

Aus dem Bereich Entwicklungsbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zur Expression und Funktion der
Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren *Drosophila*
retinales Homeoboxgen und Homeobrain in der
Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

Vorgelegt von Jens Dieter Kolb
Geboren am 20. Januar 1984 in Saarbrücken-St. Arnual

Abkürzungsverzeichnis

anatomische Begriffe:

ACT	antenna-cerebraler Trakt
A-P	anterior-posteriore-Achse
CB	central brain, Zentralgehirn; Hauptanteil des larvalen, puppalen und adulten Gehirns
DC	Deutocerebrum
DCT	dorsaler Kommissurtrakt
dIPC	dorsaler Ausläufer des inneren Proliferationszentrums der optischen Lobe
DL	dorso-lateral in Bezug auf dorso-laterale Lineages des larvalen Gehirns
DM	dorso-medial in Bezug auf dorso-mediale Lineages des larvalen Gehirns
DSM	dorsale Spitzen der Medulla; Teilgebiet der optischen Medulla
D-V	dorso-ventrale-Achse
FK	Frontalkommissur
ftfc	fibre tract founder cluster; Pioniercluster des embryonalen Gehirns
GMC	ganglion mother cell, Ganglionmutterzelle
GC	Ganglionzelle
Hs	Headspot (Expressionsbande von <i>engrailed</i> im anterioren Protocerebrum, Kopffleck)
INP	intermediate neuronal precursor; intermediäre neuronale Vorläuferzelle
IPC	inner proliferational centre; inneres Proliferationszentrum der optischen Lobe
L	Lamina
LP	Lobula Plug; ein Neuropil der optischen Lobe
LPt	Lobula Plate; ein Neuropil der optischen Lobe
LPT	longitudinaler-protocerebraler Trakt
M	optische Medulla
M-L	medial-laterale-Achse
N	Neuron
NB	Neuroblast
NE	Neuroepithel, Neuroblastenbildungszone in der optischen Medulla larvaler Gehirne
NP	Neuropil
NS	Nervensystem
OL	optische Lobe
OPC	outer proliferational centre; äußeres Proliferationszentrum der optischen Lobe
PAN	posteriorer, Asense-negativer Neuroblast, Typ-II-Neuroblast der DM/DL-Lineages
PAT	primäre Axontrakte
PB	Protocerebralbrücke
PC	Protocerebrum
PCN	Protocerebralkonnektiv
PHK	präorale Hirnkommissur
PK	Pilzkörper
PNE	procephales Neuroektoderm, Bildungszone der Neuroblasten des embryonalen Gehirns
SAG	supraoesophageales Ganglion; entspricht den Gehirnhemisphären
SAT	sekundäre Axontrakte
SOG	suboesophageales Ganglion
TC	Tritocerebrum
TK	tritocerebrale Kommissur
VCT	ventraler Kommissurtrakt
VNS	ventrales Nervensystem
ZNS	zentrales Nervensystem

Mikroskopie:

20x	Verwendung eines Objektivs mit 20-facher Vergrößerung
25x	Verwendung eines Objektivs mit 25-facher Vergrößerung
40x	Verwendung eines Objektivs mit 40-facher Vergrößerung
63x	Verwendung eines Objektivs mit 63-facher Vergrößerung

sonstige Abkürzungen:

57B-TF	die Transkriptionsfaktoren Drx und Hbn (auch Otp) des 57B-Genclusters des rechten Arms des 2. Chromosoms
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat (Ammoniumpersulfat)
AS	Aminosäuren
beta-Gal	beta-Galactosidase
BL	Bloomington Stock Center (Stammbezeichnung: + Nummer)
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-terminal	carboxyterminal (Protein)
Cyo	Curly of Oster (Drosophila-Balancer, 2.Chromosom)
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii / et aliae (lat. „und andere“)
EMS	Ethylmethansulfonat
ES	embryonales Entwicklungsstadium; insgesamt 17 Stadien werden unterschieden
F ¹	1. Filialgeneration
F ²	2. Filialgeneration
Flp	Flippase
FM7	First Multiple Series 7 (Drosophila-Balancer, X-Chromosom)
FRT	Flippase Rekombinase Target
g	(Normwert) Erdbeschleunigung ($g = 9.80665 \text{ m/s}^2$)
G4	Gal4
geno.	genomisch, im Sinne genomischer DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HCL	Salzsäure
HRP	Antikörper mit Spezifität für ein Glykoprotein auf der Oberfläche des <i>Drosophila</i> -Nervensystems (h orseradish p eroxidase) sowie das Enzym Horseradish Peroxidase
hs	Hitzeschock
hs-FLP	Hitzeschock gesteuerte Flippase
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KLG	Kopflückengene

IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
L1, L2, L3	Larve des 1., 2., 3. Larvalstadiums
l	Liter
lacZ	beta-Galaktosidase-Gen (beta-Gal)
LB	Luria Bertani Medium
LiCl	Lithiumchlorid
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	Molarität
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
mM	Milimolarität
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholinio)propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natronlauge
neg.	negativ, bezogen auf kernständige Expression eines Transkriptionsfaktors
N-terminal	aminoterminal (Protein)
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBL	Phosphate Buffered Lysin
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Pondus hydrogenii; $\text{pH} = -\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$
pos.	positiv, bezogen auf kernständige Expression eines Transkriptionsfaktors
prim.	primär, bezogen auf primäre Neurone der embryonalen Nervensystementwicklung
prox.	proximal, bezogen auf Lineage, bedeutet den Beginn der Lineage
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
RDGN	retinales D eterminations G en N etzwerk; Gruppe von für die Augenbildung bedeutender Transkriptionsfaktoren: z.B.: Dachshund, Eyeless und Twin of Eyeless
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>Sb</i>	Stubble (kurze Borsten)
<i>Sco</i>	Scutoid (fehlende Borsten)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
sec	Sekunde(n)
sek.	sekundär, bezogen auf die in der larvalen Entwicklung gebildeten Neurone
shRNA	short hairpin Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
spez.	Spezifisch
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tb</i>	tubby
TEMED	N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TM3	Third multiple 3 (<i>Drosophila</i> -Balancer, 3.Chromosom)

TM6	Third multiple 6 (<i>Drosophila</i> -Balancer, 3.Chromosom)
Tris(-HCl)	α,α,α -Tris-Base (mit HCl auf den notwendigen pH-Wert eingestellt)
Triton X-100	Octoxinol-9
TSA	Tyramid Signal Amplifikation
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TRITC	Tetramethylrhodamin
TUG	TubulinGal4
UAS	upstream activating sequence
ü.N.	über Nacht
ü.T.	über Tag
U	Unit (Enzymmenge, die ein μmol Substrat pro Minute umsetzt $1\text{U}=1\mu\text{mol}/\text{min}$)
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
x	gekreuzt mit [bzw. -fach Puffer]
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
yw	yellow-white (Fliegenstamm, der als Wildtyp-Kontrollstamm eingesetzt wurde)
z.B.	zum Beispiel
zw.	zwischen
%	Prozent
(w/v)	Gewichtsprozent (weight per volume)
(v/v)	Volumenprozent (volume per volume)
~	ungefähr
♀	weiblich
♂	männlich
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis:

1. Zusammenfassung

1.1	Untersuchungen zur Expression und Funktion der Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren <i>Drosophila</i> retinales Homeoboxgen und Homeobrain in der Gehirnentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2	Analysis of the expression and function of the homeodomain transcriptional activators <i>Drosophila</i> retinal homeobox and Homeobrain in the brain development of <i>Drosophila melanogaster</i>	3

2. Einleitung

2.1	<i>Drosophila</i> als Modellorganismus in der neurowissenschaftlichen Forschung.....	5
2.2	Die embryonale Gehirn- und Nervensystementwicklung von <i>Drosophila</i>	6
2.3	Kommissurbildung im embryonalen Gehirn.....	13
2.4	Hintergrund zum 57B-Gencluster auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms.....	15
2.5	Die larvale Gehirnentwicklung.....	19
2.6	Unterschiede der larvalen Typ-I- und Typ-II-NB-Lineages.....	22
2.7	Entwicklung der optischen Lobe.....	24
2.8	Der Pilzkörper.....	26
2.9	Techniken zur Analyse des Nervensystems.....	27
2.10	Timing-Faktoren in der Entwicklung des Nervensystems.....	29
2.11	Zielsetzung der Arbeit.....	31

3. Material und Methoden

3.1	Materialien.....	33
3.1.1	Antikörper für Fluoreszenzfärbungen.....	33
3.1.1.1	Primäre Antikörper.....	33
3.1.1.2	Sekundäre Fluoreszenzantikörper.....	34
3.2	Verwendete Organismen.....	35
3.2.1	Bakterienstämme.....	35
3.2.2	Fliegenstämme.....	35
3.2.2.1	lacZ-Reporterstämme.....	35
3.2.2.2	Gal4-Reporterstämme.....	35
3.2.2.3	UAS-Effektorstämme.....	36
3.2.2.4	Mutanten.....	36
3.2.2.5	FRT-Rekombinanten für MARCM und TUG-Treiberstämme.....	36
3.2.2.6	Fluoreszenzrekombinanten.....	37

3.2.2.7	Sonstige Fliegenstämme.....	37
3.2.3	Verwendete DNA-Klone.....	37
3.2.3.1	Vektoren.....	37
3.2.3.2	Verwendete Primer.....	37
3.2.4	Verwendete Lösungen.....	38
3.2.4.1	Kulturmedien.....	38
3.2.4.2	Lösungen und Puffer.....	39
3.2.4.3	Verwendete Kits.....	41
3.2.4.4	Verwendete Geräte.....	41
3.2.4.5	Bezugsquellen.....	42
3.2.5	Methoden.....	42
3.2.5.1	Agarosegelelektrophorese.....	42
3.2.5.2	Alkalische Lyse.....	42
3.2.5.3	Erzeugung von 3'-Adenosin-Überhängen.....	43
3.2.5.4	TOPO®-Klonierung.....	43
3.2.5.5	Plasmidisolierung mittels Qiagen Plasmid Midi Kit.....	44
3.2.5.6	Plasmidisolierung mittels peqGold Plasmid Miniprep Kit.....	44
3.2.5.7	Präparation genomischer DNA.....	44
3.2.5.8	PCR.....	44
3.2.5.9	Restriktionsverdau.....	45
3.2.5.10	DNA-Sequenzierung.....	45
3.2.5.11	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....	46
3.2.5.12	Fixierung von biologischem Material und Antikörperfärbung.....	48
3.2.5.12.1	Fixierung von Embryonen.....	48
3.2.5.12.2	Antikörperfärbung von PEM-fixierten Embryonen.....	49
3.2.5.12.3	Fixierung larvaler Gehirne.....	50
3.2.5.12.4	Färbung larvaler Gehirne.....	51
3.2.5.13	Tyramid Signal Amplifikation (TSA, Perkin Elmer).....	52
3.2.5.14	Mikroskopie.....	52
3.2.5.14.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	52
3.2.5.14.2	Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	53
3.2.6	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	54
3.2.6.1	Fliegenzucht.....	54
3.2.6.2	Absammeln von Embryonen.....	54
3.2.6.3	Absammeln von virginellen Weibchen für anschließende Kreuzungen.....	55
3.2.6.4	Balancierung.....	55
3.2.6.5	Keimbahntransformation.....	56
3.2.6.6	Letalitätsanalyse.....	57
3.2.6.7	MARCM.....	58
3.2.6.8	Kreuzung für den Rettungsansatz.....	59
3.2.6.9	Rekombination.....	60

3.2.6.10	Selektion von Mutanten durch ein fluoreszenzmarkiertes Balancerchromosom	60
3.2.6.11	UAS-Gal4-System	61
4. Ergebnisse		
4.1	Hbn zeigt ein dynamisches Muster in der embryonalen Kopfregeion	62
4.2	Hbn wird in verschiedenen Arealen des supraoesophagealen Ganglion exprimiert	66
4.3	Hbn wird in NB, GMC und Neuronen, jedoch nicht in Gliazellen exprimiert	68
4.4	Kartierung der Hbn-Expression im Vergleich zu Faktoren des RDGN und Drx	71
4.5	Vergleich der Hbn-Expression mit den FasziklinII-positiven <i>ftfc</i> des embryonalen Gehirns	73
4.6	Übersicht zur Kommissurbildung	75
4.7	Darstellung der Mittellinienvorsprünge und der anschließenden Kommissurknüpfung	79
4.8	Lage der Hbn-positiven Pionierneurone im Vergleich zu Gliazellen	81
4.9	Analyse des <i>hbn</i> ¹⁵²²⁷ - und <i>hbn</i> ⁴⁰²⁸ -Gehirnphänotyps	82
4.9.1	<i>Hbn</i> -Phänotyp mit schwerer Ausprägung	83
4.9.2	<i>Hbn</i> -Phänotyp mit schwachem Kommissurdefekt bzw. fusionierten Hemisphären	86
4.10	<i>Hbn</i> -Mutanten zeigen einen Verlust des Pilzkörpers	89
4.11	<i>Hbn</i> -Mutanten zeigen eine frühe Entstehung der protocerebralen Ablation	90
4.12	Analyse der Ursachen für den Verlust protocerebraler Lineages in <i>hbn</i> -Mutanten	92
4.12.1	Untersuchung zur Bildung des frühen, blastodermalen Hbn- Expressionsstreifens in der <i>hbn</i> ⁴⁰²⁸ -Mutante	93
4.12.2	Untersuchungen zur Proliferation von Hbn-positiven, neuronalen Zellen mit anti-pH3	94
4.12.3	<i>Hbn</i> -Mutanten zeigen Apoptose im Bereich des sich entwickelnden Protocerebrums	96
4.13	Rettungs-Experimente mit <i>hbn</i> -spezifischen P[acman]-Konstrukten	98
4.14	Untersuchungen zur dorso-medialen Expression von Drx und Hbn im embryonalen Gehirn	101
4.15	Zusammenfassung der embryonalen Ergebnisse	104
4.16	Expression und Funktion von Drx und Hbn in der larvalen Gehirnentwicklung	106
4.17	Drx und Hbn zeigen larval ein ähnliches Expressionsmuster	106
4.18	Regionsspezifische Expressionsanalyse dorso-medialer Lineages	108
4.19	DM-spezifische Koloalokalisation der 57B-TF	111

4.20	Vergleiche der Drx/Hbn-Expression mit spezifischen Treiberlinien der DM-Lineages.....	113
4.21	Expression von Drx und Hbn in dorso-lateralen Typ-II-NB-Lineages.....	116
4.22	Zelltypanalysen der Drx- und Hbn-positiven DM-Expression.....	117
4.23	Untersuchung mutanter DM-MARCM-Klone der 57B-TF Drx und Hbn.....	119
4.24	Vergleich der Drx- und Hbn-Expression mit definierten Timing-Faktoren der DM-Lineages.....	122
4.25	Detaillierte Analysen zur DM-Drx-Expression und Überexpression von Drx in der DM-Stammzellregion.....	125
4.26	Drx wird neben PK-NB in weiteren Typ-I-NB exprimiert.....	128
4.27	Untersuchung zur Drx/Hbn-DM-Expression im Vergleich zu R45F08Gal4.....	129
4.28	Allgemeine Expressionsanalyse von Drx und Hbn in der larvalen optischen Lobe.....	131
4.29	Drx und Hbn zeigen Kolokalisation in der Medulla und dem Lobula Komplex, jedoch keine Expression in der Lamina der OL.....	137
4.30	Vergleich der Drx/Hbn-Expression im Lobula Plug untereinander und mit weiteren Markern.....	138
4.31	Zelltypanalyse Drx- und Hbn-exprimierender Zellen der optischen Medulla.....	142
4.32	Einordnung von Hbn-positiven Medulla-NB in die Timing-Serie der Medulla.....	144
4.33	Einordnung der Hbn-positiven Medulla-Neurone im Vergleich zu anderen Faktoren.....	145
4.34	Vergleich der Hbn-Expression mit den konzentrischen Zonen der Medulla.....	148
4.35	Drx und Hbn werden in larvalen PK-NB und deren GMC exprimiert.....	151
4.36	Kolokalisationsstudien von Drx und Hbn in ventralen Typ-I-Lineages des CB.....	153
4.37	Zusammenfassung der larvalen Untersuchungen.....	155

5. Diskussion

5.1	Die Funktion von <i>hbn</i> in der Entwicklung des embryonalen Protocerebrums.....	157
5.2	Die Entstehung der präoralen Hirnkommissur.....	160
5.3	Vergleich der Funktion von <i>hbn</i> mit Kopflückengenen.....	168
5.4	Die Funktion von <i>drx</i> und <i>hbn</i> in den Typ-II-Lineages des larvalen Gehirns.....	171
5.5	Die Funktion von <i>drx</i> und <i>hbn</i> in der larvalen optischen Lobe.....	179
5.5.1	Die optische Medulla.....	179
5.5.2	Der Lobula Komplex.....	185

5.6	Die Expression von Drx und Hbn in Typ-I-Lineages im Vergleich zu den Typ-II-Lineages.....	186
5.7	Ausblick.....	188
6.	Literaturverzeichnis.....	191
7.	Anhang.....	208
8.	Danksagung.....	218
9.	Lebenslauf.....	219

1. Zusammenfassung

1.1 Untersuchungen zur Expression und Funktion der Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren *Drosophila* retinales Homeoboxgen und Homeobrain in der Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*

Dieser Untersuchung des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors Homeobrain (Hbn) in der embryonalen Nervensystementwicklung von *Drosophila melanogaster* lag eine vorangegangene Arbeit zu Grunde, in der eine Beteiligung bei der Ausbildung des Protocerebrums und der präoralen Hirnkommissur des supraoesophagealen Ganglions ermittelt wurde. Dafür standen *hbn*-Mutanten zur Verfügung, die durch den Verlust protocerebraler Strukturen und der präoralen Hirnkommissur charakterisiert sind. Die Expression von *hbn* konnte dabei in Stammzellen und Neuronen des embryonalen Gehirns nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass Hbn-positive Gründerzellen eine interhemisphärische Brücke bilden, die ihrerseits den Vorläufer der präoralen Hirnkommissur darstellt (Dissertation Petra Kaspar, 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnten weitere Aspekte bezüglich der Funktion von Hbn während der embryonalen Gehirnentwicklung aufgedeckt werden. Der Verlust einer großen Zahl protocerebraler Lineages in mutanten Tieren konnte durch das frühe Auftreten von Apoptose während der Hemisphärenbildung erklärt werden. Ferner konnte im Verlauf der Gehirnentwicklung wildtypisch im Bereich der anterioren Spitze der Neuraxis, die der protocerebralen Wachstumszone entspricht, starke Proliferation Hbn-positiver, kortikaler Zellen gefunden werden. Weiterhin stellte sich heraus, dass der Pilzkörper, der im anterioren Protocerebrum liegt, in der Mutante nicht gebildet wird. Im Wildtyp kommt es zur Expression von Hbn in allen Pilzkörperneuroblasten, wie sie bereits in der Literatur für das im 57B-Gencluster benachbarte Gen *Drosophila* retinales Homeoboxgen (*drx*) beschrieben wurde. Die Bildung der präoralen Hirnkommissur konnte durch hochauflösende, konfokale Mikroskopie und zusätzlich erweitert um einen Marker, der auch Hbn-negative Kommissuranteile visualisiert, eingehender beschrieben werden. Dabei stellte sich heraus, dass nicht die Hbn-positiven Pionierneurone und deren Wachstumskegel zur Knüpfung der interhemisphärischen Brücke beitragen, sondern andere Axontrakte eine Rolle spielen. Zudem wurde die Expression des Faktors am Ende der embryonalen Gehirnentwicklung eingehend untersucht und mit weiteren Transkriptionsfaktoren, die eine ähnliche Expression aufweisen, verglichen. Dabei zeigte Hbn eine weitere Region gemeinsamer Expression mit

Drx im Bereich der dorso-medialen-Lineages. Diese Koexpression wurde durch molekulare Marker der dorso-medialen-Region weitergehend charakterisiert.

In der larvalen Gehirnentwicklung konnte die Expression von Drx und Hbn weiterhin gemeinsam in den dorso-medialen-Lineages beobachtet werden. Dabei wurde die Expression von Hbn in intermediären neuronalen Vorläuferzellen, die von den Stammzellen der larvalen, dorso-medialen Lineages zur Vergrößerung der Zellzahl gebildet werden, detektiert. Diese besitzen ein hohes Teilungspotential und durchlaufen eine strikte Reihenfolge Transkriptionsfaktor-vermittelter, zeitlicher Identitäten - also eine zeitliche Musterbildung. Hbn wird dabei überlappend mit Eyeless, dem dritten und letzten Faktor der zeitlichen Musterbildung, exprimiert. Im Unterschied zu den Faktoren der Timing-Serie, die in diesen Vorläuferzellen exklusiv exprimiert werden, zeigt Hbn zusätzlich eine Expression in medialen Neuronen der dorso-medialen-Lineages. Drx wird in den dorso-medialen-Lineages mit Überlappung zu Hbn vorgefunden und zeigt eine Expression vom Ende des Stammzellbereichs bis in distalste Neurone der Lineages. Ein weiteres Feld mit stammzellspezifischer Expression dieser Faktoren in larvalen Geweben zeigte sich in der optischen Medulla, wo beide Faktoren in Neuroblasten exprimiert werden: Drx in den sogenannten dorsalen Spitzen der Medulla und Hbn in einem konzentrischen Band aus Neuroblasten. In diesem Bereich konnte Hbn ebenfalls mit der dortigen zeitlichen Musterbildung in Zusammenhang gebracht werden. Die Hbn-Expression liegt hier im Übergangsbereich von Homothorax, dem ersten Timingfaktor, zu Eyeless, dem zweiten, vor. Auch in der optischen Lobe zeigt Hbn einen Unterschied zu den übrigen Timing-Faktoren, da aus den Hbn-positiven Neuroblasten keine Neurone hervorgehen. Hbn-positive Neurone werden jeweils in einem früheren und späteren Zeitfenster der Timing-Serie, jedoch nicht durch Hbn-markierte Stammzellen selbst, gebildet. Die Analysen zeigten, dass die beiden gebildeten Neuronenpools zum einen früh während der Homothorax- und später während der Dichaete-markierten Phase entstehen. Neben der optischen Medulla konnte auch in der Lobula, besonders im Lobula Plug, eine Expression der beiden Homeodomänen Transkriptionsfaktoren beobachtet werden, die ähnlich wie in den dorso-medialen-Lineages eine strikte räumliche Grenze mit überlappender Expression zeigt. Auch hier wurde eine gemeinsame Expression im zugehörigen Stammzellareal detektiert. Eine letzte Gemeinsamkeit der Faktoren wurde larval im Pilzkörper gefunden. Hier werden beide in allen Neuroblasten exprimiert, Hbn jedoch etwas schwächer als Drx. Auch in den

Progenitorzellen konnte eine Expression beider Faktoren beobachtet werden, wobei Drx in einer größeren Anzahl von Zellen vorgefunden wird.

Summary

1.2 Analysis of the expression and function of the homeodomain transcription factors *Drosophila* retinal homeobox and Homeobrain in the brain development of *Drosophila melanogaster*

The analysis of the homeodomain transcriptional factor Homeobrain (Hbn) in the embryonic nervous system development of *Drosophila melanogaster* is based on a previous thesis. There an involvement of Hbn in the development of the protocerebrum and the protocerebral commissure in the embryonic brain was determined. *Hbn*-mutants contributed to this analysis and exhibited the absence of protocerebral structures and the loss of the preoral brain commissure. The expression of *hbn* was both found in stem cells of the embryonic brain and in neurons. It was shown that Hbn-positive pioneer cells set up an interhemispheric bridge, which represents the precursor of the preoral brain commissure (Thesis Petra Kaspar, 2008).

In the current thesis further aspects regarding the function of Hbn during the embryonic brain development were discovered. The deletion of a vast number of protocerebral lineages in mutant animals could be explained by the occurrence of early apoptosis during the development of the hemispheres. Additionally, strong proliferation of Hbn-positive precursor cells in the wild type brains was detected in the anterior tip of the neuraxis, the proliferational center of the protocerebrum. It was also found that the Mushroom body, which is situated in the anterior protocerebrum, is not established in *hbn*-mutant brains. In wild-type embryos the expression of Hbn was detected in all Mushroom body neuroblasts, as described in the literature for the neighboring gene in the 57B-genecluster *Drosophila Retinal Homeobox (drx)*. The building of the preoral brain commissure was further analyzed by high-resolution confocal microscopy and extended by the use of an additional marker for Hbn-negative commissural parts. Hereby it could be concluded that the interhemispheric bridge is not set up by the Hbn-positive pioneering tracts themselves but by other axon tracts which play a crucial role. Moreover the expression of Hbn at the end of the embryonic brain development was analyzed in detail and compared with other transcriptional factors showing a similar expression pattern. Thereby a domain of strong co-localization with the

expression of Drx was found in embryonic dorso-medial-lineages and has been characterized by molecular markers for this specific domain.

In the larval stage of *Drosophila* brain development Drx and Hbn are both expressed in dorso-medial-lineages. Here, the expression of Hbn was detected in intermediate neuronal precursor cells, which descend from the respective lineage stem cells and multiply the number of cells found in dorso-medial-lineages through extensive proliferational behaviour. The intermediate neuronal precursors exhibit a specific expression of a series of transcriptional activators defining their temporal identity. Against this background Hbn is expressed overlapping with the third and last member of the series, Eyeless. In contrast to the members of this timing-series, which are exclusively expressed in the intermediate precursors, Hbn is also expressed in medially situated neurons of these lineages. Drx is expressed adjacent to the stem cell area with co-localization to Hbn in numerous neurons up to the distal end of the lineages. Another zone of stem cells expression in the larval brain is found in the optic medulla, where Drx is expressed in neuroblasts of the dorsal tips of the optic medulla and Hbn in a concentric band of neuroblasts all over the medulla cortex. Hbn expression could also be linked to the local timing-series in the medulla cortex and is expressed in a transient period defined by Homothorax, the first, and Eyeless the second member of this timing-series. In the optic medulla Hbn again shows a difference compared with the other timing factors. The Hbn-positive neurons derive either from an earlier or a later timing-zone but never from Hbn-positive neuroblasts themselves. The analysis discovered that the Hbn-positive pools of neurons are born within the Homothorax- and later during the Dichaete-tagged timing-period. In addition to the optic medulla, both the lobula, and in particular the lobula plug exhibited the expression of Drx and Hbn in a pattern with a confined distribution and areas of co-localization, similar to the dorso-medial-lineages. The expression could as well be found in the stem cell center of the lobula. Another commonality of the factors was found in the larval Mushroom body. Both factors are expressed in all neuroblasts, yet Hbn showed a lower level of expression than Drx. The expression was also observed in the progenitor cells; however, Drx expression occurred in a larger number of cells.

2. Einleitung

2.1 *Drosophila* als Modellorganismus in der neurowissenschaftlichen Forschung

Drosophila melanogaster zählt zu den am besten untersuchten Organismen und wird in zahlreichen Forschungsgebieten als Modellorganismus eingesetzt; erstmals 1910 durch Thomas Hunt Morgan zum Zwecke der genetischen Forschung, womit er die Verbreitung der Taufliege als Modellorganismus der klassischen Genetik begründete. Die Vorzüge von *Drosophila* liegen in der kurzen Generationszeit, den Haltungseigenschaften und der Zugänglichkeit des biologischen Gewebes. Besonders für die Erforschung des Nervensystems sprechen die genetische Manipulierbarkeit und die einfache Präparation des Nervensystems, insbesondere des Gehirns, in allen Entwicklungsstadien (Abb.2.1,A). Gerade in den letzten zehn Jahren konnte anhand der Fliege eine Fülle von Erkenntnissen gewonnen werden, die sich im Anschluss ebenso als geltende Prinzipien bei der Bildung des Gehirns der Maus herausstellten (Brand und Livesey, 2011). Aus diesem Grund kann *Drosophila* weiterhin als uneingeschränkter Modellorganismus gelten, der die Möglichkeit zur Untersuchung entwicklungspezifischer, neuronaler Vorgänge auf Einzelzellniveau und mit der Möglichkeit zur Veränderung auf Ebene der Gene bietet. Das Nervensystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* wird allgemein untergliedert in Gehirn, ventrales Nervensystem (VNS) und peripheres Nervensystem. Bezüglich des Gehirns können strukturelle und anatomische Vergleiche zu den Gehirnen der Säuger (Abb.2.1,B) und somit auch zum Gehirn des Menschen hergestellt werden, was *Drosophila* zu einem adäquaten Modellsystem macht, um die Entwicklung des Nervensystems von Beginn an zu untersuchen (Reichert, 2005). Über strukturellen Ähnlichkeiten stehen die molekularen Homologien, da häufig Proteine mit evolutionärer Konservierung an der embryonalen Nervensystem-Entwicklung der verschiedenen Spezies beteiligt sind (Reichert, 2005; Lichtneckert und Reichert, 2005).

Die Nervensystem-Entwicklung von *Drosophila* vollzieht sich über die gesamte Entwicklungszeit bis hin zum adulten Tier. In der embryonalen Entwicklung beginnt die Bildung aus dem ektodermalen Keimblatt bis hin zum embryonalen Zentralnervensystem (ZNS), welches sich in der larvalen und puppalen Phase zum adulten ZNS weiterentwickelt (Abb.2.1,A). Man teilt die Nervensystembildung von *Drosophila* daher global in drei Hauptetappen ein. Diese stellen die embryonale Phase mit Entwicklungsstadium (ES) 9-17, die drei larvalen Phasen L1-L3 und die puppale Phase dar (Abb.2.1,A).

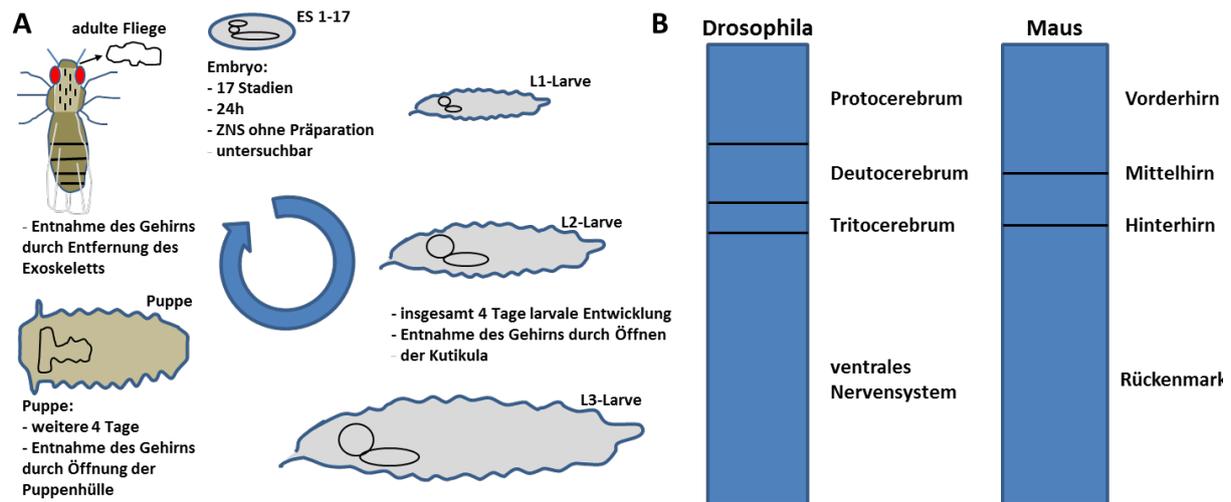


Abb.2.1: Schematische Darstellung des *Drosophila*-Lebenszyklus und Vergleich *Drosophila*/Maus-Gehirn. (A) Darstellung des Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster* mit Darstellung des Nervensystems in den verschiedenen Entwicklungsstadien: Embryo, Larve, Puppe, adulte Fliege. Angegeben sind die Dauer der Stadien, die Lokalisation sowie Präparationsart des Nervensystems. (B) Schematische Gegenüberstellung der Gliederung der Gehirne der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Maus *Mus musculus*.

2.2 Die embryonale Gehirn- und Nervensystementwicklung von *Drosophila*

Die Entwicklung eines jeden Organismus ist reguliert durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren (TF) und anderer Proteine sowie deren Interaktion, die zu einer differentiellen Genexpression im Organismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an unterschiedlichen Orten führt. Gerade in *Drosophila* konnten mehrere, in der Embryonalentwicklung zeitlich aufeinander folgende Gengruppen gefunden und hinsichtlich ihrer entwicklungsspezifischen Funktion untersucht werden. Die ersten Faktoren in der zeitlichen Reihenfolge der Expression werden von den maternalen Genen codiert, die in vier Systemen vorliegen. Darunter fallen das anteriore, posteriore, terminale und dorso-ventrale System (Driever und Nüsslein-Volhardt 1988a, b; Hülskamp und Tautz, 1991; Ingham, 1988; Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Diese Faktoren bilden nach Ablagerung im fertilisierten Ei Gradienten entlang der Achsen des Eis. In Abhängigkeit von der Konzentration dieser Gradienten wird die Expression verschiedener Lückengene, die das darauf folgende System darstellen, in breiten Streifen aktiviert (Hülskamp und Tautz, 1991). Diese Gene wiederum bedingen die Expression der Paarregelgene in einem Sieben-Streifen-Muster, was einer Expression in jeder zweiten Segmentanlage bzw. jedem Parasegment entspricht (Small und Levine, 1991) und darauf folgend in jedem Segment die Expression von Segmentpolaritätsgenen bedingt (Ingham, 1991). Die Identität eines jeden Segments wird durch homeotische Gene bestimmt, die ihrerseits wiederum durch die Expression von Lückengenen und Paarregelgenen reguliert werden (McGinnis und Krumlauf, 1992). Alle

genannten Gengruppen sind auch an der Entstehung der Kopfreion beteiligt und spielen ebenfalls eine Rolle in der Entwicklung des komplexesten Organs, das in dieser Region ausgebildet wird, nämlich des embryonalen Gehirns. Die embryonale Kopfreion umfasst jeweils drei anterior gelegene, cephal und drei posteriore, gnathale Segmente. Diese sind das labrale, antennale und intercalare Segment sowie das mandibulare, maxillare und labiale Segment. Hierzu gehört weiterhin noch die Acron genannte anteriore, procephale Region (Cohen und Jürgens, 1990; Rempel 1975; Rogers und Kaufmann, 1996; Schmidt-Ott und Technau, 1992). Die embryonale Koprentwicklung steht unter der Kontrolle dreier maternalen Systeme: anterior, terminal und dorso-ventral. Diese Systeme regulieren die Expression von sogenannten Kopflückengenen (KLG). Dazu gehören *tailless (tll)*, *orthodenticle (otd)*, *empty spiracles (ems)*, *buttonhead (btd)*, und *sloppy paired (slp)* (Cohen und Jürgens, 1991; Finkelstein und Perrimon, 1990; Gao et al., 1996; Grossniklaus et al., 1994). Während der frühen Embryonalentwicklung, genauer im zellulären Blastodermstadium, was einem Embryo mit nur einer äußeren Zellschicht entspricht, werden die Kopflückengene in einem anterioren, die dorsale Seite umspannenden Streifen bzw. Ring exprimiert. Die Lokalisation dieser Streifen umfasst die cephalen Segmente (Schmidt-Ott und Technau, 1994). Namengebend für diese besondere Klasse von entwicklungspezifischen Genen ist der Phänotyp der Mutanten. Mutationen dieser Gene zeigen einen lückenartigen Phänotyp, der mehrere benachbarte Segmente betrifft und meist zum Fehlen von kutikulären Strukturen der Larve führt. Darüber hinaus sind das Fehlen von sensorischen Organen und der Verlust von segmentalen Markern wie *Engrailed (En)* und *Wingless (Wg)* in den jeweils betroffenen Segmenten des Embryos bekannt (Cohen und Jürgens, 1990; Grossniklaus et al., 1994; Schmidt-Ott et al., 1994). *Wg* zeichnet sich unter den Segmentpolaritätsgenen ebenfalls durch eine gehirnständige Expression aus, wie es auch für *en* beschrieben wurde (Schmidt-Ott und Technau, 1992). Im Unterschied zu den klassischen Lückengenen, die eine klar abgegrenzte Expression und gegenseitige Regulation aufweisen (Pankratz und Jäckle, 1993), zeigen die Kopflückengene eine überlappende Expression ihrer anterior-dorsalen Streifen, jedoch ohne eine gegenseitige Regulation (Cohen und Jürgens, 1990; Gao et al., 1996). Die zuletzt genannte Gruppe der homeotischen Gene steht ebenso in Zusammenhang mit der Entwicklung des embryonalen Gehirns. So finden sich bei *labial-* und *Deformed-*Mutationen Veränderungen des embryonalen Gehirns. Hier werden zwar neuronale Zellen gebildet, jedoch keine Axonfaszikel beobachtet (Hirth et al., 1998).

Einen der ersten Schritte in der Regionalisierung und Festlegung des Gehirns stellt die Anlage des cephalen Neuroektoderms dar (Abb.2.2,A,B). Um dieses zu bilden, werden proneurale Gene exprimiert. Deren Produkte sind die basischen Helix-Loop-Helix-Proteine Acheate, Scute, Lethal of scute, Asense und Daughterless (Skeath and Carroll, 1994; Younossi-Hartenstein et al., 1996). Alle Zellen, die diese proneuralen Faktoren exprimieren, erhalten dadurch die Fähigkeit, neuronale Stammzellen zu bilden. Letztere werden allgemein als **Neuroblasten (NB)** (Abb.2.2,B, weiße Pfeile) bezeichnet und bilden die Progenitorzellen des Nervensystems, welche als Ganglionmutterzellen (**ganglion mother cells; GMC**) bezeichnet werden. Um die einzelnen NB aus der proneuralen Region zu bestimmen, kommt ein komplexer Mechanismus zum Einsatz, der als laterale Inhibition bekannt ist. Da alle Zellen der neuroektodermalen Region die Fähigkeit zur Bildung eines NB erhalten, aber nicht alle dieses Schicksal aufweisen (ein gewisser Teil bildet die Epidermis), muss eine Auswahl zwischen NB und Zellen der Epidermis stattfinden. Der lateralen Inhibition dienen die Gene *Notch* und *Delta* sowie *Enhancer of split* zur Selektion von NB aus dem Pool von Neuroepithelzellen (Artavanis-Tsakonas et al., 1990; Campos-Ortega, 1995; Fernandes et al., 2014; Ghysen et al., 1993; Kunisch et al., 1994). Wurde ein NB definiert, so verlässt er das Epithel durch Delamination (Abb.2.2,C) und beginnt den Aufbau von neuronalen Zellen, einer sog. Lineage, durch selbstregenerative, asymmetrische Teilung (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Die Identität und neuronale Entwicklung des NB und seiner Nachfolgezellen werden durch weitere neuronale Differenzierungsgene wie *deadpan (dpn)*, *asense (ase)* und *prospero (pros)* bestimmt (Bier et al., 1992; Doe et al., 1991; Dominguez und Campuzano, 1993; González et al., 1989; Jarman et al., 1993). Während der embryonalen Entwicklung finden insgesamt vier Runden von Neuroblastendelamination in der procephalen Region zwischen Embryonalstadium 9 und 12 statt (Abb.2.2,A). Insgesamt lassen sich etwa 100 Neuroblasten im sogenannten **procephalen Neuroektoderm (PNE)** detektieren (Abb.2.2,B), die zur Bildung des embryonalen Gehirns beitragen (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach und Technau, 2003). Alle diese Neuroblasten konnten anhand ihrer differentiellen Genexpression und Lokalisation im PNE identifiziert werden (Urbach und Technau, 2003). Die Teilung eines NB resultiert in der Bildung einer kleineren GMC und eines größeren, regenerierten NB als Folge der asymmetrischen Zellteilung (Abb.2.2,C). Die GMC sammeln sich unterhalb des Neuroblasten und bilden somit einen Pool von in das zukünftige Gehirn reichenden Neuronen (Doe et al., 1985) (Abb.2.2,C). Erstere

teilen sich terminal in zwei Neurone des embryonalen Gehirns, die fortan als primäre Neurone bezeichnet werden. Diese bilden einen primären Axontrakt im embryonalen Gehirn und führen durch synaptische Verknüpfung im **Neuropil (NP)**, dem differenzierten, neuronalen Bereich des Gehirns, zur Erstellung der larvalen Gehirnfunktion (Larsen et al. 2009; Spindler und Hartenstein, 2010; Younossi-Hartenstein et al., 2006).

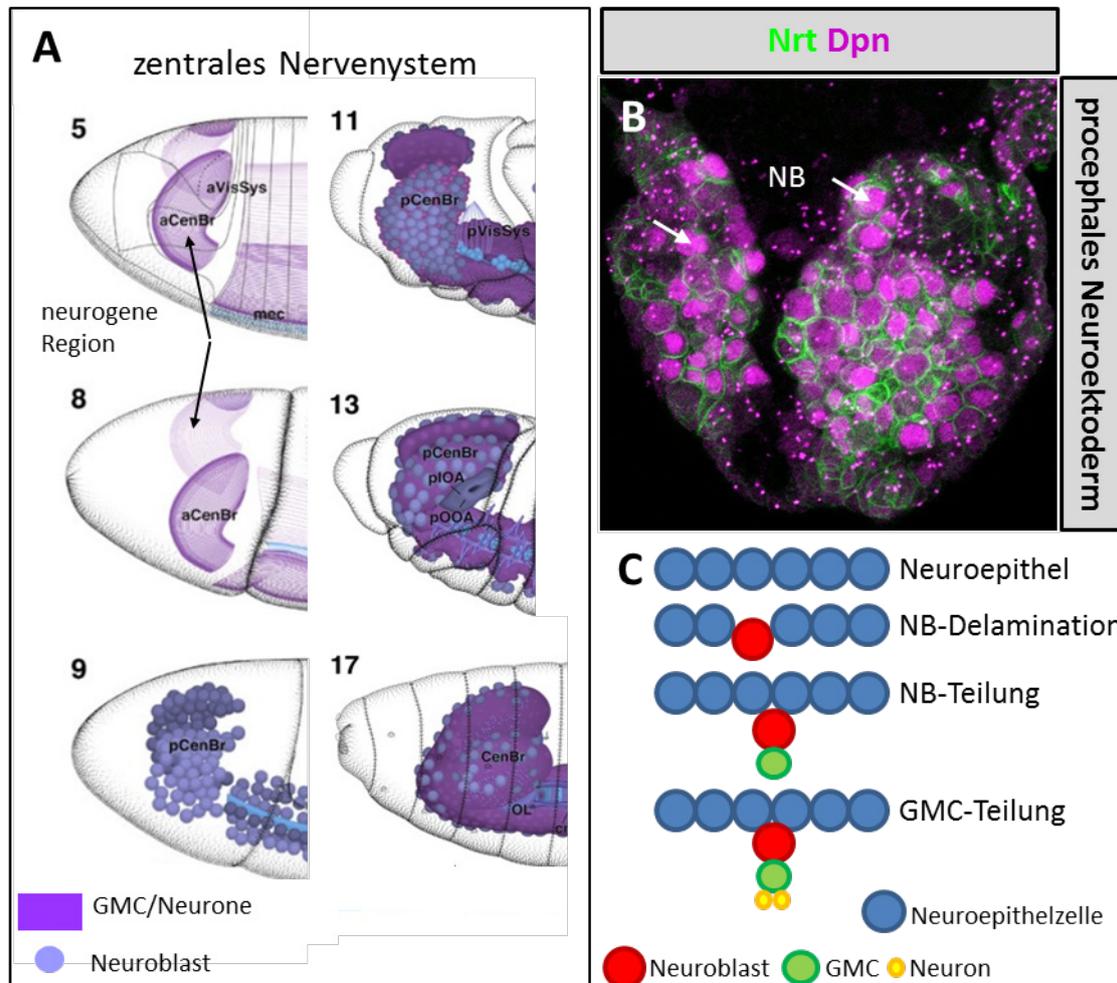


Abb.2.2: Darstellung der Neurogenese, Deadpan als NB-Marker und NB-Delamination. (A) Zahlen in oberer, linker Ecke zeigen das Embryonalstadium an. Hellrosa Bereich zeigt die neurogene Region, blaue Kreise die delaminierten NB und dunkellilafarbener Bereich die von NB gebildeten Progenitorzellen, die GMC und Neurone an. Schematische Darstellung der Neurogenese im Embryo mit Anzeichnung des Neuroektoderms bis zur Neuroblastendelamination in ES 9. Schematische Darstellung der Gehirnentwicklung in ES 11-17. (B) Konfokale Aufnahme in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) von *yw*-Embryonen in ES 9 mit anti-Dpn- und -Nrt-Färbung (Marker des Nervensystems), die die delaminierten Neuroblasten im procephalen Neuroektoderm zeigen, vgl. Abb.2.3,A, ES 9. (C) Schematische Darstellung der Neuroblastendelamination und Beginn der Proliferation zur Bildung des Nervensystems. (A: Hartenstein, 1993).

Das embryonale Gehirn von *Drosophila* besteht aus zwei **Ganglien**, dem **suboesophagealen (SOG)** und dem **supraoesophagealen (SAG)** (Hanström, 1928; Holmgren, 1916; Bullock und Horridge, 1965), die jeweils in drei Neuomere gegliedert sind. Für das suboesophageale Ganglion sind diese das mandibulare, maxillare und labiale Neuomer. Beim supraoesophagealen Ganglion finden wir das protocerebrale (B1), deutocerebrale (B2) und

tritocerebrale Neuomer (B3), welche das Gehirn somit in **Protocerebrum (PC)**, **Deutocerebrum (DC)** und **Tritocerebrum (TC)** unterteilen (Abb.2.3,A,B). Diese Strukturen entstehen lokal aus dem Labrum/Acron (PC), dem antennalen (DC) und dem interkalaren Segment (TC) und sind direkt mit denen der Säugergerirne vergleichbar; d.h. Vorder-, Mittel- und Hinterhirn der Maus sind analoge Strukturen (Abb.2.1,B). Eine etablierte Methode, die Neuomergrenzen in embryonalen *Drosophila*-Gehirnen aufzuzeigen, ist die Visualisierung der Engrailed-Expression. En wird an den Neuomergrenzen in klar definierten Zellstreifen exprimiert (Abb.2.3,A,B) und dient somit ebenfalls der Identifizierung von fehlenden Neuomeren in Mutanten mit Aberrationen im Gehirn (Hirth et al., 1995).

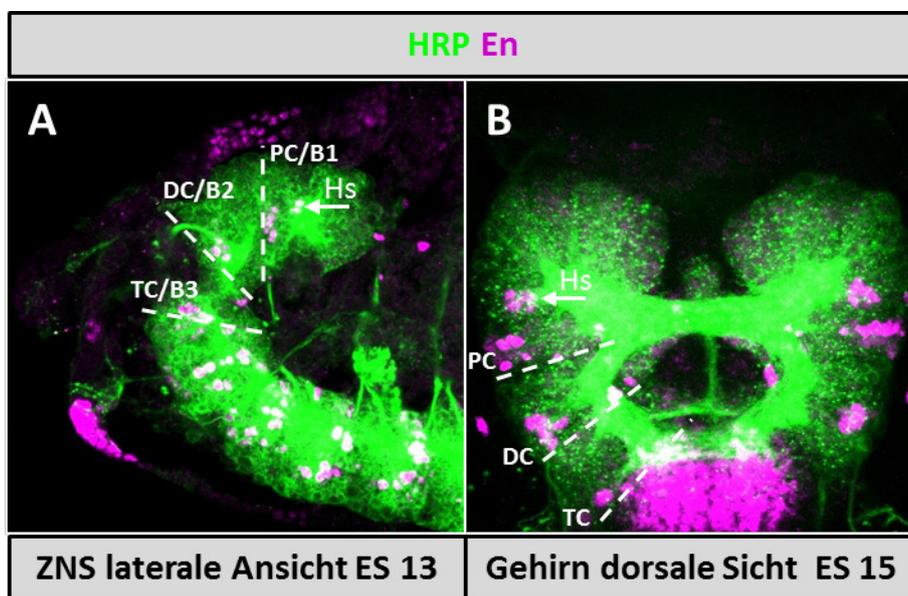
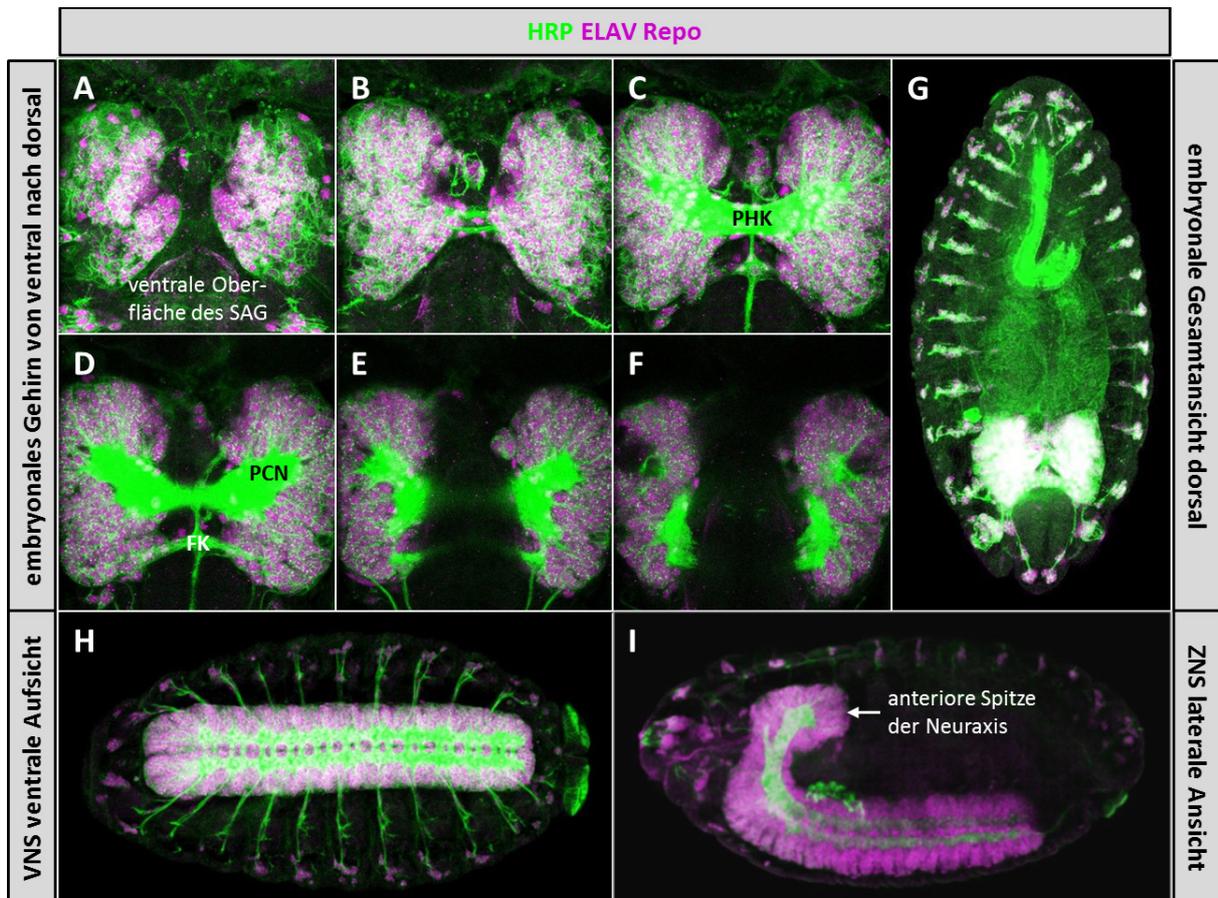


Abb.2.3: Engrailed als Marker der Neuomergrenzen des Gehirns. Konfokale Aufnahme (A) des sich entwickelnden Gehirns (ES 13) in lateraler Ansicht und (B) des entwickelten Gehirns (ES 15) in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) mit anti-En- und -HRP-Färbung. En-Muster zeigt die Neuomergrenzen des Gehirns auf (gestrichelte, weiße Linien, PC/B1-TC/B3), weißer Pfeil zeigt den sog. En-Headspot (Hs) des PC an.

Kurz nach Bildung der Neurone entstehen, ausgehend von sog. Pionierneuronen, die ersten Axonfaszikel (Pioniertrakte), die eine Art Gerüst des frühen Gehirns darstellen, an dem entlang andere Axone faszikulieren. Auf diesem Weg entstehen die ersten Kommissuren und longitudinalen Trakte als Verbindungsglieder der Neuomere des embryonalen Gehirns (Therianos et al., 1995). Ein besonderes Merkmal der Gehirnbildung in Insekten ist die Tatsache, dass sich das entwickelnde Gehirn um das einwachsende Darmrohr ausbildet, die Trakte also um das Darmrohr herum wachsen müssen. Hier ist zu erwähnen, dass sowohl gliale Strukturen als auch das Darmrohr selbst als spezifische Orientierungssubstrate für die Faszikel dienen (Page, 2002; Wildemann et al., 1997). In diesem Zusammenhang werden zwei longitudinale Haupttrakte neben den drei die Hirnneuomere verknüpfenden

Kommissuren gebildet. Jedes Neuromer des supraoesophagealen Ganglions trägt eine eigene Kommissur: im Protocerebrum wird die präorale Hirnkommissur (PHK) (Abb.2.4,C), im Deutocerebrum die Frontalkommissur (FK) (Abb.2.4,D) und schließlich im Tritocerebrum die tritocerebrale Kommissur (TK) angelegt. Im Protocerebrum fällt besonders der protocerebrale Konnektiv (PCN) auf (Abb.2.4,D), der direkt an die präorale Hirnkommissur angrenzt und nach lateral in die Hemisphäre hineinreicht. In diesen münden die zahlreichen Axonfaszikel, die von den einzelnen im Cortex der Hemisphäre liegenden Lineages ausgesandt werden, um im Neuropil mit ihren Zielzellen eine synaptische Verschaltung einzugehen. Abbildung 2.4 dient zur Orientierung im embryonalen Gehirn und Nervensystem. Dargestellt sind unter anderem die wichtigsten Orientierungspunkte: die anteriore Spitze der Neuraxis (Abb.2.4,I) und die Mittellinie, der zentrale Bereich zwischen den ausgebildeten Hirnhemisphären (Abb.2.4,J), sowie die räumliche Untergliederung des PC (Abb.2.4,J,K) und die in dieser Arbeit verwendete anterior-dorsale und laterale Ausrichtung der Embryonen für die Mikroskopie (Abb.2.4,J,K).



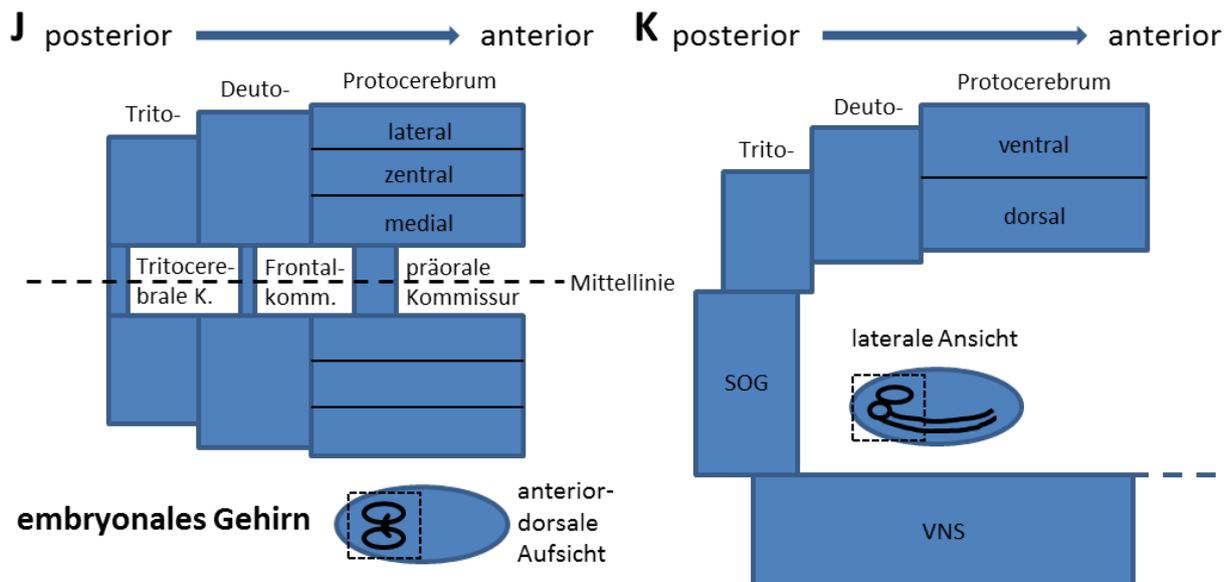


Abb.2.4: Darstellung des embryonalen Nervensystems mit spezifischen Markern. Konfokale Aufnahmen von *yw*-Embryonen in ES 16 (A-F, 63x; G-I, 20x). (A-F) Anterior-dorsale Aufsicht des supraoesophagealen Ganglions in sechs konfokalen Ebenen, Embryo anterior nach unten, (G) dorsale Gesamtaufnahme, Embryo anterior nach unten, (H) ventrale Gesamtaufnahme des Strickleiternnervensystems, Embryo anterior nach links und (I) laterale Gesamtansicht des Nervensystems, Embryo anterior nach links mit anti-ELAV- (Marker für Neurone), anti-HRP- (NS-Marker) und anti-Repo- (Marker für Gliazellen) Färbung. (J) Schematische Darstellung des embryonalen, supraoesophagealen Ganglions mit Benennung der Neuomere: Tritocerebrale K., Deuto- und Protocerebrum sowie der zugehörigen Kommissuren und Anzeichnung der Mittellinie (gestrichelte, schwarze Linie). Untergliederung des Protocerebrums in mediale, zentrale und laterale Areale. Verkleinerte Darstellung zeigt im Ausschnitt anterior-dorsale Aufsicht des supraoesophagealen Ganglions (vgl. A-F). (K) Schematische Darstellung des embryonalen Gehirns und Teil des VNS. Untergliederung der Neuomere sowie Anzeichnung des ventralen und dorsalen Areals des Protocerebrums. Verkleinerte Darstellung zeigt laterale Ansicht des embryonalen Gehirns (vgl. I).

Bezüglich der oben genannten Kopflückengene verbleibt ein wichtiger Aspekt in der Betrachtung Organismen-übergreifender Untersuchungen. Sowohl in *Drosophila* als auch in der Maus zeigen *ems/Emx*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (*wt*) phänotypische Aberrationen im Bereich des Deuto- und Tritocerebrums (Hirth et al., 1995). Im Fall von *otd/Otx*- Mutanten werden Phänotypen des Protocerebrums (Hirth et al., 1995) bzw. des Vorderhirns gefunden (Abb.2.5,A-D). *Otd* und auch *tll*, dessen zugehörige Mutanten sowohl DC als auch PC-Defekte besitzen (Abb.2.5,E,F), zeigen in *Drosophila* eine Expression im PC und anteriorem DC (Hirth et al., 1995; Rudolph et al., 1997), *ems* in DC und TC der embryonalen Gehirnanlage sowie während der Ausbildung des Gehirns (Walldorf und Gehring, 1992; Younossi-Hartenstein et al., 1997). Der Wegfall der Gehirnneuomere basiert auf dem Verlust der proneuralen Genexpression von *lethal of scute (l'sc)*, was zum Ausfall entsprechender NB führt (Younossi-Hartenstein et al., 1997). Im Fall der *wg*-Mutante zeigen späte, embryonale Gehirne ebenfalls einen Verlust protocerebraler Substanz (Richter et al., 1998) (Abb.2.5,G,H).

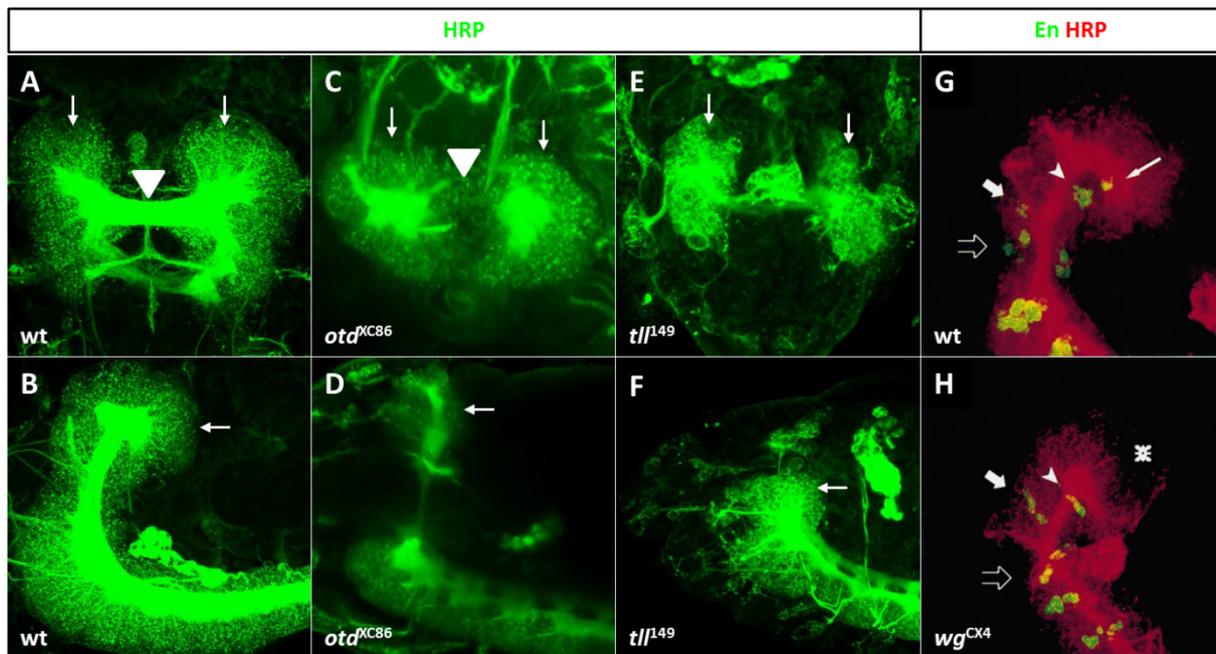


Abb.2.5: Embryonale Gehirnphänotypen von *otd*-, *tll*- und *wg*-Mutanten. Konfokale Aufnahmen (40x) von (A,B) *yw* als Wildtypvergleich in (A) anterior-dorsaler Aufsicht und (B) lateraler Ansicht sowie die Mutanten von (C,D) *otd* und (E,F) *tll* mit anti-HRP-Färbung sowie (G) Oregon R als Wildtypvergleich und (H) *wg*-Mutante in lateraler Aufsicht mit (G,H) anti-En- und -HRP-Färbung, alle Embryonen ES 16: (A,B) Darstellung der wildtypischen Gestalt der Gehirnhemisphären. Weiße Pfeile zeigen auf das vollständige PC, weißes Dreieck zeigt die PHK. (C) Embryonale Gehirne in der *otd*^{XC86}-Mutante zeigen ein vollständig ablatiertes PC (weiße Pfeile) sowie den Verlust der präoralen Hirnkommissur (weißes Dreieck). (E,F) Embryonale Gehirne der *tll*¹⁴⁹-Mutante zeigen vollständigen Verlust des PC und DC (weiße Pfeile). (G) Darstellung zeigt in lateraler Ansicht die Neuromergrenzen des SAG durch anti-En-Färbung (leerer, gefüllter Pfeil und Pfeilspitze) sowie den En-Headspot (weißer Pfeil). (H) Laterale Darstellung eines embryonalen Gehirns in der *wg*^{CX4}-Mutante mit ablatiertem PC (weißer Stern) und Verlust des En-Headspots. (G,H: Richter et al., 1998).

Es besteht die Möglichkeit, diese Defekte mit einem Rettungsansatz mittels der homologen Gene des jeweiligen anderen Organismus zu beheben (Hartmann et al., 2000; Leuzinger et al., 1998). Betrachtet man die Expression gehirnspezifischer Transkriptionsfaktoren in Maus und *Drosophila* vergleichend, so lässt sich ein gemeinsames Muster von TF bestimmter Klassen in drei Teilen des Gehirns ermitteln. In der Fruchtfliege und der Maus werden in anterioren Bereichen des supraoesophagealen Ganglions *otd/Otx* exprimiert, in posterioren Arealen Hox-Gene und in der sog. „midbrain/hindbrain boundary“ wird die Expression von Pax-Genen in beiden Spezies beobachtet. Somit ist für *Drosophila* und Maus eine dreigeteilte Organisation des Gehirns gegeben (Hirth et al., 2003; Reichert, 2005).

2.3 Kommissurbildung im embryonalen Gehirn

Am besten untersucht ist die Bildung der supraoesophagealen- oder auch als präoral-bezeichneten Hirnkommissur. Diese verbindet die beiden Hemisphären des embryonalen Gehirns im Protocerebrum. Bisher konnten drei strukturelle Merkmale mit der Bildung in

Zusammenhang gebracht und visualisiert werden. Es liegt jedoch noch keine detaillierte Betrachtung der Vorgänge während der Gehirnentwicklung vor. Das erste Anzeichen für ihre Bildung ist der Aufbau von zellulären Vorsprüngen im posterioren Bereich der frühen embryonalen Gehirnhemisphären in ES 12 (Abb.2.6,I, weiße Pfeile). Diese zur Mittellinie ausgerichteten Fortsätze des neuronalen Gewebes erweitern sich hin zum Zentrum der Mittellinie, wo sie sich schließlich treffen. Resultat dieser Strukturbildung ist eine zelluläre Brücke aus neuronalen Zellen und axonalen Faszikeln (Abb.2.6,II, weißer Pfeil), die auch von Gliazellen begleitet wird (Therianos et al., 1995). Diese Brücke wird im Laufe der Embryonalentwicklung zu einer massiven Brücke aus Axonen erweitert (Abb.2.6,III, weißer Pfeil). Maßgeblich für die Ausbildung der Kommissur erscheinen sogenannte **fibre tract founder cluster (ftfc)**. Dies sind durch den axonalen Marker **FasziklinII (FasII)** identifizierbare Pionierneurone, die einen der Zellbrücke zugrundeliegenden Aufbau über die Mittellinie zeigen. In diesem Zusammenhang sind besonders die P2m- und P2l- sowie P4m-Gründer und der D/T-Trakt zu nennen (Abb.2.6,A), da sie alle zur Etablierung der drei FasII-positiven Faszikel der präoralen Hirnkommissur beitragen, die in zwei dorsale (**dorsal commissural tract, DCT**) und einen ventralen (**VCT**) Trakt gegliedert sind (Abb.2.6,B). In ES 12 erscheinen analog zu den HRP-positiven, zellulären Vorsprüngen stark FasII-positive Zellen zu jeder Seite der Hemisphäre auf Höhe der posterioren Kante des entstehenden Gehirns zur Mittellinie weisend. Im Verlauf der Entwicklung wird eine Verknüpfung dieser P2m-Gründer in der Mittellinie festgestellt und ein sukzessives weiteres Einwachsen der Trakte der P2l- und D/T- sowie P4-Gründercluster (Nassif et al., 1998). Neben dem totalen Verlust der Kommissur durch Mutationen von *otd* oder *tll*, die das gesamte protocerebrale Neuromer betreffen (Younossi-Hartenstein et al., 1997), gibt es auch bekannte Mutationen, die Phänotypen der präoralen Hirnkommissur zeigen. Dazu gehören *commissureless (comm)* und *single minded (sim)* (Therianos et al., 1995) sowie *jing* (Sedaghat und Sonnenfeld, 2002). Neben den genannten Mutanten existieren weitere Gehirnphänotypen, die eine Veränderung des ftfc-Aufbaus bzw. des Gehirns zeigen, in denen die Kommissur betroffen ist. Zum einen zeigen Mutanten von *extradenticle* und *homothorax (hth)* Fehler in der Bildung der primären Axontrakte, die durch die ftfc gebildet werden, zum anderen zeigt ein hitzesensitives Allel von *twin of eyeless* Defekte der embryonalen Hirnanatomie, die sich auf die präorale Hirnkommissur auswirken (Furukubo-Tokunaga et al., 2009).

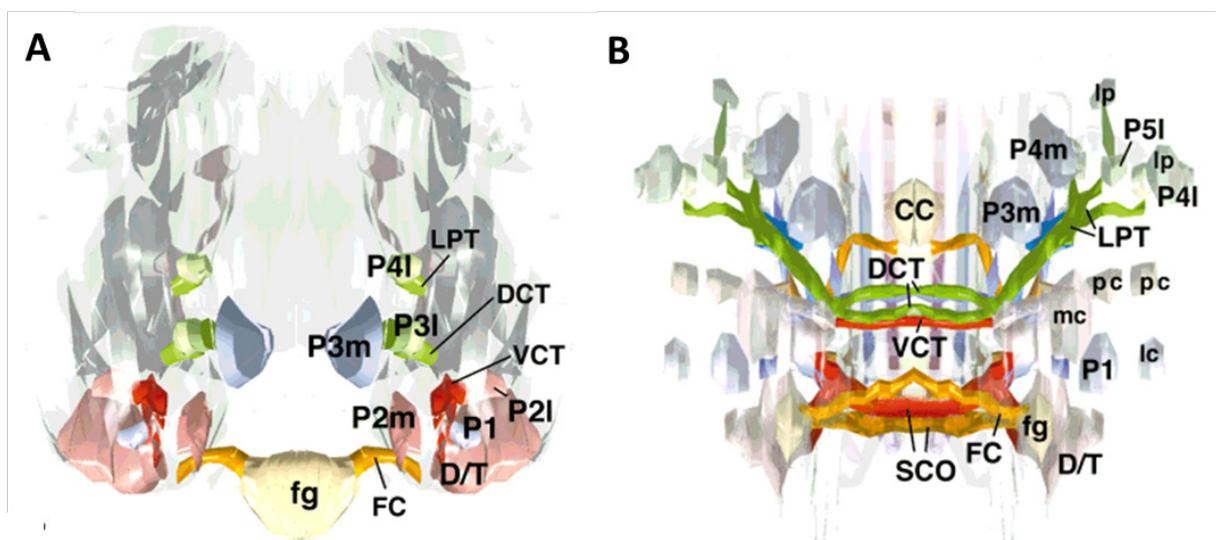
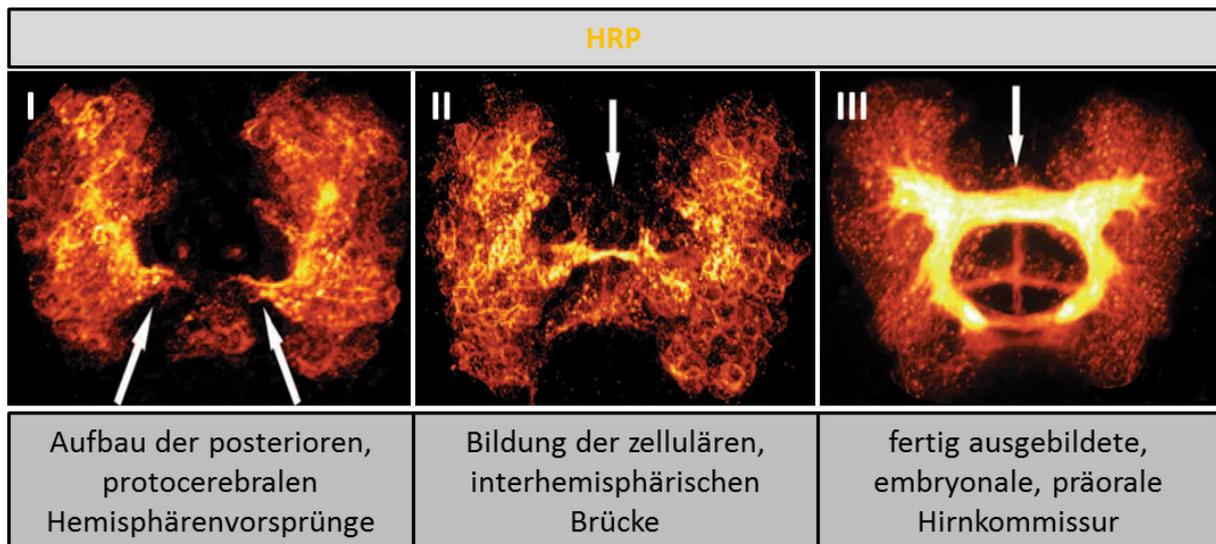


Abb.2.6: Bildung der präoralen Hirnkommisur. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht von embryonalen *Drosophila*-Gehirnen mit (I-III) anti-HRP-Färbung, Embryonen anterior nach unten: (I) Der mediale Rand der Hemisphären bildet in ES 12 zelluläre Vorsprünge aus (weiße Pfeile). (II) Elongation der Vorsprünge in ES 13 führt zur Fusion im Mittellinienspalt. (III) Vollständig ausgebildete, präorale Hirnkommisur verbindet die Hemisphären des PC ab ES 15. (I-III, Therianos et al., 1995). Digitale Modelle von Gehirnhemisphären in (A) ES 12 und (B) spätem ES 14, die die ftc (P1-P5 in medialer, m- und lateraler, l-Version) und die von ihnen gebildeten pionierenden Axontrakte darstellen. Von besonderer Bedeutung für die präorale Hirnkommisur sind die P2m Gründercluster (A) und die interhemisphärischen Kommisurtrakte DCT (grün) und VCT (rot), die von den P4-Trakten des PC (LPT, longitudinaler, protocerebraler Trakt) ausgesandt werden. (A,B: Nassif et al., 1998).

2.4 Hintergrund zum 57B-Gencluster auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms

Grundlage der Untersuchung dieser Arbeit ist die Erforschung der Nervensystem-spezifischen Rolle dreier Homeobox-Gene (Gehring, 1987), die in einem Gencluster auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms in der Region 57B liegen. Es handelt sich bei diesen Genen um *orthopedia* (*otp*) (Dissertation Nicole Bach, 2012; Simeone et al., 1994), *Drosophila retinales Homeoboxgen* (*drx*) (Davis et al., 2003; Eggert et al., 1998) und *homeobrain* (*hbn*) (Dissertation Petra Kaspar, 2008; Walldorf et al., 2000); weiter bezeichnet

als 57B-TF. Neben *Drosophila* konnte das Cluster (Abb.2.7) auch in Cnidaria und Protostomia nachgewiesen werden (Mazza et al., 2010). Für alle drei Gene wurden bereits in *Drosophila* durch Ethylmethansulfonat (EMS)-Behandlung Mutanten erzeugt, denen eine embryonale Letalität gemeinsam ist.

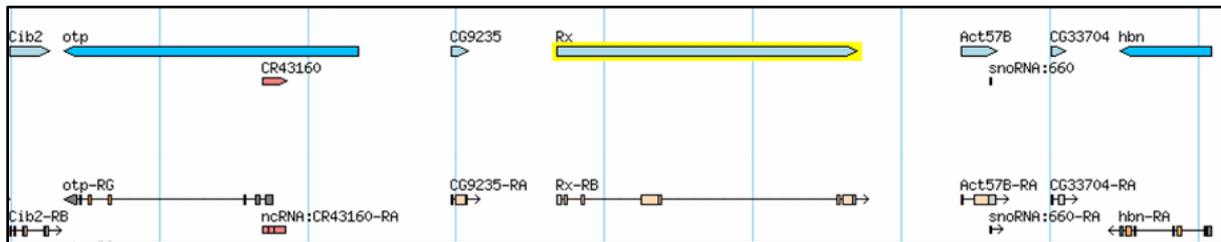
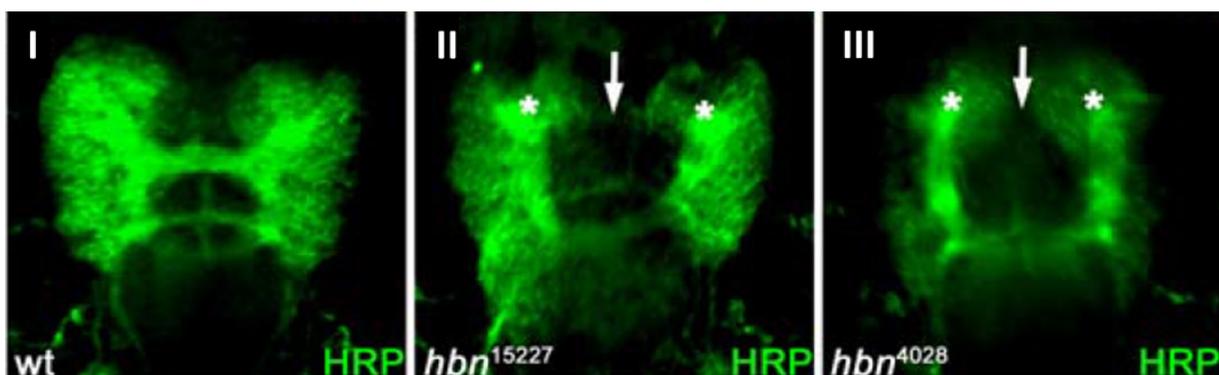


Abb.2.7: Das 57B-Gencluster auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms. FlyBase-BLAST (Dos Santos et al., 2015) zeigt die Anordnung der Gene des 57B-Genclusters *otp*, *drx*, *hbn* gemeinsam mit ihren Transkripten an. Graue Kästen bedeuten untranslatierte Exon-Bereiche, helle Kästen translatierte Exon-Bereiche, Striche stellen die Intronregionen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit standen *drx* und *hbn* im Fokus der Nervensystem-spezifischen Untersuchungen. In einer vorangegangenen Arbeit (Dissertation Petra Kaspar, 2008) mit dem Ziel der embryonalen Analyse der Funktion des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors Hbn konnten mit einem polyklonalen Antikörper die Daten der bereits vorliegenden *in situ*-Analyse (Walldorf et al., 2000) bestätigt werden. So zeigt sich eine Expression von Hbn in Form eines frühen, anterior-dorsalen Expressionsstreifens, der vor allem während der Neurogenese im Bereich des sich entwickelnden Gehirns eine Aufspaltung zu einem Muster mit mehreren Domänen erfährt, das sich schließlich im Verlauf der Entwicklung auf das supraoesophageale Ganglion fokussiert. Durch Vergleich mit dem Neuromer-spezifischen Marker Engrailed (Hirth et al., 1995) konnte die Expression von Hbn mit großem Anteil im Protocerebrum, geringerem Anteil im Deutocerebrum und wenigen Zellen im Tritocerebrum eingeordnet werden. Ein Vergleich mit neuronalen Markern belegte die Expression in wenigen Neuroblasten im Bereich des procephalen Neuroektoderms sowie in einer Vielzahl von Hbn-positiven Neuronen, die im Verlauf der Gehirnentwicklung gebildet werden. Im Vergleich mit Gliazell-spezifischen Markern zeigte sich, dass Hbn hingegen nicht in Gliazellen exprimiert wird. Der funktionellen Analyse von *hbn* standen neben den EMS-induzierten Punktmutationen *hbn*⁴⁰²⁸ und *hbn*¹⁵²²⁷ auch eine chromosomale Deletion Df(2R)7166 und eine letale P-Element-Insertion 5' des *hbn*-Gens zur Verfügung (Lin et al., 2014). Die Analyse der Mutanten zeigte im Bereich der starken Hbn-Expression, dem Protocerebrum, einen Verlust protocerebraler, neuronaler Masse (Abb.2.8,I,II,III, weiße Sterne) sowie den Verlust der präoralen Hirnkommissur (Abb.2.8,I,II,III, weißer Pfeil). Der Ausfall von protocerebralen Strukturen konnte bisher ursächlich nicht geklärt werden, da weder Apoptosemarker noch

Proliferationsmarker einen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante erkennen ließen. Im Fall der präoralen Hirnkommissur konnte jedoch ein ursächlicher Zusammenhang mit dem vorgefundenen Defekt festgestellt werden. Es zeigte sich in Analysen der Expression von Hbn im Vergleich zu dem neuronalen Marker FasII, der Gründerneurone und ihre pionierenden Axontrakte im Verlauf der Entwicklung anfärbt (Nassif et al., 1998), dass Hbn in den Gründerzellen der präoralen Hirnkommissur, dem P2l und P2m-Cluster, exprimiert wird. Die Expression kann ab der durch HRP-Färbungen gezeigten Ausbildung (Therianos et al., 1995) von zur Mittellinie weisenden Hemisphärenvorsprüngen detektiert werden. Dort befindliche FasII/Hbn-positive Pionierneurone wurden entlang des Strukturaufbaus verfolgt (Abb.2.8,A-H, weiße Dreiecke). Die Zellen zeigen ein Einwachsen in den Mittellinienspalt (Abb.2.8,A-C), bis sie im Zentrum aufeinandertreffen und eine zelluläre Brücke zwischen den Hemisphären etablieren (Abb.2.8,D-H). Die Brücke und die Konformation der FasII/Hbn-positiven Gründerzellen hat so lange Bestand, bis alle weiteren Pioniertrakte (DCT und VCT) der Kommissur gebildet sind. In der mutanten Situation konnte nachgewiesen werden, dass es nicht zur Mobilisierung dieser Gründerzellen und somit zum Aufbau der zellulären Brücke und weiter der Kommissur kommt. Beim Vergleich der Expressionsmuster sind deutliche Analogien zwischen *hbn* und den Kopflückengenen erkennbar. Zudem weist der Phänotyp der *hbn*-Mutanten Ähnlichkeit zu denen der Kopflückengenen auf, nicht nur was den Ausfall von supraoesophagealen Strukturen anbelangt, sondern darüber hinaus auch hinsichtlich einer Veränderung kutikulärer Strukturen. Bisher konnte *hbn*, das in höheren Organismen nicht homolog vorkommt, noch in *Capitella sp.* mit Expression im Nervensystem nachgewiesen werden (Fröbuis und Seaver, 2006). Das nächstverwandte Gen der Vertebraten zu *hbn* stellt das Homeoboxgen *aristaless* (*ARX*) dar, welches in mutanter Situation ein breites Spektrum an Defekten der Neurogenese aufweist. Dort zeigen sich auch Auswirkungen auf den Corpus Callosum, dem Gegenstück der Vertebraten zur präoralen Hirnkommissur (Bhat et al., 2005; Colombo et al., 2007; Hartmann et al., 2004).



