes, ipsilateral verbleibendes und ein prominentes, contralateral projizierendes Faszikel auf (Abb. 25 A-E). Ersteres projiziert durch den Bereich des ipsilateralen, lateralen Appendix des Pilzkörpers (Abb. 25 A, B, D, F) und endet im anteromedialen Neuropil, anterior des medialen Pilzkörperlobus (Abb. 25 A-D). Das contralaterale Faszikel verläuft durch den intermediären Bereich der präoralen Gehirnkommisur und bildet weitverzweigte axonale/dendritische Endigungen im Bereich der Loben des contralateralen Pilzkörpers, ohne diese jedoch zu kontaktieren (Abb. 25 A-E). In der ipsilateralen Hemisphäre bildet das Faszikel ein dendritisches/axonales Feld direkt angrenzend an den posterioren Bereich des ipsilateralen vertikalen Pilzkörperlobus (Abb. 25 A-E). Ob die Dendriten/Axone den Lobus kontaktieren, konnte in den vorhandenen Aufnahmen nicht eindeutig entschieden werden.

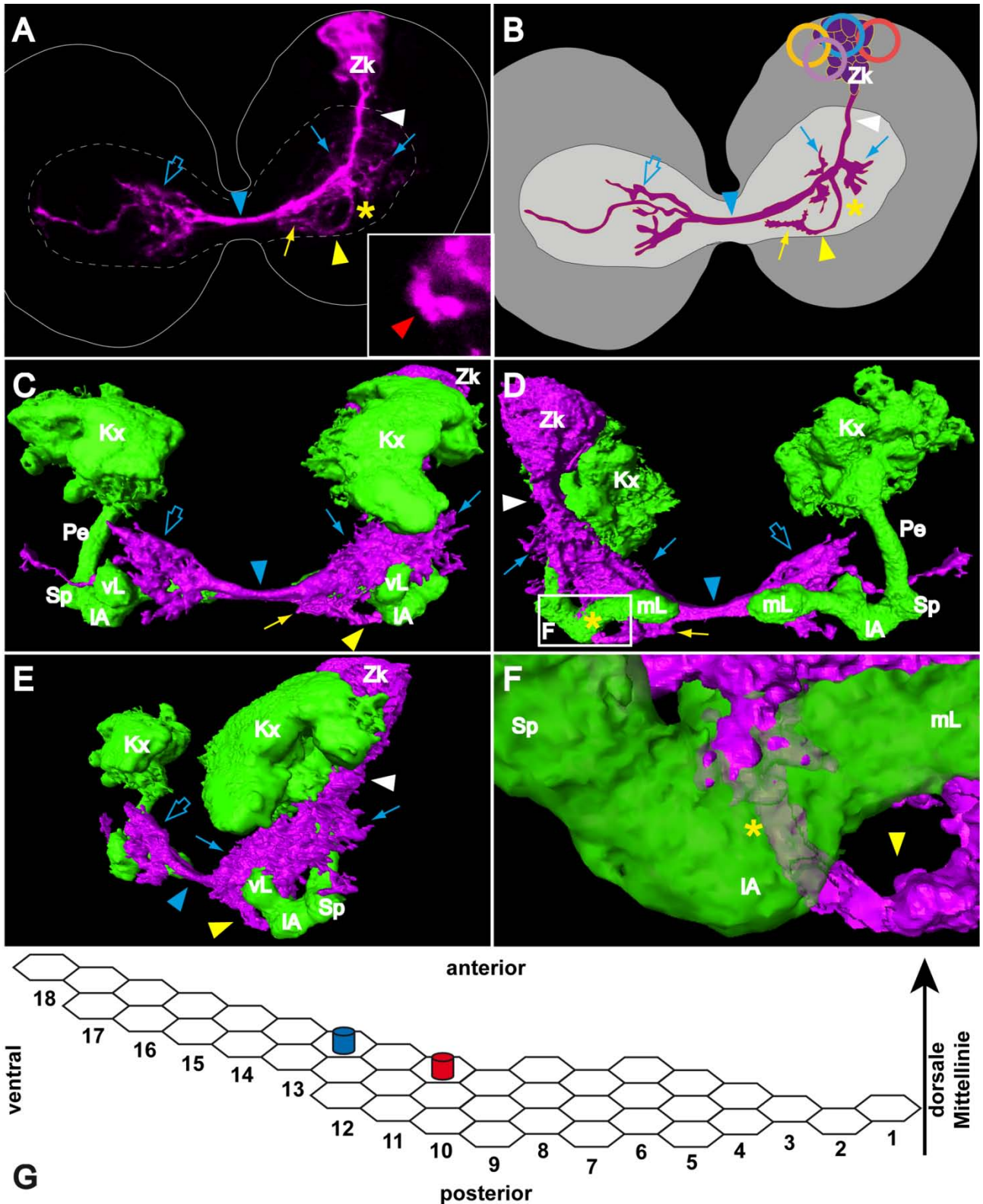


Abb. 25 δB NB-ZSB5

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines δB NB-ZSB5 in einer frühen L1 OK107>CD8::GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet zunächst ein primäres Faszikel (\square), welches im ipsilateralen Neuropil über einen weiten Bereich

dendritische/axonale Verzweigungen aufweist (→). spaltet sich im Bereich der ipsilateralen Loben in ein contralateral (▶) projizierendes und ein kurzes ipsilateral verbleibendes (■) Faszikel auf. ■ projiziert durch den IA (■) und endet im anteriomedialen Neuropil anterior des mL (■). ▶ bildet im contralateralen Neuropil weitverzweigte Endigungen im Bereich der Pilzkörperloben aus (↔), ohne diese jedoch zu kontaktieren. In der ipsilateralen Hemisphäre bildet ▶ ein dendritisches/axonales Feld direkt angrenzend an den ipsilateralen vL aus (→). In den vorhandenen Aufnahmen konnte nicht entschieden werden, ob → den Lobus kontaktiert. Inlay: Fragmente einer apoptotischen Zelle (▶). **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-F** 3D Amira Rekonstruktion des δB NB-ZSB5 ZSB (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. **D** Ventralansicht. **E** Anterolaterale Ansicht. **F** Posteriore Detailansicht des in (D) umrahmten Bereiches. Man sieht, wie das ipsilaterale Faszikel (■) durch den IA des Pilzkörper verläuft (■). **G** δB Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.1.6 δB NB-ZSB8

δB NB-ZSB8 (Abb. 26) wird von 14-18 Neuronen gebildet ($\bar{\varnothing} 16 \pm 1,5$ n=4). Die NE-Zelle des δB NB-ZSB8 wurde zumeist im posterioren Bereich des proneuralen Feldes, in den dorsoventralen Positionen 12-16 markiert (Abb. 26 G). Die Zellkörper des δB NB-ZSB8 liegen im posterioren Protocerebrum im Bereich ventral der γ-Neurone des PKZSB1 und PKZSB4 (Abb. 26 C-E). Der ZSB bildet ein primäres Faszikel, das sich im ipsilateralen Neuropil in zwei kurze sekundäre Faszikel aufspaltet, welche ipsilateral verbleiben (Abb. 26 A-E). Das eine endet anterodorsal des medialen Pilzkörperlobus (Abb. 26 C-E), das andere endet posterodorsal im Bereich zwischen Spur und lateralem Appendix (Abb. 26 D-E).

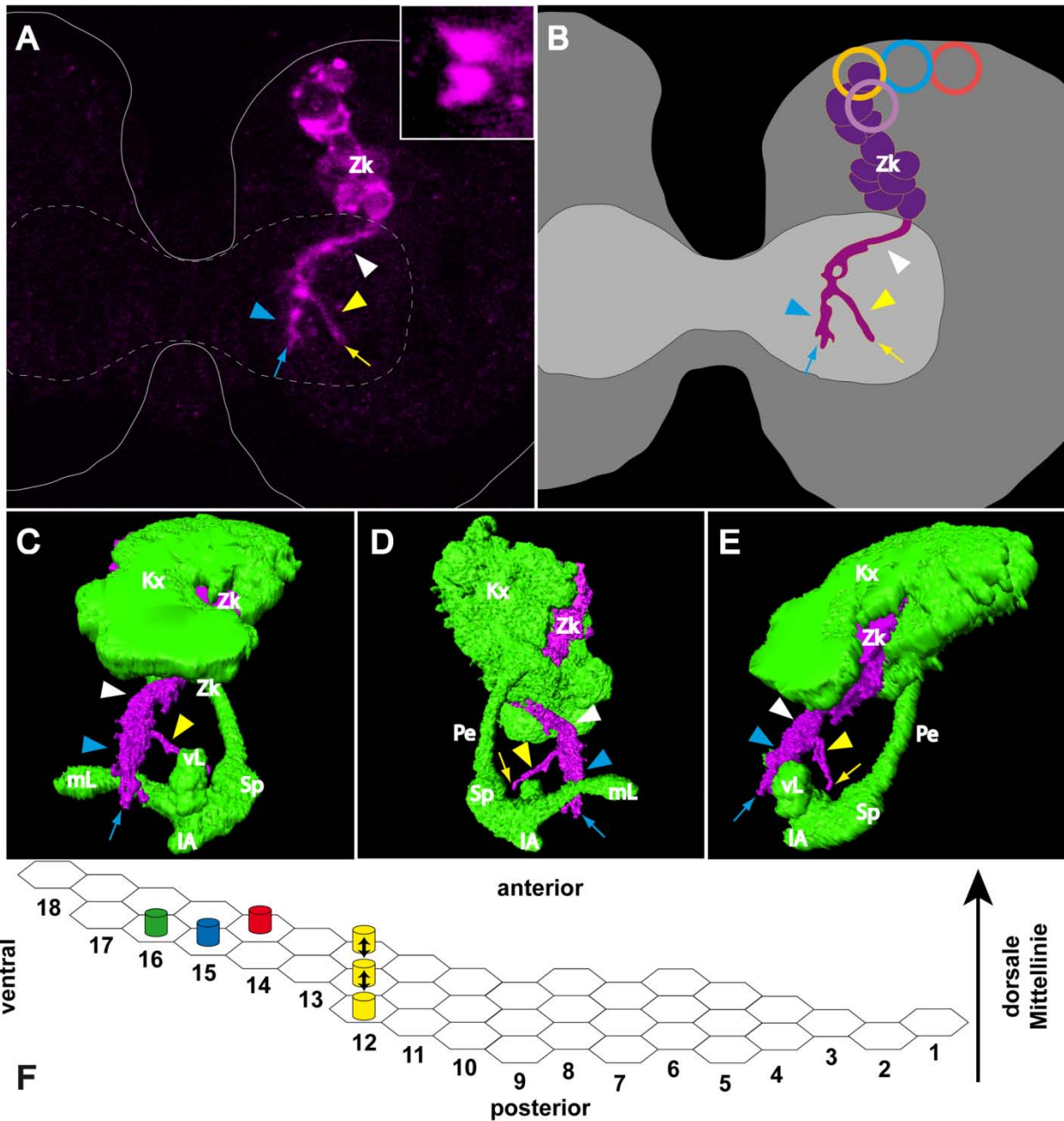


Abb. 26 δ B NB-ZSB8

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines δ B NB-ZSB8 in einer frühen L1 OK107>GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB weist ein primäres Faszikel auf (\square), das sich im ipsilateralen Neuropil in 2 kurze Faszikel aufgabelt (\blacktriangleright bzw. \blacktriangleleft). \blacktriangleright endet anterodorsal des medialen Pilzkörperlobus (\blacktriangleright); \blacktriangleleft endet posterodorsal des Bereichs der zwischen Sp und IA liegt (\blacktriangleleft). Inlay: apoptotische δ B NB-ZSB8 Zellen **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-E** 3D Amira Rekonstruktion des δ B NB-ZSB8 (magenta) und des ipsilateralen Pilzkörpers (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Anterodorsale Ansicht. **D** Ventralansicht. **E** Anterolaterale Ansicht. **F** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.1.7 δ B NB-ZSB9

δ B NB-ZSB9 (Abb. 27) besteht aus 12-17 Neuronen ($\emptyset 14,5 \pm 3,5$ n=2). Die NE-Zelle, aus der dieser ZSB hervorgeht, wurde in den dorsoventralen Positionen 10 bzw. 11 markiert (Abb. 27 G). Die Zellkörper des δ B NB-ZSB9 liegen im posterioren Protocerebrum, direkt ventral des lateralen Bereiches des Pilzkörperkortex (Abb. 27 C, D). Die Neurone bilden zunächst ein dickes Faszikel, welches sich kurz nach Eintritt ins Neuropil in zwei sekundäre Faszikel aufspaltet (Abb. 27 A-D). Das erste bildet im ipsilateralen Neuropil ein langgestrecktes dendritisches/axonales Feld, projiziert contralateral durch den posterior/intermediären Bereich der präoralen Gehirnkommisur und endet im posteromedialen Neuropil, etwas posterior und dorsal des contralateralen medialen Pilzkörperlobus (Abb. 27 A-D). Das zweite Faszikel verbleibt ipsilateral und spaltet sich in ein dorsales und ein ventrales Faszikel auf (Abb. 27 A, B, D, F). Das dorsale verläuft ein kurzes Stück in engem Kontakt mit der Oberfläche des Pedunkels (Abb. 27 C, E) und hat in seinem distalen Bereich engen Kontakt mit der ventralen Region der Lobe-junction des Pilzkörpers (Abb. 27 D, F). Boutonartige Kontakte, die auf eine mögliche funktionelle Verbindung hindeuten, konnten nicht erkannt werden. Das ventral verlaufende Faszikel deszendiert bis in die gnathalen Neuromere (Abb. 27 A, B, D, F).

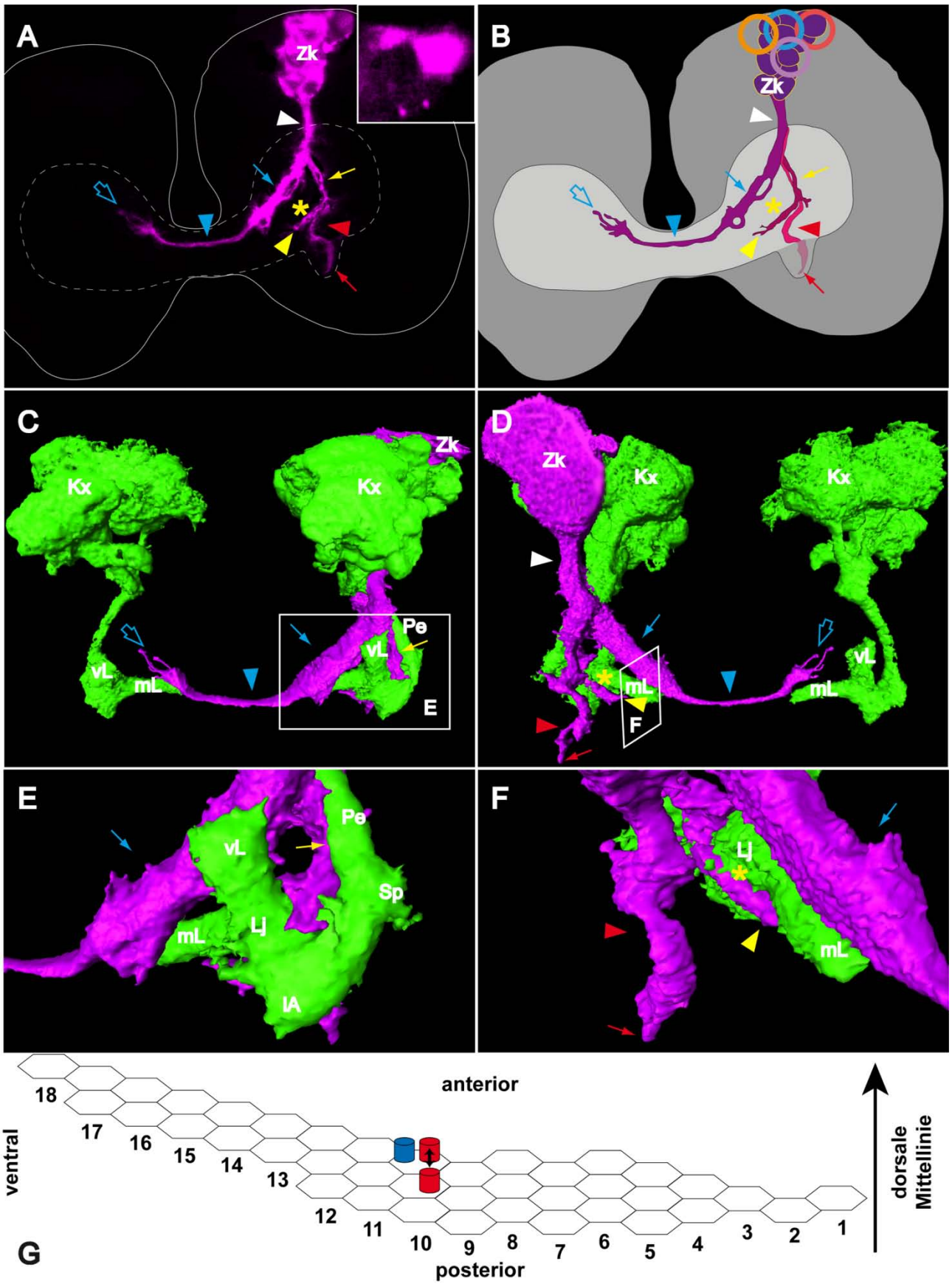


Abbildung 27

Abb. 27 δ B NB-ZSB9

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines δ B NB-ZSB9 in einer frühen L1 OK107>GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet ein dickes Primärfaszikel (▶), das sich in ein contralaterales (▶) und ein ipsilateral verbleibendes Faszikel aufgabelt. Das ipsilaterale Faszikel spaltet sich wiederum in ein dorsal verlaufendes (▶) und ein ventral verlaufendes (▶) auf. ▶ bildet im ipsilateralen Neuropil ein langgestrecktes dendritisches/axonales Feld aus (▶) und endet im contralateralen Neuropil, etwas dorsoposterior des mL (◀). ▶ verläuft ein Stück in engem Kontakt mit der Oberfläche des Pe (▶) und verläuft in seinem distalen Bereich durch den Bereich der Lj (▶). ▶ deszendiert bis in die gnathalen Segmente (▶). Inlay: apoptotische δ B NB-ZSB9 Zelle und einige apoptotische Fragmente. **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-F** 3D Amira Rekonstruktion des δ B NB-ZSB9 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. **D** Ventralansicht. **E** Detailaufnahme des in (C) umrahmten Bereichs. Man sieht das dendritische/axonale Feld (▶) und den engen Kontakt zwischen ipsilateralem dorsalem Faszikel und dem Pe (▶). **F** Ventromediale Detailansicht auf die Region der ipsilateralen Pilzkörperloben (in (D) durch den umrahmten Bereich angedeutet). Man sieht das ventral verlaufende ipsilateral deszendierende Faszikel (▶), das in den gnathalen Segmenten endet (▶) und das dorsal verlaufende ipsilaterale Faszikel (▶), das engen Kontakt zur Lj hat (▶). **G** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; Lj: Lobe-junction; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.1.8 δ B NB-ZSB10

δ B NB-ZSB10 (Abb. 28) besteht aus 11-12 Neuronen (\varnothing $11,5 \pm 0,7$ n=2). Die NE-Zelle des δ B NB-ZSB10 wurde in den dorsoventralen Positionen 13 bzw. 14 markiert (Abb. 28 G). Die Zellkörper der Neurone liegen im posterioren Protocerebrum, direkt ventral des Pilzkörperkortex (Abb. 28 B, D, E). Sie bilden zwei Faszikel aus, von denen eines durch den posterioren Bereich der präoralen Gehirnkommisur bis ins medioposteriore Neuropil der contralateralen Hemisphäre projiziert und dort in etwa auf Höhe des medialen Lobus endet (Abb. 28 A-E). Dieses Faszikel bildet im dorsalen Bereich des ipsilateralen posteromedialen Gehirnneuropil ein großes dendritisches/axonales Feld aus, welches auch die Oberfläche des distalen Bereichs des vertikalen Pilzkörperlobus innerviert (Abb. 28 A-F). Das zweite Faszikel verbleibt ipsilateral und bildet kleinere dendritische/axonale Felder sowohl im ipsilateralen Gehirnneuropil als auch im Bereich der gnathalen Neuromere, wo es auch endet (Abb. 28 A-F).

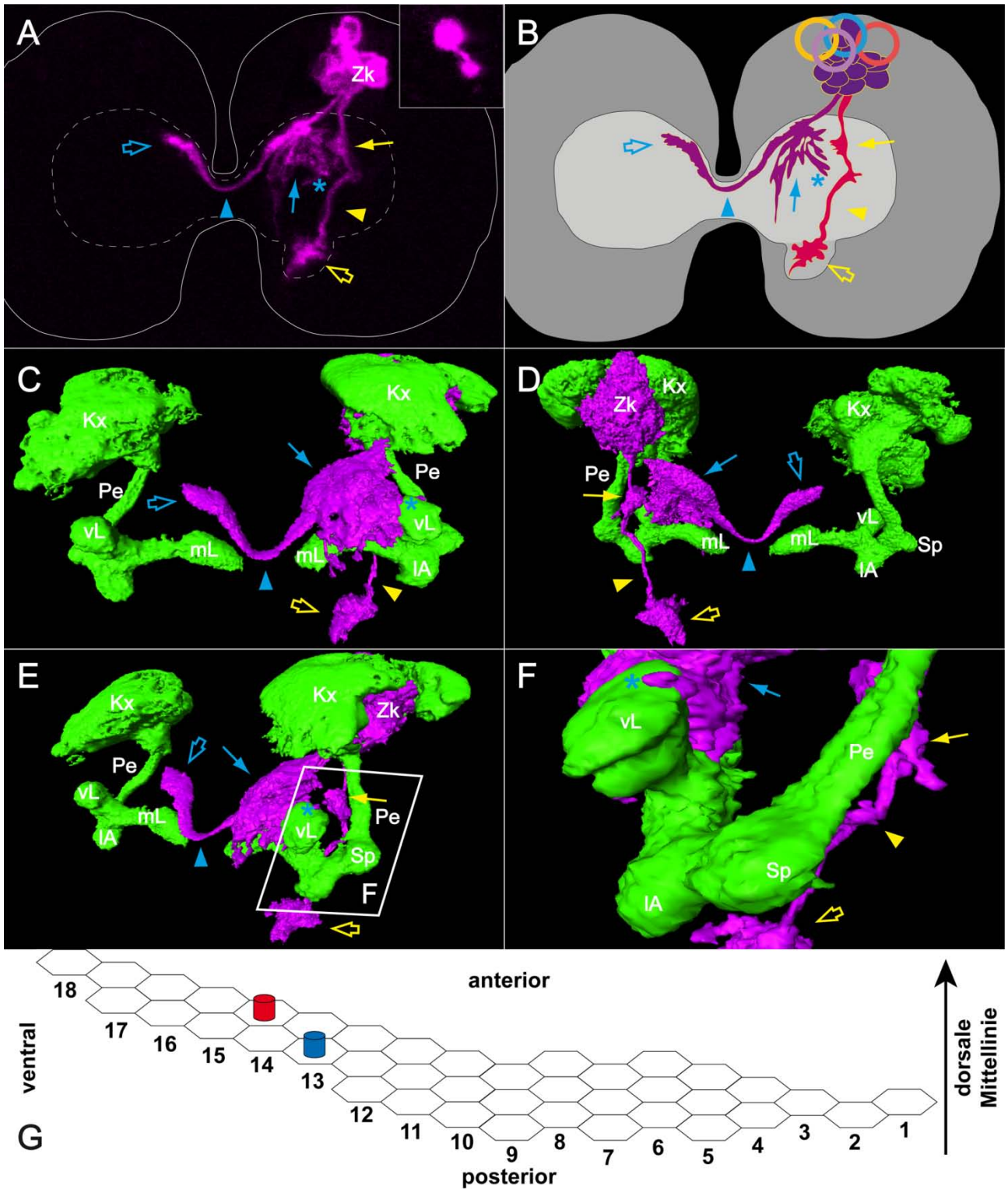










Abb. 28 δB NB-ZSB10

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines δB NB-ZSB10 in einer frühen L1 OK107>GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet 2 Faszikel aus (▶ bzw. ▶). ▶ projiziert contralateral und endet im posteromedialen Neuropil in etwa auf Höhe des mL (◀). Im ipsilateralen Neuropil bildet ▶ ein großes dendritisches/axonales Feld (→), das auch den distalen Bereich des vL innerviert (*). ▶ verbleibt ipsilateral und deszendiert bis in die

gnathalen Segmente, wo es mit einem dendritischen/axonalen Feld endet (). Außerdem bildet  noch ein weiteres dendritisches/axonales Feld im ipsilateralen Neuropil (). Inlay: apoptotische Zelle und Fragment einer δ B NB-ZSB10 Zelle **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-F** 3D Amira Rekonstruktion des δ B NB-ZSB10 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. **D** Ventralansicht. **E** Dorsolaterale Ansicht. **F** Laterale Detailansicht auf den Bereich der ipsilateralen Pilzkörperloben (in (E) durch den umrahmten Bereich angedeutet). Man sieht, wie das dendritische/axonale Feld () den distalen Bereich des vL kontaktiert (). Außerdem sind das ipsilaterale Faszikel () und die beiden dendritischen/axonalen Felder, die es ausbildet, zu sehen ( , ). **G** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.1.9 δ B NB-ZSB11

In beiden Fällen, in denen δ B NB-ZSB11 (Abb. 29) dokumentiert werden konnte, bestand der Zellklon aus neun Neuronen ($\emptyset 9,0 \pm 0 n=2$). Seine NE-Zelle wurde jeweils anterior in den dorsoventralen Positionen 13 bzw. 14 markiert (Abb. 29 C). Der NB delaminiert im späten St.8/frühen St.9. Seine Tochterzellen liegen im anterolateralen Bereich des Protocerebrum, etwas dorsal und lateral des Pilzkörperkortex (Abb. 29 A, B). Der ZSB weist ein einzelnes Faszikel auf, das im ventralen Bereich des posteromedialen Neuropil der ipsilateralen Gehirnhemisphäre endet (Abb. 29 A, B).

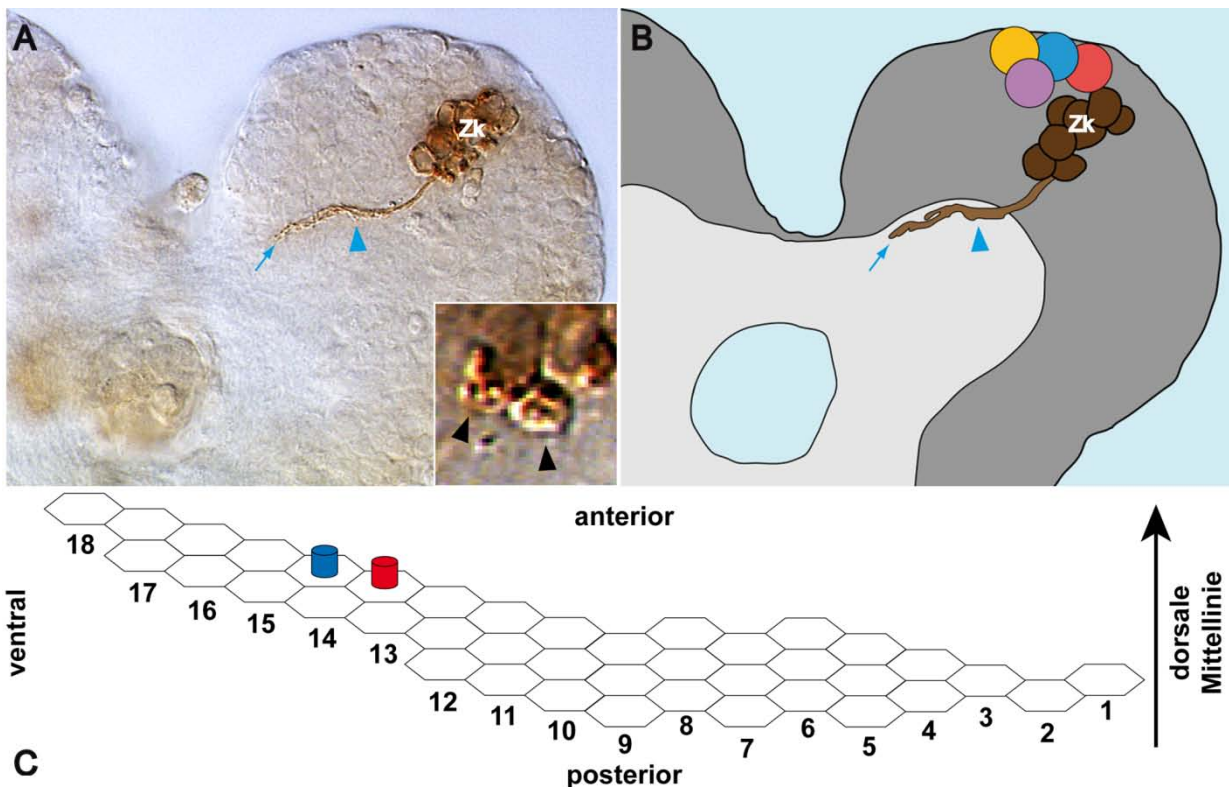


Abbildung 29

Abb. 29 δ B NB-ZSB11

A Rekonstruktion eines photokonvertierten δ B NB-ZSB11 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB weist ein einzelnes ipsilaterales Faszikel auf (▶), das im ventralen Bereich des posteromedialen Neuropil endet (→). Inlay: apoptotische Zellen oder Fragmente des δ B NB-ZSB11 (▶). **B** Zeichnung des photokonvertierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzung:** Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.2 Die proneurale Domäne innerhalb der ventralen Hälfte der δ B bringt einen Neuroglioblasten hervor

In der Gruppe der aus der proneuralen Domäne hervorgehenden ZSBs befand sich ein sowohl Neurone als auch Gliazellen enthaltender ZSB, der somit aus einem Neuroglioblasten (NGB) hervorgeht. Dieser NGB-ZSB stellt den einzigen in δ B charakterisierten ZSB dar, in dem Gliazellen gefunden wurden.

3.3.2.1 δ B NGB-ZSB1

δ B NGB-ZSB1 entsteht aus einem Neuroglioblasten, der 4-5 Neurone ($\bar{\varnothing}$ $4,5 \pm 0,5$) und 5-6 Gliazellen ($\bar{\varnothing}$ $5,3 \pm 0,5$, $n=5$) hervorbringt. Seine NE-Zelle wurde in den dorsoventralen Positionen 8-13 markiert (Abb. 30 C). Da zum Zeitpunkt der optischen Kontrolle die NE-Zelle noch nicht delaminiert war, ist davon auszugehen, dass der NGB nicht zu den früh entstehenden Gehirnneuroblasten gehört. Im δ B NGB-ZSB1 wurden keine Anzeichen von Apoptose gefunden. Seine Neurone liegen im anteroventralen Bereich des Protocerebrums und bilden zwei Faszikel aus (Abb. 30 A, B). Das eine projiziert contralateral durch den intermediären Bereich der präoralen Gehirnkommisur und endet dorsal im Grenzbereich zwischen anteromedialem und anterolateralem Neuropil. Das andere Faszikel verbleibt in der ipsilateralen Hemisphäre, wo es eine dorsal gelegene Region im posteromedialen Neuropil innerviert. Beide Faszikel weisen ipsilaterale Verzweigungen im Bereich der Kortex-Neuropilgrenze auf. Die 5-6 Gliazellen dieses Neuroglioblastenklons sind vorwiegend im posterioren und lateralen Bereich der Hemisphäre lokalisiert und liegen den Zellen des Kortex auf (Abb. 30 A, B). Ihrer Lage nach handelt es sich somit um Subperineurialglia (Hartenstein et al., 1998).

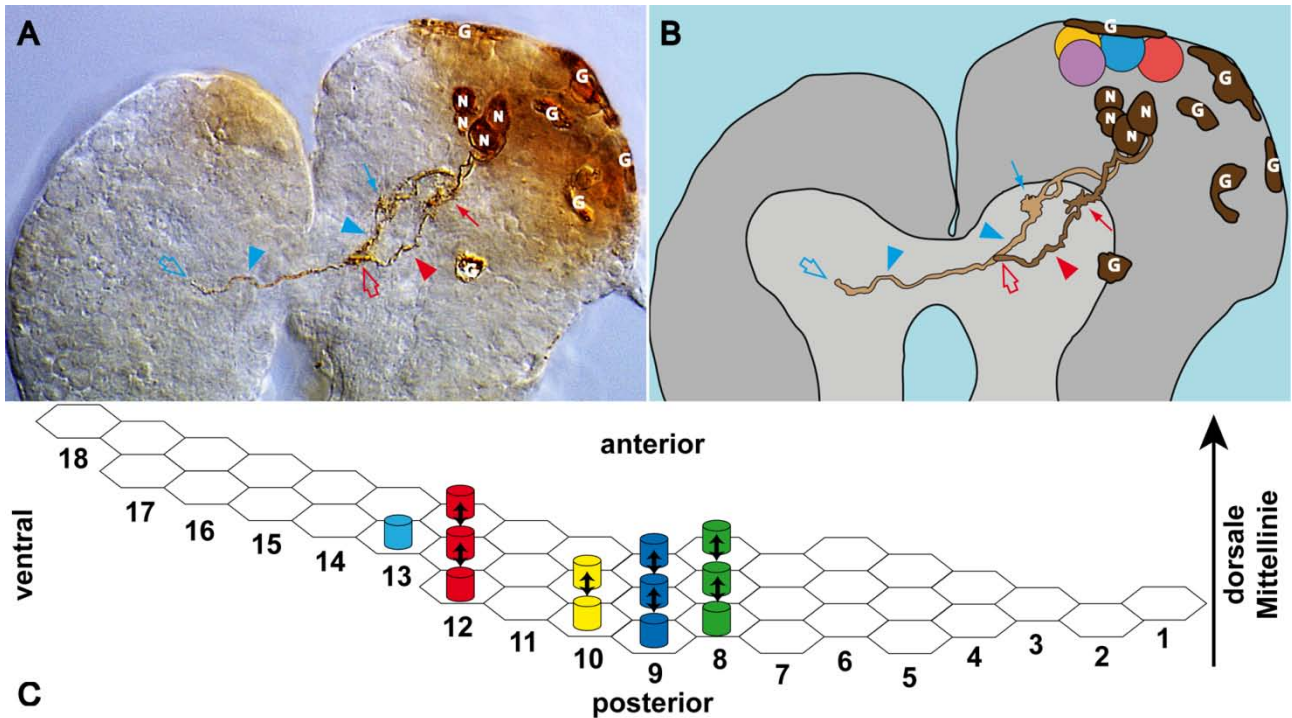


Abb. 30 δ B NGB-ZSB1

A Rekonstruktion eines photokonvertierten δ B NGB-ZSB1 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet Neurone (N) und Gliazellen (G). Die Neurone bilden 2 Faszikel aus: \blacktriangleright : contralateral projizierendes Faszikel, das dorsal im Grenzbereich zwischen anteromedialem und anterolateralem Neuropil endet (\blacktriangleleft). \blacktriangleright : ipsilateral verbleibendes Faszikel, das in einer dorsal gelegenen Region im posteromedialen Neuropil endet (\blacktriangleleft). Beide Faszikel weisen Verzweigungen im ipsilateralen Neuropil auf (\blacktriangleleft bzw. \blacktriangleright). **B** Zeichnung des photokonvertierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzungen:** N: Zellkörper der Neurone; G: Gliazellen

3.3.3 NB-ZSBs, die in der dorsalen Hälfte der δ B entstehen

3.3.3.1 δ B NB-ZSB6

δ B NB-ZSB6 (Abb. 31) besteht aus 18-21 Neuronen ($\bar{\varnothing} 19,5 \pm 2,1 n=2$). Die NE-Zelle, die diesen ZSB hervorbringt, wurden in den dorsoventralen Zellreihen 8 oder 9 markiert (Abb. 31 C). Die Delamination des NB erfolgte im späten St.8/ frühen St.9. Die Neurone des δ B NB-ZSB6 liegen im anteroventralen Bereich des protocerebralen Gehirnkortex und bilden drei contralateral projizierende Faszikel aus. Diese weisen im ipsilateralen Neuropil deutliche Anzeichen von dendritischen/axonalen Verzweigungen auf, ganz besonders im Bereich der Neuropil-Kortex Grenze, wo sich ein prominentes dendritisches/axonales Feld findet. Alle drei Faszikel verlaufen durch den intermediären Bereich der präoralen

Gehirnkommissur und enden im contralateralen Gehirnneuropil. Zwei enden im ventralen Bereich des anteromedialen/posteromedialen Neuropil. Das andere Faszikel endet im dorsalen Bereich des posterolateralen Neuropil (Abb. 31 A, B).

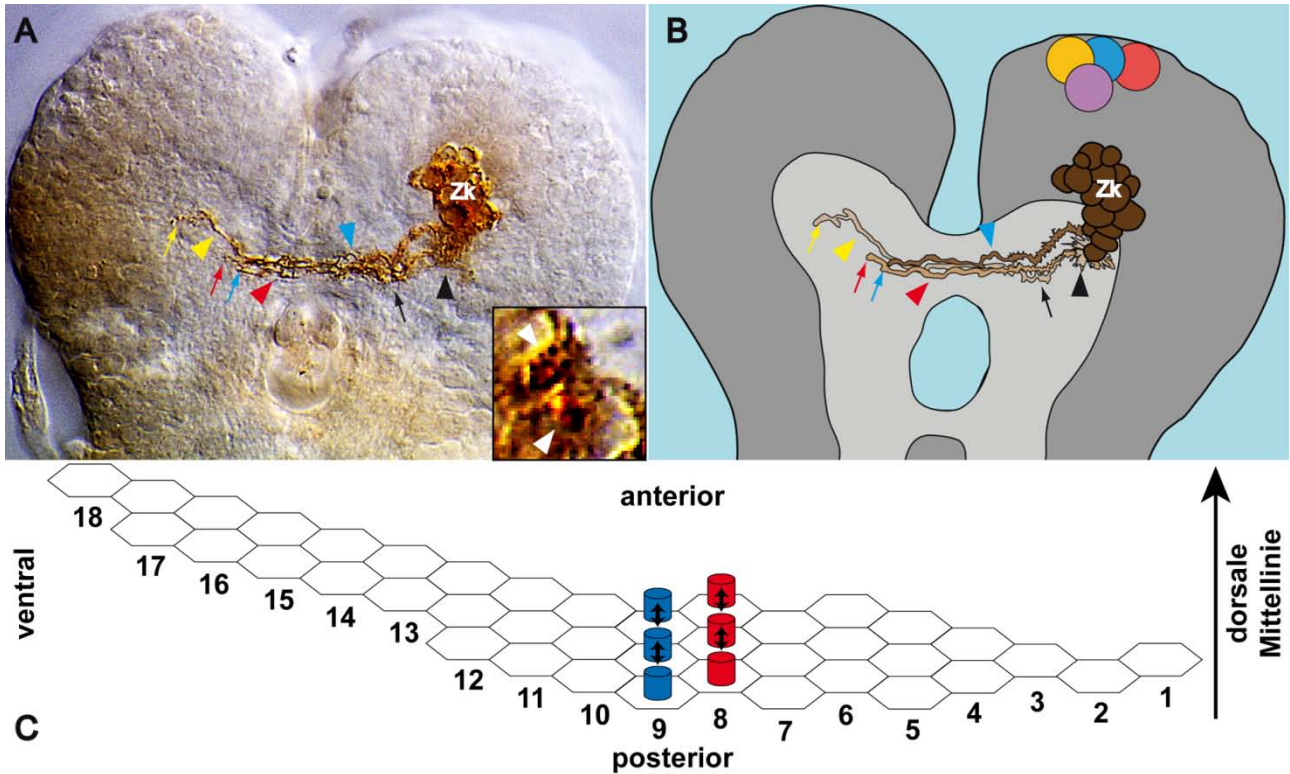


Abb. 31 δ B NB-ZSB6

A Rekonstruktion eines photokonvertierten δ B NB-ZSB6 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet 3 contralateral projizierende Faszikel aus (▶, ▶ bzw. ▶). ▶ endet im dorsalen Bereich des posterolateralen Neuropil (▶). ▶ und ▶ enden im ventralen Neuropil im Bereich der Grenze von anteromedialem und posteromedialem Neuropil (▶ bzw. ▶). Die Faszikel zeigen im ipsilateralen Neuropil deutliche Anzeichen von dendritischen/axonalen Verzweigungen (→) und ein dendritisches/axonales Feld nahe der Neuropil-Kortex-Grenze (▶). Inlay: apoptotische Fragmente einer δ B NB-ZSB6 Zelle (▶). **B** Zeichnung des photokonvertieren ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzung:** Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.3.2 δ B NB-ZSB7

In einem Fall gelang es den δ B NB-ZSB7 zu markieren (Abb. 32), welcher aus 19 Neuronen besteht. In diesem Fall wurden keine Anzeichen von Apoptose gefunden. Die Position der NE-Zelle lag bei der Markierung in der dorsoventralen Zellreihe 9 (Abb. 32 C) und der NB delaminierte im späten St.8/frühen St.9. Die Zellkörper liegen medial im posterioren Protocerebrum etwas ventral und medial des Pilzkörperkortex (Abb. 32 A, B).

Die Neurone bilden ein contralaterales Faszikel, das durch den intermediären Bereich der präoralen Gehirnkommisur verläuft und im ventralen Bereich der Grenze von anteromedialem und anterolateralem Gehirnneuropil endet (Abb. 32 A, B).

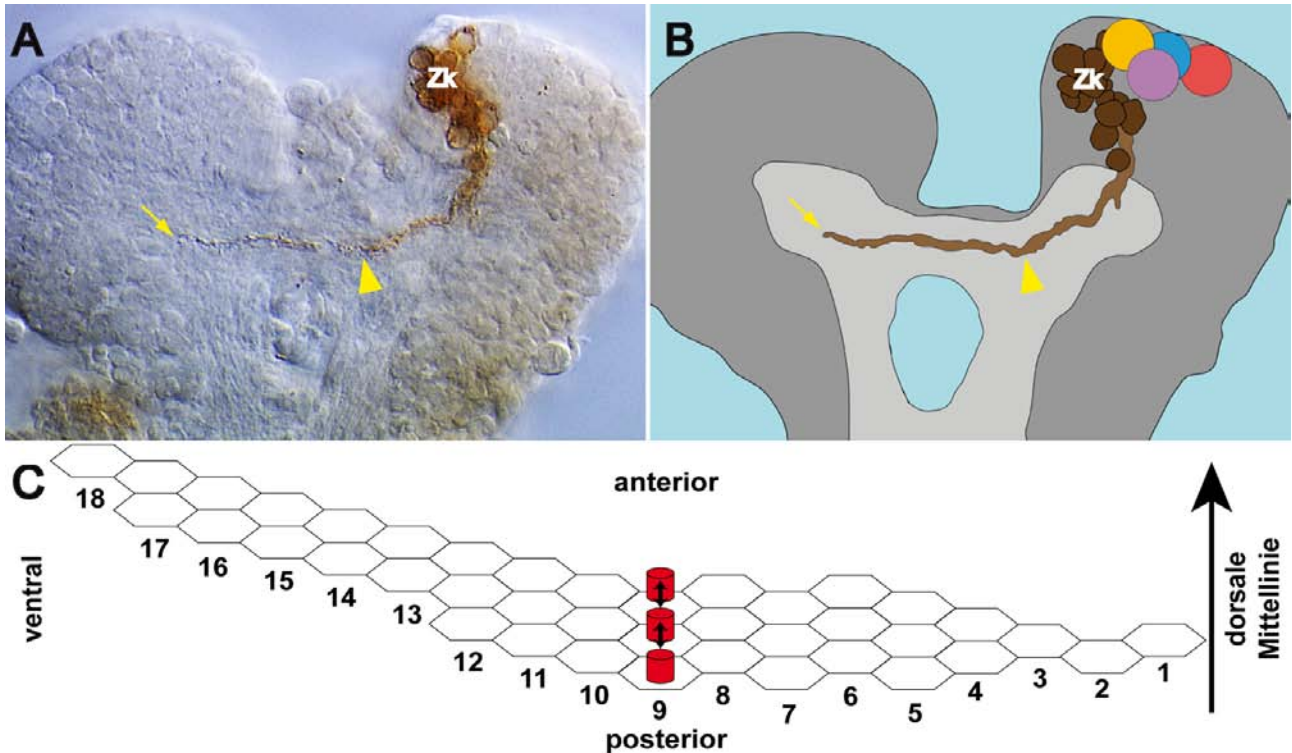




Abb. 32 δB NB-ZSB7

A Rekonstruktion eines photokonvertierten δB NB-ZSB7 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB weist ein einzelnes contralateral projizierendes Faszikel auf (), das im ventralen Bereich der Grenze von anteromedialem und anterolateralem Gehirnneuropil endet (). **B** Zeichnung des photokonvertierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C** δB Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzung:** Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.3.3 δB NB-ZSB12

δB NB-ZSB12 (Abb. 33) stellt mit nur 7-8 Neuronen ($\bar{\varnothing} 7,5 \pm 0,7 n=2$) den kleinsten charakterisierten δB ZSB dar. Es wurden keine Anzeichen für Apoptose gefunden. Die NE-Zelle wurde in den dorsoventralen Positionen 7 bzw. 9 markiert. (Abb. 33 C). Die optische Kontrolle ergab, dass der NB des δB NB-ZSB12 in etwa im späten St.8/frühen St.9 delaminiert. Die Zellkörper des ZSB liegen im posterolateralen Protocerebrum wenige Zelldurchmesser lateral des Pilzkörperkortex. Seine Neurone bilden ein einzelnes, kurzes Faszikel, das ins ipsilaterale posteromediale Neuropil projiziert (Abb. 33 A, B).

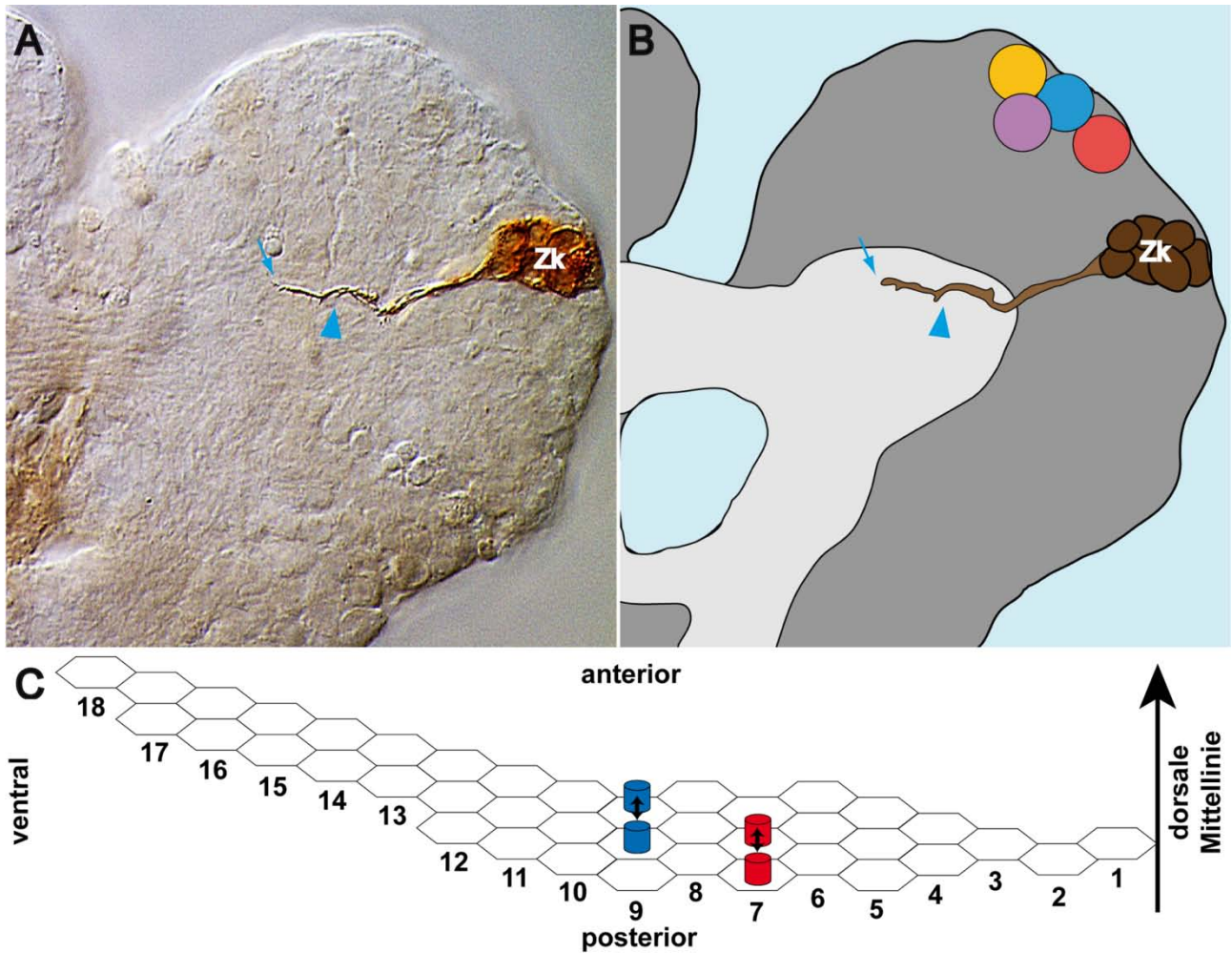


Abb. 33 δ B NB-ZSB12

A Rekonstruktion eines photokonvertierten δ B NB-ZSB12 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet ein in der ipsilateralen Hemisphäre verbleibendes Faszikel aus (▶), welches im ipsilateralen posteromedialen Neuropil endet (→). **B** Zeichnung des photokonvertierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C** δ B Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). **Abkürzung:** Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.4 Neuronale ZSBe aus $\delta 1$

Neben den ZSBen aus δB wurden auch ZSBe der $\delta 1$ markiert und charakterisiert. $\delta 1$ NE-Zellen unterscheiden sich durch ihr mitotisches Verhalten deutlich von δB und $\delta 9$ NE-Zellen (siehe 3.1.1), wodurch sie zweifelsfrei ansprechbar sind. Die NE-Zellen der im Folgenden vorgestellten $\delta 1$ -ZSBe lagen zumeist direkt anterior angrenzend an die Zellen der δB .