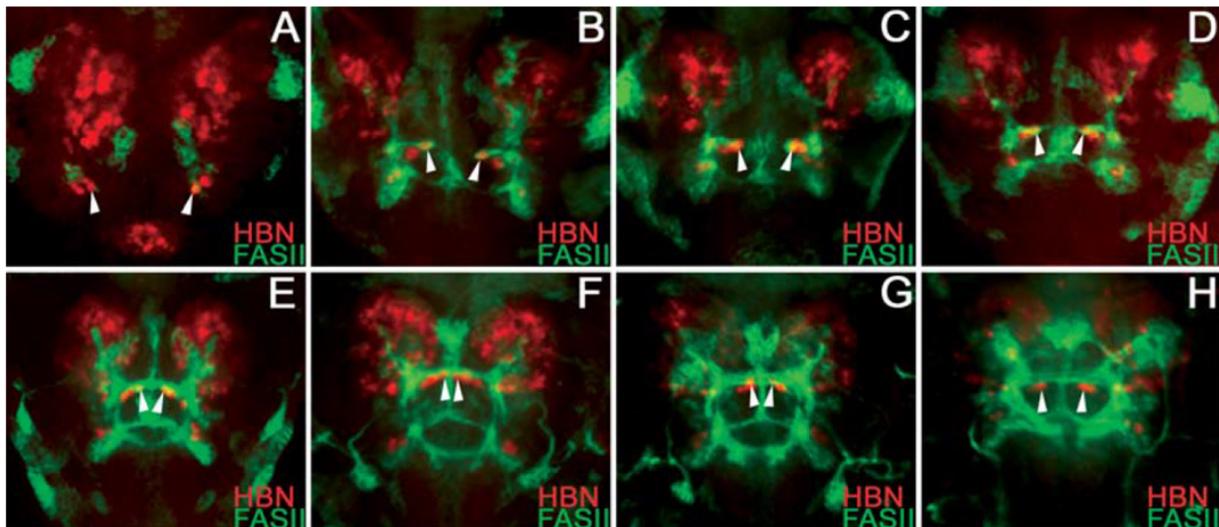


Abb.2.8: Phänotyp der *hbn*-Mutante und Beteiligung von Hbn-pos. Neuronen bei der Kommissurbildung: Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (I) des wildtypischen, embryonalen Gehirns (ES 16) und (II,III) anterior-dorsale Darstellung embryonaler Gehirne in der *hbn*¹⁵²²⁷- bzw. *hbn*⁴⁰²⁸-Mutante mit anti-HRP-Färbung, Embryonen anterior nach unten. Mutante Gehirne zeigen ein Fehlen der präoralen Hirnkommissur (weißer Pfeil) und eine Ablation des PC (weißes Sternchen). (I-III: Dissertation Petra Kaspar, 2008). Konfokale Aufnahmen von *yw*-Embryonen (A-H) mit anti-FasII- und-Hbn-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Erstes Anzeichen der FasII/Hbn-pos. Gründerneurone Ende ES 12. (B) In Mittellinie reichende FasII/Hbn-pos. Gründerzelle benachbart von weiteren Hbn-pos. Neuronen in frühem ES 13. (C) Mobilisierung der benachbarten Hbn-pos. Neurone in den Mittellinienspalt in ES 13. (D) Aufbau einer zellulären Brücke aus Hbn-pos. Neuronen beginnt Ende ES 13. (E) Etablierte zelluläre Brücke mit ausgebildeten, interhemisphärischen Trakten in ES 14. (F) Aufrechterhaltung der zellulären Brücke aus Hbn-pos. Neuronen und weiterer Aufbau der Kommissur in ES 15. (G) In ES 16 sind alle interhemisphärischen FasII-pos. Trakte zu erkennen, Hbn-pos. Brückenzellen beginnen ihren Rückzug zu den Hemisphären. (H) Am Ende der Embryonalentwicklung sind Hbn-pos. Gründerzellen an die Hemisphären (hier ohne HRP-Färbung nicht erkennbar) zurückgekehrt, die Kommissur ist vollständig ausgebildet. Weiße Dreiecke zeigen jeweils die P2m-Gründerzellen. (A-H: Dissertation Petra Kaspar, 2008).

Die Expression von *drx*, dem zweiten hier untersuchten Gen des 57B-Genclusters, wurde bereits in der embryonalen Entwicklung im Bereich des supraoesophagealen Ganglions und des Clypeolabrum gezeigt (Eggert et al., 1998). Mutanten *drx*-homologer Gene in Vertebraten zeigen phänotypische Defekte der Augenentwicklung (Mathers et al., 1997; Zhang et al., 2000; Bailey et al., 2004), dies ist jedoch in *Drosophila* nicht der Fall. Hier konnte zwar global eine Expression im larvalen und adulten Nervensystem, nicht jedoch in retinalen Geweben, festgestellt werden. Die Nullmutante *drx*^{ex8} zeigte Entwicklungsdefekte des Clypeus, die in Kutikulapräparationen und an adulten Fliegen veranschaulicht wurden. Ferner zeigt das adulte Gehirn einen variablen Phänotyp des Ellipsoidkörpers, der einen Teil des Zentralkomplexes darstellt (Davis et al., 2003). Weiter konnte *drx*-Expression in den embryonalen Pilzkörper-Neuroblasten neben den bereits bekannten Markern Dachshund, Eyeless, Tailless, Seven-up und Twin of Eyeless gezeigt werden (Kunz et al., 2012). In einem RNAi-basierten Screen konnte in der Larve die Verkleinerung der Pilzkörper-Lineages durch Knock-down der *drx*-Expression nachgewiesen werden (Neumüller et al., 2011).

Da sowohl für Hbn (Dissertation Petra Kaspar, 2008) als auch Drx (Davis et al., 2003) erste Anzeichen für eine Expression im larvalen Gehirn gefunden wurden, was sich in einer separaten Untersuchung für *otp* ebenfalls bestätigte (Dissertation Nicole Bach, 2012), soll nachfolgend auch die larvale Gehirnentwicklung in *Drosophila* geschildert werden.

2.5 Die larvale Gehirnentwicklung

Im Vorfeld der Beschreibung der molekularen und anatomischen Vorgänge in der larvalen Gehirnentwicklung sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich die Untersuchung von larvalen *Drosophila*-Gehirnen als exzellentes Modellsystem erwiesen hat, besonders im Hinblick auf die Erforschung von Stammzellen (Homem und Knoblich, 2012; Sousa-Nunes et al., 2011; Weng und Lee, 2011). Dies liegt nicht nur an der einfachen Zugänglichkeit des Gehirns für Präparationen (Abb.2.1,A), dem Vorhandensein von hoch spezifischen Antikörpern und genetischen Manipulationsmöglichkeiten, sondern auch an der vorliegenden Konservierung von Mechanismen der neuronalen Entwicklung, die auch im Säugergehirn Anwendung finden und sich somit analog in *Drosophila* untersuchen lassen (Brand und Livesey, 2011). So nimmt *Drosophila* eine Vorreiterrolle bei der Untersuchung von neuroanatomischen Grundsätzen ein und hat sich bereits als Modellsystem zur Untersuchung von Tumoren, die auf entwicklungspezifische Defekte der Neurogenese zurückzuführen sind, etabliert (Brumby und Richardson, 2005; Ellenbroek et al., 2012; Stefanatos und Vidal, 2011). Eine wichtige Feststellung im Zusammenhang mit der larvalen Gehirnentwicklung ist die Tatsache, dass nicht alle embryonalen Neurone erhalten bleiben, denn am Ende der embryonalen Gehirnentwicklung, bevor die fertige L1-Larve schlüpft, werden bis zu 40% der neuronalen Masse durch Apoptose zerstört (Larsen et al., 2009). Dabei verringert sich die Größe des Gehirns allerdings nicht, da im gleichen Zuge der Grad der Differenzierung zunimmt und mehr Synapsen gebildet werden, was den Neuropil, die Zone der differenzierten, neuronal verschalteten Zellsubstanz vergrößert und zu einem Ausgleich der Substanz führt (Larsen et al., 2009). Diese sogenannten primären Neurone bilden den Ausgangspunkt der larvalen Gehirnentwicklung und stellen zugleich das funktionale, larvale Gehirn dar. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Angliederung der optischen Lobe (OL). Diese wird während der embryonalen Gehirnentwicklung als optische Plakode angelegt und fusioniert am Ende der Entwicklung ventral mit dem Protocerebrum (Daniel et al., 1999). Gemeinsam bilden die optischen Loben zusammen mit den jeweiligen zentralen Gehirnteilen die larvalen Hirnhemisphären, welche über das SOG in das VNS der

Larve übergehen. Einen letzten wichtigen Gesichtspunkt der Embryonalentwicklung, der von Bedeutung für die larvale Entwicklung ist, stellt das völlige Einstellen von Proliferation seitens der Neuroblasten am Ende der Embryonalentwicklung dar (Abb.2.9). Diese treten in eine sogenannte Ruhephase ein und werden erst spät in der larvalen Entwicklung wieder aktiv (Datta, 1995). Dies ist gleichzeitig der Beginn für die weitere larvale Gehirnentwicklung (Abb.2.9). Im frühen L2-Stadium werden die NB reaktiviert und beginnen vermittels asymmetrischer Zellteilung die Bildung der sekundären Neurone. Die Reaktivierung erfolgt durch Signale des Fettkörpers und aus der Nische des NB, die aus Gliazellen um den NB besteht (Chell und Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011; Tsuji et al., 2008).

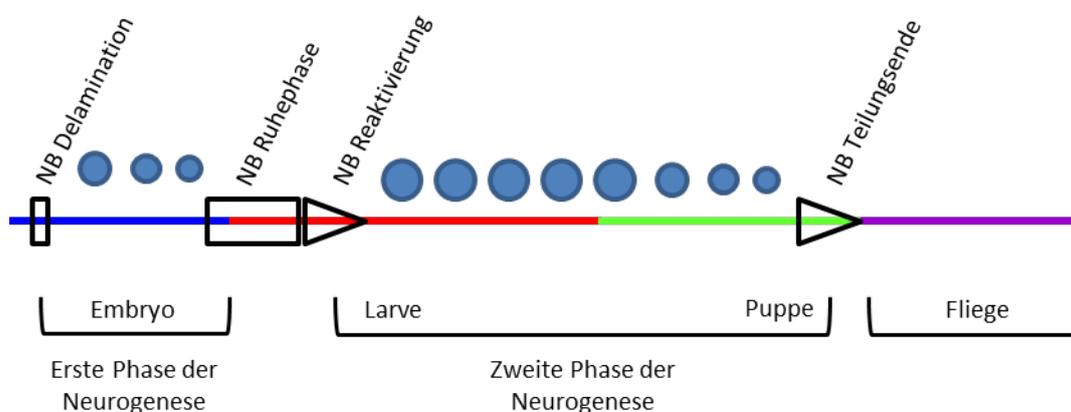
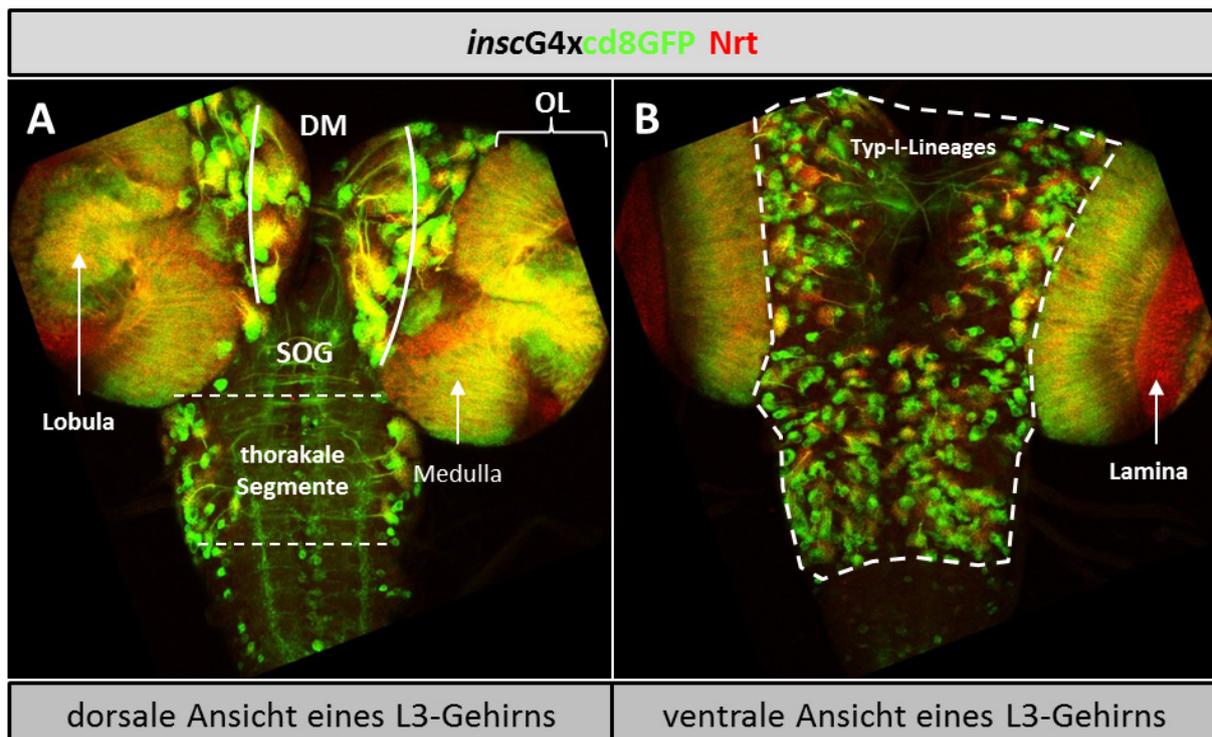


Abb.2.9: Die zwei Phasen der Neurogenese. Blaue Linie, embryonale Nervensystementwicklung; rote Linie, larvale NS-Entwicklung; grüne Linie, puppale NS-Entwicklung; lila Linie, adulte NS-Entwicklung. Blaue Punkte stellen die NB dar, deren Größe in Relation zum verbleibenden Teilungspotential steht. Schwarze Kästen bedeuten die Entstehung der embryonalen NB und deren Ruhephase. Schwarze Dreiecke zeigen den Wiedereintritt der larvalen NB in den Zellzyklus und deren Austritt aus dem Zellzyklus am Ende der puppalen Entwicklung. (nach Homem und Knoblich, 2012).

Die neu gebildeten, sekundären Neurone stellen die Hauptmasse des zukünftigen, differenzierten adulten Gehirns dar. Diese Neurone orientieren sich während der Entwicklung an der Oberfläche des larvalen Gehirns und projizieren ihre Axone entlang der **primären Axontrakte (PAT)** der vorliegenden primären Neurone und bilden dabei die **sekundären Axontrakte (SAT)** (Spindler und Hartenstein, 2010). Ein bekannter neuronaler Marker, der embryonal im gesamten NS und larval exklusiv in sekundären Neuronen exprimiert wird, ist Neurotactin (Barthalay et al., 1990), ein Transmembranprotein, welches die Zellwand der Neurone nach Antikörperfärbung gut sichtbar macht (Abb.2.10,A,B). Durch diesen Marker in Zusammenhang mit konfokaler Mikroskopie ließ sich eine genaue Karte der larvalen Lineages entwickeln (Pereanu und Hartenstein, 2006). Unter Lineage versteht man einen Neuroblasten und seine Abstammungslinie, die wie im Embryo aus Gangliemutterzellen und letzten Endes aus Neuronen besteht. Zur Orientierung im larvalen

Gehirn und zur Differenzierung der Strukturen soll Abbildung 2.10 dienen. Grundsätzlich untergliedert man das Gehirn in die Hemisphären und den Hirnstamm (Abb.2.10,C). Die Hemisphären wiederum werden in das zentrale Gehirn (CB, **central brain**) (Abb.2.10,C) und die optischen Loben unterteilt (Abb.2.10,A,C, **OL**). Der Hirnstamm gliedert sich in thorakale und abdominale Segmente (Abb.2.10,A,C, gestrichelte, weiße bzw. schwarze Linien). Am Übergang der Hemisphären in den Hirnstamm liegt das SOG (Abb.2.10,A,C). Der Neuropil, die Zone der verschalteten, primären Neurone liegt im Inneren des CB und des Hirnstamms (Abb.2.10,C, gestrichelte, weiße Linie). Die optische Lobe selbst verfügt über einen eigenen Neuropil, der auch als Plexus bezeichnet wird (Abb.2.10,C). In diesen münden die Axontrakte der verschiedenen optischen Areale: Medulla, Lamina und Lobula (Abb.2.10,A,B). Die Hemisphären verbindet im CB, genauer in der **dorso-medialen (DM)** Region (Abb.2.10,A,C, **DM**), auch larval eine Kommissur (Abb.2.10,C, **K**). Im anterior-lateralen Bereich des CB liegt der sog. Pilzkörper (Abb.2.10,C, **PK**). Ein wichtiger Unterschied zum Aufbau des embryonalen Gehirns besteht im Vorhandensein und der differentiellen Lage von unterschiedlichen Lineage-Typen (Typ-I-Lineages in der OL und dem lateralen bzw. ventralen Bereich des CB, Abb.2.10,B, gestrichelte, weiße Linie bzw. Abb.2.10,C und Typ-II-NB-Lineages, die sich im DM-Bereich des CB befinden, Abb.2.10,A,C, weiße bzw. schwarze Linien). Diese differentiellen Lineagetypen und ihre zugehörigen NB werden im nachfolgenden Kapitel einander gegenübergestellt und bezüglich ihrer molekularen Unterschiede verglichen.



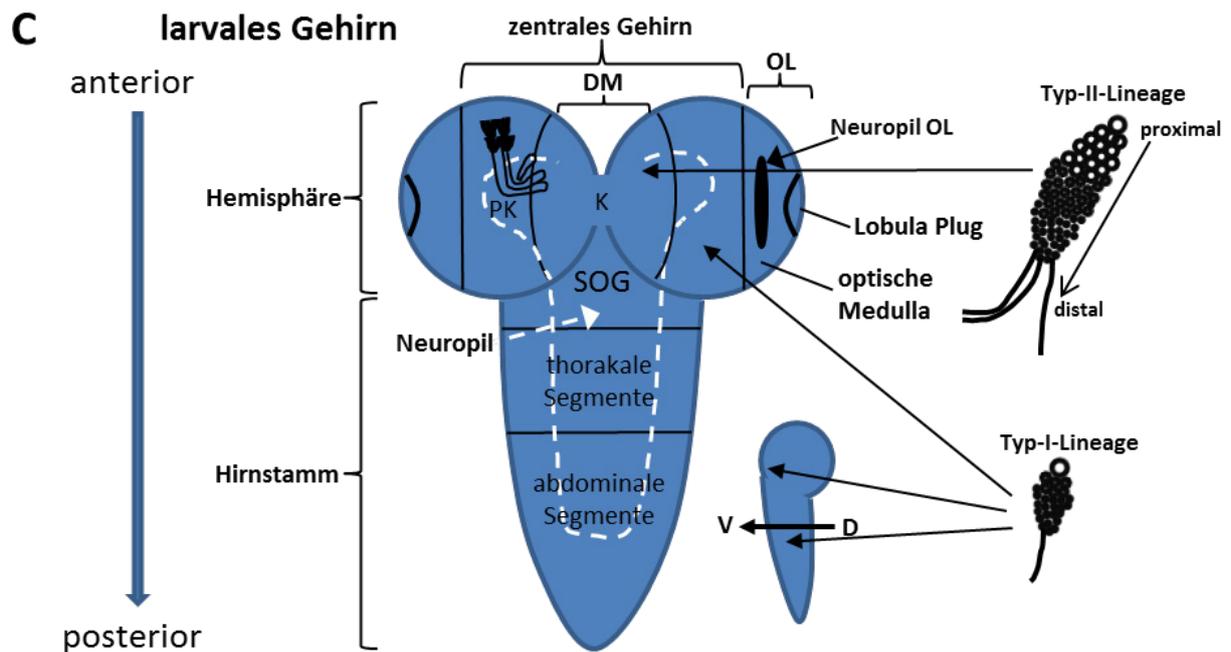
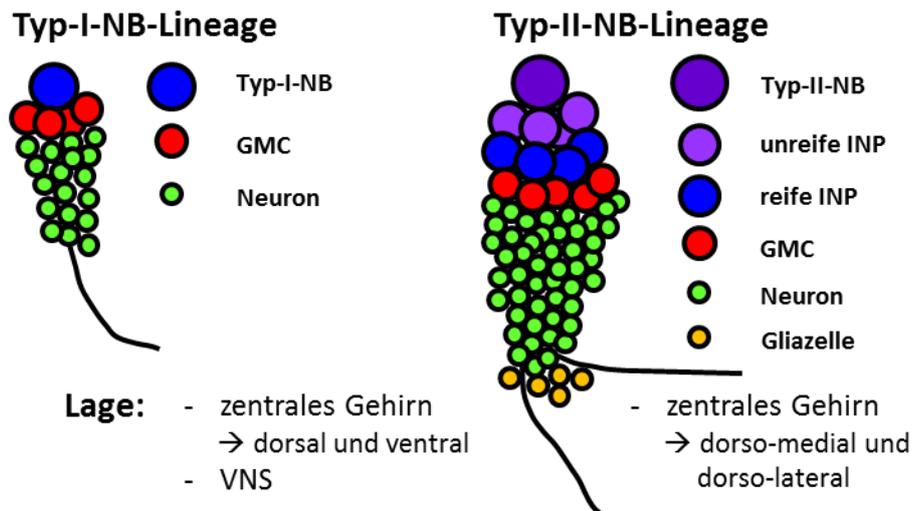


Abb.2.10: Das larvale Gehirn von *Drosophila*. Konfokale Aufnahme eines *inscG4xcd8GFP-L3*-Gehirns in dorsaler und ventraler Ansicht (25x) mit zusätzlicher anti-Nrt-Färbung zur vollständigen Visualisierung der Typ-I- und Typ-II-Lineages des larvalen Gehirns; schematische Darstellung: DM, dorso-medialer Bereich, K, Kommissur; OL, optische Lobe; PK, Pilzkörper; SOG, suboesophageales Ganglion, gestrichelte, weiße Linie grenzt Neuropil, die Zone der differenzierten, verschalteten, primären Neurone, ab. (A) Dorsale Darstellung zeigt zentral in den Hemisphären den dorso-medialen Bereich, der die Typ-II-NB-Lineages beinhaltet. Lateral in den Hemisphären erscheint die optische Lobe, die sich aus Medulla, Lamina und Lobula zusammensetzt. Unterhalb der Hemisphären liegen das SOG und im Anschluss die thorakalen und abdominalen Segmente des VNS. (B) In ventraler Darstellung fällt besonders die Vielzahl an Typ-I-Lineages auf, die über die Hemisphären bis in die thorakalen Segmente verteilt liegen. In der OL kann ventral die Lamina betrachtet werden. (C) Die Raumrichtungen bzw. die Achsen werden durch Pfeile angegeben und anterior, posterior sowie dorsal und ventral definiert. Am Bsp. einer DM-Typ-II-Lineage ist der proximale und distale Pol einer Lineage dargestellt.

2.6 Unterschiede der larvalen Typ-I- und Typ-II-NB-Lineages

Im Gegensatz zur embryonalen Entwicklung, in der nur eine Art von Neuroblasten, die Typ-I-NB, auftreten, existieren in der larvalen Entwicklung auch Typ-II-NB. Diese werden grundsätzlich durch den Zelltyp der direkt gebildeten Nachkommenschaft unterschieden (Abb.2.11). So bilden Typ-I-NB wie die NB der embryonalen Gehirnentwicklung GMC, welche sich terminal in zwei Neurone teilen. Dabei werden im Schnitt 150 sekundäre, adulte Neurone gebildet. Dieser Typ von Neuroblasten ist der vorherrschende Typ und Hauptvertreter im zentralen Gehirn, den optischen Loben und dem ventralen Nervensystem (Abb.2.10,A-C). Dem gegenüber stehen die Typ-II-Neuroblasten, welche sog. INP, intermediäre neuronale Stammzellen (intermediate neuronal precursors), bilden (Abb.2.11). Diese sog. INP weisen eine hohe Ähnlichkeit zu Typ-I-NB auf. Sie bilden in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen symmetrischer Zellteilung GMC, wodurch dieser Lineage-Typ schließlich eine weit größere Anzahl an sekundären Neuronen hervorbringt, im Durchschnitt etwa 500 Neurone (Bello et al., 2006). INP mit Typ-I-NB zu vergleichen, geschieht nicht nur

auf Grundlage der gebildeten Zellen, sondern auch durch den Vergleich der Expression von spezifischen Markerproteinen. In diesem Zusammenhang sind Deadpan und Asense zu nennen (Bier et al., 1992; Brand et al., 1993). Jeder Typ-I-NB exprimiert beide genannten Faktoren, der Typ-II-NB hingegen zeigt nur Deadpan-Expression, wird daher auch PAN (**p**osterior **a**sense negativ **n**euroblast) genannt (Bowman et al., 2008) (Abb.2.11). Die neu gebildeten INP exprimieren zuerst keinen der genannten Marker und gelten in dieser Phase der genetischen Remodulation als unreif. Bald darauf, mit etwas Entfernung zum Neuroblasten, beginnen sie mit der Expression von Deadpan und anschließend auch Asense, wodurch sie zu reifen INP werden (Bowman et al., 2008) (Abb.2.11). Eine wichtige Beobachtung im Zusammenhang mit der Markerzellexpression kann auch für Prospero gefunden werden. Typ-I-NB zeigen alle eine Expression von Prospero, welches gebunden an Miranda vorliegt und in GMC abgegeben wird, um bedingt durch eine transkriptionelle Veränderung der GMC die weitere Zellteilung zu unterbinden (Lee et al., 2006; Matsuzaki et al., 1998) (Abb.2.11). Prospero wird in Typ-II-NB nicht exprimiert (Bello et al., 2008; Boone und Doe, 2008; Bowman et al., 2008), sondern erst von den INP gebildet, durch Miranda asymmetrisch an GMC abgegeben und dort nachfolgend kernständig beobachtet (Abb.2.11). In den von GMC gebildeten Ganglionzellen (**g**anglion **c**ells, GC) wird die Expression von *prospero* verstärkt, um die Expression von *dpn* weiter zu blocken, was durch Verstärkung der Dacapo-Aktivität erfolgt, die zu einer sicheren Differenzierung in Neurone beiträgt (Colonques et al., 2011). Während die Typ-I-NB die Mehrheit der Lineages im zentralen Gehirn und ventralen Nervensystem bilden, liegen lediglich acht Typ-II-NB-Lineages im zentralen Teil des larvalen Gehirns vor. Jeweils sechs Neuroblasten bilden große Lineages im dorso-medialen Bereich der Gehirnhemisphären aus (Abb.2.10,A-C), je zwei laterale NB gehören zu den **d**orso-**l**ateralen (DL) Typ-II-NB. Diese DM-Lineages sind durch ihre Kommissurprojektionen charakterisiert und stellen eine weitere Besonderheit in der Nervensystembildung dar. Im Gegensatz zu den Typ-I-NB der larvalen Gehirnentwicklung handelt es sich hier um Neuroglioblasten und daher bilden sie Neurone und auch Gliazellen, wovon sich letztere terminal in der Lineage befinden (Abb.2.11). Die Gliazellen werden hier von bestimmten INP im Verlauf der Entwicklung erzeugt und tragen zum Zentralkomplex des adulten Gehirns bei, der aus diesen bilateral-symmetrischen Lineages während der puppalen Gehirnentwicklung entsteht (Viktorin et al., 2011).



TF	Typ-I-NB	Typ-II-NB	unreife INP	reife INP	GMC	Neuron	Glia
Dpn	+	+	-	+	-	-	-
Ase	+	-	-	+	-	-	-
Pros	-	-	-	-	+	-	-
ELAV	-	-	-	-	-	+	-
Repo	-	-	-	-	-	-	+

Abb.2.11: Vergleich der Typ-I- und Typ-II-NB-Lineages und deren molekulare Charakterisierung. Schematische Darstellung der Typ-I- und Typ-II-NB-Lineages des larvalen Gehirns und ihrer Zelltypen. Tabelle zeigt die kernständige Expression der neuronalen Marker in den jeweiligen Zelltypen der Lineages an.

2.7 Entwicklung der optischen Lobe

Die adulten optischen Loben werden in mehrere Bereiche unterschiedlicher Funktionalität mit verschiedener Verschaltung und daher verschiedener Funktion in der Verarbeitung visueller Reize gegliedert. Der größte Teil der optischen Lobe gehört zur optischen **Medulla** (M), auch optisches Mark genannt. Dies ist eine ringförmige Anlage kolumnarer Lineages, die in larvalen Gehirnen direkt an das zentrale Gehirn anschließt (Abb.2.12,A), jedoch in adulten Gehirnen durch den Lobula-Komplex von dem CB getrennt vorliegt. Neben der Medulla befinden sich in der OL auch die **Lamina** (L) sowie der Lobula-Komplex aus Lobula und Lobula **Plate** (LPt) sowie **Lobula Plug** (LP) in der Larve (Abb.2.12,A) und Lobula sowie Lobula Plate im adulten Gehirn. An die optische Lobe der Larve ist über den optischen Nerv die Augenscheibe angegliedert, die sich im Zuge der puppalen Entwicklung zum Komplexauge der Fliege entwickelt, welches von den Ommatidien ausgehend die OL des adulten Tieres innerviert. Die OL stellt somit das Verschaltungs- und Verarbeitungsareal der visuellen

Sinnesinformationen dar. Die optische Lobe wird in der frühen larvalen Entwicklung von zwei proliferativen Zentren aus gebildet. Diese stellen das äußere (**outer**) (OPC) und das innere (**inner**) (IPC) proliferative Zentrum (**proliferative center**) dar (Abb.2.12,B). Die vier Neuropile des adulten Gehirns, Medulla, Lamina, Lobula und Lobula Plate werden von ihnen gebildet. Aus dem OPC gehen die Medulla und die Lamina hervor, aus dem IPC entsteht der Lobula-Komplex (Hofbauer und Campos-Ortega, 1990). Im Gegensatz zur Reaktivierung der embryonalen Neuroblasten in CB und VNS liegen am Beginn der larvalen Entwicklung in den optischen Loben noch keine NB vor. Diese werden erst im Verlauf der larvalen Entwicklung ausgebildet, in einem Prozess, der starke Ähnlichkeit zur Entstehung der embryonalen NB aus dem Neuroektoderm zeigt. Während der larvalen Entwicklung findet im Bereich der optischen Lobe die Bildung eines Neuroektoderms statt, was durch die erneute Expression von proneuralen Genen, genauer *lethal of scute (l'sc)*, in einem zirkulären System in den optischen Loben erfolgt (Yasugi et al., 2008). Aus diesem Neuroepithel (Abb.2.12,C,D), welches durch symmetrische Teilung zuerst die Zellzahl erhöht und dann in asymmetrische Teilung übergeht, entstehen über mehrere Reifungsschritte die NB der OL sowie in entgegengesetzter Richtung die Neurone der Lamina (Abb.2.12,D). Neben den proneuralen Genen trägt eine Reihe weiterer regulatorischer Signalwege zur Differenzierung des **Neuroepithels** (NE) und zur Bildung von NB bei. Darunter fallen EGFR- und Notch-Signale, die besonders den Wechsel von symmetrischer zu asymmetrischer Teilung und das Voranschreiten der proneuralen Welle fördern (Egger et al., 2010; Pérez-Gómez et al., 2013; Weng et al., 2012; Yasugi et al., 2010). JAK/STAT- und Fat/Hippo-Signalwege sind ebenfalls an der Differenzierung des Neuroepithels beteiligt (Kawamori et al., 2011; Yasugi et al., 2008). Analog zu den Typ-I-NB des zentralen Gehirns bilden die Neuroblasten der OL ihre Lineage durch asymmetrische Teilungen, bei denen GMC in Richtung des zentralen Gehirns abgegeben werden, die sich terminal in Neurone der Medulla teilen (Sato et al., 2013). Die Stamm- und Progenitorzellen der optischen Medulla liegen somit im Cortex und die Neurone selbst unterhalb des Cortex, wo sie die Axonfaszikel bilden, die zum Neuropil der optischen Lobe projizieren.

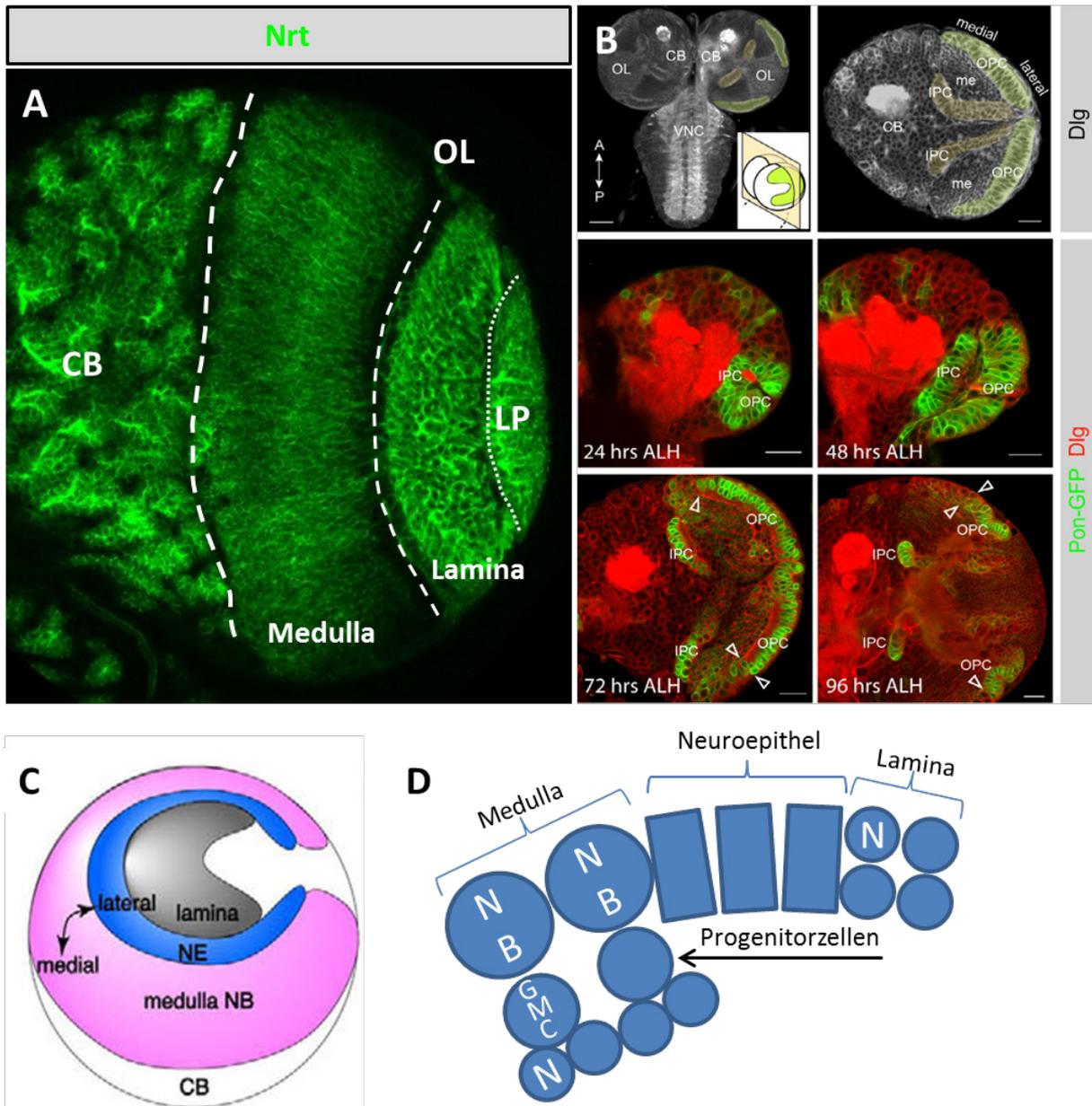


Abb.2.12: Die Entwicklung der optischen Loben. (A) Konfokale Aufnahme in ventraler Ansicht der Hemisphäre eines *yw*-L3-Gehirns (40x) mit anti-Nrt-Färbung; gestrichelte, weiße Linien grenzen das zentrale Gehirn (CB) von der optischen Medulla ab sowie die Medulla von der Lamina und selbige vom Lobula Plug (LP). (B) Schematische Darstellung der Lage des äußeren- und inneren proliferativen Centers (OPC, IPC) in einem anti-Discs-large (Dlg) (neuronaler Marker) gefärbten L3-Gehirn, me, Medulla. Konfokale Aufnahmen von PonG4xcd8GFP-Gehirnen (cd8GFP, Membranmarker) zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung, 24, 48, 72, 96 Stunden (hrs) nach Schlüpfen der Larve (after larval hatching, ALH) mit zusätzlicher anti-Dlg-Färbung. Reporterfärbung zeigt die Entwicklung und Lage der OPC und IPC in den L2-L3-Gehirnen an. (C) Schematische Darstellung der optischen Lobe in lateraler Aufsicht der Hemisphäre zeigt Lage des Neuroepithels (NE) im Vergleich zu der Lage der Lamina und der Medulla. (D) Schematische Darstellung der bipolaren Differenzierung des Neuroepithels in Medulla-Neuroblasten, GMC (schwarzer Pfeil) und Neurone der Medulla bzw. Lamina. (GMC, Ganglionmutterzelle; N, Neuron; NB, Neuroblast). (B: Egger et al., 2007; C: Yasugi et al., 2010).

2.8 Der Pilzkörper

Neben den Neuroblasten-Lineages, die bisher beschrieben wurden, existiert noch ein weiterer Lineage-Typ, der sich von den Typ-I-Lineages unterscheidet. Diese Lineages gehören

zum sogenannten **Pilzkörper (PK)**, der schon im Embryo angelegt wird und sich konstant bis in das adulte Tier hinein weiterentwickelt (Abb.2.13).

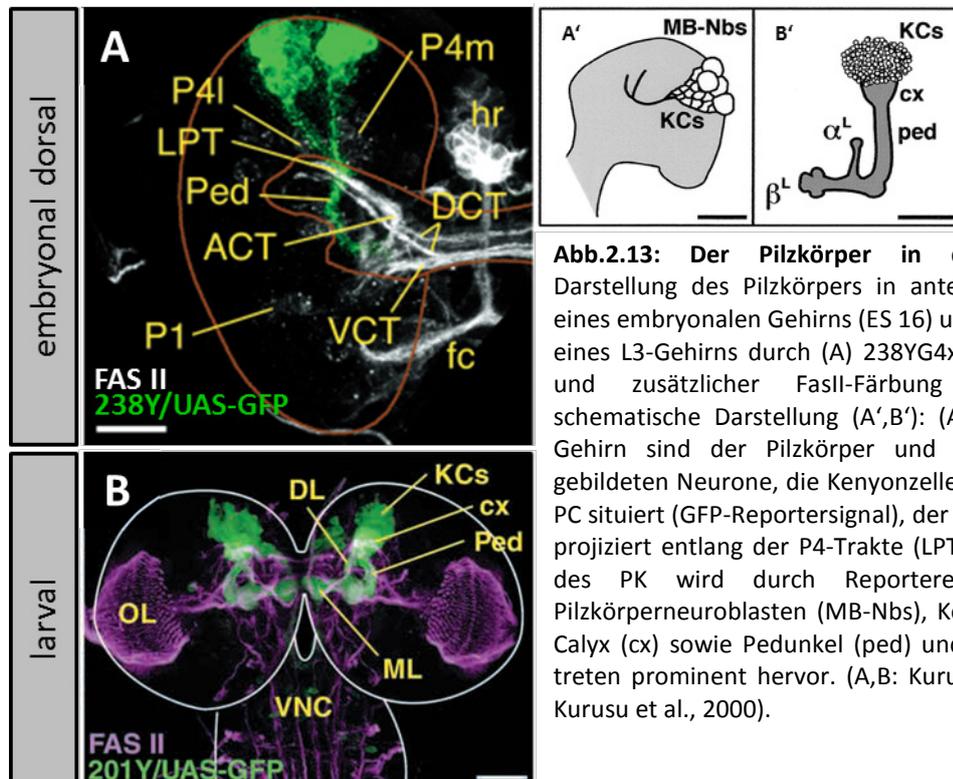


Abb.2.13: Der Pilzkörper in der NS-Entwicklung. Darstellung des Pilzkörpers in anterior-dorsaler Aufsicht eines embryonalen Gehirns (ES 16) und in dorsaler Aufsicht eines L3-Gehirns durch (A) 238YG4xGFP, (B) 201YG4xGFP und zusätzlicher FasII-Färbung sowie zugehörige schematische Darstellung (A',B'): (A,A') Im embryonalen Gehirn sind der Pilzkörper und seine NB sowie die gebildeten Neurone, die Kenyonzellen (KCs), im anterioren PC situiert (GFP-Reportersignal), der Pedunkel (Ped) des PK projiziert entlang der P4-Trakte (LPT) zur PHK. (B,B') Lage des PK wird durch Reporterexpression angezeigt, Pilzkörperneuroblasten (MB-Nbs), Kenyonzellen (KCs) und Calyx (cx) sowie Pedunkel (ped) und Loben (α , β) des PK treten prominent hervor. (A,B: Kurusu et al., 2002; A',B': Kurusu et al., 2000).

Pro Hemisphäre tragen jeweils vier Neuroblasten zur Entstehung des Pilzkörpers bei. Der Unterschied zu den normalen Typ-I-NB besteht nicht in der Produktionsart von Progenitorzellen, sondern in der Dauer der Produktionsphase. Die vier Neuroblasten sind die einzigen, die nicht in eine Ruhephase eintreten, sondern permanent weiter, sogar bis in das adulte Stadium hinein proliferieren und so eine mit den DM-Lineages vergleichbare Zahl an Neuronen erzeugen (Ito und Hotta, 1992). Die Neurone, die von den PK-NB erzeugt werden, bilden zusammen die sog. Kenyonzellen. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass mehrere Gene des RDGN (retinales **D**eterminations-**G**en-**N**etzwerk) spezifisch in PK-NB und Kenyonzellen exprimiert werden. Darunter fallen *dachshund (dac)*, *eyeless (ey)*, *seven-up (svp)* sowie *twin of eyeless (toy)* und nach neuerer Erkenntnis ebenfalls *drx* (Kunz et al., 2012; Kurusu et al., 2000).

2.9 Techniken zur Analyse des Nervensystems

Viele Mutanten Nervensystem-spezifischer Gene zeigen bereits embryonale Letalität mit spezifischem Phänotyp, wie es auch für die Vertreter des 57B-Genclusters gilt. Dies macht die Untersuchung von späteren, entwicklungsbiologisch relevanten Funktionen dieser Gene

unmöglich. Um diese Situation zu umgehen und Auswirkungen von Mutationen auch in larvalen, puppalen oder adulten Geweben untersuchen zu können, wurde eine Reihe von Techniken etabliert, mit denen man den Verlust der Genfunktion auch zu späteren Zeitpunkten analysieren kann. Die Grundlage fast aller dieser Techniken ist durch das in *Drosophila* verwendete UAS-Gal4-System gegeben. Dabei wird die Expression des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 unter die Kontrolle von beliebigen genomischen Enhancern gestellt, wodurch eine zeitlich und räumlich genau definierte Expression des TF möglich ist. Zielsequenz dieses Faktors ist die UAS-Bindungsstelle (**u**pstream **a**ctivating **s**equen**c**e), die mit einem zu exprimierenden Reporter gen oder beliebigen anderen Zielgenen gekoppelt wird (Brand und Perrimon, 1993) (Abb.2.14,C). Eine Technik mit breitem Anwendungsspektrum ist der Einsatz von spezifischen (**s**hort **h**airpin) shRNAs zur RNA-Interferenz (RNAi), die zu einem Knock-down der Expression von spezifischen Faktoren führt. Dazu können spezielle Treiber die Expression der RNAi-Konstrukte zeitlich und räumlich bestimmen. Ein bedeutender Screen vor diesem Hintergrund ist ein genomweiter Ansatz mit Nervensystem-spezifischen Faktoren, der in der Larve in allen Lineages durch den Einsatz von *inscGal4* (Abb.2.10,A,B) und einer UAS-gesteuerten RNAi-Bank durchgeführt wurde. In diesem Screen konnten sehr viele Gene analysiert und ihre mit dem Knock-down einhergehenden Phänotypen ermittelt werden (Neumüller et al., 2011; Jiang und Reichert, 2013).

Ein weiterer bedeutender Ansatz stellte eine Vielzahl von Reporterkonstrukten für Nervensystem-spezifische Faktoren zur Verfügung. Dies geschah durch die genomweite Erstellung von Gal4-Reporterkonstrukten. Dazu wurde der nicht kodierende Bereich vieler Gene spezifisch in 3,5kb große Fragmente aufgeteilt, diese wurden in den universellen Gal4-Vektor pBPGW eingesetzt und damit transgene Tiere erzeugt (Pfeiffer et al., 2008). Die entstandenen und ausgewerteten Muster der Treiber wurden im embryonalen, larvalen wie adulten Gehirn dokumentiert und in einer Datenbank zur Verfügung gestellt (Rubin Lab, Janelia Farm, Virginia). Dies ermöglicht es, Konstrukte mit spezifischer räumlicher und zeitlicher Expression zu finden und eventuell für gezielte Knock-down-Experimente einzusetzen. Darüber hinaus ist es möglich, eine neuronale Karte des Gehirns zu erstellen und sogar Neurone auf Einzelzellniveau anzusprechen.

Eine Technik, die ausgehend von beispielsweise einem Neuroblasten zu markierten, wildtypischen oder mutanten Zellklonen führt, ist die sog. MARCM-Technik (**m**osaic **a**nalysis

with a repressible cell marker) (Lee und Luo, 1999, 2001). Hierbei werden chromosomale Arme, die das gewünschte Allel tragen, mit der Rekombinase-Zielsequenz, sogenannten FRT-Stellen, rekombiniert. Werden diese Stämme gezielt mit einem Nervensystem-spezifischen Treiber gekreuzt, der zusätzlich eine Hitzeschock-aktivierbare Flippase (*hs-Flp*) und ein Markerkonstrukt (UAS*Scd8*-GFP) trägt, so können durch die Rekombination positiv markierte Klone entstehen, die sich auf Phänotypen hin untersucht lassen (Abb.2.14,A,B). Hierbei wird Gal80 zur Inhibition des Gal4-Konstruktes eingesetzt und somit eine Markierung erst nach Rekombination ermöglicht (Abb.2.14,A).

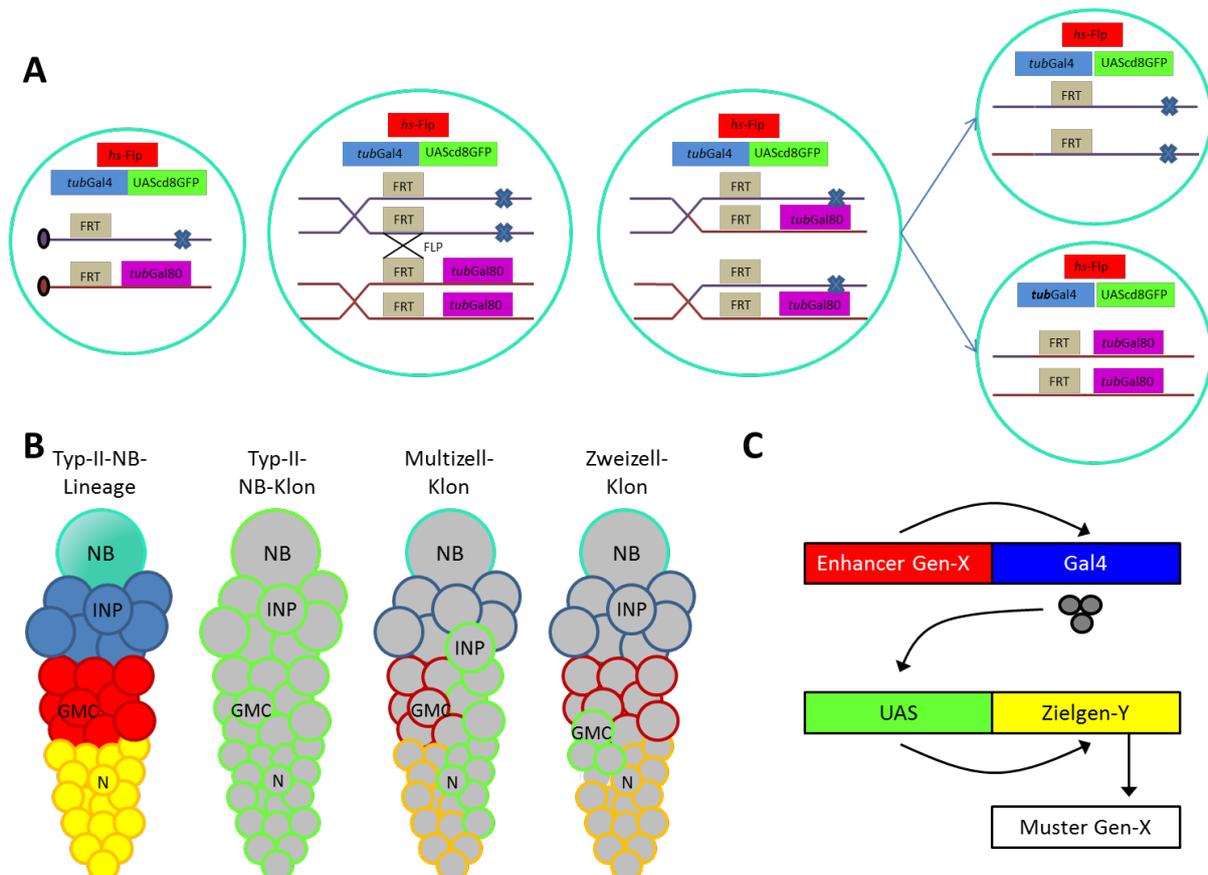


Abb.2.14: Das MARCM-System und seine Anwendung in dieser Arbeit. (A) Skizze des Rekombinationsprozesses und der Verteilung der Allele (dunkelblaue Kreuze) und Reporterkonstrukte nach Hitzeschock durch Flp/FRT geführte Rekombination in der Mitose [*hs-Flp*; *tubGal4*; *UAScd8GFP*; *tubGal80*; *FRT*]. (B) Schematische Darstellung einer Typ-II-NB-Lineage mit NB, INP, GMC und Neuronen sowie nach Hitzeschock in verschiedenen Zelltypen entstandene Lineage-Klon-Typen: Lineage-Klon (NB), Mehrzellklon (INP) und Zweizellklon GMC. (C) Schematische Darstellung der Funktion des UAS-Gal4-Systems.

2.10 Timing-Faktoren in der Entwicklung des Nervensystems

Die Analyse von exprimierten Transkriptionsfaktoren in embryonalen Neuroblasten ermöglichte nicht nur die systematische Identifizierung einzelner Stammzellen des embryonalen Gehirns und ventralen Nervensystems (Urbach und Technau, 2003), sondern darüber hinaus wurde gezeigt, dass manche Neuroblasten im ventralen, embryonalen

Nervensystem in ihrer Expression eine strikte Reihenfolge bei der Expression von Transkriptionsfaktoren zeigen. Diese Faktoren sind Hunchback → Krüppel → Pdm → Castor (Abb.2.15,A). Somit erhalten Neuroblasten eine temporale Identität, man spricht auch von einer zeitlichen Musterbildung (Isshiki et al., 2001). Dasselbe Phänomen ist ebenso in Typ-II-NB der DM-Lineages sowie in den von ihnen gebildeten INP (Bayraktar und Doe, 2013) (Abb.2.15,B) und in den Neuroblasten der optischen Lobe anzutreffen (Bertet et al., 2014; Li et al., 2013; Suzuki et al, 2013) (Abb.2.15,C,D).

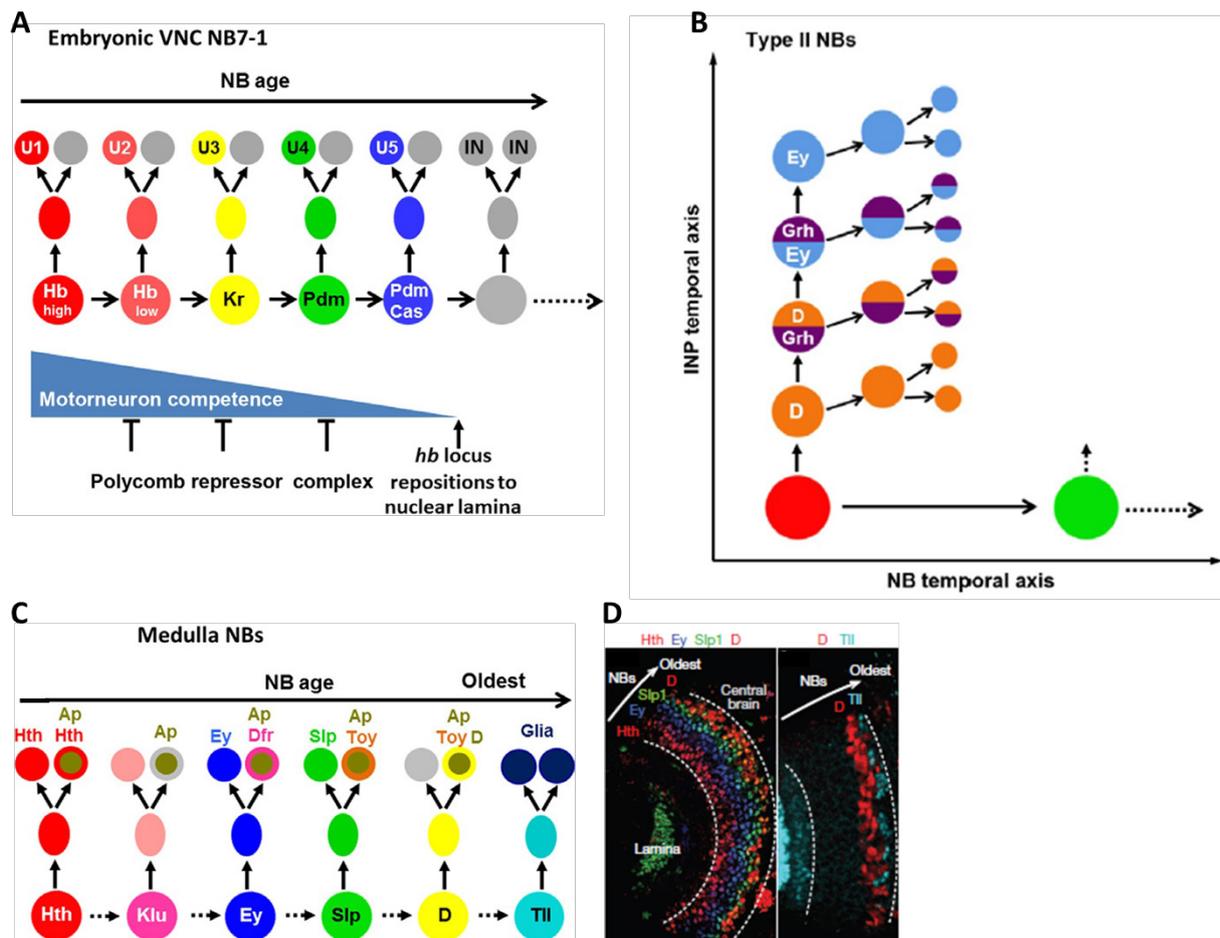


Abb.2.15: Die zeitlichen Faktoren der embryonalen-, Typ-II- und Medulla-NB Entwicklung. (A) Der Graph veranschaulicht die aufeinanderfolgende Expression von verschiedenen TF während der zeitlichen Entwicklung des embryonalen NB. (B) Zeitliche Entwicklung der Nb und INP in Typ-II-NB-Lineages mit Expression der spezifischen Marker über die Zeit. (C) In diesem Graph wird die zeitliche Reihenfolge der Timing-Faktor-Expression in Medulla-NB und deren nachfolgenden GMC und Neuronen dargestellt. (D) Mikroskopische Aufnahme der optischen Medulla gefärbt mit anti-Hth, -Ey, -Slp1, -D, -Tll, den Faktoren der zeitlichen Musterbildung. (A,B,C: Li et al., 2013; D: Li et al., 2013)

In den NB und INP der DM-Lineages sind dies Dichaete → Grainyhead → Eyeless, die aufeinanderfolgend exprimiert werden (Abb.2.15,B). In der optischen Lobe durchlaufen die Neuroblasten während ihrer Alterung und damit zunehmender Entfernung vom Neuroepithel mehrere zeitliche Identifikationszustände. Alle Neuroblasten zeigen in strikter

Reihenfolge die Expression von Homothorax → Klumpfuß → Eyeless → Sloppy Paired → Dichaete → Tailless (Abb.2.15,C,D). Das Ausschalten dieser Gene führt nicht zum Verlust von Neuroblasten, sondern zum Verlust von temporären Identitäten. Dabei aktivieren die Faktoren die nachfolgenden Glieder der Serie, die wiederum den Vorgänger in ihrer Expression zeitlich und räumlich begrenzen. Die neuronale Identität der NB bzw. INP wird dabei meist an die Progenitorzellen bzw. Neurone weitergegeben, bzw. die Markerexpression in diesen dadurch bestimmt (Abb.2.15,A-C). Die temporäre Identität ist - neben der räumlichen Identität (Rogulja-Ortmann und Technau, 2008; Technau et al., 2006), der binären Zellschicksals-Entscheidung bestimmt durch Notch (Truman et al., 2010) und der Bildung von Progenitorzellen mit unterschiedlichem Teilungscharakter (He et al., 2012) - eine der Schlüsselprinzipien zur Erzeugung neuronaler Diversität.

2.11 Zielsetzung dieser Arbeit

In einem ersten Abschnitt der Arbeit sollten Untersuchungen am embryonalen Nervensystem durchgeführt werden, um bisher ungeklärte Fragen bezüglich der Funktion von Hbn in der embryonalen Gehirnentwicklung anzugehen.

Dazu sollte zuerst die Expression von Hbn im SAG eingehender beschrieben und gegenüber von anderen in der embryonalen Gehirnentwicklung exprimierten TF untersucht werden, um eine bessere Lokalisierung der Hbn-Expression zu erreichen. Ein Schwerpunkt lag dabei auf den Faktoren des RDGN, deren Expression bereits kartiert und mit der von Hbn vergleichbar ist. In diesem Zusammenhang sollte weiterhin besonders die Expression des Nachbargens *drx*, welches in vorangegangenen Untersuchungen bereits eine hohe Ähnlichkeit bezüglich der SAG-Expression zeigte, vergleichend betrachtet und Zonen gemeinsamer Aktivität näher untersucht werden. Die bestehende Zelltypanalyse sollte unter Berücksichtigung neuester Erkenntnisse erweitert und eventuell korrigiert werden. Da Hbn bereits in Zusammenhang mit den PHK-gründenden P2m- und P2l-Pionierclustern gebracht wurde, sollten auch die übrigen Pioniercluster auf die Expression von Hbn untersucht werden. Bezüglich der Bildung der PHK sollten in dieser Arbeit die Ereignisse in der Mittellinie hochauflösend betrachtet werden. Dabei sollte sowohl der Aufenthaltsort Hbn-positiver Pionierzellen, deren genaue Anzahl und Bewegung weiter ergründet und im Vergleich zu den übrigen Axontrakten, die noch nicht verfolgt wurden, detailliert beschrieben werden. Die Analyse der *hbn*-Mutanten sollte ebenfalls erweitert werden, dabei steht der beobachtete, protocerebrale Phänotyp im Vordergrund. Das in *hbn*-Mutanten veränderte Protocerebrum sollte durch Kombinationen

von neuronalen Markern und durch die für diese Untersuchung geeignetere konfokale Mikroskopie detailliert betrachtet werden. Dadurch sollte der Verlust des anterioren PC genauer untersucht und eingehend beschrieben sowie der Beginn der protocerebralen Veränderung ermittelt werden. Die Ursachen für den Verlust der neuronalen Masse sollten weiter durch Verwendung geeigneter Marker analysiert werden. Dazu sollte im ersten Ansatz das anteriore PC auf Proliferation Hbn-positiver, protocerebraler Zellen im Wildtyp und der Mutante untersucht und verglichen werden. Ferner sollten weitere Apoptose-Marker zur Anwendung kommen, um eine apoptotische Ursache für den PC-Phänotyp erstmals beweisen oder endgültig widerlegen zu können. Um wichtige regulatorische Bereiche des *hbn*-Gens aufdecken zu können, sollte unter Verwendung von Konstrukten mit *hbn*-spezifischen, genomischen Bereichen ein Rettungsansatz durchgeführt werden.

In einem zweiten Abschnitt der Arbeit werden Untersuchungen von larvalen Gehirnen durchgeführt. Dort sollte die Expression von Drx und Hbn vergleichend betrachtet und ebenfalls auf Zonen mit gemeinsamer Expression untersucht werden. Die zugehörigen Zelltypen sollten analog der embryonalen Entwicklung bestimmt werden. Die larvale Expression sollte weiter mit geeigneten, spezifischen Markern und im Vergleich zu Faktoren mit ähnlicher Expression untersucht werden. Bereits vorliegende mutante Allele der 57B-TF sollten zur Induktion von mutanten MARCM-Klonen dienen, die nach Vergleich mit wildtypischen Klonen eventuell einen larvalen Phänotyp in den verschiedenen Geweben mit 57B-TF-Expression ergeben sollten.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Antikörper für Fluoreszenzfärbungen

3.1.1.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
Asense (Ase)	Kaninchen	1:5000	Brand et al., 1993 Donor: Gudrun Viktorin
Beta-Galactosidase (beta-Gal)	Maus	1:1000	Promega
Beta-Galactosidase	Kaninchen	1:1000	ICN
bp102	Maus	1:4	DSHB
Dachshund (Dac)	Maus	1:10	DSHB
Dcp-1	Kaninchen	1:100	Cell Signaling
Distalless (Dll)	Meerschwein	1:500	Panganiban et al., 1994 Donor: Richard Mann
Deadpan (Dpn)	Meerschwein	1:500	unveröffentlicht, Donor: Jürgen Knoblich
Deadpan	Ratte	1:1	Boone und Doe, 2010 Donor: Bruno Bello
Drosophila retinales Homeoboxgen (Drx)	Ratte	1:200	Uwe Walldorf Davis et al., 2003
Drx 1.8	Kaninchen	1:400-1:1000	Uwe Walldorf
DrxC	Kaninchen	1:1000	Uwe Walldorf
Embryonic Lethal Abnormal Vision (ELAV)	Ratte	1:30	DSHB
Engrailed (En)	Maus	1:10	DSHB
Eyes absent (Eya)	Maus	1:10	DSHB
Eyeless 1.7 (Ey)	Kaninchen	1:1000	Uwe Walldorf
Ey eyBE	Kaninchen	1:100	Eva Steinmetz, AG Walldorf
FasziklinII (FasII)	Maus	1:4	DSHB
grün fluoreszierendes Protein (GFP)	Huhn	1:500	Abcam Viktorin et al., 2011 Donor: Gudrun Viktorin

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
GFP	Kaninchen	1:2000	Molecular Probes
HRP-FITC	Ziege	1:100	ICN/Cappel
Homeobrain (Hbn)	Meerschwein	1:1000	Petra Kaspar, AG Walldorf
Hbn N/C	Kaninchen	1:1000	diese Arbeit
Neurotactin (Nrt) bp106	Maus	1:25 (1:200 für Konzentrat)	DSHB
Orthopedia (Otp)	Meerschwein	1:200-400	Nicole Bach Uwe Walldorf
Prospero (Pros)	Maus	1:10	DSHB
Phospho-Histon-H3 (pH3)	Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology
reversed polarity (Repo)	Maus	1:10	DSHB
Twin of eyeless (Toy)	Meerschwein	1:200	Uwe Walldorf
Toy	Kaninchen	1:200	Jacobsson et al., 2009 Donor: Åso Rasmuson- Lestander
22C10	Maus	1:5	DSHM

3.1.1.2 Sekundäre Fluoreszenzantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
anti Maus Alexa Fluor®488/568/647	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes/Invitrogen
anti Maus biotinyliert	Pferd IgG	1:1000	Vector Labs
anti Meerschwein Alexa Fluor® 488/568/647	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes/Invitrogen
anti Meerschwein biotinyliert	Ziege IgG	1:1000	Vector Labs
anti Kaninchen Alexa Fluor® 488/568/647	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes/Invitrogen
anti Kaninchen biotinyliert	Ziege IgG	1:1000	Vector Labs
anti Huhn 488	Ziege IgG	1:1000	Molecular Probes/Invitrogen
anti Ratte Alexa Fluor® 488/568/647	Ziege IgG	1:1000	Molekular Probes/Invitrogen

3.2 Verwendete Organismen

3.2.1 Bakterienstämme

Bei den verwendeten Wirtsbakterien handelt es sich um Derivate von *E. coli* K-12.

DH5α: (supE44 Δlac U169 (Φ80lacZ) ΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)

Verwendet für die Transformation von Plasmidvektoren (Hanahan, 1983).

3.2.2 Fliegenstämme

3.2.2.1 lacZ-Reporterstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>hbn-H4-35-lacZ</i>	P{H-Pelican- <i>hbn34G10</i> }	diese Arbeit
<i>hbn-H4-45-lacZ</i>	P{H-Pelican- <i>hbn35A03</i> }	diese Arbeit
<i>svplacZ</i>	$w^{1118};$ P{w[+mW.hs]=lwB}svp ^{AE127} /TM3, Sb ¹	Heberlein et al., 1991 Mlodzik et al., 1990
<i>tIIlacZ</i>	P{tII-lacZ.P1}	Rudolph et al., 1997

3.2.2.2 Gal4-Reporterstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
238YGal4	P[238Y-Gal4]	Yang et al., 1995; Donor: James Douglas Armstrong
<i>apterous apGal4</i>	$\gamma^1 w^{1118};$ P{w[+mW.hs]=GawB}ap[md544]/CyO	Calleja et al. 1996 BL 3041
<i>brain specific homeobox bshGal4</i>	P{bsh-Gal4.H}	Hasegawa et al., 2011 Donor: Makoto Sato
<i>deadpan dpnGal4</i>	P{dpn-Gal4.B}	Ethan Bier; Hasegawa et al., 2011 Donor: Makoto Sato
<i>distalless dIIGal4</i>	P{ry+t7.2=PZ}DII01092 cn1/CyO; ry506	Calleja et al. 1996 V. Rodriguez, BL 3038
<i>drifter drfGal4</i>	P{drf-Gal4.H}	Hasegawa et al., 2011 Donor: Makoto Sato
<i>engrailed enGal4</i>	w^* ;P{en2.4-Gal4}e16E	BL 30564
<i>homothorax hthGal4</i>	P{Gal4}hth ^{GAL4.H}	Hasegawa et al., 2011 Donor: Makoto Sato
<i>inscuteable inscGal4</i>	w^* ;P{w[+mW.hs]=GawB}insc[1407]	BL 8751

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>nabGal4</i>	w^* ; P{GawB}nab[NP3537] / TM6, Sb ¹ Tb ¹	DGRC 104533

3.2.2.3 UAS-Effektorstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
UAScd8GFP	$\gamma^1 w^*$; Pin ^{yt} /Cyo; P{w[+mC]=UAS-cd8::GFP.L}LL6	BL 5130, 5136, 5137 Lee und Luo, 1999
UASdrx1	P{UAS- <i>drx</i> }	Andrea Kiewe AG Walldorf
UASnGFP/ UASStingerGFP	P{UAS-GFP.nls}2	BL 4775/6 Barolo et al., 2000
UASnlacZ	P{UAS-lacZ.NZ}20.1	Donor: S. Hayashi

3.2.2.4 Mutanten

Allel	Genotyp	Herkunft
<i>drx</i> ¹⁰¹⁵⁵	Cyo	Uwe Walldorf
<i>hbn</i> ⁴⁰²⁸	Cyo/(<i>otplacZ</i>) oder CyO/GFP	Uwe Walldorf
<i>hbn</i> ¹⁵²²⁷	Cyo/(<i>otplacZ</i>) oder CyO/GFP	Uwe Walldorf

3.2.2.5 FRT-Rekombinanten für MARCM und TUG-Treiberstämme

Allel	Genotyp	Herkunft
FRT- <i>drx</i> ¹⁰¹⁵⁵	FRTG13	Uwe Walldorf
FRT- <i>hbn</i> ⁴⁰²⁸	FRTG13	Uwe Walldorf
FRT- <i>hbn</i> ¹⁵²²⁷	FRTG13	Uwe Walldorf
FRT-Del1A	FRTG13	Uwe Walldorf
TUG-G13	FRTG13, tub-Gal80_LL2/(Cyo, actGFP_JMR1); tubP-Gal4_LL7, UAS-cd8::GFP_LL6/TM6, Tb, Hu	BL 5140 Donor: Bruno Bello
FRT-G13	w^* ; P{FRT(<i>w</i> ^{hs})}G13	BL 1956 Donor: Bruno Bello

3.2.2.6 Fluoreszenzrekombinanten

Rekombinante	Genotyp	Herkunft
PCNA-GFP	$y^1 w^*$; P{w[PCNA.ΔNhe::GFP]T110	BL 25749 Donor: Gudrun Viktorin
R45F08xUAScd8GFP [pointed (pnt)-Gal4]	p{GMR45F08-Gal4}attP2	BL 49565 Donor: Gudrun Viktorin

3.2.2.7 Sonstige Fliegenstämme:

Stamm	Genotyp	Herkunft
Wildtyp (wt)	yw^{67c23}	Uwe Walldorf
Balancerstamm 2. Chr.	$yw^{1118}; Sco/CyO; +/+$	Uwe Walldorf
Balancerstamm 3. Chr.	$w^{1118}; +/+; TM6B Tb/TM3 Sb$	Uwe Walldorf

3.2.3 Verwendete DNA-Klone

3.2.3.1 Vektoren

Bezeichnung	Vektorkarte	Verwendung
pCR [®] 2.1 (Invitrogen)	<p>The diagram shows a circular plasmid vector with the following features: a P promoter, a lacZ gene, an FT ori (F factor origin), a Kanamycin resistance gene, an Ampicillin resistance gene, and a pUC ori (polycloning site).</p>	Klonierung von PCR-Produkten

3.2.3.2 Verwendete Primer

Primer	Verwendung	Sequenz
hbn5	Nachweis von 34G10 aus geno. DNA	CAGCTGCCGTTTGGCTTTCG
hbn7	Nachweis von 35A03 aus geno. DNA	GCACTTGCAGGTGTGGTTCC
hbn7A	Amplifikation des hbn^{4028} Genlokus	CTACAACCTCATCTCTAAACTCCC
hbn8A		GATAGATTCTGCGGATAGCCGG
M13-20 IRD700	Sequenzierung des hbn^{4028} Genlokus	GTA AACGACGGCCAGT
M13-RP IRD 800		GGAAACAGCTATGACCATG

Primer	Verwendung	Sequenz
pHP3'	Nachweis der pHPelican-Konstrukte	GAATTGTCGCTCCGTAGACGAAGC

3.2.4 Verwendete Lösungen

3.2.4.1 Kulturmedien

Zu sterilisierende Medien wurden autoklaviert (mit * markiert). Als Lösungsmittel diente H_2O_{dest} , soweit nicht anders angegeben.

Antibiotikastammlösungen:

Ampicillin: 100mg/ml Ampicillin-Natriumsalz in H_2O_{dest}

Kanamycin: 100mg/ml Kanamycinsulfat in H_2O_{dest}

LB-Medium/LB-Agar*:

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt/ 1,5 % Bacto-Agar

Apelsaft-Agarplatten:

80ml Apfelsaft werden mit 8g Zucker aufgekocht und zu 8g in 250ml H_2O durch Autoklavieren gelöstem Agar-Agar gegeben und erneut aufgekocht. Das abgekühlte Gemisch wird etwa 5mm hoch in Petrischalen gegossen und bei 9°C aufbewahrt.

Drosophila-Futtermedium:

64g Fadenagar in 5l H_2O lösen, anschließend 176g Rübensirup und 640g Malzextrakt zugeben. 144g Trockenhefe, 80g Sojamehl und 640g Maismehl in 3l H_2O vermischen und zum Fadenagar-Rübensirup-Malzextrakt-Gemisch geben und aufkochen. Wenn das Gemisch auf 60°C abgekühlt ist, werden 50ml Propionsäure und 24g Nipagin (4-Hydroxybenzoesäuremethylester) zugegeben und das fertige Futter in Portionen von etwa 15ml pro Kulturröhrchen abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 18°C.

SOC-Medium*:

10mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$, 2,5mM KCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton; nach Autoklavieren Zugabe von 20mM Glucose

3.2.4.2 Lösungen und Puffer

Alkalische Lyse:

GTE-Puffer:

50mM Glukose, 25mM Tris-HCl und 10 mM EDTA

NaOH/SDS-Lösung:

200 mM NaOH, 1%(w/v) SDS

KAc-Lösung:

40ml H₂O_{dest}, 29,5 ml Eisessig → pH mit KOH auf 4,8 einstellen, ad H₂O_{dest} 100ml

Agarosegelelektrophorese:

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10mg/ml in H₂O (4°C, lichtgeschützt)

Stopp-Lade-Puffer (6x):

10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerin, 0,17% (w/v) Bromphenolblau und 0,17% (w/v) Xylencyanol

TAE-Puffer (10x):

400mM Tris-HCl (pH 7,4), 200mM Natriumacetat und 10mM EDTA

Antikörperfärbung und Fixierung von biologischem Material:

Formaldehyd-Lösung:

37% Formaldehyd in H₂O_{dest}

Paraformaldehydlösung:

0,8g PFA in 10ml H₂O_{dest} lösen und sukzessive Zugabe von 150µl 1M NaOH bei 37°C

PBB:

PBS + 0,03% (v/v) Triton X-100 + 5% Pferdeserum

PBL*:

100mM Phosphatpuffer pH 7,4*, 100mM Na₂HPO₄ und 100mM NaH₂PO₄

3,6g Lysin-HCl in 100ml H₂O_{dest} lösen;

Zugabe von 100mM Na₂HPO₄ bis pH= 7,4, ad auf 200ml*

PBS (10x)*: (Angaben für 1l)

18,6mM NaH₂PO₄ (2,56g), 84,1mM Na₂HPO₄ (11,94g) und 1750mM NaCl (102,2g) → pH 7,4

PBX:

PBS + 0,3% (v/v) Triton X-100

PEM*:

100 mM Pipes, 1mM EDTA und 1mM MgSO₄

PLP:

3 Teile PBL (900ml) zu einem Teil PFA-Lösung (300µl)

Herstellung kompetenter Bakterien:

Puffer 1 zur Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):

100mM RbCl₂, 30mM Kaliumacetat, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂ (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), 15% (v/v) Glycerin (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes); pH 5,8 mit verdünnter Essigsäure einstellen

Puffer 2 zur Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):

10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl₂, 15% (v/v) Glycerin (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes); pH 6,5 mit verdünnter KOH einstellen

Präparation von genomischer DNA:

Lysispuffer*:

100mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM EDTA, 100mM NaCl und 0,5% (w/v) SDS

Kaliumacetat-Lösung*:

5M KAc

Lithiumchlorid-Lösung*:

6M LiCl

TE-Puffer*:

10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0

Sequenzierung:

APS-Lösung:

10% (w/v) APS in H₂O_{dest} (-20°C)

10x TBE:

900 mM Tris-HCl, 900 mM Borsäure und 100 mM Na₃-EDTA

3.2.4.3 Verwendete Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNA Cycle Sequencing Kit	Jena Bioscience GmbH (Jena)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
peqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)

3.2.4.4 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Binokular Stemi 2000	Zeiss (Oberkochen)
Biometra Tpersonal Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen)
Bio-rad My cycler™ Thermal Cycler	Bio-rad (München)
Bio-rad Photometer SmartSpec™ 3000	Bio-rad (München)
Bio-rad Power-Supply	Bio-rad (München)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Eppendorf 5415R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Mastercycler Personal	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf miniSpin plus Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Zentrifuge 5702	Eppendorf (Hamburg)
Gel-Elektrophorese-System	Peqlab (Erlangen)
Gyro Mini Nutating Mixer	Labnet International Inc. (Oakham, Rutland, UK)
Heizschrank Celsius 2000	Memmert (Schwabach)
Kamera U-CMAD3 (CC-12 Soft Imaging System)	Olympus (Hamburg)
Konfokalmikroskop LSM710	Zeiss (Oberkochen)
Konfokalmikroskop SP5	Leica (Wetzlar)
LI-COR 4300 DNA Analyzer	LI-COR (Bad Homburg)
Mikroskop BX 61	Olympus (Hamburg)
Mikroskop SZX 12	Olympus (Hamburg)
Peqlab Multi-Shaker Rotator RS-24	Peqlab (Erlangen)
Schüttelinkubator Unitron	INFORS (Einsbach)
Sorvall [®] Evolution RC-Kühlzentrifuge	Sorvall (Langenselbold)
UV-Gel-Dokumentationssystem Intas Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)
Vortex Rührer, Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)

3.2.4.5 Bezugsquellen

Chemikalien:

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe); Becton, Dickinson and Co. (Heidelberg); Sigma Aldrich GmbH (Seelze)

Enzyme und Feinchemikalien:

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Geneaid Biotech Ltd. (New Taipei City, Taiwan), GenScript (Piscataway, New Jersey, USA), Invitrogen GmbH (Darmstadt), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Qiagen GmbH (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), Vector Labs Inc. (Burlingame, CA, USA)

3.2.5 Methoden

Molekulare Methoden

3.2.5.1 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Gel aus 1% Agarose gelöst in 1x TAE-Puffer, welches in der Elektrophoresekammer (Peqlab) mit 1x TAE überschichtet wurde. Um eine Größenbestimmung zu ermöglichen, wurde der Marker GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas) mit definierter Bandengröße parallel zu den Proben aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung zwischen 80 und 150V, wobei die DNA mit 6x Stopp-Lade-Puffer versetzt wurde. Das finale Sichtbarmachen der DNA, was die Analyse und Dokumentation des Gels ermöglichte, erfolgte nach 15min Färbung des Gels in einer Ethidiumbromidlösung (0,1% (v/v) Ethidiumbromid-Stammlösung in 1x TAE). Die aufgetrennten DNA-Banden im Gel wurden auf einem Intas-Geldokumentationssystem durch UV-Licht, welches mit einer Kamera zu Dokumentationszwecken festgehalten wurde, detektiert.

3.2.5.2 Alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979)

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu erhalten, wurde die alkalische Lyse angewandt. Die Zellernte erfolgte aus 1ml Kulturvolumen durch kurzes Zentrifugieren in einem Reaktionsgefäß bei 13000Upm. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100µl GTE-Puffer aufgenommen. Die Pellets wurden so lange auf dem Vortex-Rührer (Vortex Genie 2, Scientific Industries) resuspendiert, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte.

Anschließend wurden 200µl einer NaOH/SDS-Lösung zugegeben und 5min inkubiert. Im folgenden Schritt wurden 150µl Kaliumacetat-Lösung (KAc) addiert. Die Inkubation erfolgte 5min auf Eis, anschließend wurde die Lösung 10min bei 4°C und 13000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 800µl Ethanol versetzt, 2min bei RT inkubiert und darauf 5min bei 13000Upm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die gewünschte Plasmid-DNA. Diese wurde getrocknet, in 20µl H₂O_{dest} aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die ebenfalls enthaltene RNA wurde bei der Gelelektrophorese durch im Gel-Lade-Puffer enthaltene RNase abgebaut.

3.2.5.3 Erzeugung von 3'-Adenosin-Überhängen

Die zur Amplifikation von DNA-Sequenzen verwendete *Pfu*-DNA-Polymerase erzeugt anders als die *Taq*-DNA-Polymerase keine 3'-A-Überhänge. Um die amplifizierten DNA-Fragmente dennoch in einer TOPO[®]-Reaktion verwenden zu können, wurden die 3'-A-Überhänge nachträglich angebracht. Zu diesem Zwecke wurde der gesamte Reaktionsansatz nach vollendeter PCR (3.2.5.8) zusammen mit 1µl 10mM dATP und 1µl *Taq*-Polymerase (5U/µl, GenScript) für 10min bei 72°C inkubiert.

3.2.5.4 TOPO[®]-Klonierung

Eine besondere Art der Ligation, die zur Klonierung und Vermehrung von hergestellten Inserts nach PCR dient, ist die TOPO[®]-Reaktion. Hier werden DNA-Fragmente, die aufgrund der Herstellung durch die DNA-Polymerase eine einzelne 3'-überhängende Adenosin-Base tragen, in den pCR[®]2.1 Vektor mit 5'-Thymin-Überhang eingebracht. Dazu wurden 0,5 bis 4µl PCR-Produkt mit 1µl Vektor-DNA, 1µl Ligationspuffer und 1µl T4-DNA-Polymerase ad 10µl H₂O_{dest} bei 14°C ü.N. zur Reaktion angesetzt. 2µl des fertigen Reaktionsansatzes wurden zu 100µl DH5α gegeben, gemischt, 30min auf Eis inkubiert und nachfolgend für 30sec bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Anschließend wurden die Zellen kurz auf Eis abgekühlt, 250µl SOC-Medium hinzugefügt, 1h bei 200Upm und 37°C inkubiert, anschließend auf Kanamycin-haltigen (50µg/ml) Agarplatten ausplattiert und ü.N. im Brutschrank inkubiert. Die Bestätigung positiver Integration erfolgte durch beta-Galactosidase vermittelte Blau-Weiß-Selektion. Dazu wurde auf den Platten IPTG (100mM in DMSO, 40µl/Platte) und X-Gal (40mg/ml, 40µl pro Platte) vor dem Auftragen der Bakterien ausplattiert.

3.2.5.5 Plasmidisolierung mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit

Für den Erhalt großer Mengen reiner DNA wurde diese mittels des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus 250ml einer Übernachtskultur isoliert.

3.2.5.6 Plasmidisolierung mittels peqGold Plasmid Miniprep Kit

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA aus Bakterien wurde diese mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) nach Herstellerangaben aus 10ml einer Übernachtskultur isoliert.

3.2.5.7 Präparation genomischer DNA

Zur Extraktion von genomischer DNA aus Fliegen wurden 15 durch CO₂ betäubte Fliegen in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dort wurden sie mit 200µl Lysispuffer vermengt und darauf mit einem Mikropistill (Eppendorf) mechanisch zerrieben, bis nur noch Flügel und Chitinpanzerreste zu sehen waren und die Flüssigkeit annähernd homogen erschien. Anschließend erfolgte eine 30min Inkubation auf dem Heizblock bei 65°C, woraufhin 400µl einer Mischung aus 6M LiCl und 5M KAc (2,5:1) zugeführt wurden. Nach gründlichem Mischen folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 10min. Hierauf wurde die Lösung 10min bei 13000Upm abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dem Überstand wurden 300µl Isopropanol zugesetzt und die Lösung weitere 15min bei 13000Upm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet, danach in 50µl destilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.5.8 PCR

Der spezifischen Vervielfältigung von definierten DNA-Sequenzen dient die Polymerase-Ketten-Reaktion (**p**olymerase **c**hain **r**eaction, PCR). Zur Katalyse dieses Prozesses wird die hitzestabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die sog. *Taq*-Polymerase (Saiki et al., 1988) verwendet. Für die Amplifikation von genomischen Abschnitten der *hbn*-Mutante zur nachfolgenden Sequenzierung wurde die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, da diese über eine Proofreading-Funktion verfügt (Lundberg et al., 1991).

Reaktionsmix:

PCR-Puffer (10x):	5µl
3'-Primer:	1µl (50pmol/µl)

5'-Primer:	1µl (50pmol/µl)
dNTPs:	1µl (10mM)
Template:	1µl (5µl bei genomischer DNA)
Polymerase:	1µl (5U/µm)
H ₂ O _{dest} :	ad 50µl

Reaktionsbedingungen:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
Denaturierung	3min	95°C	1
Denaturierung	1min	95°C	} 30
Annealing	1min	je nach verwendeten Primerpaaren	
Elongation	1min/kb <i>Taq</i> -Polymerase 3min/kb <i>Pfu</i> -Polymerase	72°C <i>Taq</i> -Polymerase 68°C <i>Pfu</i> -Polymerase	
Finale Elongation	10min	72°C bzw. 68°C	1
Lagerung	∞	4°C	1

3.2.5.9 Restriktionsverdau

Zur Fragmentierung von DNA im Zuge einer Klonierung werden Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese werden meist aus Bakterien gewonnen, da diese sie zur Abwehr von viraler Fremd-DNA einsetzen. Jedes vorhandene Enzym erkennt eine spezifische DNA-Sequenz und schneidet diese so, dass entweder glatte oder einsträngig überhängende Enden entstehen, die sog. blunt ends bzw. sticky ends. Diese Schnittsequenzen zeichnen sich meist durch einen palindromischen Aufbau aus.

Restriktionsansatz:

Puffer (10x):	1µl
Enzym 1:	1µl
Enzym 2:	1µl
DNA:	1µl (1µg)
H ₂ O _{dest} :	ad 20µl

Die Probe wurde 1h bei 37°C inkubiert und anschließend mit RNAse-haltigem Stopp-Lade-Puffer versehen.

3.2.5.10 DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktionen für die Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) wurden mit Hilfe des DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) unter Einsatz Fluoreszenz-markierter

Primer durchgeführt. Pro Ansatz wurden in je einem Reaktionsgefäß 4µl G-, A-, T- bzw. C-Terminationsmix vorgelegt. Ein Mastermix aus 100ng Template-DNA, 4µl 10x Sequenzierpuffer, 1µl Primer IRD800 (2pmol/µl), 1µl Primer IRD700 (2pmol/µl) sowie 1µl Sequencingpolymerase, ad 20µl H₂O_{dest}, wurde vorbereitet und von diesem jeweils 4µl zu den vorgelegten Terminationsmischen gegeben.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
Denaturierung	2min	95°C	1
Denaturierung	30sek	95°C	} 25
Annealing	30sek	je nach verwendeten Primerpaaren	
Elongation	60sek	72°C	

Die Reaktionen wurden im Bio-rad My cyclerTM Thermal Cycler durchgeführt. Im Anschluss wurden je 4µl Stop Solution hinzugefügt, die DNA bei 90°C für 2min denaturiert und auf das Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen. Zur Herstellung eines Sequenziergels wurden 25,2g Harnstoff mit 6ml LongRangerTM Gel Solution (Lonza) und 6ml 10x TBE in H₂O_{dest} gelöst und auf ein Gesamtvolumen von 60ml gebracht. Nach Filtration der Gellösung wurde diese mit 400µl APS und 40µl TEMED zur Polymerisation versetzt. Im Sequenzierautomaten (LI-COR 4300 DNA-Analyzer) wurde die Elektrophorese in 1x TBE Laufpuffer bei 1500V/50W über maximal 10h durchgeführt. Eine Auswertung der Sequenzen erfolgte manuell.

3.2.5.11 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Im Vorfeld der Transformation müssen chemisch kompetente Zellen hergestellt werden. Dazu werden die Bakterien entsalzt, um ihre Membran zu destabilisieren, was den Plasmideintritt erleichtert. Bakterienzellen der verwendeten *E. coli*-Stämme wurden mit der nachfolgenden Methode behandelt, um ihnen die Fähigkeit zu verleihen, Plasmid-DNA aus der sie umgebenden Lösung aufzunehmen:

10ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie einer Ausstrichplatte der jeweiligen Zellen inokuliert und bei 37°C und 200Upm ü.N. geschüttelt. Mit 2ml dieser Kultur wurden 200ml LB-Medium angeimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte OD600 von 0,5 bis 0,7, entsprechend der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien, inkubiert. Nach dem Überführen in vorgekühlte Zentrifugenbecher wurden die Zellen 5min auf Eis gekühlt und anschließend 5min bei 4°C mit 6000xg (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-

Rotor) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 80ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (5min, 4°C, 6000xg). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 8ml kaltem Puffer 2 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 250µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Kompetenzkontrolle der Bakterien, gemessen in Kolonienzahl/µg DNA:

Zur Transformation von je 100µl Zellen wurden verschiedene Verdünnungsstufen (10ng, 1ng, 100pg und 10pg) einer Plasmid-DNA eingesetzt und die Transformationsansätze auf antibiotikumhaltigen Agarplatten (entsprechend der Resistenz des Plasmids) ausplattiert. Weitere 100µl Zellen wurden ohne Plasmid-DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Am nächsten Tag erfolgte das Auszählen der Kolonien; eine Transformationseffizienz von beispielsweise 1×10^7 Kolonien/µg DNA lag vor, wenn bei 10pg DNA ~ 100 Kolonien gezählt werden konnten.

Transformation:

Die bei -80°C gelagerten, chemisch kompetenten Zellen wurden unmittelbar vor der Transformation mit dem zu transformierenden Vektor zusammengegeben und auf Eis für 30min inkubiert. Für einen Ligationsansatzes (TOPO®-Reaktion) wurde die komplette Reaktion (10µl) zu 100µl auf Eis aufgetauten Bakterien gegeben, für eine Plasmidlösung wurden 1-2µl in Abhängigkeit der Konzentration (ad 10µl H₂O_{dest}) zugegeben. Um den Plasmiden, die sich während der Inkubation auf Eis auf den Bakterien ablagern, den Eintritt in die Bakterienzellen zu ermöglichen, wurde für 90sec ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Unmittelbar darauf erfolgte für 5min eine erneute Inkubation auf Eis, anschließend wurden 200µl SOC-Medium zugeführt und die Bakterien für 1h bei 37°C und 200Upm geschüttelt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Bakterien entsprechend der Plasmid-vermittelten Resistenz auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden ü.N. über Kopf bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Zur Analyse auf Transformationserfolg wurden gewachsene Kolonien in Flüssigmedium angezogen und durch alkalische Lyse auf das Vorhandensein von Plasmid-DNA hin untersucht.

Immunhistochemische Methoden

3.2.5.12 Fixierung von biologischem Material und Antikörperfärbungen

Im Zuge der Anfertigung dieser Arbeit wurden Antikörperfärbungen an fixierten *Drosophila*-Embryonen sowie larvalen und adulten *Drosophila*-Gehirnen durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte dazu beschrieben.

3.2.5.12.1 Fixierung von Embryonen

Um Embryonen zu erhalten, wurden die jeweiligen Fliegenstämme oder Kreuzungen über Tag (ü.T.) (~8h) und über Nacht (ü.N.) (~14h) auf mit Hefe bestrichenen, gezuckerten Apfelsaftagarplatten in geschlossenen, belüfteten Gelegebechern gehalten. Nach Wechseln der Platte des Gelegebeckers wurden diese allgemein bei 4°C aufbewahrt und die Embryonen verschiedener Ablegezeitpunkte gemeinsam zur Fixierung eingesetzt. Um das Chorion der Embryonen zu entfernen und die Embryonen für die folgende Fixierung zugänglich zu machen, wurden diese Embryonen mit einer Lösung aus 50% Leitungswasser und 50% Hypochloridlösung (DanKlorix) für etwa zwei Minuten in der Petrischale inkubiert. Die Entfernung des Chorions wird durch Aufschwimmen der Embryonen in der Lösung angezeigt. Um die Embryonen zu sammeln, wurde die Lösung der einzelnen Platten nacheinander durch ein Auffangnetz gegossen; die darin zurückgehaltenen Embryonen wurden mit Embryonenwaschlösung von den Resten der Hypochloridlösung befreit. Anschließend wurde das Auffangnetz mit den Embryonen in ein vorher vorbereitetes Reaktionsgefäß mit Fixierlösung gegeben. Letztere ist ein zweiphasiges Gemisch mit einer wässrigen Phase, die aus 630µl PEM-Fixierpuffer und 70µl 37% Formaldehyd in H₂O_{dest} besteht. Die wasserunlösliche Phase besteht aus 700µl Heptan. Durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen des Auffangnetzes wurden die Embryonen abgelöst und anschließend für 12min auf einem Überkopfmischer (Rotationsmischer, Peqlab Multi-Shaker Rotator RS-24) inkubiert, wobei sich die Embryonen an der Phasengrenze sammelten. Nach Abschluss der Fixierphase wurden beide Phasen der Lösung abgezogen und durch je 700µl Heptan und Methanol ersetzt. Daraufhin wurde das Reaktionsgefäß heftig geschüttelt, um die Vitellinmembran der Embryonen durch starke Scherkräfte zu entfernen. Die derart behandelten Embryonen wurden nach Entfernung des Methanol/Heptan-Gemisches dreimal mit 1ml Methanol gewaschen und in 1ml frischem Methanol bei -20°C eingefroren, bis sie zur Färbung wieder aufgetaut und rehydriert wurden.

3.2.5.12.2 Antikörperfärbung von PEM-fixierten Drosophila-Embryonen

Die in Methanol eingefrorenen Embryonen wurden nach Entfernung des gesamten Methanols mit 1ml 0,3% PBX rehydriert und anschließend sechs Mal für mindestens 30min in 0,3% PBX unter Bewegung auf einem Taumler (Gyro Mini Nutating Mixer, Labnet) gewaschen, um die Permeabilisierung des Gewebes zu gewährleisten, die ein Eindringen des Antikörpers ermöglicht. Zum Entfernen der jeweiligen Waschlösung wurden die Reaktionsgefäße kurz senkrecht abgestellt und mehrmals zwischendurch schräg gedreht, um an der Oberfläche der Waschlösung verbliebene Embryonen sedimentieren zu können. Nach den Waschschrritten erfolgte eine 30min Inkubation in 0,3% PBX mit 5% Pferdeserum, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken und die Spezifität der anschließenden Antikörperinkubation zu erhöhen. Darauf erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern ü.N. bei 4°C. Die Antikörper wurden gemeinsam in 0,3% PBX mit 5% Pferdeserum in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle prim. Antikörper, 3.1.1.1) und Volumen (je nach Menge der zu färbenden Embryonen) gelöst und auf die vollständig von der Blockinglösung befreiten Embryonen gegeben, kurz gemischt und auf einen Taumler gelegt, der die weitere Durchmischung der Embryonen erlaubte.

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Antikörperlösung abgenommen und durch 0,3% PBX zum Waschen und Entfernen nicht gebundener Antikörper ersetzt. Dies erfolgte mindestens sechs Mal für 30min. Danach erfolgte wieder ein analoger Blockingschritt, anschließend wurden die sekundären, fluoreszenzgekoppelten Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle sek. Antikörper, 3.1.1.2) und entsprechendem Volumen auf die Embryonen gegeben und ü.N. bei 4°C taumelnd inkubiert.

Nach Beendigung des Übernachtschrittes wurde die Antikörperlösung entfernt, die Embryonen wurden wiederum mindestens sechs Mal mit 0,3% PBX gewaschen. Anschließend wurde die Waschlösung abgehoben, einmal mit PBS gewaschen, um Reste des Detergenz zu entfernen und ein entsprechendes Volumen (je nach Menge der Embryonen, 25-50µl) Vectashield® Fluoreszenzmountingmedium (Vector Biolabs) zugegeben, welches spezielle Epoxidharze enthält, um ein Ausbleichen der Farbstoffe durch entstehende Sauerstoffradikale bei der mikroskopischen Aufnahme zu verhindern. Die verwendete Antikörperlösung wurde bei 4°C gelagert und für weitere Experimente so lange eingesetzt, bis eine Schwächung der Signalstärke zu beobachten war.

Die Embryonen in Vectashield wurden nun mittels einer schräg abgeschnittenen, gelben Pipettenspitze (200µl) in einem Volumen von 80µl aufgezogen, mäanderförmig auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Deckglas und Objektträger wurden mit Nagellack (Maybelline New York, Express Finish 40) dauerhaft verbunden; das fertige Präparat wurde bis zum Mikroskopieren und auch danach bei -20°C konserviert.

3.2.5.12.3 Fixierung larvaler und adulter Gehirne

Larven des entsprechenden Entwicklungszeitraums (L1-L3) des jeweiligen Stammes oder der jeweiligen Kreuzung wurden aus dem Futterröhrchen mit einer gebogenen Pinzette (Dumont, INOX, Größe 7) vorsichtig entnommen und in ein mit PBS befülltes, auf Eis gekühltes Glasblockschälchen (Neolab) überführt. Die anliegende Temperatur beendete alle Bewegungen der Larve und erhielt das Gehirn bis zu seiner Entnahme in einem unveränderten Zustand. Zur Präparation des Gehirns wurde die Larve immer noch in PBS mit zwei Pinzetten (Dumont, INOX-H, Größe 3) etwa nach einem Drittel der Larvenlänge, gemessen von der anterioren Seite, zerteilt, wobei die linke Pinzette die vordere Larvenhälfte geschlossen hielt und die rechte Pinzette das hintere Ende abriss. Danach wurde der vordere Teil der Larve auf den Boden des Blockschälchens gelegt und mit der linken Pinzette die Kutikula um die Mundhaken festgehalten, während die rechte Pinzette von außen auf die Mundhaken drückte, was zu einem Zurückweichen dieser im Kutikulaschlauch der Larve führte, bis die Mundhaken schließlich mitsamt anliegender Speiseröhre und Speicheldrüsen, Gehirn mit Imaginalscheiben, Oesophagus und Magen, Fettkörper und den übrigen Imaginalscheiben in einer Einheit aus der posterioren Öffnung der zerteilten Larve heraustraten. Von den Mundhaken wurden die Speicheldrüsen entfernt, Teile des Fettkörpers und der Magen wurden vom Oesophagus abgetrennt, der Rest wurde an den Mundhaken gegriffen und auf diese Weise das Gehirn in eiskaltes PBS überführt. Alle Gehirne der jeweiligen Präparation wurden so lange in PBS aufbewahrt, bis sie schließlich gemeinsam der Fixierung zugeführt wurden. Dazu wurde das eiskalte PBS entfernt und durch 900µl PBL und 300µl 8% Paraformaldehyd, was zusammen die Fixierlösung ergab, ersetzt. In dieser Lösung wurden die Gehirne eine Stunde bei Raumtemperatur oder ü.N. bei 4°C unter ständiger Bewegung des Reaktionsgefäßes auf dem Taumler (Gyro Mini Nutating Mixer oder Clay Adams® Nutator) fixiert.

Nach Beendigung der Fixierung wurde die Fixierlösung vollständig abgehoben und die Gehirne wurden drei Mal mit 0,03% PBX gewaschen, um Reste der Fixierlösung zu entfernen,

daraufhin drei Mal mit Methanol gewaschen, woraufhin sich die ursprünglich durchsichtigen Gehirne weiß verfärbten und gut erkennbar blieben. Danach konnten die Gehirne eingefroren oder zur Färbung weiterverwendet werden. Zur Präparation von adulten Gehirnen wurde der Kopf von mit CO₂ betäubten Fliegen abgetrennt und in einen Objektträger mit Kavität, der mit 50µl 1x PBS gefüllt war, überführt. Die Gehirne wurden durch Entfernung des Kopfskeletts freipräpariert und analog zu den larvalen Gehirnen fixiert.

3.2.5.12.4 Färbung larvaler und adulter Gehirne

Im ersten Schritt der Färbung wurden die Gehirne mindestens sechs Mal mit 0,3% PBX für jeweils eine halbe Stunde zur Permeabilisierung gewaschen; ein 30min Blockingschritt in 0,3% PBX mit 5% Pferdeblutserum folgte der Permeabilisierung. Antikörperlösungen aus 0,3% PBX mit 5% Pferdeblutserum wurden in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 3.1.1.1) und entsprechendem Volumen (je nach Anzahl der zu färbenden Gehirne 100-200µl) zugegeben und ü.N. bei 4°C inkubiert. Die fertig inkubierten Gehirne wurden vollständig von der Antikörperlösung befreit und wiederum mindestens sechs Mal mit 0,3% PBX gewaschen und anschließend zur Vorbereitung der Inkubation mit sekundären Antikörpern geblockt. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern erfolgte analog zu der mit primären Antikörpern.

Die gefärbten Gehirne wurden wiederholt gewaschen. Anschließend wurde das 0,3% PBX durch 0,03% PBX ersetzt und die Gehirne nach Überführung mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze (1000µl) in einem Blockschälchen mit feinen Pinzetten (Dumont, INOX-H, Größe 5) freipräpariert. Dazu wurden alle Imaginalscheiben vom Gehirn abgetrennt, das Gehirn vom Verbund aus Mundhaken und Schlund gelöst, kurz in PBS vom Detergenz befreit und vorsichtig mit der Pinzette auf einen vorbereiteten Objektträger mit aufgespotteten 12µl Vectashield überführt. An dieser Stelle musste mit Bedacht entschieden werden, ob das Gehirn mit der ventralen oder dorsalen Seite nach oben liegen sollte und eine entsprechende Ausrichtung erfolgen. Waren alle Gehirne überführt, so wurden mit einer Spritze (2,5ml Spritze plus Nadel von Braun Melsungen AG) um den Präparatebereich mehrere kleine Punkte Vaseline als Abstandhalter für das Deckglas aufgebracht, damit die Gehirne nicht gequetscht wurden. Auf diese wurde das Deckglas äußerst vorsichtig aufgesetzt, angedrückt und das Präparat direkt mit Nagellack verschlossen. Das so angefertigte Präparat konnte nun bei -20°C konserviert oder zur Mikroskopie herangezogen werden. Die Färbung adulter Gehirne erfolgte analog zu der Färbung larvaler Gehirne.

3.2.5.13 Tyramid Signal Amplifikation (TSA, Perkin Elmer)

Manche Antikörper lassen sich mit fluoreszenzgekoppelten, sekundären Antikörpern nicht bzw. nicht hinreichend oder nur unzuverlässig detektieren, sodass eine aussagekräftige Mikroskopie nicht möglich ist. Um diese schwachen Signale zu verstärken oder nicht sichtbare, spezifische Anteile der Färbung sichtbar zu machen, kann man ein Tyramid-Verstärkungssystem verwenden. Hierbei wird die Probe zunächst normal behandelt und mit dem primären Antikörper inkubiert (siehe 3.2.5.12.2 und 3.2.5.12.4). Anders als bei der direkten Färbung mit fluoreszenzgekoppelten, sekundären Antikörpern kam hier ein biotinylierter, sekundärer Antikörper zum Einsatz (siehe 3.1.1.2). Nach Beendigung der Waschschriffe wurde die Probe nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper mit 1:200 Streptavidin-HRP in Blockinglösung inkubiert. Streptavidin bindet hochspezifisch an Biotin, sodass das Antigen über die primären und sekundären Antikörper nun zusätzlich noch mit dem Enzym HRP verbunden war. Anschließend erfolgten drei kurze Waschschriffe mit 0,3% PBX, um ungebundenes Streptavidin-HRP zu entfernen. Die eigentliche Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte erst jetzt. Dazu wurde der Tyramid-Farbstoff in einer speziellen Amplifikationslösung 1:200 verdünnt und in entsprechender Menge (je nach Zahl der Embryonen bzw. Gehirne zw. 20-200µl) auf das Präparat gegeben. HRP setzte den Farbstoff zu einem Radikal um, welches direkt in seiner Umgebung, hier dem Baum aus primärem und sekundärem Antikörper, durch Bindung abgelagert wurde. Durch diesen Prozess gelangten weit mehr Farbstoffmoleküle an den Ort des Antigens, was zu einer Verstärkung der Färbung führte und diese somit besser sichtbar machte. (Alle genannten Reagenzien sind Bestandteile des Perkin Elmer TSA-Kits).

3.2.5.14 Mikroskopie

Zur Dokumentation der fluoreszenzmarkierten Präparate wurden sowohl Auflichtfluoreszenz- (Olympus BX61) als auch konfokale Laserscanningmikroskope (Zeiss LSM 710, Leica SP5) eingesetzt. Zur Betrachtung der Fluoreszenz in Larven (MARCM-Analysen) und durch CyO-GFP-balancierte Embryonen wurde eine Auflicht-Fluoreszenzlupe (Olympus SZX 12) verwendet.

3.2.5.14.1 Fluoreszenzmikroskopie

Als Lichtquelle für Fluoreszenzmikroskope diente eine Quecksilberdampflampe, die im gesamten sichtbaren wie auch UV-Lichtbereich emittiert. Um das für die Anregung der

Fluoreszenzfarbstoffe jeweils benötigte Licht zu selektieren, kamen optische Filter zum Einsatz, welche die Wellenlänge 488, 568 und 647 aus dem emittierten Gesamtlichtstrom herausfilterten und die Probe belichteten. Das von den Farbstoffen emittierte Fluoreszenzlicht wurde mittels eines dichroitischen Spiegels von der zur Anregung verwendeten Wellenlänge getrennt und mittels einer CCD-Kamera (charge-coupled device; dt., ladungsgekoppeltes Bauteil) (Soft Imaging System, CC-12, U-CMAD3) detektiert. Ein Problem der Auflichtmikroskopie ist die Illuminierung der gesamten Probe, wobei alle im Präparat belichteten Fluorophore angeregt werden, sodass man in der jeweils eingestellten Fokusebene auch das Streulicht aus den übrigen angeregten Anteilen erhält. Eine Methode, diese Problematik zu verbessern, stellt die sog. Dekonvolution dar. Hier wurden mehrere Ebenen des Präparats mit definiertem Abstand und festgelegten Parametern (in bestimmten, durch das verwendete Objektiv vorgegebenen μm -Abständen) aufgenommen. Die Berechnung des Bildes nach Dekonvolution findet auf Grundlage der sog. Punktspreizfunktion (point spread function, Wiener Filter, Olympus) statt (Sibarita, 2005). Eine Mikroskopiertechnik, die eine definierte Anregung nur einer Fokusebene ermöglicht, stellt hingegen die sogenannte konfokale Mikroskopie dar.

3.2.5.14.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Konfokale Mikroskope werden in der Nervensystemforschung wegen der großen Problematik des Streulichtes aus anderen Präparat-Ebenen und der damit einhergehenden schweren Differenzierung der gefärbten Strukturen eingesetzt. Die Aufnahmen dieser Arbeit wurden an zwei Konfokalmikroskopen des Typs Zeiss LSM 710 und Leica SP5 durchgeführt. Zur Anregung der Fluoreszenz von EGFP und Alexa 488 kamen Argon-Laser, für TRITC (Perkin Elmer-TSA-Kit) und Alexa 568 bzw. Cy5 (Perkin Elmer TSA-Kit) und Alexa 647 Helium-Neon-Laser, die über grünes oder rotes Anregungslicht verfügen (543-, 561-, 633nm), zum Einsatz. Zur Detektion des Lichtes dienten sogenannte **Photomultiplier**terminals (PMTs) und im Fall des Leica SP5 ebenfalls ein HyD-Gasdetektor. Um das Fluoreszenzsignal aus mehreren parallelen Anregungen zu trennen, wurden die einzelnen Emissionen spektral aufgetrennt und von separaten PMTs detektiert. Zur Aufnahme der Bildstapel wurde am LSM 710 eine Lasergeschwindigkeit zw. 8 und 9 eingestellt, 2-8 Aufnahmen der jeweiligen Fokusebenen wurden gemittelt, um das Rauschen zu reduzieren. Dabei wurde eine Öffnung des Pinholes von 33-43 μm verwendet. Aufnahmen am Leica SP5 wurden bei 8000Hz konstanter Lasergeschwindigkeit mit 10-20 Aufsummierungen des Signals einer Bildzeile und 4-12-

facher Mittelung des jeweiligen Gesamtbildes durchgeführt. Bei Aufnahmen mit 400Hz Lasergeschwindigkeit wurde eine 2-6-fache Aufsummierung der Signalstärke einer Bildzeile mit einer 2-3-fachen Mittelung des Gesamtbildes verwendet. Die Auflösung des digitalen Bildes wurde in Abhängigkeit von der Größe des gescannten Objektes bzw. Objektausschnittes angepasst. So wurden in dieser Arbeit die embryonalen Gehirne mit einer Auflösung von 512x512 Pixeln ($150\mu\text{m}^2$) und die larvalen Gehirn-Hemisphären mit 1024x1024 Pixeln (je nach Stadium des Gehirns bzw. bei einer Hemisphäre von L3-Larven oder beiden Hemisphären von L1-L2-Larven $200\text{-}350\mu\text{m}^2$; bei ganzen L3-Gehirnen bzw. adulten Gehirnen $500\mu\text{m}^2$) aufgenommen. In der Z-Ebene erfolgten die Aufnahmen mit einem Abstand von $1\mu\text{m}$. In besonderen Fällen kam ein Schichtabstand von $0,5\mu\text{m}$ zur Anwendung, um lokale Besonderheiten aufzuzeigen. Am LSM 710 kam ein Objektiv mit 40x Vergrößerung für die Aufnahmen der larvalen Gehirnhemisphären, der embryonalen Gehirne sowie Teile adulter Gehirne zum Einsatz, zudem ein Objektiv mit 25x Vergrößerung für die Aufnahme ganzer L3-Gehirne. Am Leica SP5 wurde ein 63x Objektiv für die embryonalen Gehirne und die Zoomaufnahmen verwendet, außerdem ein 40x Objektiv für die Aufnahme larvaler Hemisphären sowie ein 20x Objektiv für Übersichtsaufnahmen. Alle Aufnahmen wurden mittels ImageJ bearbeitet (Schneider et al., 2012).

3.2.6 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

3.2.6.1 Fliegenzucht

Die Haltung der verwendeten Fliegenstämme erfolgte unter zwei unterschiedlichen Bedingungen. Alle Stämme, die experimentelle Verwendung fanden, wurden bei 25°C und etwa 80% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten und alle 21 Tage auf neues Futter gesetzt. Stämme, die nicht dauerhaft Anwendung fanden, wurden zur Verlängerung ihrer Generationszeit bei 18°C und etwa 65% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten und alle 28d auf neues Futter umgeschüttelt. Die Generationszeit der Fliegen im 25°C -Raum beträgt bei optimalem Verlauf etwa 10d, durch Zusätze im Futter kann sich die Generationszeit auf bis zu 14d verlängern. Im 18°C -Raum beträgt die Generationszeit etwa 21d.

3.2.6.2 Absammeln von Embryonen

Um Embryonen für Antikörperfärbungen zu erhalten, wurden die entsprechenden Fliegenstämme oder Kreuzungen in Gelegebecher gegeben und diese durch mit Hefe

bestrichene Apelsaftagar-Platten verschlossen. Die Fliegen wurden daraufhin ü.T. und ü.N. jeweils mit frischen Platten im 25°C-Raum aufbewahrt und die Platten nach Abschluss der Inkubation gewechselt. Die Platten wurden bei 4°C, was zu einem Entwicklungsstopp führte, solange gelagert, bis eine zur Fixierung geeignete Menge an Embryonen vorhanden war. Dabei wurden die Platten nicht länger als 72h aufbewahrt, um eine morphologische Veränderung der Embryonen zu verhindern. Im Falle von endogen, fluoreszenzmarkierten Embryonen wurden diese zusätzlich abgedunkelt aufbewahrt.

3.2.6.3 Absammeln von virginellen Weibchen für anschließende Kreuzungen

Einmal befruchtete *Drosophila*-Weibchen speichern den Samen des Männchens und werden fortan nur damit befruchtete Embryonen ablegen. Aus diesem Grund ist für definierte Kreuzungen der Einsatz von Jungfrauen unumgänglich. Diese können leicht von der übrigen Fliegenpopulation unterschieden werden. Frisch geschlüpfte Tiere weisen einen aufgeblähten und fast unpigmentierten Körper auf und zeichnen sich durch einen grün bis bräunlichen Fleck im Abdomen (verursacht durch das Meconium) aus. Auf diese Art können frisch geschlüpfte und mit CO₂ betäubte Tiere schnell unter dem Binokular (Zeiss) erkannt werden und müssen nur noch nach ihrem Geschlecht unterschieden werden, was sich durch geschlechtsspezifische Merkmale (Form und Pigmentierung des Abdomens sowie der Geschlechtsorgane) durchführen lässt. Die so selektierten Jungfrauen wurden in separaten Zuchtröhrchen gesammelt, mit Männchen des gewünschten Genotyps zusammengebracht und etwa 7 bis 14d bei 25°C inkubiert, bis die Nachkommen in Form von Larven oder adulten Tieren für weitere Experimente zur Verfügung standen.

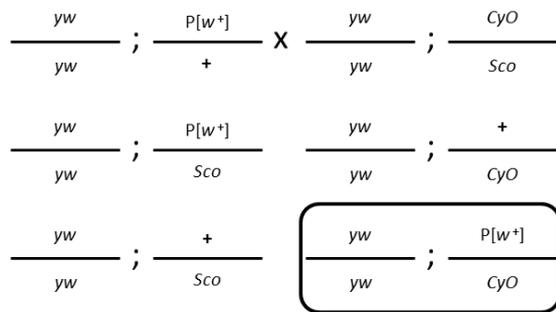
3.2.6.4 Balancierung

Um ein Konstrukt ohne Möglichkeit der Rekombination stabil im Fliegenchromosom zu halten, werden Balancerchromosomen verwendet. Darunter versteht man Chromosomen, die einen phänotypischen Marker, chromosomale Inversionen und einen rezessiven Letalfaktor tragen. Fliegen mit dem zu balancierenden Transgen wurden mit dem Balancer-Stamm, der das zugehörige Chromosom trägt, gekreuzt. Die Nachkommenschaft wurde auf das Vorhandensein der phänotypischen Marker von Transgen und Balancer hin selektiert und die entsprechenden Fliegen in einer sogenannten Selbstungskreuzung verpaart. Für das zweite Chromosom wurden *yw*; *Sco/CyO*; *+/+* (Fliegen mit gebogenen Flügeln) und für das

dritte Chromosom $w^{1118}; +/+; TM6BTb/TM3Sb$ (gestauchte Fliegen, kurze Borsten) verwendet bzw. $w^{1118}; +/+; CxD/TM3$ (CxD , Dichaete, lateral abstehende Flügel) (Abb.3.1).

Testkreuzung mit dominantem Marker für das 2. Chr.

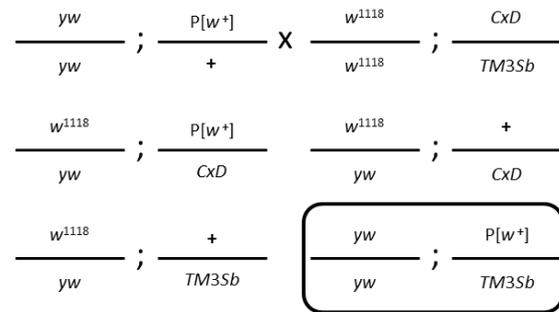
1.) Einkreuzen des Balancers in die heterozygote Linie



Phänotyp: rote Augen, nach oben gebogene Flügel

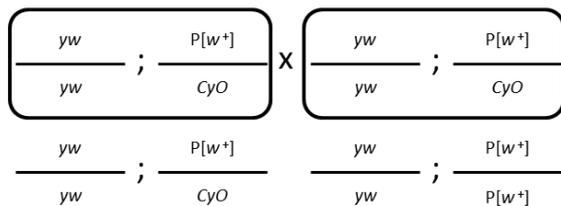
Testkreuzung mit dominantem Marker für das 3. Chr.

1.) Einkreuzen des Balancers in die heterozygote Linie



Phänotyp: rote Augen, kurze Borsten

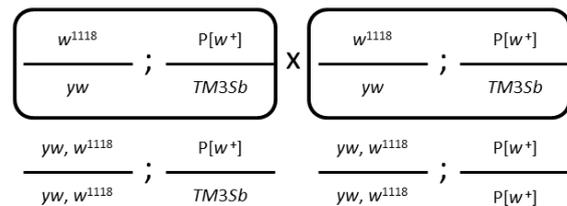
2.) Selbstung der merkmals tragenden Nachkommenschaft



Phänotyp: rote Augen, nach oben gebogene Flügel

Phänotyp: rote Augen,

2.) Selbstung der merkmals tragenden Nachkommenschaft



Phänotyp: rote Augen, kurze Borsten

Phänotyp: rote Augen,

Abb.3.1: Kreuzungsschema zur Balancierung von transgenen Tieren. Transformierte Fliegen werden sowohl mit einem zweitchromosomalen (hier: $yw; Sco/CyO$) als auch mit einem drittchromosomalen Balancerstamm (hier: $w^{1118}; CxD/TM3Sb$) gekreuzt. Die F^1 -Generation wird nach Tieren, die sowohl den Marker des Transformationsvektors (rote Augen, $P[w^+]$) als auch den des Balancerchromosoms tragen (nach oben gebogene Flügel, CyO ; kurze Borsten, $TM3Sb$) selektiert. Diese Fliegen werden untereinander weitergekreuzt. Wurde das transgene Konstrukt in das zweite Chromosom integriert, so treten in der F^2 -Generation der Kreuzung ausschließlich rotäugige Fliegen mit geraden Flügeln (homozygot) oder nach oben gebogenen Flügeln (heterozygot) auf. Wurde das transgene Konstrukt in das dritte Chromosom integriert, so treten in der F^2 -Generation ausschließlich Fliegen mit roten Augen und normalen Borsten bzw. im heterozygoten Fall Tiere mit roten Augen und kurzen Borsten auf.

3.2.6.5 Keimbahntransformation

Um transgene Fliegen zu erzeugen, injiziert man Embryonen im synzytialen Blastodermstadium eine Plasmidlösung in den posterioren Pol, da dort die Polzellen entstehen, die den Vorgänger der Keimzellen darstellen. Im Prinzip können zwei Techniken unterschieden werden: die P-Element-vermittelte Transformation (Rubin und Spradling, 1982), die zufällig an einem nicht vorbestimmten Locus eine Insertion von fremder DNA schafft und die $\phi C31$ -vermittelte Insertion, bei der die DNA des Injektionsstammes geprüfte

und für die Konstruktexpression optimierte Attachment-Sites trägt, in die das Transformationsplasmid gerichtet integriert wird. Bei der P-Element-Transformation ist eine Transposase für die Integration verantwortlich. P-Elemente existieren von Natur aus im Genom von *Drosophila melanogaster*, was erstere zu einem idealen Vektor machte. Ein Problem der Transposase enthaltenden P-Elemente ist allerdings das zufällige Weiterspringen der Vektoren im Genom nach erfolgter Integration wegen der anhaltenden Expression der Transposase. Dieses Problem wurde gelöst, indem dem Transformationsvektor die Transposase-Aktivität entfernt und der Injektion ein Helferplasmid beigegeben wurde, das über eine Transposase verfügt, jedoch selbst nicht integrationsfähig ist, und daher bald in den Zellen verloren geht und somit nur transient die für die Integration notwendige Transposase liefert.

Der gerichteten Transformation stehen verschiedene Integrationsorte auf den jeweiligen Chromosomen zur Verfügung. So sind für alle vier Chromosomen mehrere Integrationsorte vorhanden. Die gerichtete Transformation nutzt ein bakteriophages Integrationssystem bestehend aus der ϕ C31-Integrase, die eine sequenzdirigierte Integration zwischen der bakteriellen Attachment-Site (*attB*) und der Phagen-Attachment-Site (*attP*) leistet. Ein bedeutender Unterschied zu anderen Integrasen/Transposasen ist, dass ϕ C31 nur die Integration, nicht aber die Exzision katalysiert. Neben dem genannten Vorteil ist die Integrase stabil in den Transformationsstamm eingebracht, sodass weder Helferplasmide noch eine für die Integrase codierende mRNA benötigt werden (Bischof et al., 2007; Groth et al., 2004).

Die Injektionen der Transformationen wurden von BestGene (Chino Hills, CA, USA) ausgeführt.

3.2.6.6 Letalitätsanalyse

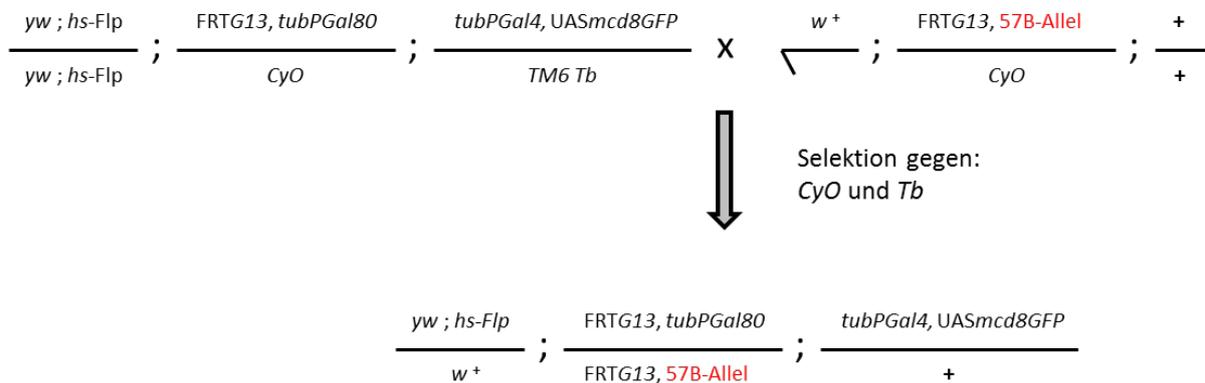
Um festzustellen, wann eine Mutation zum Absterben des sich entwickelnden Organismus führt, wird eine Letalitätsanalyse durchgeführt. Diese wird auch zur Ermittlung des Rettungspotentials von spezifischen Rettungs-Elementen verwendet. Dazu wurden die Fliegen des balancierten, mutanten Stammes abgesammelt. Ausgehend von diesen Platten wurden direkt mit einem Platinspatel 100 Embryonen von der Platte abgehoben und auf eine neue überführt, wobei exakt zehn Reihen von jeweils zehn Embryonen mit gleichem Abstand zueinander ausgelegt wurden. Es wurden mehrere Ansätze parallel angefertigt. Die Platten mit den angeordneten Embryonen wurden bei 25°C für weitere 24h inkubiert und

danach untersucht. Dazu wurden alle nicht geschlüpften Embryonen gezählt. Die Platten wurden nach weiteren 24h ein weiteres Mal untersucht und eventuell verzögert geschlüpfte Spezimen der ersten Zählung zuaddiert. Von embryonaler Letalität wird gesprochen, wenn nur 50% der angeordneten Embryonen zu Larven schlüpfen, was bedeutet, dass die homozygot mutanten und homozygot mit Balancerchromosom versehenen Tiere sterben und nur heterozygote Individuen überleben.

3.2.6.7 MARCM

Um wildtypische bzw. für ein spezifisches Gen mutante, GFP-markierte Klone von larvalen NB-Lineages zu erhalten, wurden die entsprechenden Stämme mit FRT-markiertem Chromosom mit bzw. ohne Mutation mit dem Treiberstamm gekreuzt (Abb.3.2,A). Dieser enthält neben analogen FRT-Stellen den spezifischen *tubulinGal4*-Treiber (panneuraler Treiber; *tubPGal4*), ein UAS*Gal80*- und ein UAS*cd8GFP*-Reporterkonstrukt sowie eine Hitzeschock-aktivierbare Flippase (*hs-Flp*) (Lee und Luo, 1999 und 2001).

A



B

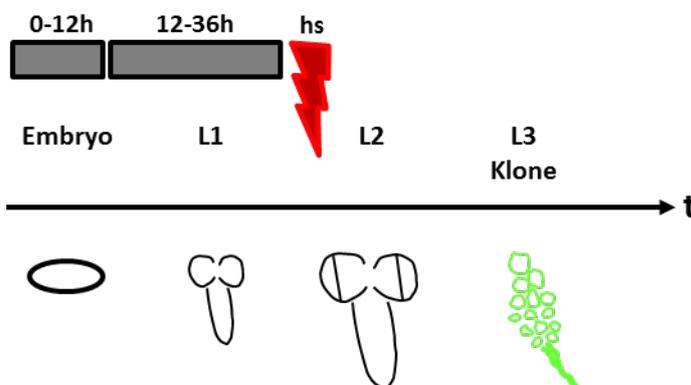


Abb.3.2: Kreuzungsschema der MARCM-Analyse. (A) Kreuzung zwischen dem MARCM-Treiberstamm und wildtypischem oder mutantern (*57B-Allel*) Stamm des zweiten Chromosoms. Die F¹-Generation wird gegen die Marker *CyO* und *Tb* selektiert. (B) Darstellung der zeitlichen Zusammenhänge zwischen organischer Entwicklung und Kloninduktion durch Hitzeschock (*hs*) nach Bello et al., 2006.

Die Embryonen aus dieser Kreuzung wurden auf Apfelsaftagarplatten ü.T. und ü.N. gesammelt. Die Platten wurden anschließend für 24h bei 25°C inkubiert, um L1-Larven zu erhalten (Abb.3.2,B). Diese Larven wurden auf der Platte für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die **Hitzeschock-gesteuerte Flippase (hs-FLP)** zu aktivieren (Abb.3.2,B). Anschließend wurden die Larven mittels Hefe angelockt und anteilig auf ausgestochenen Agarstücken auf Futterröhrchen verteilt. Die Larven wurden weiter bei 37°C in Futterröhrchen gehalten, bis die entwickelten L3-Larven zu ihrer Verpuppung das Futter verließen (Abb.3.2,B). Diese Larven wurden unter der Fluoreszenzlampe untersucht, Larven mit sichtbaren Klonen wurden in eisgekühltes PBS überführt, um anschließend präpariert und fixiert zu werden. Allgemein benötigen auf diese Weise mit cd8GFP markierte und fixierte Klone keine weitere Färbung mittels Antikörpern; die Fluoreszenz kann direkt detektiert werden.

3.2.6.8 Kreuzung für den Rettungsansatz

Zur Kontrolle der drittchromosomalen P[acman]-Rettungskonstrukte auf embryonale Rettung der *hbn*-Mutanten (2. Chr.) wurden diese nach Transformation und Balancierung in die Mutante eingekreuzt. Abb.3.3 zeigt das gesamte Kreuzungsschema mit beiden Kreuzungen.

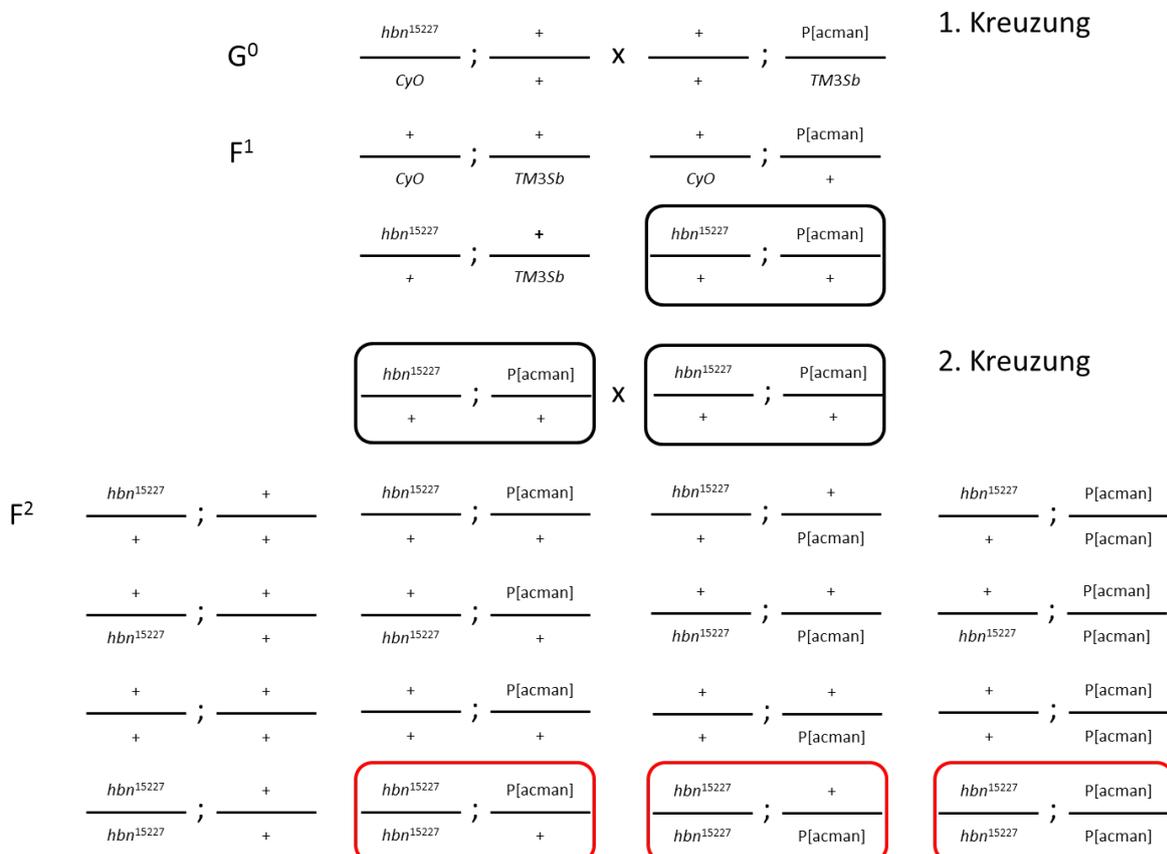


Abb.3.3: Kreuzung für den Rettungsansatz. Die F^1 -Generation der Ausgangskreuzung zwischen der zweitchromosomal balancierten (*CyO*) Mutation und dem drittchromosomal inserierten P[acman]-Rettungskonstrukt (*TM3Sb*) wird nach Fliegen ohne Balancerphänotyp (ohne gebogene Flügel und ohne kurze Borsten) abgesucht (schwarzer Rahmen). Die gefundenen Jungfrauen und Männer der F^1 -Generation wurden zur zweiten Kreuzung herangezogen, deren Embryonen gesammelt wurden. In dieser F^2 -Generation kommen 25% homozygot für *hbn* mutante Fliegen vor, von denen 18,75% ein Rettungskonstrukt tragen. Eine Rettung durch das Konstrukt ist somit in 18,75% der homozygot mutanten Nachkommenschaft (rote Kästen) der Fall, was einer Letalität von 6,25% entspricht.

3.2.6.9 Rekombination

Zur Herstellung von dauerhaft fluoreszenten Fliegenstämmen ausgehend von Gal4-Reporterkonstrukten und UAS-Fluoreszenzreportern kann die genetische Rekombination in der weiblichen Keimbahn ausgenutzt werden (Morgan, 1914). Dazu wurden die jeweiligen Konstrukt-tragenden Linien verkreuzt, ihre Nachkommen (Larven) mittels des Fluoreszenzbinokulars auf Fluoreszenz untersucht und die entsprechenden Jungfrauen mit *yw*-Fliegen rückgekreuzt. Im Fall einer erfolgreichen Rekombination konnte Fluoreszenz in den Larven der Folgegeneration festgestellt werden. Die jeweiligen Männchen wurden mit Jungfrauen des entsprechenden Balancerstammes gekreuzt und geselbstet.

3.2.6.10 Selektion von Mutanten durch ein fluoreszenzmarkiertes Balancerchromosom

Allgemein werden Mutationen wie auch Vektorinsertionen durch Balancerchromosomen vor einem möglichen Verlust durch Rekombination geschützt bzw. um sie auf dem Chromosom zu erhalten, wenn die Mutation oder Insertion homozygot letal ist. Diese Balancerchromosomen tragen bestimmte Marker, die sich phänotypisch im Stamm zeigen. So haben beispielsweise Fliegen, die mit dem zweitchromosomalen, *CyO*-markierten Balancerchromosom ausgestattet sind, gebogene Flügel. Im Fall einer balancierten Mutation können homozygot mutante Embryonen durch einen Fluoreszenzmarker (Horn et al., 2000) selektiert werden, da sie im Gegensatz zu den heterozygoten oder homozygoten Tieren keine Fluoreszenz zeigen. Um die Embryonen zu selektieren, wurden die entsprechenden Mutantenstämme ü.N. und ü.T. in Gelegebechern gehalten, die Agarplatten mit den Embryonen für weitere 24h bei 4°C inkubiert, was zu einer weiteren Reifung der Fluoreszenzproteine und damit zu einer besser detektierbaren Fluoreszenz führte. Die Selektion erfolgte unter dem Fluoreszenzbinokular und alle nicht leuchtenden Embryonen wurden vorsichtig mit einer Präpariernadel auf eine neue Agarplatte überführt und dort bis zur anschließenden Fixierung aufbewahrt. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein Absammeln der Embryonen jeweils nicht länger als 20min pro Platte in Anspruch nahm und

die Platte danach wieder auf 4°C gebracht wurde, um einer Veränderung bzw. Weiterentwicklung der Embryonen vorzubeugen.

3.2.6.11 UAS-Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993)

Das UAS-Gal4-System bedient sich des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4, der nach Bindung an die **upstream activating sequence (UAS)** die Expression eines Gens auslöst. In *Drosophila* wird durch transgene Elemente eine zeitlich und räumlich definierte Expression von Reporter genen, Genen oder shRNA ermöglicht (Duffy et al., 2002). In der Anwendung wird der Fliegenstamm, der das **Gal4 (G4)**-Konstrukt unter Kontrolle eines genetischen Enhancers trägt, Treiberlinie genannt, der Fliegenstamm, der UAS-Bindestellen und das zugehörige Element trägt, als Effektorstamm bezeichnet.

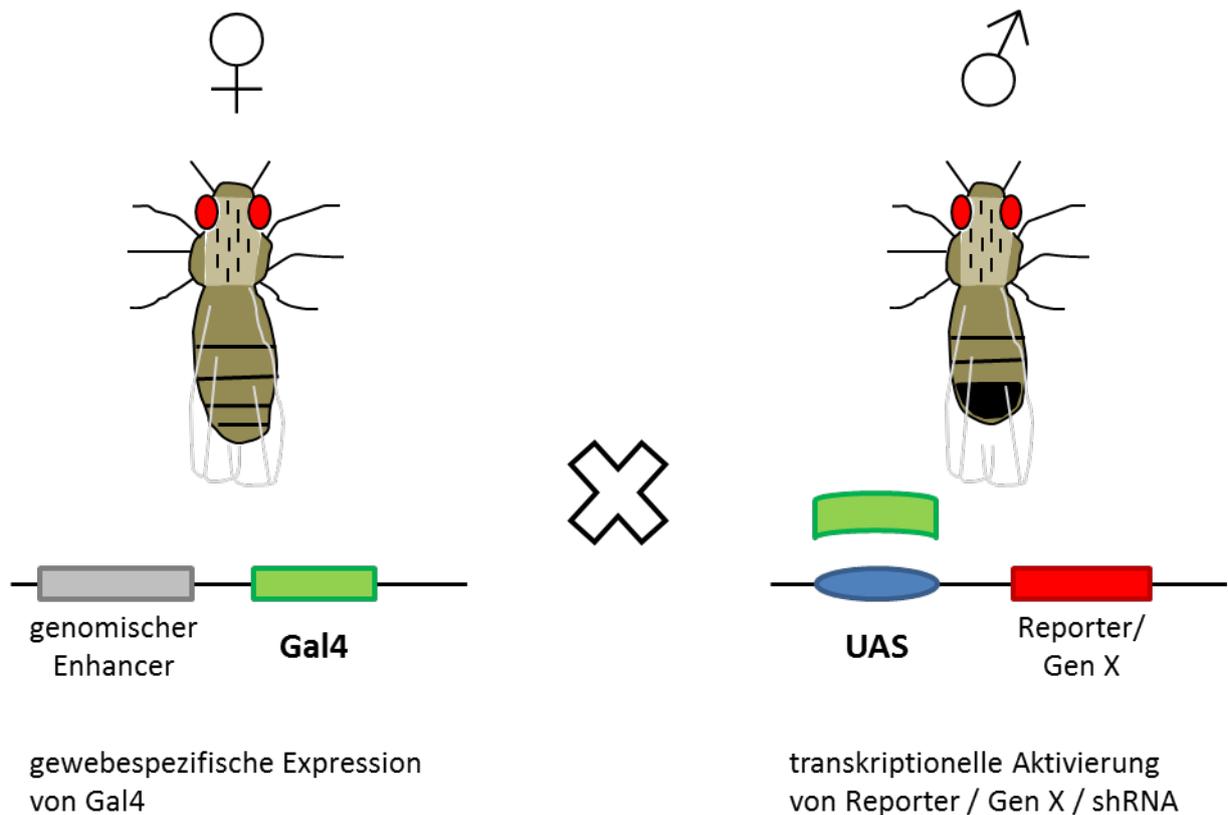


Abb.3.4: Funktionsweise des UAS-Gal4-Systems. Durch Kreuzung der Treiberlinie mit der Effektorlinie werden die beiden Systemkomponenten in den F¹-Fliegen zusammengebracht und das gewünschte Protein oder die gewünschte shRNA unter Kontrolle und somit des zeitlichen und räumlichen Musters des genetischen Enhancers exprimiert.

4. Ergebnisse

Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine vorangegangene Untersuchung zur Funktion des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors Homeobrain in der Entwicklung des embryonalen Gehirns (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Dort noch ungeklärte Fragestellungen sollten jetzt unter Berücksichtigung inzwischen erweiterter Kenntnisse bzgl. der verwendeten Marker und weiterführender Experimente beantwortet werden. Diese fortführenden Analysen beziehen sich unter anderem auf die Dynamik des embryonalen Expressionsmusters, welche bisher durch sechs exemplarische Entwicklungsstadien nicht vollständig aufschlussreich veranschaulicht wurde. Die bisher bestehende Feinkartierung der embryonalen Expression sollte nun im Vergleich zu anderen Nervensystem-spezifischen Transkriptionsfaktoren fortgesetzt werden. Ein weiterer Aspekt war in der begonnenen Zelltypanalyse zu sehen, die das Vorhandensein von Hbn-positiven GMC im SAG nicht bestätigte und deren korrekte Differenzierung gegenüber Neuronen nicht leistete. Die Untersuchung der *hbn*-Mutanten wurde hier durch Kombinationen von Markern und mittels höherer Auflösung ausgedehnt, um vorrangig Art und Ausmaß des protocerebralen Phänotyps, der bisher nur wenig beschrieben ist, deutlicher charakterisieren zu können. Zentrale Fragestellungen vor diesem Hintergrund waren die Betrachtung der Proliferation von Hbn-positiven Stammzellen im Verlauf der Entwicklung des PC und die Klärung von Ursachen und Entstehungszeitpunkt der phänotypischen Aberration. Die Betrachtung Hbn-positiver Pionierneurone beim Aufbau der präoralen Hirnkommissur sollte in dieser Studie um den Vergleich mit den übrigen am Strukturaufbau beteiligten Axontrakten erweitert werden. Dabei sollten wichtige Zwischenschritte sowie der Moment der Kommissurknüpfung hochauflösend erfasst werden. Ferner sollte die embryonale Gehirnentwicklung auf Anhaltspunkte für die Expression von Hbn in weiteren Pionierclustern überprüft werden. Insgesamt sollte somit die Analyse der Funktion von Hbn bei der Bildung der präoralen Hirnkommissur sowie des Protocerebrums abgeschlossen werden.

4.1 Hbn zeigt ein dynamisches Muster in der embryonalen Kopfregion

Die Genexpression von *homeobrain* wurde erstmals über die gesamte embryonale Entwicklung durch *in situ* Markierung der mRNA ermittelt (Walldorf et al., 2000). Die Dynamik des embryonalen, kopfständigen Expressionsmusters von Hbn wurde für sechs Entwicklungsstadien anhand des vollständigen Expressionsmusters durch

Fluoreszenzfärbungen auf Grundlage eines polyklonalen Antikörpers untersucht (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Dabei wurden unter Verwendung einer Bildanalysesoftware (Imaris) Raummodelle der detektierten Zellkerne erstellt. Die konkreten Veränderungen zwischen den untersuchten Stadien wurden dabei graphisch extrapoliert, sodass die Dynamik lediglich nachgestellt wurde. Ausgehend vom frühen, anterioren Streifen wurden Domänen benannt und diese verfolgt. Dabei wurden in Phasen starker Veränderung des Expressionsmusters verschiedene Zwischenschritte übergangen, die durch eine erweiterte Analyse nachgetragen werden sollten. Hier sollte das embryonale, kopfständige Muster in anterior-dorsaler Aufsicht unter Verwendung höher auflösender Objektive ab dem Zeitpunkt detektierbarer Expression im Blastodermstadium in den verschiedenen Embryonalstadien (ES) in so vielen differenzierbaren Einzelmustern wie möglich betrachtet werden, um die einzelnen, aus dem frühen Streifen hervorgehenden Expressionsdomänen und den Zeitpunkt neu entstehender Domänen zu ermitteln.

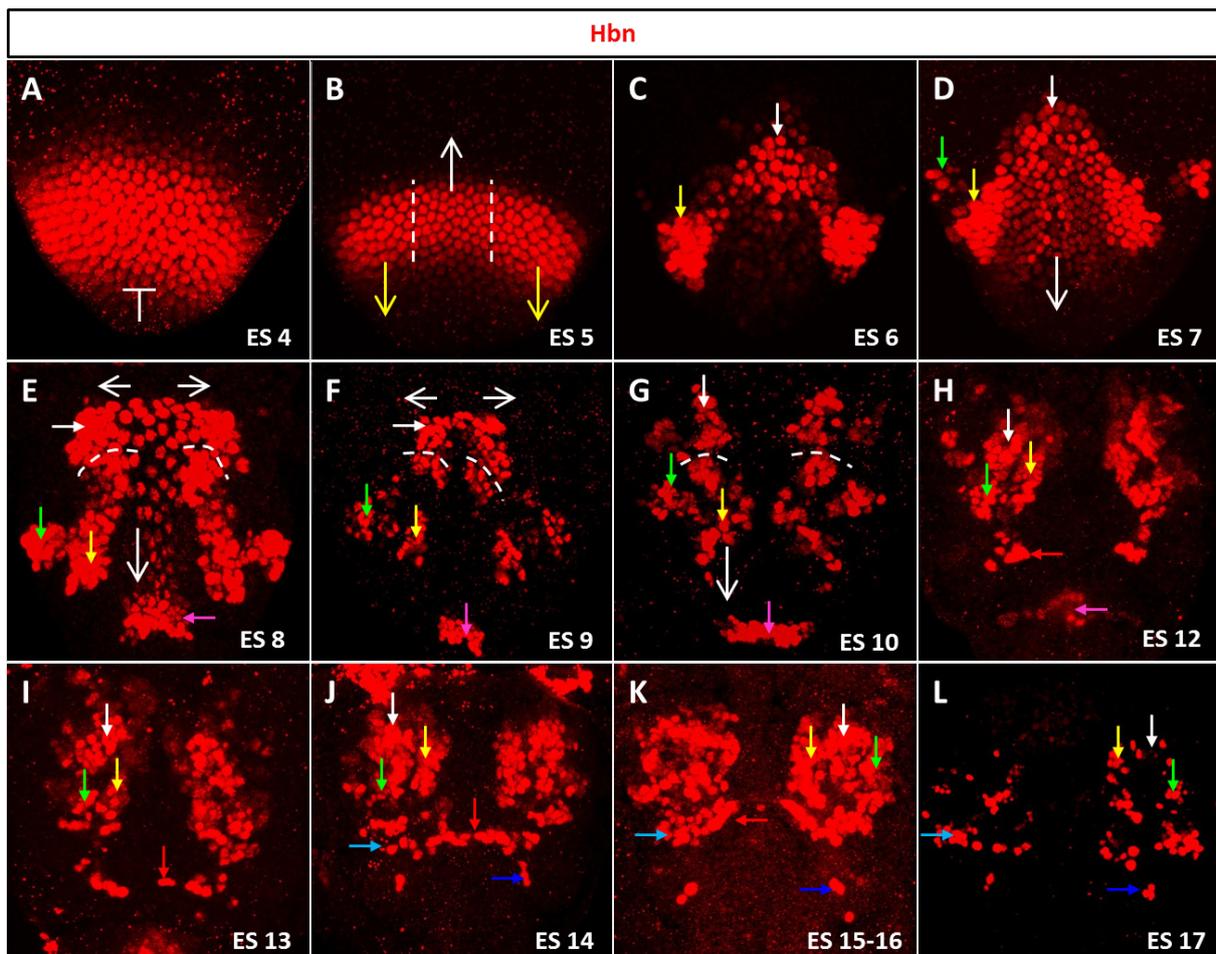


Abb.4.1: Die Dynamik des embryonalen, kopfständigen Expressionsmusters von Hbn. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) von *yw*-Embryonen in verschiedenen Embryonalstadien (ES) mit Fokus auf die Kopfregion und das entstehende embryonale Gehirn, anti-Hbn-Färbung mit TSA-Amplifikation, alle Embryonen anterior nach unten, zur Vereinfachung werden die Markierungen jeweils nur in einer Hemisphäre gesetzt: (A) Die anteriore, **frühe Kappe**, ES 4. (B) Der anteriore, **frühe Streifen**, ES 5. (C) Die **Auflösung des**

Streifens, ES 6. (D) Das **V-Muster**, ES 7. (E) Etablierung des **Multidomänen-Musters** mit verbundenen Domänen, ES 8. (F) Fokussierung des **Multidomänen-Musters**, ES 9. (G) Auflösung des **Multidomänen-Musters**, ES 10. (H) Bildung der **Hemisphärenvorsprünge**, ES 12. (I) In Mittellinie **einwandernde Zellen**, ES 13. (J) Das **Mittellinien-Muster**, ES 14, deutocerebrale und tritocerebrale Expression von Hbn entsteht. (K) Das **vollständige Muster**, ES 15-16. (L) Verminderte Hbn-Expression des **ES 17-Musters**. Gelber, grüner und weißer Pfeil zeigen mediale, laterale und zentrale PC-Domäne, roter Pfeil zeigt interhemisphärische Zellkerne, hellblauer Pfeil DC- und dunkelblauer Pfeil TC-ständige Hbn-pos. Kerne; lilafarbener Pfeil zeigt Expression im Clypeolabrum. (Pfeile mit nichtausgefüllter Spitze zeigen die Richtung der dynamischen Expressionsveränderung an; gestrichelte Linien markieren entstehende Grenzen zwischen Domänen).

Der erste Nachweis von Hbn kann als anteriorer, breiter Streifen von Hbn-positiven Zellkernen beschrieben werden, der im zellulären Blastoderm (ES 4) vorliegt und eine anteriore Repression (Abb.4.1,A, weiße Markierung) erfährt. Dadurch fokussiert sich der breite Streifen zum sog. frühen Streifen (ES 5). Dieser überspannt den Embryo anterior-dorsal und liegt somit im Bereich der späteren Kopfregion des Embryos (Abb.4.1,B). Der Streifen teilt sich in drei Domänen auf, die mit Übergangszonen geringfügiger Expression verbunden sind (Abb.4.1,C). Der frühe Streifen selbst deutet diese Domänen durch eine etwas schwächere Expression von Hbn im Zentrum im Vergleich zu den nach anterior zeigenden Flanken an (Abb.4.1,B, gestrichelte Linien). Zwei der Expressionsdomänen liegen jetzt (ES 6) an den lateralen Grenzen des vorherigen Streifens und die dritte bildet eine nach posterior verlagerte, Mittellinien-assoziierte Domäne (Abb.4.1,C, gelber und weißer Pfeil). Zusätzlich zu den bereits vorhandenen, lateralen Domänen entstehen zwei noch weiter lateral gelegene Domänen von geringer Zellkernzahl (Abb.4.1,D, grüner Pfeil). Die Mittelliniendomäne zieht sich weiter posterior zurück und zeigt dabei einen dünnen Streifen von Zellkernen entlang der Mittellinie nach anterior (Abb.4.1,D). Unmittelbar darauf bildet sich anterior, am Ende dieses Streifens, eine clypeolabrale Expressionsdomäne (Abb.4.1,E, lila Pfeil). Die beiden lateralen Expressionsdomänen verändern sich wenig, wohingegen die posteriore Mittelliniendomäne (Abb.4.1,E, weißer Pfeil) eine Erweiterung und Auseinanderstreckung zwischen ES 8 und 9 erfährt (Abb.4.1,E, weiße Pfeile). Darüber hinaus erscheint diese zu beiden Seiten der Mittellinie aufgetrennt in eine posteriore und anteriore Einheit (Abb.4.1,E, gestrichelte Linien). Der dünne Expressionstreifen, der zunächst Clypeolabrum und posteriore Mittelliniendomäne verbindet, löst sich während der beginnenden Neuroblastendelamination im Zuge der Neurogenese (ES 9) auf, wobei alle bekannten Domänen mit abgeschwächter Expression erscheinen (Abb.4.1,F). Während der Keimstreifausstreckung (ES 10) löst sich im hufeisenförmigen Muster die Verbindung über die Mittellinie auf, die Mittellinien-nahen Domänen strecken sich anterior, während sich die Clypeolabrum-Expression verbreitert (Abb.4.1,G). Mit beginnendem Keimstreifrückzug (ES

12) bilden sich in den frühen Hemisphären die mediale, laterale sowie die wenige Kerne enthaltende, zentrale Domäne weiter aus (Abb.4.1,H, gelber, grüner, weißer Pfeil). Vor diesen Domänen bilden sich aus wenigen Zellen bestehende Zellcluster, die eine zur Mittellinie geneigte Konformation aufzeigen (Abb.4.1,H, roter Pfeil). Die drei starken Domänen des anterioren Teils (gesehen an der Neuraxis) des sich entwickelnden Gehirns bleiben erhalten (ES 13). Einzig die zur Mittellinie geneigte, anteriore (gesehen an der A-P-Achse des Embryo) Domäne zeigt Zellen, die sich in der Mittellinie aufhalten (Abb.4.1,I, roter Pfeil). Nach dem Rückenschluss und der Kopfeinstülpung bildet sich aus dem zur Mittellinie erweiterten Zellcluster eine über die Mittellinie aufgereichte Ansammlung von Zellen (ES 14). Neue Anteile an Hemisphären-Expression, die den medialen, lateralen und zentralen Domänen vorgelagert sind, können beobachtet werden (Abb.4.1,J, hellblauer Pfeil). Darüber hinaus erscheinen wenige noch weiter anterior (A-P-Achse des Embryos) gelegene, Hbn-positive Zellen (Abb.4.1,J, blauer Pfeil). Das Mittellinien-ständige Muster ist an die übrigen Zellen der jetzt teils fusioniert erscheinenden, großen Expressionsdomäne aus medialen, zentralen und auch lateralen Anteilen zurückgezogen (ES 15-16). Die vorgelagerte Domäne bleibt erhalten, ebenso die anteriorste Domäne, die konstant aus drei Zellen besteht (Abb.4.1,K, blauer Pfeil). Am Ende der Embryonalentwicklung (ES 17) bleiben hauptsächlich die anterioren Domänen erhalten, während sich die großen Domänen medial und zentro-lateral fast vollständig aufgelöst haben (Abb.4.1,L, gelber, grüner, weißer Pfeil). Im Rückblick auf die hier dargestellte Veränderung des Expressionsmusters kann geschlossen werden, dass Gene der frühen, embryonalen Entwicklung die Lage und die Fokussierung des anterioren Streifens bedingen müssen. Die erste Dynamik, die Aufteilung des Streifens in die konstanten Domänen, muss auf Regulation der Genexpression beruhen, da eine Neusynthese des TF in den Übergangsstadien wahrscheinlicher ist als das Auftreten starker Proliferation. Das schnelle Verschwinden von Expression in Übergangsbereichen ist daher ebenfalls durch Herunterregulation der Expression zu erklären. Erst ab beginnender Neurogenese, die durch Delamination und anschließende Proliferation von NB erfolgt, ist vermehrt mit Proliferation von NS-ständigen Hbn-positiven Zellen zu rechnen, die zu dem sichtbar starken Anwachsen der drei konstanten Domänen führt. Diese Proliferationsereignisse sollten in separaten Experimenten bestätigt werden.

Ein Hauptunterschied zu den bereits vorgenommenen Analysen besteht in der Aufdeckung zweier zusätzlicher, differenzierbarer Muster. Zum einen existiert ein früher, breiterer

Streifen, der dem frühen Streifen unmittelbar vorausgeht. Ersterer wird in der Entwicklung schnell zum eigentlichen Streifen durch anteriore Repression der Expression fokussiert. Zum anderen entsteht am Ende der Embryonalentwicklung durch Abnahme der Anzahl von Hbn-positiven Zellkernen aus dem vollständigen Expressionsmuster ein weiteres differenzierbares Muster im ES 17. Es konnte zudem gezeigt werden, dass im Verlauf der Entwicklung aus dem frühen Streifen zusammen mit der früh lateral neu erscheinenden Domäne die protocerebralen Expressionsdomänen entstehen. Dabei bildet der nach posterior verlagerte, mediale Anteil des Streifens zuerst das Hufeisenmuster aus, welches sich in zwei posterior-mediale Domänen teilt. Diese beiden medialen bzw. lateralen Domänen des Multidomänenmusters bilden die anterioren Domänen wohingegen aus den medialen die jeweiligen Pionierzellen der Kommissurbildung hervorgehen. Im Bereich des sich entwickelnden PC sind ab ES 9 insgesamt drei stetig unterscheidbare Domänen anzutreffen: lateral, zentral und medial. Die Entstehung der deutocerebralen und tritocerebralen Hbn-Expression findet erst in ES 14 statt.

Die Veränderung des embryonalen, kopfständigen Expressionsmusters zeigte eine aus dem frühen Streifen resultierende Domänenbildung, die sich bis in späte Stadien auf das PC beschränkt. Die genaue Verteilung der Expression im PC sollte daher ergründet und in Beziehung zu den gefundenen Domänen gesetzt werden.

4.2 Hbn wird in verschiedenen Arealen des supraoesophagealen Ganglion exprimiert

Im Stadium 15 der embryonalen Entwicklung ist das embryonale Gehirn fast völlig ausgebildet und alle strukturellen Merkmale sind erkennbar. Von diesem Stadium wurde eine Hbn/HRP-Doppelfärbung angefertigt und das gesamte Gehirn von ventral nach dorsal, verglichen an der Neuraxis, also vom ventralen Cortex der Hemisphären bis zu den dorsal anliegenden optischen Loben (OL) gescannt und in Bildmontagen von je 5µm dargestellt. In diesem Stadium können die jeweils entstandenen Lineages in ihrem Verbund und die jeweilige Hbn-Expression über das supraoesophageale Ganglion dargestellt und global zugeordnet werden. In den gezeigten Bildebenen sollten die durch den panneuralen Marker HRP (Jan und Jan, 1982; Wang et al., 1994) hervorgehobenen, strukturellen Merkmale gekennzeichnet und die einzelnen Regionen mit besonders auffälliger Expression von Hbn benannt und in Bezug zu den lateralen, zentralen und medialen Domänen gestellt werden. Dadurch kann die Expression von Hbn besser kartiert und die Frage beantwortet werden, in

welchen Arealen des SAG die Expression von Hbn im Detail vorliegt und aus welcher der detektierten Hauptdomänen der PC-assoziierter Hbn-Expression sie hervorgehen.

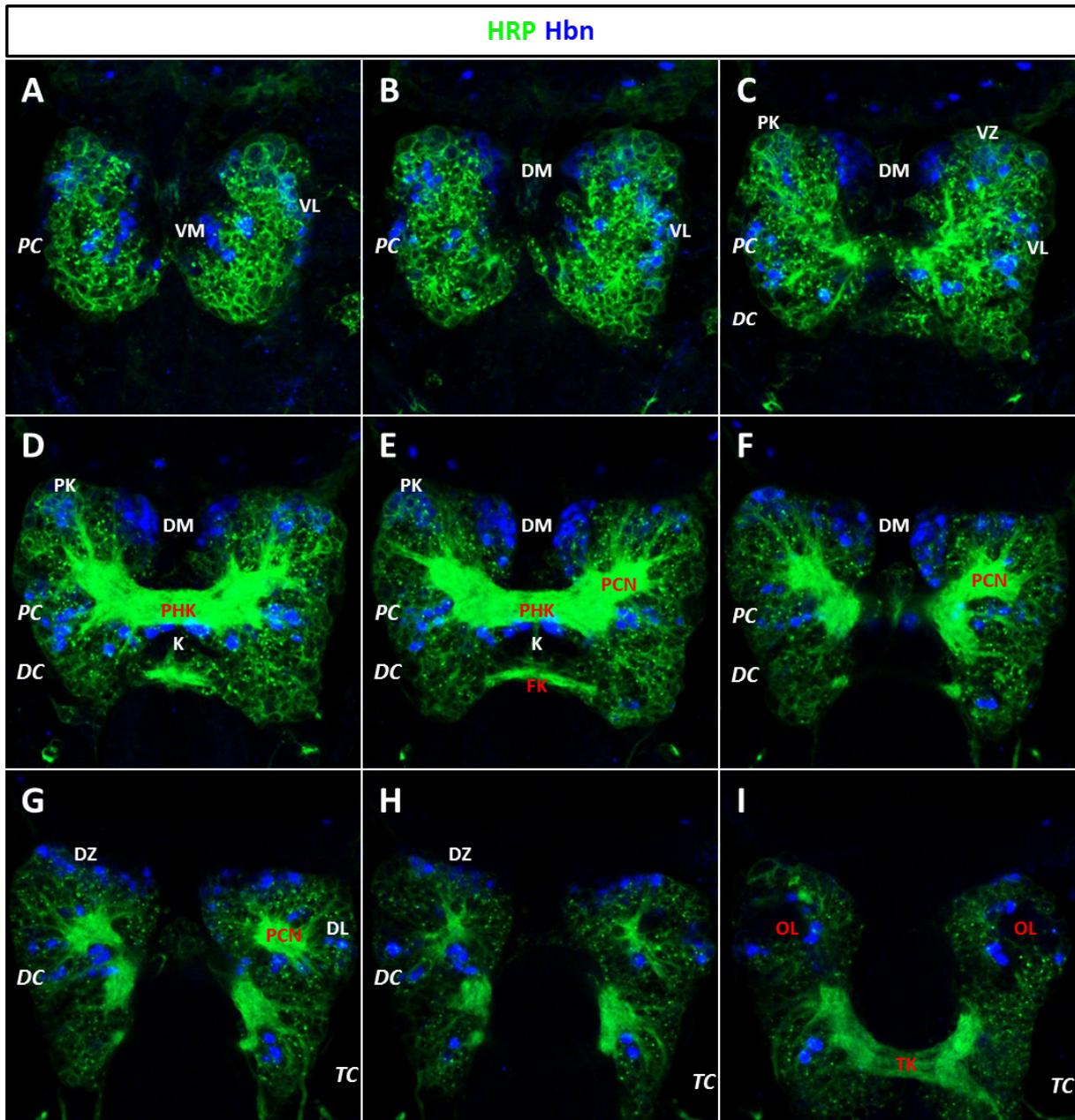


Abb.4.2: Spätes, embryonales Hbn-Expressionsmuster im SAG. Konfokale Aufnahme von ES 15 in anterior-dorsaler Aufsicht (63x) eines *yw*-Embryos. Anti-HRP-Färbung zur Visualisierung des Nervensystems und anti-Hbn mit TSA-Amplifikation. 45µm Gesamtaufnahme in neun optischen Schichten von je 5µm Schichtdicke. (DC, Deutocerebrum; DM, dorso-medial; DZ, dorso-zentral; FK, Frontalkommissur; K, Expression an Kommissur; PK, Pilzkörper; OL, optische Lobe; PHK, präorale Hirnkommissur; PC, Protocerebrum; PCN, Protocerebralkonnektiv; TC, Tritocerebrum, TK, tritocerebrale Kommissur; VL, ventro-lateral; VM, ventro-medial, VZ, ventro-zentral), Embryo anterior nach unten: (A-C) Aufsicht auf ventrale Oberfläche des embryonalen Gehirns mit medialen und lateralen Lineages im Bereich des PC sowie Beginn der dorso-medialen Expression von Hbn. (D-E) Bereich der präoralen Hirnkommissur mit sichtbaren Lineages lateral im anterioren PC sowie zentral und lateral im PC, außerdem in der Region des PK und posterior an der Kommissur in der Mittellinie zwischen den Hemisphären. (G-H) Dorsaler Teil des Gehirns mit anterior an Neuraxis befindlicher, dorso-zentraler und lateraler Hbn-Expression sowie Expression im Bereich der optischen Loben und im TC.