3.3.4.1 $\delta 1$ NB-ZSB1

In einem Fall gelang es mir den $\delta 1$ NB-ZSB1 zu markieren (Abb. 34). Seine NE-Zelle wurde direkt anterior der anteriorsten Zellreihe der δB in dorsoventraler Position 13 markiert (Abb. 34 G). Der ZSB besteht aus 16 Neuronen ($n=1$). Der NB des $\delta 1$ NB-ZSB1 delaminiert im mittleren St.9 und gehört damit nicht zu den früh delaminierenden Gehirnneuroblasten. Die Neurone des ZSB bilden zwei Faszikel (Abb. 34 A-D). Eines verläuft durch den posterioren Bereich der präoralen Gehirnkommisur; das andere durch den anterioren Bereich dieser Kommisur. Ersteres projiziert entlang der posterioren Kortex-Neuropilgrenze und endet im ventralen Bereich des posterolateralen Neuropil (Abb. 34 A-D). Das zweite Faszikel bildet ein prominentes, ipsilaterales dendritisches/axonales Feld ventral des ipsilateralen lateralen Appendix des Pilzkörpers (Abb. 34 A-E), welchen es auch kontaktiert (Abb. 34 E). Das contralaterale Ende dieses Faszikels innerviert das Pilzkörperneuropil im Bereich zwischen Spur und lateralem Appendix (Abb. 34 A-D, F). Dieses Faszikel verbindet somit die beiden Pilzkörper in den eben genannten Bereichen (Abb. 34 A-E).

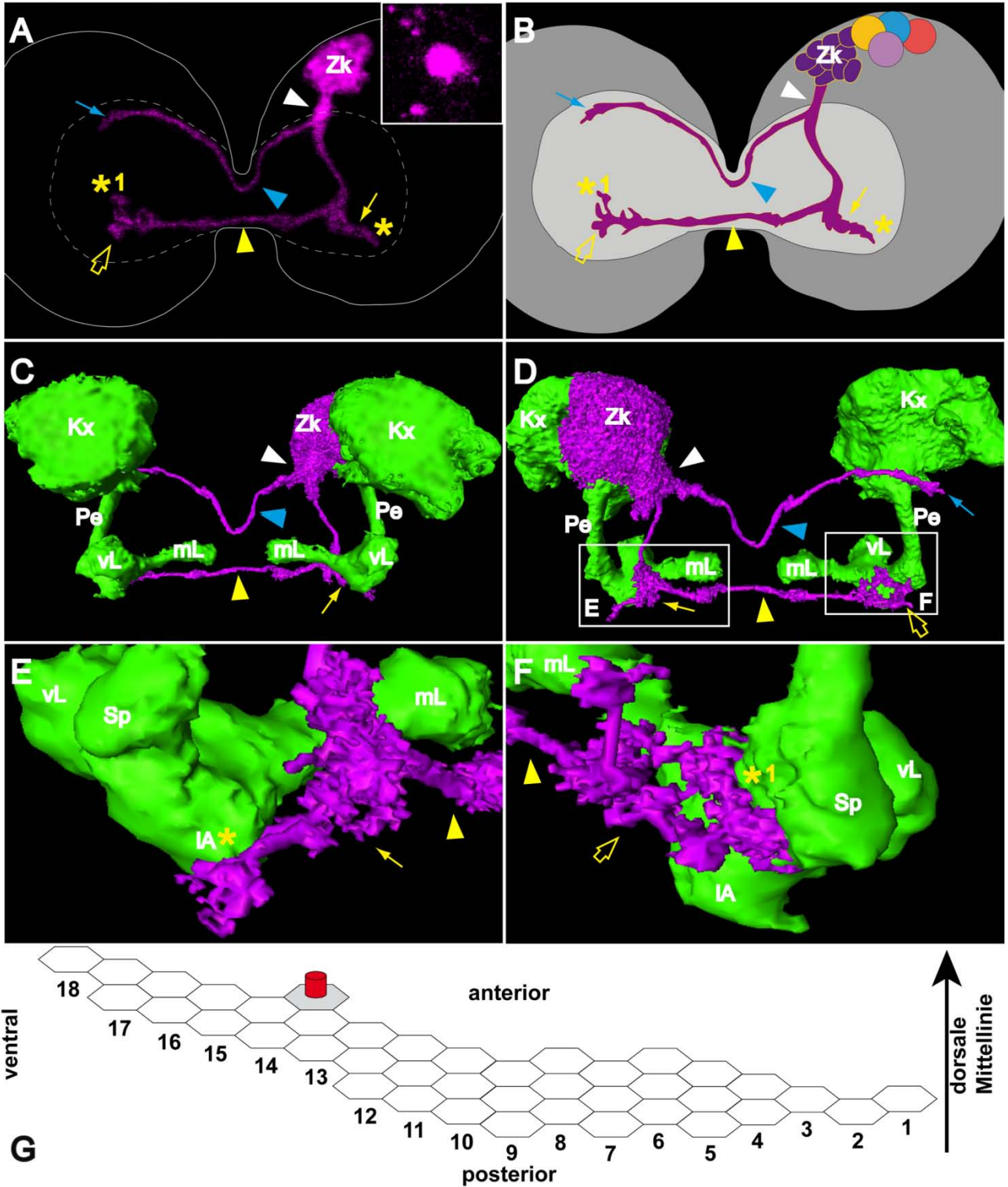









Abb. 34 $\delta 1$ NB-ZSB1

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines $\delta 1$ NB-ZSB1 in einer frühen L1 OK107>GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet zunächst ein kurzes primäres Faszikel (▭), welches sich in 2 contralateral projizierende Faszikel aufspaltet (▶ und ▶). ▶ verläuft durch den posterioren Bereich der Gehirnkommisur und endet im ventralen Bereich des posterolateralen Neuropil (→). ▶ bildet ein ipsilaterales dendritisches/axonales Feld (▭), welches den IA kontaktiert (■). Mit seinem contralateralen Ende (▭) kontaktiert ▶

den Bereich zwischen Sp und IA des Pilzkörpers (). Inlay: apoptotische Zelle und Fragmente. **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila Keis PKNB4. **C-F** 3D Amira Rekonstruktion des $\delta 1$ NB-ZSB1 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. **D** Ventralansicht. **E** Posterolaterale Detailansicht des in (D) umrahmten Bereichs der Region des ipsilateralen Sp/IA. Man sieht, wie das dendritische/axonale Feld () des Faszikels () den IA kontaktiert (). **F** Posterolaterale Detailansicht des in (D) umrahmten Bereichs der Region des contralateralen Sp/IA. Man sieht, wie die dendritischen/axonalen Endigungen () des Faszikels () den Bereich zwischen Sp und IA kontaktieren (). **G** δB Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). Das grau unterlegte Feld steht für eine $\delta 1$ Zelle **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.4.2 $\delta 1$ NB-ZSB2

$\delta 1$ NB-ZSB2 (Abb. 35) besteht aus 13-17 Neuronen ($\emptyset 15 \pm 2,8 n=2$). Seine NE-Zelle lag anterior der anteriorsten Zellreihe der δB in den dorsoventralen Positionen 12 bzw. 13 (Abb. 35 H). Bei der optischen Kontrolle (frühes St.9) war noch kein NB entstanden, weshalb der NB des $\delta 1$ NB-ZSB2 wahrscheinlich nicht zu den früh entstehenden Gehirnneuroblasten gehört. Die Zellkörper der Neurone liegen direkt anterolateral des Pilzkörperkortex (Abb. 35 C, D, F, G) und bilden drei Faszikel (Abb. 35 A, B). Zwei dieser Faszikel verbleiben in der ipsilateralen Hemisphäre. Das eine projiziert bogenförmig nach anterior und endet anterior des medialen Pilzkörperlobus (Abb. 35 A-E). In seinem proximalen Bereich bildet es ein dendritisches/axonales Feld aus, das sich in Richtung des vertikalen Lobus erstreckt, ohne diesen jedoch zu kontaktieren (Abb. 35 A-C, E). Das andere ipsilateral verbleibende Faszikel projiziert nach ventral bis in die gnathalen Neuromere und spaltet sich dort in zwei weitere kurze Faszikel auf (Abb. 35 A, B, D, F, G). Das dritte Faszikel spaltet sich im ipsilateralen Neuropil kurz vor Eintritt in die präorale Gehirnkommisur in ein contralateral durch den anterioren Bereich der Kommisur verlaufendes Faszikel und ein ipsilateral bis ins VNS deszendierendes Faszikel auf (Abb. 35 A-C, E, F). Das contralateral verlaufende spaltet sich nach Austritt aus der Gehirnkommisur erneut auf. Ein Ast endet im anteromedialen Neuropil der Hemisphäre, der andere Ast deszendiert bis ins VNS (Abb. 35 A-D, F). Da bei den Präparationen des ZNS das VNS beschädigt wurde, konnte das Segment, in dem die deszendierenden Faszikel enden, nicht bestimmt werden.

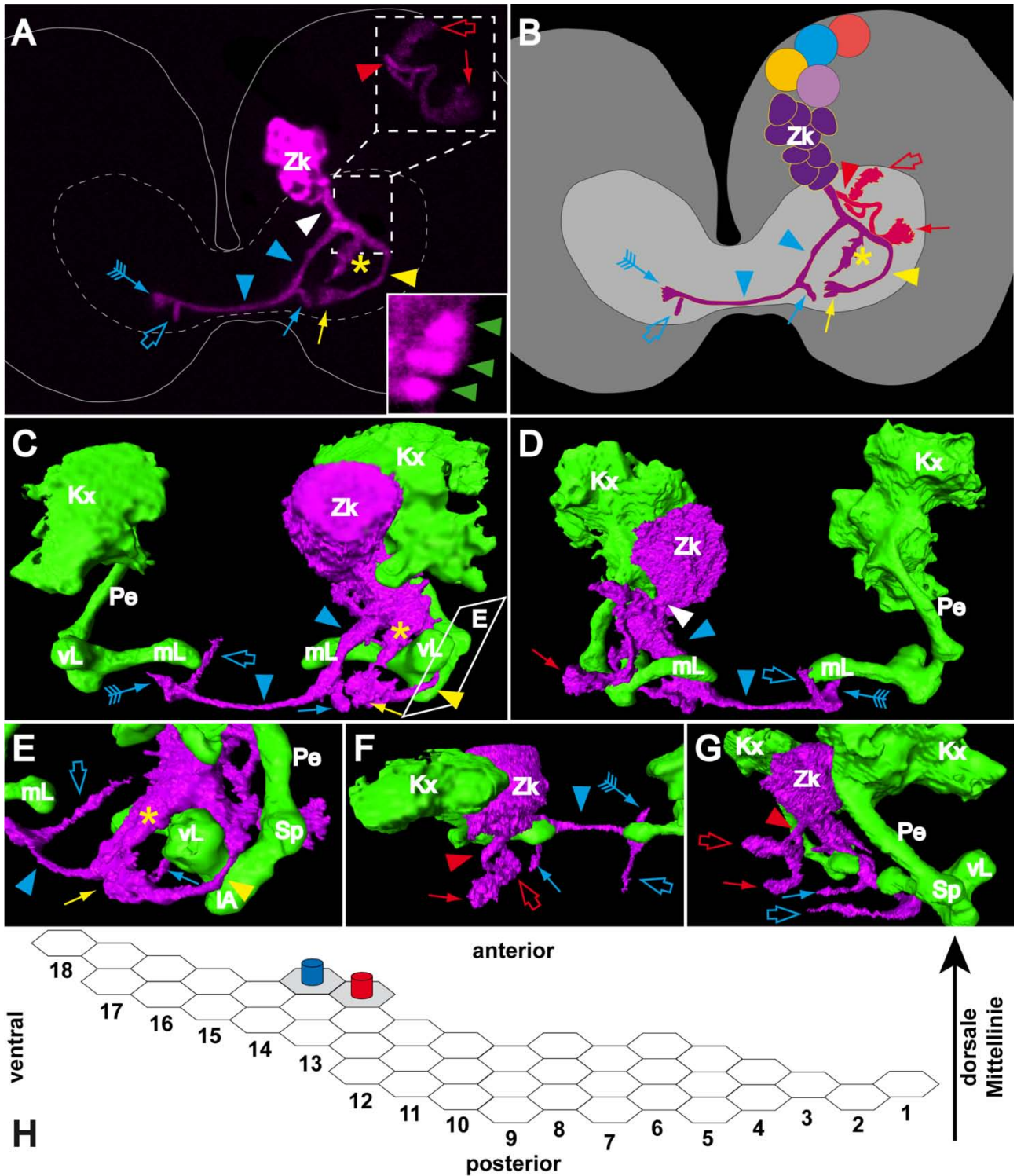


Abb. 35 51 NB-ZSB2

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines $\delta 1$ NB-ZSB2 in einer frühen L1 OK107>GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil mit Linien umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet zunächst ein primäres Faszikel (\square), welches sich im ipsilateralen Neuropil in 3 sekundäre Faszikel aufspaltet (\blacksquare , \blacktriangleright und \blacktriangleleft). \blacksquare verbleibt ipsilateral, bildet in seinem proximalen Bereich ein dendritisches/axonales Feld (\star) und endet im anteromedialen Bereich des Neuropil (\dashv). \blacktriangleright deszendiert bis in die gnathalen Segmente und spaltet sich dort in 2 kurze Faszikel auf (\blacktriangleright , \blacktriangleleft).

bzw. \rightarrow). \blacktriangleright projiziert contralateral, wobei es kurz vor Eintritt in die Gehirnkommisur ein ipsilateral deszendierendes Faszikel bildet (\rightarrow). Nach Austritt aus der Kommissur spaltet sich \blacktriangleright in ein kurzes im anteromedialen Neuropil endendes (\blacktriangleright) und ein bis ins VNS deszendierendes (\blacktriangleright) Faszikel auf. Inlay: apoptotische Zellen oder Fragmente apoptotischer Zellen (\blacktriangleright). **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C-G** 3D Amira Rekonstruktion des $\delta 1$ NB-ZSB2 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. **D** Ventralansicht. **E** Laterale Detailansicht auf die Region der ipsilateralen Pilzkörperloben und des Pedunkels (in (C) durch den umrahmten Bereich angedeutet). Man sieht \blacktriangleright und sein dendritisches/axonales Feld (\blacktriangleright), die nahe am ipsilateralen vL liegen, ohne diesen jedoch zu kontaktieren. Darüber hinaus sieht man neben dem Bereich, in dem \blacktriangleright endet (\blacktriangleright), einen Teil des contralateral projizierenden Faszikel (\blacktriangleright) und das contralateral deszendierende Faszikel (\blacktriangleright). **F** Posteriore Ansicht. Der contralaterale Pilzkörper ist nur teilweise zu sehen. **G** Posterolaterale Ansicht aus Blickrichtung der contralateralen Hemisphäre. **H** δB Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). Grau unterlegte Felder stehen für $\delta 1$ Zellen. **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.4.3 $\delta 1$ NB-ZSB3

$\delta 1$ NB-ZSB3 (Abb. 36) besteht aus 12 Neuronen ($n=1$). Die NE-Zelle wurde an dorsoventraler Position 13 direkt anterior der anteriorsten Zellreihe der δB markiert (Abb. 36 H). Die Zellkörper des ZSB liegen im medialen Bereich des Protocerebrums, direkt ventral des medialen Bereichs des Pilzkörperkortex (Abb. 36 A-D). Die Neurone bilden drei contralateral projizierende Faszikel (Abb. 36 A-D). Das erste verläuft durch den posterioren Bereich der präoralen Gehirnkommisur und endet ventral im Grenzbereich des posteromedialen und posterolateralen Neuropil (Abb. 36 A-D). Die beiden anderen Faszikel projizieren entlang des ipsilateralen medialen Pilzkörperlobus, wobei sie ihn kontaktieren (Abb. 36 F) und danach posterior bzw. anterior durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur verlaufen (Abb. 36 A-D). Das posterior verlaufende Faszikel endet ventral und posterior des proximalen Bereiches des contralateralen, medialen Pilzkörperlobus (Abb. 36 A-D, G). Das anterior durch den intermediären Bereich der Kommissur verlaufende Faszikel endet mit einem dendritisches/axonales Feld im Bereich direkt ventral der Region des Spur/lateralen Appendix des contralateralen Pilzkörpers (Abb. 36 A-D, G), welche es auch kontaktiert (Abb. 36 G). In der ipsilateralen Hemisphäre weist das Faszikel, neben einem kleinen nach posterodorsal gerichteten Faszikel (Abb. 36 A, B, D), ein großes dendritisches/axonales Feld auf (Abb. 36 A-F), mit dem es den posterioren Bereich der Lobe-junction des ipsilateralen Pilzkörpers kontaktiert (Abb. 36 E). Dieses Faszikel verbindet somit die eben genannten Regionen der beiden Pilzkörper.

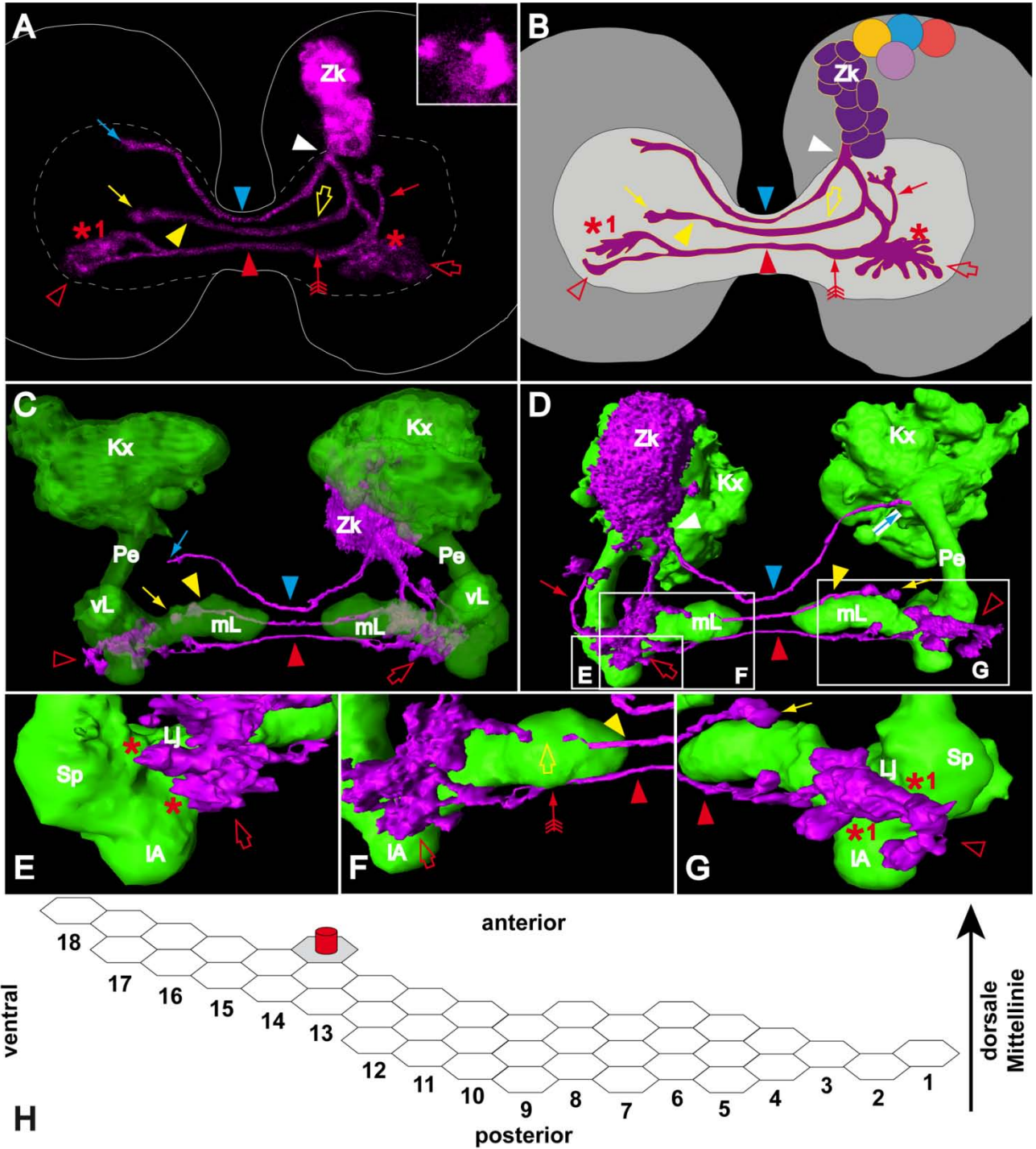


Abb. 36 $\delta 1$ NB-ZSB3

A Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen LSM Aufnahme eines $\delta 1$ NB-ZSB3 in einer frühen L1 OK107>GFP Larve. Zur Orientierung wurden Gehirnkortex und Neuropil umrandet. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB bildet zunächst ein kurzes primäres Faszikel (grey arrow), welches sich in 3 contralateral projizierende Faszikel aufspaltet (blue, yellow and red arrows). blue arrow verläuft durch den posterioren Bereich der Gehirnkommisur und endet ventral im Grenzbereich des posteromedialen/posterolateralen Neuropil (blue arrow). yellow arrow projiziert in der ipsilateralen Hemisphäre entlang des mL, welchen es auch kontaktiert (yellow arrow), verläuft dann posterior durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur und endet im posteromedialen Neuropil posteroventral des contralateralen mL (yellow arrow). red arrow bildet im ipsilateralen Neuropil einen Seitenast (red arrow) und ein großes dendritisches/axonales Feld aus (red arrow), welches den

posterioren Bereich der Lj kontaktiert (*). In seinem weiteren Verlauf projiziert das Faszikel entlang des mL, wobei es diesen auch kontaktiert (»→) und verläuft weiter durch den intermediären Bereich der Gehirnkommisur. In der contralateralen Hemisphäre endet es direkt ventral der Region des Sp/IA des contralateralen Pilzkörpers mit einem dendritischen/axonalen Feld (▷). Ausläufer dieses Feldes kontaktieren die Region zwischen Sp und IA (*1). Inlay: apoptotische Zellen und Fragmente. **B** Zeichnung des rekonstruierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBn eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila Keis PKNB4. **C-G** 3D Amira Rekonstruktion des $\delta 1$ NB-ZSB3 (magenta) und der Pilzkörper (grün). Die Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A, B). **C** Dorsalansicht. Die Pilzkörper wurden transparent dargestellt, um die Morphologie des darunterliegenden ZSB erkennbar zu machen. **D** Ventralansicht. **E** Posterolaterale Detailansicht des in (D) umrahmten Bereichs der Region des ipsilateralen Sp/IA. Man sieht das dendritische/axonale Feld (▷) und wie es den posterioren Bereich der Lj innerviert (*). **F** Posteriore Detailansicht des in (D) umrahmten Bereichs der Region des ipsilateralen mL. Man sieht das ipsilaterale dendritische/axonale Feld (▷) und die beiden Faszikel (■ und ▷), die den mL kontaktieren (▷ bzw. »→). **G** Posterolaterale Detailansicht des in (D) umrahmten Bereichs der Region des contralateralen Sp/IA. Man sieht das Ende eines der contralateral projizierenden Faszikel (■) und ▷ wie es mit seinem dendritischen/axonalen Feld (▷) die Region zwischen Sp und IA innerviert (*1). **H** δB Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). Das grau unterlegte Feld steht für eine $\delta 1$ Zelle. **Abkürzungen:** Kx: Pilzkörperkortex; IA: lateraler Appendix; Lj: Lobe-junction; mL: medialer Lobus; Pe: Pedunkel; Sp: Spur; vL: vertikaler Lobus; Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.4.4 $\delta 1$ NB-ZSB4

$\delta 1$ NB-ZSB4 (Abb. 37) besteht aus 10-11 Neuronen ($\emptyset 10,5 \pm 0,7$ n=2). Die Position der NE-Zelle wurden in beiden Fällen auf zwei Zellreihen anterior der anteriorsten Zellreihe der δB bestimmt, jeweils in den dorsoventralen Positionen 8 bzw. 12 (Abb. 37 C). Da bei der optischen Kontrolle (frühes St.9) noch kein NB delaminiert war, ist davon auszugehen, dass der NB des $\delta 1$ NB-ZSB4 nicht zu den früh entstehenden Gehirnneuroblasten gehört. Die Zellkörper der Neurone liegen medial im Protocerebrum im Bereich des Pars intercerebralis (Abb. 37 A, B). Sie bilden zwei Faszikel, die contralateral durch den anterioren Bereich der präoralen Gehirnkommisur projizieren und im anteromedialen Neuropil der contralateralen Hemisphäre enden. Eines der beiden Faszikel bildet im ipsilateralen posteromedialen Neuropil und im anteromedialen Neuropil jeweils einen kleinen Seitenast aus (Abb. 37 A, B). Das andere Faszikel weist in der ipsilateralen Hemisphäre ebenfalls einen kleinen Seitenast auf und zusätzlich noch einen Bereich mit dendritischen/axonalen Verzweigungen (Abb. 37 A, B).

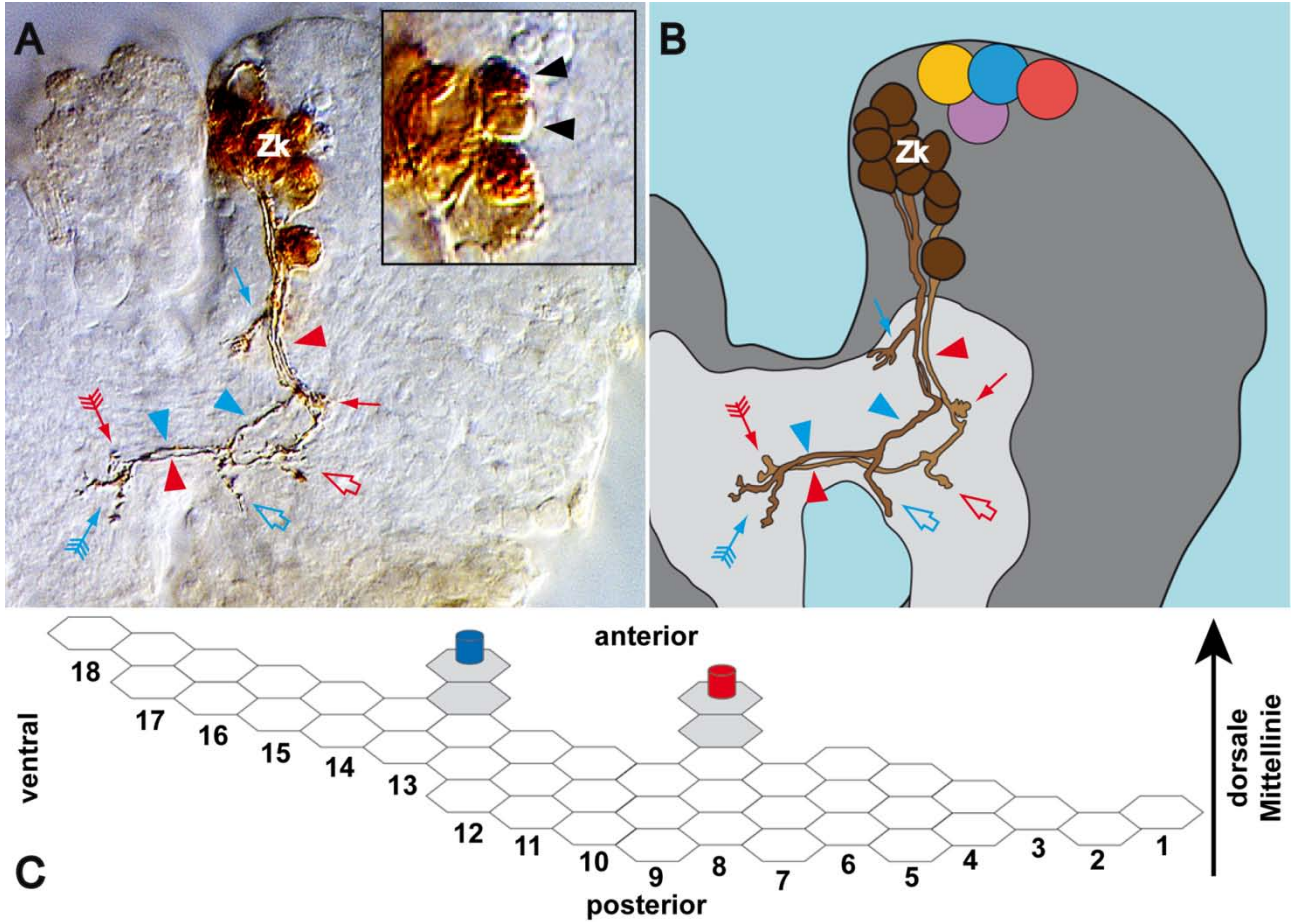


Abb. 37 $\delta 1$ NB-ZSB4

A Rekonstruktion eines photokontvertierten $\delta 1$ NB-ZSB4 in einem frühen St.17 WT Embryo. Dorsalansicht, anterior unten (Körperachse). Der ZSB weist 2 contralateral verlaufende Faszikel auf (\blacktriangleright bzw. \blacktriangleleft), die durch den anterioren Bereich der Gehirnkommisur verlaufen. Eines der beiden Faszikel (\blacktriangleright) bildet im Neuropil der ipsilateralen Hemisphäre 2 kleine Seitenäste aus (\blacktriangleright bzw. \blacktriangleleft). Das andere Faszikel (\blacktriangleleft) bildet im ipsilateralen Neuropil einen kleinen Seitenast (\blacktriangleright) und ein kleines dendritisches/axonales Feld (\blacktriangleright). Beide Faszikel enden im contralateralen anteromedialen Neuropil (\blacktriangleright bzw. \blacktriangleleft). Inlay: apoptotische Zellen oder Fragmente (\blacktriangleright). **B** Zeichnung des photokontvertierten ZSB aus (A). Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). Dunkelgrau: Gehirnkortex; hellgrau: Neuropil. Zur Orientierung wurde die Lage der 4 PKNBen eingezeichnet: gelb PKNB1, blau PKNB2, rot PKNB3, lila PKNB4. **C**: δB Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). Grau unterlegte Felder stehen für $\delta 1$ Zellen. **Abkürzung**: Zk: Zellkörper des markierten ZSB.

3.3.5 Epidermale ZSBe aus $\delta 1$

Bei der Markierung von $\delta 1$ NE-Zellen entstanden auch epidermale ZSBe ($n=5$), die aus 7-10 Zellen bestanden und im frühen St.17 Embryo im dorsalen Bereich des Kopfes nahe der dorsalen Mittellinie lagen (Abb. 38 A). Die NE-Zellen, die zu diesen epidermalen Klonen führten, lagen in den dorsoventralen Positionen 10-13 und 1-2 Zellreihen anterior der anteriorsten Reihe der δB -Zellen (Abb. 38 B). Da epidermale ZSBe wenig morphologische Charakteristika aufweisen, anhand derer sie unterschieden werden können, ist nicht klar, ob in jedem Fall dieselbe Vorläuferzelle markiert wurde oder ob es sich um Markierungen verschiedener Vorläuferzellen mit epidermale Schicksal handelt.

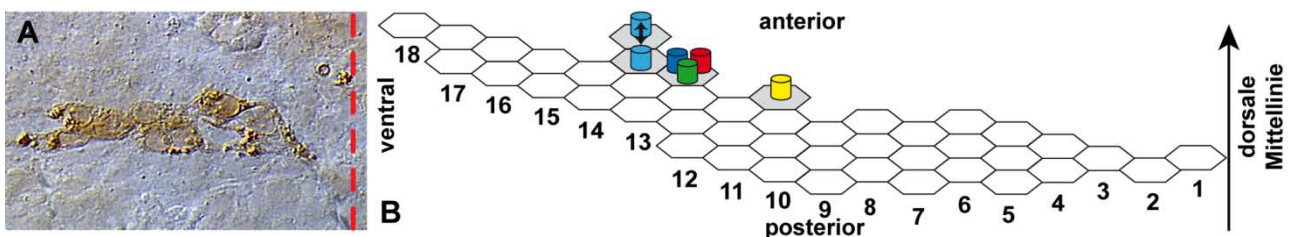


Abb. 38 Epidermaler ZSB aus $\delta 1$

A Rekonstruktion eines photokonvertierten epidermalen ZSB im frühen St.17. Anterior oben (Körperachse), lateral links. Man sieht die epidermalen Zellen (braun), die sich nahe der dorsalen Mittellinie (rot gestrichelte Linie) befinden. **B** δB Schema. Symbole wie in Abb. 21 (S. 95). Grau unterlegte Felder stehen für $\delta 1$ Zellen.

Ergebnisse

| Name | Teil der proneuralen Domäne ? | Delaminations-Zeitpunkt (Stadium) | Zellzahl (Neurone inkl. NB) | Gliazellen | Faszikel | | | | Anzeichen von Apoptose | Besonderheiten |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------|---------------|----------------|---------------|----------------|------------------------|---|
| | | | | | contralateral | | ipsilateral | | | |
| | | | | | deszendierend | nicht deszend. | deszendierend | nicht deszend. | | |
| δB NB-ZSB1 | JA | spät8/früh9 | Ø 27,5 ± 0,7 | NEIN | NEIN | NEIN | NEIN | 2 | JA | |
| δB NB-ZSB2 | JA | spät8 | Ø 22,5 ± 4,2 | NEIN | 3 | 2 | 2 | NEIN | NEIN | Faszikel innervieren terminales abdominales Segment |
| δB NB-ZSB3 | JA | spät8 | Ø 21,8 ± 1 | NEIN | NEIN | 1 (in L1) | NEIN | 2 | JA | innerviert Ringdrüse; kontaktiert möglicherweise ipsilateralen Pilzkörper |
| δB NB-ZSB4 | JA | ? | Ø 20,5 ± 2,1 | NEIN | NEIN | 1 | NEIN | 1 | JA | ZSB verbindet ipsi- und contralateralen Pilzkörper. Axone tragen zum Pedunkel bei |
| δB NB-ZSB5 | JA | ? | Ø 19,5 ± 2,1 | NEIN | NEIN | 1 | NEIN | 1 | JA | Faszikel verläuft durch ipsilateralen lateralen Appendix. |
| δB NB-ZSB6 | NEIN | spät8/früh9 | Ø 19,5 ± 2,1 | NEIN | NEIN | 3 | NEIN | NEIN | JA | |
| δB NB-ZSB7 | NEIN | spät8/früh9 | 19,0 (n=1) | NEIN | NEIN | 1 | NEIN | NEIN | NEIN | |
| δB NB-ZSB8 | JA | später als früh9 | Ø 16 ± 1,5 | NEIN | NEIN | NEIN | NEIN | 2 | JA | |
| δB NB-ZSB9 | JA | später als früh9 | Ø 14,5 ± 3,5 | NEIN | NEIN | 1 | 1 | 1 | JA | verläuft durch Lobe-junction des ipsilateralen Pilzkörper |
| δB NB-ZSB10 | JA | später als früh9 | Ø 11,5 ± 0,7 | NEIN | NEIN | 1 | 1 | NEIN | JA | innerviert ipsilateralen vL des Pilzkörper |
| δB NB-ZSB11 | JA | spät8/früh9 | Ø 9,0 ± 0 | NEIN | NEIN | NEIN | NEIN | 1 | JA | |
| δB NB-ZSB12 | NEIN | spät8/früh9 | Ø 7,5 ± 0,7 | NEIN | NEIN | NEIN | NEIN | 1 | NEIN | |
| δB NGB-ZSB1 | JA | später als früh9 | Ø 4,5 ± 0,5 | Ø 5,3 ± 0,5 | NEIN | 1 | NEIN | 1 | NEIN | bringt Gliazellen hervor |
| δ1 NB-ZSB1 | NEIN | mitte9 | 16,0 (n=1) | NEIN | NEIN | 2 | NEIN | NEIN | JA | ZSB verbindet ipsi- und contralateralen Pilzkörper |
| δ1 NB-ZSB2 | NEIN | später als früh9 | Ø 15,0 ± 2,8 | NEIN | 1 | 1 | 1 | 1 | JA | |
| δ1 NB-ZSB3 | NEIN | später als früh9 | 12,0 (n=1) | NEIN | NEIN | 3 | NEIN | NEIN | JA | ZSB verbindet ipsi- und contralateralen Pilzkörper |
| δ1 NB-ZSB4 | NEIN | später als früh9 | Ø 10,5 ± 0,7 | NEIN | NEIN | 2 | NEIN | NEIN | JA | |

Tabelle 2 Statistiken δB und δ1 ZSBs

3.4 Untersuchung von Gal4-Stämmen mit Expression in PKZSBen

Mit der klonalen Untersuchung der Embryonalentwicklung der PKZSBe und der Identifikation der betreffenden PKNBen in den embryonalen Gehirnneuroblastenkarten (Urbach et al., 2003; Urbach and Technau, 2003b) wurde der Grundstein für die Etablierung eines Modellsystems gelegt, das die Untersuchung verschiedenster zellulärer und genetischer Aspekte der Embryonalentwicklung der PKNBen und ihrer embryonalen Gehirnzellstammbäume ermöglicht. Um z.B. mittels des Gal4/UAS-Systems die Funktion bestimmter Gene im Rahmen der Pilzkörperentwicklung zu untersuchen, ist eine wichtige Voraussetzung die Verfügbarkeit von Gal4-Stämmen, die gezielt in den Zellen dieser Zellstammbäume (NB, Subgruppen von Tochterzellen, oder allen Tochterzellen) exprimieren. Auf diese Weise kann z.B. in Missexpressionsexperimenten die Funktion der missexprimierten Gene auf die Entwicklung der betreffenden Zellen untersucht werden.

Aus diesem Grund wurden Gal4-Stämme, die laut Literatur eine Expression in den postembryonalen Pilzkörpern zeigen (Aso et al., 2009; Tanaka et al., 2008), auf eine Expression in den embryonalen Pilzkörpern hin untersucht. Außerdem wurde das Expressionsmuster von *dacGal4* untersucht, da *dac* im embryonalen Pilzkörper exprimiert wird (Kurusu et al., 2000; Noveen et al., 2000) (siehe Tabelle 3). Hierzu wurden die Gal4 Fliegen mit UAS-CD8::GFP Fliegen verkreuzt und ihre Embryonen einer Antikörperfärbung gegen GFP unterzogen. Von allen untersuchten Stämmen zeigten nur OK107Gal4 (siehe Tabelle 3 und 3.2.1) und *dacGal4* (siehe Tabelle 3 und 3.4.1) eine Reporterexpression im Bereich der embryonalen Pilzkörper, weshalb sie für eine nähere Charakterisierung ausgewählt wurden.

Ergebnisse

| Stamm | Expression |
|-----------------|--|
| NP6649 | Expression in einigen Gliazellen im St.17 Gehirn. Keine Expression im Bereich der Pilzkörper |
| NP3208 | Sehr schwache Expression in vielen Zellen des Protocerebrums. Darunter auch in einigen Zellen die im Bereich der γ -Neurone liegen. Keine Expression in PKNBen. |
| NP2748 | Keine GFP Expression im St.17 Gehirn |
| NP3061 | Keine GFP Expression im St.17 Gehirn |
| NP3291 | GFP Expression im St.17 Gehirn, jedoch nicht im Bereich der Pilzkörper |
| NP5286 | Keine GFP Expression im St.17 Gehirn |
| NP7060 | Keine GFP Expression im St.17 Gehirn |
| NP7175 | Keine GFP Expression im St.17 Gehirn |
| NP6024 | Keine GFP Expression im St.17 Gehirn |
| UASGFP T10 | Keine GFP Expression im St.17 Gehirn, jedoch in Subsets von γ -Neuronen in L1 |
| OK107 (Ey-Gal4) | Starke GFP Expression im St.17 und L1 in den 4 PKNBen und allen ihren γ -Neuronen (siehe 3.2.1) |
| dacGal4 | GFP Expression in den PKNBen 1-3 und allen ihren Nachkommenzellen (siehe 3.4.1.1) |

Tabelle 3 Gal4 Stämme, die auf eine Expression im embryonalen Pilzkörper hin untersucht wurden

3.4.1 Charakterisierung des *dacGal4* Expressionsmusters

3.4.1.1 Dil-Markierungen von PKZSBen in *dacGal4>CD8::GFP*

dacGal4 exprimiert in den PKNBen1-3 und in vielen ihrer Nachkommenzellen. Um zu überprüfen, in welchen Nachkommenzellen dieser drei PKNBen *dacGal* exprimiert wird, wurden Dil-Markierungen in *dacGal4>CD8::GFP* Embryonen durchgeführt und auf eine Kolokalisation von Dil und GFP im St.17 hin untersucht. Die Markierungen zeigten, dass alle Nachkommenzellen der PKZSB1-3 ($n= 2-3$ pro PKZSB) eine Kolokalisation von GFP und Dil aufwiesen (Abb. 39 A-C'). PKZSB4 und seine Nachkommen zeigen keine *dacGal4* Expression (siehe 3.4.1.2). Dies ist konsistent mit der fehlenden *Dac*-Proteinexpression im PKNB4 und seinen Nachkommenzellen (siehe 3.5.1).

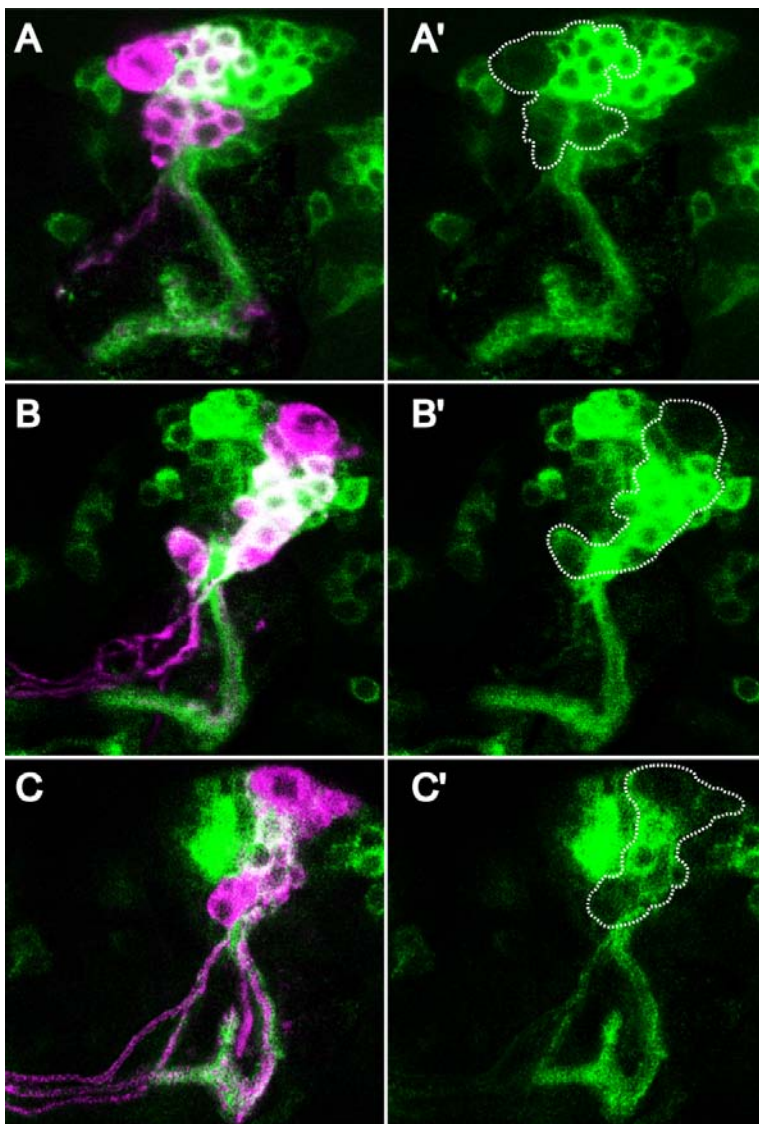


Abb. 39 Dil-Markierungen in *dacGal4>CD8::GFP*

A-C Dil-Markierungen der PKZSB1-3 aufgenommen im späten St.17 in *dacGal4>CD8::GFP* Embryonen. Man sieht die Kolokalisation von Dil und GFP in allen Zellen der PKZSB1-3 **A** PKZSB1. **A'** GFP Expression von (A). Die weiße, gestrichelte Linie gibt den Umriss der Dil-positiven Zellkörper an. **B** PKZSB2. **B'** GFP Expression von (B) Die weiße, gestrichelte Linie gibt den Umriss der Dil-positiven Zellkörper an. **C** PKZSB3. **C'** GFP Expression der in (C) gezeigten Abbildung. Die weiße, gestrichelte Linie gibt den Umriss der Dil-positiven Zellkörper an.

3.4.1.2 Spätembryonale Ey-Expression im *dacGal4>CD8::GFP* Hintergrund

Analyse des *dacGal4>CD8::GFP* Expressionsmusters im St.17 und die durchgeführten Dil-Markierungen im Bereich der Pilzkörper erweckten den Eindruck, dass neben den PKZSBe1-3 auch andere, an die PKZSBe1-3 angrenzende Zellen, *dacGal4* exprimieren. Eine Auszählung der Zellzahlen in diesem Bereich bestätigte dies. Man findet im Bereich der Pilzkörper $156 \pm 4,8$ Zellen, die GFP exprimieren (n=4 Hemisphären). Bei einer exklusiven Gal4 Expression in den PKZSBe1-3 sollten hingegen, laut der durch Dil-Markierungen ermittelten Zellzahlen dieser drei ZSBe, im St.17 nur $97 \pm 5,5$ Zellen markiert sein (siehe Tabelle 1). Der "Überschuss" an Zellen kommt also von anderen *dacGal4* exprimierenden Zellen, die benachbart zu den PKZSBe liegen. Antikörperfärbungen gegen Ey (n=10 Hemisphären), das im St.17 im Bereich des posterodorsalen Protocerebrums nur von γ -Neuronen exprimiert wird, ermöglichen innerhalb des *dacGal4>CD8::GFP* Musters eine Unterscheidung der γ -Neurone der PKZSBe (Ey positiv) und der Zellen der anderen Gehirnzellstammbäume (Ey negativ). Es stellte sich heraus, dass es, neben den Ey positiven γ -Neuronen der PKZSBe, drei Bereiche im *dacGal4>UAS::CD8 GFP* Muster gibt, in denen Zellen liegen, die kein Ey exprimieren (Abb. 40 A-E). Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um die Nachkommen dreier *dacGal4* exprimierender ZSBe. Diese befinden sich anterolateral, posterointermediär bzw. posteroventral in der *dacGal4* Expressionsdomäne. Die *dacGal4* Expressionsdomäne im Bereich der Pilzkörper umfasst also die PKZSBe1-3, die den inneren Bereich der Expressionsdomäne darstellen und drei weitere Gehirnzellstammbäume, die in der Peripherie der Expressionsdomäne liegen.

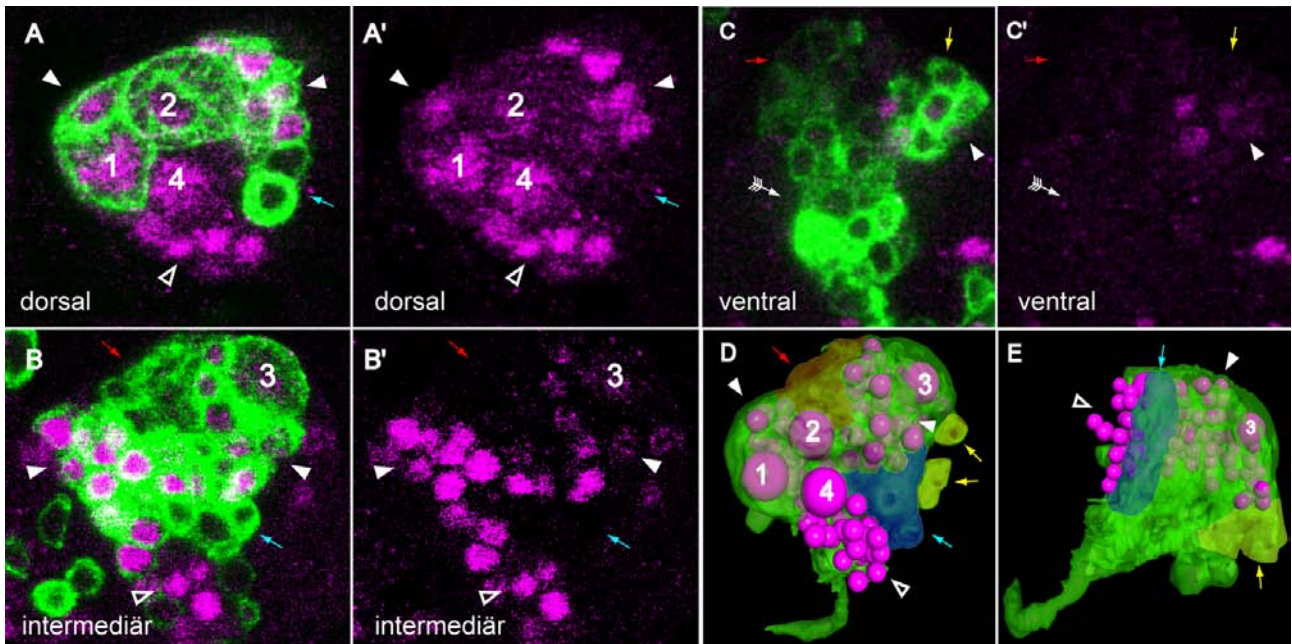


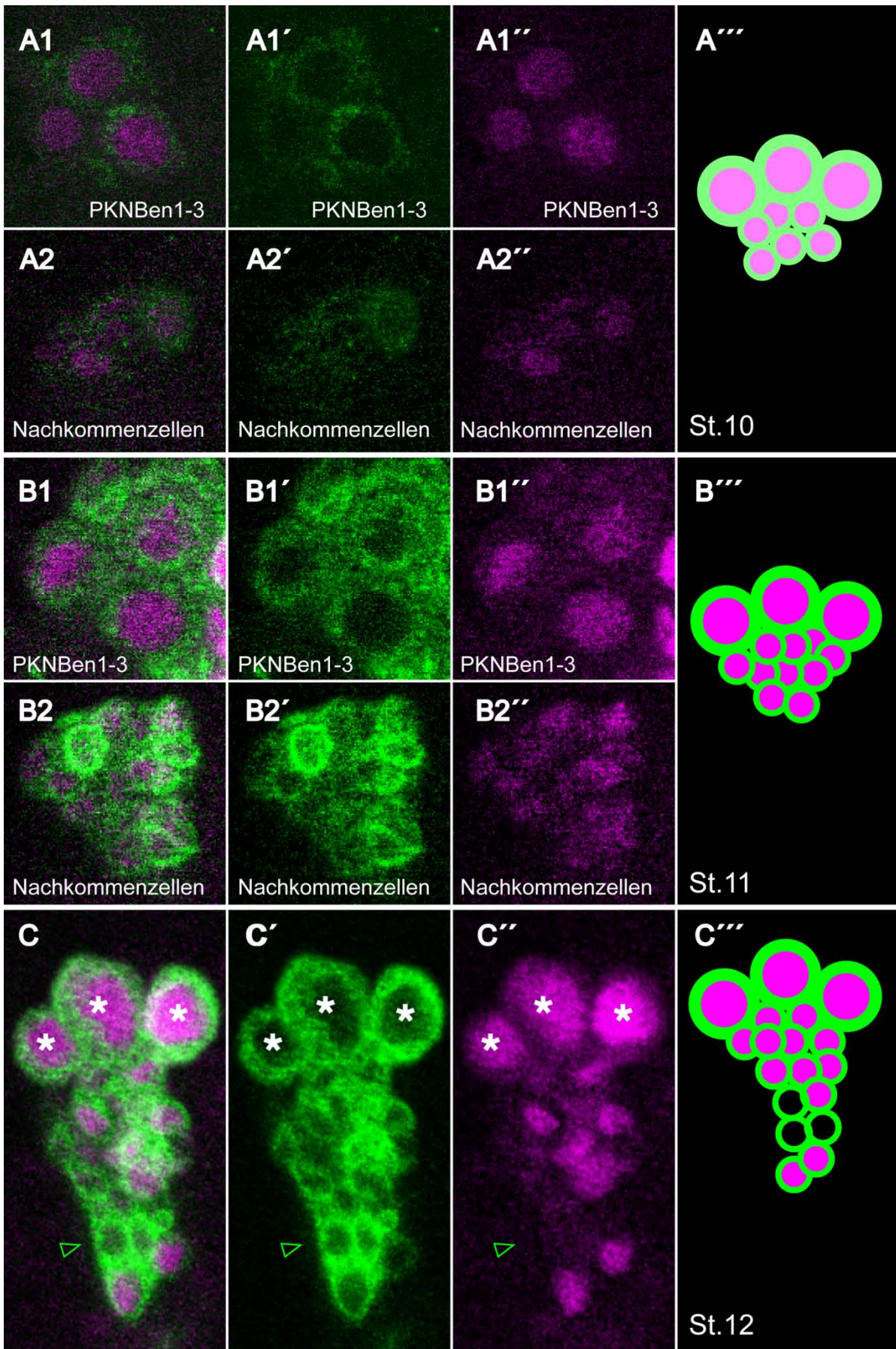
Abb. 40 Ey Antikörperfärbung im *dacGal4>CD8GFP* Hintergrund

A-C Ey Antikörperfärbung in *dacGal4>CD8::GFP* im St.17. Gezeigt ist die Pilzkörperregion der rechten Hemisphäre. Anterior unten (in Körperachse), medial links. **A'-C'** Ey Färbung der in (A-C) gezeigten Abbildungen. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A-C). **A** Optischer Schnitt durch den dorsalen Bereich der Pilzkörperregion. Man sieht sowohl die PKNB1,2 inklusive einiger ihrer Nachkommenzellen (◻; GFP+/Ey+) als auch den PKNB4 und Nachkommenzellen (◻; Ey+/GFP-). Neben diesen PKZSBen sieht man auch einige GFP+/Ey-Zellen, bei denen es sich um die Nachkommen von *dacGal4* exprimierenden nicht-PKZSBen handelt (→). **B** Optischer Schnitt durch den intermediären Bereich der Pilzkörperregion. Man sieht neben den Nachkommenzellen der PKNB1,2 (◻; GFP+/Ey+) auch den PKNB3 inklusive einiger seiner Nachkommenzellen (◻; GFP+/Ey+). Des Weiteren sieht man γ -Neurone des PKNB4 (◻; Ey+/GFP-) und auch einige Zellen, bei denen es sich um die Nachkommen von *dacGal4* exprimierenden nicht-PKZSBen handelt (GFP+/Ey-; → und →). **C** Optischer Schnitt durch den ventralen Bereich der Pilzkörperregion. Gezeigt sind einige Nachkommenzellen des PKNB3 (◻GFP+/Ey+), einige Nachkommenzellen von nicht-PKZSBen (GFP+/Ey-, ansprechbar durch ihre periphere Lage am Kortextrand, → und →) und die zentral gelegenen ni-Neurone (◻→; GFP+/Ey-) der PKZSBen1-3. **D+E** Amira Rekonstruktion des in (A-C) gezeigten Pilzkörperbereichs. Die Regionen in denen sich die Nachkommenzellen der nicht-PKZSBen befinden (→, → und →) wurden farbig markiert (rot: posterointermediär; blau: anterolateral; gelb: posteroventral). Symbole wie in (A-C') **D** Dorsalansicht, medial links. **E** Lateralansicht, anterior links (Körperachse).