Auf der ventralen Oberfläche des Gehirns befinden sich zwei zur Mittellinie hin orientierte Lineages (Abb.4.2,A, **VM**) sowie zwei laterale Lineages mit Hbn-positiven Zellkernen, die den

ventralen Cortex umspannen (Abb.4.2,B, **VL**). Bereits in noch ventral gelegenen Schichten des Gehirns erscheinen die ersten Hbn-positiven Zellkerne der dorso-medialen Expressionszone, die sehr weit in den dorsalen Bereich des Gehirns hereinreichen und über der dorsal angrenzenden optischen Lobe enden (Abb.4.2,B-F, **DM**). Im ventralen Anteil kann ebenfalls im zentralen Bereich der Hemisphären eine Lineage beobachtet werden (Abb.4.2,C, **VZ**). Im Bereich des Pilzkörpers (Abb.4.2,D,E, **PK**) und seiner Hbn-Expression erscheint auch die präorale Hirnkommissur, die sich von dort an über insgesamt etwa 15µm Tiefe erstreckt (Abb.4.2,D-E, **PHK**). Mit der Kommissur assoziiert, liegen mehrere Hbn-positive Zellen über die Mittellinie (Abb.4.2,D,E, **K**) und zu deren Rand im PC verteilt, wo auch eine große Lineage beiderseits parallel zur PHK situiert ist (Abb.4.2,D-H, **PC**). In der Ebene der Kommissur kann auch das ganze dorso-mediale Muster von Hbn beobachtet werden (Abb.4.2,D-F, **DM**). Unterhalb der Kommissur wird um den Protocerebralkonnectiv (**protocerebral connectiv**, PCN) eine Reihe von Zellen festgestellt (Abb.4.2,E,F,G, **PCN**) sowie die aus wenigen Zellen bestehende Expressionsdomäne im Tritocerebrum (Abb.4.2,G-I, **TC**). Dorsal, das Zentrum und die angrenzenden Bereiche der anterioren Spitze des Gehirns umschließend, befindet sich eine breite Expressionszone (Abb.4.2,G,H, DL, **DZ**). Im dorsalsten Bereich des Gehirns kann immer noch Hbn-Expression im Umfeld der angelagerten OL festgestellt werden, letztere erscheint als Aussparung in der Hemisphäre (Abb.4.2,I, **OL**).

Hbn zeigt eine im anterioren Protocerebrum vorliegende Expression in sowohl ventralen wie dorsalen Anteilen. Dabei werden Hbn-positive Lineages lateral, zentral sowie medial detektiert, was der erwarteten Verteilung nach zugrunde liegender Lokalisierung der differenzierbaren Hauptdomänen der Hbn-Expression entspricht (Abb.4.1). Dorso-mediale-Lineages entsprechen der medialen Domäne, PK und dorso-zentrale Lineages der zentralen und ventro- wie dorso-laterale Lineages der lateralen Domäne. Nach Abschluss der globalen Beschreibung des Expressionsmusters sollten die Zelltypen, die Hbn-Expression während der embryonalen Gehirnentwicklung zeigen, durch spezifische Marker weiter aufgeklärt werden.

4.3 Hbn wird in NB, GMC und Neuronen, jedoch nicht in Gliazellen exprimiert

Durch die Lage der Genexpression im Vergleich mit den neuronalen Markern HRP bzw. Nrt (de la Escalera et al., 1990) lässt sich die Expression von Hbn im dorso-anterioren Bereich eindeutig den Hirnhemisphären zuordnen. Die zuvor durchgeführte Zelltypenanalyse zeigte das Vorhandensein von vier NB in der Mittelliniendomäne (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Dies

erscheint in Anbetracht der Anzahl von tatsächlich abgrenzbaren und gleichzeitig wachsenden Hbn-positiven Domänen in der Entwicklung wenig. Daher sollten weitere Färbungen gegen Deadpan als NB-Marker (Bier et al., 1992) durchgeführt werden, um die tatsächliche Anzahl und Lokalisierung zu klären. Weiter konnte durch die bisher durchgeführte Zelltypbestimmung keine genaue Unterscheidung zwischen undifferenzierten Progenitorzellen -GMC- und differenzierten Neuronen (N) getroffen werden. Diese Unterscheidung kann nur mittels gleichzeitiger Färbung von Hbn gegenüber Prospero (Doe et al., 1991; Li und Vaessin, 2000; Spana und Doe, 1995; Vaessin et al., 1991) und ELAV (Campos et al., 1987) erfolgen. Der TF Prospero (Pros) liegt in NB an Miranda gebunden vor (Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Matsuzaki et al., 1998) und wird erst nach der asymmetrischen Zellteilung in der Tochterzelle aktiv. Nach proteolytischer Spaltung von Miranda gelangt Pros in den Zellkern, wo er Stammzellerhaltungsfaktoren deaktiviert und die Expression von Faktoren unterstützt, die zur Differenzierung führen. ELAV liegt im Zytoplasma undifferenzierter, neuronaler Zellen vor und gelangt erst während der Differenzierung zum Neuron in den Zellkern (Berger et al. 2007; Robinow und White, 1991). Während der Differenzierung zu Neuronen wird Pros inaktiv, sodass ausschließlich ELAV-positive Kernfärbung ein Neuron markiert, während alleinige Pros-Färbung eine GMC bestimmt. Gliazellen zeigen als Marker eine kernständige Expression von Repo an (Campbell et al., 1994; Halter et al., 1995; Lee et al., 2005; Xiong et al., 1994).

Das Deadpan-Muster zeigt alle delaminierten NB im Nervensystem des sich entwickelnden Embryos an. Somit erscheint die frühe, dorso-anteriore Dpn-Expression im proneuralen Ektoderm des Kopfes als dichtes Muster großer Zellkerne. In diesem Bereich der Gehirnanlage können in drei Zonen mehrere Dpn/Hbn-positive Zellkerne (je 2-3) detektiert werden, die sich medial nahe der Mittellinie befinden, lateral in der während der frühen Embryonalentwicklung neu entstehenden Zone und anterior in der Gehirnanlage, in der sich auflösenden hufeisenförmigen Zone (Abb.4.3,A, weiße Pfeile). Im Verlauf der weiteren Entwicklung des Gehirns können NB in aus diesen Bereichen hervorgehenden Strukturen weiter beobachtet werden. Während der Hemisphärenbildung werden Hbn-positive NB an der anterioren Spitze der Neuraxis detektiert. Dort liegen sie sowohl im dorsalen als auch ventralen Anteil, was der Verteilung der Hbn-positiven Lineages entspricht (Daten nicht gezeigt). Anti-Pros- und -ELAV-Färbungen zeigen eine starke Ähnlichkeit des Expressionsmusters, da ELAV schon vor der endgültigen Differenzierung zum Neuron

cytoplasmatisch exprimiert wird und in allen Neuronen den Kern stark färbt, während Pros in sich differenzierenden Neuronen (Ganglionzellen, GC) nicht unmittelbar abgebaut wird (während der Differenzierung zu Neuronen bleibt die *pros*-Expression transient erhalten) und auch in manchen Gliazellen vorkommt. Eine wirkliche Unterscheidung findet nur in GMC statt, da dort der Kern ein Vorhandensein von Pros zeigt, nicht jedoch von ELAV.

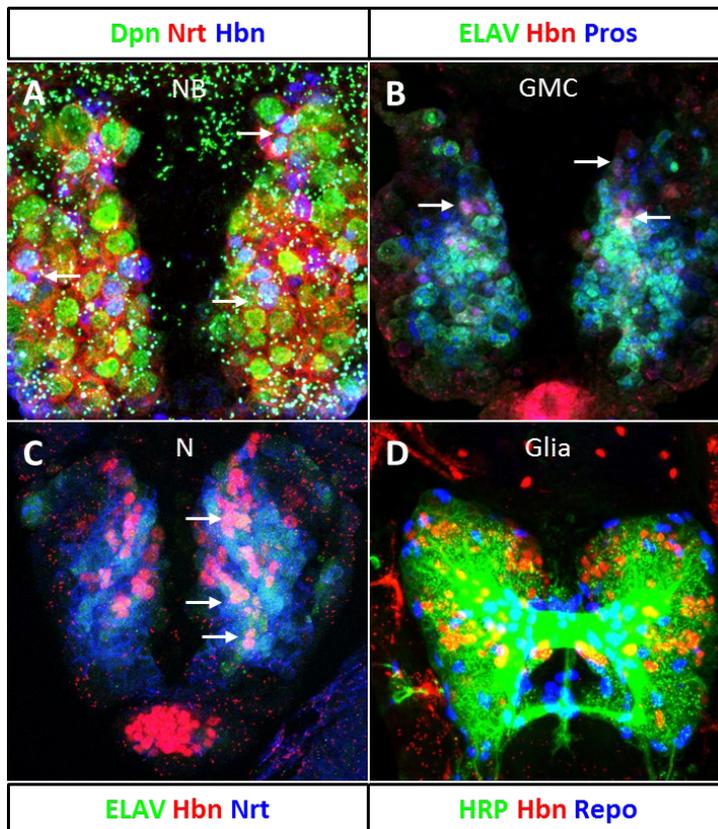


Abb.4.3: Zelltypbestimmung der neuronalen Hbn-Expression. Konfokale Aufnahmen von *yw*-Embryonen (A, 63x, ES 10; B, 40x, ES 12; C, 40x, ES 12; D, 40x, ES 15) in anterior-dorsaler Aufsicht mit (A) anti-Dpn-, -Hbn-, -Nrt- (Neuroblasten); (B) anti-ELAV, -Hbn-, -Pros- (GMC); (C) -ELAV-, -Hbn-, -Nrt- (Neurone); -Hbn-, -HRP-, -Repo-Färbung (Gliazellen), alle Embryonen anterior nach unten abgebildet: (A) Weiße Pfeile zeigen Dpn/Hbn-pos. NB in drei Domänen, medial, lateral und zentral. (B) Weiße Pfeile zeigen Hbn/Pros-pos. GMC im ventralen Cortex an der anterioren Spitze der Neuraxis. (C) Weiße Pfeile zeigen ELAV/Hbn-pos. Neurone im PC. (D) Keine Hbn-pos. Glia.

In dieser Analyse konnten auf der ventralen Oberfläche des Gehirns Hbn-positive GMC am anterioren Terminus des PC gefunden werden (Abb.4.3,B, weiße Pfeile). In obiger kortikaler Ebene werden noch keine Hbn- und ELAV-positiven Neurone sichtbar (Abb.4.3,B). Analysen in tieferen Ebenen des SAG zeigen unter Verwendung von ELAV als Neuronenmarker große Ansammlungen von Hbn-positiven Neuronen im PC (Abb.4.3,C, weiße Pfeile). Alle Gliazellen exprimieren spezifisch den Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Repo. Untersuchungen der embryonalen Gehirnentwicklung mit Repo- und Hbn-Antikörpern zeigen keine Übereinstimmung (Abb.4.3,D). Insgesamt kann Hbn-Expression in NB, GMC und Neuronen, jedoch nicht in Gliazellen beobachtet werden.

Die ursprüngliche Detektion von Hbn-positiven NB durch Vergleichsfärbungen gegen Deadpan und Miranda als NB-Marker lies vier Dpn/Hbn-positive NB in den Mittelliniendomänen erkennen. Die erneute Untersuchung zeigte wie erwartet eine größere

Zahl von detektierbaren NB. Insgesamt delaminieren zwischen ES 9 und ES 11 im PNE 13 NB, die auch in weiteren Domänen wie den lateralen und der Hufeisendomäne anzutreffen sind. Die Analyse ergab damit ein Vorhandensein von NB in allen Arealen des Multidomänenmusters mit Ausnahme des clypeolabralen Anteils. Die Suche nach GMC durch eine Färbung von Hbn gegenüber ELAV und Prospero deckte das Vorhandensein von Progenitorzellen im Cortex des embryonalen Gehirns auf, dort im anterioren Bereich des PC. Neurone hingegen sind unmittelbar unterhalb des Cortex im Verlauf der Entwicklung in stetig gesteigerter Anzahl nachweisbar. Ein erneuter Vergleich der Hbn-Expression mit dem hier deutlich besser angefärbten Gliazellmarker Repo vor dem Hintergrund einer panneuralen Markierung durch HRP bestätigt, dass Hbn definitiv nicht in Gliazellen des embryonalen Gehirns exprimiert wird.

Hbn wird in der NS-Entwicklung in Stamm- (NB) und Progenitorzellen (GMC) sowie in aus ihnen hervorgehenden Neuronen exprimiert. Zur Verbesserung der gewonnenen Expressionsdaten von Hbn sollte ein Vergleich mit bereits kartierten Faktoren, die eine ähnliche Verteilung im NS zeigen, dienen.

4.4 Kartierung der Hbn-Expression im Vergleich zu Faktoren des RDGN und Drx

Um die Feinkartierung der Expression von Hbn zu verbessern und die Frage nach der Verteilung Hbn-positiver Zellkerne besser beantworten zu können, bietet sich der Vergleich mit anderen gehirnspezifischen TF an. Mehrere Ansätze wurden unternommen, um die Expression verschiedenster Transkriptionsfaktoren im embryonalen Gehirn zu bestimmen und zu kartieren (Sprecher et al., 2007). Dabei zeigten sich für Faktoren des retinalen Determinations-Gen-Netzwerkes (RDGN), hier Dachshund (Mardon et al., 1994), Eyeless (Quiring et al., 1994) und Twin of eyeless (Czerny et al., 1999) zu Hbn vergleichbare Expressionsmuster im supraoesophagealen Ganglion. In Untersuchungen zu den 57B-TF zeigte Drx ebenfalls ein ähnliches Expressionsmuster zu Hbn (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern lässt daher einen Vergleich der Expression der verschiedenen TF zu. Die vorgenommene Kartierung dieser TF lässt über den Vergleich mit Hbn eine ungefähre Kartierung von Hbn auf Ebene der Areale und teils Lineages, aus deren Verbund das Gehirn besteht, zu und erweitert die Kenntnisse in Bezug auf Hbn. Besonders die Faktoren Ey und Toy werden in den embryonalen Hemisphären,

betrachtet an der Neuraxis, in ventralen (Ey) und dorsalen (Toy) Anteilen exprimiert und bilden somit eine Expressionsgrenze in den Hemisphären (Kammermeier et al., 2001).

Der Vergleich der Hbn- mit der Ey-Expression zeigt im ventralen Cortex des PC am anterioren Pol des Gehirns, lateral und zur Mittellinie orientiert, Lineages mit Kolokalisation der Faktoren in fast allen TF-positiven Neuronen derselben (Abb.4.4,A,A', weiße Pfeile). Die Untersuchung mit Toy ergibt eine Übereinstimmung in der lateralen, posterioren, PC-ständigen Lineage sowie am Übergang des ventralen in den dorsalen Anteil des PC am anterioren Pol des Gehirns. Weiter wird im dorsalen Cortex des embryonalen Gehirns im Umfeld der optischen Lobe Kolokalisation beobachtet (Abb.4.4,B,B', weiße Pfeile). Dac als dritter Vertreter des RDGN zeigt sich in einer zentralen Lineage sowie einer lateralen Lineage des PC mit Hbn kolokalisiert, auch die TC-ständige Hbn-Expression zeigt ein kolokalisiertes Neuron (Abb.4.4,C,C', weiße Pfeile).

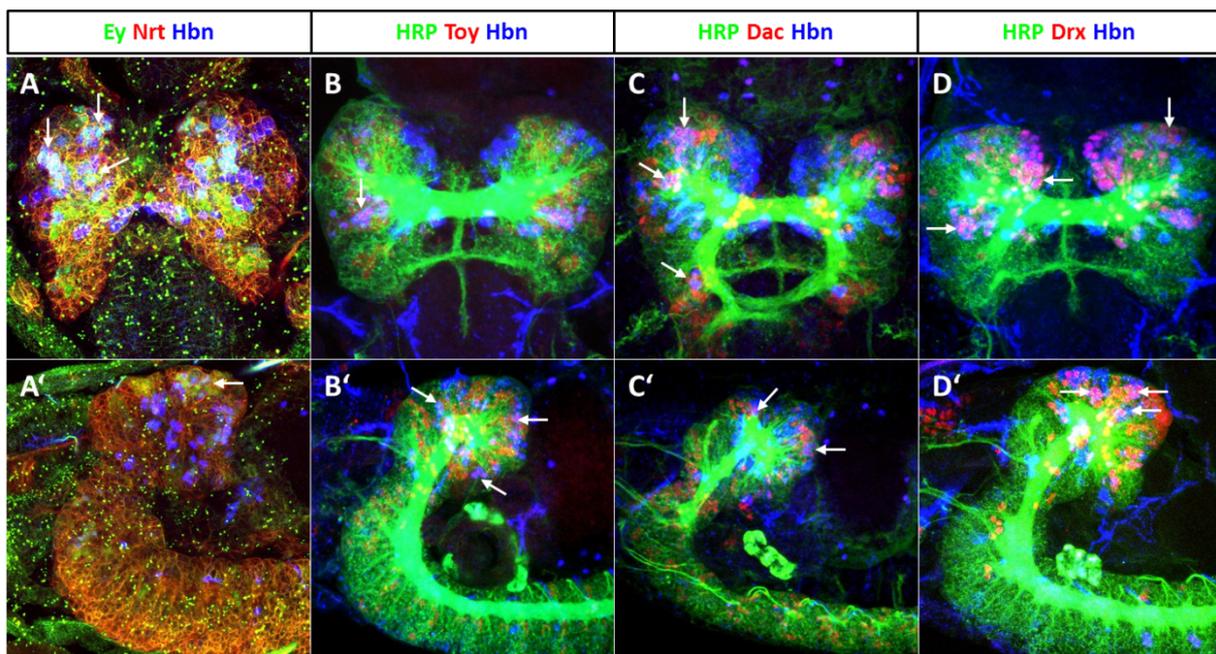


Abb.4.4: Vergleich Hbn-Expression mit Faktoren des RDGN und Drx. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler und -lateraler Ansicht (A,A', 63x, B-D', 40x) von *yw*-Embryonen (ES 15) mit anti-Hbn-, -HRP/Nrt- und (A) -Ey-, (B) -Toy-, (C) -Dac-, (D) -Drx-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten bzw. nach links: (A,A') Weiße Pfeile zeigen Kolokalisation von Ey und Hbn in den ventralen Lineages des embryonalen PC. (B,B') Weiße Pfeile zeigen Kolokalisation von Hbn und Toy in posterioren und dorso-zentralen PC-Lineages. (C,C') Weiße Pfeile zeigen Dac- und Hbn-pos. Zellen in anterior-zentralen und posterior-lateralen Lineages sowie im TC. (D) Dorso-mediale und anterior-zentrale Kolokalisation von Drx und Hbn sowie Kolokalisation in posterioren PC-Lineages (weiße Pfeile). (D') Weiße Pfeile zeigen Kolokalisation von Drx und Hbn im anterioren PC, in den Kenyonzellen des PK sowie in dorso-zentralen und -medialen Lineages.

In Zusammenhang mit Drx sind besonders die dorso-mediale Expression sowie die posteriore PC-Expression auf Höhe der PHK zu benennen. In zentralen Bereichen des embryonalen Gehirns unterscheiden sich diese Faktoren in ihrer neuronalen Expression in den dortigen

Lineages. In lateraler Ansicht kann das Expressionsmuster der beiden 57B-TF gut differenziert werden. Hier erscheinen in den Kenyonzellen des PK die Drx/Hbn-positiven Zellen ebenso wie im dorsalen Anteil des PC und dem ventralen Anteil des DC. Im dorsalen Anteil ist die Situation mit der Hbn/Toy-Kolokalisation vergleichbar (Abb.4.4,D,D', weiße Pfeile).

Nach Vergleich mit Ey und Toy wird Hbn anteilig gesehen stärker im dorsalen Kompartiment des SAG und dort besonders in medialen Lineages exprimiert, in denen ebenfalls die Hauptzone der Kolokalisation zur vorliegenden Drx-Expression liegt. Nachfolgend sollte die Gehirnentwicklung auf eine Expression von Hbn in anderen als den kommissurgründenden P2m und P2I-Clustern untersucht werden, um Anhaltspunkte für die Beteiligung an anderen Pionierclustern zu erhalten.

4.5 Vergleich der Hbn-Expression mit den FasII-positiven ftfc des embryonalen Gehirns

Im Sinne einer Feinkartierung wurde die embryonale Hbn-Expression gegenüber HRP als panneuralem Marker und bp102 als axonalem Marker verglichen (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Neben diesen wurde mit FasII (Grenningloh et al., 1991) ein Marker der Pionierneurone verwendet. Etwa im Stadium 11 der embryonalen Entwicklung können im Gehirn des Embryos FasII-positive Neurone, die sog. **fibre tract founder cluster (ftfc)**, detektiert werden (Nassif et al., 1998). Diese Gründerzellen bilden die ersten longitudinalen Trakte und Kommissuren des embryonalen Gehirns und erstellen daher ein Gerüst für die weitere Ausbildung des Gehirns sowie die Projektion von nachfolgenden Lineages. Unter den Gründerzellclustern befinden sich D/T, P1-P5 in lateraler und medialer Unterscheidung sowie die OL (Nassif et al., 1998). Eine Expression von Hbn in diesen ftfc kann eine Bedeutung für den Aufbau dieses axonalen Gerüsts besitzen. Bereits geklärt werden konnte die Expression von Hbn in den medialen und lateralen P2-Gründerclustern (P2m, P2I). Durch weitere Färbungen sollten auch die übrigen Cluster untersucht werden, um eventuelle Hbn-Expression in Clustern aufzudecken, die an der Bildung von LPT (longitudinaler-protocerebraler Trakt), DCT und VCT (**d**orsal **c**ommissure **t**ract, **v**entral **c**ommissure **t**ract) beteiligt sind.

Werden Embryonen entsprechend mit FasII und Hbn angefärbt und konfokal untersucht, so können vor Bildung der Konnektive und Kommissuren bereits drei Gründerzellcluster, P2I

und P2m sowie P3m (erstes dorso-mediales Cluster), als Hbn-positiv ausgemacht werden (Abb.4.5,A). Dies ist insofern wichtig, als die P2-Cluster die initiale Bildung der interhemisphärischen Brücke vornehmen (Dissertation Petra Kaspar, 2008; Nassif et al., 1998), woraufhin dorsale und ventrale Kommissurtrakte (DCT, VCT) gebildet werden können.

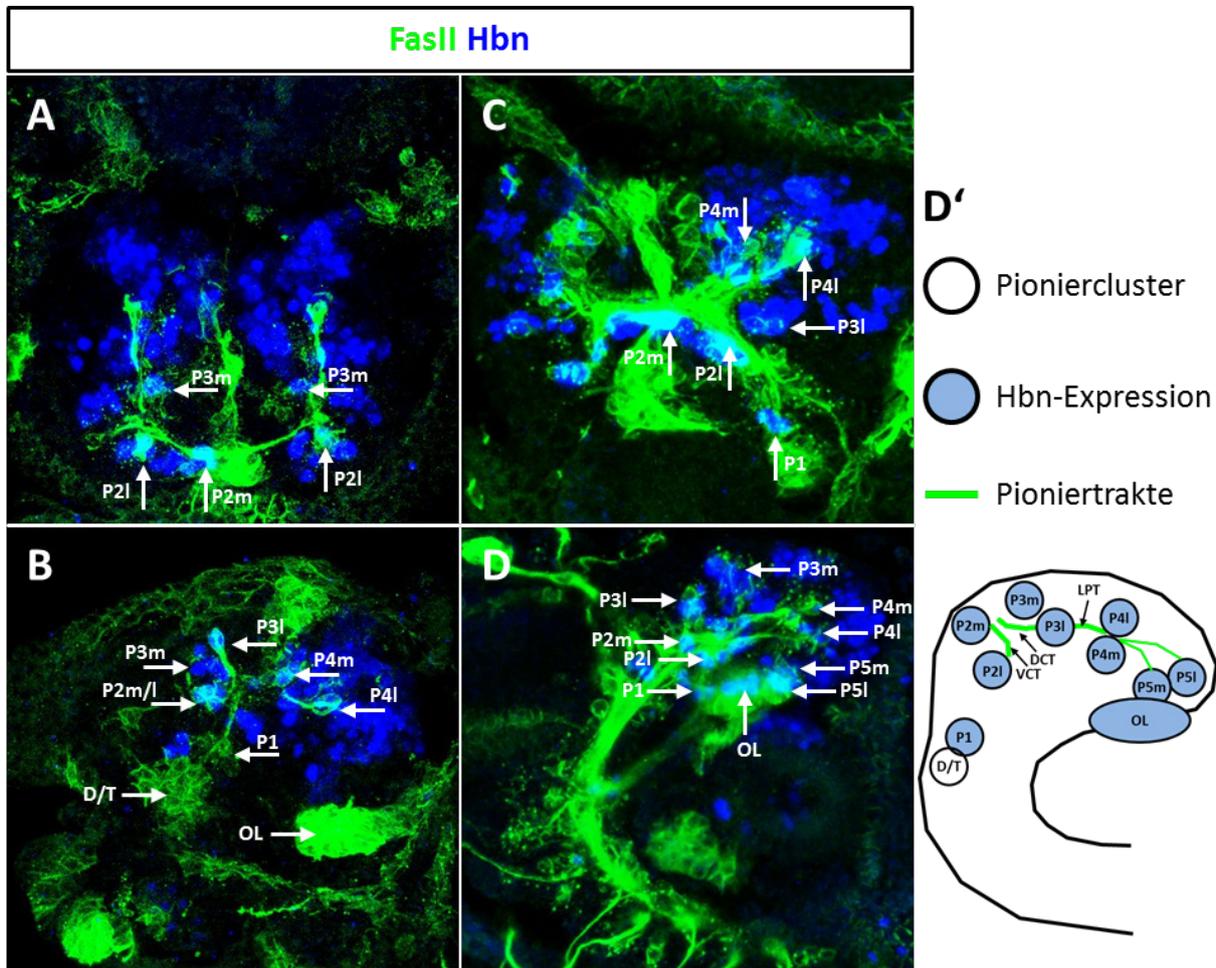


Abb.4.5: Hbn-Expression in FasII-positiven Gründerzellen. Konfokale Aufnahmen (63x) von *yw*-Embryonen mit anti-FasII- und -Hbn-TSA-Färbung, anterior nach unten bzw. nach links: Weiße Pfeile zeigen jeweils auf die Gründerzellcluster. (A) Anterior-dorsale Aufsicht von ES 12. (B) Laterale Ansicht ES 11-12. (C) Anterior-dorsale Aufsicht, rotiert, ES 14. (D) Laterale Ansicht ES 15. (D') Schema zeigt die Anordnung der *fttc* nach Nassif et al.

Neben diesen Trakten kann in einer dorsaleren Ebene des sich entwickelnden Gehirns noch der P3l-Trakt mit Hbn-positiver Kernfärbung ausgemacht werden (Abb.4.5,B). Im ES 14 ist die präorale Hirnkommissur fast vollständig entwickelt und alle interhemisphärischen, FasII-positiven Trakte sind angelegt. In diesem Stadium können an der Kommissur aus FasII-positiven Axontrakten neben den Zellkörpern der P2m- und P2,3l-Trakte mit Hbn-positiver Kernfärbung, von denen die Bildung des VCT ausgeht, auch weiter posterior liegend ebenfalls die P1-Trakte mit Hbn-positiver Färbung beobachtet werden. Weiter können in den Hemisphären die Projektionen der P4-Gründerzellen, die parallel zu den Axontrakten des PK verlaufen (Kurusu et al., 2000, vgl. Abb.2.13,A), benachbart zu stark Hbn-positiven Lineages,

beobachtet werden (Abb.4.5,C). Diese bilden zusammen mit den P3-Trakten die DCT. Laterale Projektionen des embryonalen Gehirns in ES 15 zeigen den Bereich der PHK mit vielen FasII/Hbn-positiven Zellclustern (Abb.4.5,D). Dort können auch die P3-Cluster anterior der Kommissur mit vielen Hbn-positiven Kernen beobachtet werden. Die P4-Cluster treten im anterioren PC stark hervor und zeigen ebenfalls Hbn-positive Kernfärbung (Abb.4.5,D). Auch die P5-Cluster, ventral der OL anliegend, zeigen Hbn-positive Kernfärbung; ebenso wird in wenigen Zellen der OL Hbn-Expression beobachtet (Abb.4.5,D). Somit zeigen alle Pioniercluster, die an der Ausbildung des LPT (P3I,4I,5I) bzw. DCT (P3I/4I) und VCT (P2I/m) beteiligt sind, Hbn-Expression mit Ausnahme des D/T-Clusters (Abb.4.5,D', blaue Füllung).

Durch detaillierte Aufnahmen verschiedener Entwicklungsstadien konnte die Expression von Hbn neben den PHK-gründenden P2m- und P2I-Clustern während des Entwicklungsverlaufs auch in anderen Clustern bewiesen werden. Die Gründercluster P1, P3, P4 und P5 zeigen ebenfalls Hbn-positive Kernfärbung. Die Kommissurbildung sollte nachfolgend unter gleichzeitiger Beobachtung der FasII/Hbn-positiven Kommissurgründer und den übrigen an der Kommissurbildung beteiligten Neurone bzw. ihrer Axontrakte dargestellt und analysiert werden.

4.6 Übersicht zur Kommissurbildung

Die Bildung der präoralen Hirnkommissur wurde bisher einmal durch die Betrachtung von anti-HRP-Färbungen (Therianos et al., 1995) und ein zweites Mal durch anti-FasII-Färbungen (Nassif et al., 1998) untersucht. Dabei stellte man den Aufbau von Hemisphärenvorsprüngen fest, die sich posterior am Rand der Hemisphären zur Mittellinie hin ausbilden. In einem weiteren Schritt wird eine interhemisphärische Brücke aus Neuronen und Gliazellen ausgebildet, die den übrigen neuronalen Trakten die Überquerung der Mittellinie ermöglicht (Therianos et al., 1995). Die Analyse mit FasII verfolgt die *ftfc*, welche die Konnektive und Kommissuren des embryonalen Gehirns erstellen. Hier wurde das Einwachsen der P2m-Gründerzellen in die Mittellinie gezeigt, woraufhin deren Fusion erfolgt. Im weiteren Verlauf konnte die Entstehung der DCT und des VCT durch weitere Pioniercluster gezeigt werden. Die präorale Hirnkommissur besitzt somit drei FasII-positive, interhemisphärische Trakte (Nassif et al., 1998). Die Expression von Hbn konnte in den P2m-Pionierneuronen bestätigt und eine ungeklärte Anzahl weiterer Hbn-positiver Neurone beschrieben werden, die in der entstehenden zellulären, interhemisphärischen Brücke angeordnet werden (Dissertation

Petra Kaspar, 2008). In diesem Ansatz konnte die Fusion der FasII/Hbn-positiven Neurone der interhemisphärischen Brücke allerdings nicht hochaufgelöst gezeigt und die Ursache für die Bewegung der Pionierneurone nicht ergründet werden. Auch wurde die Beteiligung der übrigen axonalen Trakte während der Kommissurbildung nicht in die Untersuchung mit einbezogen. Ein Ansatz, der alle Fragestellungen kombiniert, ist die gemeinsame Färbung gegen FasII, Hbn und HRP, um alle Aspekte der Kommissurbildung hochaufgelöst beobachten zu können.

Um eine Übersicht zur Kommissurbildung und Dynamik des damit assoziierten Hbn-Musters zu erhalten, wurden beide Hemisphären der embryonalen Gehirne aufgenommen und die Entwicklung der Kommissur in zeitlicher Reihenfolge dokumentiert. Am Beginn der Kommissurbildung steht die morphologische Veränderung des Gehirns, welche sich durch eine zur Mittellinie orientierte Ausstülpung der Hemisphären an ihrem posterioren Ende auszeichnet. In diesem neu gebildeten Vorsprung liegen einige Hbn/HRP-positive Zellen, die zukünftigen Brückenzellen, wie auch je eine prominente, an der Spitze der Vorsprünge liegende FasII/Hbn-positive Zelle, die P2m-Pionierzelle. (Abb.4.6,A, weiße Pfeile). Diese Vorsprünge zeigen zur Mittellinie orientierte HRP-positive Wachstumskegel (Abb.4.6,A, grüne Pfeile). Im weiteren Verlauf der Entwicklung erfahren diese Hemisphärenvorsprünge eine Verlängerung zur Mittellinie, welche von HRP-positiven Wachstumskegeln ausgeht. Die FasII/Hbn-positive Zelle liegt mit dem Zellkörper an der Spitze des Vorsprungs und mit dem Faszikel zur Hemisphäre projizierend (Abb.4.6,B, weiße Pfeile). Die HRP-positiven Wachstumskegel sind zur Mittellinie verlängert (Abb.4.6,B, grüne Pfeile). Kurze Zeit später haben sich die Vorsprünge soweit ausgedehnt und einander angenähert, dass die HRP-positiven Wachstumskegel sich in der Mittellinie berühren (Abb.4.6,C, grüner Pfeil). Die Hbn-positiven Zellen erscheinen auf dem ausgestreckten Vorsprung aufgereiht, mit der FasII/Hbn-positiven Zelle an der Spitze (Abb.4.6,C, weiße Pfeile). Weiter anterior im Gehirn erscheint die FasII/Hbn-positive P3m-Gründerzelle (Abb.4.6,C, P3m, weißer Pfeil; vgl. Abb.4.5,A). Sobald die beiden Hemisphären des Gehirns miteinander über HRP-positive Faszikel verbunden und die FasII/Hbn-positiven Frontzellen in räumliche Nähe gerückt sind, erfolgt auch eine Verbindung der FasII/Hbn-positiven Zellen durch Faszikel (Abb.4.6,D, weißer Pfeil). In der Hemisphäre liegt weiter posterior das P2l-Gründercluster, welches ebenfalls Hbn-pos. Kernfärbung zeigt (Abb.4.6,E, P2l, weißer Pfeil). Die Pionierzellen verbleiben die Mittellinie flankierend (Abb.4.6,E, P2m, weiße Pfeile). Ihre FasII-Expression

verstärkt sich und zeigt deutlich ein Faszikel zwischen den Zellen (Abb.4.6,E, gelber Pfeil), während auf der anterioren Seite der sich ausbildenden Kommissur an beiden Enden der zellulären Brücke HRP-positive, unverbundene Faszikel einwachsen (Abb.4.6,E, grüner Pfeil).

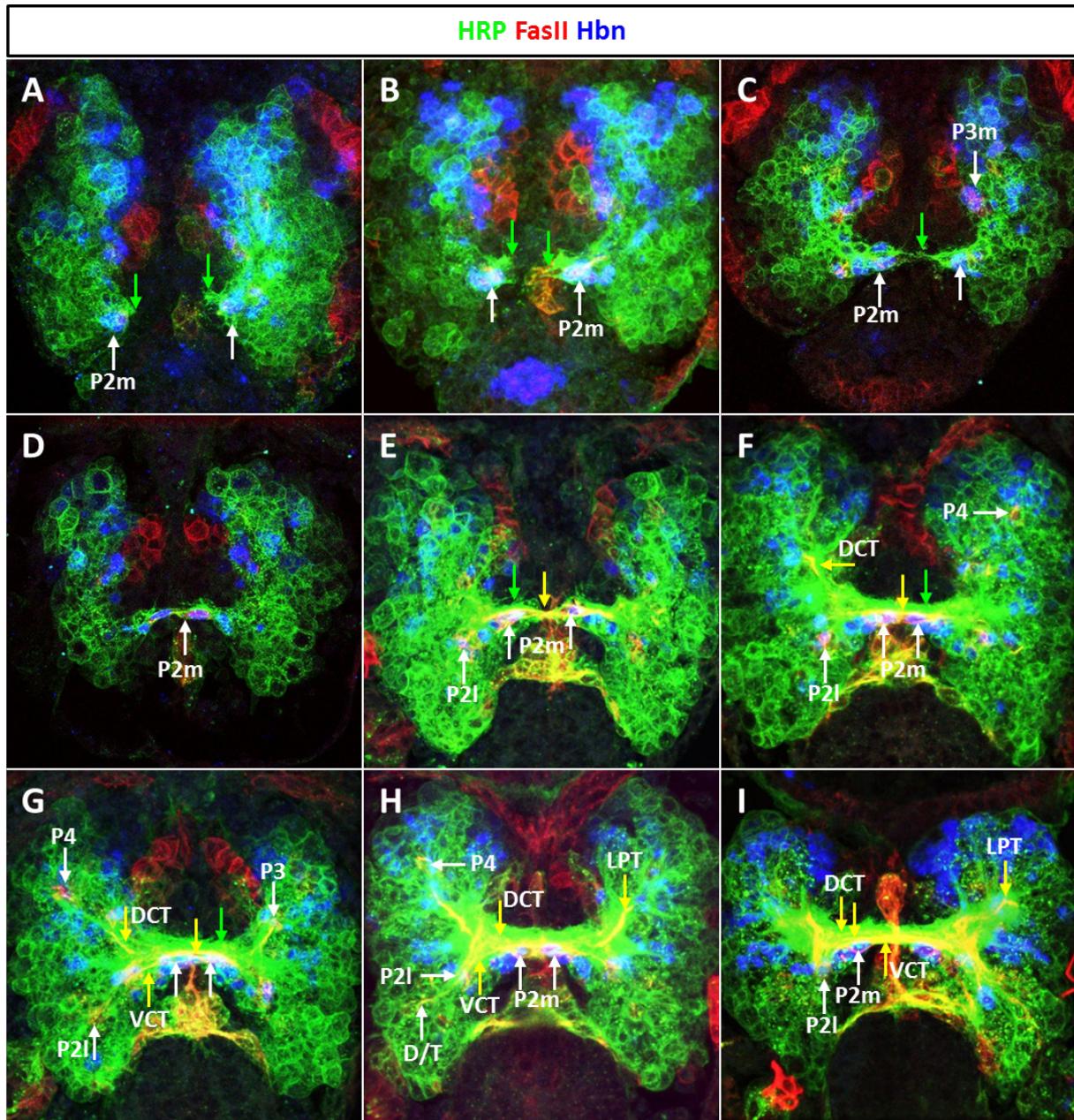


Abb.4.6: Übersichtsdarstellung der Kommissurbildung. Konfokale Aufnahmen von *yw*-Embryonen (A-C, ES 12; D-F, ES 13; G-I, ES 14) in anterior-dorsaler Aufsicht (63x) mit anti-FasII-, -Hbn- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: Weiße Pfeile zeigen die P2-, P3- und P4-Pioniercluster, gelbe Pfeile zeigen die Pioniertrakte DCT, VCT und LPT. Grüne Pfeile zeigen die HRP-pos Wachstumskegel bzw. Axontrakte. (A) Frühes ES 12-Gehirn. Hemisphärenvorsprünge mit P2m-Pionierzellen werden sichtbar. (B) Verlängerung der Hemisphärenvorsprünge und der Wachstumskegel. (C) Aufeinandertreffen der HRP-pos. Wachstumskegel. (D) Etablierung der interhemisphärischen Brücke. (E) Beginn der Expansionsphase. Einwachsen weiterer HRP-pos. Trakte. (F) Beginnende Ausbildung weiterer FasII-pos. Kommissurtrakte. (G) DCT (von P3 und P4 aus) und VCT (von P2l bzw. D/T aus) erscheinen benachbart zur Kommissur. HRP-pos. Trakte vermehrt auf anteriorer Seite der Kommissur sichtbar. (H) P2m-Gründerzellen umgeben weiterhin die Mittellinie. DCT/VCT sind in der Kommissur weiter fortgeschritten. LPT (von P4 und P5 aus) im PCN sichtbar. (I) P2m ziehen sich aus der Mittellinie zurück, alle FasII-pos. Trakte, DCT, VCT sind interhemisphärisch etabliert. LPT gut sichtbar in Richtung des zentralen PC ausgebildet.

Diese Struktur wird als interhemisphärische Brücke bezeichnet. Während die Frontzellen ihre Position und Expression beibehalten, bildet sich ein immer größer werdender, HRP-positiver Anteil der präoralen Hirnkommissur entlang der interhemisphärischen Brücke, die als Achse fungiert (Abb.4.6,F, grüner Pfeil). Im PC wird zudem das P4-Gründercluster sichtbar (Abb.4.6,F, P4, weißer Pfeil). Neben den beschriebenen Hbn-Frontzellen und ihren FasII-positiven Faszikeln tauchen nun anterior und posterior zur Kommissur der dorsale und ventrale Kommissurtrakt auf. Gebildet werden diese jeweils von den P3/4- bzw. P2-Gründern (Abb.4.6,G, P2I, P3, P4, weiße Pfeile). Diese wachsen in Richtung Kommissur, wo FasII/Hbn-positive Frontzellen immer noch die Mittellinie umgeben und sich weitere HRP-positive Kommissurtrakte bilden, um die Kommissur zu verdicken (Abb.4.6,G, gelber Pfeil). Erreichen DCT und VCT die Kommissur, so wachsen sie ein und bilden eigene FasII-positive Kommissurtrakte (Abb.4.6,H, gelbe Pfeile). Kurze Zeit später beginnen die FasII/Hbn-positiven Gründerzellen sich aus dem Zentrum der Kommissur an deren Rand zu verlagern. Alle FasII-positiven Kommissurtrakte sowie eine breite HRP-positive Kommissur sind zu erkennen und der LPT wird sichtbar (Abb.4.6,I, LPT, gelber Pfeil). Eine hochauflösende Darstellung der Ereignisse im Mittellinienspalt kann im Anhang, Abb.7.1, betrachtet werden. Als erster bedeutender Gewinn der gemeinsamen Analyse beider neuronaler Marker, FasII und HRP, konnte gezeigt werden, dass nicht ausschließlich die Pionierneurone in die Mittellinie weisende Wachstumskegel besitzen und deren Bewegung in den Mittellinienspalt vermutlich passiv über die Bindung an HRP-positive Faszikel stattfindet. So zeigen besonders im Vorsprung liegende HRP-positive Anteile mehrere Wachstumskegel (Abb.4.6,A,B), die bereits unmittelbar nach Bildung der Hemisphärenvorsprünge in die Mittellinie ragen. Die Mobilisierung der FasII/Hbn-positiven Gründerzellen erfolgt gleichmäßig mit der Verlängerung der HRP-positiven Axontrakte in den Mittellinienspalt, dabei werden in jeder Hemisphäre im Mittel jeweils vier Hbn-positive Zellen beobachtet, die dem Aufbau der interhemisphärischen Brücke dienen. An der Front liegt immer die Pionierzelle, die die stärkste FasII-positive Färbung zeigt. Es können jedoch in seltenen Fällen weitere FasII/Hbn-positive Zellen auf der interhemisphärischen Brücke beobachtet werden, die eine schwächere Färbung des Markers aufweisen. Auffallend ist, dass die FasII-Färbung der Hbn-positiven Gründerzelle nach Erreichen der Mittellinie, wobei letztere meist links und rechts von der jeweiligen Gründerzelle flankiert wird, stark an Intensität zunimmt. Der Annäherung in der Mittellinie geht immer eine Faszikulation der Wachstumskegel voraus, wobei HRP-

positive Anteile die Fusion beginnen und die FasII-positiven Anteile im Anschluss faszikulieren. Die interhemisphärische Brücke besteht somit aus acht Hbn/HRP-positiven Zellen, die auf einem dünnen Axontrakt liegen sowie den stark FasII/Hbn-positiven Zellen, die die Mittellinie umgeben. Ab diesem Zeitpunkt kann das weitere Einwachsen der HRP-positiven Faszikel auf der anterioren Seite der Kommissur beobachtet werden, bis sowohl ventraler als auch dorsaler FasII-positiver Trakt in die Kommissur eingewachsen sind. Ist dies geschehen, erfolgt die rückwärtige Mobilisierung der Hbn-positiven Pionier- und Brückenzellen zu ihrem Ausgangspunkt am Rand der Hemisphären, während die Kommissur durch weitere HRP-positive Axone zu ihrer vollständigen Größe ausreift. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Mobilisierung der Pionier- und Brückenneurone zum Aufbau der interhemisphärischen Brücke durch Axontrakte aus dem Protocerebrum ermöglicht wird, denen die Pionier- und Brückenneurone aufsitzen.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Kommissurbildung wurde durch Vergleichsfärbungen von Hbn- zu Apterous (Ap)-positiven Neuronen, die an Kommissurprojektionen beteiligt sind (Boyan et al., 2003; Herzig et al., 2001), vorgefunden. Hier ergab sich eine Übereinstimmung der Expression in verschiedenen Anteilen des *apGal4*-Reporters. Dabei zeigten ventrozentrale und -mediale sowie dorso-zentrale und -laterale *apGal4*-Cluster, von denen jedes einen Kommissurtrakt aufweist, Expression von Hbn. Die ventro-medialen Zellen weisen dabei eine Kommissurprojektion auf, die auch mit den Ey/Hbn-positiven Zellen bereits in Verbindung gebracht wurde (Boyan et al., 2003). Zugehörige Aufnahmen können im Anhang in Abb.7.7 betrachtet werden.

Die globale Betrachtung der Kommissurbildung des PC verschaffte einen Einblick bzgl. des generellen Verhaltens der FasII/Hbn-positiven Gründerzellen und der übrigen assoziierten Axontrakte und ihrer Wachstumskegel; eine hochaufgelöste Betrachtung der Hemisphärenvorsprünge und der Zellbrücke sollte besonders die Ereignisse in der Mittellinie hervorheben und die P2m-Gründerzellen, die Pionierneurone, weiter untersuchen.

4.7 Darstellung der Mittellinienvorsprünge und der anschließenden Kommissurknüpfung

Um den initialen Eintritt der Hbn-positiven P2m-Gründerzellen in die Mittellinie und somit die der Verknüpfung der gegenüberliegenden Anteile zu einer zellulären Brücke vorausgehenden Axonfaszikel zu visualisieren, wurde dieser Bereiche in vergrößerter Darstellung betrachtet. Die Struktur des Vorsprungs, die Anordnung der Hbn-positiven

Brückenneurone und die Projektionen ihrer Axone sollten untersucht werden. Von besonderem Interesse ist dabei, wie die HRP-positiven Faszikel im Vergleich zu dem FasII-positiven der Pionierzelle liegen und wie die Wachstumskegel der Vorsprünge verteilt sind, bevor die Verknüpfung stattfindet.

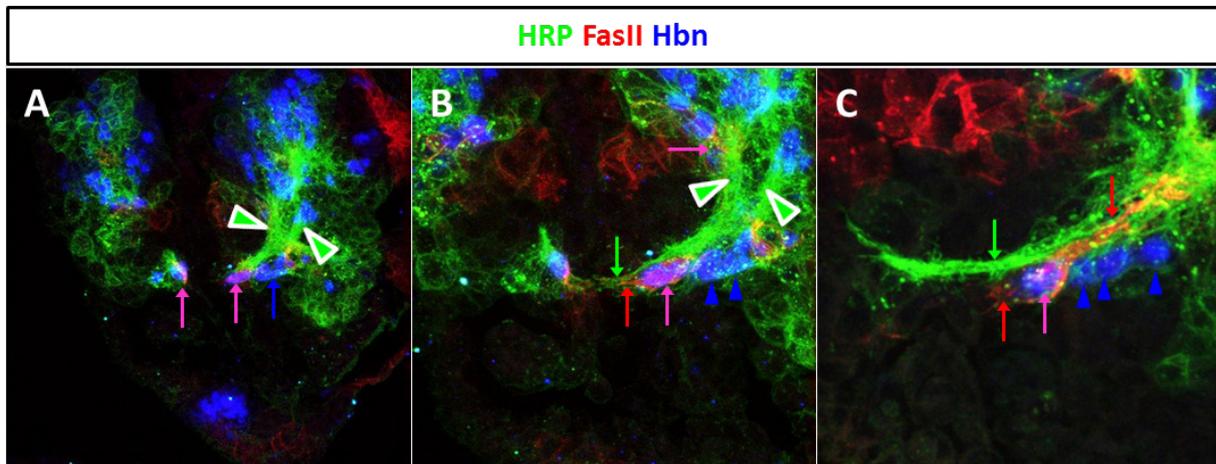


Abb.4.7: Detaillierte Darstellung der kommissurgründenden Hemisphärenvorsprünge. Konfokale Aufnahmen von ES 12 yw-Embryonen in anterior-dorsaler, rotierter Aufsicht (63x, Zoom) mit anti-FasII, -Hbn- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten. Alle Bilder (A-C) zeigen bereits einen zur Mittellinie ausgestreckten Hemisphärenvorsprung. Weiß-grüne Dreiecke zeigen die Basis des Vorsprungs, lila Pfeile die Pionierzellen und blaue Pfeile bzw. Pfeilspitzen die übrigen Hbn-pos. Zellen der interhemisphärischen Brücke. Grüne und rote Pfeile zeigen HRP- bzw. FasII-pos. Wachstumskegel.

Der Hemisphärenausläufer erscheint in leicht rotierter Ausrichtung und somit lateraler Ansicht als Zusammensetzung zweier stark HRP-positiver, neuropilartiger Stelzen (Abb.4.7,A,B, grün-weiße Dreiecke). Diese tragen einerseits die FasII/Hbn-positiven Frontzellen an der posterioren Spitze (Abb.4.7,A, lila Pfeile), andererseits bilden sie ein Fundament für weitere Hbn-positive, zukünftige Brückenzellen, die sich direkt hinter der Pionierzelle formieren und auf diesem Vorsprung aufgereiht werden (Abb.4.7,A, blauer Pfeil). An der Basis der HRP-positiven Stelzen liegen die FasII/Hbn-positiven P3m-Gründerzellen (Abb.4.7,B, lila Pfeil). Durch eine vergrößerte Darstellung kann hier die Frontzelle mit Zellkörperfärbung (Abb.4.7,B,C, lila Pfeil) inklusive dem FasII-positiven Wachstumskegel (Abb.4.7,B,C, rote Pfeile) und weiteren angrenzenden, HRP-positiven Neuronen beschrieben werden (Abb.4.7,B,C, blaue Pfeilspitzen). Die Frontzellen zeigen mit geringerer Präsenz von FasII-positivem gegenüber HRP-positivem Anteil die Wachstumskegel, die zum Pendant der gegenüberliegenden Hemisphäre ausgestreckt sind (Abb.4.7,B,C, rote Pfeile). In noch weiterer Vergrößerung kann erkannt werden, dass eine HRP-positive Verbindung der Hemisphären dem Aufeinandertreffen der Hbn-positiven P2m-Gründerzellen vorausgeht (Abb.4.7,B,C, grüne Pfeile) und die Frontzelle bereits ein FasII-

positives Faszikel zum Beginn des Vorsprungs ausgebildet hat (Abb.4.7,C, roter Pfeil). Über diesem FasII-positiven Faszikel liegen posterior die übrigen Hbn-positiven Zellen mit HRP-positivem Zellkörper, doch können keine Axonprojektionen letzterer in die Mittellinie ausgemacht werden (Abb.4.7,C, blaue Dreiecke). Die HRP-positiven Faszikel verlaufen zur Mittellinie anterior der Hbn-positiven Pionier- und Brückenzellen.

Somit konnte eine Beteiligung von FasII/Hbn-positiven Pionierzellen an der Erstellung der interhemisphärischen Brücke, die so lange unter räumlichem Erhalt der Gründerzell-Konformation Bestand hat, bis die Kommissur mit allen FasII- und HRP-positiven Trakten gebildet ist, bestätigt werden. Der Aufbau der Hemisphärenvorsprünge und die exakte Lage der Hbn-positiven Brückenzellen sollte nun auch im Vergleich zu den ebenfalls beschriebenen Gliazellen veranschaulicht werden.

4.8 Lage der Hbn-positiven Pionierneurone im Vergleich zu Gliazellen

In Zusammenhang mit der strukturellen Untersuchung der Kommissurbildung wurden Gliazellen beobachtet, die neben den Neuronen der interhemisphärischen Brücke ebenfalls mit dieser Struktur verknüpft sind (Panganiban und Rubenstein, 2002; Therianos et al., 1995; Wildemann et al., 1997). In den Untersuchungen durch Petra Kaspar konnten die Hbn-positiven Pionier- und Brückenzellen bereits durch anti-ELAV-Färbungen als Neurone identifiziert werden. Es existierten jedoch bisher keine Daten, die die Hbn-positiven Neurone der interhemisphärischen Brücke im Vergleich zu den Gliazellen zeigen. Aus diesem Grund sollten die Mittellinienvorsprünge und die interhemisphärische Brücke mit anti-Repo-Färbungen untersucht werden, um die differentielle Lage der Brückenneurone zu den Gliazellen zu klären.

Betrachtet man Hbn-positive Zellen im Vergleich zu Repo-positiven Gliazellen, so können nur benachbart und weiter lateral zu den Vorsprüngen wenige Gliazellen entdeckt werden (Abb.4.8,A, blaue, rote Pfeile). Ist die Zellbrücke fertig ausgebildet, so liegen Gliazellen im Zentrum der Mittellinie, dort zwischen den die Mittellinie flankierenden FasII/Hbn-positiven Gründerzellen (Abb.4.8,C, rote Pfeile), an den Flanken der Kommissur sowie anterior an der Kommissur in einer ebenfalls als Zellbrücke zu bezeichnenden Anordnung (Abb.4.8,C, blaue Pfeile). Diese Gliazellen konnten auch durch Pros und Distalless (DII) in der embryonalen Gehirnentwicklung beobachtet werden (Doe et al., 1991; Panganiban und Rubenstein, 2002).

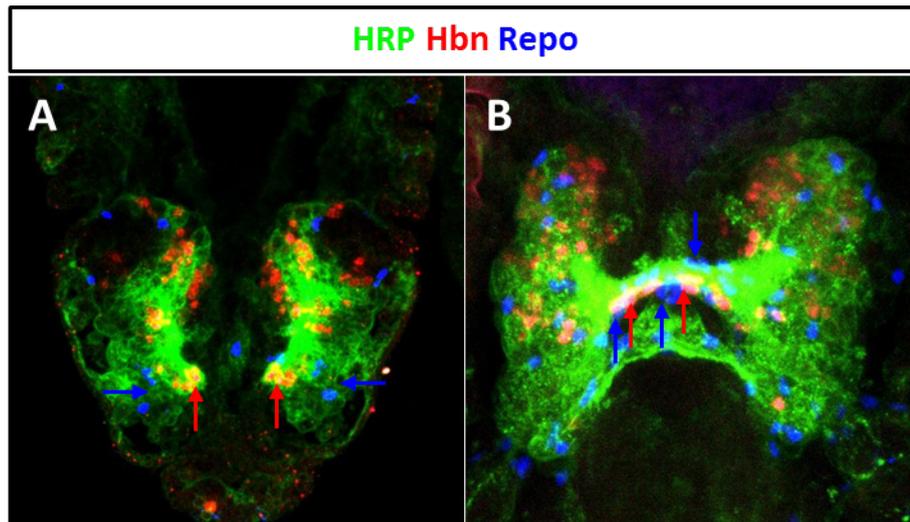


Abb.4.8: Vergleich der Lage von Gliazellen mit den Pionierneuronen im Hemisphärenvorsprung und der interhemisphärischen Brücke. Konfokale Aufnahmen von *yw*-Embryonen in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) mit anti-Hbn-, -HRP- und -Repo-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten. Blaue Pfeile zeigen Gliazellen, rote Pfeile die Hbn-pos. Zellen des Vorsprungs und der interhemisphärischen Brücke: (A) Gliazellen liegen im Hemisphärenvorsprung benachbart zu Hbn-pos. Neuronen (ES 12). (B) Blaue Pfeile zeigen die Gliazellen an der Kommissur verteilt, medial, lateral und anterior zu dieser (ES 14).

Nach Abschluss der Kommissuranalyse wurde mit der detaillierten Untersuchung des mutanten Phänotyps das zweite Hauptuntersuchungsfeld angegangen, bei dem die vorangegangenen Erkenntnisse helfen sollten, anschließend die Ursache des Phänotyps und somit die Funktion von Hbn zu verstehen.

4.9 Analyse des *hbn*¹⁵²²⁷- und *hbn*⁴⁰²⁸-Gehirnphänotyps

Die molekulare Analyse der EMS-Mutanten *hbn*⁴⁰²⁸ und *hbn*¹⁵²²⁷ durch Sequenzierung zeigte bisher nur für das Allel *hbn*¹⁵²²⁷ einen Abbruch der Proteinsynthese aufgrund der Bildung eines Stopp-Codons. Die Untersuchung der mutanten *hbn*-Allele und der Defizienz Df(2R)7166 sowie der letalen P-Element-Insertion *hbn*^{KG02514} zeigte einen vollständigen Verlust der präoralen Hirnkommissur sowie einen Ausfall von anterioren, protocerebralen Bereichen. Diese Veränderungen wurden mit mehreren Markern untersucht, die vollständige Natur des Phänotyps im PC konnte durch Einzelfärbungen der Marker jedoch noch nicht ermittelt werden (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Im Vorfeld der ergänzenden phänotypischen Untersuchungen durch Mikroskopie sollte die molekulare Beschaffenheit des *hbn*⁴⁰²⁸-Allels durch Sequenzierung ermittelt werden. Zur weiteren Aufklärung des Phänotyps sollten jeweils die zuvor verwendeten Marker bp102 (Seeger et al., 1993), FasII und 22C10 (Hummel et al., 2000) vor dem Hintergrund einer HRP-Färbung eingesetzt und detailliert im Wildtyp und der Mutante untersucht werden. Dadurch sollten die

anatomischen Veränderungen des PC besser erfasst werden und mit gleichwertig gefärbten, wildtypischen Gehirnen verglichen werden.

Die bisherige Analyse der Mutanten erbrachte neben der Beschreibung der beiden betroffenen Areale PHK und PC auch Erkenntnisse bezüglich der im Embryo gebildeten optischen Loben. Diese erscheinen in *hbn*-Mutanten delokalisiert und teilweise fusioniert. Durch die neue Markerkombination mit HRP sollte deren Aufenthaltsort in mutanten Gehirnen genauer visualisiert und analysiert werden.

Ebenfalls wurde eine Hemisphärenfusion angesprochen, deren Entstehungszeitpunkt, weitere Entwicklung und genaue Charakteristik jedoch nicht gezeigt wurde. Durch geeignete Marker sollte nun die Natur dieser Fusion veranschaulicht werden.

Ferner wurde für alle Allele ein schwacher Phänotyp mit Teilkommissur und geringerem PC-Defekt festgestellt, der mit einer niedrigeren Penetranz auftritt (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Eine vergleichende Analyse dieses Phänotyps sollte mittels der oben genannten Markerkombinationen durchgeführt werden, um so das Verständnis der Auswirkung einer *hbn*-Mutation auf die embryonale Gehirnentwicklung zu erweitern.

4.9.1 *Hbn*-Phänotyp mit schwerer Ausprägung

Um die molekulare Natur des noch ungeklärten *hbn*⁴⁰²⁸-Allels zu ergründen, sollten weitere Sequenzierungen des mutanten Genlokus durchgeführt werden. Im Rahmen der vorangegangenen Dissertation wurden alle Exonbereiche des mutanten *hbn*⁴⁰²⁸-Genlokus untersucht, jedoch keine Veränderung vorgefunden. Da in *hbn*⁴⁰²⁸ im Unterschied zu *hbn*¹⁵²²⁷ ein Protein detektierbar ist, wurde jetzt angenommen, dass die zugehörige Nonsense-Mutation weiter 3' liegen müsste, wodurch ein größeres Proteinfsegment erzeugt würde, jedoch die Homeodomäne wahrscheinlich nicht vollständig enthalten bliebe. Daher sollten die Spleißstellen und ihre Exon/Intron-Umgebung untersucht werden. Durch Verwendung der Primer *hbn*7A und *hbn*8A wurde ein entsprechender Bereich amplifiziert und nach Klonierung in den pCR2.1® TOPO-Vektor sequenziert. Die Sequenzierung zeigte einen Basenaustausch an Position 604, der zur Bildung eines Stopp-Codons führt. Somit wird in der *hbn*⁴⁰²⁸-Mutante ein 202 AS großes, N-terminales Fragment gebildet, welches sich mit dem gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper nachweisen lässt. Ein Vergleich der Ergebnisse der Sequenzierungen der *hbn*-Allele kann im Anhang, Abb.7.2, betrachtet werden.

Zur weiteren Ergründung der phänotypischen Auswirkungen der mutanten *hbn*-Allele sollte zunächst der schwere *hbn*-Phänotyp anhand der beiden EMS-induzierten *hbn*-Allele

untersucht werden. Dazu wurde eine anti-HRP-Färbung in Kombination mit bp102 bzw. FasII sowohl in dorsaler als auch lateraler Ansicht des Wildtyps und der Mutanten betrachtet. Somit sollte die genaue Veränderung des anterioren PC geklärt werden und diese in Relation zu den wildtypischen Daten bezüglich des Hbn-Musters sowie der Funktion von Hbn als Stamm- und Progenitorzell-spezifischem Faktor des PC gesetzt werden.

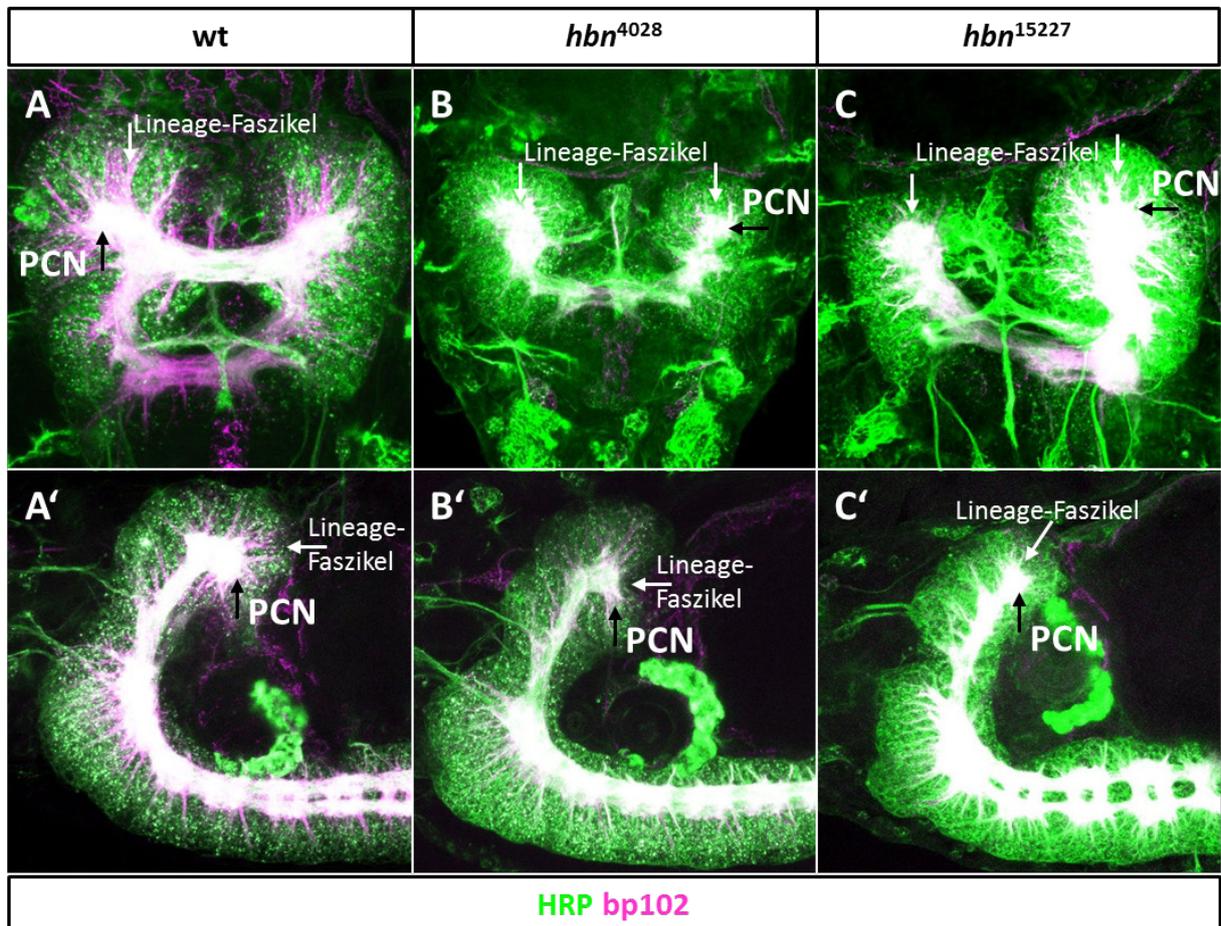


Abb.4.9: Darstellung des *hbn*-mutanten Phänotyps mit axonalem Marker bp102. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler und -lateraler Ansicht (40x) von (A,A') *yw*-, (B,B') *hbn*⁴⁰²⁸- und (C,C') *hbn*¹⁵²²⁷-Gehirnen in ES 16 mit anti-HRP- und -bp102-Färbung, anterior nach unten bzw. nach links: (A,A') Wildtypisches Expressionsmuster von bp102. Weißer Pfeil deutet auf Lineage-Faszikel in dorsaler und lateraler Ansicht. Schwarzer Pfeil weist auf PCN. (B,B',C,C') *hbn*⁴⁰²⁸- und *hbn*¹⁵²²⁷-Gehirne zeigen einen Ausfall von fast allen Lineage-Trakten (weiße Pfeile) des PC sowie einen verkleinerten PCN (schwarze Pfeile).

In anterior-dorsaler Aufsicht des *wt*-Gehirns, gefärbt mit dem axonalen Marker bp102, fallen die Axontrakte des Gehirns deutlich auf, welche von den einzelnen im Cortex des Gehirns gebildeten Lineages ausgesandt werden. Viele Projektionen verlaufen interhemisphärisch, wodurch die präorale Hirnkommissur ebenfalls stark hervortritt (Abb.4.9,A,A').

In mutanter Situation erscheinen die vorher beschriebenen Axontrakte (Abb.4.9,A,A') verkürzt oder fehlen sogar gänzlich (Abb.4.9,B,B',C,C', weiße Pfeile). PC-spezifische, kommissurale Trakte fehlen vollständig, was den Verlust der supraoesophagealen Hirnkommissur bedeutet (Abb.4.9,B,C). In lateraler Ansicht erscheinen die Axontrakte in *wt*-

Gehirnen von ventral nach dorsal über das PC verteilt und zum Protocerebralkonnektiv projizierend, der schließlich in die Kommissur übergeht. Mit mutantem Hintergrund fehlen, je nach Ausprägung des Phänotyps, die meisten oder sogar alle Axontrakte. Der PCN ist dadurch sichtlich kleiner oder fehlt gänzlich in seiner Form als dorso-laterale Erweiterung des embryonalen Gehirnneuropils (Abb.4.9,B,B',C,C', schwarze Pfeile).

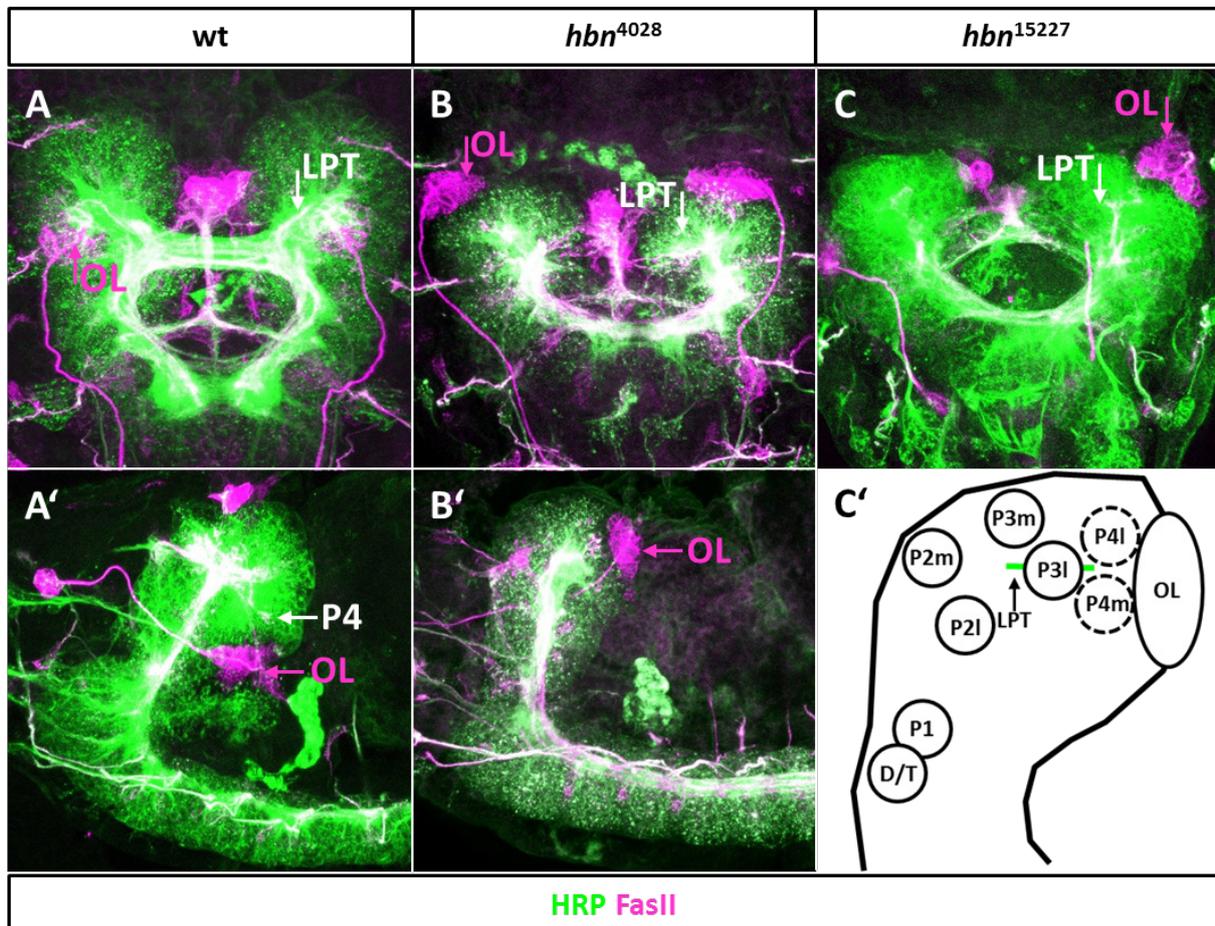


Abb.4.10: Darstellung des *hbn*-mutanten Phänotyps mit dem spezifischen neuronalen Marker FasII. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler und -lateraler Ansicht (40x) von (A,A') *yw*-, (B,B') *hbn*⁴⁰²⁸- und (C,C') *hbn*¹⁵²²⁷-Gehirnen in ES 16 mit anti-HRP- und -FasII-Färbung, anterior nach unten bzw. nach links: (A,A') Aufnahme des wildtypischen, embryonalen Gehirns mit FasII-pos. Trakten und den optischen Loben dorsal der Hemisphären. Weiße Pfeile zeigen den LPT, den P4-Gründertrakt, lila Pfeile zeigen die OL. (B,B',C) *Hbn*⁴⁰²⁸- und *hbn*¹⁵²²⁷-Gehirne zeigen Veränderungen des LPT (weiße Pfeile), die optische Lobe ist anterior an das PC angelagert (lila Pfeile). (C') Schema zeigt Veränderung des SAG mit Verschiebung der OL und Verlust der P5-Cluster sowie Verringerung der P4-Gründercluster und zugehöriger Pioniertrakte LPT, VCT, DCT (vgl. Abb.4.5).

Wildtypische ES 16-Gehirne zeigen ein spezifisches Muster axonaler Projektionen, die den *ftfc* entsprechen und durch anti-FasII spezifisch markiert sind (vgl. Abb.4.5,D'). Neben den drei interhemisphärischen Kommissurtrakten erscheint angrenzend der im PCN verlaufende longitudinale, protocerebrale-Trakt (LPT) (Abb.4.10,A,A', LPT, weiße Pfeile), der von den dortigen P4- und P5-Gründerclustern gebildet wird (Abb.4.10,A', P4, weißer Pfeil). Weiter befinden sich die optischen Loben, welche ventral der Hemisphäre liegen, am dorsalen Cortex des PC anliegend (Abb.4.10,A,A', OL, lila Pfeile).

In *hbn*-mutanten Embryonen erscheint die Situation gänzlich verändert, da sich meist weder PC-Gründerzelltrakte differenzieren lassen noch Kommissurtrakte vorhanden sind oder das *ftfc*-Muster fast vollständig ausgelöscht erscheint. Der LPT ist hier je nach Ausprägung des PC-Defektes verkürzt (Abb.4.10,B,C, LPT, weiße Pfeile), kann aber auch gänzlich durch Verlust der P4- und P5-Cluster deletiert sein. Neben den protocerebralen Veränderungen gibt es noch die Lageveränderung der optischen Loben, welche anterior an das reduzierte Protocerebrum verschoben und dort häufig in Auskerbungen des PC lokalisiert sind, was besonders in der lateralen Ansicht deutlich wird (Abb.4.10,B', OL, lila Pfeile; Abb.4.10,C').

In beiden Mutanten erscheint zudem häufig das SAG in seinem Winkel zum ventralen Nervensystem verändert (Abb.4.10,B'). Alle Veränderungen sind in Abb.4.10,C' schematisch zusammengefasst. Eine detaillierte Betrachtung des *FasII*-Musters in Wildtyp und Mutante in verschiedenen Entwicklungsstadien, ES 13 und ES 16, belegen bereits eine starke Veränderung des PC-ständigen Gründerzellmusters in dem nur noch der verminderte LPT teilweise identifiziert werden kann. Eine Analyse des 22C10-Musters in *hbn*¹⁵²²⁷ zeigt deutlich den Ausfall des PC-ständigen Musters des Reporters sowie die strukturelle Veränderung des PCN und die Verlagerung der erhaltenen 22C10-positiven PC-Trakte. Zugehörige Aufnahmen können im Anhang, Abb.7.4, betrachtet werden. Zum besseren Vergleich der mutanten und wildtypischen Situation wurden ebenfalls Dreifachfärbungen der Marker mit zusätzlicher anti-Hbn-Färbung durchgeführt. Diese Aufnahmen können ebenso im Anhang, Abb.7.3, betrachtet werden.

Die Betrachtung des *bp102*-Musters vor dem Hintergrund einer panneuralen HRP-Färbung zeigt in den *hbn*-Mutanten eindeutig eine Verkürzung der Lineagetrakte, die zu einer Schmälerung des Neuropils, besonders im Bereich des PCN führt. Im Vergleich zum Wildtyp wird offensichtlich, dass alle protocerebralen Lineagetrakte, die von Hbn-positiven Lineages ausgehen und zum Neuropil bzw. PCN führen, verkürzt oder ablatiert sind. Der Vergleich von *FasII* vor dem Hintergrund der HRP-Färbung beweist, dass die translozierte OL in den häufig auftretenden Kerben des anterioren PC anzutreffen ist und die P4,5m- und P4,5l-Pioniercluster bzw. -Trakte (LPT, ACT, D/VCT) des anterioren PC verkürzt bzw. deletiert sind.

4.9.2 *Hbn*-Phänotyp mit schwachem Kommissurdefekt bzw. fusionierten Hemisphären

Wie zu Beginn der zu erweiternden phänotypischen Analysen der *hbn*-mutanten Gehirne bereits erwähnt, wurde auch ein Phänotyp mit schwächerer Ausprägung und geringerer

Penetranz beobachtet (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Neben dem am häufigsten beobachteten Phänotypen mit komplettem Verlust der präoralen Hirnkommissur, der als schwerer Phänotyp bezeichnet wurde, kommt es in allen *hbn*-Mutanten auch zur selteneren Ausbildung eines schwachen Phänotyps mit teilweise erhaltener Kommissur und größeren PC-Anteilen (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Um diese bisher nicht detailliert dokumentierte und beschriebene phänotypische Auswirkung der *hbn*-Mutation mit dem schweren Phänotyp vergleichen zu können, sollten die gleichen Markerfärbungen angewandt werden. Ferner sollte der angesprochene Phänotyp, der eine Fusion des Protocerebrums zeigt, bestätigt werden. Auch in diesem Fall sollten durch eine Markerkombination die Veränderungen des SAG analysiert und mit den übrigen Phänotypen verglichen werden. Insgesamt sollte ermittelt werden, ob die Veränderungen des PC und der PHK in Zusammenhang stehen oder in ihrer unterschiedlichen Ausprägung unabhängig voneinander entstehen.

Die hier untersuchten Gehirne des *hbn*¹⁵²²⁷-Allels zeigen einen starken PC-Phänotyp, der sich ebenfalls durch Verkleinerung der Lineagetakte und des PCN auszeichnet (Abb.4.11,A,B, schwarzer Pfeil). Eine veränderte Lokalisation der optischen Lobe, was dem starken Phänotyp entspricht, ist ebenfalls zu beobachten (Abb.4.11,A, lila Pfeil). Dies geht mit der Verkleinerung des PC einher; die Veränderungen an den P4/5-Gründertrakten, dem LPT, entsprechen ebenfalls der starken Ausprägung des Phänotyps (Abb.4.11,A,B weißer Pfeil). Die Untersuchungen bezüglich der angesprochenen Hemisphärenfusion zeigten den Beginn der Fusion in ES 12. Die Fusion der Hemisphären findet ausschließlich an den anterioren Spitzen der Neuraxis statt. Eine Teilkommissur wird in diesen Gehirnen nicht beobachtet. Am Ende der NS-Entwicklung kann jedoch ein fusionierter Neuropil ausgemacht werden, der als brückenartige Struktur beschreibbar ist (Abb.4.11,C, lila Pfeil). Der PCN ist hier statt lateral nach medial orientiert (Abb.4.11,C, PCN, schwarzer Pfeil). Die jeweiligen Häufigkeiten des Auftretens der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen wurden bereits durch die vorangegangene Arbeit ermittelt (Dissertation Petra Kaspar, 2008).

Die hier durchgeführten Analysen bestätigen zwar das Vorhandensein einer Teilkommissur des PC (Abb.4.11,A,B, lila Pfeile), jedoch steht dies nicht in allgemeinem Zusammenhang mit einem schwächeren Defekt des PC.

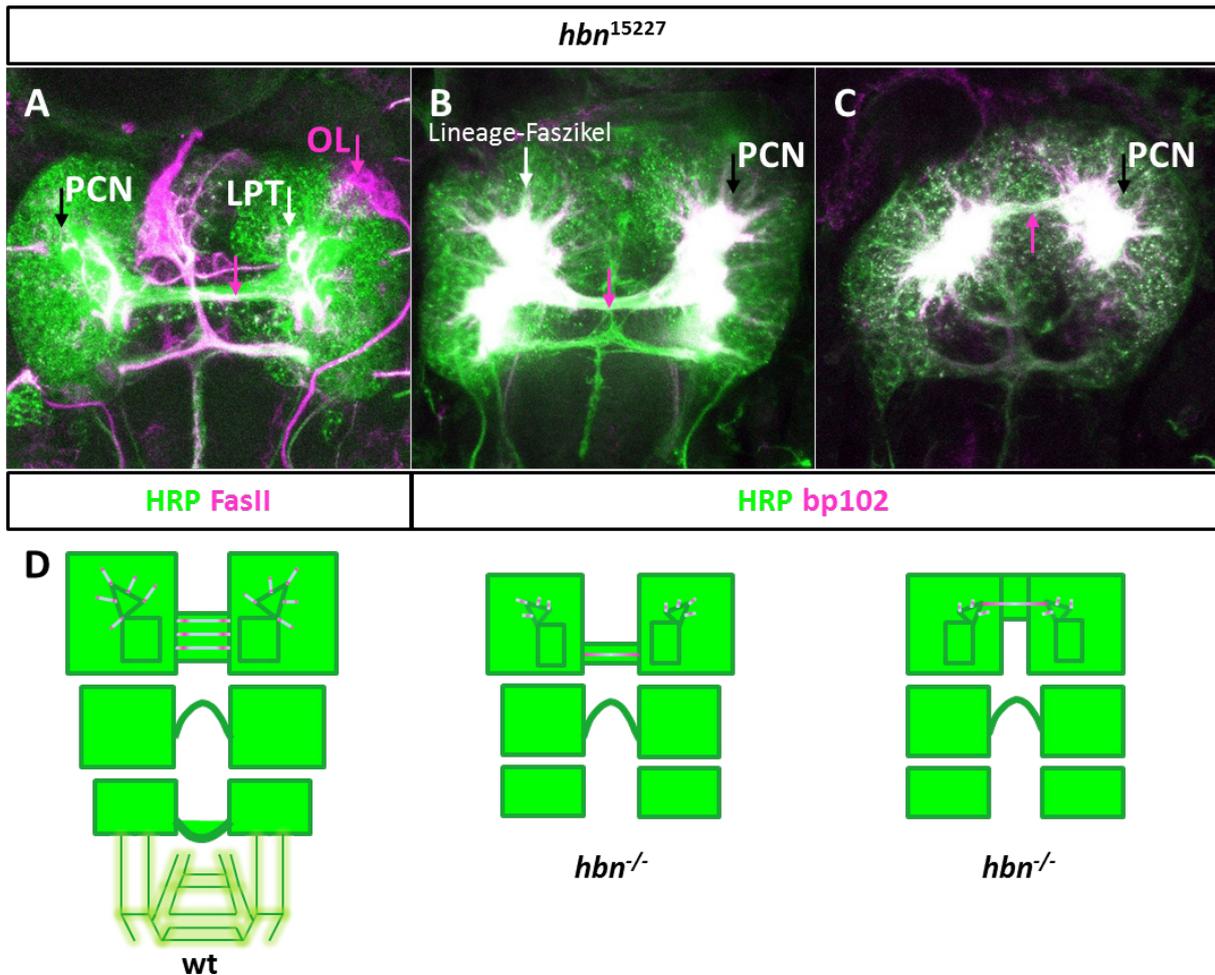


Abb.4.11: Darstellung des schwachen *hbn*-Phänotyps und des Phänotyps mit fusionierten Hemisphären. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) von *hbn*¹⁵²²⁷-Embryonen (ES 16) mit (A) anti-FasII und -HRP- sowie (B,C) -bp102- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Gehirn mit verminderter Kommissur. Lila Pfeil zeigt auf einzigen FasII-pos., interhemisphärischen Trakt bzw. delokalisierte Lage der OL. Schwarzer Pfeil deutet auf verminderten PCN, weißer Pfeil weist auf verkürzten P4-Trakt, den LPT. (B) Weißer Pfeil zeigt verminderte Lineage-Trakte, schwarzer Pfeil zeigt verkleinerten PCN, lila Pfeil verkleinerte Kommissur. (C) Gehirn mit fusionierten Hemisphären. Lila Pfeil zeigt brückenartige Fusion des Neuropils, schwarzer Pfeil zeigt veränderte Ausrichtung des PCN. (D) Schematische Darstellung in anterior-dorsaler Aufsicht des wildtypischen Gehirns im Vergleich zum *hbn*-mutanten Gehirn mit schwachem Phänotyp bzw. mit fusionierten Hemisphären.

Durch die mikroskopische Darstellung schwach ausgeprägter Phänotypen der *hbn*⁴⁰²⁸- und *hbn*¹⁵²²⁷-Mutanten konnte jetzt geklärt werden, dass sich der schwache Phänotyp nicht grundsätzlich durch einen verminderten Effekt im PC und eine vorhandene, jedoch schwache Hirnkommissur auszeichnet, sondern diese beiden differenziellen Aspekte auch unabhängig voneinander auftreten. So können Gehirne mit teilweise vorhandener Kommissur auch einen starken Defekt des PC zeigen und Gehirne mit wenig vermindertem PC einen vollständigen Verlust der PHK aufweisen. Im weiteren Verlauf sollte nun das in *hbn*-Mutanten verkleinerte PC bezüglich der Auswirkung auf den dort gelegenen PK untersucht werden.

4.10 *Hbn*-Mutanten zeigen einen Verlust des Pilzkörpers

Untersuchungen an *hbn*-Mutanten belegen eine starke Ablation der anterioren, protocerebralen Bereiche. Diese Zone enthält auch die vier Neuroblasten des Pilzkörpers (PK), welche die Kenyonzellen als Lineage des PK bilden (siehe 2.8, Abb.2.13). Da die bisherig verwendeten Markerkombinationen nicht ausreichten, um die Veränderungen des PC mit dem PK in Verbindung zu bringen, wurde mit 238YGal4 (Kurusu et al., 2000; Tettamanti et al., 1997; Yang et al., 1995) ein geeigneter Reporterstamm gewählt, der die PK-NB, die Kenyonzellen und deren axonale Projektionen, den Pedunkel, anhand des verwendeten membranständigen Markers UAScd8GFP anzeigt (Lee und Luo, 1999). Als Marker für die neuronale Masse des späten embryonalen Gehirns wurde Neurotactin verwendet. Der eigentliche Nachweis der Hbn-Expression in PK-NB sollte ebenfalls in Nrt-markierten Gehirnen visualisiert werden, da dieser in bisherigen Ansätzen nicht vollständig gelang.

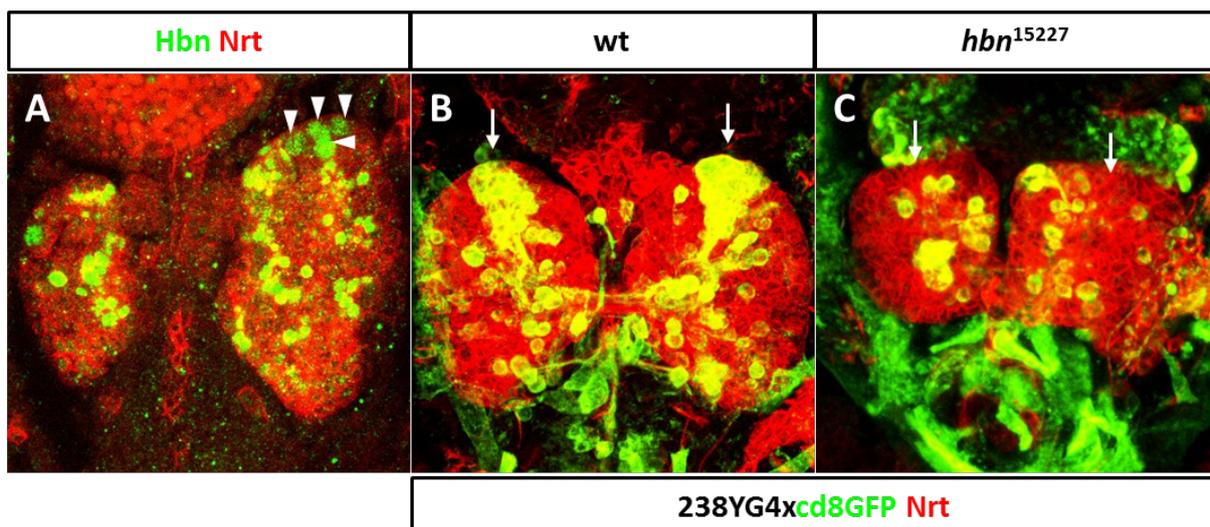


Abb.4.12: Untersuchung des PK-Phänotyps von *hbn*-Mutanten. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (63x) von (A) *yw*-, (B,C) 238YGal4::GFP- und *hbn*¹⁵²²⁷/238YGal4::GFP-Embryonen in ES 16 mit (A) anti-Hbn- und -Nrt- sowie (B,C) anti-GFP- und -Nrt-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Weiße Pfeilspitzen zeigen vier Hbn-pos. PK-NB. (B) Weiße Pfeile zeigen die wildtypische Expression des PK-spezifischen 238YGal4-Reporters. (C) Weiße Pfeile zeigen Verlust des PK-spezifischen GFP-Musters in *hbn*¹⁵²²⁷-Gehirnen.

Da PK-NB als einzige NB am Ende der Embryonalentwicklung nicht in die Ruhephase eintreten, können diese im ES 16 noch immer mit großen Kernen an der anterioren Spitze des PC gefunden werden. Eine anti-Hbn-Färbung hebt deutlich die Kerne der vier PK-NB hervor und bestätigt die Expression von Hbn in diesen NB (Abb.4.12,A, weiße Pfeilspitzen). Ein Beweis der korrekten Identifizierung dieser NB konnte im Vergleich zu *svplacZ* erfolgen, da *Svp* in den anterior-ventral lokalisierten NB exprimiert wird und der zugehörige Reporter mit Hbn während der PC-Entwicklung kolokalisiert (Daten nicht gezeigt). In 238YGal4::UAScd8GFP-Embryonen können in beiden embryonalen Hirnhemisphären im

anterior-ventralen Bereich des PC deutlich die NB des PK und die Kenyonzellen mit ihren Axonprojektionen beobachtet werden (Abb.4.12,B, weiße Pfeile). Wird dieses rekombinierte Konstrukt in die *hbn*¹⁵²²⁷-Mutante eingekreuzt und angefärbt, so ist es möglich, die Struktur des PK in mutanten Gehirnen sichtbar zu machen. Letztere zeigen eine starke Verminderung des PC. Dabei können in *hbn*¹⁵²²⁷-Gehirnen weder eine Färbung des PK noch dessen Projektionen anhand der 238YGal4-Expression beobachtet werden, was einer Nichtbildung des PK in *hbn*-Mutanten entspricht (Abb.4.12,C, weiße Pfeile).

Die detaillierte Analyse des PC-Defektes von *hbn*-Mutanten lässt im Hinblick auf die hier ermittelten Daten folgende Schlüsse zu: Der Verlust des PC betrifft die Hbn-positiven Lineages an der anterioren Spitze der Neuraxis, die sich im ventralen und dorsalen Anteil von lateral bis medial verteilen. Dabei kann eine Verminderung der Lineagetrikte in Abhängigkeit der Stärke des Phänotyps beobachtet werden. Dieser Verlust protocerebraler Lineages und ihrer faszikulären Anteile bedingt die Verkleinerung des Neuropils und besonders des PCN. Die Bildung dieser Lineages steht in Zusammenhang mit den nachgewiesenen Hbn-positiven Stamm- und Progenitorzellen, die an der anterioren Spitze der Neuraxis liegen.

Nach Untersuchung des mutanten Phänotyps sollten unter Einsatz der gewonnenen Erkenntnisse die Ursachen für die vorliegenden phänotypischen Aberrationen gefunden werden. Dabei wurden zuerst der Entstehungszeitpunkt der protocerebralen Ablationen und im Anschluss die Ursachen für den zellulären Verlust untersucht.

4.11 *Hbn*-Mutanten zeigen eine frühe Entstehung der protocerebralen Ablation

In den vorangegangenen Untersuchungen zur phänotypischen Veränderung embryonaler Gehirne in *hbn*-Mutanten wurden Beginn (ES 12) und Ende der Kommissurbildung (ES 15) im Wildtyp und der Mutante untersucht. Dabei stellte man das Vorhandensein der Pionierneurone fest, die sich am posterioren Ende des Protocerebrums normal formieren, jedoch keine Bewegung in die Mittellinie zeigen (Dissertation Petra Kaspar, 2008). In den bisher getätigten Untersuchungen der Mutante konnte auch gezeigt werden, dass die verbliebene neuronale Masse am Ende der Gehirnentwicklung ELAV als Marker für differenzierte Neurone exprimiert (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Bezüglich des protocerebralen Defektes wurde der Beginn der phänotypischen Aberration jedoch noch nicht bestimmt. In weiterführenden Untersuchungen sollte daher die protocerebrale

Entwicklung in *hbn*-Mutanten untersucht und der Zeitpunkt ermittelt werden, ab dem eine Veränderung des anterioren Protocerebrums im Vergleich zu den gesammelten wildtypischen Daten (vgl. Abb.4.6) feststellbar ist. Das Ausmaß der verbliebenen Hbn-Expression im Bereich des anterioren PC sollte in *hbn*⁴⁰²⁸ untersucht werden, um somit eventuell eine veränderte Expression mit der Veränderung des PC in Zusammenhang bringen zu können. In dieser Untersuchung sollte der Beginn der Hemisphärenbildung und der Bereich feststellbarer Deletionen des anterioren PC ebenfalls mit ELAV untersucht werden, um eine eventuelle Nichtdifferenzierung der gebildeten Zellen im frühen Gehirn als Ursache für den Phänotyp bestätigen oder ausschließen zu können.

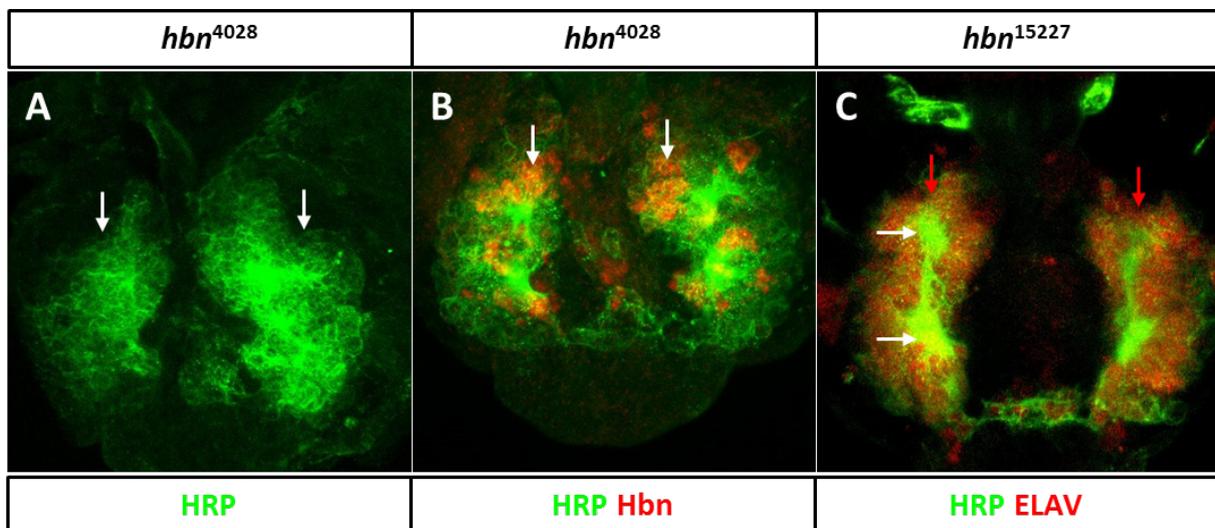


Abb.4.13: Frühe Entstehung des PC-Defektes in *hbn*-Mutanten. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) von *hbn*⁴⁰²⁸- und *hbn*¹⁵²²⁷-Embryonen (ES 12) mit (A) anti-HRP, (B) -Hbn- und -HRP-, (C) -ELAV- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Weiße Pfeile zeigen den Verlust anteriorer, protocerebraler Substanz. (B) Weiße Pfeile zeigen vermindertes Hbn-Muster im anterioren PC. (C) Rote Pfeile zeigen vorhandene, differenzierte Neurone im verkleinerten, anterioren PC; weiße Pfeile zeigen den zerteilten Neuropil.

Durch HRP-Färbungen kann etwa in ES 12 bereits eine Verkleinerung protocerebraler Bereiche vorgefunden werden. Diese zeichnet sich im Vergleich zu den untersuchten Gehirnen späterer Entwicklungsabschnitte (ES 15) bereits durch Kerben an der anterioren Spitze der Neuraxis aus (Abb.4.13,A, weiße Pfeile). Eine Untersuchung des Hbn-Musters in *hbn*⁴⁰²⁸ zeigt zwar das Vorhandensein von Hbn-positiven Zellkernen, diese befinden sich jedoch mehrheitlich im medialen, der Mittellinie angrenzenden Bereich der sich entwickelnden Hemisphäre (Abb.4.13,B, weiße Pfeile; vgl. Abb.4.6) und nicht in vergleichbarer Form an der anterioren Spitze der Neuraxis, wie es im Wildtyp beobachtet wird. Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob in ES 12 alle gebildeten Zellen des Protocerebrums ihre neuronale Identität behalten, da in anderen gehirnspezifischen

Mutanten, wie z.B. *labial*-Mutanten (Hirth et al., 1998) die Expression von ELAV in den betroffenen Bereichen verloren geht. Die Untersuchung ergab, dass im bereits verkleinerten, anterioren PC die Expression von ELAV in den gebildeten Zellen bestehen bleibt, diese somit korrekt differenziert sind (Abb.4.13,C, rote Pfeile). In den untersuchten Gehirnen wurden keine Anzeichen für das Vorhandensein undifferenzierter Zellen im anterioren PC gefunden.

Der protocerebrale Defekt ist schon in ES 12 anzutreffen und ist daher ursächlich schon vor der Kommissurbildung anzusetzen. Aufgrund dieser frühen Erscheinung protocerebraler Defekte muss es zu einem sehr frühen Ausfall der Bildung von Stammzellen bzw. deren Proliferation oder sogar des Zelltodes im PC kommen. Die Ursache für diesen frühen, strukturellen Verlust sollte in nachfolgenden Experimenten geklärt werden.

4.12 Analyse der Ursachen für den Verlust protocerebraler Lineages in *hbn*-Mutanten

Veränderungen des Protocerebrums und der präoralen Hirnkommissur wurden auch in Mutanten der Kopflückengene gefunden, wie oben in dieser Arbeit erläutert (siehe 2.2, Abb.2.5) und bereits in der vorangegangenen Arbeit mit den *hbn*-Mutanten verglichen wurden (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Ursächlich begründen sich die Phänotypen der Kopflückengene dabei durch den Ausfall der Expression proneuraler Gene, deren Funktion für die Neuroblastenbildung im procephalen Neuroektoderm, besonders in den für das PC bedeutenden Arealen, entscheidend ist. So werden in Mutanten von *otd* und *tll* Ausfälle des proneuralen Faktors Lethal of scute beobachtet, die zu einem spezifischen Verlust von neuronalen Zellen aufgrund der fehlenden Neuroblasten führen (Younossi-Hartenstein et al., 1997).

Weitere Ursache für das Fehlen von neuronalen Zellen kann ein Ausfall der Proliferation von Progenitorzellen sein oder der Verlust von bereits gebildeten Zellen durch Apoptose, wie z.B. in *wg*-Mutanten (Richter et al., 1998). Im Fall der Mutationen von *hbn* müsste aufgrund der Expression der trunkierten, mutanten Hbn-Proteine ein Ausfall der Proliferation im Bereich des PC oder Apoptose ursächlich für den Verlust des PC verantwortlich sein. Um die Ursache des Phänotyps der *hbn*-Mutanten zu klären, wurden mutante Embryonen während ihrer Entwicklung mit Proliferations- und Apoptose-Markern untersucht. Ein weiterer Aspekt sollte mit der Untersuchung des frühen Streifens mit *hbn*-mutantem Hintergrund angegangen werden, da dieser in der mutanten Situation nicht nachgewiesen werden konnte (Dissertation Petra Kaspar, 2008).

4.12.1 Untersuchung zur Bildung des frühen, blastodermalen Hbn-Expressionsstreifens in der *hbn*⁴⁰²⁸-Mutante

In vorangegangenen Studien zur Expression von Hbn in der *hbn*⁴⁰²⁸-Mutante, in der sich das C-terminal trunkierte Hbn-Protein (siehe 4.9.1, Abb.7.2) durch den N-terminalen Antikörper nachweisen lässt, konnten Veränderungen der embryonalen Expression nach Aufspaltung des frühen Streifens (ES 7) beobachtet werden. So zeigen mutante Embryonen ab der Erstellung des Multidomänen-Musters ein vom *wt* abweichendes Hbn-Muster. Die Expression des frühen Streifens selbst konnte durch Antikörperfärbungen bisher nicht in der Mutante bestätigt werden (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Um die Existenz des frühen Streifens im Blastoderm des mutanten Embryos nachweisen zu können, wurde die *hbn*⁴⁰²⁸-Mutante mit dem *hunchbacklacZ*-mutierten Balancerchromosom [*CyO(hblacZ)*] balanciert. Durch Antikörperfärbungen gegen beta-Galaktosidase kann die Aktivität des Reporters in heterozygot-mutanten Embryonen nachgewiesen werden und dadurch eine Unterscheidung von nichtgefärbten, homozygot-mutanten Embryonen erfolgen. Die Färbungen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und nach entsprechenden homozygot-mutanten Spezimen ohne Reporterfärbung, aber mit einem Hbn-Streifen, abgesehen.

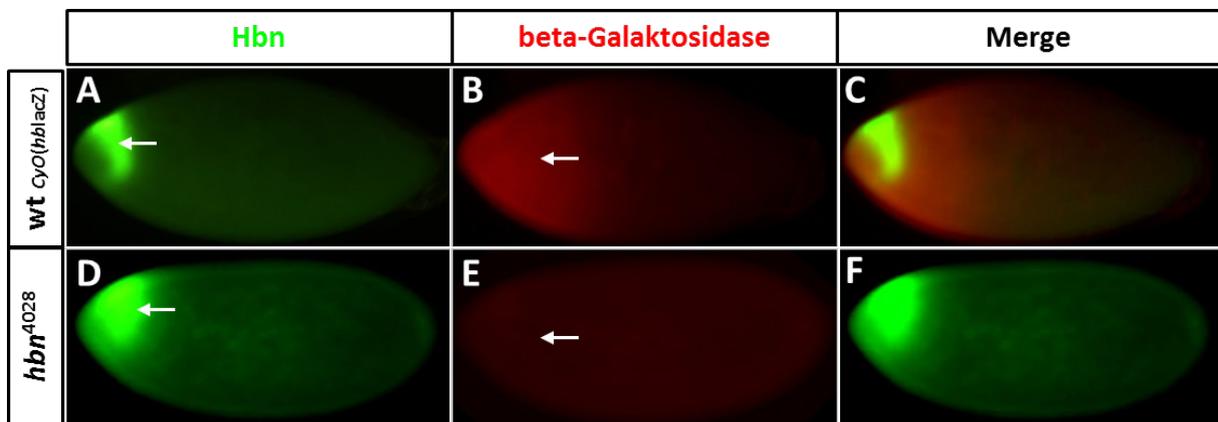


Abb.4.14: Untersuchung der Expression des frühen Streifens in *hbn*⁴⁰²⁸. Laterale Gesamtansicht (20x) von (A-C) *hbn*⁴⁰²⁸/*CyO(hblacZ)*- und (D-F) *hbn*⁴⁰²⁸-Embryonen (ES 5) mit anti-beta-Gal- und -Hbn-Färbung, alle Embryonen anterior nach links: (A) Weißer Pfeil zeigt *wt*-Hbn-Färbung an *hbn*⁴⁰²⁸-Embryo mit *CyO/hunchbacklacZ*-Reporter. (B) Weißer Pfeil zeigt die anteriore beta-Gal-Färbung des *hunchback*-Reporters vom anterioren Pol ab, mit abnehmender Intensität. (C) Merge. (D) Weißer Pfeil zeigt frühen, anterior-dorsalen Streifen des Embryos durch anti-Hbn-Antikörperfärbung in *hbn*⁴⁰²⁸-Embryonen. (E) Der Ausfall der beta-Gal-Färbung bestätigt die homozygot-mutante Identität des Embryos. (F) Merge.

In diesem Ansatz konnte mit Antikörpern die *hblacZ*-Expression in Balancer-tragenden Embryonen eindeutig gegenüber homozygot *hbn*-mutanten Embryonen ohne Gradient nachgewiesen werden (Abb.4.14,B,E, weiße Pfeile). Somit konnten mutante von

wildtypischen Embryonen unterschieden und sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante ein früher Streifen nachgewiesen werden (Abb.4.14,A,D, weiße Pfeile).

Abbildungen 4.14,C,F zeigen die Übereinanderlagerungen der Signale und beweisen die Existenz eines frühen Streifens in *hbn*-Mutanten.

4.12.2 Untersuchungen zur Proliferation von Hbn-positiven, neuronalen Zellen mit anti-pH3

Proliferative Zellen lassen sich durch mehrere Techniken markieren. Eine davon ist die spezifische Färbung gegen eine in der Mitose-Phase gesetzte Histon-Phosphorylierung an Histon-H3, welche durch den spezifischen Antikörper anti-Phospho-Histon-H3 detektiert werden kann (Bello et al., 2006). In der Dissertation von Petra Kaspar konnte auf diese Art kein Zusammenhang der Hbn-Expression mit vorliegender Proliferation ermittelt werden. Um hier eine bessere Analyse zur embryonalen Gehirnentwicklung in Zusammenhang mit Hbn durchzuführen, wurden Embryonen mit HRP zur Visualisierung des sich entwickelnden Gehirns gefärbt, zudem mit anti-Hbn und -pH3, um die bereits nachgewiesenen, proliferierenden, neuronalen Stamm- und Progenitorzellen anzuzeigen. Die Analyse beginnt mit der Aufspaltung des frühen Streifens in ES 6 und geht bis in ES 16. Dabei liegt der Fokus auf den lateralen Darstellungen des supraoesophagealen Ganglions, besonders der anterioren Spitze des PC, da sich dort die nachgewiesenen Stammzellen mit Hbn-positiver Kernfärbung befinden. Der Beginn der Proliferation sollte dargestellt werden, ebenso im Detail die Proliferation während der Kommissurbildung und darüber hinaus bis an das endgültige Ende der NB-Teilung in ES 16. Ein weiterer Schritt dieser Untersuchung sah die Analyse der Proliferation in Mutanten vor. Diese erfolgte auch unter dem Aspekt des oben herausgearbeiteten Beginns der phänotypischen Ausprägung, der durch die Analyse des HRP- und ELAV-Musters weiter verdeutlicht werden sollte. Der Beginn der phänotypischen Veränderungen sollte somit vor dem Hintergrund einer Proliferationsanalyse in der Mutante festgestellt werden, um somit die Frage zu klären, ob und wann ein Ausfall von Proliferation zur Deletion des anterioren PC führt.

Eine erste Bestätigung mitotischer, Hbn-positiver Zellen konnte schon ab der Auflösung des frühen Streifens in ES 6 und bis zur Ausbildung des PNE in ES 9, nach die NB-Delamination, erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Häufige Proliferationssignale durch anti-pH3-Färbung in Hbn-positiven Stammzellen wurden ab ES 11, dem Ende der Delamination und Beginn der Progenitorzelldifferenzierung, gefunden, was sich in lateralen Projektionen gut

demonstrieren lässt. In diesen Projektionen erscheint das für den Entwicklungsverlauf als dauerhaft proliferativ gezeigte, anteriore PC (Minden et al., 2008) mit vielen Hbn/pH3-positiven Signalen. Somit zeigen die Gehirne während der Hemisphärenbildung verstärkt Proliferation an der anterioren Spitze des PC, die in vorangegangenen Experimenten als Aufenthaltsort von Hbn-positiven NB und GMC bestätigt wurde (Abb.4.15.4,A-D, weiße Pfeile, siehe 4.3). Auffällig in dieser Untersuchung ist die späte Aktivität von Hbn-positiven Stammzellen im PC, die im Cortex des ausgebildeten Gehirns immer noch Aktivität zeigen (Abb.4.15,D).

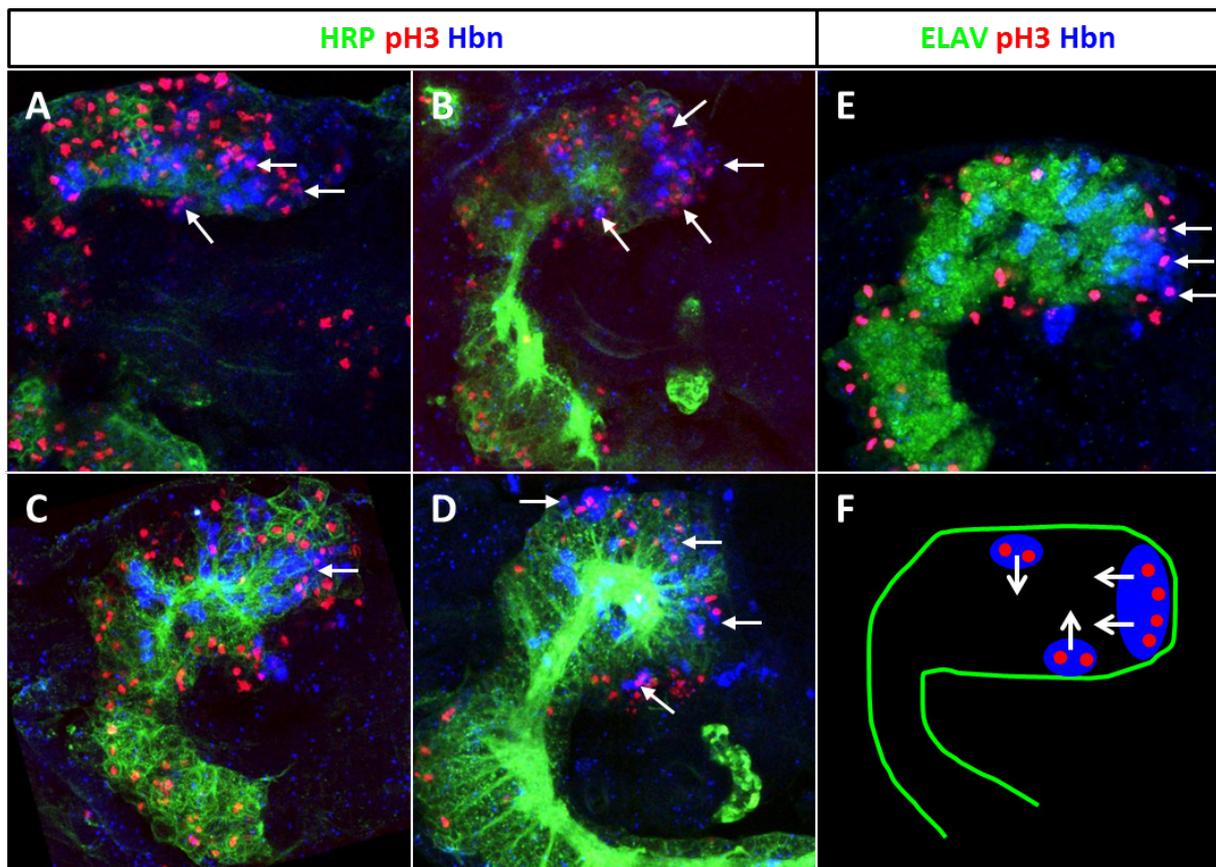


Abb.4.15: Analyse zur Proliferation von Hbn-positiven, neuronalen Zellen. Konfokale Aufnahmen in lateraler Ansicht von *yw*-Embryonen (63x) mit (A-D) anti-Hbn-, -HRP- und -pH3- und (E) -ELAV-, -Hbn- und -pH3-Färbung; alle Embryonen anterior nach links: (A) Weiße Pfeile zeigen Hbn-pos., proliferierende Zellen im dorsalen Anteil der anterioren Spitze der Neuraxis (ES 11). (B) Weiße Pfeile zeigen Hbn-pos., proliferierende Zellen im anterioren Bereich sowie im dorsalen und ventralen Anteil des PC und an dessen posteriorem Ende (ES 13). (C) Weißer Pfeil zeigt Proliferation im dorsalen Anteil des lateralen Cortex des PC (ES 14). (D) Weiße Pfeile deuten auf proliferierende, Hbn-pos. Zellen im ventralen Cortex, an der anterioren Spitze der Neuraxis im ventralen und dorsalen Anteil sowie im Bereich der OL (ES 15+). (E) Weiße Pfeile zeigen auf undifferenzierte Stamm- und Progenitorzellen an der anterioren Spitze der Neuraxis. (F) Schema zeigt Lage der Hbn-pos., proliferierenden Zonen des embryonalen Gehirns.

Wird die Proliferation im anterioren Protocerebrum gegenüber den differenzierten, ELAV-positiven, neuronalen Zellen dargestellt, so zeichnen sich die Hbn/pH3-positiven, proliferierenden Stamm- und Progenitorzellen deutlich an der anterioren Spitze der Neuraxis von den bereits abgegebenen Neuronen der zugehörigen Lineages ab (Abb.4.15,E, weiße

Pfeile). Abb.4.15,F zeigt schematisch die proliferativen, Hbn-positiven Bereiche der Hemisphäre in lateraler Darstellung an.

Die durchgeführte Analyse bezüglich der Proliferation in Hbn-positiven, gehirnständigen Zellen im Verlauf der Entwicklung untermauert eindeutig die zu einem früheren Zeitpunkt gefundenen Ergebnisse bezüglich der Verteilung der Hbn-positiven Stammzellen. Das gesamte anteriore PC konnte somit als Zentrum Hbn-positiver, proliferierender Stammzellen identifiziert werden. Dort kann zwischen ES 12 und ES 16 in dorsalen und ventralen Anteilen des PC Proliferation in mehreren Hbn-positiven Zellclustern nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Proliferation mit mutantern Hintergrund zeigte schon früh in der Entwicklung der Hemisphären die Veränderung des PC. Diese konnte allerdings nicht in Verbindung mit verringerter Proliferation gebracht werden, bestätigt jedoch, dass der Phänotyp schon etabliert ist (Daten nicht gezeigt), bevor es im Wildtyp zu der massiven Proliferation von Hbn-positiven Stammzellen kommt. Daher müssen die Zellen des PC schon sehr früh in der Entwicklung verloren gehen.

Die Hbn-Expression im anterioren PC zeigt häufig eine Übereinstimmung mit proliferierenden Stammzellen, was die Veränderungen des PC mit mutantern Hintergrund in Einklang bringt. Da in der Mutante protocerebrale Bereiche schon vor der beobachteten, eigentlichen Proliferation fehlen, kann ein Ausfall der Proliferation Hbn-positiver Stammzellen nicht Auslöser für den Verlust sein. Im folgenden Experiment sollte daher Apoptose als mögliche Ursache untersucht werden.

4.12.3 *Hbn*-Mutanten zeigen Apoptose im Bereich des sich entwickelnden Protocerebrums

Ein Überblick über apoptotische Zellen im Verlauf der embryonalen Gehirnentwicklung, ausgehend von der Formierung des PNE bis zum ausgebildeten embryonalen Gehirn, wurde durch Färbungen mit Neurotactin und dem Apoptosemarker Dcp-1 (Florentin und Arama, 2012) erstellt, um eine Vergleichsbasis für die mutante Analyse zu schaffen.

Der Vergleich mit selektierten *hbn*¹⁵²²⁷-Embryonen, die sich durch ein Fehlen des Fluoreszenz-markierten Balancerchromosoms (Halfon et al., 2002) auszeichnen und somit ausgesucht wurden, zeigt in der Gehirnentwicklung schon früh (ES 10) eine starke Zunahme der Apoptose im anterioren Bereich des PC, während übrige Bereiche weiterhin nur sporadisch Apoptose erkennen lassen (Abb.4.16,A,A', weiße Pfeile). Diese verstärkte Apoptose beginnt sehr früh und hat bis zum Zeitpunkt der wildtypischen,

interhemisphärischen Brückenbildung und darüber hinaus Bestand (Abb.4.16,B,B',C,C', weiße Pfeile). In mutanten Gehirnen des ES 15-16 kann nur die wildtypische, minimale Apoptose beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was den Zeitpunkt der Apoptose des PC mit dem Ausfall der Proliferation gleichsetzt, bzw. durch Apoptose schon die wildtypischen, proliferierenden Bereiche ablatiert werden, in denen Hbn-positive Stamm- und Progenitorzellen die PC-Lineages bilden.

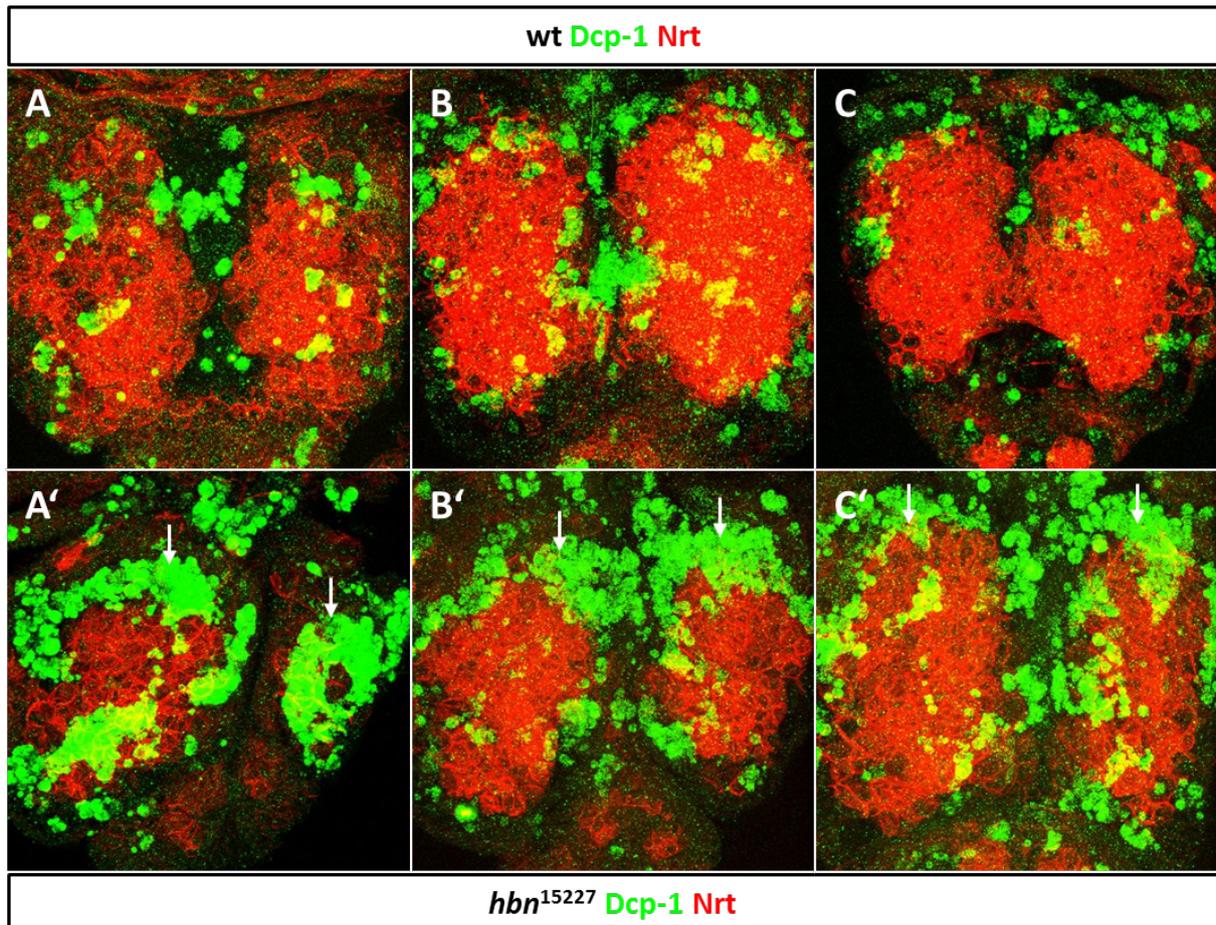


Abb.4.16: Analyse der Apoptose in *hbn*-Mutanten. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (63x) von (A-C) *yw*- und (A'-C') selektierten *hbn*¹⁵²²⁷-Embryonen (ES 10-13) [ausgehend von *hbn*¹⁵²²⁷/*CyO*(GFP)-Embryonen] mit anti-Dcp-1- und -Nrt-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Frühe, embryonale Gehirnentwicklung in ES 10-11. (A') Weiße Pfeile zeigen Halbmond apoptotischer Zellen um anteriores PC. (B) Frühe Hemisphäre, ES 12. (B') Weiße Pfeile zeigen Ablationen und starke Caspase-Aktivität an der anterioren Spitze der Neuraxis. (C) Gehirn mit interhemisphärischer Brücke ES 13. (C') Weiße Pfeile zeigen Apoptose im typischen Bereich von PC-Ablationen der *hbn*-Mutanten.

Zusammenfassend kann aus den durchgeführten Analysen in Bezug auf die Aufklärung des Verlustes von protocerebralen Strukturen in *hbn*-Mutanten geschlossen werden, dass im Bereich der starken proliferativen Aktivität ein Verlust der Zellsubstanz durch Apoptose schon vor Beginn der Kommissurbildung zu verzeichnen ist. Dies geht mit den gewonnenen Daten zur Proliferation in der Mutante konform, da schon in frühen Gehirnen die Veränderung des Gehirns im anterioren PC durch Verlust von neuronaler Zellmasse

anzutreffen ist und daher die Proliferation in diesem besonderen Areal im Vergleich zu den nicht betroffenen Arealen vermindert erscheint.

4.13 Rettungs-Experimente mit *hbn*-spezifischen P[acman]-Konstrukten

Für die *hbn*-Mutanten sollten Rettungsexperimente durchgeführt werden, um genomische Bereiche zu definieren, die für die embryonale Genfunktion im Zusammenhang mit der Gehirnentwicklung relevant sind. Dazu wurden sog. P[acman]-Konstrukte verwendet, die aus einer genomabdeckenden Bank von Klonen stammen (Venken et al., 2009). Diese Klone besitzen jeweils etwa 20kb DNA in einem Transformationsvektor und decken in ihrer Gesamtheit alle genomischen Bereiche ab, so auch den *hbn*-Genbereich. Verwendet wurden das Konstrukt 19C04, welches vom 3' Ende des *hbn*-Gens bis zu den nächsten 5' gelegenen Genen reicht, sowie 89N09, welches sehr weit in den 3'-Bereich von *hbn* hinein reicht, jedoch 5' von *hbn* nur etwa 4kB enthält (Abb.4.17).

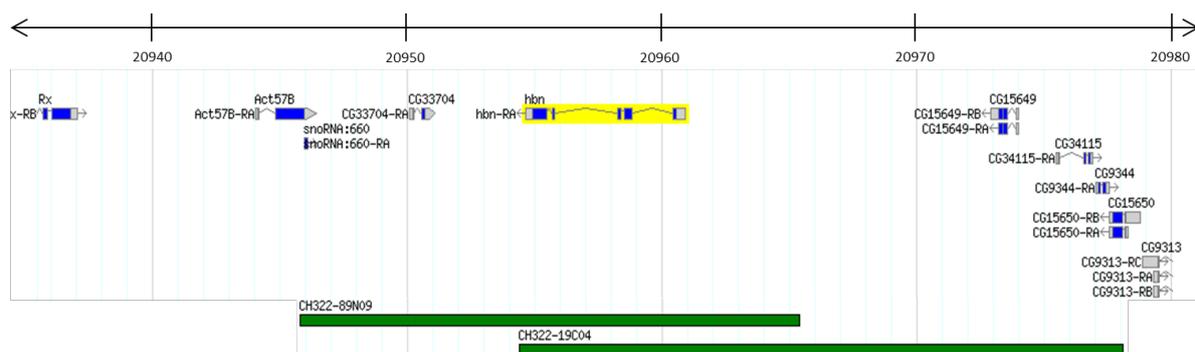


Abb.4.17: Lage der *hbn*-spezifischen P[acman]-Rettungs-Konstrukte. 89N09; 19C04.

Beide Konstrukte wurden nach Keimbahntransformation und einer gerichteten Integration auf dem dritten Chromosom balanciert und anschließend mit den balancierten *hbn*⁴⁰²⁸- und *hbn*¹⁵²²⁷-Mutanten gekreuzt und die F¹-Generation geselbstet. Gesammelte Embryonen dieser Kreuzung wurden zu Letalitätsstudien verwendet, hierzu wurde die Überlebensrate von jeweils 100 Embryonen in mehreren parallelen Ansätzen untersucht. Dabei erwartet man bei einer funktionellen Rettung durch mindestens eine Kopie des P[acman]-Konstruktes eine Überlebensrate von 93,75% (6,25% letale Embryonen; siehe 3.2.6.8; Abb.3.3). Die Ergebnisse des Rettungsversuchs sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Darüber hinaus wurde das Hbn-Muster in Embryonen der P[acman]-Konstruktstämme untersucht, um eine eventuelle Fehlregulation von *hbn* und dadurch ektopische Expression von Hbn in diesen aufzudecken.

Die Untersuchung der Auswirkung des 89N09-P[acman]-Konstruktes auf die endogene Expression von Hbn zeigte eine deutliche Verstärkung des posterioren, gastraln Musters

(Daten nicht gezeigt). Durch die Isolierung des genetischen Abschnitts im P[acman]-Vektor von seiner ursprünglichen, genetischen Nachbarschaft kommt es zu einer Fehlregulation des zusätzlich eingebrachten *hbn*-Gens, das sich als verstärktes, posteriores Muster während der Entwicklung zeigt. Im Fall von 19C04 ist ein zusätzliches Muster im VNS sichtbar (Daten nicht gezeigt). Beide Vektoren ermöglichen nach Einkreuzung in die Mutanten eine embryonale Rettung durch eine Kopie des Rettungskonstruktes (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Embryonale Letalität der *hbn*-Mutanten mit den verwendeten Rettungskonstrukten.

Rettungs-konstrukt	getestete Embryonen	geschlüpfte Embryonen	Letalität	embryonale Rettung
19C04	1200	1114	7,2%	ja
89N09	800	763	4,6%	ja

Von den P[acman]-Konstruktstämmen wurden Embryonen gesammelt, fixiert und dann mit den bisher verwendeten neuronalen Markern FasII und HRP sowie Hbn angefärbt und auf Auffälligkeiten des SAG und der Kommissur hin untersucht.

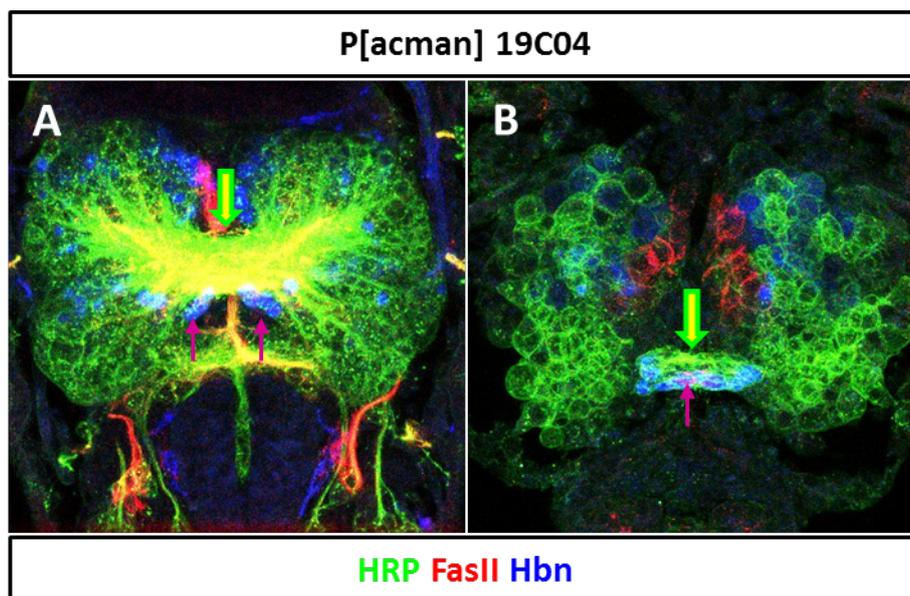


Abb.4.18: Untersuchung der Auswirkung des P[acman]-19C04-Konstruktes. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Darstellung des Gehirns (63x) von P[acman]-19C04-Embryonen mit anti-FasII-, -Hbn- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Embryonales Gehirn in ES 16. Gelb-grüner Blockpfeil zeigt enorm verdickte Kommissur, lila Pfeile zeigen P2m-Gründerzellen. (B) ES 11 Embryo. Gelb-grüner Blockpfeil zeigt interhemisphärische Brücke mit anterioren, stark HRP-pos. Anteilen. Lila Pfeil zeigt P2m-Gründerzellen der interhemisphärischen Brücke.

Eine häufig angetroffene Aberration des Gehirns in Embryonen aus dem P[acman]-19C04-Konstruktstamm kann als sichtbare Vergrößerung der Kommissur beschrieben werden, in der die FasII-Trakte besonders hervorgehoben sind (Abb.4.18,A, gelb-grüner Blockpfeil). Die Pionierzellen liegen normal den Hemisphären an (Abb.4.18,A, lila Pfeile), die Kommissur

erscheint gerafft, sodass die Hemisphären nahe beieinander liegen. Eine mögliche Ursache für diese Veränderung der Kommissur kann in der beobachteten Verdopplung bzw. Verstärkung der interhemisphärischen Brücke liegen. Die untersuchten Embryonen zeigen neben der Pionierneurone-tragenden Zellbrücke ebenfalls eine zweite, direkt anterior angelagerte Brücke aus HRP-positiven Neuronen (Abb.4.18,B, lila Pfeil) und einem FasII-positiven Trakt (Abb.4.18,B, gelb-grüner Blockpfeil). Diese Form der interhemisphärischen Brücke ist bereits in ES 11 zu erkennen und damit vor der eigentlichen Kommissurknüpfung. Die beobachteten Veränderungen der untersuchten Gehirne deuten auf einen attraktiven Effekt der Hbn-positiven Pionierneurone hin. Dieser erscheint durch die zusätzliche Genkopie verstärkt, sodass vermehrt Neurone aus dem PC eine interhemisphärische Projektion antreten und die interhemisphärische Brücke bereits zu einem früheren Zeitpunkt durch ein erhöhtes Aufkommen an HRP-positivem Anteil auffällt.

Da eine Rettung der embryonalen Letalität durch die Konstrukte 19C04 und 89N09 belegt wurde, konnte auf wichtige regulatorische Bereiche des *hbn*-Gens geschlossen werden, die im Überlappungsbereich der beiden Konstrukte liegen. Somit müssten im 5'-Bereich unmittelbar vor dem Promotor sowie in den Intronbereichen des *hbn*-Gens wichtige Enhancer liegen, die die Expression und Funktion von *hbn* im SAG determinieren. Durch Herstellung von lacZ- und Gal4-Reporterkonstrukten im Labor konnten tatsächlich in den beiden großen Introns des Gens *hbn*-spezifische Enhancer gefunden werden. Unter den markierten Zellen befinden sich auch die P2m-Pionierzellen, die somit spezifisch angesprochen werden konnten. Ein weiteres Konstrukt zeigte ebenfalls Aktivität im PC, sollte aber aufgrund der räumlichen Lokalisierung der Expression im anschließenden Kapitel, der Analyse der DM-Lineages beschrieben werden. Im Anhang können sowohl Lage als auch Muster der für die Reporter ermittelten Enhancer in Abb.7.5 und 7.6 betrachtet werden.

Nachdem die Ursachen für den bisher noch nicht erklärten, protocerebralen Defekt gefunden wurden und eine Rettung der embryonalen Letalität durch P[acman]-Rettungskonstrukte gelungen war, sollte der Fokus auf weitere funktionelle Untersuchungen von *hbn* und auch des Nachbargens *drx* gelegt werden. Die Faktoren zeigten bereits in vergleichenden Expressionsanalysen eine dorso-mediale Kollokalisierung im PC, die in weiteren Experimenten im Verlauf der Entwicklung und unter Verwendung spezifischer Marker für diese Region betrachtet werden sollte.

4.14 Untersuchungen zur dorso-medialen Expression von Drx und Hbn im embryonalen Gehirn

Kolokalisationsstudien von Hbn und Drx zeigten eine Region starker Kolokalisation im ES 15-16 Gehirnen. Gut zu beobachten war die starke Koexpression der Nachbargene *drx* und *hbn* in der dorso-medialen Region des Protocerebrums. Diese primären Lineages sind der embryonale Vorläufer der sekundären larvalen DM-Lineages, die neben den dorso-lateralen Lineages die einzigen Vertreter der Typ-II-Lineages darstellen, aus denen der Zentralkomplex des adulten Gehirns hervorgeht (Boyan und Reichert, 2011). Aufgrund der Bedeutung der DM-Lineages und dem Vorhandensein von zahlreichen Publikationen zur larvalen Entwicklung dieser Lineages sollten die Muster von Drx und Hbn bereits embryonal untersucht werden. Für diese Region existieren embryonal weitere Marker wie Tailless (Tll) (Gudrun Viktorin, persönliche Mitteilung), Distalless (Dll) (Panganiban und Rubenstein, 2002) und Earmuff (Erm) (Pfeiffer et al., 2008), deren Reporterkonstrukte die endogene Expression widerspiegeln und daher zur Analyse der 57B-DM-Expression verwendet wurden. Im Fall von Dll liegt ein Antikörper vor, der somit zum zusätzlichen Vergleich der 57B-TF-Expression mit der realen, endogenen Expression des TF diene. Der Beginn und die weitere Entwicklung der DM-Expression von Hbn sollte gegenüber *t//lacZ* analysiert werden. Um die dorso-mediale Expression von Drx und Hbn während der embryonalen Gehirnentwicklung aufzuzeigen, sollten ebenfalls beide zusammen gegenüber anti-HRP-visualisierten Gehirnen mit Fokus auf die DM-Lineages gefärbt werden.

Tll wird in dorso-medialen NB und Neuronen exprimiert (Gudrun Viktorin, persönliche Mitteilung). Ein Vergleich des Reporters mit Hbn ergibt, dass die in der Mittelliniendomäne gelegenen Hbn-positiven NB in ES 10 Kolokalisation zeigen und bestätigt deren Identität (Abb.4.19,A, weiße Pfeile). Eine Kolokalisation von Hbn mit *t//lacZ* wird ebenfalls in späteren Stadien der Entwicklung der Hemisphären beobachtet (Abb.4.19,B, weiße Pfeile). Dabei stimmt in späten Stadien die Expression des Reporters fast genau mit der dorso-medialen Hbn-Expression überein (Abb.4.19,C).

Die medial vorgefundenen, Hbn-positiven NB konnten ferner mit Kolokalisation zu Wg, einem Marker protocerebraler NB (Urbach und Technau, 2003) in Verbindung gebracht werden.

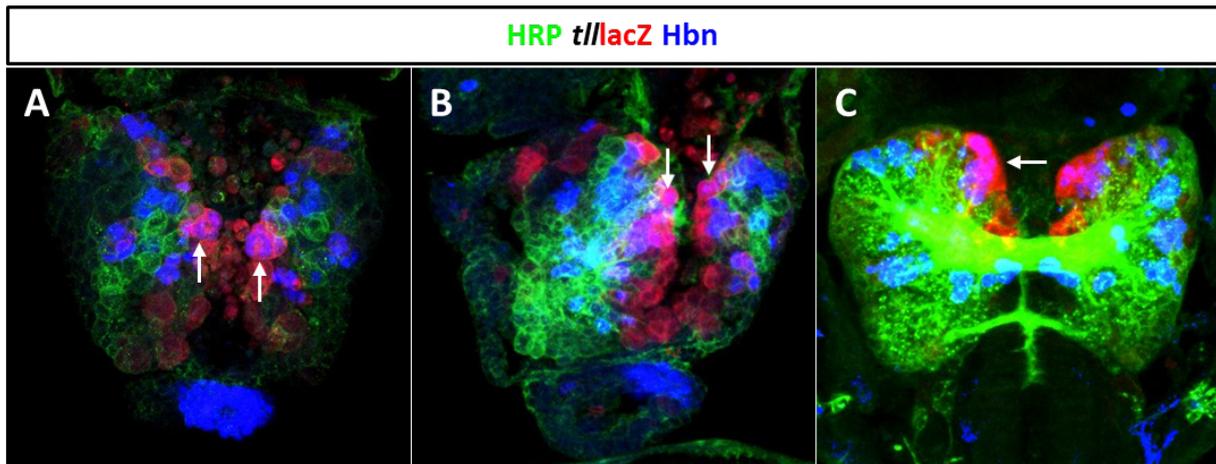


Abb.4.19: Hbn wird in DM-NB exprimiert. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) von (A, ES 10; B, ES 11; C, ES 15) *t//lacZ*-Gehirnen mit anti-beta-Gal-, -Hbn- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Weiße Pfeile zeigen dorso-mediale, *t//lacZ* und Hbn -pos. NB. (B) Weiße Pfeile markieren anteriore Übereinstimmung der Hbn- und DM-*t//lacZ*-Expression. (C) Weißer Pfeil zeigt Übereinstimmung der anterioren DM-*t//lacZ*-Expression mit der Expression von Hbn.

Auch die Expression von *Drx* kann in diesen medialen NB und weiteren des PNE in Zusammenhang mit der Expression von Hbn detektiert werden. Das angesprochene *hbn*-Reporterkonstrukt, welches durch einen Enhancer aus der Intronregion angetrieben wird, zeigt exakt die gleiche dorso-mediale Aktivität während der Gehirnentwicklung, die durch die Hbn-Expression gekennzeichnet ist und stellt somit ein adäquates Tool dar, diesen Bereich anzusprechen. Im Anhang können in Abb.7.6 sowie 7.7 die zugehörigen Aufnahmen bezüglich *Drx*/*Hbn*-positiver NB und der DM-Reporteraktivität betrachtet werden.

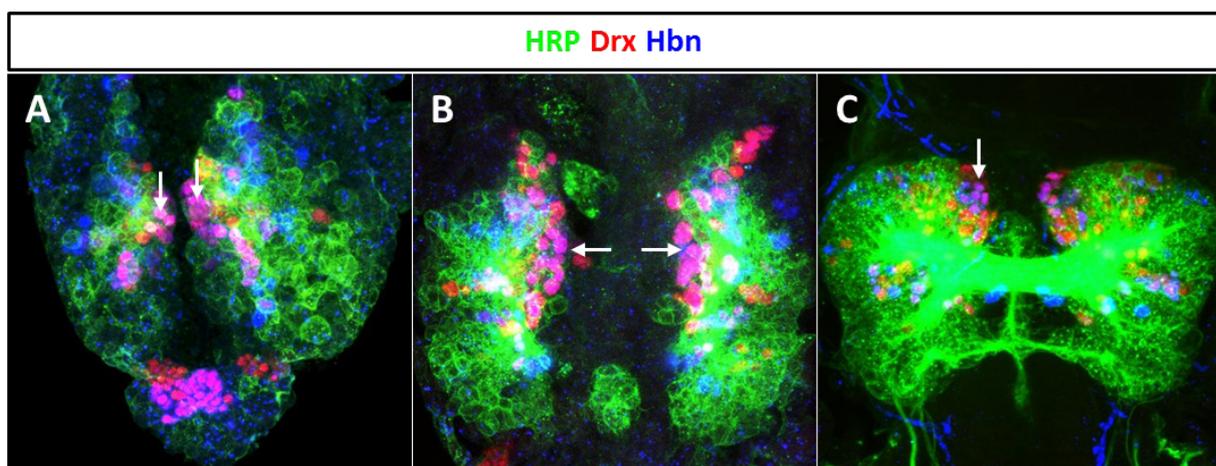


Abb.4.20: Vergleich der dorso-medialen Expression von *Drx* und *Hbn* in der embryonalen Gehirnentwicklung. Konfokale Aufnahmen in anterior-dorsaler Aufsicht (40x) von *yw*-Embryonen mit anti-*Drx*-, -*Hbn*- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) Weiße Pfeile zeigen Kolokalisation von *Drx* und *Hbn* in dorso-medialen-Lineages in ES 11. (B) Weiße Pfeile zeigen dorso-mediale Kolokalisation von *Drx* und *Hbn* im ES 12-Embryo. (C) Weißer Pfeil zeigt anteriore DM-Kolokalisation von *Drx* und *Hbn* in DM-Lineages in ES 15.

In ES 11 werden am Ende der Neuroblastendelamination *Drx* und *Hbn* gemeinsam in DM-NB und Neuronen detektiert (Abb.4.20,A, weiße Pfeile). Wird die Expression von *Drx* und *Hbn* in der frühen Gehirnentwicklung (ES 12) untersucht, so fällt anterior der

Hemisphärenvorsprünge die dorso-mediale Kolokalisation der gesamten dortigen Neurone auf. (Abb.4.20,B, weiße Pfeile). Am Ende der embryonalen Gehirnentwicklung wird Drx in allen DM-Lineage-Anteilen detektiert, während Hbn mehrheitlich Kolokalisation in den anterioren DM-Anteilen mit Drx zeigt (Abb.4.20,C, weiße Pfeile). Um die Expression von Drx und Hbn in dieser Region weiter zu bestimmen, sie mit verschiedenen UAS-Stämmen manipulieren und in späteren Entwicklungsstadien analysieren zu können, sollten die Expressionen weiter mit DM-spezifischen Gal4-Konstrukten und Antikörpern untersucht werden, die im Fall von *dll*- und *ermGal4* auch spezifische Marker der larvalen DM-Lineages darstellen und daher auch dort Verwendung fanden.

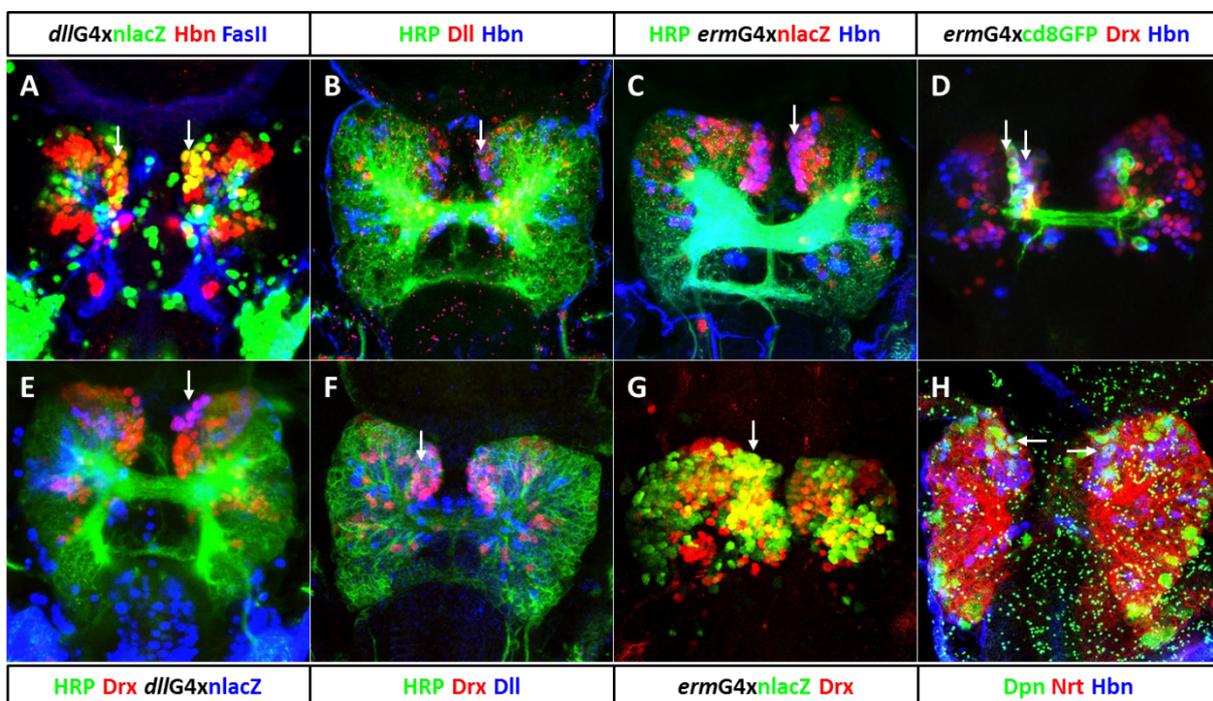


Abb.4.21: Eingehende Untersuchung der Drx/Hbn-DM-Expression mit DM-Markern. Konfokale Aufnahmen (40x) in anterior-dorsaler Aufsicht von (A,E) *dllG4xnlacZ*-, (C,D,G) *ermG4xnlacZ*/*xcd8GFP*- und (B,F,H) *yw*-Embryonen (ES 15) mit (A) anti-beta-Gal, -FasII-, -Hbn-, (B) -Dll-, -Hbn-, -HRP-, (C) -beta-Gal-, -Hbn-, -HRP-, (D) -Drx-, -GFP-, -Hbn-, (E) -beta-Gal-, -Drx-, -HRP-, (F) -Dll-, -Drx-, -HRP-, (G) -beta-Gal-, -Drx-, (H) -Dpn-, -Hbn-, -Nrt-Färbungen, alle Embryonen anterior nach unten. Weiße Pfeile zeigen die dorso-mediale Kolokalisation von Drx bzw. Hbn in den DM-Lineages des embryonalen Gehirns mit den jeweiligen Markern dorso-medialer-Lineages.

Vergleicht man die Expression der beiden 57B-TF mit der Reporterexpression des *dllGal4*-Treibers, so lässt sich diese mit Drx und Hbn in dorso-medialen Bereichen als kolokalisierend bestätigen (Abb.4.21,A,E, weiße Pfeile). Der Vergleich mit dem Dll-Antikörper zeigt ebenfalls Kolokalisationssignale mit den 57B-TF in den embryonalen DM-Lineages (Abb.4.21,B,F, weiße Pfeile). Neben *dllGal4*, der sich in der Literatur erstmals als spezifischer Marker der larvalen DM-Lineages herausstellte, existiert ein weiterer larvaler DM-Lineage-Marker, R9D11Gal4 (*ermGal4*), der einer genomweiten Enhancer-Analyse entstammt und ebenfalls eine spezifische Expression im embryonalen DM-Bereich zeigt (Pfeiffer et al., 2008; Weng et

al., 2010; Xiao et al., 2012). Erneut können hier sowohl Drx- als auch Hbn-positive, dorso-mediale Zellen mit Konstruktidentität gefunden werden (Abb.4.21,C,G, weiße Pfeile).

Ein Vergleich von Drx/Hbn gemeinsam mit membranständiger Markierung des *earmuff*-Treibers zeigt Zellen mit gemeinsamer 57B-TF-Expression und Projektionen mit kommissuralem Charakter an (Abb.4.21,D, weiße Pfeile). In ES 15-Gehirnen können am Ende der NB-Aktivität noch Dpn/Hbn-positive NB im dorso-medialen Areal gefunden werden, diese liegen anterior der dorso-medialen, Hbn-positiven Neuronenpopulation (Abb.4.21, H, weiße Pfeile). Damit stimmen sie von der Lage etwa mit den in Abb.4.21,D gezeigten anterioren, *ermGal4*-positiven Zellen überein, was eine Expression beider Faktoren in embryonalen DM-NB wahrscheinlich macht.

4.15 Zusammenfassung der embryonalen Ergebnisse

Durch die fortgesetzten funktionellen Analysen des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors Hbn während der Embryonalentwicklung konnten verschiedene neue Aspekte aufgezeigt werden. So konnte bestätigt werden, dass die Dynamik des Expressionsmusters ab der Neuroblastendelamination tatsächlich auf beginnender starker Proliferation von Hbn-positiven Stamm- und Progenitorzellen beruht. Diese wurden in separaten Ansätzen zur Zelltypbestimmung und zur Analyse der Proliferation von Hbn-positiven Zellen ermittelt. Weiter konnte gezeigt werden, dass tatsächlich schon im frühen Streifen rudimentär die Domänen des PC definiert sind und sich ab dem ES 7 aus den entstandenen Domänen herausbilden, die Expression in DC und TC wird dagegen erst in der späten embryonalen Gehirnentwicklung festgelegt. Das Vorhandensein von Hbn-positiven, delaminierten NB konnte zudem in der lateralen Domäne bestätigt werden, ebenso eine höhere Anzahl an NB in ES 9 und 10. Diese NB konnten durch Marker eindeutig dem PC zugeordnet (NB zeigen Tll- und Wg-positive Färbung, die eine PC-Zugehörigkeit beweist; Urbach und Technau, 2003) und im Verlauf der Entwicklung an der anterioren Spitze der Neuraxis befindlich detektiert werden. Diese stellte sich als vorrangiger Ort Hbn-positiver, proliferierender Zellen heraus. Eben diese anteriore Spitze der Neuraxis, die sowohl im dorsalen als auch ventralen Areal NB und GMC mit Hbn-Expression trägt und bis zum En-Kopffleck reicht, fehlt in der mutanten Situation. Dadurch erscheinen die Lineage-trakte der anterioren PC-Lineages verkleinert, der ACT und LPT, also die Pioniertrakte von P4/5-Clustern verkürzt bzw. verformt; der PCN sowie Teile des Neuropils fehlen gänzlich. Als Ursache zeigte sich massive Apoptose ab der Hemisphärenausbildung mit Beginn in ES 10 und fortdauernd bis in ES 13. Neben diesen

Kenntnissen, die die Funktion von Hbn in der Gehirnentwicklung näher charakterisieren, konnte ein embryonales Überleben durch *hbn*-spezifische Rettungskonstrukte mit mutantern Hintergrund gezeigt werden. Potentielle regulatorische Elemente der embryonalen Gehirnentwicklung wurden daher im Überlappungsbereich der verwendeten Rettungskonstrukte erwartet und bestätigt.

Im Vergleich mit dem Nachbarn *drx* wurde die dorso-mediale Region des Embryos als Bereich gemeinsamer Aktivität gefunden und eingehend mit DM-Markern untersucht. Es zeigte sich, dass *Drx* und *Hbn* mit Beginn der Neurogenese in DM-NB, die sich durch *tllacZ*-Expression auszeichnen, exprimiert werden und bis ans Ende der NB-Teilung aktiv bleiben, wo zumindest im Fall von *Hbn* noch *Dpn/Hbn*-positive NB detektiert wurden. Weiterhin kann die Existenz von Neuronen der DM-Region, in denen *Drx* und *Hbn* exprimiert werden, bestätigt werden. Dabei stimmt die Expression beider Faktoren in ihren jeweiligen, DM-bezogenen Arealen mit der Expression von *Dll* überein. Tabelle 4.2 fasst die embryonal detektierten Kollokalisierungen von *Hbn* mit den verwendeten Markern zusammen.

Tabelle 4.2: Vergleich der Kollokalisierungen von Hbn mit anderen Faktoren und Reporterkonstrukten. (DL, dorso-lateral; DM, dorso-medial; DZ, dorso-zentral; NB, Neuroblast; OL, optische Lobe; PK, Pilzkörper; pPC, posteriores Protocerebrum; VL, ventro-lateral; VM, ventro-medial; VZ, ventro-zentral; TC, Tritocerebrum). Tabelle beinhaltet Daten aus allen Vergleichen mit allen Faktoren nach anterior-dorsalem bzw. lateralem Gesamtscan des SAG eines ES 15 Embryos.

	TC	pPC	DM	DZ	DL	VM	VZ	PK	VL	OL	NB	ftfc
Ap				•	•	•	•					
Dac	•		•	•	•			•	•	•		
Dll			•									
Drx		•	•		•			•	•		•	
Ems	•											
Erm			•									
Ey						•	•		•			
Tll			•						•		•	
Toy		•		•	•				•	•		
Wg											•	
G10			•					•				
A03								•				•

Nach Beendigung der embryonalen Untersuchungen sollte mit der Analyse der beiden 57B-TF in der larvalen Entwicklung fortgefahren werden.

4.16 Expression und Funktion von Drx und Hbn in der larvalen Gehirnentwicklung

Die larvale Entwicklung untergliedert sich in drei Etappen, die jeweils mit der Häutung und dem Wachstum der Larve assoziiert sind. In allen Phasen erfährt somit auch das larvale Gehirn eine Veränderung. Im L2-Stadium treten die embryonalen NB aus ihrer Ruhephase aus und beginnen mit der Produktion der sekundären Lineages, die im Verlauf der weiteren Entwicklung zum adulten Gehirn differenziert werden. Zu diesem Zeitpunkt werden ebenfalls die Neuropile der OL nach Bildung der zugehörigen Stammzellzentren entwickelt. Die Expressionanalyse von Drx und Hbn im Verlauf der larvalen Gehirnentwicklung bedarf daher einer Aufklärung der Expression in den verschiedenen Entwicklungsphasen und Bereichen des larvalen Gehirns unter Verwendung von neuronalen Markern, die diese Analyse ermöglichen. Ansatzpunkte für die Analyse sind durch die embryonale Untersuchung gegeben, in der eine gemeinsame Expression von Drx und Hbn im dorso-medialen Bereich gefunden wurde. Diese Region stellt sich in der larvalen Entwicklung als ein besonderes Gebiet der neuronalen Entwicklung dar, da hier ein neu gefundener Typ von Neuroblasten (Typ-II-NB) zur Bildung besonders großer Lineages beiträgt (Bello et al., 2008; Boone und Doe, 2008; Bowman et al., 2008). Ein weiterer Ansatz besteht in der Möglichkeit zur Erzeugung von wildtypischen und mutanten MARCM-Klonen, mit Hilfe derer eine Lineagezuordnung der Expression sowie eventuell in der Entwicklung der larvalen Lineages auftretende Phänotypen durch mutante Allele der 57B-TF gefunden werden können.

4.17 Drx und Hbn zeigen larval ein ähnliches Expressionsmuster

Durch gemeinsame Betrachtung von Drx und Hbn in den embryonalen DM-Lineages konnte eine starke Ähnlichkeit der lokalen Expression festgestellt werden. Um die Expression und Funktion der Faktoren auch in der larvalen Entwicklung gemeinsam ergründen zu können, sollten L3-Gehirne gegen Drx und Hbn gefärbt und auf Bereiche alleiniger bzw. gemeinsamer Expression untersucht werden, um Areale für weiterführende Analysen zu definieren. Abb.4.22 stellt die Muster von Drx und Hbn in den Hemisphären eines L3-Gehirns dar.

Man findet dort die Zone starker, embryonaler Aktivität wieder. Drx und Hbn zeigen hier erneut ein hohes Maß an Expression wie auch Kolo-kalisation in den dorso-medialen-Lineages des larvalen Gehirns (Abb.4.22,A,C, roter Pfeil; 4.22,E, **DM**; 4.22,G, roter Kreis) und zweier weiter lateral gelegener Lineages mit denselben Attributen, den dorso-lateralen Lineages

(Abb.4.22,A,C, blauer Pfeil; 4.22,E, DL; 4.22,G, blauer Kreis), die wie die DM-Lineages ebenfalls Vertreter der Typ-II-Lineages sind.

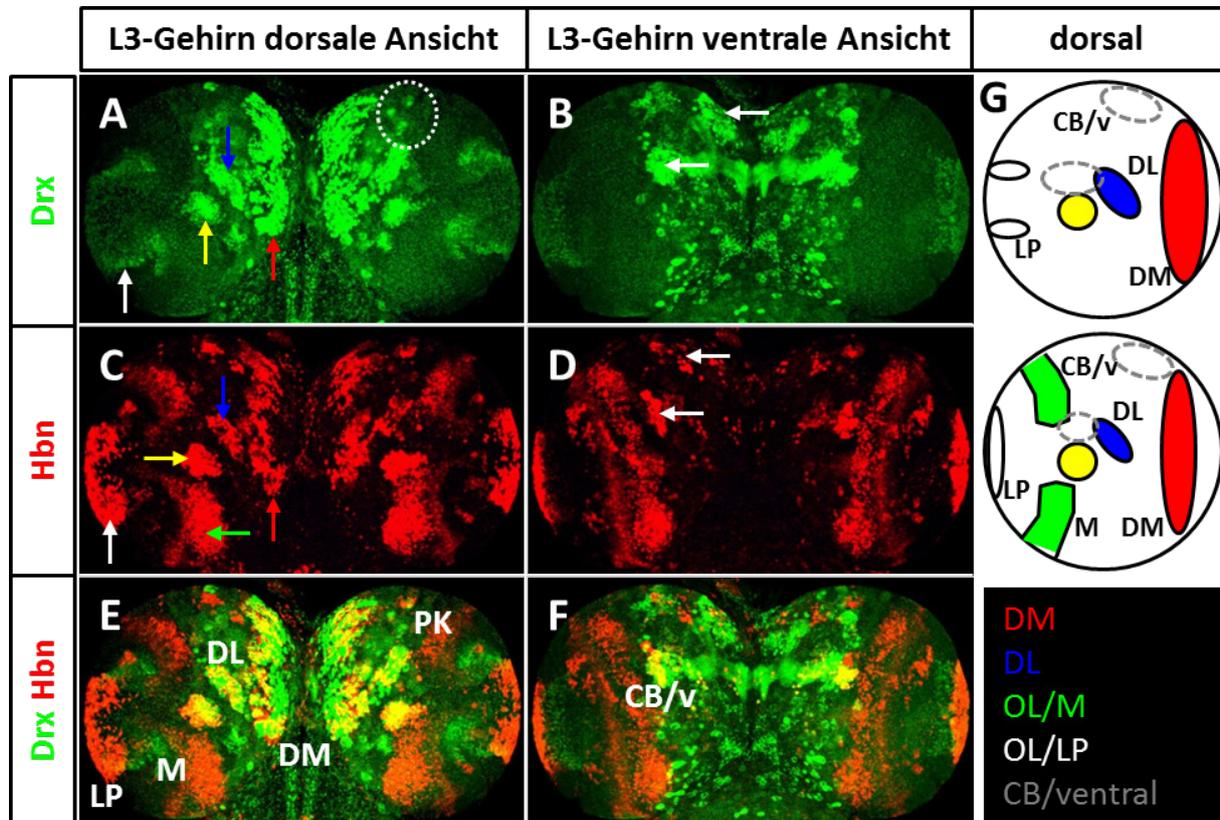


Abb.4.22 Larvale Expressionsmuster von Drx und Hbn im Vergleich. Konfokale Aufnahmen in dorsaler und ventraler Ansicht (25x) der Hemisphären eines *yw*-L3-Gehirns mit (A,B) anti-Drx- und (C,D) -Hbn-Färbung und (E,F) Übereinanderlagerung: (A,C) Weiße Pfeile zeigen Expression im lateralen Bereich der OL im Lobula Plug (LP), gelbe Pfeile zeigen Expressionsdomäne im lateralen Bereich des CB, grüner Pfeil zeigt Expression im medialen Teil der OL, der Medulla (M), blaue Pfeile zeigen dorso-laterale (DL) Expression und rote Pfeile zeigen dorso-mediale (DM) Expression. Gestrichelter, weißer Kreis zeigt die Lage der Drx-pos. PK-NB an. (B,D) Weiße Pfeile zeigen Expression in ventralen Lineages des CB (CB/v). (G) Schematische Darstellung der Expression von Drx und Hbn in der Hemisphäre eines L3-Gehirns. Schwarzer Kasten beschreibt die farbliche Kodierung der eingezeichneten Expressionsareale.

Im zentralen Gehirn können neben den Vertretern der Typ-II-NB-Lineages ebenfalls Typ-I-Lineages im ventralen Anteil gefunden werden, die teilweise Kolo-kalisation der Faktoren zeigen (Abb.4.22,B,D weiße Pfeile, 4.22,F, **CB/v**; 4.22,G, gestrichelte, graue Kreise). In der optischen Lobe kann die Expression von Hbn in mehreren Bereichen festgestellt werden. Dort ist sie in der optischen Medulla (Abb.4.22,C, grüner Pfeil; 4.22,E, **M**; 4.22,G, grüner Bereich) und dem Lobula Plug (Abb.4.22,C, weißer Pfeil, G, weißer Kreis) lokalisiert. Darüber hinaus kann im Lobula Plug ein geringes Maß an Kolo-kalisation mit der Expression von Drx festgestellt werden (Abb.4.22,E, **LP**). Ein letztes Areal mit starker Kolo-kalisation befindet sich zwischen den DL-Lineages und der optischen Medulla, das global so nicht zugeordnet werden kann (Abb.4.22, A,C,E, gelbe Pfeile; 4.22,G, gelber Kreis). Die Expression von Drx

kann in den Neuroblasten des Pilzkörpers larval beobachtet werden (Abb.4.22,A, gestrichelter, weißer Kreis; 4.22,E, **PK**).

Die Erwartung, Drx- und Hbn-Expression auch in der larvalen Entwicklung im CB zu detektieren, wurde erfüllt. Hier zeigte sich nicht nur Expression in sekundären Lineages des SAG mit zur embryonalen Entwicklung vergleichbarer Lage und Quantität im PC, sondern auch Expression in den larval neu gebildeten optischen Loben. Besonders bestätigt wurde die Erwartung durch eine mit der embryonalen Situation vergleichbare Expression der Faktoren in den larvalen DM-Lineages. Zudem wurden weitere Zonen gemeinsamer Aktivität aufgedeckt. Diese befinden sich in den dorso-lateralen Typ-II-Lineages sowie weiteren Typ-I-Lineages des zentralen Gehirns, vornehmlich auf der ventralen Seite des CB. Auch der Pilzkörper stellt larval eine Domäne mit 57B-TF-Expression dar, die im Folgenden auch bezüglich Hbn untersucht werden sollte. Alle genannten Bereiche sollten durch weiterführende Experimente betrachtet werden.

4.18 Regionsspezifische Expressionsanalyse dorso-medialer-Lineages

Um die Expression der zwei 57B-Faktoren in den sechs DM-Lineages genauer untersuchen zu können, sollten dort mit Hilfe der MARCM-Technik (Lee und Luo, 1999) GFP-markierte Zellklone induziert und die Faktoren jeweils einzeln in Färbungen auf ihre proximo-distale Expressionsverteilung hin untersucht werden. Hierbei sollte geklärt werden, in welchem Bereich der Lineage die Faktoren exprimiert werden. Im proximalen Bereich liegen die für Typ-II-Lineages charakteristischen intermediären neuronalen Vorläuferzellen, die INP, die von den Typ-II-NB an der Spitze der Lineage gebildet werden. Daran angeschlossen befinden sich im medialen Bereich die GMC, aus denen wiederum der distale Neuronenpool der DM-Lineage hervorgeht. Ein Vergleich der TF-Expression mit der markierten Lineage sollte erste Hinweise zur Verteilung der Faktoren auf die unterschiedlichen Zelltypen geben. Dabei wurde zusätzlich eine anti-Nrt-Färbung durchgeführt, wodurch sämtliche sekundären Neurone der larvalen Gehirnentwicklung markiert werden (Barthalay et al., 1990; Hortsch et al., 1990; Peraanu und Hartenstein, 2006). Dies ermöglicht eine Visualisierung aller DM-Lineages, um die Frage zu klären, ob die Expression in allen oder nur in bestimmten DM-Lineages vorliegt. Anschließend sollte die Expression nach Beginn der NB-Reaktivierung im L2-Stadium analysiert werden, um den Expressionsbeginn der 57B-TF in sekundären Typ-II-DM-Lineages zu untersuchen. Abb.4.23, A zeigt ein Schema einer larvalen Gehirnhemisphäre

mit den verschiedenen Lineages im CB und dient der Orientierung in diesem und folgenden experimentellen Ansätzen. Eine mikroskopische Darstellung der gesamten DM-Lineages (Nrt) mit zusätzlicher Markierung des Stammzellbereichs durch *ermGal4xUAScd8GFP* (Weng et al., 2010) ist in Abb.4.23,B dargestellt.