3.4.1.3 Charakterisierung der *Dac*-Protein- und *dacGal4*-Expression im Verlauf der embryonalen Gehirnentwicklung

Um zu klären, inwiefern die *dacGal4* Expression mit der *Dac*-Proteinexpression im Bereich der PKZSBen übereinstimmt, wurde eine Analyse über die gesamte Embryonalentwicklung hinweg durchgeführt. Eine erste schwache GFP Expression im Bereich der frühen PKNBen und ihrer Nachkommenzellen zeigt sich im St.10 (n= 6 Hemisphären) und nimmt im St.11 (n= 10 Hemisphären) deutlich an Intensität zu. In diesen Stadien stimmen GFP Expression und *Dac*-Proteinexpression im Bereich der PKNBen und ihrer

Nachkommenzellen vollständig überein (Abb. 41 A1, A2, B1, B2). Im St.12 (n= 18 Hemisphären) (Abb. 41 C) zeigen sich erste Unterschiede in der GFP und Dac-Proteinexpression. In einigen wenigen der GFP exprimierenden Zellen findet sich nun keine Dac-Proteinexpression. Dies betrifft Zellen, die weit distal von den PKNBen gelegen sind, was dafür spricht, dass in einigen der frühgeborenen Zellen (ni-Neurone) die Dac-Proteinexpression herunterreguliert wurde. In den Embryonalstadien 13 und 14 (n= 18 bzw. 12 Hemisphären) (Abb. 41 D) nimmt die Anzahl der distal gelegenen Nachkommenzellen (also im Bereich der ni-Neurone), die ihre Dac-Proteinexpression verlieren, deutlich zu. Darüber hinaus exprimieren im St.14 im Bereich der γ -Neurone (also nahe an den PKNBen liegende Zellen) einige Zellen Dac Protein nur schwach. Die Dac-Proteinexpression in den PKNBen1-3 ist ab dem St.14 deutlich schwächer. Während der Embryonalstadien 15, 16 und 17 (n= 10, 14 bzw. 12 Hemisphären) findet man nun zunehmend mehr Zellen im Bereich der γ -Neurone, die kein Dac exprimieren. Gleichzeitig erhöht sich auch die Zahl der Zellen im Bereich der ni-Neurone, die zwar noch GFP, aber keine Dac-Proteinexpression mehr zeigen (Abb. 41 E).



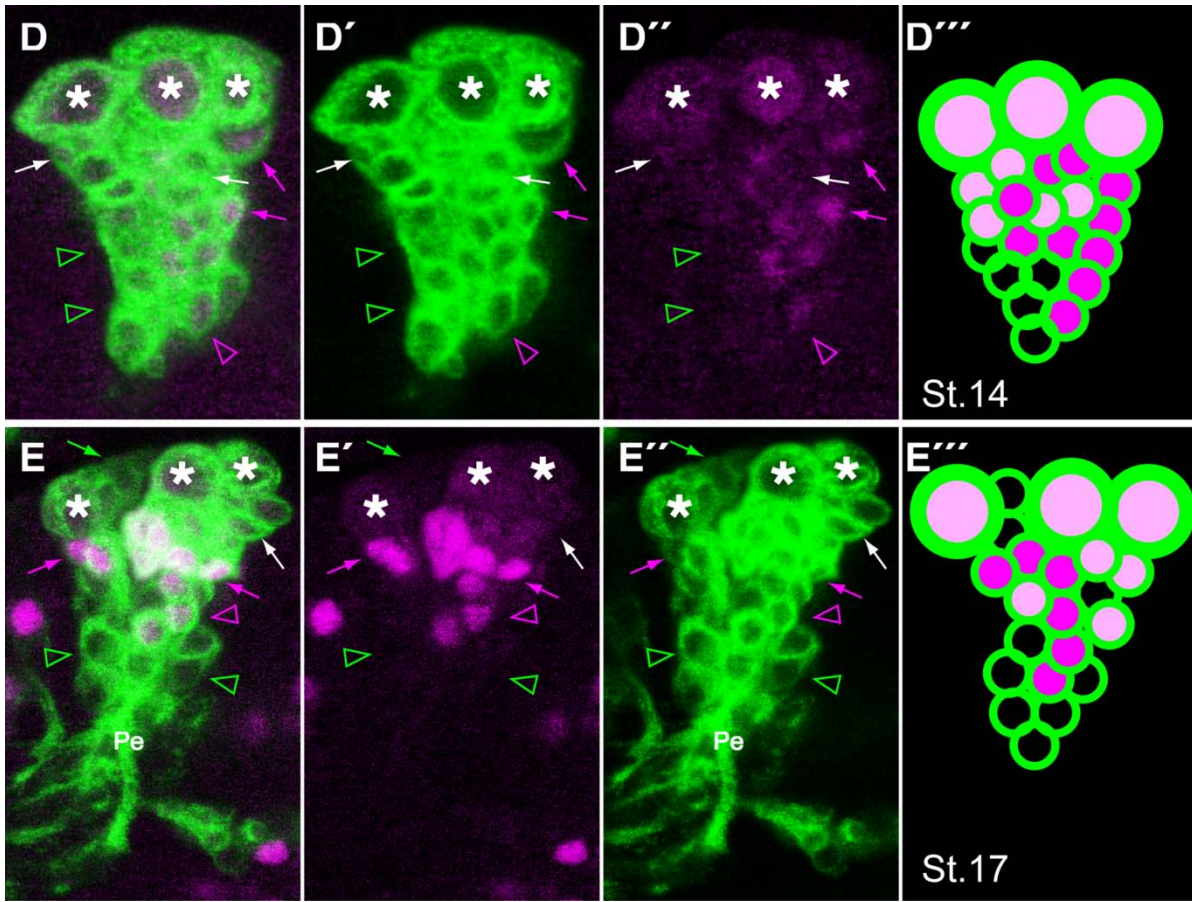


Abb. 41 *dacGal4>CD8::GFP* und Dac Expression der PKZSBe1-3 im Verlauf der Embryonalentwicklung

A Gezeigt sind die PKZSBe1-3 einer Hemisphäre im St.10. Man sieht die Dac-Proteinexpression (magenta) und die schwache GFP Expression (grün) in den PKNBen 1-3 (A1) und allen ihren Nachkommenzellen (A2). **A1' + A2'** GFP Expression der in A1 bzw. A2 gezeigten Abbildung. **A1'' + A2''** Dac-Proteinexpression der in (A1) bzw. (A2) gezeigten Abbildung. **A'''** Schematische Darstellung der GFP und Dac-Proteinexpression der PKZSBe 1-3 im St.10. **B** PKZSBe1-3 im St.11 Embryo. Dac-Protein (magenta) und GFP Expression (grün) findet sich in den PKNBen1-3 (B1) und allen ihren Nachkommenzellen (B2). **B1' + B2'** GFP Expression der in (B1) bzw. (B2) gezeigten Abbildung. **B1'' + B2''** Dac-Proteinexpression der in (B1) bzw. (B2) gezeigten Abbildung. **B'''** Schematische Darstellung der GFP und Dac-Proteinexpression der PKZSBe1-3 im St.11. **C** PKZSBe1-3 im St.12 Embryo. Man sieht, dass sowohl die PKNBen (☒) als auch alle ihre Nachkommenzellen GFP (grün) exprimieren. Dac Protein (magenta) wird in einigen weit distal der PKNBen gelegenen Zellen nicht mehr exprimiert (▶). **C'** GFP Expression der in (C) gezeigten Abbildung. **C''** Dac-Proteinexpression der in (C) gezeigten Abbildung. **C'''** Schematische Darstellung der GFP und Dac-Proteinexpression der PKZSBe1-3 im St.12. **D** PKZSBe1-3 im St.14 Embryo. Sowohl die PKNBen (☒) als auch alle ihre Nachkommenzellen exprimieren GFP (grün). Die PKNBen1-3 zeigen nur noch eine schwache Dac Expression (magenta). Im Bereich der ni-Neurone findet man vermehrt Zellen, die keine Dac Expression mehr zeigen (▶), aber auch Zellen mit starker Dac Expression (▶). Im Bereich der γ -Neurone ist die Dac Expression heterogen. Man findet sowohl stark (→) als auch schwach (⇒) exprimierende Zellen. **D'** GFP Expression der in (D) gezeigten Abbildung. **D''** Dac-Proteinexpression der in (D) gezeigten Abbildung. **D'''** Schematische Darstellung der GFP und Dac-Proteinexpression der PKZSBe1-3 im St.14. **E** PKZSBe1-3 im St.17. Sowohl die PKNBen1-3 (☒) als auch alle ihre Nachkommenzellen exprimieren GFP (grün). Die Dac Expression (magenta) in den PKNBen ist schwach. Im Bereich der γ -Neurone findet man Zellen, die kein (→), schwach (⇒) oder stark (→) Dac exprimieren. In der Position der ni-Neurone liegen Dac negative (▶) und Dac positive (▶) Zellen. **E'** GFP Expression der in (E) gezeigten Abbildung. **E''** Dac-Proteinexpression der in (E) gezeigten Abbildung. **E'''** Schematische Darstellung der GFP und Dac-Proteinexpression der PKZSBe1-3 im St.17 Embryo. **Abkürzungen** Pe: Pedunkel

3.5 Molekulare Marker für Nachkommenzellen der PKZSBen1-3

Zellen unterscheiden sich voneinander durch ihre distinkte Genexpression. Mit Hilfe von molekularen Markern (hier: Antikörper) können Zellen somit identifiziert, charakterisiert und reproduzierbar angesprochen werden. Die Identifikation eines molekularen Markers in einer Zelle (oder einer Population von Zellen) deutet einerseits auf eine Funktion des entsprechenden Proteins in der Zelle/den Zellen hin, andererseits kann die Auswirkung einer Überexpression bzw. Mutation eines Gens auf die durch Marker ansprechbare(n) Zelle(n) untersucht werden. Solche Untersuchungen ermöglichen Rückschlüsse auf die Funktion des betreffenden Gens.

3.5.1 Charakterisierung der Ey- und Dac-Expression in γ - und ni-Neuronen im späten Embryo

Betrachtet man die Ey- und Dac-Proteinexpression in St.17 WT Embryonen, so findet man im Bereich der Pilzkörperanlage prinzipiell drei verschiedene Kombinationen der Expression dieser beiden Proteine. Im Bereich direkt angrenzend an die vier PKNBen findet man durchschnittlich 65 γ -Neurone ($\bar{\varnothing}$ 65,5 \pm 8,1; n=11 Hemisphären), die nur Ey aber kein Dac exprimieren (Ey+/Dac-) (Abb. 42 A-A',E). Ihrer Position nach handelt es sich um spät geborene γ -Neurone. Angrenzend an diese Population von Zellen findet man ca. 28 γ -Neurone (27,8 \pm 4,8; n=11 Hemisphären), die sowohl Ey- als auch Dac-Expression aufweisen. Diese γ -Neurone liegen im Bereich der Nachkommenzellen der PKNBen1-3, nicht jedoch im Bereich der Nachkommenzellen des PKNB4 (Abb. 42 B-B',E). Ihre distale Lage, relativ zu den PKNBen1-3, deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Zellen um früh geborene γ -Neurone handelt, die weiter von den PKNBen entfernt liegen als die später geborenen Ey+/Dac- γ -Neurone. Weiter im Inneren des Kortex, angrenzend an die früh geborenen γ -Neurone (Ey+/Dac+), findet man ca. 18 ($\bar{\varnothing}$ 18,5 \pm 1,9; n=11 Hemisphären) nur Dac, aber kein Ey exprimierende Neurone (Dac+/Ey-), bei denen es sich, ansprechbar durch ihre Position, um ni-Neurone handelt (Abb. 42 C-C',E). In vergleichbarer Position findet man hingegen beim PKZSB4 keine Dac+ Zellen (Abb. 42 D). Dies deutet darauf hin, dass die ni-Neurone des PKZSB4 kein Dac-Protein exprimieren. Beim Vergleich der Anzahl der von den PKZSBen1-3 gebildeten ni-Neurone ($\bar{\varnothing}$ 32,8 \pm 3,7 errechnet aus Zellzahlen der Tabelle 1) und der in Antikörperfärbungen

Ergebnisse

durch Dac Protein markierten ni-Neurone ($\bar{\phi}$ 18,5 \pm 1,9; n=11 Hemisphären) wird deutlich, dass nur etwa die Hälfte der ni-Neurone der PKZSBe1-3 im St.17 Dac Protein exprimiert. Zusammengenommen kann man also mit Ey/Dac Doppelfärbungen drei unterschiedliche Populationen von Nachkommenzellen der PKNBen1-3 im Embryonalstadium 17 unterscheiden: 1. Eine Subpopulation der zuerst von PKNBen hervorgebrachten ni-Neurone, die im Inneren der Hemisphäre liegen und Dac aber kein Ey exprimieren. 2. früh geborene Dac und Ey exprimierende γ -Neurone, die direkt angrenzend an die ni-Neurone liegen und 3. die spät geborenen nur Ey exprimierenden γ -Neurone, die an der Oberfläche des Kortex nahe der PKNBen liegen (Abb. 42 E).

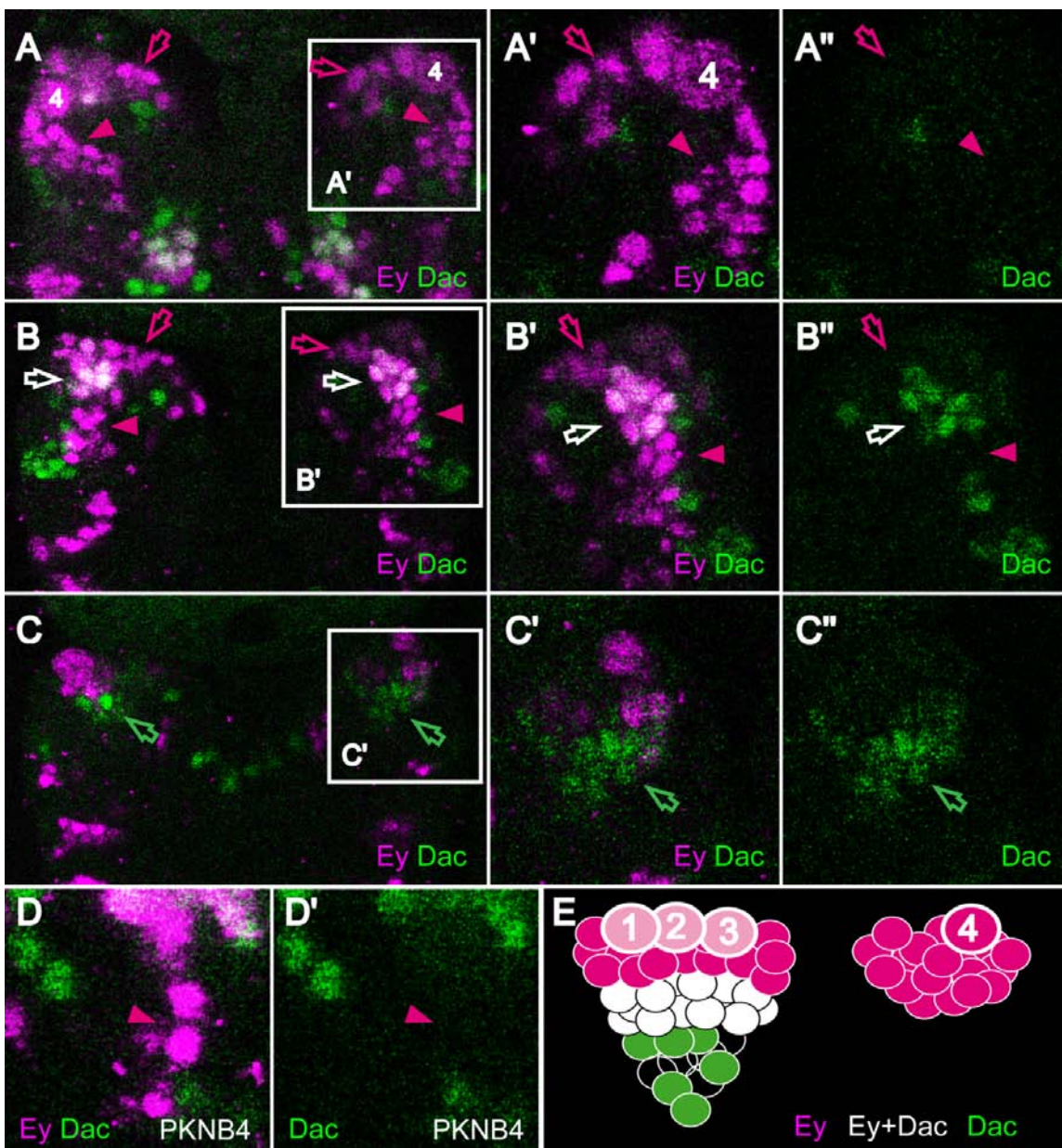


Abbildung 42

Abb. 42 Ey und Dac Expression in St.17 PKZSBen

A-F Ey (magenta) und Dac (grün) Antikörperfärbung in einem St.17 WT Gehirn. **A** Optischer Schnitt durch die Gehirnhemisphären auf Höhe des dorsalen Bereiches der Pilzkörperregion. Man sieht den PKNB4 und einige seiner Ey positiven und Dac negativen γ -Neuronen (▶). Daneben findet man auch Ey positive und Dac negative γ -Neurone der anderen PKNBen (◀). **A'+ A''** Vergrößerung der Pilzkörperregion der rechten Hemisphäre (in (A) durch weißes Quadrat angedeutet). **B** Optischer Schnitt durch die Gehirnhemisphären auf Höhe des intermediären Bereiches der Pilzkörperregion. Man sieht neben den superficial gelegenen nur Ey exprimierenden γ -Neuronen der PKNBen1-3 (◀) auch die darunter liegenden Ey und Dac coexprimierende γ -Neurone der PKNBen1-3 (◀). Die γ -Neurone des PKNB4 exprimieren kein Dac (▶). **B'+ B''** Vergrößerung der Pilzkörperregion der rechten Hemisphäre (in B durch weißes Quadrat angedeutet). **C** optischer Schnitt durch die Gehirnhemisphären auf Höhe des ventralen Bereiches der Pilzkörperregion. Man sieht die Ey negativen, Dac positiven ni-Neurone (▶) der PKZSB1-3. **C'+ C''** Vergrößerung der Pilzkörperregion der rechten Hemisphäre (in (C) durch weißes Quadrat angedeutet). **D+D'** optischer Schnitt durch den ventralen Bereich des PKNB4 Zellclusters. Man sieht die Ey positiven, Dac negativen γ -Neurone des PKNB4 (▶). Im Gegensatz zu den PKNBen1-3 (siehe C-C'') finden sich hier keine Dac+ ni-Neurone. **E** Schematische Darstellung der Lage der Nachkommenszellen der PKZSB1-3 (links) und des PKZSB4 (rechts) im St.17. Magenta: Ey+/Dac- γ -Neurone; weiß: Ey+/Dac+ γ -Neurone; grün: Ey-/Dac+ ni-Neurone; durchsichtig: ni-Neurone, die weder Ey noch Dac exprimieren. Die PKNBen1-3 exprimieren Dac nur noch schwach (rosa).

3.5.2 Twin-of-eyeless wird im St.17 in Subsets von γ - und ni-Neuronen exprimiert

Neben *ey* und *dac* ist *twin-of-eyeless* (*toy*) ein weiteres Gen, das in embryonalen Pilzkörpern exprimiert wird (Kurusu et al., 2000). Um die *toy* Expression näher zu charakterisieren, besonders im Hinblick auf eine mögliche Expression in den ni-Neuronen, wurden Antikörperfärbungen gegen Toy in *dacGal4>CD8::GFP* Embryonen durchgeführt und die Toy Expression im Bereich der PKZSB1-3 im St.17 untersucht (n= 6 Hemisphären) (Abb. 43 A-C). Toy wird im St.17 in vielen, jedoch nicht allen γ -Neuronen exprimiert (Abb. 43 A, B). Neben der Expression in γ -Neuronen findet man auch eine Toy Expression in Subsets von Ni-neuronen (Abb. 43 C).