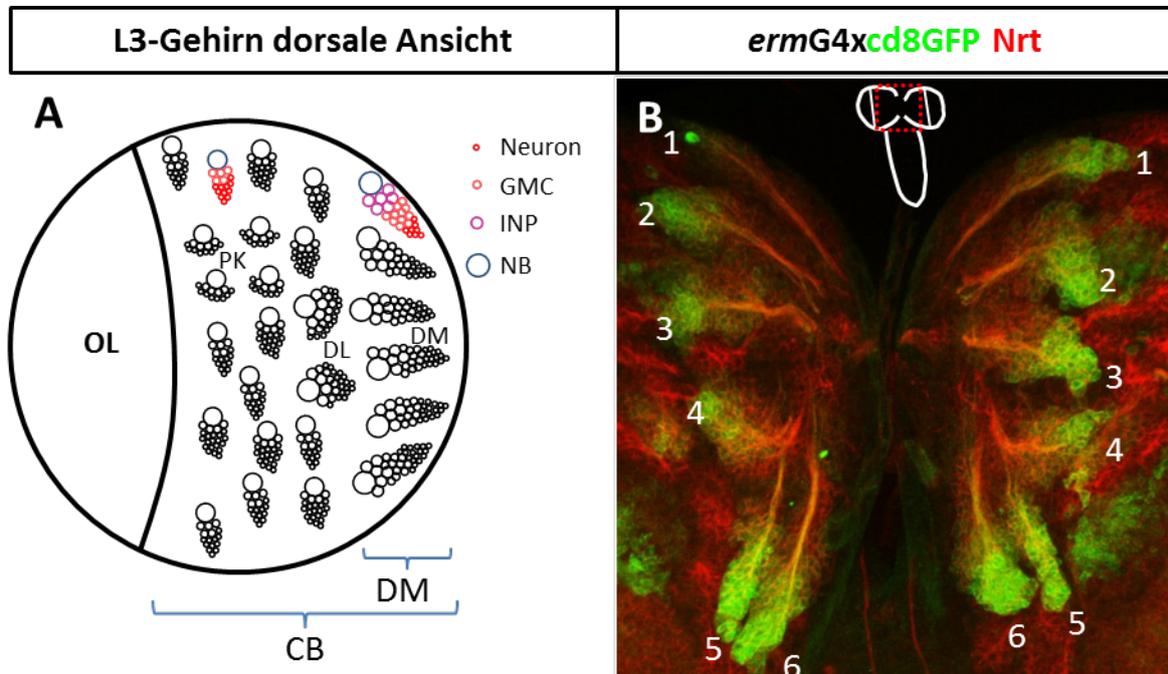


Abb.4.23: Schematische Darstellung einer larvalen Hemisphäre und der DM-Lineages. (A) Darstellung zeigt die linke Hemisphäre eines L3-Gehirns in dorsaler Ansicht. Im DM gekennzeichneten Bereich befinden sich die sechs Typ-II-NB-Lineages, im DL-Bereich die zwei DL-Typ-II-Lineages sowie die vier PK-Lineages und übrige Typ-I-NB-Lineages. Die optische Lobe (OL) schließt sich lateral an das zentrale Gehirn (CB) an. Die Legende zeigt die verschiedenen Zelltypen der jeweiligen Lineages an. (B) Konfokale Aufnahme (40x) eines *yw*-L3-Gehirns mit Zoom auf die zwölf DM-Typ-II-NB-Lineages (1-6) (weißes Gehirn mit rotem Kasten zeigt den Ausschnitt). Sekundäre Neurone sind durch anti-Nrt-Färbung hervorgehoben, der Stammzellbereich der DM-Lineages ist durch den rekombinanten Stamm *ermG4alxUAScd8GFP* (Weng et al., 2010) markiert.

Bei der Analyse von MARCM-Klonen findet man in einem wildtypischen DM 3-Klon mit *Drx/Nrt*-Färbung (Abb.4.24, A,A', DM 3) an der dorsalen Oberfläche des Gehirns in proximalen Lineage-Anteilen nur wenig *Drx*-Expression (Abb.4.24,A), wohingegen in tieferen Ebenen des Klons fast die gesamte Zellmasse *Drx*-positiv vorliegt (Abb.4.24,A'). Die Expression von *Drx* beginnt außerhalb des proximalen Stammzellbereichs und endet am distalen Terminus der Lineage (Abb.4.24,A,A', gestrichelte, rote Linien). In der posterior benachbarten DM 4-Lineage kann die Expression von *Drx* in der Lineage von dorsal nach ventral mit steigender Anzahl gefärbter Zellkerne nachvollzogen werden (Abb.4.24,A,A', weiße Pfeile). Betrachtet man einen wildtypischen DM 4-Klon mit anti-Hbn-Färbung, so können direkt unterhalb des proximalen Lineage-Halses, bestehend aus NB und unreifen INP, die ersten Hbn-positiven Zellen ermittelt werden (Abb.4.24,B, DM 4, gestrichelte, rote Linie). Im distalen Bereich unterscheidet sich die Expression von Hbn stark, da hier, anders

als in Drx-Färbungen, fast keine positiven Zellen mehr detektiert werden (Abb.4.24,B, gestrichelte, rote Linie). Auch werden in den Lineages verglichen mit dem Drx-Muster insgesamt weniger Hbn-positive Zellkerne detektiert (Abb.4.24,B, DM 3, weißer Pfeil).

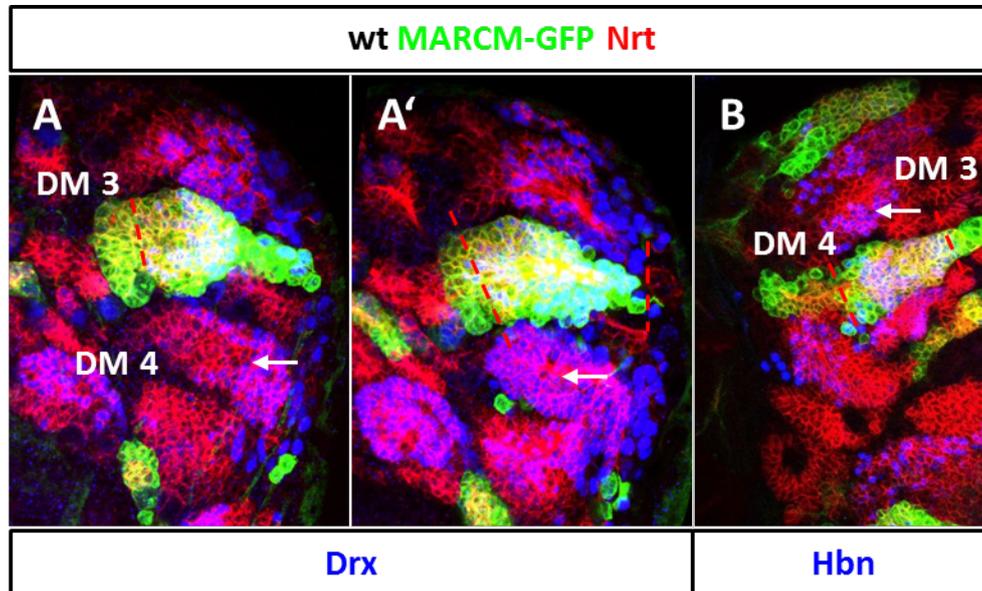


Abb.4.24: Dorso-mediale-Lineage Expression von Drx und Hbn markiert mit wt-MARCM-Klonen. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Aufsicht (40x) von fluoreszenzmarkierten FRT(G13)xTUG(G13)-L3-Gehirnen mit (A,A') anti-Drx-, -Nrt-, (B) -Hbn-, -Nrt-Färbung: (A,A') Abbildung zeigt eine GFP-Markierung der DM 3-Lineage in zwei konfokalen Sektionen. Gestrichelte, rote Linie zeigt Beginn und Ende der Drx-Expression. Weißer Pfeil zeigt Drx-Expression in DM 4. (B) Abbildung zeigt DM 4-Lineage mit GFP-Markierung. Gestrichelte, rote Linien zeigen den Beginn der Hbn-Expression früh nach dem Neuroblasten und das Ende dieser im medialen Bereich der Lineage. Weißer Pfeil zeigt Hbn-Expression in DM 3.

Die Untersuchungen bezüglich Drx belegen eine weite, mediale nach distale Expression, für Hbn wurde dagegen eine proximale bis mediale Expression in allen DM-Lineages vorgefunden. Eine Untersuchung früher L2-Gehirne sollte nun den Beginn der Expression in sekundäre Neuronen der DM-Lineages bestimmen.

In den DM-Lineages von L2-Larven, die aus der NB-Ruhephase ausgetreten sind, werden bereits Drx- und Hbn-positive Zellen vorgefunden, die anhand der anti-Nrt-Färbung als sek. Neurone identifizierbar sind (Abb.4.25,A, weiße Pfeile). Eine Expression der Faktoren kann hier erst nach Entstehung und Reifung der INP angetroffen werden. Bis zu diesem Zeitpunkt werden lediglich DM-NB mit wenigen Tochterzellen (unreife INP) beobachtet, die von Drx- und Hbn-positiven, primären Neuronen umgeben sind (Daten nicht gezeigt).

Mit Bildung der ersten GMC und Neurone, ausgehend von reifen INP, kann auch die gemeinsame Expression der 57B-TF beobachtet werden. Mit fortschreitender Entwicklung der DM-Lineages wird vermehrt Drx/Hbn-Expression in den Nrt-markierten Lineages

vorgefunden (Abb.4.25,B, blauer, grüner Pfeil). Somit ist nachgewiesen, dass beide Faktoren eine Expression von Beginn der INP-Differenzierung an zeigen.

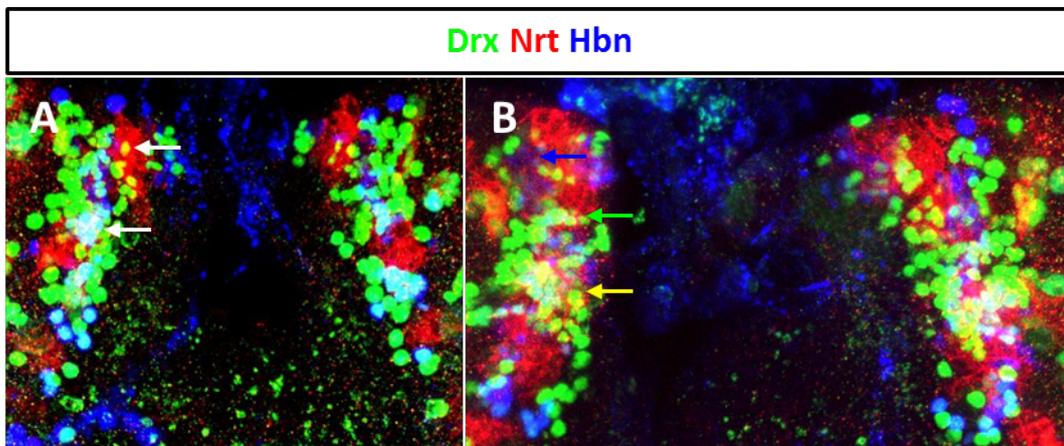


Abb.4.25: Frühe, dorso-mediale Expression von Hbn und Drx in der Larve. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Aufsicht (40x) von *yw*-L2-Gehirnen mit anti-Drx-, -Hbn- und -Nrt-Färbung: (A) Frühes, larvales L2-Gehirn, Beginn der Bildung sek. Neurone. Weiße Pfeile zeigen auf Drx- bzw. Drx- und Hbn-pos., sek. Neurone der frühen, larvalen DM-Lineages. (B) Fortgeschrittene Bildung sek. Neurone in dorso-medialen-Lineages des L2-Gehirns. Blauer Pfeil zeigt Hbn-pos., sek. Neurone, grüner Pfeil zeigt Drx-pos., sek. Neurone und gelber Pfeil markiert ein Cluster aus Drx- und Hbn-pos., sek. Neuronen.

Die Drx-Expression zeigt eine Vielzahl an Nrt-markierten Zellkernen der frühen DM-Lineages, was die breite und weit nach distal reichende Verteilung am Ende der larvalen Phase erklärt, da die zuerst gebildeten Neurone am weitesten distal in der Lineage liegen (Abb.4.25,B, gelber Pfeil). Hbn zeigt schon zu diesem Zeitpunkt wie auch in späteren Entwicklungsabschnitten eine geringere Präsenz in den DM-Lineages.

In einem weiteren Ansatz sollte die in DM-Lineages vorgefundene Kolo-kalisation der Transkriptionsfaktoren genauer bestimmt werden.

4.19 DM-spezifische Kolo-kalisation der 57B-TF

Die weitere Untersuchung der DM-Expression umfasst eine detaillierte Kolo-kalisationsstudie von Drx und Hbn untereinander in den sechs DM-Typ-II-NB-Lineages, die nach der proximo-distalen Analyse durch MARCM-Klone auch die anterior-posteriore Verteilung der Faktoren in den DM-Lineages bestimmen sollte. Die Lineages wurden hierbei durch Nrt bzw. Dlg (Mendoza et al., 2003; Albornoz et al., 2008) markiert, die in diesem Fall als gleichwertig zu betrachtende, zelluläre Marker des Nervensystems verwendet wurden. Ein weiteres Ziel war es dabei, die Lineages auf Zonen gemeinsamer und alleiniger Expression von Drx und Hbn zu untersuchen und für diese eine Kartierung innerhalb der sechs Lineages zu erstellen.

Drx und Hbn zeigen in allen Lineages des DM-Bereichs eine vergleichbare Kolo­kalisierung. Diese erscheint meist in Form eines Grenzstreifens der Expression beider Faktoren im medialen Teil der Lineage, der diese in zwei Bereiche unterschiedlicher Expression trennt. Anteriore und posteriore Anteile der Lineage zeigen somit eine Präferenz für die Expression des jeweiligen Faktors (Abb.4.26,A weiße Pfeile, B blaue, lila, rote Pfeile; siehe Abb.4.27).

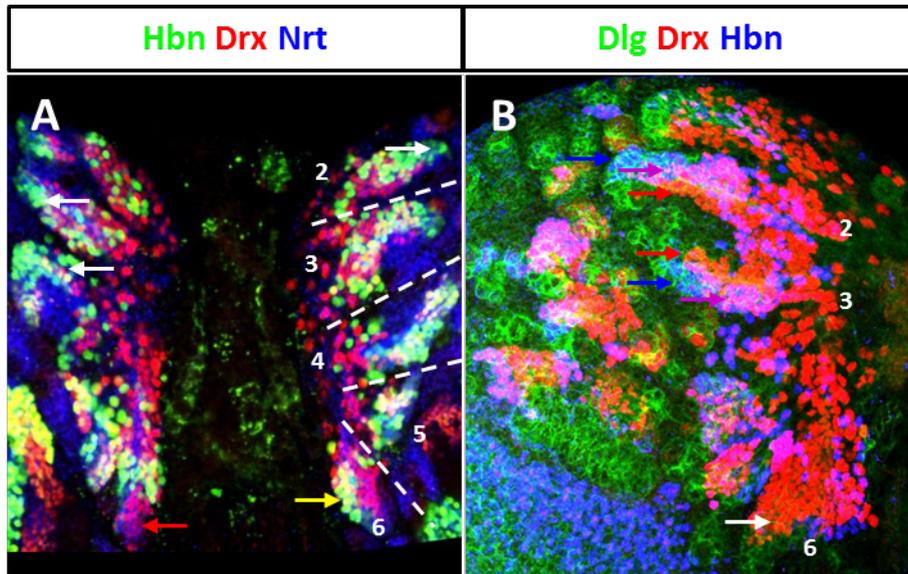


Abb.4.26: DM-Expression von Drx und Hbn im Vergleich. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Aufsicht (40x) der sechs Typ-II-NB-DM-Lineages (2-6) von *yw*-L3-Gehirnen mit (A) anti-Drx-, -Hbn-, -Nrt- und (B) anti-Dlg-, -Drx-, -Hbn-Färbung: (A) Weiße Pfeile zeigen auf alleinige Hbn-Expression im proximalen Bereich der DM-Lineages. Gelber Pfeil zeigt gemeinsame, proximale Expression von Drx und Hbn in DM 6, roter Pfeil zeigt in einer anderen Ebene der DM 6 die breite Expression von Drx im proximalen Bereich. (B) Blaue Pfeile zeigen proximale, alleinständige Expression von Hbn, lila Pfeile zeigen kolo­kalisierte Grenzregion von Drx- und Hbn-pos. Zellen der DM-Lineage, rote Pfeile zeigen alleinige, mediale Drx-Expression im posterioren Bereich der DM-Lineages. Drei Zonen differentieller Färbung von Drx/Hbn in DM 2 und 3. Weißer Pfeil zeigt Unterschied der Drx- und Hbn-Expression in DM 6 im Vergleich. zu den anderen DM-Lineages.

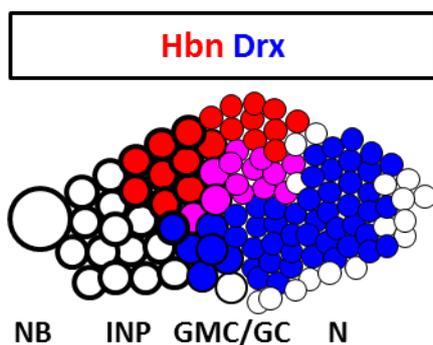


Abb.4.27: Schematische Darstellung der DM-Kolo­kalisierung von Drx und Hbn. Idealisierte Darstellung einer DM-Lineage mit verminderter Zellzahl. Unter der Lineage sind die jeweiligen Zelltypen markiert, diese sind auch durch unterschiedlich dicke Rahmen voneinander abgesetzt. Drx und Hbn zeigen ein von anterior nach posterior räumlich aufgeteiltes Muster in den DM-Lineages. Hbn liegt dabei anterior und Drx posterior. Eine Zone der Überlappung liegt zwischen den Faktoren vor. Hbn wird darüber hinaus in proximaleren Bereichen der Lineage beobachtet, wohingegen Drx weiter distal exprimiert wird.

In proximalen Teilen der Lineage wird Hbn meist alleine und nur in sehr wenigen Zellkernen mit Drx koexprimiert (Abb.4.26,A, weiße Pfeile, Abb.4.27). Eine Besonderheit der Analyse ergibt sich für die Expression von Drx in DM 6. Hier zeigt die Expression eine vergleichbare proximale Ausdehnung zu derjenigen von Hbn. Die räumliche Trennung von anterior nach posterior wird dabei wie in den übrigen Lineages beibehalten (Abb.4.26.A, gelber Pfeil).

Ferner ist allgemein ein sehr hohes Aufkommen an Drx-positiven Zellkernen im proximalen Bereich zu beobachten (Abb.4.26,A,B, roter bzw. weißer Pfeil).

Nachdem die Expression der 57B-TF in den DM-Lineages einzeln und im Vergleich analysiert wurde, konnte die Analyse in Richtung der funktionellen Bewertung durch den Vergleich mit DM-spezifischen Reportern und im Sinne einer Zuordnung zu den verschiedenen Zelltypen fortgesetzt werden.

4.20 Vergleiche der Drx/Hbn-Expression mit spezifischen Treiberlinien der DM-Lineages

In der larvalen Phase sollten die bereits embryonal zur Analyse verwendeten Gal4-Treiberlinien von *dll* (Calleja et al., 1996) und *erm* (Pfeiffer et al., 2008) zum Einsatz kommen, um die Expression von Drx und Hbn näher zu klassifizieren. In diesem Ansatz wurde der *dllGal4*-Treiber sowie der *ermGal4*-Treiber mit UAScd8GFP (Lee und Luo, 1999) markiert und die Expression von Drx und Hbn gemeinsam mit den Reportern verglichen. *DllGal4* erwies sich in larvalen Untersuchungen als spezifischer Marker für die dorso-medialen-Lineages (Izergina et al., 2009) mit einem Beginn der Reporterexpression im Neuroblasten. *ErmGal4* zeigte sich in Studien bezüglich der Typ-II-DM-Lineages als spezifischer Marker für die INP- und GMC-Region (Bayraktar et al., 2010; Weng et al., 2010; Xiao et al., 2012) und sollte daher Aufschluss über die 57B-TF-Expression in diesem besonderen Stammzellbereich geben. Ziel war es, die differentielle Expression der Faktoren im proximalen Stammzellbereich genauer zu beschreiben und ihre Verteilung im gesamten markierten Lineagekorridor besser zu visualisieren.

Um die Expression beider Faktoren zellgenau im Bereich des Reporters analysieren zu können, wurden beide 57B-TF gegenüber der Membran-markierten Version des *dllGal4*-Treibers untersucht. Somit können in mehreren Stapelmontagen die Expressionsmuster von Drx und Hbn nachvollzogen, Kollokationen untereinander genau betrachtet und die Expressionen in proximalen Bereichen besser quantifiziert werden. Hier können, wie bereits in der Doppelfärbung gegenüber Nrt, regionspezifische Unterschiede vor dem Hintergrund des Reporters festgestellt werden. Hbn taucht im Stammzellbereich der Lineage eher in anterioren Abschnitten auf (Abb.4.28,A, roter Pfeil; Abb.4.29), wohingegen Drx überwiegend in den posterioren Teilen zu finden ist (Abb.4.28,A, blauer Pfeil; Abb.4.29). Die Expression beschränkt sich dabei jeweils auf wenige, kortikal in der Lineage liegende, Zellen.

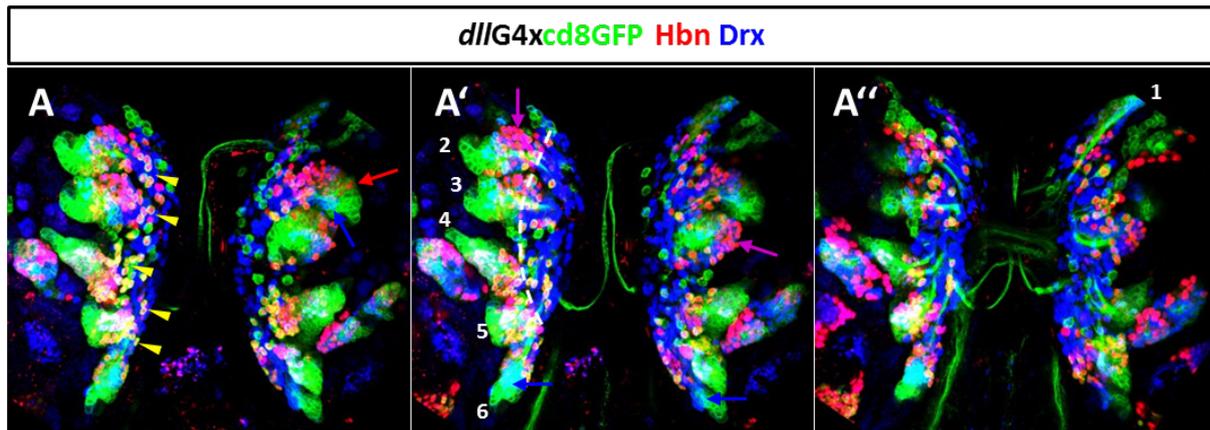


Abb.4.28: *DllG4* als DM-Marker zur Expressionsanalyse von *Drx* und *Hbn*. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Aufsicht (40x) aller DM-Lineages (1-6) im Verlauf von der dorsalen Oberfläche bis zum Ende der Reporteraktivität an *dllG4xcd8GFP*-L3-Gehirnen mit anti-*Drx*- und -*Hbn*-Färbung: (A-A'') *DllG4xcd8GFP* färbt proximal vom NB bis medial der Lineage. Rote Pfeile zeigen kortikale, *Hbn*-pos.- und blaue Pfeile kortikale, *Drx*-pos.-Zellen im proximalen Reporterbereich. Lila Pfeile zeigen kolokalisierte Zellen im Reporterbereich. Gelbe Pfeilspitzen zeigen distale, verbundlose, *Hbn*-pos. Zellen. Gestrichelte, weiße Linie zeigt das Ende der Reporteraktivität.

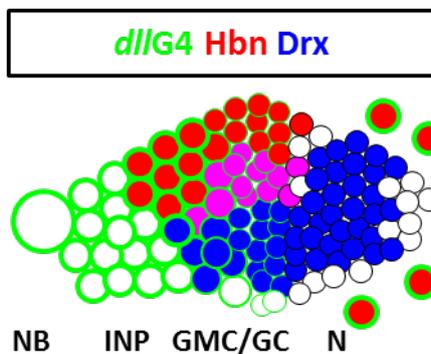


Abb.4.29: Verteilung der *Drx*/*Hbn*-Expression im Bereich des *dllG4*-Reporters. Idealierte Darstellung einer DM-Lineage mit verminderter Zellzahl. Unter der Lineage sind die jeweiligen Zelltypen markiert, diese sind auch durch unterschiedlich dicke Rahmen voneinander abgesetzt. Vom Reporter gefärbte Zellen sind mit grünem Rand markiert. NB und Teil der INP-Zone ohne *Drx*/*Hbn*-Expression. Ein Teil mit meist kortikaler Expression in Bezug auf die Lineage und überlappende Expression im Zentrum; *Hbn*-Expression in verbundlosen, *dllG4*-markierten Zellen am distalen Terminus der Lineage zu beobachten.

Besonders fällt auch hier wieder DM 6 auf, wo *Drx* erneut proximaler von *Hbn* zu beobachten ist (Abb.4.28,A', blaue Pfeile). In der tiefsten, von dorsal ausgehend betrachteten Ebene erscheint fast ausschließlich die Expression von *Drx* im Anschluss an den Reporterbereich (Abb.4.28,A''). Des Weiteren konnten *dllGal4*/*Hbn*-positive Zellen außerhalb des Verbundes der DM-Lineage nachgewiesen werden (Abb.4.28,A, gelbe Dreiecke).

Die Aktivität des *ermGal4*-Treibers wird in verschiedenen Stammzellarealen der larvalen Gehirne beobachtet, so werden neben den DM- (Abb.4.30,A, weißer Kasten, Abb.4.30,B) auch die DL-Lineages und der Cortex der OL markiert (Abb.4.30,A). Der Vergleich mit *ermGal4* zeigt für beide Faktoren zusammen ein spezifisches, die Lineage räumlich teilendes *Drx*/*Hbn*-Muster innerhalb des Reporterbereichs (Abb.4.30,C). Darüber hinaus kann in einer detaillierten Betrachtung aller DM-Lineages definitiv festgestellt werden, dass sowohl *Drx*- als auch *Hbn*-Expression im Bereich des Reporters vorliegt. Meist sind dort nur einzelne, räumlich aneinander grenzende Zellen im kortikalen Bereich des Reporters gefärbt (Abb.4.30,C, blaue, rote und lilafarbene Pfeile, Abb.4.31). Besonders für *Hbn* kann hier im

Cortex der Lineages in mehreren Zellen innerhalb des Reporterbereichs starke Expression bestätigt werden, die wahrscheinlich den dort befindlichen INP zuzuordnen ist (Abb.4.30,C, DM 2, roter Pfeil, Abb.4.31).

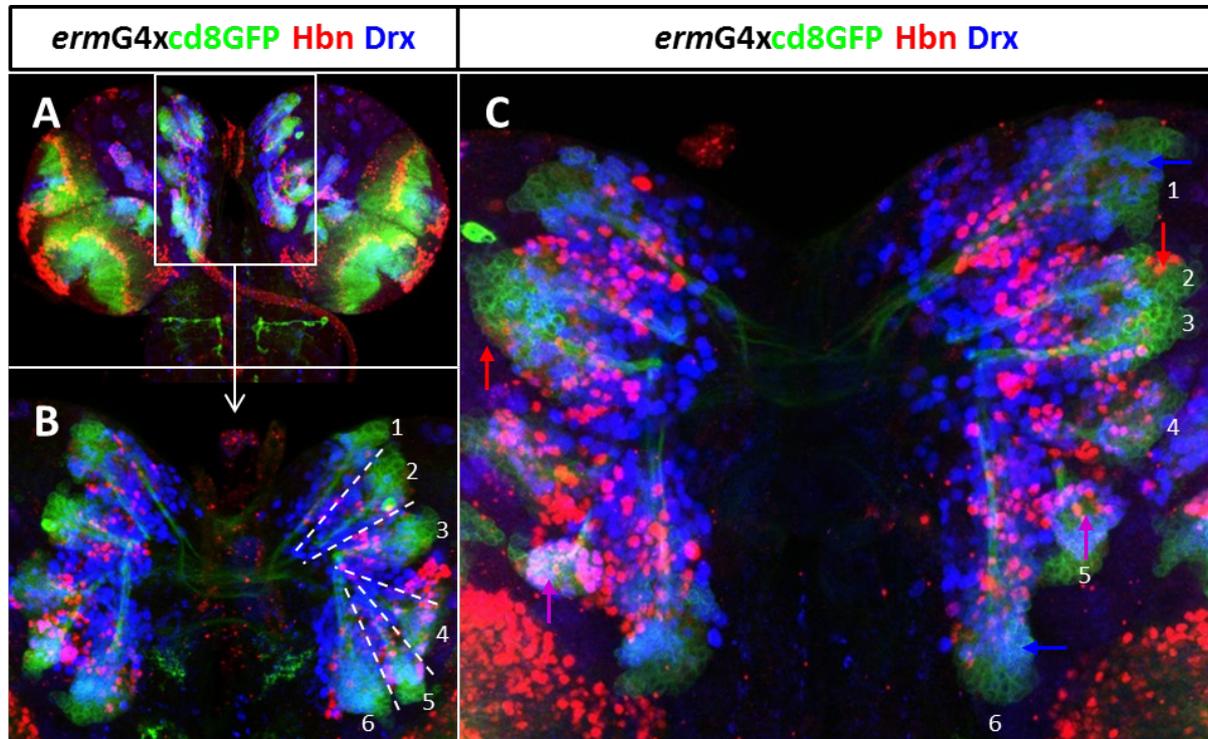


Abb.4.30: ErmG4 als Stammzellmarker der DM-Lineages zur Expressionsanalyse von Drx und Hbn. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Aufsicht (40x) von *ermG4xcd8GFP*-L3-Gehirnen mit anti-Drx- und -Hbn-Färbung: (A) Dorsaler Fokus, Übersicht über die Expression des Treibers und der 57B-TF in den Hemisphären des L3-Gehirns, Ausschnitt (weiße Linie) zeigt die DM-Region an. (B) Vergrößerung des markierten Bereichs aus A zeigt alle DM-Lineages durch Zahlen markiert und durch gestrichelte Linien voneinander abgegrenzt. (C) Analyse der Expression von Drx und Hbn im Reporterbereich. Rote Pfeile zeigen proximale, kortikale, Hbn-pos. Zellen im Reporterbereich, blaue Pfeile zeigen Drx-pos. Zellen im Reporterbereich und lila Pfeile kolokalisierte Zellen im proximalen Reporterbereich.

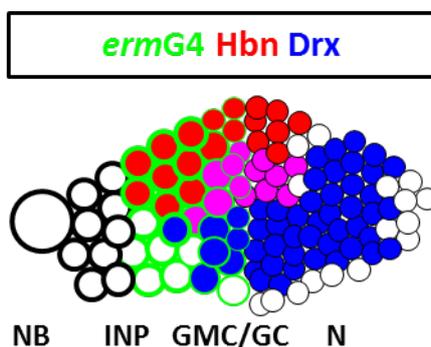


Abb.4.31: Schematische Darstellung der Drx/Hbn-Expression im Vergleich zu *ermG4*. Idealisierte Darstellung einer DM-Lineage mit verminderter Zellzahl. Unter der Lineage sind die jeweiligen Zelltypen markiert, diese sind auch durch unterschiedlich dicke Rahmen voneinander abgesetzt. Vom Reporter markierte Zellen sind durch einen grünen Rand hervorgehoben. Beide Faktoren werden im Stammzellbereich einzeln und gemeinsam exprimiert.

Areale mit vielen kolokalierenden Zellen im Reporterbereich treten jedoch ebenfalls auf. Im direkten Vergleich zu Hbn kann hier für die DM 6 eine proximale Expression von Drx vor Hbn gezeigt werden, in der viele Drx-positive Zellen beobachtet werden (Abb.4.30,C, blauer Pfeil). Dies bestätigt die DM 6-spezifische Expression von Drx in proximalen Stammzellarealen. Der Expressionsvergleich mit dem Stammzellreporter der DM-Lineages,

ermGal4, bestätigt somit die bisherigen Ergebnisse der MARCM-Analyse und des Vergleichs mit *dllGal4*.

Die Analyse von stammzellspezifischen Reportern der DM-Lineages im Hinblick auf die Expression von *Drx* und *Hbn* zeigt eine schwache, jedoch feststellbare Expression beider Faktoren, deren zelluläre Identität untersucht werden sollte. Durch den Einsatz von *dll*- und *ermGal4*-Treiber wurden ebenfalls die DL-Lineages des CB mit nachweisbarer *Drx/Hbn*-Expression vorgefunden. Diese Lineages sollten daher im Vorfeld der Zelltypanalyse beschrieben werden.

4.21 Expression von *Drx* und *Hbn* in dorso-lateralen Typ-II-NB-Lineages

Neben den sechs im dorso-medialen Bereich des CB vorhandenen Typ-II-NB-Lineages existieren im dorso-lateralen Anteil des larvalen Gehirns zwei weitere Typ-II-NB-Lineages, die sog. dorso-lateralen Lineages. Die Expression der 57B-TF sollte in diesen Lineages mit geeigneten Markern untersucht und dargestellt werden, wozu sich die Verwendung von *erm*- und *worniu* (*wor*)*Gal4[aseGal80]* (Lee et al., 2006) sowie *nabGal4* (Clements et al., 2003; Félix et al., 2007) anbietet, da sie einerseits den Stammzellbereich von Typ-II-NB-Lineages markieren (*ermGal4*, *worGal4[aseGal80]*) und andererseits zu einer vollständigen Markierung aller Typ-I- und Typ-II-Lineages im larvalen Gehirn führen (*nabGal4*) (Ashraf et al., 2004; Hayashi et al., 2002). Die DL-Lineages sollten ebenfalls auf die *Drx/Hbn*-Expression im Stammzellbereich analog zu den DM-Lineages untersucht und eventuelle Unterschiede dokumentiert werden.

Die Expression der 57B-Faktoren wurde auch in den lateralen Typ-II-Lineages vorgefunden und zeigte global betrachtet einen den DM-Lineages (1-6) vergleichbaren Charakter (Abb.4.32,A, I,II). Dabei beginnt hier die 57B-Expression im proximaleren Bereich (Abb.4.32,A, weiße Pfeile). Die Markierung durch *worGal4[aseGal80]* hebt ausschließlich den NB und die unreifen, also noch Ase-negativen INP aller Typ-II-NB-Lineages hervor, da durch die Wirkung des *aseGal80*-Konstruktes die Aktivität des *worGal4*-Treibers in Ase-positiven Lineageanteilen unterdrückt wird (Anwendung im RNAi-basierten Screen der AG Knoblich, Wien, zur Aufdeckung Nervensystem-spezifischer Stammzellfaktoren, Neumüller et al., 2011). Die Expression von *Drx* kann somit stellvertretend für die 57B-Faktoren in den DL-Lineages im Anschluss an die Reporterexpression eindeutig nachgewiesen werden (Abb.4.32,B, weiße Pfeile).

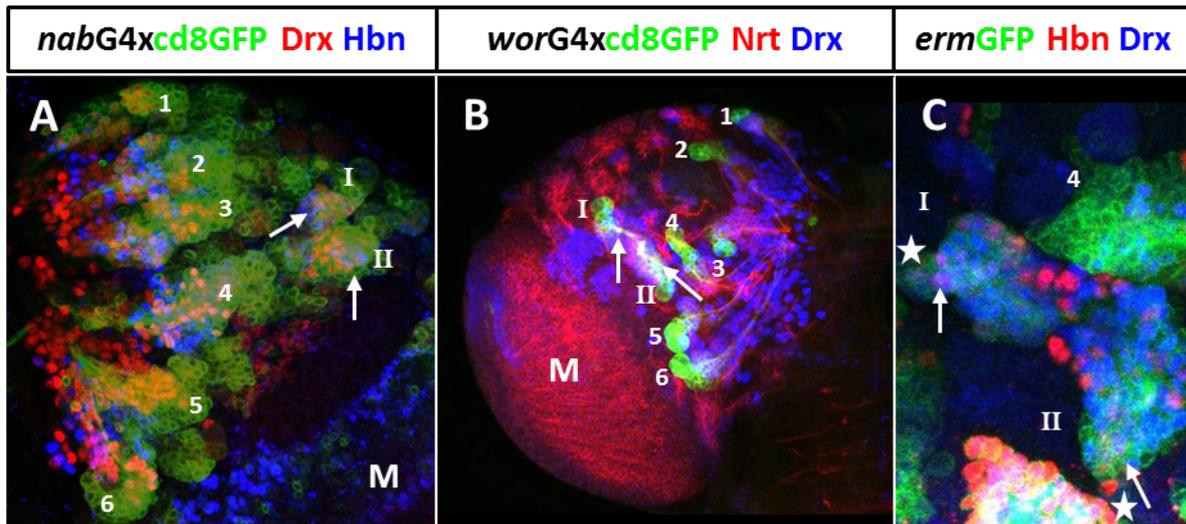


Abb.4.32: Darstellung der Drx/Hbn-Expression in DL-Lineages mit spez. Markern. Konfokale Aufnahmen (40x) von, (A) *nabG4*, (B) *worG4[aseG80]* und (C) *ermG4* in jeweiliger Rekombination mit UAScd8GFP und (A,C) anti-Drx- und-Hbn- sowie (B) mit anti-Drx- und -Nrt-Färbung, DM-Lineages (1-6), DL-Lineages (I,II): (A) *NabG4* markiert die Lineages des larvalen Gehirns im proximalen Bereich. Weiße Pfeile zeigen die Lage der lateralen Typ-II-Lineages mit Drx- und Hbn-Expression an. (B) *WorG4[aseG80]* wird spezifisch nur in NB und INP der Typ-II-Lineages exprimiert, weiße Pfeile zeigen Drx-positive DL-Lineages. (C) DL-I- und DL-II-Lineage in Nachbarschaft zur DM 4 mit Expression der 57B-TF im Reporterbereich. Weiße Pfeile zeigen starke Expression von Drx und Hbn im proximalen Reporterbereich. Weiße Sterne zeigen Lage des NB an. (M, Medulla).

Der Typ-II-Lineage-spezifische Reporter *ermGal4* (Bayraktar et al., 2010; Pfeiffer et al., 2008; Weng et al., 2010) markiert ebenfalls den Stammzellbereich der DL-Lineages. Im Unterschied zur benachbarten DM 4 wird in den DL-Lineages der gesamte Reporterbereich mit 57B-Expression vorgefunden (Abb.4.32,C, weiße Pfeile).

Die Expression der 57B-Faktoren Drx und Hbn konnte für die acht Typ-II-NB-Lineages bestätigt werden. Ein Unterschied der Expression zwischen dorso-medialen und -lateralen Vertretern liegt in der Anzahl der markierten, *ermGal4*-positiven, proximalen Stammzellen der Lineages vor. An dieser Stelle sollte nun die Zelltypanalyse in den DM-Lineages, stellvertretend für alle Typ-II-Lineages stattfinden. Besonders in diesen Lineages ist die Analyse wertvoll, da sie als einzige über den additiven Zelltyp INP verfügen.

4.22 Zelltypanalysen der Drx- und Hbn-positiven DM-Expression

Analog zur Strategie, Hbn im embryonalen Nervensystem Zelltyp-spezifisch nachzuweisen, wurden in der Larve die gleichen Faktoren zur Bestimmung der Zelltypen in DM-Lineages verwendet. So entscheidet eine Dpn-Färbung über das Vorhandensein von NB und INP. Eine Differentialfärbung mit ELAV und Pros sollte es erneut möglich machen, zwischen Pools aus GMC und Neuronen zu unterscheiden. Zu beachten ist die Tatsache, dass Prospero in seiner Eigenschaft als zur Differenzierung beitragender Faktor die Entwicklung der postmitotischen

Ganglion-Zellen (GC) zu differenzierten Neuronen antreibt. Daher wird Prospero noch in diesen Zellen exprimiert, bis sich die Zellen gänzlich zu ELAV-positiven Neuronen differenziert haben, weshalb sie mit ELAV/Pros-Färbung ebenfalls detektiert werden (Colonques et al., 2011). Repo diente auch in der larvalen Phase als Marker für Gliazellen. Um die Analyse der Expression in DM-Stammzellen zu unterstützen, wurden Färbungen mit anti-pH3 (Bello et al., 2006) und PCNA-GFP (Easwaran et al., 2007) als allgemeine Proliferationsmarker durchgeführt.

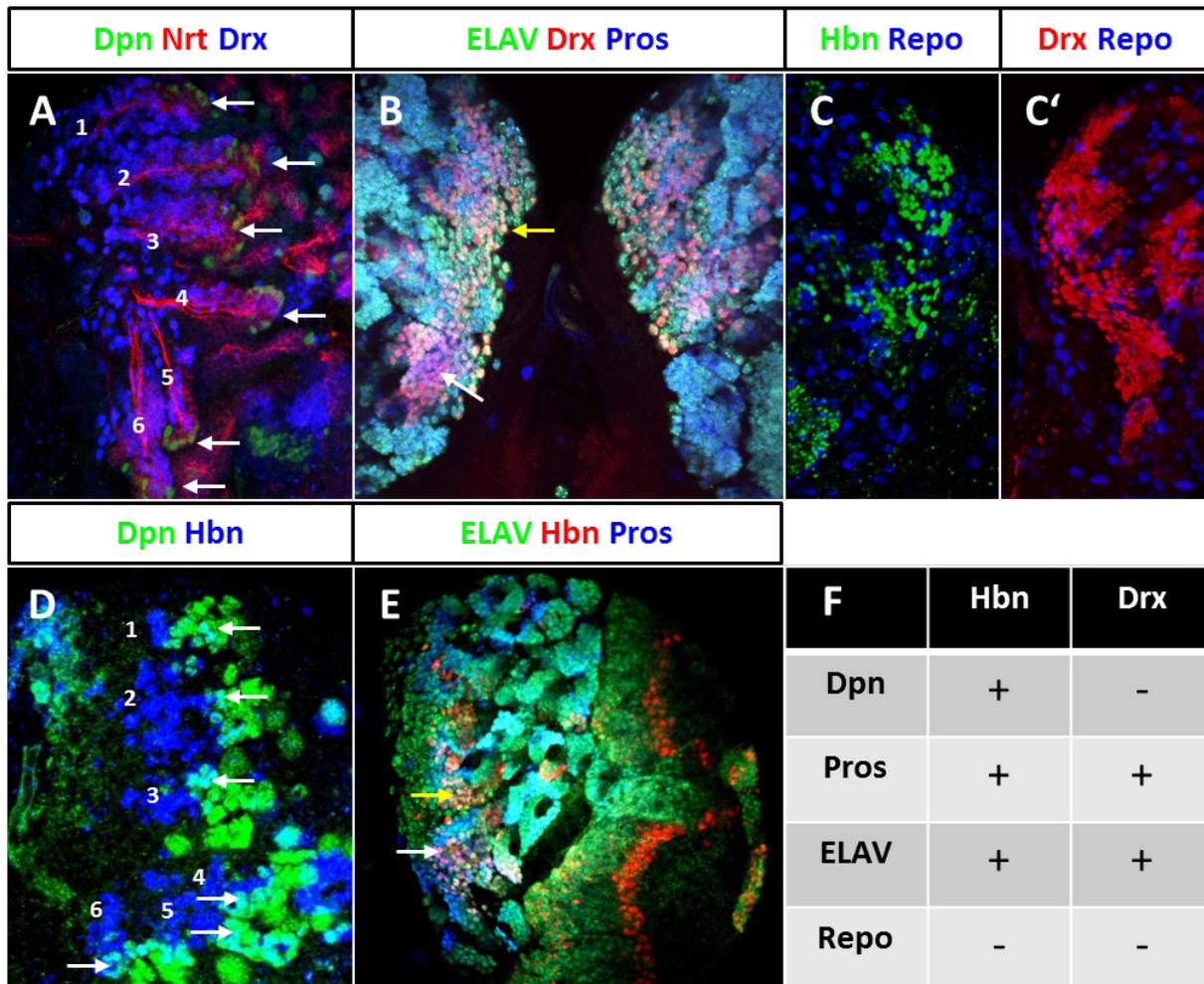


Abb.4.33: Zelltypbestimmung der dorso-medialen Expression von Drx/Hbn. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Aufsicht (40x) von yw-L3-Gehirnen mit (A) anti-Dpn-, -Drx-, -Nrt-, (B) -Drx-, -ELAV-, -Pros-, (C) -Hbn-, -Repo-, (C') -Drx-, -Repo-, (D) -Dpn-, -Hbn-, (E) -ELAV-, -Hbn- und -Pros-Färbung: (A) Weiße Pfeile zeigen Dpn-pos. INP proximal in der Lineage. (B) Weißer Pfeil zeigt Drx-Expression in GMC, gelber Pfeil weist auf Drx-Expression in ELAV-pos. Neuronen am distalen Ende der Lineage. (C) Vergleich der Hbn-Expression mit Glia-spezifischer Repo-Expression. Es wird keine Kolo-kalisation beobachtet. (C') Vergleich der Drx-Expression mit der Expression von Repo zeigt keine Übereinstimmung. (D) Weiße Pfeile zeigen Hbn-Expression in alten, distalen, Dpn-pos. INP. (E) Weißer Pfeil zeigt Hbn-Expression in GMC, gelber Pfeil Hbn-Expression in distalen Neuronen. (F) Tabelle mit ermittelten Kolo-kalisationen.

Drx zeigt in späten L3-Gehirnen eine ausgedehnte, von proximal nach distal verlaufende Expression beginnend mit geringem Zellabstand zu den reifen INP, eine Kolo-kalisation mit Dpn-positiven INP kann hier in diesem Entwicklungsstadium jedoch nicht ausgelesen

werden. (Abb.4.33,A, weiße Pfeile). Hbn hingegen wird weiter proximal in reifen, also Dpn-positiven INP exprimiert (Abb.4.33,D, weiße Pfeile). Mittels der gemeinsamen Färbung von ELAV und Pros kann eine Aussage über die Expression der 57B-TF in den GMC getroffen werden. Beide Faktoren können in späten L3-Stadien der Gehirnentwicklung zumindest in den DM 6-Lineages in proximalen Zellen mit alleiniger, Pros-positiver Kernfärbung gefunden werden (Abb.4.33,B,E, weiße Pfeile). Die Mehrheit der Drx- und Hbn-positiven Zellen in DM-Lineages fällt den ELAV-positiven Neuronen zu (Abb.4.33,B,E, gelbe Pfeile), mit Ausnahme der DM 6. Für den Gliazell-spezifischen Faktor Repo konnte keine Kolo-kalisation mit Drx oder Hbn gefunden werden (Abb.4.33.1,C,C'), somit handelt es sich in den DM-Lineages, die sowohl Neurone als auch Glia bilden (Izergina et al., 2009), ausschließlich um Hbn-positive INP, Drx/Hbn-positive GMC und Drx/Hbn-positive Neurone. Die Tabelle in Abb.4.33,F fasst die Ergebnisse zusammen.

Die zusätzliche Verwendung von anti-pH3 und PCNA-GFP als Proliferationsmarker konnte die bei der Zelltypanalyse gefundenen Daten bestätigen. So werden in L2-, frühen und ausgebildeten L3-Gehirnen im proximalen Bereich der DM-Lineages noch immer Drx- und Hbn-exprimierende Zellen mit Phospho-Histon-Markierung beobachtet bzw. Zellen in direkter Nachbarschaft zu pH3-positiven Zellen vorgefunden. In früheren Stadien konnte besonders in Hbn-positiven Zellen häufig pH3-Markierungen detektiert werden, aber auch in Drx-positiven Zellen. Mittels PCNA-GFP konnten in den DM-Lineages mehrere Zellen mit Drx/Hbn-Expression im proximalen, proliferativen Stammzellbereich gefunden werden. In DM 6 gilt dies besonders für Drx. Insgesamt lassen sich jedoch für Hbn mehr mitotische Zellen im Stammzellbereich der DM-Lineages finden. Im Anhang sind in Abb.7.8 und 7.9 die zugehörigen Aufnahmen dargestellt.

Zusammenfassend kann Drx als GMC/GC- und Neuronen-Marker in den DM-Lineages angesehen werden, Hbn hingegen als Marker der früh gebildeten INP und einem Teil der von ihnen gebildeten GMC und Neurone. Um die larval gebildeten DM-Lineages auf Phänotypen bezüglich der embryonal letalen Allele von *hbn* und *drx* untersuchen zu können, wurden mutante MARCM-Klone induziert und analysiert.

4.23 Untersuchung mutanter DM-MARCM-Klone der 57B-TF Drx und Hbn

Die MARCM-Technik stellt eine Methode dar, die Funktion eines Gens anhand letaler Allele auch in Teilgeweben zu untersuchen (Lee und Luo, 1999). Dadurch können im Fall des 57B-

Genclusters, dessen Mutanten durchweg eine embryonale Letalität aufweisen, hier auch in larvalen Gehirnen funktionelle Analysen getätigt werden. Durch Rekombination der Allele *drx*¹⁰¹⁵⁵ sowie *hbn*¹⁵²²⁷ mit Centromer-nahen FRT-sites ist es möglich, mit den entsprechenden TUG-(*tubulinGal4*; panneuraler Treiber) MARCM-Treibern mutante Klone in larvalen Gehirnen zu induzieren, die nur das mutante Protein exprimieren. Diese Klone können nun auf Veränderungen ihrer Lineage-Struktur, Axonprojektion und Zellzahl hin direkt anhand der klonalen Fluoreszenzmarkierung untersucht werden. Neben der Möglichkeit, ein einzelnes Allel in MARCM-Klonen zu untersuchen, kann auch eine Defizienz mit FRT-sites versehen werden, um dadurch mehrere Gene gleichzeitig betrachten zu können. In diesem Fall wurde der rechte Arm des zweiten Chromosoms mit einer 57B-Deletion von 57B3-57B5 mit FRT-Rekombinationsstellen rekombiniert. Im Anhang zeigt Abb.7.10 den deletierten Bereich. Dadurch konnten Klone der DM-Lineages auf Veränderungen durch den Ausfall aller TF untersucht werden. Zur Gegenfärbung dienten die beiden in DM-Lineages exprimierten und zu untersuchenden TF Drx und Hbn. Im ersten Ansatz einer auf diese Weise durchgeführten MARCM-Analyse wurde nach Veränderungen der Lineage-Struktur gesucht. Abb.4.34 veranschaulicht am Beispiel verschiedener DM-Klone, vor allem von DM 3, die Ergebnisse der Allel-spezifischen MARCM-Analyse.

Für *drx*¹⁰¹⁵⁵ wurde ein Ansatz mit n>25 Klonen durchgeführt. Ein Problem dieser Untersuchung lag in der Nachweisbarkeit eines N-terminalen Proteinfragmentes mit den vorhandenen, N-terminalen Antikörpern (Davis et al., 2003), woraufhin im Labor der C-terminale Antikörper DrxC hergestellt wurde. Mit diesem war es möglich, mutante, GFP-markierte Klone ohne Drx-Färbung direkt mit dem wildtypischen Gegenstück zu vergleichen. Hier konnte keine Veränderung der untersuchten Lineages gefunden werden (Abb.4.34,A).

Auch im Falle von Hbn war es dank des nicht nachweisbaren *hbn*¹⁵²²⁷-Proteins möglich, einen mutanten Klon ohne Hbn-Färbung direkt mit seinem Pendant in der spiegelsymmetrischen Hemisphäre zu vergleichen. Deren entsprechende Lineages verfügen sowohl über Nrt- als auch Hbn-Färbung, was den morphologischen Vergleich ermöglicht. In allen Fällen konnte keine Veränderung der Lineages, was Größe, Lage und Vorhandensein der Kommissurprojektionen angeht, festgestellt werden (Abb.4.34,B; n>25).

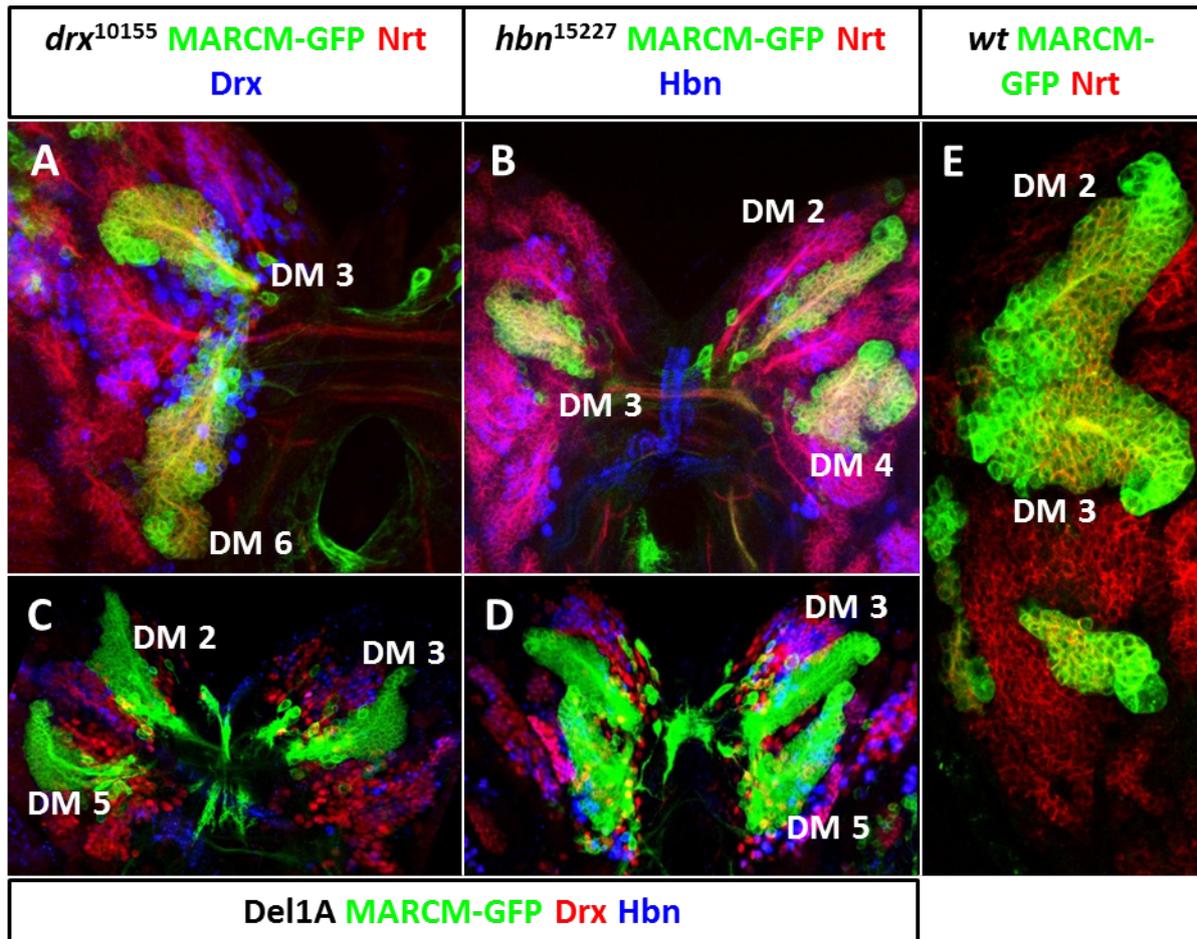


Abb.4.34: Darstellung mutanter MARCM-DM-Klone für die 57B-TF Drx und Hbn. Konfokalmikroskopische Aufnahmen in dorsaler Aufsicht (40x) von fluoreszenzmarkierten FRT(57B)xTUB(G13)-L3-Gehirnen mit anti-Nrt-Färbung und ferner (A) anti-Drx- bzw. (B) anti-Hbn-Färbung bzw. (C,D) FRT(Del1A)xTUB(G13)-L3-Gehirnen mit anti-Drx- und -Hbn-Färbung sowie (E) FRT(G13)xTUB(G13)-L3-Gehirn mit -Nrt-Färbung als *wt*-Vergleich: (A) Mutante *drx*¹⁰¹⁵⁵-MARCM-DM-Klone: DM 3, 6. (B) *hbn*¹⁵²²⁷ MARCM-DM-Klone: DM 2, 3, 4. (C) Del1A-MARCM-Klone: DM 2, 3, 5. (D) Del1A-MARCM-DM-Klone: beidseitig DM 3, 5. (E) *Wt*-MARCM-Klone: DM 2, 3.

Die induzierten Del1A-DM-Klone, die weder Drx noch Hbn exprimieren, zeigten ebenfalls keine Veränderung der Lineage (Abb.4.34,C,D). Zum Vergleich dient in Abb.4.34 ein DM 3-*wt*-MARCM-Klon. Für die DM 6-Lineage, die als einziger Vertreter alle drei 57B-Faktoren exprimiert, wurden keine Klone gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass Hbn zwar sowohl embryonal (NB, GMC) als auch larval (INP, GMC) in Stammzellen exprimiert wird, jedoch larval keinen analogen Phänotyp in Form eines Ausfalls von Zellen zeigt. Dies gilt gleichermaßen für Drx.

Zusammenfassend stellte sich in der klonalen Analyse mit mutanten Allelen der 57B-Faktoren heraus, dass diese Faktoren keinen sichtbaren Einfluss auf die larvale Ausbildung der DM-Lineages haben. Daher scheinen diese Faktoren andere Funktionen innerhalb dieser Lineages zu besitzen, die in weiteren Experimenten untersucht werden sollten.

4.24 Vergleich der 57B-Expression mit definierten Timing-Faktoren der DM-Lineages

Während der experimentellen Durchführung dieser Arbeit wurden neueste Erkenntnisse bezüglich der zeitlichen Abfolge der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in den DM-Typ-II-NB-Lineages veröffentlicht (siehe 2.10, Abb.2.15), die bestimmte Populationen und Entwicklungszeiträume der Lineage durch ihre Expression in NB und INP definieren (Bayraktar und Doe, 2013). Die INP der DM-Lineage werden durch die Expression sog. Timing-Faktoren in frühe, mittlere und späte INP untergliedert. Diese unterscheiden sich durch die Herstellung von Neuronen mit bestimmter Markerexpression. Somit wird eine temporale Musterbildung der Lineage geschaffen. Ausgehend von der Lage der Drx- und Hbn-Expression in den DM-Lineages, erschien eine Untersuchung früher INP und der von ihnen gebildeten Neurone sinnvoll. Dazu sollte die Expression von Drx und Hbn mit der von Ey und Toy verglichen werden, da Ey die frühen INP markiert, aus denen eine Toy-positive Neuronenpopulation hervorgeht. Zusätzlich standen für diese Expressionsanalyse noch Dac und Dll zur Verfügung, die sich bereits embryonal analog zu Ey und Toy durch sehr vergleichbare Expressionsmuster im SAG auszeichneten und daher mit in die Kartierung einbezogen werden sollten. Zu den Vergleichsfärbungen von Ey und Toy wurde anti-Nrt addiert, um die Lineages zu markieren und so die zeitliche und örtliche Expression von Drx bzw. Hbn im Zusammenhang mit den Timing-Markern besser analysieren zu können. Ziel der Untersuchung war die Einordnung der Expression der 57B-Faktoren in die zeitliche Serie der INP bzw. eine weitere Determinierung des Beginns der Expression und somit eine Zuordnung zu den Neuronenpopulationen, die aus verschiedenen Zeitfenstern der Typ-II-Lineage-Entwicklung hervorgehen.

Wird Drx mit Ey verglichen, so kann in allen Lineages mit unterschiedlicher Penetranz ein Übergang von Ey-positiven INP in Drx-positive Lineage-Anteile beobachtet werden. Dies erfolgt meist ohne Kolo-kalisation, in seltenen Fällen aber auch mit (Abb.4.35,A, weißer Pfeil), was die Expression von Drx direkt im Anschluss an INP bestätigt (Abb.4.35,A, weiße Linien; Abb.4.36). Untersuchungen von Hbn zeigten hingegen Kolo-kalisation mit dem INP-ständigen Ey-Muster in DM-Lineages an (Abb.4.35,A', weiße Pfeile; Abb.4.36), wodurch eine Überlappung der zeitlichen Identität der Ey- und Hbn-positiven INP nachgewiesen wurde.

Toy wurde als ausschließlich neuronaler Marker identifiziert, der frühe Expression erfährt und daher in der Lineage weit distal im Anschluss an den Stammzellbereich liegt (Bayraktar und Doe, 2013).

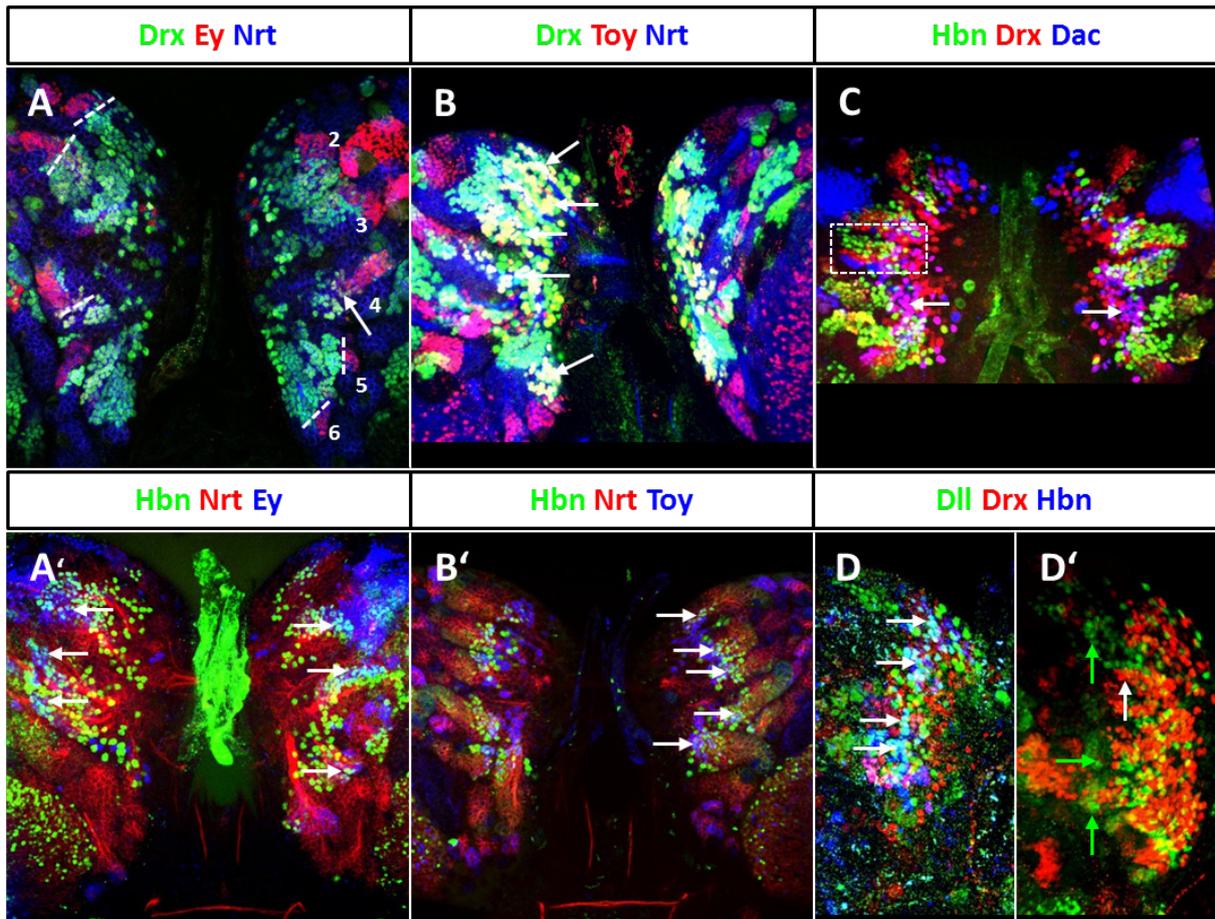


Abb.4.35: Vergleich der Drx/Hbn DM-Expression mit den Timing-Faktoren und anderen TF. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Aufsicht der DM-Lineages (40x) von *yw*-L3-Gehirnen mit (A,A') anti-Ey-, -Drx/Hbn-, -Nrt-; (B,B') -Drx/Hbn-, -Nrt-, -Toy- und (C) -Dac-, -Drx-, -Hbn- und (D) -Dll-, -Drx-, -Hbn- bzw. (D') -Dll- und -Drx-Färbungen: (A) Gestrichelte, weiße Linien zeigen Grenzen der Ey- und Drx-Expression an. Weißer Pfeil zeigt eine der wenigen Kolokalisationen der Faktoren an. (A') Weiße Pfeile markieren Hbn-Expression in Ey-pos. INP. (B) Weiße Pfeile deuten auf kolokalisierte Toy-pos. Neurone im medialen Anteil der DM-Drx-Expression hin. (B') Weiße Pfeile zeigen Übergang der Hbn-Expression in die Toy-Expression an. (C) Weiße Pfeile zeigen Kolokalisation von Dac und Drx. Weißer Kasten zeigt in DM 4 Regionalisierung der Lineage-Expression der Faktoren. (D) Weiße Pfeile zeigen Dll/Hbn-Kolokalisation. (D') Weißer Pfeil zeigt Dll Expression, die ähnlich zur Verteilung Hbn gegenüber Drx in DM-Lineages liegt. Grüne Pfeile zeigen Dll-Expression in proximalen Stammzellen.

Drx kolokalisiert auf weiter Strecke mit Toy, jedoch nicht in proximalen und distalen Anteilen. Somit wird Drx einerseits früher in der Lineage exprimiert und andererseits auch über das zeitliche Fenster von Toy hinaus (Abb.4.35,B, weiße Pfeile; Abb.4.36). Hbn und Toy hingegen zeigen nur einen Abschnitt gemeinsamer Aktivität, da die Toy-Expression nach der Hbn-Expression in INP beginnt und über die Neuronenpopulation von Hbn hinausreicht.

Die Aktivität von Hbn liegt somit im Stammzellbereich vor den Neuronen, aber auch in gebildeten Neuronen (Abb.4.35,B', weiße Pfeile; Abb.4.36). Ein Experiment mit Dac als Vergleichsfaktor ergab eine Kolokalisation mit Drx, nicht jedoch mit Hbn. So zeigen lediglich die distalen Anteile der Dac/Drx-Expression mehrere Ereignisse von zellulärer Koaktivität in DM-Lineages an (Abb.4.35,C, weiße Pfeile). Der Vergleich verdeutlicht eine Expression dieser

Faktoren in drei voneinander abgegrenzten Zonen der DM-Lineage (siehe Abb.4.35, weißer Kasten). In einem weiteren Experiment wurde die endogene Dll-Expression mit Drx/Hbn verglichen und eine Kolokalisation mit proximalen Hbn-Anteilen in DM 1-5 gefunden, wohingegen Dll und Drx nur in wenigen vereinzelt Kernen Übereinstimmung zeigen (Abb.4.35,D, weiße Pfeile). Werden Dll und Drx allein verglichen, so zeigt sich eine ähnliche Verteilung, wie sie zwischen Drx und Hbn angetroffen wird. So kann auch Dll in anterioren Bereichen vorgefunden werden (Abb.4.35,D', weißer Pfeil) und darüber hinaus bis in proximale Stammzellen, wie es der zuvor verwendete *dll*-Reporter bereits zeigte (Abb.4.35,D', grüne Pfeile; siehe 4.20, Abb.4.28).

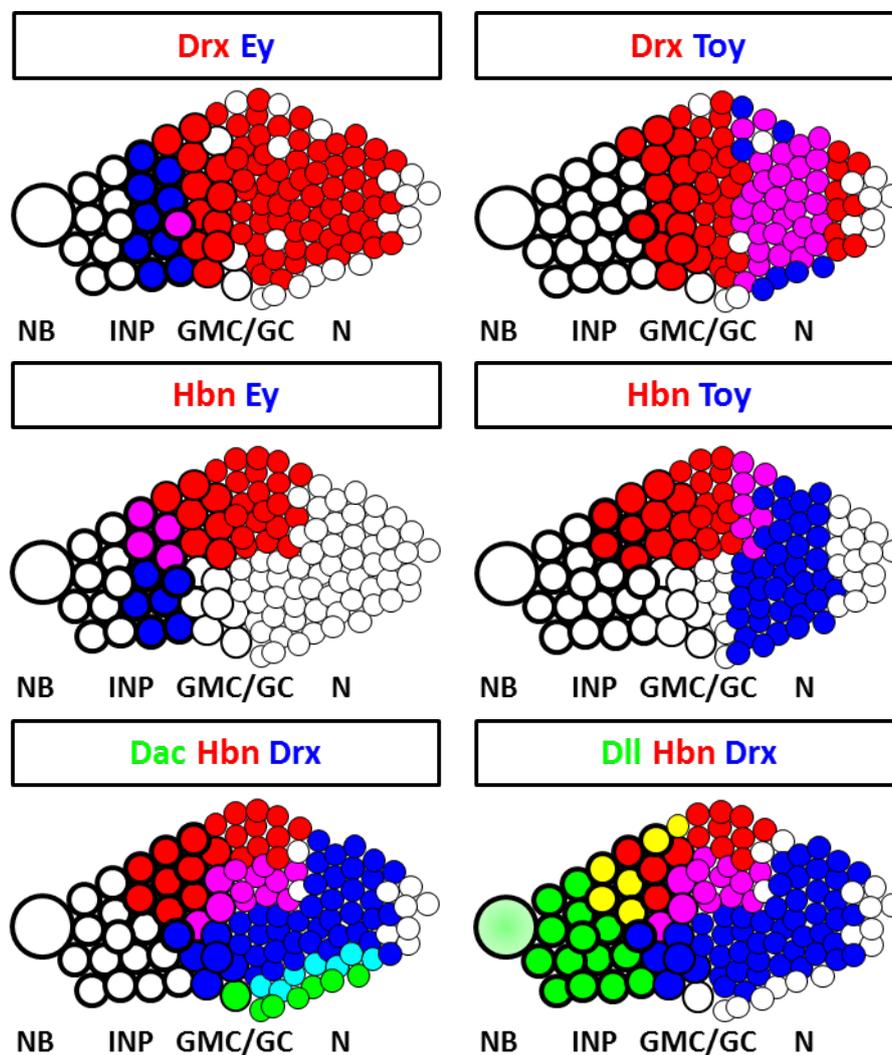


Abb.4.36: Kartierung der Expression von Drx/Hbn gegenüber den Timing-Faktoren der DM-Lineage und Dac bzw. Dll. Ey und Hbn überlappen definitiv in den INP der DM-Lineage, wohingegen Drx eine direkt an die Expressionsdomäne von Ey angrenzende Expression zeigt, die minimale Kolokalisation gegenüber Ey besitzt. Hbn und Toy besitzen nur geringe Überlappung im Korridor der Lineage, Toy-Expression liegt in distaleren Neuronen der Lineage vor. Drx hingegen wird vgl. an Toy früher in der Entwicklung der DM-Lineages exprimiert und erscheint daher mit Toy überlappend, aber auch distaler in Neuronen der Lineage. Im Vergleich der 57B-TF zu Dac kann eine dreiteilige Expression mit Grenzen zwischen der anterior-posterioren Verteilung beobachtet werden. Dll zeigt eine Expression in allen Stammzellen der Lineage, die ab den INP teilweise mit Hbn kolokalisiert.

Damit kann Dll ebenfalls als Stammzell-spezifischer Faktor für DM-Lineages eingestuft werden. Im Fall von Hbn konnte in diesen Experimenten wie erhofft ein Zusammenhang mit der zeitlichen Identität der gebildeten Lineage-Anteile ausgehend von INP herausgefunden werden. Für Drx stellte sich heraus, dass es sich um einen der frühesten exprimierten Faktoren der DM-Lineages handelt. Neben den DM-Lineages bilden auch die Typ-II-DL-Lineages INP. Die Expression von Drx und Hbn wird dort mit Ey überlappend gefunden, was mit der starken Expression beider Faktoren im Reporterbereich von *ermGal4* im Einklang steht (Daten nicht gezeigt).

Hbn konnte durch die vorgenommenen Experimente als mögliches Mitglied der Timing-Serie der DM-Lineages benannt werden, wobei im Vergleich zu Ey hier auch Neurone markiert werden und nur ein Teil der anterior nach posterior verteilten INP Hbn-Expression aufweist. Im Fall von Drx trifft dies jedoch nicht zu. Weitere spezifische Experimente mit dem Fokus auf diesen Faktor sollten hier helfen, dessen Expression und Funktion besser zu verstehen.

4.25 Detaillierte Analysen zur DM-Drx-Expression und Überexpression von Drx in der DM-Stammzellregion

In verschiedenen Untersuchungen sollte die sehr breite Expression von Drx in den proximalen Bereichen der sechs DM-Lineages weiter untersucht werden. Dabei diene jeweils *ermGal4* als Marker für die Stammzellbereiche im Allgemeinen, während ELAV als Neuronenmarker, pH3 (Bello et al., 2006) als Proliferationsmarker beziehungsweise Dpn erneut als INP-Marker eingesetzt wurden. Alle drei Ansätze gehen gemeinsam darauf ein, inwiefern Drx in der Stammzellregion der DM-Lineages exprimiert wird und ob die Expression einen transienten Charakter in INP besitzt. Diese Fragestellung konnte durch vorangegangene Experimente nicht hinreichend geklärt werden, da diese ausschließlich am Ende der larvalen Entwicklung stattfanden. Würde eine Drx-Expression in ELAV-negativen bzw. proliferierenden pH3-positiven Zellen oder sogar in Dpn-positiven INP im Verlauf der DM-Lineagebildung detektiert, so deutete dies auf einen eventuellen Stammzellcharakter hin. Anzeichen dafür wurden in den Vergleichsfärbungen zu Ey gefunden, in denen es auch zur minimalen Überlappung der Faktoren kam, was eine Expression von Drx in INP nicht ausschließt. Die ebenfalls durchgeführten Proliferationsanalysen im Vergleich zu pH3 zeigten im proximalen Anteil Zellen, die möglicherweise den INP zuzuordnen sind.

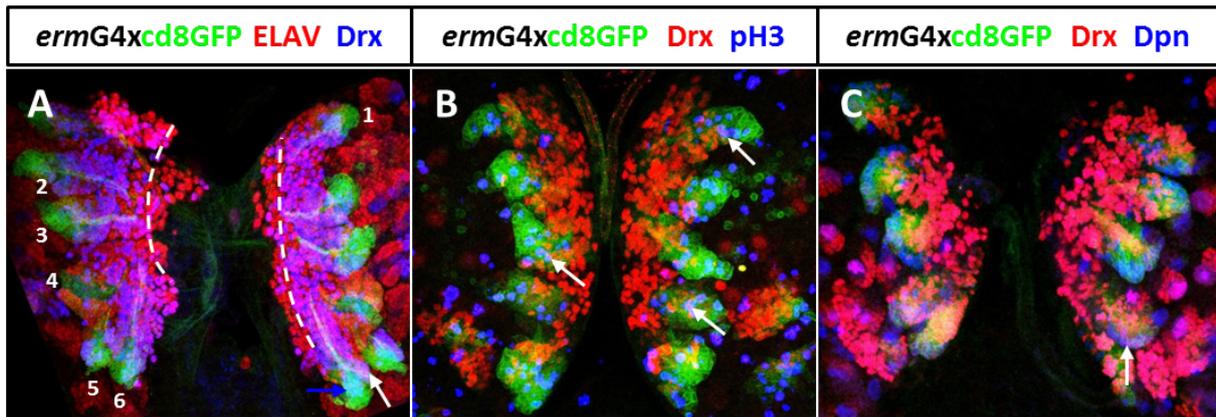


Abb.4.37: Detaillierte Analyse der Drx-Expression im Stammzellbereich der DM-Lineages. Konfokale Aufnahmen der DM-Lineages (40x) von frühen *ermG4xcd8GFP*-L3-Gehirnen mit (A) anti-Drx-, -ELAV-, (B) -Drx-, -pH3- und (C) -Drx-, -Dpn-Färbung: (A) Drx-Expression vom Ende der Reporteraktivität bis in distale Bereiche der Lineage; gestrichelte, weiße Linie zeigt Zone Drx-neg. Neurone. Weißer Pfeil zeigt Drx/ELAV-pos.-Neurone im Reporterbereich in DM 6 und blauer Pfeil ELAV-neg. GMC im proximalen Bereich der DM 6. (B) Weiße Pfeile zeigen Drx/ph3-pos. GMC im Reporterbereich. (C) Weißer Pfeil zeigt auf schwach Drx-exprimierende INP in frühen L3-Gehirnen.

In allen DM-Lineages wird eine Expression von Drx in Teilen des distalen Anteils der *ermGal4*-Reporterexpression beobachtet, auch hier besonders in DM 6. Darunter befinden sich dort sowohl ELAV-positive als auch ELAV-negative Zellen (Abb.4.37,A, blauer, weißer Pfeil). Weiter wird festgestellt, dass Drx-positive Neurone eine fast vollständige Abdeckung der Lineage erreichen. Diese endet meist erst am distalen Pol der Lineage, wo nur noch wenige Drx-negative Neurone auftreten (Abb.4.37,A, gestrichelte Linie).

Wird der Reporterbereich auf Drx/pH3-positive Zellen hin untersucht, können in L2- bzw. L3-Gehirnen positive Signale gefunden werden (Abb.4.37.B, weiße Pfeile). Im Anhang sind in Abb.7.8 weitere Proliferationsstudien diesbezüglich dargestellt. Wird die Expression von Dpn und Drx in *ermGal4*-positiven Zellen untersucht, wird in seltenen Fällen eine INP-ständige Kolokalisation in L2- und frühen L3-Gehirnen bestätigt. Die Expression von Drx wird in direkt zum Zentrum der Lineage weisenden Zellen angetroffen, die im Abstand von zwei Zellen zu den INP liegen und daher zu den GMC/GC und differenzierenden Neuronen zählen (Abb.4.37,C, weißer Pfeil). Somit kann für Drx eine transiente Expression während der Lineagebildung (L2-L3) in INP bestätigt werden. In den von ihnen gebildeten GMC wird die Expression von Drx ebenso beobachtet wie in den differenzierten GC und Neuronen.

Ein allgemeines Modell der DM-Expression von Drx am Ende der L3-Phase zeigt die Expression von Drx daher unmittelbar im Anschluss an die INP in den letzten undifferenzierten GMC und GC (Abb.4.38). In früheren Stadien kann die Expression transient in INP und den GMC beobachtet werden.

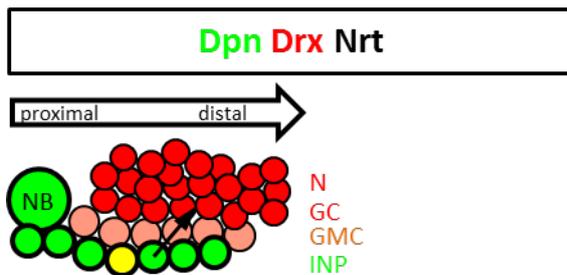


Abb.4.38: Expression von Drx in Progenitorzellen am Ende der larvalen Gehirnentwicklung. In späten L3-Gehirnen wird Drx-Expression in unmittelbarer Nähe zu den INP der DM-Lineage beobachtet; in späten L2- und frühen L3-Gehirnen auch transiente Expression in INP. Zwischen dem großen Pool an proximalen, Drx-pos. Neuronen stehen nur die GMC, die in späten Stadien nur noch selten Drx-Expression zeigen.

In einem weiteren Ansatz sollte eine ektopische Expression von Drx proximal in Richtung der NB durch spezifische Treiber für die gesamte Stammzellregion induziert werden. Hierbei sollten mögliche Veränderungen der Größe der Lineages untersucht werden. Dieser Ansatz beruht auf der Kenntnis, dass Drx in PK-Lineages NB- und GMC-ständig exprimiert wird und in mutanter Situation die PK-Lineages verkleinert sind (Neumüller et al., 2011). Faktoren, welche die differentielle Expression von *drx* zwischen den Typ-I- und Typ-II-Lineages bedingen könnten (z.B. Ase), werden somit umgangen und eine Situation, ähnlich der in PK-Lineages, wird geschaffen. Dies könnte sich auf die proliferative Leistung der Lineages auswirken. Im ersten Ansatz wurde *ermGal4* verwendet, wobei sich herausstellte, dass der Treiber nicht ausreichend stark ist, um eine nachweisbare Überexpression zu bewirken. Ein Versuch der Überexpression mit *dllGal4* stellte sich als embryonal letal heraus, sodass dieser Treiber nicht für die ektopische Expression von Drx im larvalen Stammzellbereich dienen konnte. Daher blieb als spezifischer Treiber für Stammzellen der DM-Lineages nur *dpnGal4* (Hasegawa et al., 2011). Eine Überexpression mit diesem Treiber gelang zuverlässig und in ausreichender Stärke.

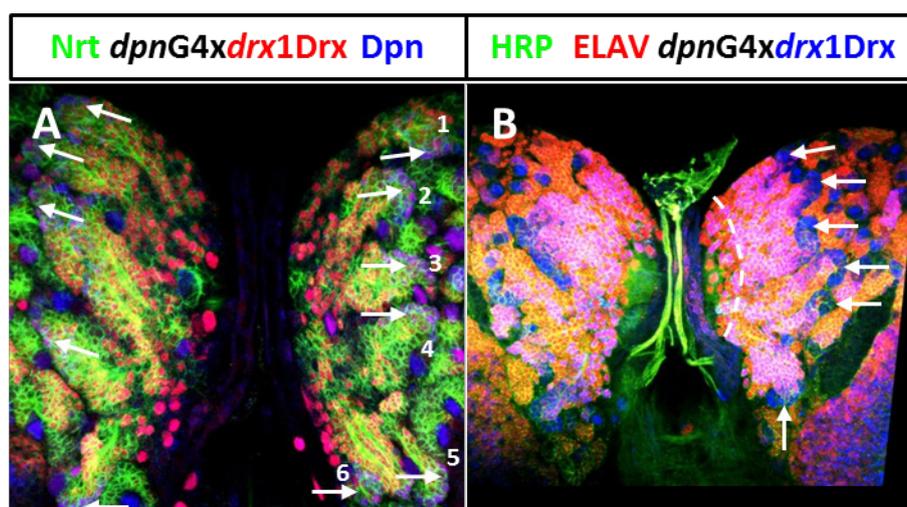


Abb.4.39: Überexpression von Drx im DM-Stammzellbereich und Effektanalyse. Konfokale Aufnahmen in dorsaler Ansicht der Typ-II-NB-DM-Lineages (40x) von *dpnG4xUASdrx1*-L3-Gehirnen mit (A) anti-Dpn-, -Drx-, -Nrt- und (B) -ELAV-, -Drx-, -HRP-Färbung: (A) Weiße Pfeile zeigen auf proximalen Stammzellbereich der DM-Lineages mit Dpn/Drx-Kolokalisation in NB/INP. (B) Weiße Pfeile zeigen Drx-Expression in NB/INP. Gestrichelte, weiße Linie zeigt Bereich, ab dem distale, Drx-neg. Neurone vorliegen.

Drx-Expression kann nun in den INP und sogar den NB der DM-Lineages beobachtet werden (Abb.4.39,A,B, weiße Pfeile). Es kommt allerdings nicht zu einer Veränderung der Lineage in Form und Größe. Auch die endogene Expression von Drx wird nicht beeinflusst (Abb.4.39,A,B). Die Lineages zeichnen sich durch eine *wt*-Population von Drx-positiven wie -negativen Neuronen aus und behalten ihren typischen Charakter bezüglich des Zeitpunktes ihrer Entstehung. Es verbleibt eine geringe Population ELAV-positiver/Drx-negativer Neuronen am distalen Ende der Lineage (Abb.4.39,B, gestichelte, weiße Linie). Somit bewirkt eine ektopische Expression von Drx in allen INP keine frühere Bildung von Drx-positiven Neuronen. Die Fehlexpression von Drx in wildtypisch Drx-negativen NB, unreifen und reifen INP zeigt sich ohne Auswirkung auf die proliferative Leistung der Lineage.

Die Expression von Drx konnte neben den Typ-II-Lineages auch in Typ-I-Lineages des CB mit verschiedenem Charakter gezeigt werden. Zum einen wird die Expression in ventralen und dorsalen Typ-I-Lineages beobachtet und zum anderen in den PK-Lineages. In einem weiteren Ansatz sollte diese Expression in Bezug auf die Stammzellen untersucht werden, um prinzipielle Unterschiede zwischen den NB-Typen und der vorgefundenen Expression von Drx aufzuzeigen.

4.26 Drx wird neben PK-NB in weiteren Typ-I-NB exprimiert

In der embryonalen Entwicklung konnte für Drx eine Expression in den Pilzkörper-Neuroblasten (PK-NB) gezeigt werden (Kunz et al., 2012). Ferner wurden im experimentellen Verlauf dieser Arbeit Drx-positive NB im procephalen Neuroektoderm des Embryos identifiziert, die teilweise auch mit Hbn-positiven NB kolokalisieren. Diese können im Anhang in Abb.7.7 betrachtet werden. In der larvalen Entwicklung konnte die Expression von Drx in PK-NB bestätigt werden. Darüber hinaus gab es Anhaltspunkte für die Expression in weiteren Typ-I-NB (eigene Beobachtungen). Ziel war es daher, Anzahl und Lage dieser NB zu klären und die Verteilung von Drx in den daraus resultierenden Lineages zu betrachten. Um diese zusätzliche Expression näher zu untersuchen, wurde mit *nabGal4* (Clements et al., 2003; Félix et al., 2007) ein Neuroblasten- und Lineage-spezifischer Marker eingesetzt.

NabGal4 in Kombination mit *UAScd8GFP* markiert im larvalen Gehirn jeweils den NB und proximalen Bereich aller Typ-I- und Typ-II-Lineages. Anti-Nrt als zusätzlicher Marker färbt vollständig die ab dem zweiten Larvalstadium gebildeten, sekundären Lineages. Somit werden alle Typ-I- und Typ-II-NB-Lineages unter besonderer Hervorhebung des

Stammzellbereichs dargestellt. Die Expression von Drx kann auf diese Weise allen Lineages dorsal und ventral des CB zugeordnet und bezüglich der Expression in den verschiedenen Zelltypen untersucht werden. Neben den Drx-positiven PK-NB (Abb.4.40,A, blaue Pfeile) können vier Drx-positive NB dorsal, nahe der DM 5-Lineage und benachbart zu den DL-Lineages, festgestellt werden (Abb.4.40,A, schwarze Pfeile). Am anterioren Pol des Gehirns, zur ventralen Seite übergehend, liegen ein fünfter und sechster NB mit nachweisbarer Drx-Expression (Abb.4.40,B, weiße Pfeile). Eine detaillierte Betrachtung der zugehörigen Typ-I-Lineages zeigt zusätzlich zur Drx-Expression im NB (Abb.4.40,A',B', weiße Pfeile) auch eine Expression in den zugehörigen GMC an (Abb.4.40,A',B', weiße Pfeilspitzen).

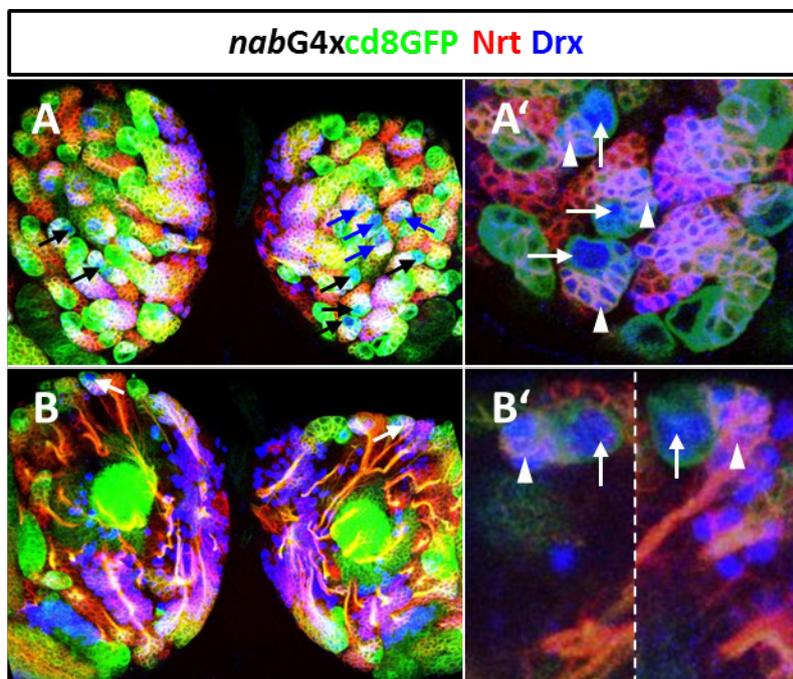


Abb.4.40: Analyse der NB-ständigen Expression von Drx in der larvalen Phase. Konfokale Aufnahme (40x) von *nabG4xcd8GFP*-L3-Gehirnen mit anti-Drx- und -Nrt-Färbung: (A) Im Fokus ist die dorsale Oberfläche des Gehirns. Blaue Pfeile zeigen die vier PK-NB. Schwarze Pfeile zeigen auf vier weitere Typ-I-Lineages mit Drx-pos. NB. (A') Weiße Pfeile zeigen den NB, weiße Dreiecke die GMC mit Drx-Expression. (B) Weiße Pfeile zeigen an der anterioren Spitze des Gehirns zwei weitere Typ-I-Lineages mit Drx-pos. NB. (B') Zwei konfokale Ebenen, gestrichelte, weiße Linie. Weiße Pfeile zeigen den NB, weiße Dreiecke die GMC mit Drx-Expression.

Drx wird in weiteren Typ-I-Lineages neben den PK-Lineages im NB und GMC exprimiert. Eine prinzipielle Fragestellung, die aus den bisher gesammelten Ergebnissen hervorgeht, besteht in der Aufklärung der differentiellen Expression von Drx in Ase-negativen Typ-II-NB und Ase-positiven Typ-I-NB. Dies kann mit *asense*-spezifischen Gal4-Treiberlinien zukünftig untersucht werden.

4.27 Untersuchung zur Drx/Hbn-DM-Expression im Vergleich zu R45F08Gal4

Drx und Hbn zeigen eine ausgedehnte Expression in den DM-Lineages, aus denen auch der adulte Zentralkomplex hervorgeht (Boyan und Reichert, 2011), der sich aus verschiedenen Neupilen zusammensetzt. Damit ergibt sich die Frage, ob bzw. inwieweit die beiden Faktoren am Aufbau dieser Struktur beteiligt sind. Larval gut untersuchbar ist das

Primordium eines Zentralkörper-Neuropils, des sog. Fächerförmigen Körpers. Dieser lässt sich durch eine spezifische Gal4-Treiberlinie, R45F08Gal4 (Riebli et al., 2013), markieren. Ein Vergleich der Expression von Drx und Hbn mit dem Reporter sollte daher Hinweise auf die Rolle der 57B-TF liefern.

Die Expression des Reporters beginnt im letzten Drittel der DM-Lineages, die Zellen zeigen dort eine gemeinsame, örtlich begrenzte Kommissurprojektion. Bei einer Vielzahl der markierten Zellen kann eine Expression von Drx festgestellt werden (Abb.4.41, weiße Pfeilspitzen). Hbn hingegen zeigt im gesamten Reporterbereich keine positiven Signale. Somit wird für das adulte Gehirn eine Expression von Drx im Bereich des Fächerförmigen Körpers erwartet und damit im Zentralkomplex, der bereits Phänotypen in Bezug auf Drx zeigte. So konnte in früheren Untersuchungen ein variabler Defekt in einem benachbarten Neuropil, dem Ellipsoidkörper, gefunden werden (Davis et al., 2003).

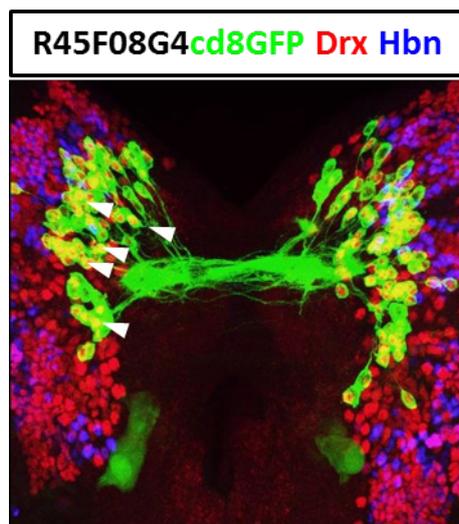


Abb.4.41: Analyse zur R45F08G4 ständigen Expression von Drx und Hbn. Konfokale Aufnahme in dorsaler Aufsicht (40x) mit Fokus auf die Expression des R45F08G4-Konstruktes visualisiert durch UAScd8GFP mit anti-Drx- und -Hbn-Färbungen: Weiße Pfeilspitzen zeigen ausschließlich Drx-pos., dorso-mediale Zellen des Reporters an.

Vorausgreifend wurden adulte Gehirne im Bereich des Zentralkomplexes auf die Expression von Drx untersucht. Dabei konnte eine breite Expression im Zentralkomplex festgestellt werden, die der larvalen Verteilung ähnelt. Hier konnte besonders im Bereich der Protocerebralbrücke, ebenfalls ein Neuropil des Zentralkomplexes, eine Expression von Drx bestätigt werden. Im Anhang kann die zugehörige Abb.7.16 betrachtet werden.

Nach Abschluss der Untersuchung der 57B-TF-Expression in DM- und DL-Lineages sollten die optischen Loben als nächstes untersucht werden.

4.28 Allgemeine Expressionsanalyse von Drx und Hbn in der larvalen optischen Lobe

In den zu Drx und Hbn durchgeführten Expressionsanalysen wurde neben der Zentralgehirn (CB)-ständigen Expression auch eine Expression in den optischen Loben (OL) erkannt. Um diese Expression einführend zu beschreiben, wurden beide Faktoren vor dem Hintergrund einer anti-Nrt-Färbung untersucht. Dabei wurde jeweils eine optische Lobe eines L3-Gehirns in optischen Sektionen dargestellt. Dies sollte einen Überblick über die regionale Expression in den OL-Neuropilen, Medulla, Lamina und Lobula Komplex, letzterer bestehend aus Lobula, Lobula Plate und Lobula Plug, schaffen. Darüber hinaus sollte in den optischen Loben früher L2-Gehirne der Expressionsbeginn der Faktoren bestimmt und auf eine Expression im äußeren Proliferationszentrum (OPC), dem Stammzellbereich der optischen Medulla, hin untersucht werden. Als zusätzlicher Schritt zur Visualisierung der Expression dienen für Drx und Hbn auch in der OL *wt*-MARCM-Klone.

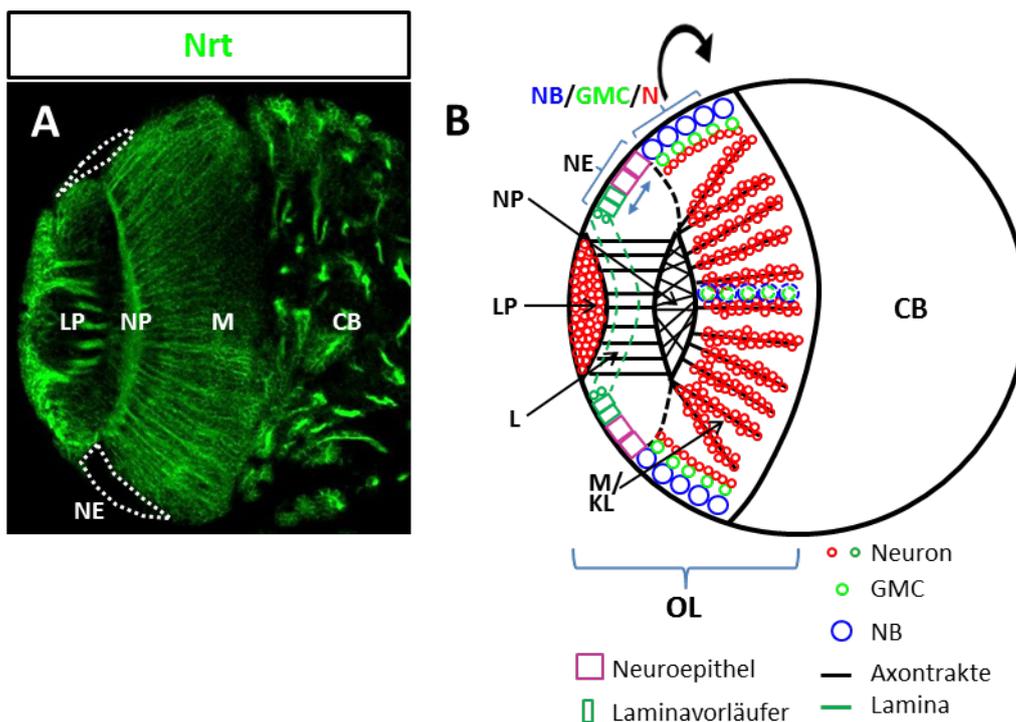


Abb.4.42: Aufbau der larvalen optischen Lobe. (A) Ventrale Ansicht der OL und des CB mit anti-Nrt-Färbung: Fokusebene entspricht der schematischen Darstellung, gestrichelte, weiße Linie zeigt Lage des Neuroepithels.

(B) Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der linken Hemisphäre eines L3-Gehirns in medialer Schnittebene. Ganz lateral ist der Lobula Plug eingezeichnet (LP), der von der Lamina (L) auf der ventralen Seite umgeben wird (gestrichelte, grüne Linie). Die Neurone der Lamina (grüne Kreise) werden aus dem Neuroepithel (NE) der OL gebildet (grüne Rechtecke). Dieses Neuroepithel bildet in zum CB liegender Richtung die NB der Medulla (M) (blaue Kreise). Diese NB bilden durch asymmetrische Zellteilung ins Innere der Medulla die GMC (grüne Kreise), welche ihrerseits durch symmetrische Teilung die Neurone (rote Kreise) der Medulla bilden. Die NB werden aus dem NE kreisrund (schwarzer Pfeil) abgegeben und im Zuge der weiteren Bildung weiter nach medial verlagert, sodass nach innen über die gesamte Oberfläche der Medulla sog. kolumnare Lineages (KL) gebildet werden. Die NB und GMC verteilen sich dabei über den Cortex der Medulla (gestrichelte, blaue und grüne Kreise), hier eine Reihe NB und nach innen abgegebene GMC über den Lineage-Neuronen angedeutet. Kleiner, blauer Doppelpfeil zeigt die symmetrische Teilung des NE in laterale L und mediale M. Im

Zentrum der OL liegt der Neuropil (**NP**), der durch die Lineage-Faszikel gebildet wird (schwarze Linien und schraffierter Bereich).

Zum besseren Verständnis der Expressionsdaten ist in Abb.4.42 der strukturelle Aufbau der optischen Lobe dargestellt. Diese Darstellung betrachtet auch das Neuroepithel aus dem die Lamina und Medulla hervorgehen. Weiter sind die Zelltypen von Lamina, Lobula Komplex und Medulla mit ihrem jeweiligen Aufenthaltsort eingezeichnet. Die entsprechenden Lineages weisen ihre zugehörigen Axonprojektionen zum Neuropil der OL auf. Dadurch sollte die neuronale Topologie schematisch wiedergegeben werden.

Eine Drx/Nrt-Färbung in optischen Schnitten von wenigen μm Abstand bzw. Stapeldicke (Abb.4.43,A-F) zeigt auf der dorsalen Seite den Verlauf der Expression in großen, dicht geclusterten Zellen an (Abb.4.43,A,B weiße Pfeile). Diese Zellcluster befinden sich in den **dorsalen Spitzen** der optischen **Medulla (DSM)**. In weiterer Tiefe verläuft die Expression von Drx an axonalen Projektionen entlang, die aus den lateralen Bereichen der optischen Loben, dem Lobula Plug (LP), zum Neuropil (NP) der Medulla verlaufen (Abb.4.43,C,D,E, weiße Pfeile). Die nicht markierte bzw. schwach gefärbte Lamina (L) zeigt hier keine Drx-Expression, aber direkt an der Lamina anliegend, kann in den säulenartigen Lineages der optischen Medulla in den distalen Lineage-Anteilen Expression in wenigen Zellkernen vorgefunden werden (Abb.4.43,F, weißer Pfeil).

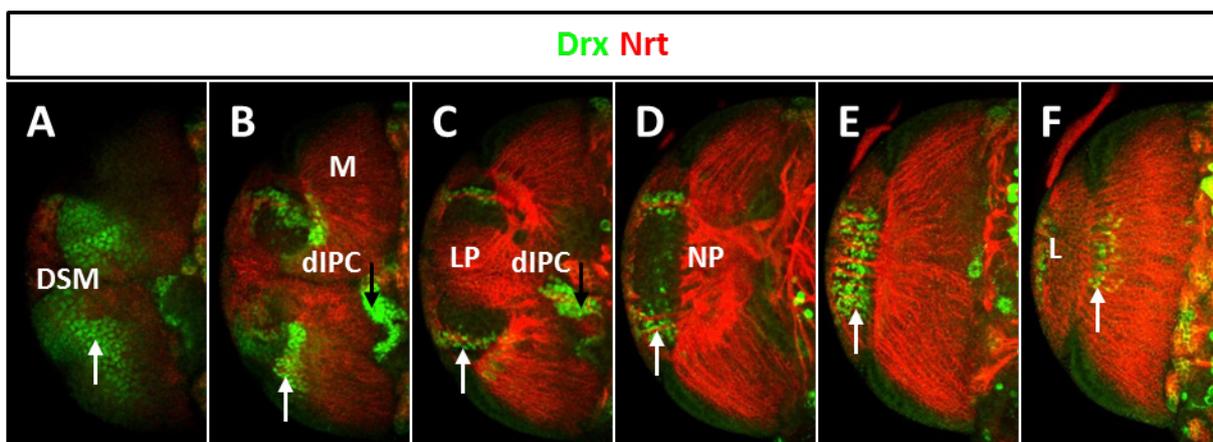


Abb.4.43: Darstellung der Drx-Expression in larvaler OL. Konfokale Aufnahme in dorsaler bis ventraler Durchsicht (40x) von *yw-L3*-Gehirnen mit anti-Drx- und -Nrt-Färbung; optische Schnitte einer Hemisphäre zeigen in Bildstapelmontagen von wenigen μm Dicke die Expression von Drx in der OL an: (A) Weißer Pfeil zeigt auf die dorsalen Spitzen der Medulla mit Drx-pos. Zellkernen. (B) Weißer Pfeil zeigt Drx-DSM-Expression am Übergang zu den kolumnaren Lineages; im dorsalen Ausläufer des IPC kann ebenfalls die Expression von Drx beobachtet werden (schwarzer Pfeil). (C) Weißer Pfeil zeigt Drx-pos. Zellen an Axonbahnen des Lobula Plug zum Neuropil, schwarzer Pfeil zeigt dIPC. (D) Weißer Pfeil deutet auf ventrale Ansicht der Drx-pos. Plug-Neurone. (E) Weißer Pfeil zeigt im ventralen Bereich des Lobula Plug Drx-pos. Zellkerne, die an den Axonbahnen liegen. (F) Weißer Pfeil zeigt in der Medulla wenige Drx-pos. Zellkerne. (dIPC, dorsaler Ausläufer des inneren Proliferationszentrums; DSM, dorsale Medullaspitzen; L, Lamina; LP, Lobula Plug; M, Medulla; NP, Neuropil).

Drx zeigt in der optischen Lobe somit Expression in der Medulla und dem Lobula Komplex. Neben der beobachteten Expression in der Medulla und im Lobula Plug wurde auf der dorsalen Oberfläche im Bereich des dorsalen Ausläufers des inneren proliferativen Zentrums (dIPC) ebenfalls die Expression von Drx festgestellt (Abb.4.43,B,C, schwarze Pfeile).

Die Expression von Hbn ist deutlich komplexer und erstreckt sich in der optischen Lobe über mehrere Zonen (Abb.4.44,A-F). So ist ein Zellkranz großer Zellkerne im Cortex der Medulla zu erkennen (Abb.4.44,A, weißer Pfeil) und ein größerer Kranz mit vielen Hbn-exprimierenden Zellen in tieferen Ebenen der optischen Medulla, den kolumnaren Lineages (Abb.4.44,B,C weiße Pfeile). Eine Expressionszone mit wenigen Hbn-positiven Zellen schließt sich in der Medulla direkt dem Neuropil an. Die Neurone liegen somit am distalen Ende der Lineages und ihrer Axonprojektionen, die im Neuropil enden, (Abb.4.44,D, weißer Pfeil). Eine weitere Expression von Hbn liegt im Lobula Plug vor. Die Zellkerne im zellulären Cortex sind ausschließlich Hbn-positiv (Abb.4.44,E,F grüner Pfeil). Ebenso wie Drx wird auch die Expression von Hbn im dorsalen Ausläufer des IPC vorgefunden (Abb.4.44,B,C, schwarze Pfeile).

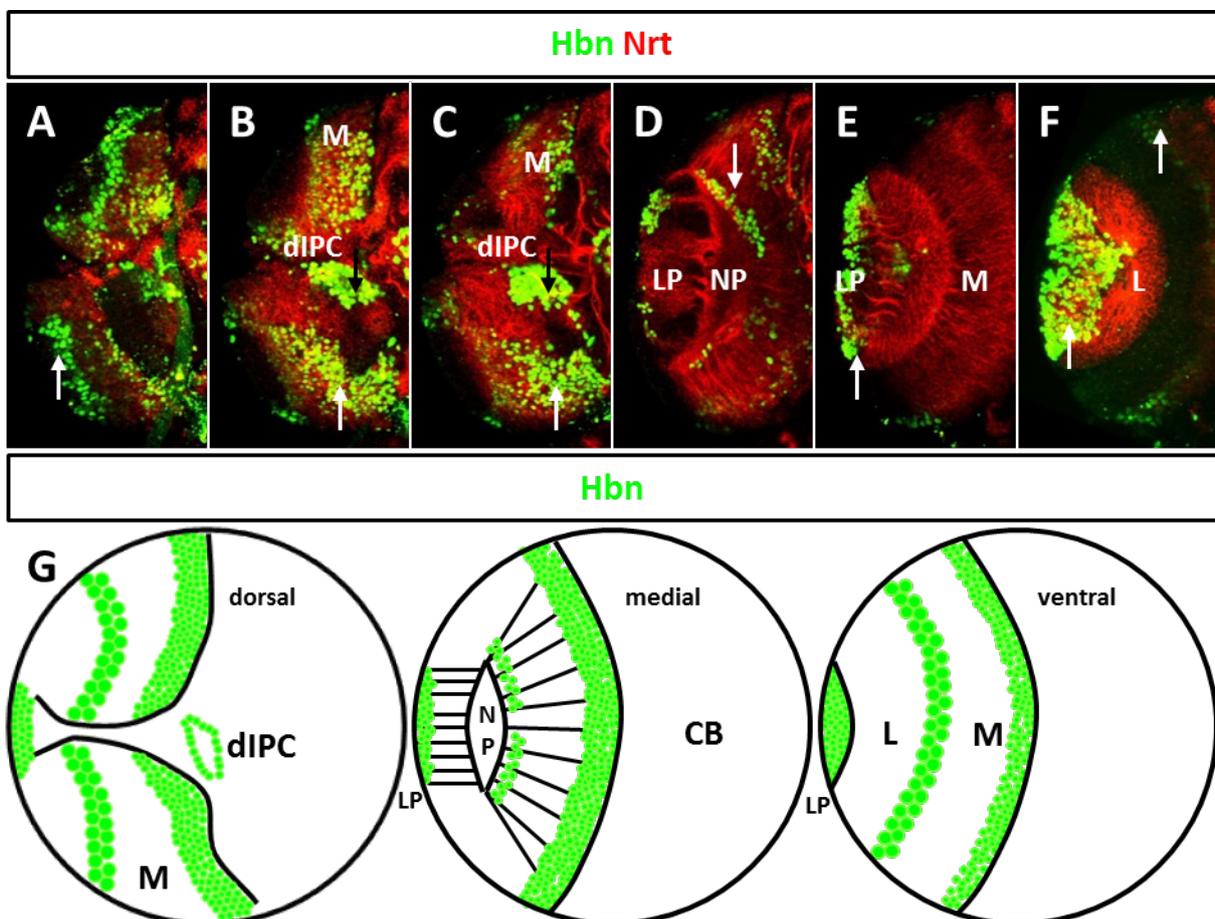


Abb.4.44: Darstellung der Hbn-Expression in larvaler OL. Konfokale Aufnahme in dorsaler bis ventraler Durchsicht (40x) von *yw*-L3-Gehirnen mit anti- Hbn- und -Nrt-Färbung; optische Schnitte einer Hemisphäre zeigen in Aufnahmen von wenigen μm Dicke die Expression von Hbn in der OL an: (A) Weißer Pfeil zeigt auf das dorsal und weiter zirkulär über der Medulla gelegene, schmale Band aus Hbn-pos. Zellkernen. (B,C) Weißer Pfeil zeigt in der Medulla eine Vielzahl an Hbn-pos. Zellen. Schwarzer Pfeil zeigt auf dorsalen Ausläufer des IPC mit Expression von Hbn. (D) Weißer Pfeil zeigt in tieferen optischen Schnitten in der Medulla am Neuropil Hbn-Expression. (E) Pfeil zeigt Hbn-pos. Zellen im Cortex des Lobula Plug. (F) Pfeil zeigt im ventralen Medullacortex die konzentrische Expression von Hbn. (G) Darstellung zeigt von links nach rechts die dorsale Oberfläche, einen medialen Schnitt sowie die ventrale Oberfläche der linken Hemisphäre eines L3-Gehirns. Auf der dorsalen Oberfläche kann lateral die Expression im LP beobachtet werden. In der Medulla erscheint lateral ein schmales Band großer Zellen und weiter medial eine große Ansammlung von kleineren Zellkernen. Im medialen Schnitt kann neben der medialen Population von Hbn-pos. Zellen eine weitere Population Hbn-pos. Zellen um den Neuropil ausgemacht werden. Auf der ventralen Oberfläche kann wieder das schmale Band großer Zellkerne sowie die große Zellpopulation am Rand zum CB erkannt werden. (CB, Zentralgehirn; dIPC, dorsaler Ausläufer des inneren Proliferationszentrums; L, Lamina; LP, Lobula Plug; M, Medulla; NP, Neuropil).

Aufgrund des komplexen Hbn-Musters ist die Verteilung der Expression schematisch dargestellt, wobei auch die ventralen Bereiche, die in den gescannten Ebenen nur schwach dargestellt sind, berücksichtigt wurden, um das Verständnis der Expression zu verbessern (Abb.4.44,G). Die auf der dorsalen Seite beobachteten Expressionsdomänen werden über die gesamte Medulla konzentrisch fortgeführt (Abb.4.44,G), im Gegensatz zu *Drx*, welches nur in den dorsalen Spitzen der Medulla zu beobachten ist. Somit können die ventral in der Medulla gelegenen, nur schwach erkennbaren, großen Zellkerne als konzentrische Fortführung der dorsal beobachteten Population angesehen werden (Abb.4.44,A,F, weiße Pfeile).

Im Gegensatz zu den übrigen NB-Lineages des larvalen Gehirns werden alle Medulla-NB mit Beginn des L2-Stadiums aus dem Neuroepithel, welches durch eine proneurale Welle erstellt wird, die der embryonalen Gehirnentwicklung ähnlich ist, gebildet (Egger et al., 2007). Die NB entstehen durch symmetrische Zellteilung aus Vorläuferzellen des NE, dieser Bereich stellt das OPC dar. Durch weitere asymmetrische Teilung bilden diese NB die optische Medulla. Lobula und Lobula Plug werden aus dem IPC gebildet, das im Inneren der OL liegt, jedoch bis an den Cortex heranreicht und angrenzend an das CB beobachtet werden kann (Hofbauer und Campos-Ortega, 1990). Diese Stammzellzonen sollten auf die Expression von *Drx* und *Hbn* untersucht werden. Insbesondere wurden wie im Fall der DM-Lineages Gehirne des L2-Stadiums im neu gebildeten Stammzellbereich der optischen Medulla betrachtet, da eine Hervorhebung des NE und der DSM in späten L3-Gehirnen durch anti-Nrt nicht ausreichend gelingt.

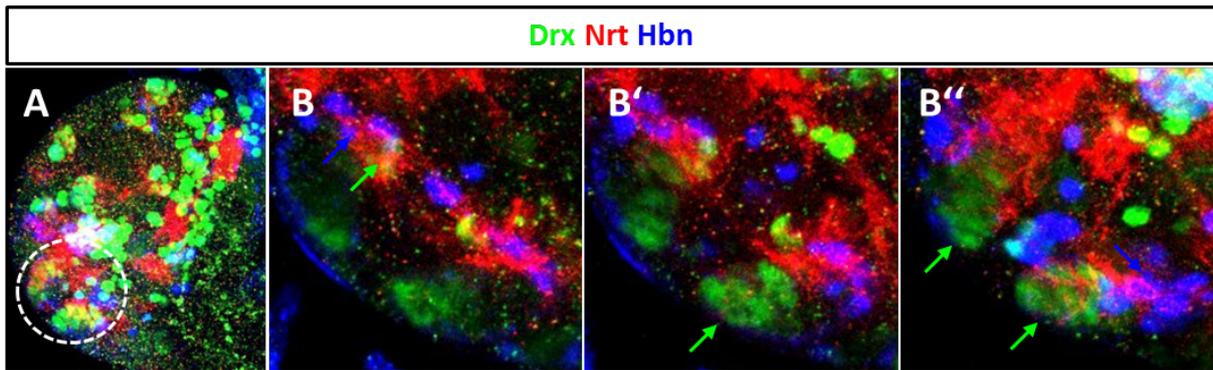


Abb.4.45: Drx und Hbn werden im OPC exprimiert. Konfokale Aufnahme (40x) von *yw*-L2 Gehirnen mit anti-Drx-, -Hbn- und -Nrt-Färbung: (A) Linke Hemisphäre eines L2-Gehirns. Gestrichelter, weißer Kreis zeigt das frühe OPC, das in B-B'' vergrößert dargestellt ist. (B-B'') Drei konfokale Ebenen zeigen das OPC von dorsal nach ventral. Grüne Pfeile zeigen die Drx-Expression in den verschiedenen optischen Ebenen, in den sich entwickelnden dorsalen Spitzen der Medulla, blaue Pfeile zeigen auf die Hbn-Expression in der angrenzenden Medulla.

Frühe L2-Gehirne, die gerade das Neuroektoderm der optischen Lobe ausgebildet haben, aus dem die Medulla hervorgeht, zeigten die Expression von sowohl Drx als auch Hbn im OPC an (Abb.4.45,A, gestrichelter, weißer Kreis; B, blaue und grüne Pfeile). Dabei wird die Expression von Drx in den jungen DSM detektiert. Im Fall von Hbn wird eine an die DSM angrenzende Expression angetroffen (Abb.4.45,B',B'', blaue und grüne Pfeile). Dies entspricht der späteren Verteilung im Bereich der Medulla.

Nach erster Einordnung der Expression sollten ebenfalls wie im Fall der DM-Lineages *wt*-MARCM-Klone dazu verwendet werden, um die Expression detaillierter zu betrachten und Anhaltspunkte über die Zelltyp-spezifische Expression und dadurch Funktion der Faktoren zu sammeln.

Mit Hilfe der GFP-markierten, wildtypischen Klone, die in der neurogenen Region der OL (OPC) im Verlauf der Gehirnentwicklung induziert wurden, konnte die Expression der 57B-Faktoren räumlich genauer analysiert werden. Klone der OL, in denen Drx-Expression zu finden ist, liegen auf der dorsalen Oberfläche der OL an den Spitzen der Medulla. Dort wird Drx nach der äußeren Stammzellzone zu beiden Seiten am Beginn der differenzierten Medulla in vielen Zellen festgestellt. Die Klone erstrecken sich über die Drx-Expression hinaus in die Medulla. Drx wird somit nur räumlich begrenzt in den DSM exprimiert (Daten nicht gezeigt).

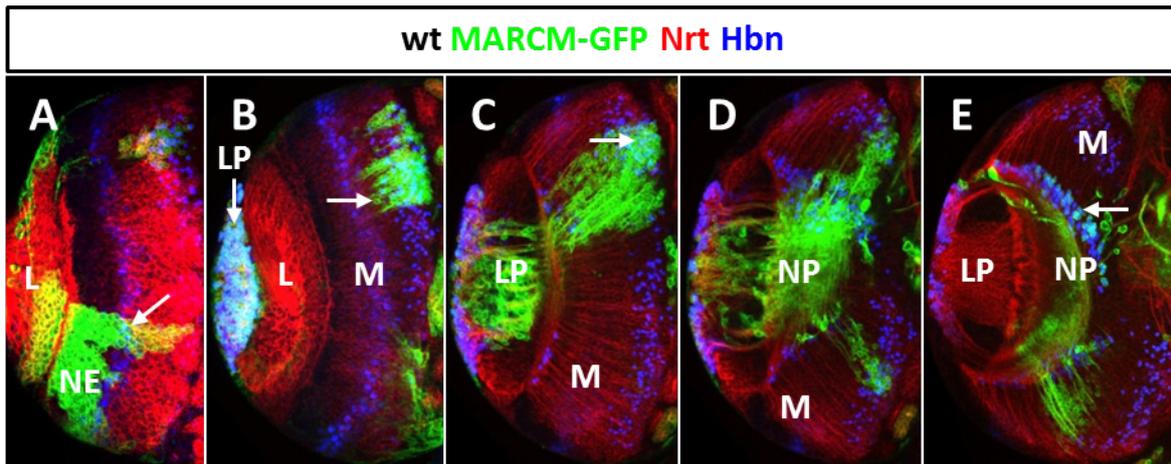


Abb.4.46: Darstellung der Hbn-Expression durch MARCM-Klone in der OL. Konfokale Aufnahme (40x) eines L3-Gehirns einer Kreuzung aus FRT(G13)xTUG(G13) mit resultierender Fluoreszenzmarkierung von Lineages der OL mit (A-E) anti-Hbn- und -Nrt-Färbung: (A) Neuroepithel-Klon. Weißer Pfeil zeigt auf das Hbn-pos. Band von Zellkernen im Cortex der Medulla. (B) Vertikaler, weißer Pfeil zeigt auf Lobula Plug-Klon, horizontaler, weißer Pfeil zeigt auf kolumnaren Klon mit Hbn-pos. Zellen am Rand der Medulla zum CB. (C) Klon markiert kolumnare-Lineages der Medulla und zeigt Axonprojektionen zum Neuropil. (D) Projektion der Medulla- und Plug-Neurone zum Neuropil der OL. (E) Weißer Pfeil zeigt klonale Markierung der Neuropil-nahen, Hbn-pos. Neurone. (L, Lamina; LP, Lobula Plug; M, Medulla; NE, Neuroepithel; NP, Neuropil).

Wird Hbn in einem ventralen NE-Klon betrachtet, der die Medulla nach zentral und die Lamina nach lateral visualisiert, so wird mittig im Medulla-Anteil des Klons ein dünner Streifen Hbn-positiver Zellen im Cortex der Medulla beobachtet (Abb.4.46,A, weißer Pfeil). Auf Grund der Lage können diese Zellen eventuell den Stammzellen zugeordnet werden. Abb.4.46,B zeigt die klonale Markierung des Lobula Plugs und den Beginn kolumnarer Lineages am medialen Rand der Medulla (weiße Pfeile). Beide Klone zeigen Zellen mit Hbn-Expression an, die der Lage nach neuronaler Natur sind. Ein weiter nach dorsal versetzter optischer Schnitt ist in Abb.4.46,C dargestellt. Hier können die kolumnaren Medulla-Lineages mit Hbn-positiven Zellen auf der gesamten Distanz vom medialen Beginn an zusammen mit dem Axontrakt beobachtet werden (weißer Pfeil). Abb.4.46,D zeigt die Projektionen der Hbn-positiven, kolumnaren Medulla-Lineages und der Lineages des Lobula Plug hin zum Neuropil. In einem medialen optischen Schnitt der OL finden sich am Neuropil Hbn-positiven Zellen mit klonaler Markierung (Abb.4.46,E, weißer Pfeil).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass aus dem NE alle in der Medulla befindlichen, Hbn-positiven Zellen gebildet werden, da sie gemeinsam in induzierten Klonen vorliegen. Daraus kann gefolgert werden, dass Hbn eventuell auch in Medulla-NB eine Expression erfährt. Die kortikal im NE beobachteten Zellen liegen im Neuroblastenbereich der OL, wohingegen die Expression in Medulla-Lineages den Neuronen zuzuordnen wäre. Im nächsten Schritt sollte

die Kolokalisation der Faktoren im Bereich der OL durch geeignete Marker untersucht werden.

4.29 Drx und Hbn zeigen Kolokalisation in der Medulla und dem Lobula Komplex, jedoch keine Expression in der Lamina der OL

Untersuchungen der 57B-TF zeigten eingangs eine regionale Koexpression von Drx und Hbn in der OL (Abb.4.22), die im Folgenden genau bestimmt werden sollte. Um die Expression der Faktoren in den verschiedenen Neuropilen der OL optimal vergleichen zu können, wurde mit *dr/Gal4* (Moreau-Fauvarque et al., 1998) in Kombination mit UAScd8GFP ein breiter Marker der Medulla gewählt und Drx sowie Hbn angefärbt. Dadurch erfolgte im ersten Ansatz eine strukturelle Abgrenzung der Expression vom Lobula Komplex, der nicht durch *dr/Gal4* markiert wird. Ferner sollte die Lamina, der dritte Neuropil der OL, genauer auf die Expression von Drx und Hbn untersucht werden. Hierfür wurden beide Faktoren im Vergleich zu dem Marker Dac, der spezifisch in allen Lamina-Neuronen exprimiert wird, angefärbt (Huang und Kunes, 1996; Mardon et al., 1994; Piñeiro et al., 2014).

Dr/Gal4 färbt die optische Medulla an. Das Neuroepithel wird gut am Rand zum Lobula Plug sichtbar, während der Lobula Komplex nicht gefärbt wird (Abb.4.47). Am Außenrand der Medulla kann vom OPC aus der Hbn-positive Streifen betrachtet werden, der in die gemeinsame Expression mit Drx in die DSM übergeht und von dort bis zum Lobula Plug verfolgt werden kann, wo die Expression von Drx und Hbn immer noch Überlappung zeigt (Abb.4.47,A, weißer Pfeil, Abb.4.49,A). Zwischen den angrenzenden, dorsalen Spitzen der Medulla liegt das IPC, das hier deutlich die Kolokalisation von Drx und Hbn anzeigt. Dadurch ist die gemeinsame Expression in den Stammzellarealen OPC und IPC belegt (Abb.4.47,A,B, **dIPC**, gestrichelter, weißer Kreis). Im dorsalen Ausläufer des IPC wird die Expression von Hbn kreisrund um den Drx-positiven Anteil herum vorgefunden (Abb.4.47,A, **dIPC**, gestrichelter, weißer Kreis). In tieferen Ebenen liegen alle 57B-markierten Zellen mit Kolokalisation vor (Abb.4.47,B, **dIPC**, gestrichelter, weißer Kreis). Versetzt man den optischen Schnitt medial in den Lobula Plug und die Medulla, so kann ein Übergang von Hbn- über Drx/Hbn- zu allein Drx-positiven Zellen betrachtet werden, die sich in einem Teil des nicht markierten Lobula Komplexes, genauer dem Lobula Plug, aufhalten (Abb.4.47,B, **LP**, blauer, lila und roter Pfeil). Um auch die Lamina als Gewebe mit Drx/Hbn-positiven Zellen im Vergleich zum unmittelbar anliegenden Lobula Plug ausschließen oder bestätigen zu können, wurde eine Drx- und Hbn-Gegenfärbung zu Dac angefertigt.

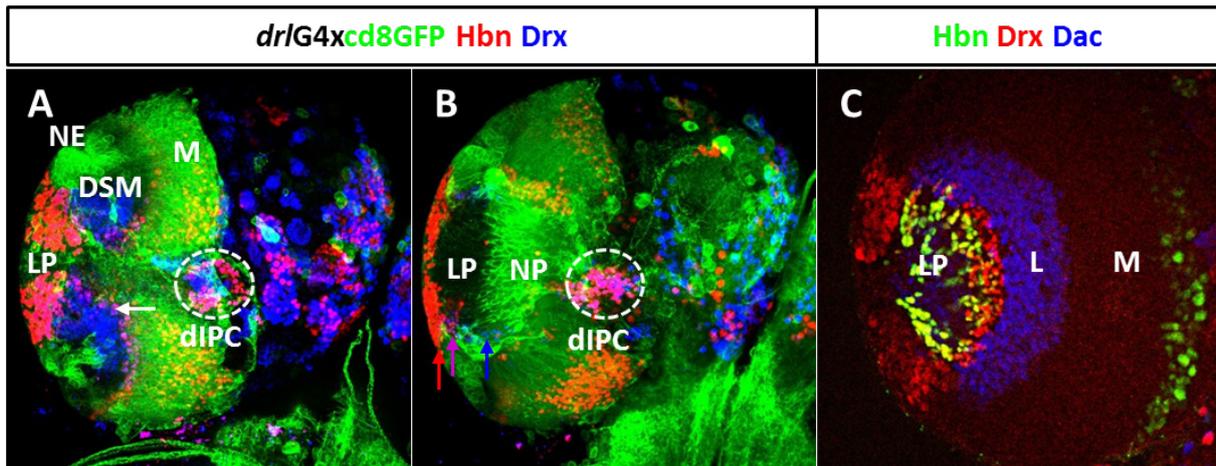


Abb.4.47: Drx- und Hbn-Expression in den verschiedenen Neuropilen der OL. Konfokale Aufnahme in (A) dorsaler und (B) medialer Ansicht bzw. (C) ventraler Aufsicht (40x) von (A,B) *dr/G4xcd8GFP*, (C) *yw-L3*-Gehirnen mit (A,B,C) anti-Drx- und -Hbn- sowie (C) -Dac-Färbung: (A) Weißer Pfeil zeigt Drx/Hbn-Kolokalisation in dorsalen Spitzen der Medulla. Gestrichelter, weißer Kreis umrandet den dIPC. (B) Im Lobula Komplex liegt ebenfalls in IPC und Lobula Plug Drx/Hbn Kolokalisation vor. Roter, lila und blauer Pfeil zeigen den Übergang der Expression. (C) Dac als Lamina-Marker bestätigt, weder Drx noch Hbn werden in der Lamina exprimiert. (dIPC, dorsaler Ausläufer des inneren Proliferationszentrums; DSM, dorsale Spitzen der Medulla; LP, Lobula Plug; M, Medulla, NE, Neuroepithel, NP, Neuropil).

Die Färbung der Dac-positiven Lamina zeigt weder Überlappung mit der Färbung gegen Drx noch mit der gegen Hbn (Abb.4.47,C). Somit ist bewiesen, dass keiner der Faktoren in der Lamina exprimiert wird.

Es lässt sich zusammenfassen, dass Drx und Hbn in NB der dorsalen Spitzen der Medulla, des ausschließlichen Expressionsgebietes von Drx in der optischen Medulla, eine gemeinsame Expression aufweisen. Ein zweites Gebiet mit Kolokalisation der 57B-TF wird im IPC lokalisiert, dem Stammzellgebiet des Lobula Komplexes. Konzentrisch um die Peripherie der Hbn-positiven Plug-Neurone befindet sich eine Domäne gemeinsamer Expression von Drx und Hbn in Zellen des Lobula Plug. Diese Verteilung spiegelt die im IPC vorgefundene Expressionsverteilung wider. Die Lamina, der dritte Neuropil der OL, konnte durch den Vergleich mit Dac ohne Expression der 57B-TF beschrieben werden. Die Expression und besonders die Verteilung von Drx/Hbn-positiven Neuronen im Lobula Plug sollte nachfolgend unter Verwendung weiterer Marker analysiert werden.

4.30 Vergleich der Drx/Hbn-Expression im Lobula Plug untereinander und mit weiteren Markern

Der Lobula Plug stellt ein in der Literatur wenig beschriebenes Areal der OL dar. Bisher konnte in dieser Arbeit die spezifische Expression von Hbn in allen Neuronen der Struktur gezeigt werden. Die Expression von Drx wurde ebenfalls in der Lobula an den axonalen

Projektionen der Hbn-positiven Plug-Neurone zum Neuropil der OL gezeigt. Die Kolokalisation in der Lobula sollte jetzt detailliert betrachtet und beschrieben werden. Dazu wurden Gehirne aus einer Kreuzung von *dllGal4xUAScd8GFP* mit den Antikörpern gegen Drx und Hbn gefärbt. *DllGal4xUAScd8GFP* markiert die Neurone des Lobula Plugs und ihre axonalen Projektionen zum Neuropil und ist daher ein geeigneter Reporter, um die Kolokalisation in diesem Bereich zu untersuchen. Ferner sollte im Lobula Plug auch die endogene Dll-Expression durch Antikörperfärbungen im Vergleich mit Drx und Hbn untersucht werden.

Betrachtet man im Lobula Plug die Expression der 57B-TF in Neuronen, die durch das *dllGal4*-Konstrukt markiert werden, so fällt der Übergang von *dllGal4*/Hbn-positiven Neuronen in Drx-positive Neurone auf, die die Axonprojektionen des Lobula Plugs zum Neuropil umgeben. Dabei wird immer eine Region geringer Zellzahl mit Drx/Hbn-positiver Kernfärbung zwischen den Anteilen jeweils alleiniger Expression beobachtet (Abb.4.48,A-C, blauer, lila und roter Pfeil; Abb.4.49,B).

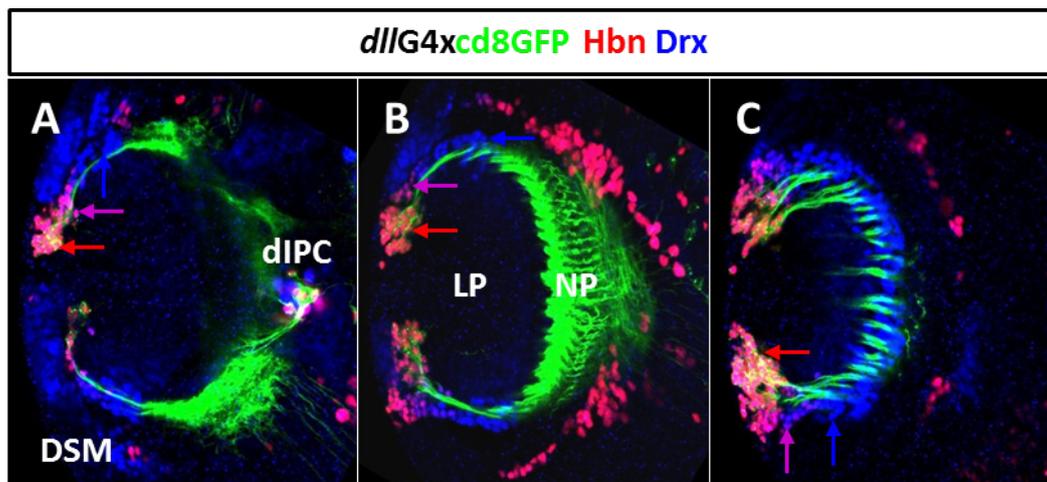


Abb.4.48: Vergleich der *dllGal4*/Drx/Hbn-Expression im Lobula Plug. Konfokale Aufnahme eines *dllGal4xUAScd8GFP*-L3-Gehirns (40x) mit Fokus auf den Lobula Plug und Neuropil mit anti-Drx- und -Hbn-Färbung: (A,B) *DllGal4* färbt spezifisch Hbn-pos. Neurone des Lobula Plugs und deren Axonprojektionen zum Neuropil, Drx-pos. Zellen erscheinen teils mit Hbn überlappend, jedoch weitestgehend allein exprimiert in Zellen, die die einzelnen Axonbündel umgeben. (C) Drx-Expression findet um jedes der Axonbündel statt und umgrenzt ebenfalls die Eintrittszone der Faszikel in den Neuropil. Roter, lila und blauer Pfeil zeigen jeweils den Übergang der Expression. (dIPC, dorsaler Ausläufer des IPC; DSM, dorsale Spitzen der Medulla; LP, Lobula Plug; NP, Neuropil).

Abbildung 4.49 fasst schematisch die vorgefundene Kolokalisation von Drx und Hbn in den dorsalen Spitzen der Medulla, dem dIPC und dem Lobula Plug zusammen.

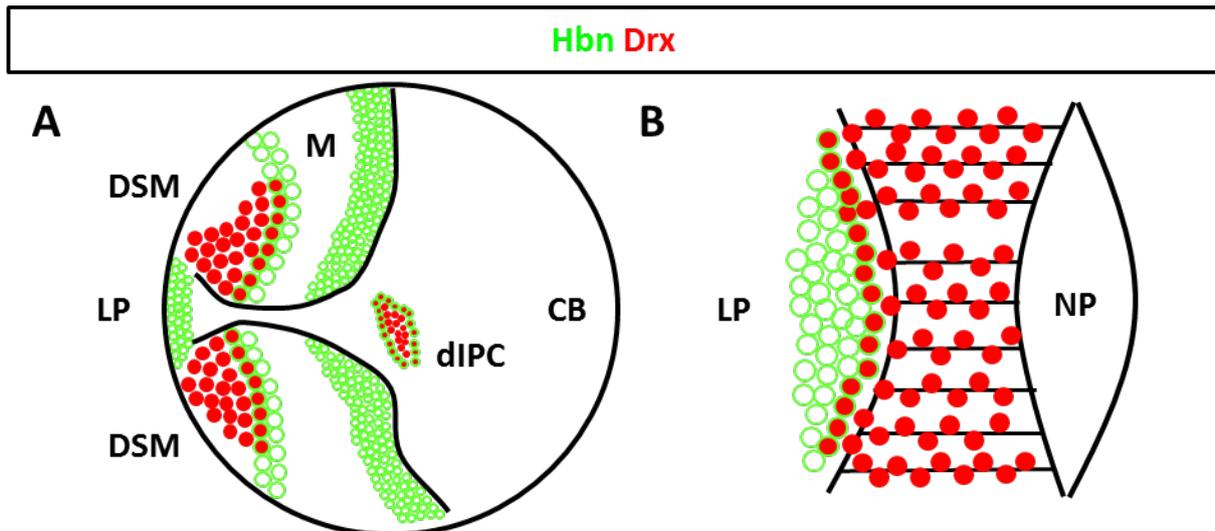


Abb.4.49: Schematische Darstellung der differentiellen Expression von Drx und Hbn in der OL. (A) Dorsale Aufsicht auf linke Hemisphäre eines L3-Gehirns. (B) Die Darstellung zeigt ausschließlich den Lobula Plug mit der starken Hbn-Expression am Rand des Lobula Plugs. Besonders am Beginn der axonalen Projektionen der Plug-Neurone kann die Kolokalisation von Drx und Hbn beobachtet werden. Die Expression von Drx liegt weiterhin in Zellkernen, die die Axonprojektionen des Plugs zum Neuropil der OL umgeben. (CB, Zentralgehirn; dIPC, dorsaler Ausläufer des inneren Proliferationszentrums; DSM, dorsale Spitzen der Medulla; LP, Lobula Plug; M, Medulla; NP, Neuropil).

Auch Dll und Toy zeigen eine Expression im Lobula Komplex und wurden daher mit der Expression der 57B-TF im Lobula Plug verglichen. Zusätzlich wurde Dll vergleichend in der Umgebung der Lobula und des IPC sowie in den dorsalen Spitzen der Medulla untersucht. Dll wurde bereits in einen regulatorischen Zusammenhang in den DSM beobachtet, der ebenfalls zu einem spezifischen Timing-System dieser Region beiträgt (Bertet et al., 2014).

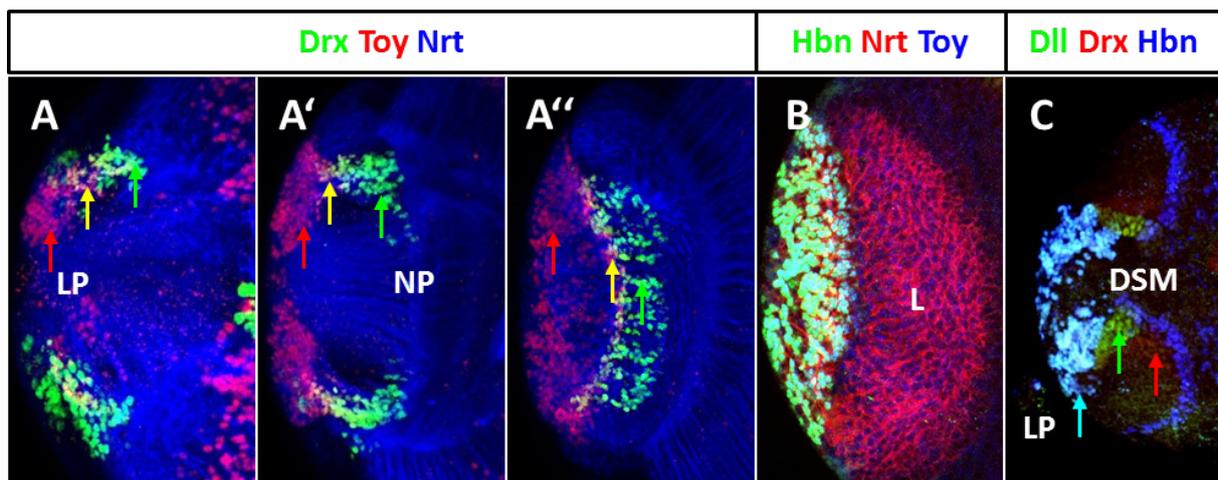


Abb.4.50: Vergleich der Expression von Toy und Dll mit Drx/Hbn im Lobula Plug. Konfokale Aufnahme von *yw*-L3-Gehirnen (40x) mit (A-A'') anti-Drx-, -Toy- und -Nrt-, (B) -Hbn-, -Nrt- und -Toy-, (C) -Dll-, -Drx- und -Hbn-Färbung: (A-A'') Toy-Expression, roter Pfeil, im Lobula Plug zeigt Übergang von Toy-pos. Neuronen in Drx-pos. Neurone, grüner Pfeil. Gelber Pfeil zeigt jeweils den Übergang bzw. die Koexpression von Toy, in Drx. (B) Neurone des Lobula Plug sind Hbn- und Toy-pos. (C) Türkisfarbener Pfeil zeigt Dll/Hbn-Kolokalisation des Lobula Plugs; Differentielles Muster der Faktoren in NB der dorsalen Spitzen der Medulla. Grüner Pfeil zeigt Dll-Expression in NB angrenzend an Drx-pos. NB der DSM, die durch den roten Pfeil markiert sind. (DSM, dorsale Spitzen der Medulla; L, Lamina; LP, Lobula Plug; NP, Neuropil).

Vergleicht man die Expression von Drx und Hbn im Lobula Plug mit der Expression von Toy, so stellt man den gleichen Übergang von Toy-positiven Neuronen des Plugs in Drx-positive Zellen fest, wie in Abb. 4.48 für Hbn zu erkennen ist (Abb.4.50,A,-A“, gelbe, grüne und rote Pfeile). Die Expression von Hbn und Toy im Lobula Plug ist tatsächlich in der kompletten Neuronenpopulation deckungsgleich (Abb.4.50,B).

Im Fall von Dll kann vorrangig eine starke Kolo-kalisation mit Hbn beobachtet werden, die sich auf den Großteil der Hbn-positiven Neurone bezieht. Lediglich am Rand des Plugs erscheint die Kolo-kalisation vermindert, da Dll dort schwächer exprimiert wird (Abb.4.50,C, türkisfarbener Pfeil). Wird aufgrund der Beteiligung von Dll an einer Timing-Serie der DSM (Bertet et al., 2014) die Expression von Drx und Hbn in den DSM verglichen, so fällt die strikte räumliche Trennung der Faktoren in drei differenzielle, aneinandergrenzende Zonen auf (Abb.4.50,C, grüner, roter Pfeil).

Auch im Bereich der Lobula wurden Proliferationsmarker eingesetzt. In tieferen Ebenen des Plugs, im Bereich des inneren Anteils des IPC, konnte die Expression von Drx in pH3-positiven GMC direkt benachbart zu den Dpn-positiven Stammzellen des IPC beobachtet werden. Dort treten auch Dll-positiv e Zellen benachbart zu Drx-positiv e Zellen auf. Somit kann der innere Anteil des IPC als Bildungsort der Drx-positiv e Plug-Neurone entlang der Axonbahnen beschrieben werden, während die Hbn- und Dll-positiv e, cortikalen Zellen wahrscheinlich aus dem dIPC hervorgehen, wo ebenfalls Kolo-kalisation beider Faktoren gefunden wurde. Durch den Proliferationsmarker PCNA-GFP konnte darüber hinaus die Expression von Drx/Hbn in Stammzellen des dIPC gezeigt werden. Dort konnte nach eingehender Analyse eine breite Expression von Drx entlang des gesamten Systems gefunden werden, die lediglich am anterioren Ende die typische, ringförmige Expressionsdomäne von Drx und Hbn zeigt. Die Ergebnisse dieser Stammzellareale können im Anhang, Abb.7.11, .12, .13 betrachtet werden.

Dll, Hbn und Toy werden gemeinsam im LP exprimiert und zeigen einen Übergang in Drx-positiv e Neurone. Im IPC, dem Stammzellzentrum dieses Areals, findet sich diese Expressionsverteilung wieder. In den dorsalen Spitzen der Medulla liegt ein Areal aus Drx/Hbn-positiv e NB benachbart zu Dll-positiv e NB vor. Im Anschluss an die Untersuchungen des Lobula Plugs sollten die Zelltypen der Medulla mit Drx- und Hbn-Expression aufgeklärt werden.

4.31 Zelltypanalyse Drx- und Hbn-exprimierender Zellen der optischen Medulla

In der larvalen Entwicklung wird die optische Medulla von neugebildeten Typ-I-NB aufgebaut, die in der neurogenen Region der entstehenden optischen Lobe aus dem Neuroepithel erzeugt werden. Diese NB generieren durch asymmetrische Zellteilung die GMC, aus denen wiederum die Neurone der Medulla hervorgehen. Um das große Aufkommen von Drx- und Hbn-positiven Zellen in den optischen Loben den verschiedenen, vorliegenden Zelltypen zuordnen zu können, wurden Färbungen mit spezifischen NB-Markern der OL wie Ase (Brand et al., 1993; González et al., 1989; Jarman et al., 1993) und Dpn durchgeführt (Wallace et al., 2000). Die GMC wurden durch anti-Pros-Färbung sichtbar gemacht. Die Neuronen können jedoch in der optischen Lobe durch ihre Lage bestimmt werden, daher ist in diesem Fall keine Differentialfärbung gegenüber ELAV nötig. Eine detaillierte Bestimmung der Hbn-positiven Neurone wurde in einem separaten Ansatz angegangen (siehe 4.33, 4.34). Auch in der OL wurden die Gliazellen auf Expression der 57B-TF untersucht und dazu Färbungen mit anti-Repo durchgeführt.

In ventraler Ansicht kann der Kranz aus großen Zellkernen eindeutig der Expression von Ase- und Hbn-positiven Neuroblasten zugeordnet werden (Abb.4.51,A, weißer Pfeil). Anti-Dpn-Färbung zeigt als Bestätigung die dorsale Seite mit einer ringförmigen Bande aus Dpn- und Hbn-positiven Neuroblasten im Cortex der Medulla (Abb.4.51,B, weiße Pfeile). In der OL ist somit die Hbn-Expression in einem NB-Kranz nachgewiesen. Die Expression von Drx in Zellen der DSM kann ebenfalls mittels anti-Dpn-Färbung den NB zugeordnet werden (Abb.4.51,C, weiße Pfeile). In einem weiteren Schritt wurde mit anti-Pros-Färbung die Expression beider Faktoren in GMC bestätigt, für Hbn im gesamten zirkulären Areal der Medulla (Abb.4.51,D, roter Pfeil), für Drx nur in einem anteiligen Gebiet der Medulla, dem DSM (Abb.4.51,D, weißer Pfeil).

Die Untersuchung auf Expression in Gliazellen fällt für beide Faktoren negativ aus (Abb.4.51,E). Die Expression von Drx und Hbn (Abb.4.51,E, blauer, roter Pfeil) liegt jedoch in direkter Nachbarschaft zu Gliazellen nahe des Neuropils und im Lobula Plug (Abb.4.51,E, weißer Pfeil).

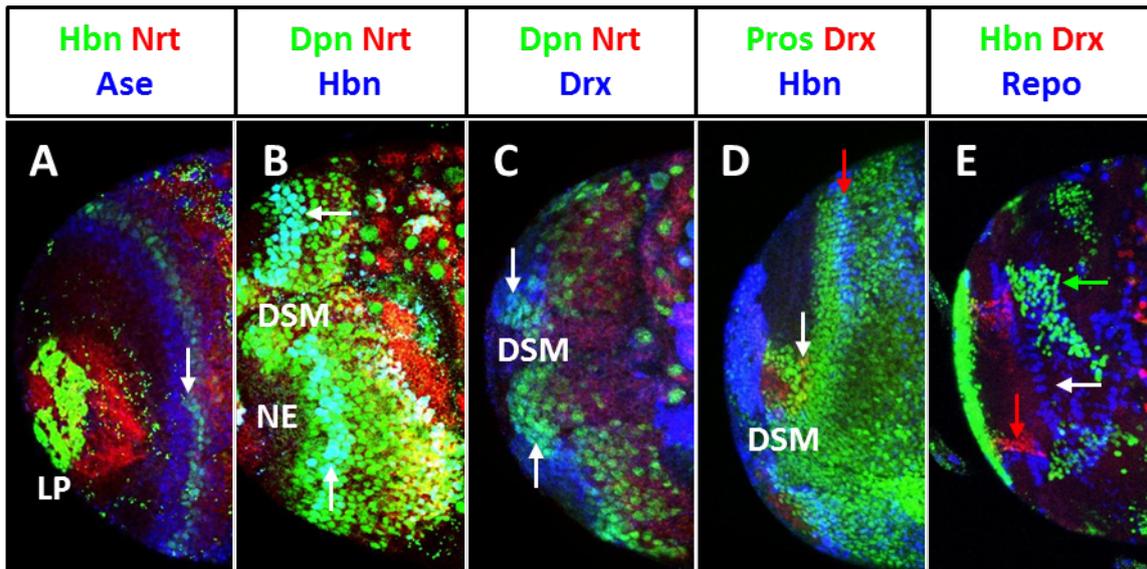


Abb.4.51: Zelltypanalyse Drx/Hbn-exprimierender Zellen in der OL. Konfokale Aufnahme in dorsaler und ventraler Ansicht (40x) von *yw-L3*-Gehirnen mit (A) anti-Ase-, -Hbn-, -Nrt-, (B) -Dpn-, -Hbn-, -Nrt-, (C) -Dpn-, -Drx-, -Nrt (D) -Drx-, -Hbn- und -Pros- sowie (E) -Drx-, -Hbn-, -Repo-Färbung: (A,B) Ventrale bzw. dorsale Aufsicht, weiße Pfeile zeigen die Hbn-Expression in Ase- bzw. Dpn-pos. Medulla-NB. (C) Weiße Pfeile zeigen Drx in NB der dorsalen Spitzen der Medulla. (D) Dorsale Aufsicht auf OL, roter Pfeil zeigt Hbn-Expression in einem schmalen Streifen GMC, weißer Pfeil zeigt Drx-pos. GMC nur in den dorsalen Spitzen der Medulla an. (E) Drx und Hbn werden nicht in Gliazellen der OL exprimiert. Weißer Pfeil zeigt die Gliazellen am Neuropil der OL, roter Pfeil Drx-pos. Neurone in Nachbarschaft zu Gliazellen des Lobula Plugs, grüner Pfeil zeigt die Neuropilnahen, Hbn-pos. Neurone benachbart zu den dortigen Gliazellen. (DSM, dorsale Spitzen der Medulla; LP, Lobula Plug; NE, Neuroepithel).

Auch zur stammzellspezifischen Analyse der Medulla wurden mit anti-pH3 und PCNA-GFP Proliferations-Marker verwendet, um die Drx/Hbn-Expression selbigen zu untersuchen. Dadurch konnten im Cortex der optischen Medulla die Drx- und Hbn-positiven Neuroblasten mit Markierung des PCNA-GFP- und Phospho-Histon-Markers beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können im Anhang, Abb.7.14 und 7.15, betrachtet werden. Alle übrigen Hbn-positiven Zellen sind, wie oben beschrieben, nach Ausschluss und anhand der Lage den Neuronen der Medulla- bzw. des Lobula Plugs zuzuordnen.

Die Untersuchungen der OL zeigen ein vergleichbares Bild mit den anderen vorgenommenen Zelltypanalysen, denn sowohl Drx als auch Hbn werden in NB und GMC sowie Neuronen detektiert. Zudem existiert keine Gliazell-Expression der Faktoren im Bereich der OL. Auch in diesem Gewebe sollten mutante Klone der 57B-Faktoren induziert werden, um die markierten Lineages auf morphologische Veränderungen zu untersuchen. Die Analyse zeigte - wie im Fall der DM-Lineages - jedoch keine Veränderung der kolumnaren Lineages der optischen Medulla, was die Zellzahl und Morphologie betrifft. Dies ließ darauf schließen, dass die Expression von Drx und Hbn in einem Teil der dortigen NB entweder nicht zu einer feststellbaren Verminderung neuronaler Masse führt oder diese Faktoren in der larvalen

Phase andere Funktionen im Bereich der optischen Lobe besitzen müssen, die sich - ähnlich wie in den DM-Lineages - auf die neuronale Identität beziehen. Weitere Untersuchungen sollten die Expression der Faktoren in einen funktionellen Zusammenhang bringen. Da die Medulla-NB ebenso - wie die DM-Neuroblasten - eine Timing-Serie zeigen, sollten Hbn-positive NB in dieser Hinsicht im weiteren Verlauf analysiert werden.

4.32 Einordnung der Hbn-positiven Medulla-NB in die Timing-Serie der Medulla

Wie im Falle der DM-Lineages haben verschiedene Arbeitsgruppen im Zeitraum dieser Arbeit Daten zur zeitlichen Bildung und transkriptionellen Identifikation der neugebildeten Neuroblasten in den optischen Loben publiziert (Li et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Die NB-Expression von Hbn sollte daher mit den dort beschriebenen Timing-Faktoren der optischen Medulla verglichen werden (siehe 2.10 und Abb.2.15). Wie in der Analyse der DM-Lineages wurde auch hier Ey verwendet. Ey wird in der Medulla als zweiter Faktor der Timing-Serie exprimiert und zeigt die breiteste Expressionsbande. Diese Bande ist mit der Hbn-NB-Bande vergleichbar und sollte daher auf Kolo-kalisation bzw. Überlappung mit Hbn untersucht werden. Ferner wurde die Expression von Hbn im Kontext des ersten Faktors der Timing-Serie, Homothorax (Hth), untersucht. Der Vergleich mit Hth-positiven NB wurde durch ein *hth*-spezifisches Reporterkonstrukt realisiert (Hasegawa et al., 2011). Die NB-ständige Hbn-Expression sollte im Fall einer Kolo-kalisation mit den verwendeten Markern in die Serie eingliedert werden.

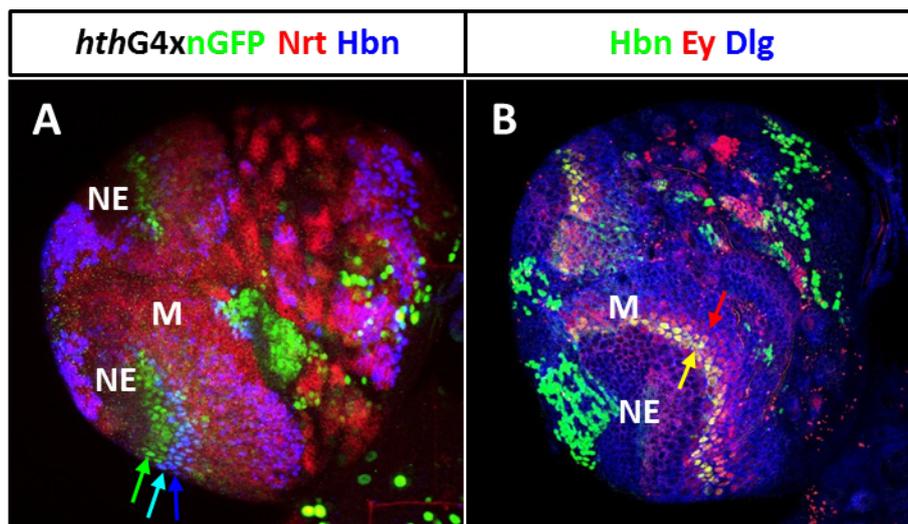


Abb.4.52: Vergleich der Hbn-Expression mit den OL-NB Timing-Faktoren Hth und Ey. Konfokale Aufnahme in dorsaler Ansicht (40x) von *hthG4xnGFP*- und *yw-L3*-Gehirnen mit (A) anti-Hbn- und -Nrt- sowie (B) -Ey-, -Hbn- und -Nrt-Färbung: (A) Blauer Pfeil zeigt Hbn-Expression in NB angrenzend an die durch einen grünen Pfeil markierten NB mit *hthG4*-Konstrukt-Expression; geringe Überlappung durch türkisfarbenen Pfeil markiert. (B) Fokus liegt auf der gemeinsamen Expression von Ey/Hbn in Medulla-NB; gelber Pfeil markiert Hbn in der jüngeren Hälfte von Ey-pos. NB, roter Pfeil markiert ältere Ey-pos. NB. (M, Medulla; NE, Neuroepithel).

Das *hth*-spezifische Gal4-Konstrukt zeigt durch kernständige Reporterexpression die NB-ständige Aktivität von Hth an (Abb.4.52,A, grüner Pfeil), nicht jedoch dessen Expression im NE. Unmittelbar angrenzend an die Aktivität des Konstruktes, die sich nach medial abschwächt, kann der Kranz aus Hbn-positiven NB beobachtet werden (Abb.4.52,A, blauer Pfeil). Im Übergangsbereich kommt es zu leichter Koloalstion (Abb.4.52,A, türkisfarbener Pfeil).

Wird die Expression von Ey und Hbn in der optischen Medulla verglichen, so kann man eine Koloalstion der Faktoren antreffen, doch zeigt die Ey-Expression zwei zusätzliche Zellreihen von NB verglichen mit Hbn, sodass Hbn nur in jüngeren Ey-positiven Neuroblasten detektiert werden kann (Abb.4.52,B, gelber, roter Pfeil; Abb.4.53).

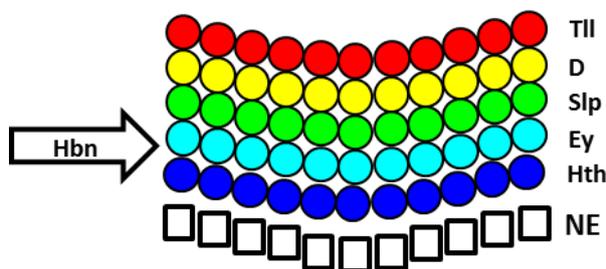


Abb.4.53: Einordnung Hbn-positiver Medulla-NB in die Timing-Serie. Darstellung des Neuroepithels (schwarze Kästen) und der NB des Medullacortex (Kreise) in dorsaler Aufsicht. Hbn-pos. Medulla-NB (Blockpfeil) liegen in der Übergangszone der Hth-pos. in die Ey-pos. NB. (NE, Neuroepithel).

Bezogen auf die NB-Timing-Serie der optischen Medulla liegt Hbn zwischen der Hth- und Ey-Zone und zeigt Überlappung mit beiden Faktoren. Weiterhin bekannt ist die Tatsache, dass alle durch die Timing-Faktoren bestimmten NB verschiedene Neurone bilden, deren jeweiliger Typ durch die definierte Expression spezifischer Faktoren bestimmt wird (Li et al., 2013). Ein nächstes Ziel war daher, die Hbn-positiven Neurone der Medulla vor diesem Hintergrund zu untersuchen und zu bestimmen.

4.33 Einordnung der Hbn-positiven Medulla-Neurone im Vergleich zu anderen Faktoren

Die durch die Timing-Serie unterschiedlich markierten Medulla-NB bilden differentiell markierte GMC und Neurone, die sich durch die Kombination der von ihnen exprimierten TF unterscheiden lassen (Li et al., 2013). Da Hbn-positiv NB eine Überschneidung mit Ey-positiven NB zeigen, sollten auch die aus ihnen hervorgehenden Medulla-Neurone auf Koloalstion untersucht werden. Neben Ey sollte ebenso Toy, der in vielen bereits definierten Medulla-Neuronen exprimiert wird, auf eventuelle Koloalstion geprüft werden. Dll besitzt ebenfalls eine Expression in Neuronen der Medulla (Morante et al., 2011) und sollte daher auch in diesem Areal mit Hbn verglichen werden. Ziel war es somit, die

Identität der Hbn-positiven Neurone durch Vergleich mit exprimierten Markern einzugrenzen oder sogar zu klären.

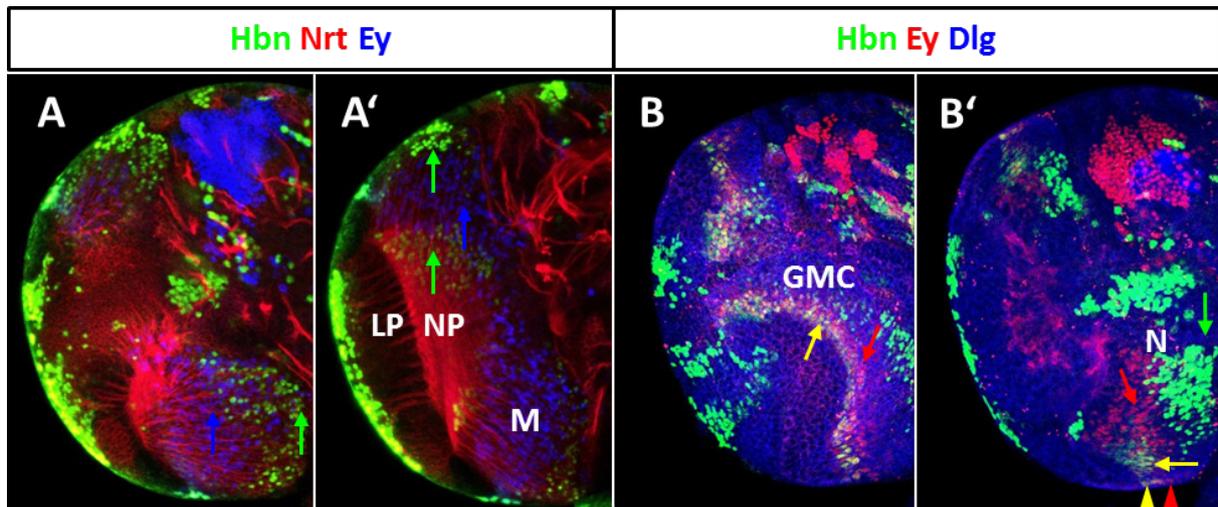


Abb.4.54: Vergleich der Hbn-pos. Medulla-Neurone mit Ey-pos. Neuronen. Konfokale Aufnahmen in dorsaler und medialer Ansicht von *yw-L3*-Gehirnen (40x) mit (A,A') anti-Ey-, -Hbn- und -Nrt- bzw. (B,B') -Dlg-, -Ey- und -Hbn-Färbung: (A) Dorsale Aufsicht auf Medulla. Zwei getrennte Pools von Ey- bzw. Hbn-pos. Medulla-Neuronen. Blauer Pfeil markiert Ey-pos. Neurone medial, grüner Pfeil zeigt Hbn-pos. Neurone lateral in der Medulla. (A') Medialer Schnitt. Blauer Pfeil weist auf Ey-pos. Neurone zwischen den Hbn-pos., Neuropil-nahen und den übrigen, konzentrisch angeordneten Neuronen, die durch grüne Pfeile gezeigt sind. (B) Dorsaler Fokus. Gelber Pfeil zeigt auf Ey/Hbn-pos. GMC, roter Pfeil zeigt nur Ey-pos. GMC der Medulla. (B') Medialer Schnitt. Lage der Ey/Hbn- und Ey-pos. NB im Medullacortex (gelbes, rotes Dreieck). Die gemeinsam gefärbten GMC (gelber Pfeil) und die getrennt daraus hervorgehenden Neuronenpools (grüner, roter Pfeil). (GMC, Ganglionmutterzelle; LP, Lobula Plug; M, Medulla; NP, Neuropil).