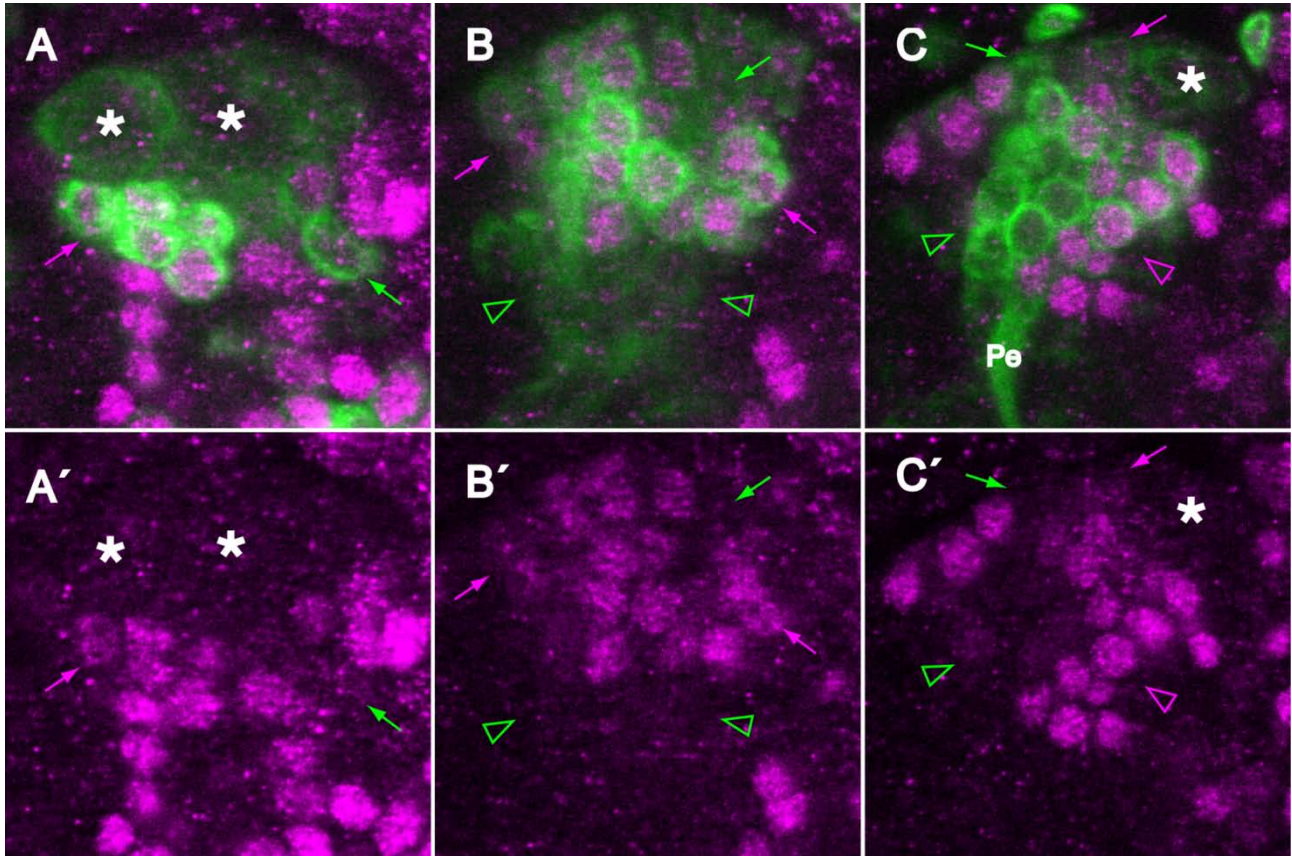


Abb. 43 Toy-Expression in den PKZSBen 1-3 im St.17

A-C Toy (magenta) Expression in den PKZSBen1-3 in *dacGal4>CD8::GFP* (grün) Embryonen des St.17. Dargestellt sind 3 verschiedene optische Foki der Pilzkörperregion der rechten Gehirnhemisphäre. Anterior (in Neuralachse) oben, medial links. **A** Dorsaler optischer Fokus. Man sieht 2 PKZSBen (✳) und einige direkt darunter liegende γ -Neurone. Man findet sowohl Toy exprimierende γ -Neurone (\rightarrow) als auch γ -Neurone, die kein Toy exprimieren (\rightarrow). **A'** Toy Expression der in (A) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B** Intermediärer optischer Fokus. Man sieht wiederum Toy exprimierende γ -Neurone (\rightarrow) und γ -Neurone, die keine Toy Expression aufweisen (\rightarrow). Darüber hinaus sieht man ni-Neurone, die keine Toy Expression aufweisen (\triangleright). **B'** Toy Expression der in (B) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (B). **C** Ventraler optischer Fokus. Gezeigt ist ein PKZSBen (✳), sowie Toy positive (\rightarrow) und Toy negative (\rightarrow) γ -Neurone. Im unteren Bereich der Abbildung sieht man sowohl Toy exprimierende (\triangleright) als auch Toy negative (\triangleright) ni-Neurone. **C'** Toy Expression der in (C) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (C). **Abkürzungen** Pe: Pedunkel

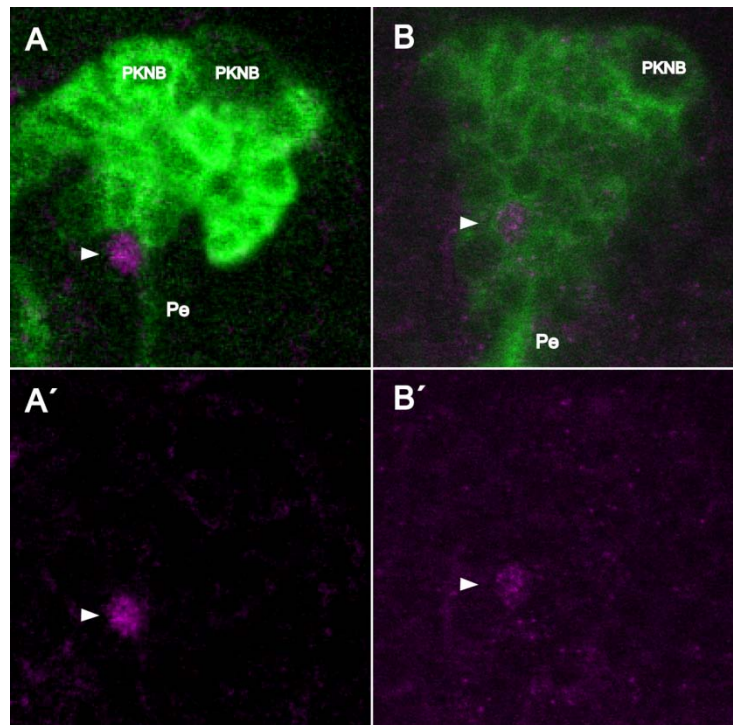
3.5.3 Extradenticle wird im St.17 in einem einzigen ni-Neuron exprimiert.

Das Proteinexpressionsmuster von Extradenticle (Exd) im St.17 Gehirn ist sehr übersichtlich. Exd wird generell nur in wenigen Zellen im Bereich des Protocerebrums exprimiert. Antikörperfärbungen gegen Exd in St.17 Embryonen des Stammes *OK107>CD8::GFP* zeigen direkt angrenzend an die γ -Neurone eine einzelne Exd-positive Zelle (\emptyset $0,9 \pm 0,3$; $n = 10$ Hemisphären) medial des Pedunkels (Abb. 44 A, A'). Um die Vermutung, dass es sich bei dieser Zelle um ein ni-Neuron handelt, zu bestätigen, wurde

eine Exd Färbung in *dacGal4>CD8::GFP* Embryonen durchgeführt (Abb. 44 B, B') (n= 4 Hemisphären). Diese Färbung zeigt, dass die Exd positive Zelle Teil des PKZB1-3-spezifischen *dacGal* Expressionsmusters ist und es sich somit um ein ni-Neuron handelt. Aufgrund der Lage medial des Pedunkels (Abb. 44 A, B) und der fehlenden OK107-Expression handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein ni-Neuron, das vom PKNB1 oder PKNB2 hervorgebracht wird.

Abb. 44 Extradenticle wird im St.17 in einem einzigen ni-Neuron exprimiert

A Exd Expression (magenta) im Bereich des Pilzkörpers der rechten Gehirnhemisphäre in einem St.17 *OK107>CD8::GFP* Embryo. Anterior oben (in Neuralachse), medial links. Man sieht eine einzelne Exd positive Zelle (▣) medial des Pedunkels (Pe) und direkt angrenzend an die GFP positiven (grün) γ -Neurone. **A'** Exd Expression der in (A) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B** Exd Expression (magenta) im Bereich des Pilzkörpers einer rechten Gehirnhemisphäre, in einem St.17 *dacGal4>CD8::GFP* Embryo. Anterior oben (in Neuralachse), medial links. Man sieht eine einzelne Exd und GFP (grün) positive Zelle (▣) medial des Pedunkels (Pe). **B'** Exd Expression der in (B) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (B). **Abkürzungen** Pe: Pedunkel



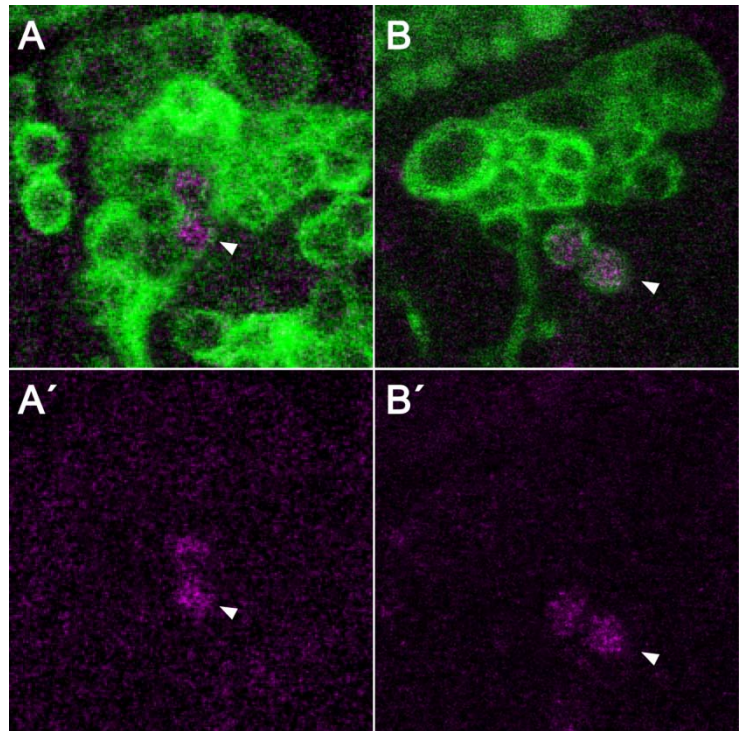
3.5.4 Sloppy-paired1 wird im St.17 in zwei γ - oder ni-Typ2-Neuronen exprimiert

Antikörperfärbungen gegen Sloppy-paired1 (Slp1) in St.17 *dacGal4>CD::GFP* Embryonen zeigen eine Slp1 Expression in 2-3 Nachkommenzellen der PKZSB1-3 ($\bar{\varnothing}$ 2,3 \pm 0,5; n= 6 Hemisphären) (Abb. 45 A, A'). Die Position dieser Zellen ließ keinen eindeutigen Rückschluss darüber zu, ob es sich bei diesen Zellen um ni-Neurone oder γ -Neurone handelt. Deshalb wurde das Slp1 Expressionsmuster auch in *OK107>CD8::GFP* überprüft (n= 6 Hemisphären). Die Neurone zeigten im OK107 Hintergrund eine Kolo-kalisation von Slp1 und GFP und sie liegen weit distal der PKNBen im medialen/intermediären Bereich des Pilzkörperkortex. Dies deutet darauf hin, dass es sich um Tochterzellen des PKNB1 oder PKNB2 handelt (Abb. 45 B, B'). Aufgrund der GFP Expression dieser Neurone im

OK107 Hintergrund handelt es sich sehr wahrscheinlich um γ -Neurone. Im Falle einer Abstammung vom PKNB1 könnte es sich bei diesen Slp1-positiven Zellen jedoch auch um zwei oder drei der von diesem PKNB hervorgebrachten ni-Typ2-Neurone handeln, die OK107 positiv sind und die direkt angrenzend an die γ -Neurone liegen (siehe 3.2.6.).

Abb. 45 Slp1 Expression in St.17 PKZSBen

A Slp1 Expression (magenta) im Bereich des Pilzkörpers der rechten Gehirnhemisphäre in einem St.17 $dacGal4>CD8::GFP$ Embryo. Anterior oben (in Neuralachse), medial links. Man sieht zwei Slp1 positive Zellen (▣), die eine Kolokalisation mit GFP (grün) aufweisen. **A'** Slp1 Expression der in (A) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B** Slp1 Färbung (magenta) im Bereich des Pilzkörpers der rechten Gehirnhemisphäre in einem St.17 $OK107>CD8::GFP$ Embryo. Anterior oben (in Neuralachse), medial links. Man sieht die GFP (grün) und Slp1 (magenta) Expression in den am weitesten distal der PKNBen gelegenen Zellen (▣). **B'** Slp1 Expression der in (B) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (B).



3.5.5 Expression der temporären Spezifizierungsgene *hunchback*, *Krüppel* und *pdm1* in St.17 PKZSBen

Von NBen des VNS ist bekannt, dass sie die temporären Spezifizierungsgene *hb*, *Kr* und *pdm1* zeitlich aufeinanderfolgend exprimieren und die jeweilige Genexpression auch an ihre Nachkommenzellen weitergeben (Isshiki et al., 2001; Pearson and Doe, 2003). Die sequentielle Expression dieser Gene und ihre Vererbung an die Nachkommenzellen führt zu einer geschichteten Anordnung von Hb, Kr und Pdm1 exprimierenden Zellen im VNS (Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998). Die Hb-, Kr-, Pdm1 Expression in den PKZSBen1-3, zeigt eine Anordnung von Zellen, die an die von Kambadur et al. (1998) beschriebenen Schichtungen erinnert. Hb Expression findet sich im St.17 in einer einzigen Nachkommenzelle der PKZSBe1-3 ($\emptyset 1,0 \pm 0$; $n= 16$ Hemisphären) (Abb. 46 A, A' + B, B'), die sehr weit distal von den PKNBen an der Neuropil-Kortex Grenze liegt. Gemäß dieser Position handelt es sich um eines der am frühesten geborenen ni-Neurone. Kr Expression findet sich in mehreren Zellen der PKZSBe. Im St.17 findet man ca. 8 Kr

exprimierende Zellen ($\bar{\varnothing}$ $8,4 \pm 1,0$;n= 12 Hemisphären), die weit distal der PKNBen in Position der ni-Neurone liegen (Abb. 46 A, A''). Bei einer dieser Kr positiven Zellen handelt es sich um die Zelle, die auch Hb exprimiert (Abb. 46 A, A', A''). Pdm1 Expression findet sich in ca. 11 Zellen in Position der ni-Neurone ($\bar{\varnothing}$ $10,7 \pm 1,3$;n= 10 Hemisphären) (Abb. 46 B, B''). Bei einer dieser Zellen handelt es sich um die Hb exprimierende Zelle, die jedoch nur schwach Pdm1 exprimiert (Abb. 46 B, B', B'').

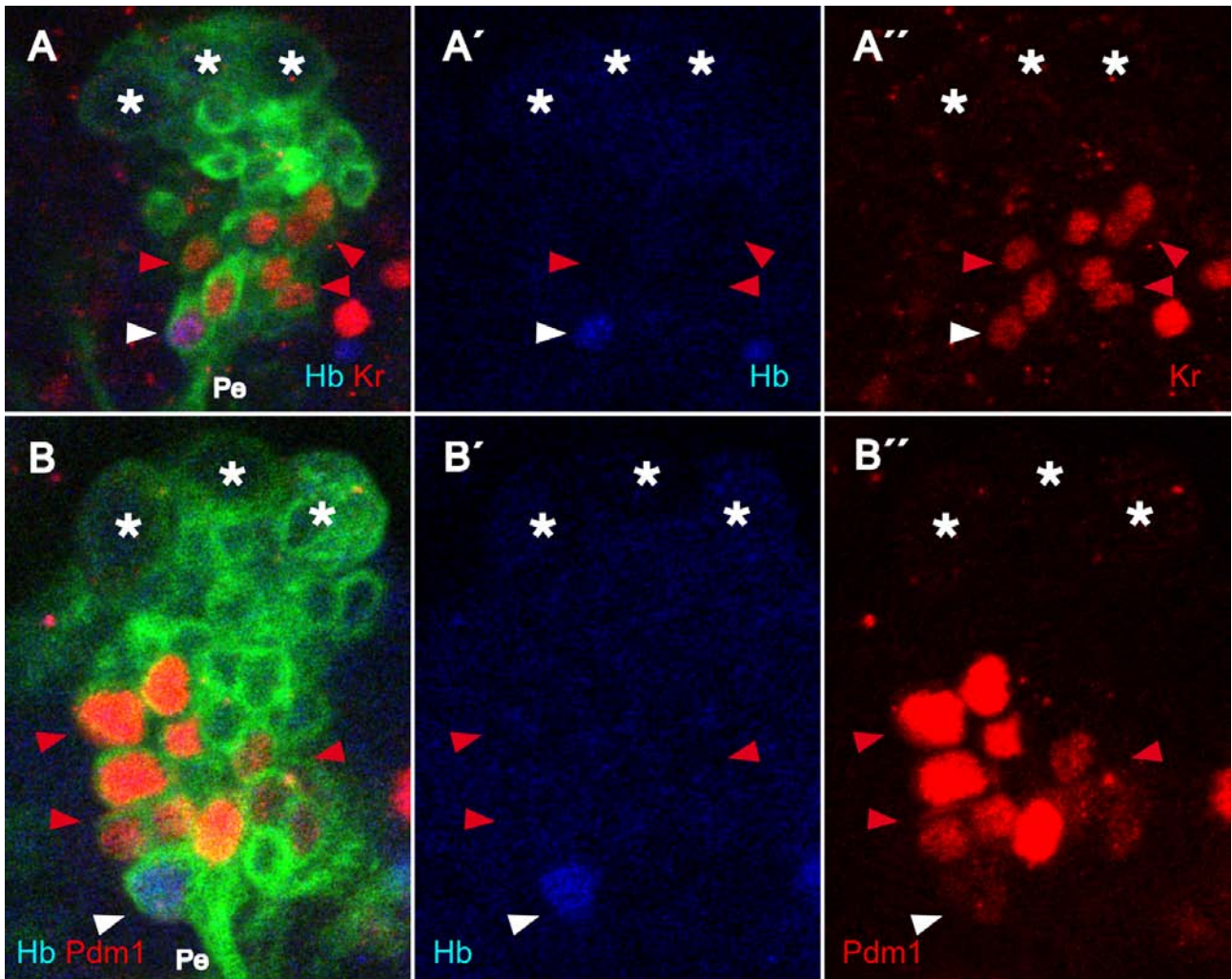


Abb. 46 Hb, Kr Pdm1 Expression in den PKZSBen 1-3 im St.17

A Hb (blau) und Kr (rot) Expression eines St.17 *dacGal4>CD8::GFP* (grün) Embryos im Bereich der Pilzkörper der rechten Gehirnhemisphäre. Anterior oben (in Neuralachse), medial links. Man sieht die Hb und Kr positive (▶) Zelle, die weit distal der NBen (☒) an der Neuropil Kortex Grenze liegt. Des Weiteren sieht man die Kr exprimierenden Zellen, die sich ebenfalls weit distal der NBen in Position der ni-Neurone befinden (▶). **A'** Hb Expression der in (A) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in A. **A''** Kr Expression der in (A) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (A). **B** Hb (blau) und Pdm1 (rot) Expression im Bereich des Pilzkörpers der rechten Gehirnhemisphäre in einem St.17 *dacGal4>CD8::GFP* (grün) Embryo. Anterior oben (in Neuralachse), medial links. Die Hb und schwach Pdm1 positive Zelle (▶) liegt weit distal der NBen (☒) an der Neuropil Kortex Grenze. Die Pdm1 exprimierenden Zellen liegen ebenfalls weit distal der NBen in Position der ni-Neurone (▶). **B'** Hb Expression der in (B) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (B). **B''** Pdm1 Expression der

Ergebnisse

in (B) gezeigten Abbildung. Symbole verweisen auf die gleichen Strukturen wie in (B).
Abkürzungen Pe: Pedunkel

4 Diskussion

Die Embryonalentwicklung des VNS des Modellorganismus *Drosophila* wird aufgrund seiner vergleichsweise einfachen Organisation und der guten experimentellen Zugänglichkeit bereits seit Jahrzehnten erforscht. Aufgrund dessen wurden bereits viele Erkenntnisse bezüglich der Mechanismen gewonnen, die der Entstehung des VNS und seiner zellulären Diversität zu Grunde liegen. Verglichen mit der Erforschung des embryonalen VNS steckt die Erforschung der embryonalen Gehirnentwicklung noch in den Kinderschuhen. Die hier vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zu Erforschung der embryonalen Gehirnentwicklung dar, indem sie erstmalig den genauen neuroektodermalen Ursprung, die zelluläre Komposition, die Topologie und vollständige Morphologie von 21 protocerebralen Gehirnzellstammbäumen beschreibt. Der Fokus dieser Arbeit lag insbesondere auf der detaillierten Untersuchung der Embryonalentwicklung der vier Neuroblasten-ZSBe, die den Pilzkörper konstituieren. Ein Neuropilzentrum, das in die Verarbeitung von olfaktorischen Informationen sowie in die Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung involviert ist (Connolly et al., 1996; de Belle and Heisenberg, 1994; Heisenberg, 1998; Heisenberg et al., 1985; Pauls et al., 2010).

4.1 Dil-Markierungen ermöglichen die Charakterisierung vollständiger, embryonaler Gehirnzellstammbäume

Die Analyse von embryonalen Zellstammbäumen mittels der Dil-Technik (Bossing and Technau, 1994) scheint momentan die einzig zuverlässige Methode, um vollständige embryonale Zellstammbäume zu erhalten, da durch die Markierung einer Zelle im Neuroektoderm (also noch vor der Formation des Neuroblasten) eine lückenlose Markierung aller Neuroblastennachkommenzellen garantiert ist. Andere Methoden, die Zellklone mittels genetischer Rekombination visualisieren, wie z.B die Flip-out Technik, können nicht die vollständige Erfassung aller embryonaler Neuroblastennachkommenzellen gewährleisten, da sich die für die Rekombination erforderliche Flipase-Konzentration erst nach der Generierung der frühen Nachkommenzellen aufbaut (Larsen et al., 2009). Durch dieses methodenbedingte Nicht-

Erfassen der frühen Neuroblastennachkommenzellen lassen sich wahrscheinlich auch die drastischen Unterschiede in der Anzahl der Nachkommenzellen der PKNBen erklären, die in dieser Arbeit gefunden wurden (durchschnittlich 29-45 Zellen im St.17 und 36-48 in L1; siehe Tabelle 1) und den von Larsen et al. (2009) gefunden Zellzahlen (ca. 14 Zellen im späten St.16 und ca. 8 Zellen in L1). Auch die postembryonal erfolgreich angewendete MARCM-Technik kann embryonal keine vollständigen Zellstammbäume markieren, da bei dieser Methode die genetische Rekombination neben einer ausreichenden Flipasekonzentration noch zusätzlich von dem Gal80-Repressor abhängt, der über die gesamte Embryonalentwicklung zu persistieren scheint (Luo, 2005). Neben der Möglichkeit, vollständige Zellstammbäume zu markieren, bietet die Dil-Technik weitere Vorteile. So kann, nachdem die Position einer NE-Zelle, die einen Neuroblasten von Interesse hervorbringt, einmal bestimmt wurde, diese NE-Zelle reproduzierbar markiert werden, so dass der aus ihr resultierende Zellstammbaum in verschiedenen Stadien seiner Entwicklung untersucht werden kann. Dieses gezielte Markieren ist darüber hinaus für Ablationsexperimente, wie die hier durchgeführten, unerlässlich (siehe 3.2.6.)

4.2 4D-Mikroskopie in Kombination mit Dil-Markierungen ermöglicht die Erstellung von hochauflösenden fate maps

Die 4D-mikroskopische Analyse des cephalen Neuroektoderms und die Etablierung reproduzierbarer morphologischer Landmarken (z.B. cephale Furche, dorsale Mittellinie und mitotische Domänen) hat sich als eine hervorragende Möglichkeit herausgestellt, um gezielte Zellstammbaumanalysen mittels der Dil-Technik durchzuführen. Das Dil-Markieren in Verbindung mit morphologischen Landmarken und der Möglichkeit, das Verhalten (Mitose, Delamination) der markierten Zelle mikroskopisch verfolgen zu können, ermöglichte die Zuordnung der markierten NE-Zelle zu distinkten Positionen innerhalb der mitotischen Domänen δ (B bzw. δ 1) und damit in manchen Fällen auch Aussagen bezüglich der möglichen Identität des aus der NE-Zelle entstehenden Neuroblasten. Durch die hohe Auflösung dieser Herangehensweise war es möglich, ein aus 10-12 Zellen bestehendes Zellcluster im ventralen Bereich der δ B zu identifizieren, dessen Mitglieder das Potential haben, sich zu Pilzkörperneuroblasten zu entwickeln. Die Kenntnis der genauen Position einer markierten Zelle innerhalb der δ B ermöglichte also das Erstellen

einer hochauflösenden "fate map" des betreffenden neuroektodermalen Bereichs. Dies erbrachte neue Erkenntnisse bezüglich des Zellschicksals der δB Zellen: 1. Es konnte gezeigt werden, dass die PKNBen aus dieser Domäne hervorgehen, was im Widerspruch zu vorhergehenden Aussagen steht, nach denen die Pilzkörper aus Neuroblasten der posterodorsalen Region der $\delta 1$ hervorgehen (Robertson et al., 2003). 2. Die Aussage von Robertson et al. (2003), dass aus δB keine neuronalen Zellstambäume hervorgehen, sondern dass sie die Ursprungsdomäne der Subperineurialglia im Gehirn ist, konnte teilweise widerlegt werden. Die klonalen Dil-Markierungsexperimente zeigten deutlich, dass es sich bei einem Großteil der aus δB hervorgehenden neuronalen Stammzellen um NBen handelt, die rein neuronale Zellstambäume bilden. Bisher gibt es lediglich Hinweise für die Existenz eines Neuroglioblasten, der nur eine sehr geringe Anzahl an Gliazellen beinhaltet. Da die Dil-Markierungen sich jedoch hauptsächlich auf die ventrale Hälfte der δB beschränkten, könnte es sein, dass aus ihrem dorsalen Anteil Glioblasten oder Neuroglioblasten hervorgehen, welche die Subperineurialglia des Gehirns bilden.

Mit der 4D-mikroskopischen Analyse der $\delta 24$ und der Etablierung von morphologischen Landmarken (ventrale Furche, cephalische Furche) wurden die Voraussetzungen geschaffen, um diese mitotische Domäne, analog zur δB , mit Hilfe der Dil-Markierungstechnik zu untersuchen. Bereits in den 4D-mikroskopischen Analysen wurde eine delaminierende Zelle beobachtet, bei der es sich wahrscheinlich um einen Neuroblasten handelt (siehe 3.1.2). Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei $\delta 24$ um eine weitere, bisher nicht als solche identifizierte, mitotische Domäne handelt, aus der Anteile des Gehirns hervorgehen.

4.3 Entstehung von unterschiedlichen Stammzellen in δB und $\delta 1$

Im Rahmen dieser Arbeit gelang u.a. der experimentelle Beweis, dass in δB unmittelbar benachbarte NE-Zellen gleichermaßen ein neurales Schicksal haben (3.2.3). Dies deutet darauf hin, dass der Mechanismus der lateralen Inhibition, wie er im VNS vorliegt, bei der Neurogenese in diesen Zellen keine Rolle spielt. Dieser Befund wird unterstützt durch Untersuchungen in temperatursensitiven Notch^{ts} mutanten Embryonen, bei denen sich ein Block des Notch-Signalweges während des Zeitraums der Gehirnneuroblastenentstehung (St.8-11) nicht auf die Zahl, die Größe und die Position der Ey positiven PKNBen

auswirkte. Die Anzahl anderer Gehirnneuroblasten war hingegen erhöht, wie die Untersuchung des Expressionsmusters des neuroblastenspezifischen Markers Deadpan zeigte (Kunz et al., 2012). Die Aufklärung der ZSBe aus dem *ac/sc/’sc*-coexprimierenden proneuralen Feld innerhalb der δB zeigte, dass aus diesem Feld ausschließlich Stammzellen mit neuralem Schicksal hervorgehen. In keinem Fall wurde ein epidermaler Klon erhalten (n=155). Außerdem zeigten die Delaminationszeitpunkte der neuronalen Stammzellen, dass sich unter ihnen viele der früh-entstehenden Gehirnneuroblasten befinden (Urbach et al., 2003). Betrachtet man die zelluläre Komposition der ZSBe aus dem proneuralen Feld, so findet man am häufigsten ZSBe, die ausschließlich Interneurone hervorbringen. Bei einem dieser rein neuronalen ZSBe konnten auch neurosekretorische Neurone identifiziert werden, die die Ringdrüse innervieren. Neben diesen rein neuronalen Zellstammbäumen entsteht aber auch ein ZSB, der sowohl Neurone als auch Gliazellen hervorbringt. Diese Befunde zeigen, dass in diesem proneuralen Feld der δB ausschließlich neurale Stammzellen spezifiziert werden, die jedoch unterschiedliche neurale Zelltypen (Interneurone, neurosekretorische Neurone, Gliazellen) hervorbringen können.

Im Gegensatz zu δB , teilen sich NE-Zellen in $\delta 1$ parallel zur ektodermalen Oberfläche, wonach in der Regel eine der beiden Zellen als Neuroblast delaminiert. Die andere Zelle, so wird vermutet, wird zum Epidermoblasten (Urbach et al., 2003), analog zur Situation der spät entstehenden Neuroblasten/Epidermoblasten im rNE (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Im Falle der hier beschriebenen vier $\delta 1$ ZSBe konnte, neben dem neuronalen Zellklon, kein epidermaler Klon gefunden werden. Das Zellschicksal, der nach der Teilung im Neuroektoderm verbleibenden Zelle, konnte nicht geklärt werden. Das Fehlen eines zweiten Zellklons könnte auf Apoptose der Zelle hindeuten. Unterstützt wird diese Vermutung des apoptotischen Schicksals durch frühere Arbeiten, die aufzeigten, dass während der morphogenetischen Bewegungen der embryonalen Kopfentwicklung viele Zellen durch Apoptose entfernt werden (Nassif et al., 1998). In wenigen Fällen wurden bei Markierungen von $\delta 1$ Zellen auch epidermale Klone erhalten. In diesen Fällen konnte jedoch kein neuraler Schwesterklon beobachtet werden.

4.4 Embryonale PKNBen generieren individuelle ZSBe bestehend aus unterschiedlichen Neuronentypen, die in einer festgelegten Reihenfolge entstehen

Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass sich die PKNBen sowohl in ihrer Genexpression, als auch in den ZSBen, die sie hervorbringen, voneinander unterscheiden. Jeder der vier PKNBen bringt ein individuelles Set an ni-Neuronen hervor. Diese Sets unterscheiden sich deutlich durch ihre Zellzahlen, durch die Anzahl ihrer Faszikel und durch die Neuropilregionen die sie innervieren. Einige der ni-Neuronen-Faszikel der PKZSBe2-4 bilden z.B. boutonartige Kontakte mit dem Neuropil des Pilzkörpers der contralateralen Hemisphäre aus, und eines der ni-Neuronen-Faszikel des PKZSB2 innerviert das VNS. Neben den ni-Neuronen findet sich, allerdings nur unter den Nachkommenzellen des PKNB1, ein weiterer Neuronentyp: die ni-Typ2-Neurone. Deren Axone verlaufen durch den Pedunkel, verlassen diesen im Bereich des Spur und innervieren somit nicht die Loben. Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen den PKZSBen findet sich in der Anzahl der von ihnen hervorgebrachten γ -Neurone. PKZSB4 bringt mit durchschnittlich 36 γ -Neuronen im späten St.17 ungefähr doppelt so viele γ -Neurone hervor wie die PKZSBe1-3 (siehe Tabelle 1). Die Untersuchungen zur Pilzkörperneuropilentwicklung auf Ebene einzelner PKZSBe zeigte darüber hinaus, dass auch das zeitlich-räumliche Auswachsen der γ -Neurone zellstammbaumspezifisch erfolgt. Unterschiedliche Genexpression innerhalb der γ -Neuronen-Population (3.5.1, 3.5.2) suggeriert außerdem die Existenz unterschiedlicher embryonaler γ -Neuronen Subtypen. Zusammengenommen zeigen die hier aufgezeigten Unterschiede, dass jeder der vier PKNBen eine eigene Identität besitzt und einen individuellen ZSB hervorbringt. Untersuchungen zur postembryonalen Pilzkörperentwicklung haben aufgedeckt, dass während dieser Entwicklungsphase jeder PKNB ein morphologisch identisches Set von im wesentlichen drei unterschiedlichen Kenyonzelltypen (γ -, α'/β' - und α/β -Neurone) hervorbringt, welche in aufeinanderfolgenden Zeitfenstern generiert werden (Armstrong et al., 1998; Crittenden et al., 1998; Lee et al., 1999; Yu and Lee, 2007). Somit unterscheiden sich die embryonalen PKZSBe von den Postembryonalen, indem sie neben intrinsischen (γ -Neurone) auch nicht-intrinsische Neurone (ni- und ni-Typ2) hervorbringen. Darüber hinaus zeigte Frau K. Kraft, durch klonale Dil-Markierungen in Embryonen, die GFP unter der

Kontrolle des gliaspezifischen *repo*-Enhancers exprimieren, dass während der Embryonalentwicklung keine Gliazellen von den PKNBen gebildet werden, was möglicherweise einen weiteren Unterschied zu den postembryonalen PKNBen darstellt (Ito et al., 1997; Kunz et al., 2012; Lai and Lee, 2006; Lee et al., 1999). Wie ich durch Ablationsexperimente zeigen konnte, werden die drei oben genannten embryonalen Pilzkörper-Neuronentypen in aufeinander folgenden Zeitfenstern generiert. Durch diese aufgezeigte zeitliche Abfolge der Entstehung der embryonalen PKNBen Nachkommenzellen liegt nun ein vollständiges Bild der sequentiellen Entstehung von unterschiedlichen PKNBen Neuronentypen über die gesamte Entwicklung hinweg vor (Abb. 47).

Die Individualität der embryonalen PKNBen und die unterschiedlichen Zelltypen, die in einer festgelegten Reihenfolge von ihnen hervorgebracht werden, implizieren genetische Regulation des temporären Zellschicksals in einer Zellstammbaum autonomen Weise. Bei der Suche nach molekularen Markern für PKNBen Nachkommenzellen wurde eine Expression von *hb*, *Kr* und *pdm1* in den frühen Nachkommenzellen der PKNBen1-3 gefunden (siehe 3.5.5). Von diesen genetischen Faktoren wurde gezeigt, dass sie im embryonalen VNS eine entscheidende Rolle bei der temporären Spezifizierung spielen (Isshiki et al., 2001; Jacob et al., 2008) und dass sich durch ihre zeitlich aufeinanderfolgende Expression eine geschichtete Anordnung von *hb*, *Kr* und *pdm1* exprimierenden Zellen im VNS ergibt (Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998; Pearson and Doe, 2003). Interessanterweise findet man diese Schichtung auch ansatzweise in einem Subset der frühen Nachkommenzellen der PKNBen1-3 (gemäß ihrer Lage im Gehirnkortex handelt es sich um ni-Neurone). Diese Befunde lassen vermuten, dass die bei der temporären Spezifizierung im VNS stattfindende, zeitlich aufeinanderfolgende Expression von *hb*, *Kr* und *pdm1* auch bei der temporären Spezifizierung einiger ni-Neurone eine Rolle spielen könnte. *hb*, *Kr* und *pdm1* Expression wurde jedoch nicht in allen ni-Neuronen und nicht im Bereich der γ -Neurone detektiert. So könnten weitere Gene, die in die temporäre Spezifizierung im VNS involviert sind, für die Spezifizierung der PKNBen Nachkommenzellen eine Rolle spielen. So wurde gezeigt, dass neben *hb*, *Kr* und *pdm1* auch die Transkriptionsfaktoren *Castor*, *Grainyhead* und andere Faktoren in die temporäre Spezifizierung im VNS involviert sind (Baumgardt et al., 2009; Isshiki et al., 2001; Pearson and Doe, 2003; Tsuji et al., 2008). Ein aus der postembryonalen

Pilzkörperentwicklung bekannter temporärer Spezifizierungsfaktor ist Chinmo, der in Abhängigkeit von seiner Konzentration, die temporäre Identität postembryonal geborener Kenyonzellen spezifiziert (Zhu et al., 2006). Ob Chinmo bereits embryonal in die temporäre Spezifizierung von PKNBen Nachkommenzellen involviert ist, bleibt abzuwarten. Da, wie hier gezeigt, die PKNBen embryonal eine größere Zahl unterschiedlicher Zelltypen hervorbringen als die drei während der Postembryonalentwicklung hervorgebrachten Kenyonzelltypen (γ -, α'/β' - und α/β - Neurone), könnte der zugrundeliegende temporäre Spezifizierungsmechanismus embryonal komplexer sein als postembryonal. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass im AD-PN-Zellstammbaum der Antennalloben der embryonale Neuroblast, im Gegensatz zum larvalen, seine temporäre Identität nach jeder Teilung ändert (Yu et al., 2010).

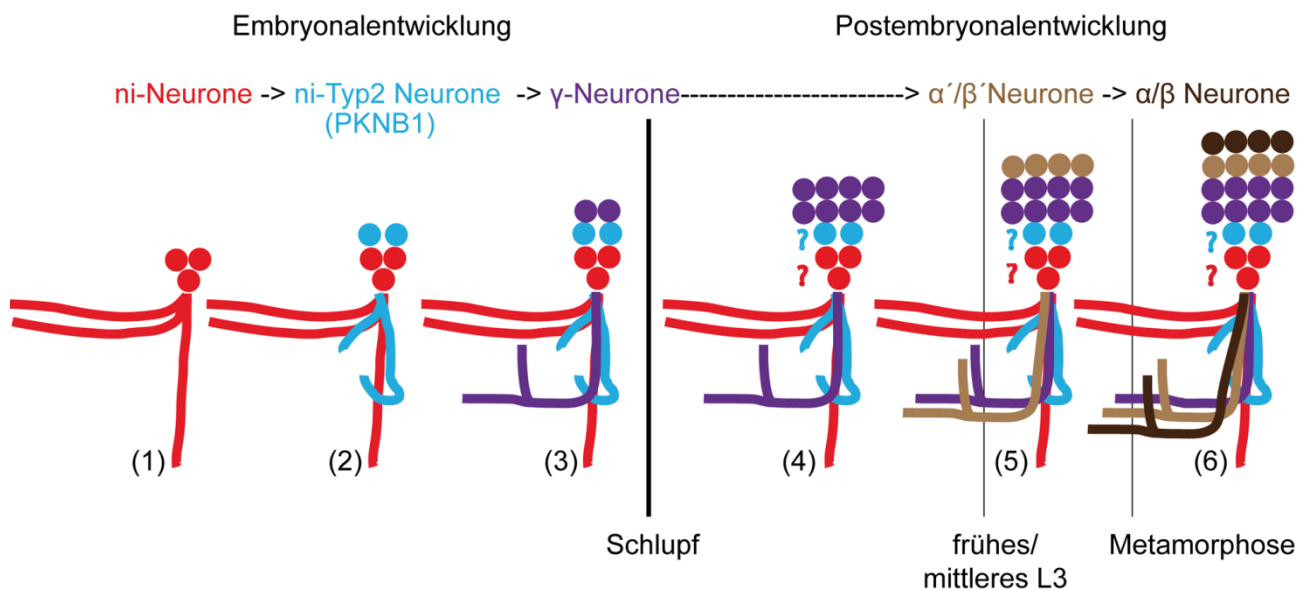


Abb. 47 Die sequentiell generierten Neuronentypen der PKNBen

Während der Embryonalphase (1-3) werden aufeinanderfolgend drei unterschiedliche Neuronentypen gebildet: (1) ni-neurone; (2) ni-Typ2-Neurone (beim PKNB1) und (3) die embryonal geborenen γ -Neurone. In der Postembryonalentwicklung (4-6) werden während der Larvalstadien L1, L2 und frühes/mittleres L3 die postembryonalen γ -Neurone (4) generiert. Im frühen/mittleren L3 Stadium (5) schalten die PKNBen auf die Produktion von α'/β' Neuronen um und beginnen während der Metamorphose (6) mit der Generierung von α/β Neuronen. Das postembryonale Schicksal der ni- und ni-Typ2-Neurone wurde noch nicht aufgeklärt (?).

4.5 Die Embryonalentwicklung der Neuropilstrukturen des Pilzkörpers

Die γ -Neurone der PKNBen zeigen ein zellstammbaumspezifisches Auswachsen ihrer Axone. Zuerst wachsen die Axone der γ -Neurone des PKNB1 aus, danach folgen die der PKNBen2 und 3 und zuletzt differenzieren die des PKNB4 (3.2.7.1). Die durchgeführten Ablationsexperimente deuten jedoch darauf hin, dass die γ -Neurone des PKNB1 (oder der anderen PKNBen) keine Pionierfunktion bei der Entwicklung des Pilzkörperneuopils innehaben (siehe 3.2.8). Interessanterweise zeigten Grillenzoni et al. (2007), dass bisher nicht identifizierte, den Derailed-Rezeptor exprimierende contralaterale Neurone, die in engem Kontakt zu γ -Neuronen stehen (welche den Derailed Liganden Wnt5 exprimieren), eine Rolle bei der korrekten Wegfindung der γ -Neuronenaxone spielen. Da ni-Neurone bereits vor den γ -Neuronen ausdifferenzieren und diese bei ihrer Differenzierung in engem Kontakt zu den ni-Neuronen stehen, könnten ni-Neurone zu dieser Population von Derailed-Rezeptor exprimierenden Zellen gehören, die notwendig für ein korrektes Auswachsen der γ -Neurone in Richtung der Mittellinie sind (Grillenzoni et al., 2007). Ni-Neuronen könnte also eine doppelte Funktion zukommen: 1. eine entwicklungsbiologische Funktion beim Ausdifferenzieren der γ -Neurone und 2. eine verhaltensbiologische Funktion, da sie Kontakt zum Pilzkörperneuopil aufnehmen (3.2.5.2 - 3.2.5.4).

Die gefundenen zellstammbaumspezifischen zeitlichen Unterschiede beim Auswachsen der γ -Neurone deuten an, dass funktionelle Verbindungen von γ -Neuronen mit anderen Interneuronen des Gehirns zuerst bei denen der PKZSBen1-3 auftreten und diese somit vor den γ -Neuronen des PKNB4 an Integrationsleistungen der Pilzkörper beteiligt sind. Auffällig im Zusammenhang mit der verspäteten Differenzierung von PKZSB4 γ -Neuronen ist das Fehlen einer Dac Expression im PKNB4 und seinen Nachkommenzellen (3.4.1, 3.5.1). Von Dac wurde gezeigt, dass es eine Funktion bei der Differenzierung von γ -Neuronen erfüllt (Kurusu et al., 2000; Martini and Davis, 2005; Martini et al., 2000; Noveen et al., 2000). Möglicherweise spielt das Fehlen von Dac Protein in PKNB4 γ -Neuronen eine Rolle bei ihrer verzögerten Differenzierung.

Wie gezeigt wachsen die γ -Neurone des PKNB1 zuerst aus und bifurkieren während des mittleren St.17 zeitgleich in den medialen und vertikalen Lobus. Dieser Befund widerspricht Untersuchungen, nach denen der mediale Lobus im frühen St. 17 gebildet

wird und der vertikale Lobus einen seitlichen Auswuchs des medialen darstellt, der sich erst im späten St. 17 entwickelt (Noveen et al., 2000; Tettamanti et al., 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Calyx bereits im späten Embryo vorhanden ist, was im Widerspruch zu früher gemachten Aussagen steht, nach denen sich die Calyx erst während des L1 Larvenstadiums ausdifferenziert (Tettamanti et al., 1997). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass appetitives olfaktorisches Lernen in der L1 Larve von ca. 100 embryonal geborenen γ -Neuronen abhängt. Dies deutet darauf hin, dass die zugrunde liegenden neuronalen Schaltkreise bereits während der Embryonalentwicklung etabliert werden (Pauls et al., 2010). Somit verfügt die Larve zum Zeitpunkt ihres Schlupfes wahrscheinlich bereits über eine funktionierende Informationsübertragung von Antennalloben zu Pilzkörpern, z.B mittels embryonal geborener Projektionsneurone (Marin et al., 2005; Ramaekers et al., 2005; Yu et al., 2010).

4.6 Embryonale γ -Neurone begehen keine Apoptose und persistieren bis in das adulte Nervensystem

Apoptose spielt während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* als einer der Mechanismen, der zur Regulation von Zellzahlen beiträgt, eine bedeutende Rolle bei der Organogenese (Jacobson et al., 1997; Rusconi et al., 2000). Auch im sich entwickelnden zentralen Nervensystem werden sowohl im VNS als auch im Gehirn zum Teil bedeutende Mengen von Zellen durch Apoptose entfernt (Larsen et al., 2009; Rogulja-Ortmann et al., 2007). Meine Ergebnisse hingegen sprechen gegen eine Regulation der γ -Neuronenanzahl durch Apoptose (siehe 3.2.9). Konsistent mit dem Fehlen von Apoptose und der durchgehenden Proliferation von PKNBen (Ito and Hotta, 1992; Prokop and Technau, 1994) findet man eine Zunahme der γ -Neuronenanzahl in allen vier PKZSBen zwischen dem St.17 und dem frühen L1-Larvenstadium (siehe Tabelle 1). Diese Zunahme steht im Widerspruch zu den Befunden von Larsen et al. (2009), die in Flip-out Klonen eine Abnahme der γ -Neuronenanzahl im Pilzkörper zwischen Stadium 17 und L1 beobachteten. Wie die klonale Zellstammbaumanalyse aufdeckte, werden embryonal ca. 95 (bis zum frühen L1 Stadium ca. 125) γ -Neurone gebildet (siehe Tabelle 1). Interessanterweise fand man in früheren Untersuchungen nach Ablation der PKNBen in der frühen L1 Larve mit Hydroxyurea noch ca. 100 embryonal geborene γ -Neurone im

adulten Gehirn (Armstrong et al., 1998). Diese Befunde implizieren, dass embryonal geborene γ -Neurone über die Metamorphose hinweg bis in das adulte Tier persistieren. Die von mir gefundene Anzahl von ca. 95 γ -Neuronen im spätembryonalen Pilzkörper deutet darauf hin, dass die meisten, oder gar alle embryonal entstandenen Kenyonzellen eine Funktion im adulten Nervensystem erfüllen, und embryonal geborene γ -Neurone somit auch während der postembryonalen Entwicklung nicht durch Apoptose entfernt werden (Technau and Heisenberg, 1982). Das Fehlen von Apoptose in den γ -Neuronen der Pilzkörper stellt einen auffälligen Unterschied zu den häufig beobachteten Anzeichen von apoptotischen Zellen (in Form von Zellfragmenten oder pyknotischen Zellen) in den anderen protocerebralen Zellstammbäumen dar, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden. Obwohl die Zahl der apoptotischen Zellen in diesen ZSBen nicht quantifiziert werden konnte, steht die häufige Beobachtung von apoptotischen Zellen im Einklang mit Beobachtungen, nach denen ca. 40% der Gehirnzellen während des spätembryonalen/frühtarvalen Stadiums durch Apoptose entfernt werden (Larsen et al., 2009).

4.7 Parallelen zwischen ni-Typ2-Neuronen in *Drosophila* und Typ 3 Kenyonzellen in anderen Insekten

Typ 3 Kenyonzellen sind ein Typus von Kenyonzellen, die in manchen, aber nicht in allen, Insekten vorkommen und die eine variable Morphologie zwischen den verschiedenen Insektenspezies zeigen. Allen Typ 3 Kenyonzellen ist jedoch gemein, dass sie, falls vorhanden, zu den ersten von den PKNBen geborenen Zellen gehören und dass sie häufig ein Pedunkel und Lobensystem ausbilden, das sich vom Pedunkel und den Loben des eigentlichen Pilzkörpers separiert (Farris, 2005). Bei einer Untersuchung der Larvalentwicklung des Pilzkörpers der Biene (*Apis mellifera*) wurden Typ 3 Kenyonzellen beschrieben, deren Axone, analog zu den in dieser Arbeit beschriebenen ni-Typ2-Neuronen, durch den Pedunkel projizieren, diesen im Bereich des Spur verlassen und in eine Region posterior der Loben projizieren (Abb. 48)(Farris et al., 2004). Bei den ni-Typ2-Neuronen in der Fruchtfliege handelt es sich ebenso wie bei den Typ 3 Kenyonzellen in der Biene um frühgeborene Neurone, die zudem Gemeinsamkeiten in ihrem axonalen

Projektionsverlauf aufweisen. Diese Parallelen unterstützen die Vermutung, dass die ni-Typ2-Neurone somit eine Form der Typ 3 Kenyonzellen darstellen könnten.

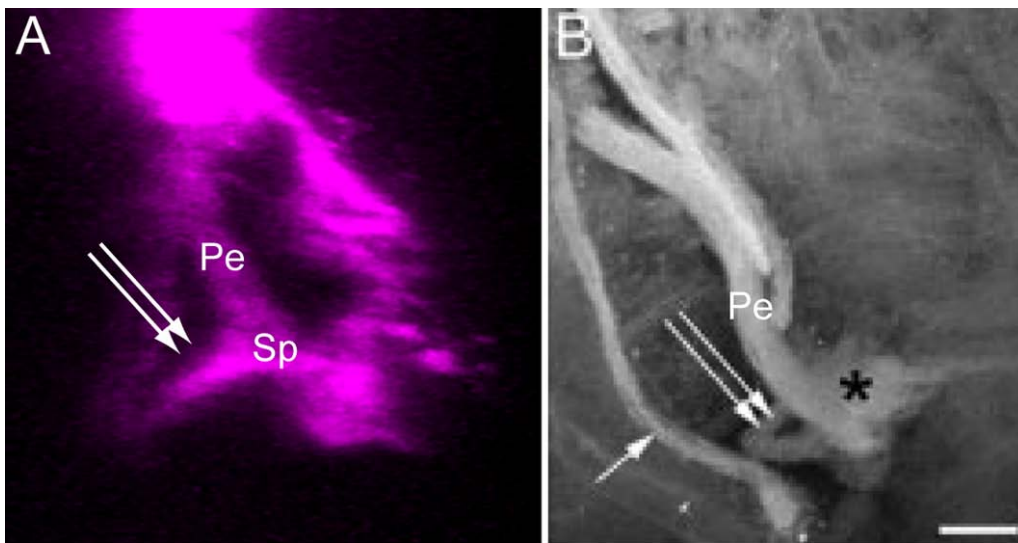


Abb. 48 *Drosophila* ni-Typ2-Neurone und Typ 3 Kenyonzellen der Bienenlarve

A Axonverlauf der ni-Typ2-Neurone in einem St.17 *Drosophila* Embryo. Ansicht von lateral. Die Axone verlassen das Pilzkörperneuropil im Bereich des Sp und projizieren in einen Bereich posterior des mL (Doppelpfeile). **B** Typ 3 Kenyonzellen der Bienenlarve (aus (Farris et al., 2004)). Die Doppelpfeile verweisen auf den Projektionsverlauf der Typ 3 Kenyonzellen, die das Pilzkörperneuropil im Bereich des Sp verlassen und in einen Bereich posterior des mL projizieren. Asterisk: Gabelungspunkt von medialem und vertikalem Lobus. **Abkürzungen:** Pe: Pedunkel; Sp: Spur; mL: medialer Lobus

4.8 Evolutionäre Betrachtungen der Pilzkörper

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die PKNBen von benachbarten δ B Zellen desselben proneuralen Feldes abstammen (3.2.3). Diese Art der Neurogenese (siehe auch (Urbach et al., 2003)) entspricht dem Modus der Neurogenese, die von basalen Arthropoden bekannt ist. In Cheliceraten stammt der Pilzkörper von Zellen ab, die das proneurale Gen *CsASH1* exprimieren, invaginieren und alle ein neurales Schicksal haben (Doeffinger et al., 2010). Diese Ähnlichkeiten deuten auf einen evolutionär alten Ursprung des neuroektodermalen Bereichs hin, aus dem die Pilzkörper entstammen.

Kürzlich wurde das frühe Genexpressionsprofil von zwei potentiellen *Drosophila* PKNBen, der *Dac* positiven Neuroblasten *Pcd8* und *Pcd9*, für einen molekularen Vergleich der Genexpression mit dem Pilzkörper des Anneliden *Platynereis* herangezogen (Tomer et al., 2010). Da *dac* und/oder *ey* jedoch nicht exklusiv in *Drosophila* PKNBen exprimiert werden, war die Identität der PKNBen in der embryonalen Neuroblastenkarte (Urbach and

Technau, 2003b) bisher nicht eindeutig geklärt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pcd9, aber nicht Pcd8, zu den PKNBen gehört. Das Genexpressionsprofil der nun identifizierten drei anderen PKNBen (Pcd2, Pcd4, Pcv9) ist dem von Pcd9 jedoch ähnlich. Außerdem findet sich eine Koexpression von *rx* und *dac/ey* nahezu exklusiv in der Pilzkörperanlage in *Drosophila*. *rx* wird auch im Anneliden Pilzkörper exprimiert, was eine Homologie zwischen den Pilzkörpern von Insekten und Anneliden weiter unterstützt (Tomer et al., 2010). Darüber hinaus zeigen Tomer et al. (2010), dass der molekulare Fingerabdruck der *Platynereis* Pilzkörper auch in einer Subregion des Vertebraten-Vorderhirns konserviert ist. In Übereinstimmung mit diesem Befund findet man diesen molekularen Fingerprint nicht nur in dem zum Vergleich herangezogenen (Pcd9) sondern auch, wenngleich weniger stark konserviert, in den drei übrigen *Drosophila* PKNBen (Pcd2; Pcd4; Pcv9). Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die Pilzkörper der Protostomen (Anneliden und Insekten) und das Pallium der Deuterostomen (Vertebraten) aus einem bereits im Vorfahren der Bilateria vorhandenen Gehirnbereich evolvierten.

4.9 Zellzahlen und Projektionsverläufe der protocerebralen Zellstammbäume

72 der ca. 105 embryonalen Gehirnneuroblasten wurden dem Protocerebrum zugeordnet (Urbach et al., 2003). Die hier vorliegende Beschreibung von 21 embryonalen protocerebralen ZSBen umfasst somit ungefähr 30% aller protocerebraler ZSBe, was einen ersten Einblick in ihre generellen zellulären und morphologischen Eigenschaften erlaubt.

Die Zellzahlen der protocerebralen Gehirnzellstammbäume weisen beträchtliche Unterschiede auf und liegen zwischen 7 und 45 Zellen (δB NB-ZSB12 bzw. PKZSB4). Mit Ausnahme von 4 Zellstammbäumen (siehe Tabelle 2), bringen alle in dieser Arbeit charakterisierten protocerebralen ZSBe Neurone mit contralateral verlaufenden Projektionen hervor (=81%). Die geringe Zahl an rein ipsilateral projizierenden ZSBen (=19%) ist ähnlich der Situation im VNS, in dem von 30 ZSBen lediglich vier ZSBe (=13%) Neurone mit ausschließlich ipsilateralem Verlauf aufweisen (Schmidt et al., 1997). Ein Vergleich der Zellzahlen von ZSBen des Protocerebrums und VNS zeigt, dass Erstere (ausgenommen die PKZSBe, wegen des nicht vorhandenen mitotischen Arrests (Kunz et

al., 2012; Prokop and Technau, 1994)) in der Dimension ihrer Zellzahl mit den ZSBen des VNS vergleichbar sind (Protocerebrum: 7-27 Zellen (Tabelle 2); VNS: 2-26 Zellen (Bossing et al., 1996)).

Zwei der charakterisierten protocerebralen Gehirnzellstammbäume (PKZSB2 und δ B NB-ZSB2) bringen Neurone hervor, deren Neuriten durch die Konnektive des VNS zum Teil bis ins terminale abdominale Neuromer deszendieren und somit efferente, das Gehirn mit den abdominalen Neuromeren des VNS verbindende Neurone darstellen. Dieser Befund stellte eine Überraschung dar, da bei einer Untersuchung zur Konnektivität von Gehirn und VNS in der L1 Larve nur deszendierende Neurone gefunden wurden, die bis in die gnathalen bzw. thorakalen Neuromere reichen (Cardona et al., 2009). Die Tatsache, dass von Cardona et al. (2009) keine Neurone gefunden wurden, die vom Gehirn bis in die abdominalen Neuromere projizieren, deutet darauf hin, dass es vermutlich nur wenige solcher Neurone in der L1 Larve gibt. In der L1 Larve wurde ein *Drosophila tachykinin* (*Dtk*; kodiert für das Prohormon der Tachykinin-verwandten Peptide) exprimierendes Neuron im medialen Protocerebrum beschrieben, das bis in die abdominalen Neuromere projiziert (Winther et al., 2003). Somit stammen, nach meiner Kenntnis, alle bisher beschriebenen Neurone des fröhlarvalen *Drosophila* Gehirns, die bis in abdominale Neuromere deszendieren, aus dem Protocerebrum. Dies könnte bedeuten, dass efferente Verbindungen von Gehirn und abdominalen Neuromeren in der frühen Larve hauptsächlich oder gar exklusiv von protocerebralen Neuronen hergestellt werden.

Viele der charakterisierten protocerebralen ZSBen bilden Faszikel aus, die das Neuropil eines oder beider Pilzkörper innervieren oder in engem Kontakt zu diesem stehen, was eine mögliche funktionelle Verknüpfung möglich erscheinen lässt. Manche der ni-Neuronen-Faszikel bilden boutonartige Strukturen auf der Oberfläche bestimmter Bereiche des contralateralen Pilzkörperneuropil aus. Diese Strukturen deuten stark auf einen funktionellen Kontakt dieser Faszikel mit dem Pilzkörperneuropil hin. Mit δ B NB-ZSB4 konnte ein protocerebraler ZSB charakterisiert werden, dessen Zellkörper ventral des Pilzkörperkortex liegen und dessen Faszikel sowohl das Neuropil des ipsilateralen als auch das Neuropil des contralateralen Pilzkörpers in vielen Bereichen innervieren. Diese Faszikel scheinen somit am Informationsaustausch zwischen den Pilzkörpern der beiden Hemisphären beteiligt zu sein. Darüber hinaus verläuft eines der Faszikel des δ B NB-ZSB4 teilweise durch den Pedunkel des ipsilateralen Pilzkörpers, parallel zu den Axonen

der γ -Neurone. Dies zeigt, dass der Bereich des spätembryonalen/frühtarvalen Pedunkels nicht exklusiv von Axonen der γ -Neurone okkupiert wird. Interessant in diesem Zusammenhang sind Beobachtungen von Technau und Heisenberg (1982), die durch Auszählen der Fasern in Pedunkelquerschnitten eine Zahl von ca. 300 Axonen im Pedunkel von L1 Larven bestimmten. Diese Zahl beinhaltet neben den Axonen der γ -Neurone wahrscheinlich auch Axone von extrinsischen Neuronen (Technau and Heisenberg, 1982). Das durch den Pedunkel verlaufende Faszikel des hier charakterisierten δ B NB-ZSB4 stellt somit wahrscheinlich eine Subpopulation solcher extrinsischer Neurone dar.

5 Zusammenfassung

Eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Spezifizierungsmechanismen unterschiedlicher Zelltypen im embryonalen Gehirn ist die detaillierte Kenntnis des neuroektodermalen Ursprungs seiner neuralen Stammzellen (Neuroblasten, NB), sowie der Morphologie und zellulären Komposition der daraus hervorgehenden Zellstammbäume (ZSBe). In der vorliegenden Arbeit wurde die Entstehung und Topologie von 21 embryonalen ZSBen im anteriorsten Gehirnteil, dem Protocerebrum, charakterisiert, mit besonderem Fokus auf solche ZSBe, die den Pilzkörper konstituieren. Pilzkörper sind prominente, paarige Neuropilzentren, die eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung olfaktorischer Informationen, beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung spielen. In dieser Arbeit konnte erstmalig die Embryonalentwicklung der Pilzkörper ab dem Zeitpunkt der Entstehung ihrer NBen im procephalen Neuroektoderm (pNE), bis hin zum funktionellen Gehirnzentrum in der frühen Larve auf Ebene individueller ZSBe bzw. einzelner Neurone beschrieben werden. Mittels der klonalen Di-Markierungstechnik konnte ich zeigen, dass die vier NBen der Pilzkörper (PKNBen) jeder Gehirnhemisphäre innerhalb des NE aus dem ventralen Bereich der mitotischen Domäne δB hervorgehen. Ein in diesem Bereich liegendes proneurales Feld beherbergt etwa 10-12 Zellen, die alle das Potential haben sich zu PKNBen zu entwickeln. Des Weiteren zeigen diese Untersuchungen, dass die PKNBen (und weitere NBen der δB) aus benachbarten NE-Zellen hervorgehen. Dieser Befund impliziert, dass der Mechanismus der lateralen Inhibition in diesem Bereich des NE keine Rolle spielt. Weiterhin stellte sich heraus, dass jeder PKNB eine ihm eigene Position im sich entwickelnden Pilzkörperkortex besetzt und eine spezifische Kombination der Transkriptionsfaktoren Dachshund, Eyeless und Retinal homeobox exprimiert. Dadurch konnte jeder der vier PKNBen in den betreffenden frühembryonalen NB-Karten einem der ca. 105 NBen pro Gehirnhemisphäre zugeordnet werden. Die PKNBen bringen individuelle ZSBe hervor, die Pilzkörper-intrinsische γ -Neurone beinhalten, aber auch jeweils charakteristische Sets an Interneuronen, die nicht am Aufbau des Pilzkörpers beteiligt sind. Diese verschiedenen Neuronentypen entstehen in einer zeitlichen Abfolge, die für jeden PKNBen spezifisch ist. Ihre embryonalen ZSBe sind aber nicht nur durch individuelle Sets an frühgeborenen α -Neuronen charakterisiert, sondern auch durch spezifische

Unterschiede in der Anzahl ihrer γ -Neurone, welche jedoch, wie ich zeigen konnte, nicht durch Apoptose reguliert wird. Weiterhin konnte ich zeigen, dass γ -Neurone, in einer PKNB Klon-abhängigen Weise, spezifische Unterschiede in der räumlich-zeitlichen Innervation des Pedunkels, der Calyx und der Loben aufweisen. Im Weiteren wurde die Expression verschiedener molekularer Marker in diesen ZSBen charakterisiert, u.a. die Expression verschiedener Gal4-Fliegenstämme, und solcher Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der temporären Spezifizierung im VNS spielen. So werden *hb*, *Kr*, *pdm1* auch in Nachkommenzellen der PKNBen exprimiert und haben möglicherweise eine Funktion bei ihrer temporären Spezifizierung. Diese Arbeit gibt auch erstmalig Einblick in die vollständige spätembryonale/frühtarvale Morphologie anderer protocerebraler Gehirnzellstammbäume aus δB und $\delta 1$. Die Beschreibungen dieser ZSBe beinhalten Angaben zu deren Zellzahl, Zelltypen, der Lage der ZSBe im Gehirn, axonalen/dendritischen Projektionsmustern sowie dem Entstehungsort des NBen.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi, Y., Hauck, B., Clements, J., Kawauchi, H., Kurusu, M., Totani, Y., Kang, Y. Y., Eggert, T., Walldorf, U., Furukubo-Tokunaga, K. et al.** (2003). Conserved cis-regulatory modules mediate complex neural expression patterns of the *eyeless* gene in the *Drosophila* brain. *Mech Dev* **120**, 1113-26.
- Armstrong, J. D., de Belle, J. S., Wang, Z. and Kaiser, K.** (1998). Metamorphosis of the mushroom bodies; large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. *Learn Mem* **5**, 102-14.
- Aso, Y., Grubel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I. and Tanimoto, H.** (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* **23**, 156-72.
- Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Diaz-Benjumea, F. J. and Thor, S.** (2009). Neuronal subtype specification within a lineage by opposing temporal feed-forward loops. *Cell* **139**, 969-82.
- Bossing, T. and Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* **120**, 1895-906.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41-64.
- Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1995). Evolution of neuroblast identity: seven-up and prospero expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and *Schistocerca*. *Development* **121**, 3989-96.
- Cabrera, C. V., Martinez-Arias, A. and Bate, M.** (1987). The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*. *Cell* **50**, 425-33.
- Cambridge, S. B., Davis, R. L. and Minden, J. S.** (1997). *Drosophila* mitotic domain boundaries as cell fate boundaries. *Science* **277**, 825-8.
- Campos-Ortega, J. and Hartenstein, V.** (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Berlin, Springer.
- Campos-Ortega, J. A.** (1993). Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology* **24**, 1305-1327.
- Campos-Ortega, J. A.** (1994). Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol Paris* **88**, 111-22.
- Cardona, A., Larsen, C. and Hartenstein, V.** (2009). Neuronal fiber tracts connecting the brain and ventral nerve cord of the early *Drosophila* larva. *J Comp Neurol* **515**, 427-40.
- Connolly, J. B., Roberts, I. J. H., Armstrong, J. D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T. and O'Kane, C. J.** (1996). Associative Learning Disrupted by Impaired Gs Signaling in *Drosophila* Mushroom Bodies. *Science* **274**, 2104-2107.

- Crittenden, J. R., Skoulakis, E. M., Han, K. A., Kalderon, D. and Davis, R. L.** (1998). Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem* **5**, 38-51.
- Davis, R. L.** (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci* **28**, 275-302.
- de Belle, J. S. and Heisenberg, M.** (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263**, 692-5.
- Doe, C. Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855-63.
- Doeffinger, C., Hartenstein, V. and Stollewerk, A.** (2010). Compartmentalization of the precheliceral neuroectoderm in the spider *Cupiennius salei*: development of the arcuate body, optic ganglia, and mushroom body. *J Comp Neurol* **518**, 2612-32.
- Dujardin, F.** (1850). Mémoire sur le système nerveux des insectes. *Ann. Sci. Nat. Zool.* **14**: 195-206.
- Fahrbach, S. E.** (2006). Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annu Rev Entomol* **51**, 209-32.
- Farris, S. M.** (2005). Evolution of insect mushroom bodies: old clues, new insights. *Arthropod Structure and Development* **34**, 211-234.
- Farris, S. M., Abrams, A. I. and Strausfeld, N. J.** (2004). Development and morphology of class II Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* **474**, 325-39.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**, 1-22.
- Foe, V. E. and Alberts, B. M.** (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* **61**, 31-70.
- Grillenzoni, N., Flandre, A., Lasbleiz, C. and Dura, J. M.** (2007). Respective roles of the DRL receptor and its ligand WNT5 in *Drosophila* mushroom body development. *Development* **134**, 3089-97.
- Hartenstein, V., Nassif, C. and Lekven, A.** (1998). Embryonic development of the *Drosophila* brain. II. Pattern of glial cells. *J Comp Neurol* **402**, 32-47.
- Hartenstein, V., Rudloff, E. and Campos -Ortega, J. A.** (1987). The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* **196**, 473-485.
- Heisenberg, M.** (1998). What Do the Mushroom Bodies Do for the Insect Brain? An Introduction. *Learn Mem.* **May**; **5(1)**: 1–10.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S. and Byers, D.** (1985). *Drosophila* Mushroom Body Mutants are Deficient in Olfactory Learning. *Journal of Neurogenetics* **2**, 1-30.

- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. and Doe, C. Q.** (2001). Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* **106**, 511-21.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D.** (1997). The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-71.
- Ito, K. and Hotta, Y.** (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **149**, 134-48.
- Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D. and Strausfeld, N. J.** (1998). The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in Drosophila melanogaster Meigen. *Learn Mem* **5**, 52-77.
- Jacob, J., Maurange, C. and Gould, A. P.** (2008). Temporal control of neuronal diversity: common regulatory principles in insects and vertebrates? *Development* **135**, 3481-9.
- Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C.** (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-54.
- Jefferis, G. S. X. E., Marin, E. C., Stocker, R. F. and Luo, L.** (2001). Target neuron prespecification in the olfactory map of Drosophila. *Nature* **414**, 204-208.
- Jimenez, F. and Campos-Ortega, J. A.** (1990). Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of D. melanogaster. *Neuron* **5**, 81-9.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. and Odenwald, W. F.** (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the Drosophila CNS. *Genes Dev* **12**, 246-60.
- Karcavich, R. E.** (2005). Generating neuronal diversity in the Drosophila central nervous system: a view from the ganglion mother cells. *Dev Dyn* **232**, 609-16.
- Kenyon, F. C.** (1896). The brain of the bee. A preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the arthropoda. *J. Comp. Neurol.* **6:133–210**.
- Kunz, T., Kraft, K., Technau, G. and Urbach, R.** (2012). Origin of Drosophila mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *eingereicht bei Development*.
- Kurusu, M., Nagao, T., Walldorf, U., Flister, S., Gehring, W. J. and Furukubo-Tokunaga, K.** (2000). Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the Drosophila brain, by the eyeless, twin of eyeless, and Dachshund genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2140-4.
- Lai, S. L. and Lee, T.** (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in Drosophila. *Nat Neurosci* **9**, 703-9.
- Larsen, C., Shy, D., Spindler, S. R., Fung, S., Pereanu, W., Younossi-Hartenstein, A. and Hartenstein, V.** (2009). Patterns of growth, axonal extension and axonal arborization of neuronal lineages in the developing Drosophila brain. *Dev Biol* **335**, 289-304.

- Lecourtois, M. and Schweisguth, F.** (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* **9**, 2598-608.
- Lee, T., Lee, A. and Luo, L.** (1999). Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* **126**, 4065-76.
- Luo, L.** (2005). A Practical Guide: Single-Neuron Labeling Using Genetic Methods. In *Imaging in Neuroscience and Development: A laboratory manual*, (eds. R. Yuste and A. Konnerth). . *Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Marin, E. C., Watts, R. J., Tanaka, N. K., Ito, K. and Luo, L.** (2005). Developmentally programmed remodeling of the Drosophila olfactory circuit. *Development* **132**, 725-37.
- Martini, S. R. and Davis, R. L.** (2005). The dachshund gene is required for the proper guidance and branching of mushroom body axons in Drosophila melanogaster. *J Neurobiol* **64**, 133-44.
- Martini, S. R., Roman, G., Meuser, S., Mardon, G. and Davis, R. L.** (2000). The retinal determination gene, dachshund, is required for mushroom body cell differentiation. *Development* **127**, 2663-72.
- Namba, R. and Minden, J. S.** (1999). Fate mapping of Drosophila embryonic mitotic domain 20 reveals that the larval visual system is derived from a subdomain of a few cells. *Dev Biol* **212**, 465-76.
- Nassif, C., Daniel, A., Lengyel, J. A. and Hartenstein, V.** (1998). The role of morphogenetic cell death during Drosophila embryonic head development. *Dev Biol* **197**, 170-86.
- Noveen, A., Daniel, A. and Hartenstein, V.** (2000). Early development of the Drosophila mushroom body: the roles of eyeless and dachshund. *Development* **127**, 3475-88.
- Pauls, D., Selcho, M., Gendre, N., Stocker, R. F. and Thum, A. S.** (2010). Drosophila larvae establish appetitive olfactory memories via mushroom body neurons of embryonic origin. *J Neurosci* **30**, 10655-66.
- Pearson, B. J. and Doe, C. Q.** (2003). Regulation of neuroblast competence in Drosophila. *Nature* **425**, 624-8.
- Prokop, A. and Technau, G. M.** (1994). Normal function of the mushroom body defect gene of Drosophila is required for the regulation of the number and proliferation of neuroblasts. *Dev Biol* **161**, 321-37.
- Ramaekers, A., Magnenat, E., Marin, E. C., Gendre, N., Jefferis, G. S., Luo, L. and Stocker, R. F.** (2005). Glomerular maps without cellular redundancy at successive levels of the Drosophila larval olfactory circuit. *Curr Biol* **15**, 982-92.
- Rickert, C., Kunz, T., Harris, K. L., Whittington, P. M. and Technau, G. M.** (2011). Morphological characterization of the entire interneuron population reveals principles of neuromere organization in the ventral nerve cord of Drosophila. *J Neurosci* **31**, 15870-83.
- Robertson, K., Mergliano, J. and Minden, J. S.** (2003). Dissecting Drosophila embryonic brain development using photoactivated gene expression. *Dev Biol* **260**, 124-37.

- Rogulja-Ortmann, A., Luer, K., Seibert, J., Rickert, C. and Technau, G. M.** (2007). Programmed cell death in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**, 105-16.
- Rusconi, J. C., Hays, R. and Cagan, R. L.** (2000). Programmed cell death and patterning in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **7**, 1063-70.
- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-89.
- Schmidt-Ott, U. and Martin Technau, G.** (1994). Fate-mapping in the procephalic region of the embryonic *Drosophila* head. *Development Genes and Evolution* **203**, 367-373.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186-204.
- Seibert, J. and Urbach, R.** (2010). Role of *en* and novel interactions between *msh*, *ind*, and *vnd* in dorsoventral patterning of the *Drosophila* brain and ventral nerve cord. *Dev Biol* **346**, 332-45.
- Seibert, J., Volland, D. and Urbach, R.** (2009). *Ems* and *Nkx6* are central regulators in dorsoventral patterning of the *Drosophila* brain. *Development* **136**, 3937-47.
- Siegmund, T. and Korge, G.** (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **431**, 481-91.
- Skeath, J. B.** (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* **21**, 922-31.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B.** (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* **114**, 939-46.
- Skeath, J. B. and Thor, S.** (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 8-15.
- Stocker, R. F.** (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and Tissue Research* **275**, 3-26.
- Stocker, R. F., Tissot, M. and Gendre, N.** (1995). Morphogenesis and cellular proliferation pattern in the developing antennal lobe of *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* **205**, 62-72.
- Strausfeld, N. J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R. S. and Ito, K.** (1998). Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn Mem* **5**, 11-37.
- Tanaka, N. K., Tanimoto, H. and Ito, K.** (2008). Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* **508**, 711-55.
- Technau, G. and Heisenberg, M.** (1982). Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **295**, 405-7.

- Technau, G. M., Berger, C. and Urbach, R.** (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn* **235**, 861-9.
- Tettamanti, M., Armstrong, J. D., Endo, K., Yang, M. Y., FurukuboTokunaga, K., Kaiser, K. and Reichert, H.** (1997). Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centres for associative learning and memory. *Development Genes and Evolution* **207**, 242-252.
- Tomer, R., Denes, A. S., Tessmar-Raible, K. and Arendt, D.** (2010). Profiling by image registration reveals common origin of annelid mushroom bodies and vertebrate pallium. *Cell* **142**, 800-9.
- Truman, J. W., Schuppe, H., Shepherd, D. and Williams, D. W.** (2004). Developmental architecture of adult-specific lineages in the ventral CNS of *Drosophila*. *Development* **131**, 5167-84.
- Tsuji, T., Hasegawa, E. and Isshiki, T.** (2008). Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors. *Development* **135**, 3859-69.
- Urbach, R., Schnabel, R. and Technau, G. M.** (2003). The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* **130**, 3589-606.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2003a). Segment polarity and DV patterning gene expression reveals segmental organization of the *Drosophila* brain. *Development* **130**, 3607-20.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2003b). Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**, 3621-37.
- Urbach, R. and Technau, G. M.** (2003c). Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species. *Arthropod Struct Dev* **32**, 103-23.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H.** (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-83.
- Winther, A. M., Siviter, R. J., Isaac, R. E., Predel, R. and Nassel, D. R.** (2003). Neuronal expression of tachykinin-related peptides and gene transcript during postembryonic development of *Drosophila*. *J Comp Neurol* **464**, 180-96.
- Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Green, P. and Hartenstein, V.** (1996). Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol* **370**, 313-29.
- Yu, H. H., Kao, C. F., He, Y., Ding, P., Kao, J. C. and Lee, T.** (2010). A complete developmental sequence of a *Drosophila* neuronal lineage as revealed by twin-spot MARCM. *PLoS Biol* **8**.
- Yu, H. H. and Lee, T.** (2007). Neuronal temporal identity in post-embryonic *Drosophila* brain. *Trends Neurosci* **30**, 520-6.
- Zars, T.** (2000). Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 790-5.

Zhu, S., Lin, S., Kao, C. F., Awasaki, T., Chiang, A. S. and Lee, T. (2006). Gradients of the *Drosophila* Chinmo BTB-zinc finger protein govern neuronal temporal identity. *Cell* **127**, 409-22.

7 Anhang

7.1 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Thomas Kunz
Geburtsdatum/-ort 11. 09 1978 in Wadern (Saar)

PROMOTION

2006 - 2011 Johannes Gutenberg Universität Mainz
Institut für Genetik

STUDIUM

2005-2006 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Genetik
Thema: Untersuchung zum Ursprung individueller Interneurone im
embryonalen Bauchmark von *D. melanogaster*
Abschluss: Diplombiologe (Dipl. Biol.)

1999-2005 Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
Schwerpunkte: Biochemie, Genetik, Zoologie

ZIVILDIENST

1998 - 1999 Hochwaldkliniken Weißkirchen; Pflegedienst

SCHULE

1989 - 1998 Geschwister-Scholl Gymnasium, Lebach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1985 - 1989 Private Grund- u. Hauptschule des Bistums Trier in Lebach

Publikationen:

Rickert, C., Kunz, T., Harris, K. L., Whittington, P. M. and Technau, G. M. (2011). Morphological characterization of the entire interneuron population reveals principles of neuromere organization in the ventral nerve cord of *Drosophila*. *J Neurosci* **31**, 15870-83.

Kunz, T., Kraft, K., Technau, G. and Urbach, R. (2011). Origin of *Drosophila* mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *eingereicht bei Development*.

Kongressteilnahme mit Posterpräsentation:

11th European *Drosophila* Neurobiology Conference 2006, Leuven/Belgien

17. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie 2007, Marburg/Deutschland

12th European *Drosophila* Neurobiology Conference 2008, Würzburg/Deutschland

21st European *Drosophila* Research Conference 2009, Nice/France

7.2 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

Thomas Kunz

7.3 Danksagung

Danke an...