Trotz der überlappenden Expression von Ey und Hbn in Medulla-NB, können keine gemeinsam markierten Neurone in der Medulla gefunden werden. Ey und Hbn zeigen auf Ebene der Neurone ein differentielles Muster, das sehr große, weitgehend getrennte Pools von Neuronen umfasst. (Abb.4.54,A,A', blauer und grüne Pfeile). Ey-positive Neurone liegen dabei zwischen dem Neuropil- und Medulla-Pool von Hbn-positiven Neuronen (Abb.4.54,A', blauer Pfeil). Einzig in dorso-lateralen Anteilen der Medulla ist eine Durchmischung der Pools zu beobachten (Abb.4.54,A, grüner Pfeil). Es konnte somit nachgewiesen werden, dass Hbn in einem Teil der Ey-positiven GMC exprimiert wird (Abb.4.54,B, gelber, roter Pfeil). Jedoch werden von diesen Progenitorzellen keine Neurone gebildet, die beide Faktoren als Marker zeigen (Abb.4.54,B', gelber, roter Pfeil). Somit sollten die jeweiligen Neuronenpools, die aus diesen GMC hervorgehen, weitere unterschiedliche Marker tragen. Eine Differenzierung der aus GMC gebildeten Neurone liegt schon durch ihren Notch-positiven bzw. Notch-negativen Status vor, der in aller Regel auch von einer weiteren differentiellen Markerexpression begleitet wird (Li et al., 2013).

Toy wird im Unterschied zu Hbn (Abb.4.55,A-A'', weiße Pfeile) nicht in NB oder GMC, sondern erst in Neuronen exprimiert (Abb.4.54,A'', blauer Pfeil). Toy-positive Neurone gehen aus NB nach der Ey-positiven Zone hervor (Slp-, D-Zone, vgl. Abb.2.15,C). Daher war ein Vergleich der Hbn-positiven Neurone mit den Toy-positiven ein nächster Schritt zur zeitlichen Einordnung der Expression von Hbn. Kolokalisieren Hbn- und Toy-positive Neurone oder liegen im gleichen Areal der Medulla, so wurden sie von den gleichen NB (Slp⁺, D⁺) gebildet.

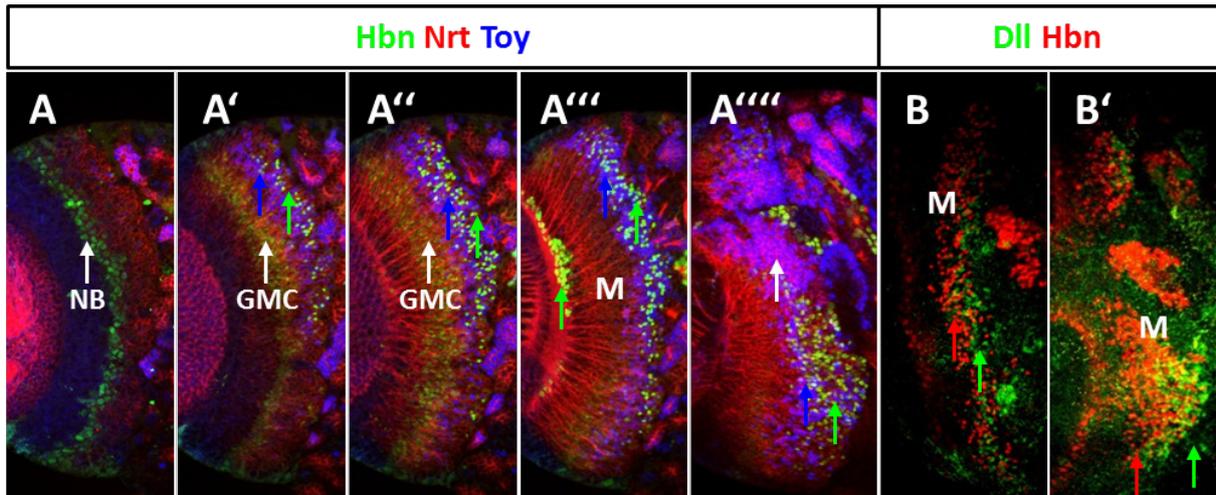


Abb.4.55: Vergleich der Hbn-pos. Medulla-Neurone mit Toy und Dll als spezifischen Neuronen-Markern. Konfokale Aufnahmen (40x) in (A-A''') ventraler nach dorsaler Durchsicht und (B,B') dorsaler und ventraler Ansicht von *yw-L3*-Gehirnen mit (A-A''') anti-Hbn, -Nrt- und -Toy- bzw. (B,B') -Dll- und -Hbn-Färbung: (A-A''') Hbn und Toy zeigen keine Übereinstimmung der Expression in Medulla-Neuronen (blaue und grüne Pfeile): (A) Weißer Pfeil zeigt auf Ring aus Hbn-pos. NB. (A') Weißer Pfeil deutet auf Hbn-pos. GMC. Blauer und grüner Pfeil weisen auf die ersten Hbn- und Toy-pos. Neurone. (A'') Blauer und grüner Pfeil zeigen im ventralen Bereich getrennte Neuronenpopulationen mit Expression der beiden Faktoren. (A''') Dieselbe Verteilung in einer tieferen Ebene medial am Neuropil, Hbn und Toy zeigen keine Kolokalisation in Neuronen (blauer und grüner Pfeil). (A''') Dorsale Aufsicht auf die Medulla-Region mit den meisten pos. Zellkernen (blauer und grüner Pfeil), weißer Pfeil zeigt alleinständige Toy-Expression in Neuronen nahe den DSM. (B) Dorsale Aufsicht und (B') ventrale Aufsicht der Medulla. Roter Pfeil zeigt Hbn-pos. Neurone, grüner Pfeil zeigt Dll-pos. Neurone. (GMC, Ganglionmutterzelle; M, Medulla; NB, Neuroblast).

Ein Vergleich der Hbn- und Toy-positiven Medulla-Neurone zeigt zwar eindeutig Expression im gleichen Bereich der Medulla in Form eines großen Rings aus Neuronen, jedoch kann auch hier keine Kolokalisation beobachtet werden (Abb.4.55,A-A''', blauer, grüner Pfeil). Neben der konzentrischen Expression ist Hbn auch in Neuropil-nahen Neuronen nachweisbar (Abb.4.55,A''', grüner Pfeil). Toy besitzt keine vergleichbare Neuropil-nahe Expression (Abb.4.55,A'''), wird jedoch in dorsalen Arealen der Medulla ohne Nachbarschaft zu Hbn-positiven Neuronen exprimiert (Abb.4.55,A''', weißer Pfeil).

Einen letzten im Vergleich zur Expression von Ey-positiven Neuronen beschriebenen Faktor, der in Medulla-Neuronen exprimiert wird, stellt Dll dar (Morante et al., 2011; Morante und Desplan, 2008). Dessen Expression wurde daher ebenfalls mit dem Vorkommen Hbn-

positiver Medulla-Neurone verglichen. Diese Analyse zeigte eine konzentrische Anordnung von Dll-positiven Neuronen, die verglichen mit Hbn noch weiter medial zum CB in der Medulla liegen (Abb.4.55,B,B', grüner, roter Pfeil). Somit konnte Hbn durch Expressionsvergleich weiter eingruppiert werden. Abb.4.56 fasst die Expression der Timing-Faktoren in NB und den aus ihnen hervorgehenden Neuronenpools in der Medulla schematisch zusammen und stellt diese gegenüber Hbn dar. Der große Hbn-Medulla-Neuronenpool liegt zeitlich und räumlich nach den Ey-positiven Neuronen auf Höhe der Toy-positiven Neurone und dort unmittelbar vor den Dll-positiven Neuronen. Durch die ermittelten Vergleiche kann die Expression von Hbn im medialen Teil der Medulla theoretisch dem Slp/D-Zeitfenster zugeordnet werden. Der Neuropil-Pool liegt vor den Ey-positiven Neuronen und muss daher dem Hth-Fenster entstammen.

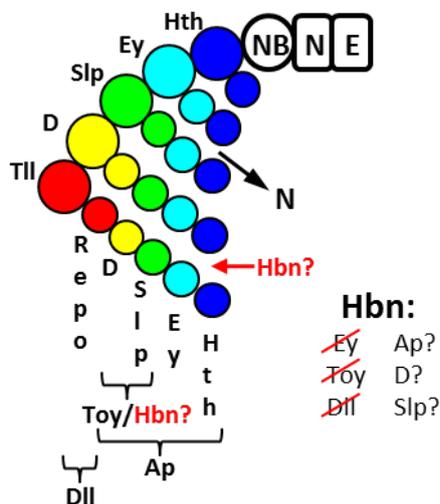


Abb.4.56: Vergleich der Hbn-Expression mit der neuronalen Expression der Timing-Faktoren und anderer Faktoren der Medulla-Neurone. Die NB und die in verschiedenen Phasen ihrer Entwicklung produzierten Neurone sind farblich markiert. Schwarzer Pfeil zeigt die Richtung der Abgabe von Neuronen durch NB an. Die mögliche Lage Hbn-pos. Neurone ist rot gekennzeichnet. Die entsprechende Markerexpression der NB und Neurone ist benannt und ihre Verteilung durch Mengenklammern markiert. Hbn wird in nicht Dll-, Ey- oder Toy-pos. Neuronen exprimiert. Ein Vergleich mit Ap, D und Slp steht aus. (N, Neuron; NB, Neuroblast, NE, Neuroepithel).

Hbn zeigt keine Kolo-kalisation mit den untersuchten Faktoren. Daher ist eine konkrete Identifizierung der Typen Hbn-exprimierender Neurone nicht möglich. Neben den bisher untersuchten Faktoren existiert noch eine Reihe weiterer, gemeinsam kartierter Faktoren der Medulla. Der Vergleich mit diesen sollte helfen, die zeitliche und räumliche Identität der Hbn-Neuronenpools weiter einzugrenzen.

4.34 Vergleich der Hbn-Expression mit den konzentrischen Zonen der Medulla

Die Arbeitsgruppe Sato (Hasegawa et al., 2011) beschreibt das Vorhandensein konzentrischer Zonen von Medulla-Neuronen, die durch die ringförmige, strikt aufeinanderfolgende Expression von Hth, Brain specific Homeobox (Bsh), Runt (Run) und Drifter (Drf) definiert sind (Anderson et al., 1995; Gergen und Butler, 1988; Jones und McGinnis, 1993; Kurant et al., 1998; Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997). Die jeweilige larvale Expression dieser Faktoren bestimmt die Neuronentypen des adulten Gehirns

(Hasegawa et al., 2011). Hbn zeigt neben der Expression in jungen Ey-positiven NB auch eine Expression in konzentrisch angeordneten Neuronen der Medulla, deren NB-bezogene Herkunft noch nicht vollständig geklärt wurde. Ein Vergleich mit den oben genannten Faktoren bietet sich daher an. Um die Hbn-Expression in dieses Identifikations-Raster einordnen zu können, wurde eine Hbn-Antikörperfärbung inklusive Dlg oder Nrt im Vergleich zur jeweiligen Expression von Gal4-Reporterlinien dieser Faktoren durchgeführt. Als UAS-Marker wurden zwei Konstrukte, UAScd8GFP und UASnGFP (Barolo et al., 2000), benutzt.

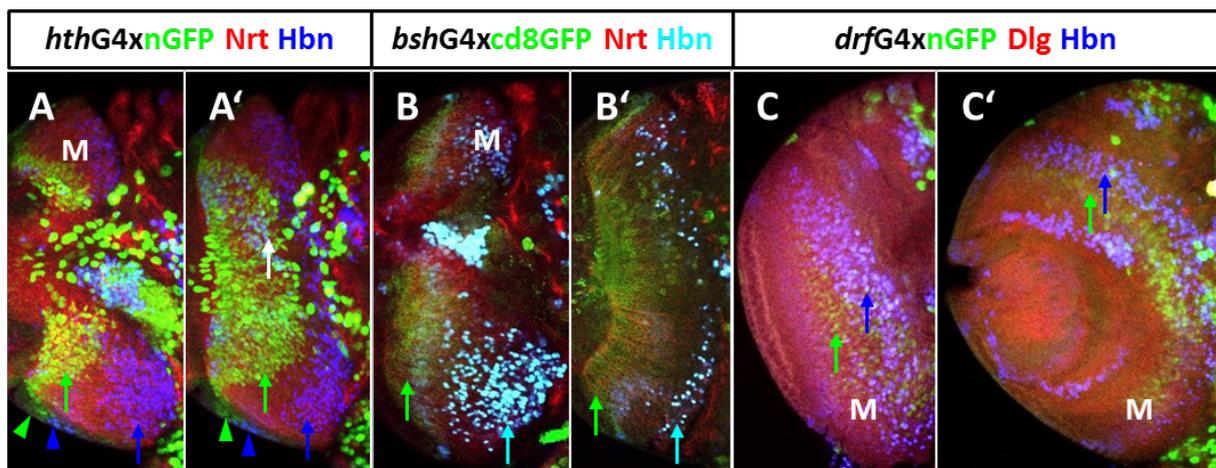


Abb.4.57: Vergleich der Hbn-Expression mit den konzentrischen Markern *bsh-*, *drf-*, *hthGal4*. Konfokale Aufnahme (40x) in jeweils dorsaler Aufsicht und medialer Ansicht der optischen Medulla eines (A,A') *hthG4xnGFP*, (B,B') *bshG4xcd8GFP*- und (C,C') *drfG4xnGFP*-L3-Gehirns mit anti-Hbn- und (A-B') -Nrt- und (C,C') -Dlg-Färbung: (A) Grüner Pfeil zeigt *hthG4*- und blauer Pfeil Hbn-pos. Neurone in unterschiedlichen Medullazonen. Blaues und grünes Dreieck weisen auf die Hbn- bzw. Hth-pos. Neuroblasten im Cortex der Medulla. (A') Weißer Pfeil zeigt *hthG4*- und Hbn-pos., kolokalisierte Neurone am Neuropil. (B,B') Grüner Pfeil zeigt die Aktivität des *bshG4*-Konstruktes am Neuropil-nahen Anteil der Medulla. Türkisfarbener Pfeil zeigt großen, konzentrischen Pool Hbn-pos. Neurone außerhalb der *bshG4*-pos. markierten Neurone. (C,C') Grüner Pfeil zeigt konzentrische Expression des *drfG4*-Reporters. Blauer Pfeil zeigt konzentrische Expression von Hbn in der Medulla. Geringe Kolokalisation Hbn/*drfG4*. Der Hbn-pos., konzentrische Ring liegt weiter außerhalb des Konstrukt-markierten Areals. (M, Medulla).

Werden die durch anti-Hbn und *hthGal4* angefärbten Neurone betrachtet, so fallen zwei zeitlich völlig getrennte Populationen von Neuronen auf (Abb.4.57,A,A' blauer, grüner Pfeil). Einzig der Pool Hbn-positiver Neurone am Neuropil der Medulla zeigt auch *hthGal4*-Expression (Abb.4.57,A', weißer Pfeil). Betrachtet man die aneinandergrenzende Expression von Hbn und Hth in kortikal situierten NB der Medulla (Abb.4.57,A,A', blaue und grüne Pfeilspitzen), so fällt auf, dass die Hth-positive Neuronenpopulation angrenzend an die Hth-positiven NB liegt (Abb.4.57,A,A', grüne Pfeilspitze, grüner Pfeil). Die Hbn-positiven Neurone liegen jedoch nicht angrenzend an die Hbn-positiven NB (Abb.4.57,A,A', blaue Pfeilspitze, blauer Pfeil). Dies bestätigt die im Vergleich zur Ey-Expression getroffene Annahme, dass die große, Hbn-positive Neuronenpopulation von NB mit einer anderen, nicht Hbn-positiven, Timing-Markierung abstammen muss. Die konzentrische Expression des *bshGal4*-Reporters

beginnt unmittelbar am Neuropil und endet vor der Hbn-positiven, konzentrischen Expression in Neuronen (Abb.4.57,B,B', grüne und türkisfarbene Pfeile). Die *drfGal4*-Expression erfolgt nach der Expression der *bshGal4*-positiven Zone und zeigt nur in sehr wenigen Neuronen Übereinstimmung mit der Expression von Hbn (Abb.4.57,C,C', blaue und grüne Pfeile).

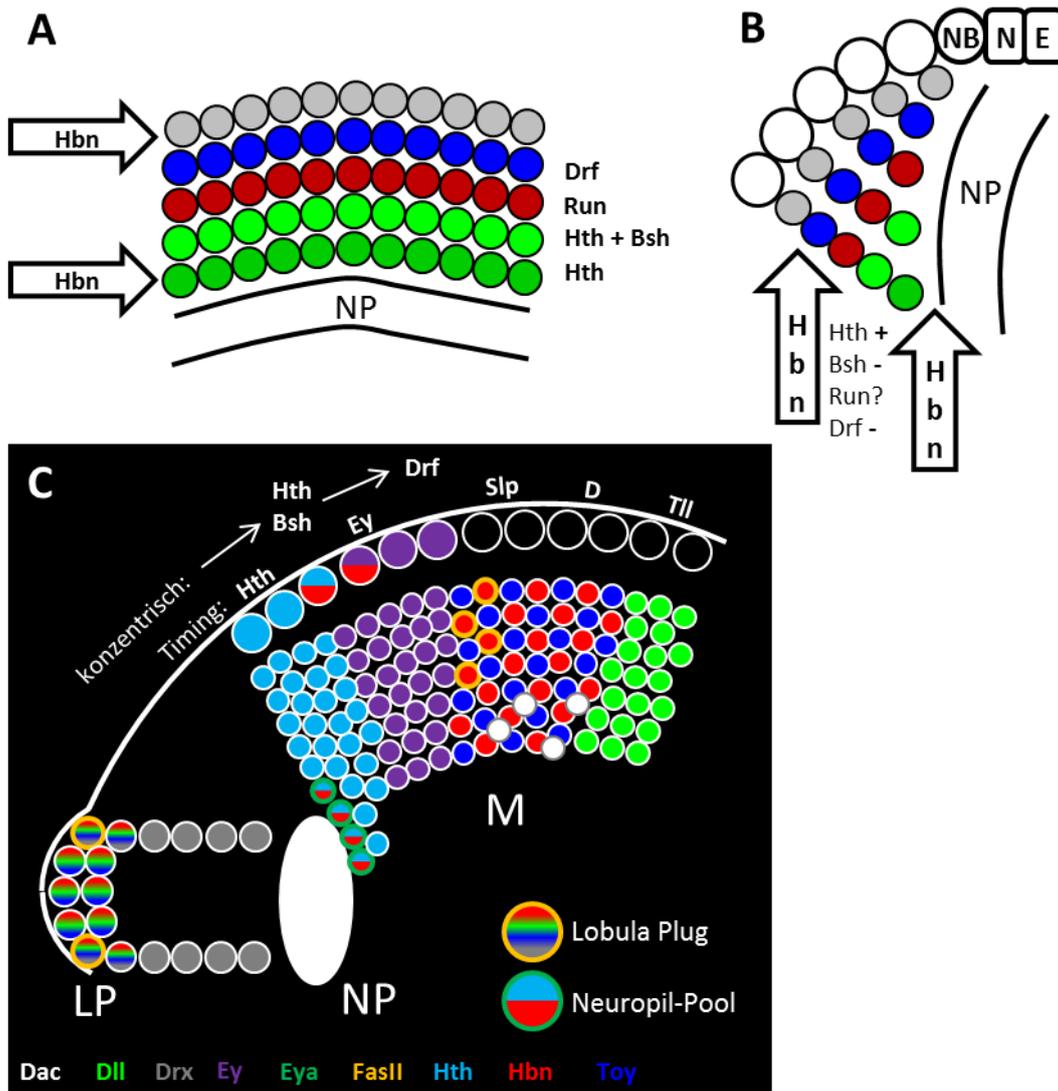


Abb.4.58: Einordnung der Hbn-Expression in die konzentrischen Zonen der OL und die Gesamtausdruckskarte. (A,B) Verteilung der konzentrisch markierten Neurone betrachtet (A) vom Neuropil aus und (B) als Querschnitt durch den Medullacortex. Im Vergleich zu den konzentrischen Zonen neuronaler Markerexpression von Hth, Hth/Bsh, Run und Drf nach Hasegawa et al. (2011) wird Hbn in *hthG4*-pos. Neuronen am Neuropil exprimiert (Blockpfeil). Neben dieser Expression kann Hbn außerhalb der konzentrischen Expression von *bsh*- und *drfG4*-pos. Neuronen beobachtet werden (Blockpfeil). Diese Zone könnte mit der unbestimmten Zone (graue Kreise) übereinstimmen. (C) Drei Zonen Hbn-Expression in rot dargestellt, in LP und M mit FasII (orange) zum Teil kolokalisiert. In verschiedenen Farben sind weitere Faktoren mit Kolokalisation zu Hbn in den Medullazonen dargestellt. Große Kreise zeigen die Neuroblasten, die aus dem NE entstanden sind und im Cortex liegen (Timing-Serie über NB eingetragen), mittlere Kreise die Neurone des Lobula Plugs und kleine Kreise die Neurone der Medulla (konzentrische Areale von Hth/Bsh und Drf eingetragen). Der Neuropil ist durch ein weißes Oval dargestellt. (LP, Lobula Plug; M, Medulla; NE, Neuroepithel; NP, Neuropil).

Abb.4.58 setzt die vorgefundene Expression von Hbn in der Medulla schematisch in Bezug zur endogenen Expression der konzentrisch exprimierten Faktoren Bsh, Drf, Hth, Run sowie der Zone unbekannter Expression und fasst weiterhin die insgesamt gefundenen Expressionen in der Medulla zusammen (Abb.4.58,C). Dabei wurden auch Daten, die in Vergleichsfärbungen von Hbn zu *Dac*, *Eyes absent (Eya)* und *FasII* gewonnen wurden, berücksichtigt.

Die Lage der Hbn-positiven Medulla-Neurone ist somit auf eine äußere, konzentrische Zone im Anschluss an die Vergleichsfaktoren eingegrenzt. Dort liegen sie eventuell in der Zone, die durch einen unbekanntem Faktor markierter ist, welcher von Hasegawa et al. nicht bestimmt werden konnte. Die konzentrische Expression von Hbn-positiven-Medulla-Neuronen liegt somit zwischen dem Pool aus *drfGal4-/Dac*- und *Dll*-positiven, gemischt mit *Toy*-positiven Neuronen vor dem Außenrand der Medulla (Abb.4.58,C). Demgegenüber zeigt die Neuropil-nahe Population eine Übereinstimmung mit *Hth* und *Eya* (Abb.4.61,A,B).

Vorausgreifend wurde auch die adulte Medulla auf Expression von Hbn untersucht und eine gleichverteilte Expression im gesamten Cortex der Medulla sowie dem Außenrand der Lobula gefunden. Dies deutet auf eine Re-Regionalisierung der Medulla-Neurone in der puppalen Phase hin, wie sie auch für die konzentrischen Faktoren (Hasegawa et al., 2011) gefunden wurde. Im Anhang kann die zugehörige Abb.7.16 betrachtet werden.

Die Expression von Hbn in der Medulla konnte durch die verwendeten Faktoren zeitlich und räumlich beschrieben werden. Die Identifizierung der Neuronentypen kann allerdings nur durch Vergleich mit weiteren Markern erfolgen. Im Anschluss an die neuronale Analyse der optischen Medulla wurde die *57B*-spezifische Expression im Pilzkörper untersucht.

4.35 *Drx* und Hbn werden in larvalen PK-NB und deren GMC exprimiert

In der embryonalen Entwicklung wurde eine Expression von *Drx* in PK-NB gezeigt (Kunz et al., 2012). In der larvalen Phase konnten durch Knock-down der *drx*-Expression bereits Effekte auf die Ausbildung der PK-Lineages gezeigt werden (Neumüller et al., 2011). Hbn zeigt ebenfalls Expression in embryonalen PK-NB (siehe Abb.4.12). Für Hbn ist die larvale Expression in PK-NB jedoch noch nicht geklärt und sollte daher untersucht werden. Dazu wurde eine Färbung gegen den allgemeinen NB-Marker *Dpn*, welcher in allen PK-NB exprimiert wird, durchgeführt. *Drx* wird ebenfalls in den GMC der PK-Lineages exprimiert, weshalb ein Ansatz zur möglichen Aufdeckung auch von Hbn-positiven GMC in der Marker-

Färbung durch Prospero bestand. Dies sollte auch im direkten Vergleich zu Drx durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede der 57B-Faktoren in Progenitorzellen zu klären. Auch die frühe larvale Entwicklung sollte auf die gemeinsame Expression der 57B-TF in PK-Lineages untersucht werden, was durch gemeinsame Färbung der 57B-TF in L2-Gehirnen erfolgen sollte.

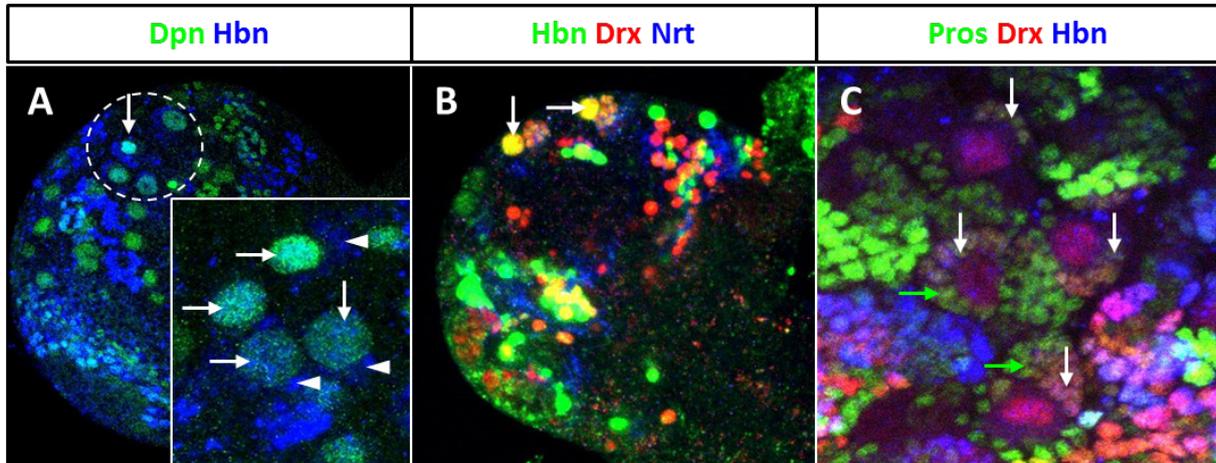


Abb.4.59: Drx und Hbn werden in PK-NB und -GMC exprimiert. Konfokale Aufnahmen (40x) in dorsaler Aufsicht von *yw*-Gehirnen mit (A) anti-Dpn-, -Hbn-, (B) -Drx-, -Hbn-, -Nrt-, (C) -Drx-, -Hbn- und -Pros-Färbung: (A) Frühes L3-Gehirn. Gestrichelter Kreis markiert im dorso-anterior-lateralen Bereich des CB die vier Dpn/Hbn-pos. NB des PK. Im Ausschnitt, anderes Gehirn, sind durch weiße Pfeile die PK-NB und durch weiße Pfeilspitzen die PK-GMC mit Hbn-Expression angezeichnet. (B) Weiße Pfeile zeigen Drx/Hbn-Expression in PK-NB eines frühen L2-Gehirns. (C). Weiße Pfeile markieren gemeinsame Drx/Hbn-Expression in jungen PK-GMC des L3-Gehirns. Grüne Pfeile zeigen alleinige Drx-Expression in älteren PK-GMC.

Dorso-anterior-lateral auf Höhe der DM 2- und DM 3-Lineages liegen die vier NB des Pilzkörpers (Abb.4.59,A, weißer Kreis, weißer Pfeil). Hbn zeigt eine schwache Kernfärbung in diesen NB (Abb.4.59,A, vergrößerter Ausschnitt, weiße Pfeile) und darüber hinaus in wenigen direkt angrenzenden Zellen den GMC (Abb.4.59,A, vergrößerter Ausschnitt, weiße Pfeilspitzen). In früheren Stadien der larvalen Gehirnentwicklung wird eine stärkere Expression von Hbn in NB festgestellt und zeigt verglichen mit Drx die gleichen GMC der Lineages an (Abb.4.59,B, weiße Pfeile). Wird das L3-Stadium bezüglich der GMC untersucht, so erscheint die Expression des Nachbargens *drx* deutlich stärker in den NB und zeigt im Vergleich zur Expression von Hbn weiter distal gelegene GMC an (Abb.4.59,C, weiße Pfeile), die distalsten, Pros-positiven GMC sind jedoch Drx/Hbn negativ (Abb.4.59,C, grüne Pfeile). Auch für die PK-Lineages konnte durch den Vergleich mit PCNA-GFP die Verteilung von Drx und Hbn auf NB und proliferierende GMC in den unterschiedlichen Anteilen der GMC bestätigt werden; im Anhang zeigt Abb.7.17 die zugehörigen Daten.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass Hbn analog zur embryonal festgestellten Expression in den PK-NB auch larval diese Charakteristik beibehält und sich von Drx nur durch die Menge an markierten GMC unterscheidet. Diese verminderte Anzahl an markierten GMC etabliert sich jedoch erst während der larvalen Entwicklung, da in frühen Stadien noch kein Unterschied zwischen der Drx- und Hbn-ständigen GMC-Expression vorliegt. Ein Unterschied besteht jedoch in der phänotypischen Auswirkung, die im Gegensatz zu *drx* im Screen für *hbn* am PK nicht festgestellt wurde (Neumüller et al., 2011). *Hbn* fällt daher eine andere Rolle in der Entwicklung des larvalen PK zu. Diese lässt sich phänotypisch nicht oder nur minimal durch den Vergleich des wildtypischen und des durch RNAi veränderten *inscGal4alxUAScd8GFP*-Reportertermusters erkennen. Der letzte Abschnitt vergleichender, larvaler Analysen von Drx und Hbn betrifft die Expression in ventralen Typ-I-Lineages des SAG.

4.36 Kolokalisationsstudien von Drx und Hbn in ventralen Typ-I-Lineages des CB

Das letzte Gebiet mit detektierter Kolokalisation zwischen Drx und Hbn stellt die ventrale Seite des CB dar. Dort findet auch die Expression des segmentalen Markers *enGal4* statt, der eine Zuordnung der ventralen Drx- und Hbn-Expression auf die Neuromere des SAG ermöglicht (Kumar et al., 2009). Die Visualisierung des Treibers erfolgte durch eine kernständige Markierung durch Kern-lokalisiertes GFP (Barolo et al., 2000). Um die Expression in den ventralen Lineages des CB untereinander besser analysieren und differenzieren zu können, wurden wie in embryonalen Expressionskartierungen und vorgenommenen Vergleichen der DM- und OL-Lineages die RDGN-Faktoren *Dac*, *Ey* und *Toy* mit einbezogen und die Typ-I-NB-Lineages mit *Nrt* sichtbar gemacht. Jeweils zwei Faktoren wurden gemeinsam mit *Nrt* gefärbt, um die Expression und Kolokalisation in den jeweiligen Lineages darzustellen. Ziel war es auch hier, Kolokalisationen der Faktoren in den ventralen Lineages des larvalen Gehirns zu untersuchen. Die Untersuchung von Drx und Hbn in den ventral gelegenen Typ-I-NB-Lineages zeigt Übereinstimmung der Expression in der größten Expressionsdomäne von Drx-positiven Lineages, die sich auf zwei Anteile beschränkt, die ein differentielles Muster in weiten Teilen der Lineages zeigen (Abb.4.60,A, weißer Pfeil).

Die Expression von Drx und Hbn kann larval in sekundären Lineages des PC und DC festgestellt werden (Abb.4.60,B,C, weiße Grenzlinien, weiße Pfeile). Im TC können lediglich *Nrt*-negative, primäre Neurone beobachtet werden.

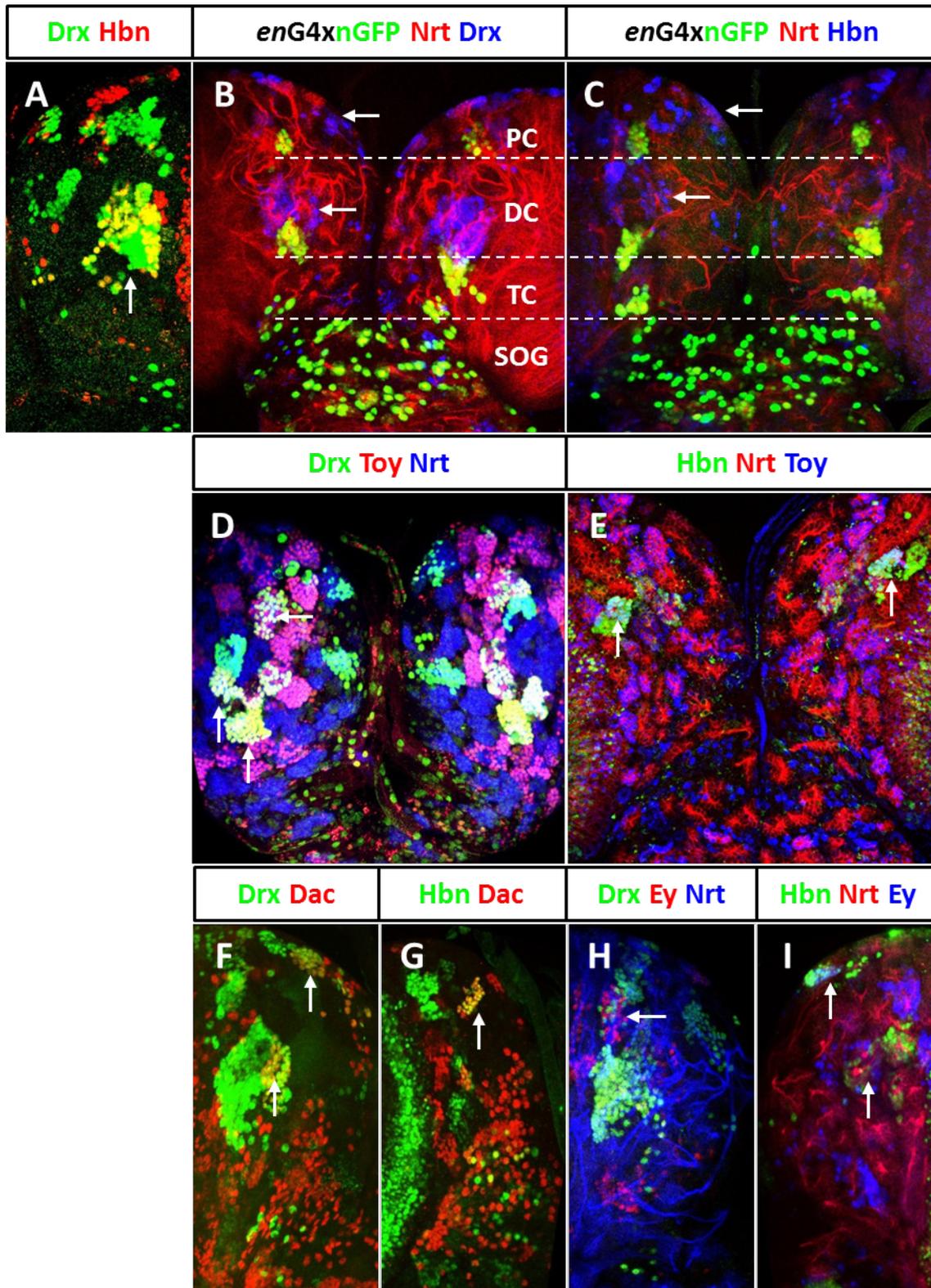


Abb.4.60: Ventrale Expression von Drx und Hbn in Typ-I-Lineages verglichen mit Dac, Ey und Toy. Konfokale Aufnahme in ventraler Aufsicht (40x) von (A, D, E, F, G, H, I) *yw*- und (B,C) *enG4xnGFP*-L3-Gehirnen mit (A) anti-Drx-, -Hbn-, (B) -Drx-, -Nrt-, (C) -Hbn-, -Nrt-, (D) -Drx-, -Nrt-, -Toy-, (E) -Hbn-, -Nrt-, -Toy-, (F) -Dac-, -Drx-, (G) -Dac-, -Hbn-, (H) -Drx-, -Ey-, -Nrt-, (I) -Ey-, -Hbn- und -Nrt-Färbung: (A). Weißer Pfeil deutet auf Drx und Hbn-Kolokalisation im großen, Drx-pos., ventralen Lineageverbund. (B). Weiße Pfeile zeigen Drx-pos. Lineages im PC und DC. (C). Weiße Pfeile zeigen Hbn-pos. Lineages im PC und DC. (D) Toy-Expression in ventralen Typ-I-Lineages. Weiße Pfeile zeigen Kolokalisation mit Drx-Expression in allen ventralen, nicht aber den medialen und anterioren Drx-pos. Lineages. (E) Weiße Pfeile zeigen Hbn/Toy-Kolokalisation in DC-ständiger, lateraler, Hbn-pos. Typ-I-Lineage. (F). Weiße Pfeile zeigen Dac/Drx-Kolokalisation in anteriorer und zentraler Drx-pos. Lineage.

(G). Weißer Pfeil zeigt Dac/Hbn-Kolokalisation in anteriorer, Hbn-pos. Lineage. (H). Weißer Pfeil markiert PC-Lineage mit differenziellem Drx/Ey-Muster. (I). Weiße Pfeile markieren Ey/Hbn-Kolokalisation in anteriorer PC-Lineage und gemeinsame Expression in medialer, Hbn-pos. Lineage. (DC, Deutocerebrum; PC, Protocerebrum; TC, Tritocerebrum; SOG, suboesophageales Ganglion).

Wird die Expression von Toy, die sich über zahlreiche Lineages verteilt, mit der Drx-Expression verglichen, so fällt die gemeinsame Lineage-Expression unterhalb der anterioren PC-Lineages auf (Abb.4.60,D, weiße Pfeile). Die mediale Lineage zeigt keine Übereinstimmung mit Toy, alle übrigen Drx-positiven Lineages zeigen jedoch im proximalen Teil Kolokalisation, die Expression von Toy setzt sich im medialen und distalen Teil der jeweiligen Lineages fort (Abb.4.60,D, weiße Pfeile).

Vergleicht man Hbn und Toy in ventralen Typ-I-Lineages, zeigt sich eine gemeinsame Expression im lateralen Anteil der vormals bestimmten Lineage mit Drx/Hbn-Kolokalisation, die als mediale Lineage bezeichnet wurde (Abb.4.60,E, weiße Pfeile). In einem frühen L3-Gehirn zeigt der Vergleich von Dac und Drx in der medialen Drx-positiven Lineage des anterioren PC Kolokalisation ebenso wie in der Hauptdomäne von Drx im medialen Bereich des DC (Abb.4.60,F, weiße Pfeile). Hbn zeigt in der medialen der beiden Hbn-positiven, anterioren PC-Lineages ebenfalls Kolokalisation zu Dac (Abb.4.60,G, weißer Pfeil). Ey-Expression wird in drei Lineages um die Hauptexpressionszone der 57B-TF gefunden und zeigt in der zentralen, Drx-positiven Lineage ebenfalls Expression, jedoch ohne Kolokalisation (Abb.4.60,H, weißer Pfeil). Hbn wird in dieser Zone ebenfalls ohne Kolokalisation zu Ey exprimiert, zeigt hingegen in der medialen, anterioren PC-Lineage Kolokalisation zu Ey (Abb.4.60,I, weiße Pfeile). Eine schematische Zusammenfassung der gesamten ventralen 57B-TF-Expression in Typ-I-Lineages kann im Anhang, Abb.7.18, betrachtet werden.

4.37 Zusammenfassung der larvalen Untersuchungen

Die Expression von Drx und Hbn konnte auch in der larvalen Phase detailliert beschrieben und in Bezug zur embryonalen Expression gesetzt werden. So wurde die Expression in sekundären Lineages wiedergefunden, die analog der embryonalen, primären Lineages im SAG verteilt sind. Dabei zeigen die Faktoren besonders im PC, dort anterior sowie im dorsalen und ventralen Bereich Expression, die auch larval mit den RDGN-Faktoren vergleichbar ist. Die dorso-mediale Region, die sich embryonal durch die stärkste gemeinsame Aktivität auszeichnete, stellt auch in der Larve das Gebiet der vorrangigen Kolokalisation dar. Hier konnte besonders für Drx eine breite Expression in allen larval gebildeten DM- aber auch den angrenzenden DL-Lineages gefunden werden. Hbn wird hier

anteilig weniger exprimiert, zeigt jedoch eine Expression in INP, den exklusiv in Typ-II-Lineages anzutreffenden intermediären NB, welche den embryonalen Typ-I-NB entsprechen. Hbn zeigt in diesem Zusammenhang Ähnlichkeit mit gefundenen Timing-Faktoren der DM-Lineage-Entwicklung, mit dem Unterschied, dass Hbn ebenfalls in den aus den markierten INP gebildeten GMC und Neuronen Expression zeigt. Neben diesen besonders großen Lineages, die zur Bildung des adulten Zentralkomplexes beitragen (Boyan und Reichert, 2011; Peraanu et al., 2011; Riebli et al., 2013; Yang et al., 2013), wurde ebenfalls eine Expression beider Faktoren im Bereich der optischen Loben, die im Verlauf der larvalen Entwicklung entstehen, festgestellt. Dabei konnten beide Faktoren in Stammzellen dieses Areals detektiert werden. Drx nur in einem spezifischen Subset in den dorsalen Spitzen der Medulla, wohingegen Hbn in einem konzentrischen Ring aus Stammzellen in der Medulla beobachtet wurde. Auch in diesem Fall zeigt die stammzellspezifische Expression von Hbn in der OL Ähnlichkeit zur dort in Medulla-NB vorgefundenen Expression von Timing-Faktoren, die die Identität der gebildeten Neurone mitbestimmen. Auch hier zeigt Hbn, zwischen den ersten beiden Faktoren der Timing-Serie exprimiert, einen Unterschied, da Hbn nicht in den von Hbn-positiven NB gebildeten Neuronen, sondern in Neuronen aus einem früheren und späteren Timing-Abschnitt exprimiert wird. In der optischen Lobe zeigt ein zweiter Neuropil, die Lobula, die Expression der 57B-Faktoren an. Auch in diesem Fall kann die Expression ebenfalls im Stammzellgebiet dieser Struktur, des IPC, nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigen Drx und Hbn, die gemeinsam in allen embryonalen PK-NB exprimiert werden auch larval eine Expression in den Stamm- und Progenitorzellen, wobei Drx anteilig in mehr GMC detektiert werden kann. Die Untersuchung weiterer Typ-I-Lineages im Bereich des CB zeigte eine Expression von Drx in sechs weiteren NB und von diesen gebildeten GMC. Darüber hinaus konnte die Expression im ventralen Bereich des CB erneut mit den RDGN-Faktoren verglichen werden. Dabei zeigten Drx und Hbn in sekundären Lineages, die den primären, embryonalen Lineages entsprechen, untereinander sowie mit den übrigen untersuchten Faktoren Kollokalisierung.

5. Diskussion

5.1 Die Funktion von *hbn* in der Entwicklung des embryonalen Protocerebrums

In der vorangegangenen Untersuchung der *hbn*-Mutanten wurde eine Veränderung des Protocerebrums festgestellt, die ursächlich nicht erklärt werden konnte. Es wurde weder wildtypisch ein verstärktes Aufkommen von Proliferation in Hbn-positiven Zellen des PC während der Gehirnentwicklung vorgefunden, noch Apoptose im Verlauf der Neurogenese der *hbn*-Mutante angetroffen. Auch konnten nur wenige NB mit Hbn-Expression im PNE gefunden werden, sodass ein Wegfallen dieser und der zugehörigen Lineages in mutanten Embryonen den Verlust protocerebraler Zellen nicht hinreichend erklären konnte (Dissertation Petra Kaspar, 2008).

Am Beginn der weiterführenden Experimente zur Klärung des PC-Defektes und der funktionellen Beschreibung von *hbn* für die Entwicklung des embryonalen PC stand die Erkenntnis, dass Hbn insgesamt in 13 NB in allen während der Entwicklung mit dem PC assoziierten Domänen nachgewiesen werden konnte (Abb.5.1,A). Ein Vergleich mit der Expression von *Wg* und *tlllacZ* (Urbach und Technau, 2003) bestätigte darüber hinaus die Zugehörigkeit der NB zum Protocerebrum. Ein Vergleich mit *svplacZ* (Kunz et al., 2012) lieferte den ersten Hinweis auf Hbn-Expression in PK-NB, die ebenfalls im anterioren PC situiert sind.

Ein zusätzlicher Aspekt ist durch die Identifizierung von Hbn-positiven GMC im ventralen und dorsalen Cortex des PC gegeben, was zwangsläufig eine Proliferation von Hbn-positiven Progenitorzellen in diesem Bereich bedingt. Nachfolgende Experimente mit anti-pH3 als Mitosemarker bestätigten, dass ab ES 11 im anterioren PC vermehrt Proliferation in Hbn-positiven Zellen vorliegt (Abb.5.1,B). Diese Region, die als anteriore Spitze der Neuraxis bezeichnet wird, entspricht dem proliferativen Zentrum des PC, welches durch Photoaktivitäts-Studien in anderen Untersuchungen identifiziert wurde (Robertson et al., 2003). In diesen Studien wurde durch die gezielte Belichtung von Stammzellen des PNE die Freisetzung von injiziertem und geblocktem Gal4 erreicht, wodurch in bestimmten Arealen ein UAS-Transgen mit Fluoreszenzmarker aktiviert und durch Mikroskopie in seiner Entwicklung verfolgt wurde. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Gehirn durch fünf voneinander unabhängige, proliferative Zentren aufgebaut wird, von denen eines die Zellen des anterioren PC produziert. In dieser Domäne konnte auch die Bildung des Pilzkörpers ausgehend von den photoaktivierten Zellen beobachtet werden (Robertson et al., 2003).

Diese Daten stimmen mit der detektierten Proliferation von Hbn-positiven Stamm- und Progenitorzellen im Hinblick auf ihre Verteilung und Bildung von Lineages im anterior-dorsalen- und ventralen-PC überein, wie es auch für die dort befindlichen Hbn-positiven PK-NB zutrifft.

Als endgültige Ursache für den zellulären Verlust konnte nicht der Ausfall von proneuraler Genaktivität und damit einhergehendem Verlust von delaminierten NB, wie es für KLG-Mutanten gilt und in der vorangegangenen Arbeit angenommen wurde, sondern das Auftreten von massiver Apoptose in der frühen Gehirnentwicklung gefunden werden. Der betroffene Bereich umspannt die anteriore Spitze der Neuraxis von lateral nach medial und von ventral nach dorsal (Abb.5.1,C).

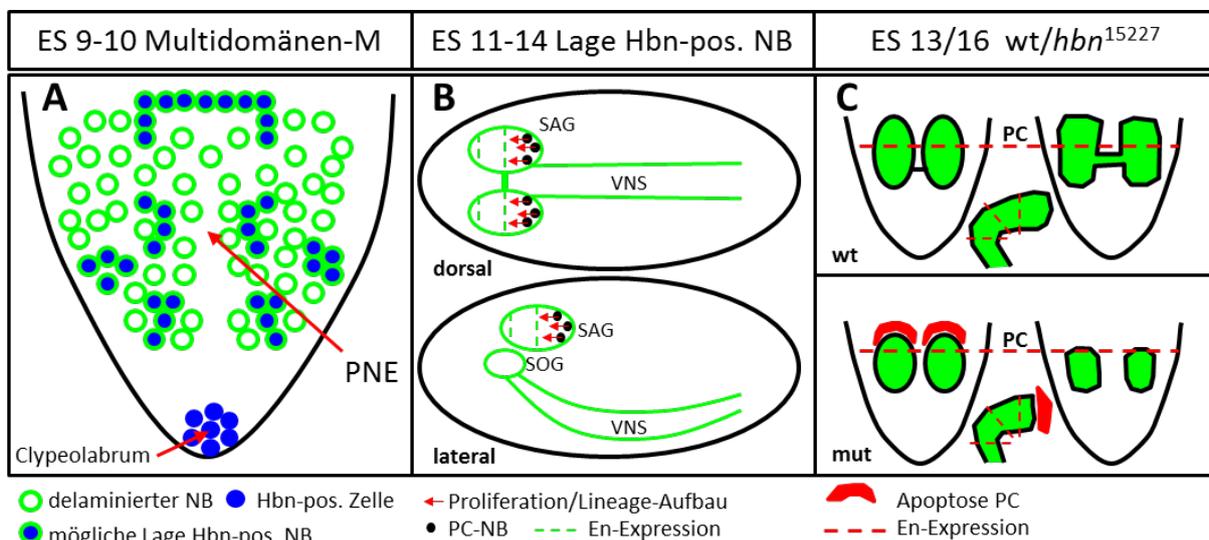


Abb.5.1: Lage Hbn-pos. NB im Neuroektoderm, Proliferation während der Hemisphärenbildung und Apoptose in *hbn*-Mutanten. (A) Schematische Darstellung des Multidomänenmusters in *wt*-Embryonen. Grüne Kreise zeigen NB des PNE (nach HRP-Färbung), blau ausgefüllte markieren die Hbn-positiv markierten NB in den abgrenzbaren Domänen des Hbn-Musters, die zur Entstehung des PC beitragen. (B) Dorsale (oben) und laterale (unten), schematische Darstellung des NS von *Drosophila*. Gestrichelte, grüne Linien markieren die Neuromergrenze von PC und DC. Schwarze Punkte zeigen die Lage von Hbn-positiven Stamm/Progenitorzellen im anterioren Cortex des PC. Rote Pfeile zeigen die Richtung der Lineagebildung durch proliferierende Hbn-positiv markierte Zellen an der anterioren Spitze der Neuraxis. (C) Schematischer Vergleich der *wt*- und *hbn*-mutanten Gehirnentwicklung in dorsaler und lateraler Ansicht in ES 13 (links) und ES 16 (rechts). Rote Markierungen zeigen den Bereich, der durch Apoptose deletiert wird. Gestrichelte, rote Linien an lateraler Darstellung zeigen die Expression von En an den Neuromergrenzen, fette Linie zeigt die Grenze des PC in anterior-dorsaler Darstellung.

Aus diesen Daten kann nun zusammenfassend geschlossen werden, dass an der Entwicklung des PC Hbn-positiv markierte NB und insbesondere von diesen gebildete GMC beteiligt sind, die im ventralen und dorsalen Anteil des SAG zum Aufbau von Lineages beitragen. Exakt dieser Bereich ist durch die in Mutanten vorgefundene Apoptose betroffen und daher deletiert, was zum Fehlen der PC-Bereiche führt, weshalb bei Untersuchung mit dem neuronalen Marker HRP bereits ab ES 12 im anterioren PC Kerben zu erkennen sind. In diesem

Zusammenhang stellt der Verlust des Pilzkörpers in *hbn*-Mutanten eine weitere strukturelle Aberration dar, die nicht hinreichend ist, um den gesamten Phänotyp zu bedingen, da sonst nur eine strukturelle Aberration im ventralen Areal vorliegen würde. Die detaillierten Analysen durch Kombination verschiedener neuronaler Marker belegten jedoch, dass Lineages um den gesamten Cortex des PC betroffen sind, da in vielen Fällen dort weder Axontrakte noch der PCN sowie die P4- und P5-Pioniercluster detektiert wurden. Die bei der wildtypischen Analyse gefundene Verteilung Hbn-positiver Lineages im anterioren PC stimmt somit mit dem in *hbn*-mutanten Embryonen deletierten Bereich des Gehirns überein.

Noch nicht hinreichend geklärt ist, in welchem Ausmaß der *hbn*-Phänotyp das PC tatsächlich betrifft, ob z.B. bereits bekannte Marker des PC wie der En-Kopffleck bzw. das Neuromergrenzen-Muster von En (Hirth et al., 1995; Schmidt-Ott et al., 1994; Schmidt-Ott und Technau, 1992; Younossi-Hartenstein et al., 1996) oder die drei für das PC charakteristischen Bsh-positiven Zellcluster (Jones und McGinnis, 1993; Richter et al., 1998) noch vorhanden sind. Es stellt sich ebenfalls die Frage, ob die Expression von *otd* und *wg* im verminderten PC der *hbn*-Mutanten Embryonen noch teilweise vorhanden ist. Diese beiden Faktoren besitzen eine weitgehend vergleichbare Expression im anterioren PC und zeigen in mutanter Situation im Vergleich mit *hbn*-Mutanten die ähnlichsten phänotypischen Aberrationen im PC. Interessanterweise werden bei Hbn/Wg-Färbungen des PNE Hbn/Wg- positive Zellcluster ausgemacht, die Hbn/Wg- positive NB enthalten. *Wg* selbst wird in sechs PC-spezifischen NB exprimiert. *Wg*-Mutanten zeigen wie *hbn*-Mutanten einen Wegfall des PC, der durch Apoptose bedingt ist (Richter et al., 1998). Im Unterschied zu den *hbn*-Mutanten wird Apoptose allerdings erst in der späten Gehirnentwicklung angetroffen, wodurch die Hälfte des PC, bis zum En-Kopffleck, verloren geht. Eine Rettung dieses Phänotyps kann jedoch nur durch ektopische Expression während der Delamination der NB erfolgen, weshalb man von einer Funktion von *Wg* für die Festlegung des Zellschicksals ausgeht und eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung und Bildung des PC annimmt.

In lateralen Aufnahmen der *hbn*-Mutante wird häufig eine eher senkrechte Anordnung des supraoesophagealen Ganglions festgestellt, welche auch in *otd*-mutanten Gehirnen vorzufinden ist. Worauf dieses Recken des Gehirns zurückzuführen ist, bleibt unbekannt, denn die detaillierten Analysen der *hbn*-Mutanten zeigten diesbezüglich keinen Anhaltspunkt. Auch standen die ansonsten beobachteten phänotypischen Veränderungen wie Deletionen und Strukturverlagerungen nicht in Zusammenhang mit dem Auftreten

dieser Veränderung. Eher lässt sie sich selbst als variable phänotypische Ausprägung betrachten, wodurch besonders in anterior-dorsalen Aufnahmen teilweise große Unterschiede bei den Aufnahmen *hbn*-mutanter Gehirne zu beobachten sind. Die Veränderung der Lage der optischen Lobe oder auch des Bolwig-Nervs lässt sich durch die vorgenommenen Untersuchungen noch nicht ursächlich erklären.

Grundsätzlich zeichnet sich Hbn durch seine Expression in 13 NB und daraus gebildeten GMC während der Entwicklung des embryonalen Gehirns somit als Stammzell-spezifischer Faktor aus. Eine wichtige Fragestellung hinsichtlich der NB bezieht sich auf deren gesamte TF-basierte Identität. Bisher konnten die NB mittels getätigter Dpn/Hbn-Färbungen detektiert und durch panneurale Marker im Bereich des PC während der Gehirnentwicklung verfolgt werden (Daten nicht gezeigt), eine eindeutige Identifizierung einzelner NB war jedoch nur für die PK-NB durch Lage und Markervergleich möglich. Die Klärung der übrigen Hbn-positiven NB des PNE könnte im Vergleich mit weiteren der bereits von Urbach und Technau, 2003 aufgedeckten Faktoren erfolgen. Somit lassen sich zukünftig die NB in Bezug zu den entwickelten Lineages setzen und dadurch rückschließend bereits getätigten Lineage-Kartierungen (Sprecher et al., 2007) zuordnen. Somit könnten sowohl Hbn- als auch Drx-positive NB identifiziert werden. Ebenso ließen sich jetzt auch die dorso-medialen NB durch Earmuff-AK (Janssens et al., 2014) und Tll-AK (Gudrun Viktorin, persönliche Kommunikation) eindeutig identifizieren und während der Entwicklung verfolgen. Diese DM-NB spielen neben den übrigen PC-Neuroblasten eine besondere Rolle, da die Expression der 57B-TF in DM-Anteilen auch in larvalen Stadien weitergeführt wird.

Zusammenfassend kann für die Entwicklung des embryonalen Gehirns, besonders des PC, die Funktion von Hbn als regulatorischem Faktor beschrieben werden, der Stammzellen- und Progenitorzellen des PC identifiziert und das Überleben der von ihnen gebildeten Lineages garantiert, was zum Erhalt des PC beiträgt.

5.2 Die Entstehung der präoralen Hirnkommissur

Neben den PC-Defekten wurde in der *hbn*-Mutante die fehlende PHK beobachtet. Wird die Entwicklung der Hirnhemisphären betrachtet, fallen die Hbn-positiven Zellen im Zentrum der Mittellinie ab ES 12 zwischen den posterior-medialen Kanten der Hirnhemisphären auf, welche in Zusammenhang mit FasII-markierten Pionierneuronen stehen, die eine gerüstbildende Funktion in der Entwicklung des Gehirns ausüben (Dissertation Petra Kaspar, 2008; Nassif et al., 1998). Diese Neurone sind an der Bildung der präoralen Hirnkommissur

beteiligt, welche die Hemisphären im PC verbindet. Hbn- und Hbn/FasII-positive, interhemisphärische Zellen legen hier eine zelluläre Brücke an, welche Axone der beiden Hemisphären nutzen, um durch interhemisphärische Projektionen eine Kommissur auszubilden (Dissertation Petra Kaspar, 2008).

Diesbezüglich konnte jetzt die Bildung der Kommissur vom Auftreten der Vorläuferstruktur bis zu ihrer vollkommenen Ausbildung, im Detail auf eine neue Art erforscht werden, da zusätzlich der von Therianos et al., 1995 verwendete Marker HRP eingesetzt wurde.

Ein Ziel war es, bereits bekannte Untersuchungsstrategien (Nassif et al., 1998; Therianos et al., 1995) mit der Beobachtung von Hbn-positiven Pionierzellen während der Kommissurbildung zu kombinieren und die Dokumentation zu erweitern, da eine detaillierte, komplette Betrachtung der Ereignisse im Mittellinienspalt während der Entwicklung der PHK bisher nicht vorlag. Weiter sollte auch die Verteilung der Gliazellen gegenüber Hbn-positiven Neuronen betrachtet werden, da diese ebenfalls strukturelle Komponenten der Traktbildung darstellen (Therianos et al., 1995; Wildemann et al., 1997). Abbildung 5.2 stellt die gefundenen Zusammenhänge bei der Bildung der präoralen Kommissur schematisch dar.

Der Beginn der Kommissurbildung zeigt die FasII-positiven P2m-Gründerzellen zusammen mit den HRP-markierten Mittellinienvorsprüngen. Hbn wird hier sowohl in FasII-positiven Gründerzellen exprimiert als auch zusätzlich in ortsnahen Neuronen, die durch HRP- und ELAV-Markierung identifiziert sind. Ausgehend von diesem Aufbau aus verschiedenen Neuronen und wenigen Gliazellen, die hier erstmals im räumlichen Vergleich mit den Hbn-positiven Neuronen detektiert wurden, erfolgt die erste beobachtbare Entstehung von in die Mittellinie gerichteten HRP-positiven Wachstumskegeln und einer FasII/Hbn-positiven Zelle an der Spitze des Vorsprungs mit ebenfalls einem Wachstumskegel, der jedoch nicht die vorderste Position einnimmt (Abb.5.2,A). Mit zunehmender Anzahl und Länge der HRP-positiven Wachstumskegel, die von diesem Vorsprung zur Mittellinie ausgesandt werden, beginnt sich der Vorsprung in die Mittellinie zu strecken. Die übrigen Hbn-positiven Zellen werden auf beiden Seiten hinter der FasII/Hbn-positiven Pionierzelle in einer Reihe angeordnet, wobei eine unterschiedliche Anzahl an weiteren Hbn-positiven Zellen in den verschiedenen Spezimen festgestellt wurde, insgesamt meist vier Neurone jeweils zu beiden Seiten der Mittellinie (Abb.5.2,B). In diesem Zusammenhang interessant war auch die Entdeckung weiterer, im angrenzenden Protocerebrum situierter, Hbn-positiver Neurone im ventralen und dorsalen Areal sowie die Entdeckung unterschiedlicher Konfigurationen in der

Anordnung der Hbn-positiven Brücken- und ortsnahen Neurone (Daten nicht gezeigt), sowie weitere Hbn-positive Gründercluster, die an der Ausbildung der DCT beteiligt sind.

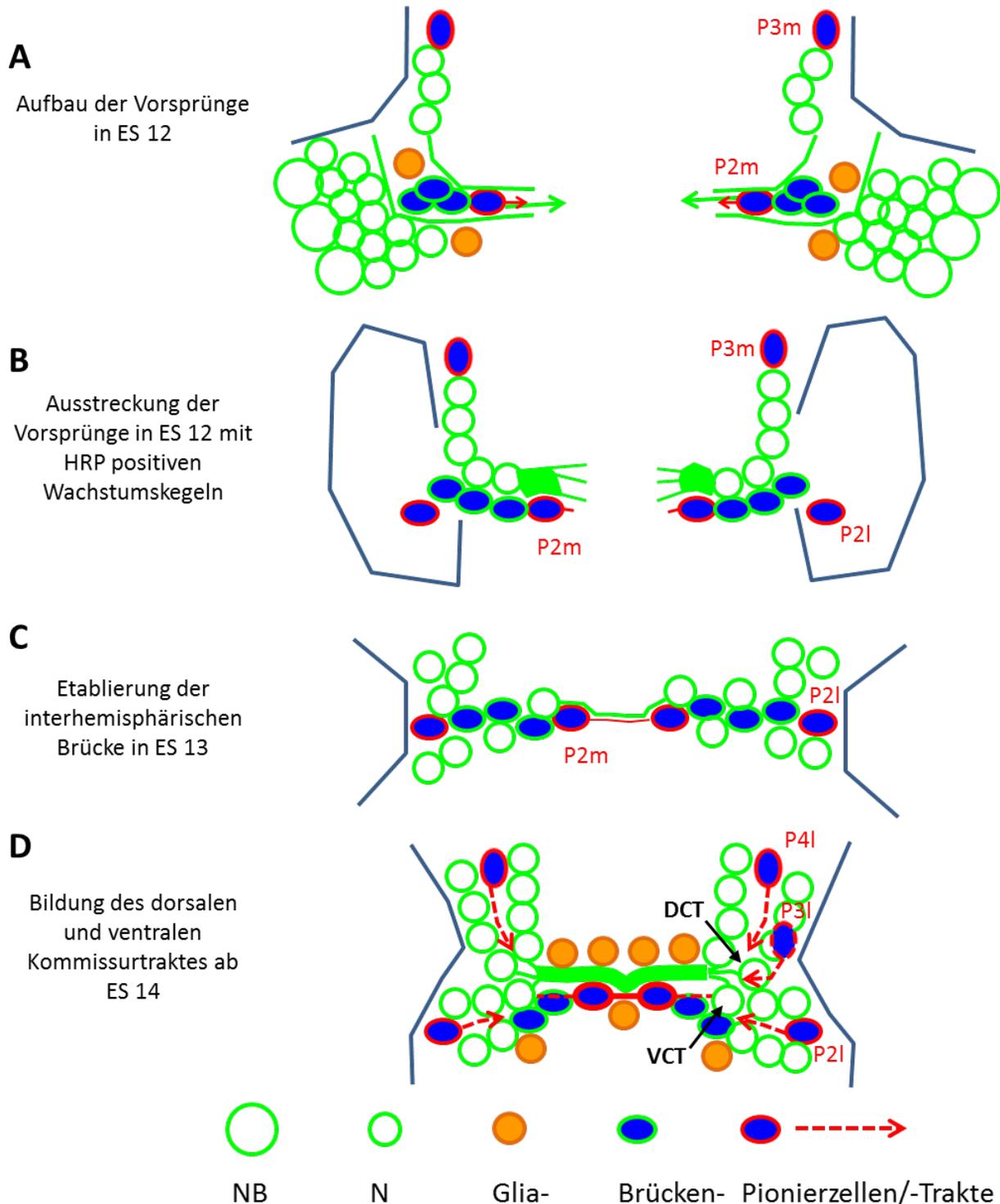


Abb.5.2: Schematische Darstellung der Kommissurbildung durch FasII-pos. Gründerzellen und HRP-pos. Trakte. (A) Hemisphärenvorsprünge in ES 12. (B) Verlängerung der Vorsprünge zur Mittellinie in ES12. (C) Knüpfung der interhemisphärische Brücke in ES 13. (D) Bildung des DCT und VCT ab ES 14. Grüne und rote Pfeilspitzen stellen die Wachstumskegel dar, gestrichelte, rote Pfeile die Projektionsrichtungen von DCT und VCT (schwarze Pfeile). Gestrichelte, rote Umrandung des P3I-Pionierclusters deutet dessen Lage in einer anderen Fokusebene an. Graue Grenzlinien verweisen auf nicht eingezeichnete Gehirnteile.

Die Wachstumskegel des verlängerten Vorsprungs treffen im Zentrum der Mittellinie zusammen, dort kurze Zeit später auch die FasII/Hbn-positiven Frontzellen (Abb.5.2,C). Zu diesem Zeitpunkt ist die HRP-positive, interhemisphärische Brücke aus Hbn/HRP-positiven Zellen erstellt, die FasII/Hbn-positiven Pionierneurone liegen nahe der Mittellinie. Diese Struktur stellt den Startpunkt für weitere HRP-positive Trakte dar, die an der interhemisphärischen Zellbrücke anterior einwachsen, was sich durch eine stetige Verdickung der Kommissur zeigt (Abb.5.2,C).

In der nun folgenden Expansionsphase der Kommissur verbleiben die Hbn-positiven P2m-Gründerzellen um das Zentrum der Mittellinie und zeigen eine verstärkte FasII-Färbung. Während der Bildung der dorsalen und des ventralen Kommissurtraktes, ausgehend von den P3/4-Gründerclustern bzw. den P2I und D/T-Gründerclustern, die ebenfalls FasII-positiv sind (Nassif et al., 1998), verbleiben diese mit den übrigen Hbn-positiven Zellen auf der interhemisphärischen Brücke (Abb.5.2,D). Diese Konformation bleibt so lange erhalten, bis alle interhemisphärischen FasII-Trakte (DCT, VCT) ausgebildet sind. Erst wenn sowohl die dorsalen als auch der ventrale Kommissurtrakt als FasII-positiv Faszikel in der Kommissur angelegt sind, beginnen sich die FasII/Hbn-positiven Pionierzellen mit den übrigen Zellen der ehemaligen interhemisphärischen Brücke zum Ursprung der Kommissur, also zu beiden Seiten der Mittellinie zurückzuziehen. Dort verbleiben prominent gefärbt die FasII/Hbn-positiven P2m-Gründerzellen, die nach Fusion mit dem P2I-Pioniertrakt den vollständigen interhemisphärischen ventralen Trakt in der Kommissur gebildet haben.

Weiter fielen in diesem Zusammenhang die im Protocerebrum situierten Hbn-positiven Neurone auf, die mit der Expression von *apGal4* kolokalisieren. Der Homeodomänen-TF *Apterous* selbst wird in 200 PC-Neuronen exprimiert, die mehrheitlich interhemisphärische Projektionen aufweisen. Diese Neurone wurden bereits in früheren Untersuchungen mit der Expression von *Ey* und einer ersten Traktbildung der PHK in ES 14 in Zusammenhang gebracht (Boyan et al., 2003). Exakt diese *apGal4/Ey*-positiven, interhemisphärisch projizierenden Neurone wurden ebenfalls mit Hbn-Expression im ventralen Cortex vorgefunden. Ferner zeigen auch *apGal4/Hbn*-positive Neurone im dorsalen Anteil des PC interhemisphärische Projektionen. Die Untersuchung von *apterous*-Mutanten zeigte bei der Kommissurbildung Defekte. Letztere gehen auf Wegfindungsstörungen der Ap-positiven Neurone zurück, welche zwar korrekt im PC situiert sind, ihre Axonfaszikel jedoch häufig das zugehörige Axonbündel in der PHK verlassen und daher keine interhemisphärische

Projektion erreichen (Herzig et al., 2001). Eine Funktion von Apterous bei der Axonwegfindung konnte ebenfalls festgestellt werden (van Meyel et al., 2000), hier auch besonders im VNS, wo ebenfalls die Ap-positiven Neurone gebildet werden, jedoch nicht korrekt faszikulieren (Lundgren et al., 1995). Diese Zusammenhänge machen auch die Expression von Hbn in diesen protocerebral befindlichen Neuronen mit Kommissurprojektionen für weitere Untersuchungen interessant, in denen die Kommissurentwicklung ausgehend von *apGal4*-markierten Zellen betrachtet wird. Dadurch könnte eventuell eine Lineage-Zuordnung der HRP-positiven Wachstumskegel, die die zelluläre Brücke knüpfen oder auch der weiteren Trakte, die nach der Brückenbildung in die Mittellinie einwachsen, zu Ap- bzw. Ap/Hbn-positiven Lineages des PC erfolgen. Außerdem könnte somit eine weitere Funktion von Hbn bei der Erstellung und Wegfindung von interhemisphärischen Projektionen des PC aufgedeckt werden.

In der vorangegangenen Arbeit wurden einige Annahmen getätigt, die aufgrund der neuen Erkenntnisse zur Kommissurbildung nun kritisch betrachtet werden sollten. Ein Hauptdiskussionspunkt der vorherigen Untersuchungen war die Bewertung der zellulären Bewegung der P2m-Pionierneurone in die Mittellinie als Migration bzw. Wanderung. In diesem Zusammenhang wurde des Weiteren angenommen, dass ein Aufeinandertreffen der FasII-positiven Wachstumskegel einer Mobilisierung der P2m-Gründerzellen vorausgeht. Durch die hier vorliegenden Daten konnte dies jedoch widerlegt werden, da die initiale Knüpfung der interhemisphärischen Brücke von HRP-positiven Wachstumskegeln ausgeht und nicht von den Pionierzellen selbst. Die Mobilisierung der Pionierzellen scheint darüber hinaus gleichzeitig mit der Verlängerung der HRP-positiven Hemisphärenvorsprünge zu erfolgen, was im Widerspruch zu einer aktiven Wanderung bzw. Migration steht, sondern einen passiven Transport darstellt. Weiter wurde diskutiert, ob die Aufreihung der Hbn-positiven Brückenzellen eventuell durch das Anschalten der Hbn-Expression in bereits vorliegenden Zellen nacheinander erfolgt, bis eine bestimmte Konformation erreicht ist. Anhand der detaillierten Betrachtung der Hemisphärenvorsprünge in dieser Studie kann geschlossen werden, dass die Zellen bereits zu Beginn vollständig im Hemisphärenvorsprung vorliegen und sich während der Ausstreckung hinter der Pionierzelle auf dem HRP-positiven Substrat anordnen. Ferner wurde ursprünglich überlegt, ob die Hbn-positiven Brückenzellen vor bzw. während der Knüpfung der interhemisphärischen Brücke durch Proliferation neu entstehen. In den jetzt durchgeführten Proliferationsanalysen und Untersuchungen zur

Dynamik des Expressionsmusters konnte keine entsprechende Proliferation von Hbn-positiven Progenitorzellen in diesem Bereich oder Zeitraum gefunden werden. Die dynamische Veränderung des Expressionsmusters zeigte vielmehr eine Ausstreckung von posterioren Anteilen der Mittelliniendomänen im ES 11-12, die zur Anordnung der Hbn-positiven Zellen im Hemisphärenvorsprung führt. Einzig in tieferen Ebenen des SAG, somit dorsal der Hemisphärenvorsprünge konnte eine Drx/Hbn-positive Stammzelle durch anti-Dpn-Färbung und Größenkriterium bestimmt werden, die eventuell zur Produktion von Hbn-positiven Zellen des Vorsprungs beiträgt.

Ein Einwachsen weiterer HRP-positiver Kommissurtrakte wird erst nach Bildung der interhemisphärischen Brücke beobachtet. In der vorangegangenen Arbeit wurde diesbezüglich eine attraktive Wirkung der Pionierzellen auf nachfolgende kommissurale Trakte diskutiert. Dort konnte diese Wirkung aufgrund der verwendeten FasII-Färbung allerdings nur bezüglich VCT und DCT untersucht werden. In dieser Arbeit konnte jedoch eine entscheidende Beobachtung bezüglich eines vorliegenden attraktiven Effektes auf übrige Trakte gemacht werden. Die Untersuchung der P[acman]-19C04 Transformante zeigte nämlich eine Verstärkung der Kommissur sowie eine Raffung dieser an. Dies dürfte auf der zusätzlichen Einbringung einer weiteren *hbn*-Genkopie beruhen, wodurch die attraktive Wirkung von Hbn-positiven Pionier- und Brückenneuronen verstärkt und dadurch eine vermehrte Traktbildung ausgelöst wird. Somit sollten die FasII/Hbn-positiven Pionierzellen eine attraktive Wirkung auf alle nach Bildung der zellulären Brücke einwachsenden interhemisphärischen Kommissurtrakte besitzen.

Interessant wäre auch die zeitliche Betrachtung der Kommissurbildung in Zusammenhang mit den Aufenthaltsorten der Gliazellen, da in *Drosophila* bereits der Oesophagus und die umgebenden Gliazellen als wichtiges Substrat für die Bildung der kommissuralen und longitudinalen Trakte identifiziert wurden. Gliazellen zeigen ebenfalls bei der Bildung des Corpus Callosum in der Maus eine Beteiligung (Chinn et al., 2014), sodass eventuell konservierte Funktionen der Gliazellen bei der Bildung des Balken bereits in *Drosophila* untersucht werden können. Bisher konnten in der Umgebung des Hemisphärenvorsprungs sowie später in der Expansionsphase der Kommissur Gliazell-Cluster im Zentrum der Mittellinie, an den Hemisphären und anterior an der Kommissur gezeigt werden (Abb.5.2,A,D). Die anterior an der Kommissur aufgereihten Gliazellen wurden bereits in verschiedenen Untersuchungen beobachtet (Page, 2002; Panganiban und Rubenstein, 2002),

eine Funktion bei der Etablierung der interhemisphärischen Brücke bzw. als Signalzentrum für die einwachsenden Axontrakte konnte bisher nicht bestätigt werden. Mittels UAS/Gal4-gesteuerter Markierung der Gliazellen durch *repoGal4xUAScd8GFP*, könnte gegebenenfalls der Aufbau einer zur Unterstützung der interhemisphärischen Brücke gebildeten Struktur aus Gliazellen aufgedeckt werden. Durch Ausfall von Gliazellen in bestimmten Defizienzen oder Mutationen könnte ebenfalls ein Ausbleiben der Knüpfung der interhemisphärischen Brücke beobachtet werden, ähnlich wie bereits Defekte bei der Kommissurbildung durch Fehlen des Vorderdarm-Signalzentrums in *hedgehog*-Mutanten gezeigt wurde (Page, 2002), was auch in höheren Organismen der Fall ist.

Die Ausbildung von Hemisphärenvorsprüngen in den *hbn*-Mutanten (Daten nicht gezeigt) belegt, dass *hbn* für diese Strukturbildung nicht benötigt wird. Das Vorhandensein von Teilkommissuren in *hbn*-Mutanten deutet darauf hin, dass die Mobilisierung der Vorsprünge und eine Verknüpfung HRP-positiver Kommissuranteile ebenfalls *hbn*-unabhängig erfolgen können. Die in der *hbn*-Mutante vorgefundene Teilkommissurbildung lässt sich nun möglicherweise durch die Kenntnis der „HRP-vermittelten“-Erstknüpfung der interhemisphärischen Brücke erklären. So kommt es vermutlich in manchen *hbn*-mutanten Embryonen durch die Verlängerung und Verbindung der Hemisphärenvorsprünge auch ohne vollständige Mobilisierung der Pionierneurone zur Ausbildung eines einzelnen Kommissurtraktes, dem nachfolgend durch den Mangel der attraktiven Wirkung Hbn-positiver Pionierneurone ein weiteres Einwachsen von interhemisphärischen Trakten verwehrt bleibt. Dies zeigt sich ebenso in der *commissureless*-Mutante, die auch nur eine dünne Kommissur mit einem der drei FasII-positiven Trakte und wenigen HRP-positiven, interhemisphärischen Axonen aufweist. In der *comm*-Mutante konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls nicht zur Mobilisierung der Hbn-positiven Pionierneurone kommt (Dissertation Petra Kaspar, 2008), weshalb nur die Verknüpfung von Anteilen des Hemisphärenvorsprungs zur Bildung der Teilkommissur beitragen kann.

Ein breiter Ansatz, der in der vorangegangenen Arbeit zur Anwendung kam, war die Untersuchung von Defizienzstämmen hinsichtlich eines Defektes der präoralen Hirnkommissur, um weitere Gene zu finden, die an der Bildung der selbiger beteiligt sind. Ein Ziel dieser breiten Untersuchung war, dass nach Auffinden eines genetischen Treibers, der die Hbn-positiven Pionierzellen markiert, verschiedene der bereits auf diese Weise gefundenen Gene über einen RNA-Interferenz-Ansatz spezifisch in diesen Zellen

herunterreguliert werden könnten. Dadurch wäre ein eventuell veränderter Aufbau oder Ausfall der Kommissur vor dem Hintergrund beteiligter Faktoren und ihrer Funktion für die Mobilisierung der Pionierzellen zu untersuchen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden Reporterkonstrukte, deren Sequenzen im Überlappungsbereich der Rettungskonstrukte liegen, hergestellt. Eines der Konstrukte zeigte dabei tatsächlich Aktivität in den Pionierzellen der PHK. Leider stellte sich heraus, dass ein embryonaler Knock-down vermittelt dieses Treibers nicht funktioniert, da das entsprechende Gal4-Konstrukt zu viel Zeit benötigt, um eine ausreichende Aktivität zu entwickeln. So war es nicht möglich, den embryonalen Kommissurphänotyp durch Verwendung des P2m-spezifischen Konstruktes und unter Einsatz von *hbn*-shRNA (Dietzl et al., 2007) zu reproduzieren. Allerdings gelang es die Kommissurentwicklung durch das *hbn*-35A03Gal4-Konstrukt nachzustellen und zu vergleichbaren Daten zu kommen, wie sie in der Untersuchung zur Kommissurbildung generiert wurden. Abschließend zeigte eine live-imaging-Aufnahme dieses Konstruktes, dass die Bildung der Kommissur in Bezug auf die Bewegung und Verknüpfung der Pionierneurone im Einklang mit den übrigen gefundenen Daten steht.

Eine zur Untersuchung der präoralen Hirnkommissur in dieser Arbeit durchgeführte, weitere Untersuchung der Defizienzen mit *hbn*-ähnlichem Phänotyp (Dissertation Petra Kaspar, 2008) zeigte nach Analyse mit FasII, Hbn und HRP als Marker neue Erkenntnisse (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte durch die Verwendung von HRP in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass keinesfalls nur die PHK in vielen der vormals beurteilten Defizienzen einen Defekt zeigt, sondern auch das SAG, hier auch teilweise im PC. Die erstellten Daten dienen in einer weiteren Arbeit zur Eingrenzung der in Frage kommenden Gene der Ausgangsdefizienz durch kleinere Defizienzen. Dabei konnte bereits ermittelt werden, dass die gezeigten Phänotypen teilweise eine Kombination von unterschiedlichen Phänotypen darstellten, die in den kleineren Defizienzen unabhängig voneinander wiedergefunden wurden (Bachelorarbeit Olga Hartwig, 2014). Eine Konsequenz dieser Untersuchung bestand in der Aufnahme eines „next-generation DNA sequencing“-Ansatzes (Rizzo und Buck, 2012), der die Veränderung der Genexpression in Abhängigkeit von der *hbn*-Mutation aufdecken sollte.

Die Zusammenführung der durch diese experimentellen Ansätze gewonnenen Daten könnte zukünftig die Faktoren, die an der Bildung der präoralen Hirnkommissur beteiligt sind, aufdecken, da sich entsprechende Phänotypen durch die in dieser Arbeit etablierte

Untersuchungsstrategie im Vergleich zu *hbn*-Mutanten detailliert analysieren und bewerten lassen.

5.3 Vergleich von *hbn* mit Kopflückengenen in der embryonalen Gehirnentwicklung

Analysen der Expression und Funktion des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors Hbn während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* zeigten eine Beteiligung an der Nervensystementwicklung, die derjenigen von Kopflückengenen ähnelt (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Gestützt wird diese Aussage durch die früh in der Embryonalentwicklung beginnende Expression von Hbn zunächst im anterior-dorsalen Bereich (der Kopfgregion), die nach Beginn der Neurogenese (ES 9) mit neuronalen Markern Kolokalisation zeigt und dann ausschließlich im procephalen Neuroektoderm, der embryonalen Anlage des *Drosophila*-Gehirns (Campos-Ortega, 1995), zu finden ist. Ort der vornehmlichen Aktivität von Hbn stellt das supraoesophageale Ganglion dar. Dort konnte im Wildtyp die Hbn-Expression in den Neuromeren PC, DC und TC durch Co-Färbungen mit dem segmentalen Marker Engrailed (Hirth et al., 1995) und im Vergleich zu der Expression des Kopflückengens *ems* (Walldorf und Gehring, 1992; Hirth et al., 1995) gezeigt werden. In der vorangegangenen Arbeit von Petra Kaspar wurde aufgrund des Expressionsmusters und der in Mutanten auftretenden Phänotypen ein Vergleich von *hbn* mit den bekannten Kopflückengenen (KLG) *btd*, *ems*, *otd*, *slp* und *tll* angestrebt und letzten Endes versucht, die Frage zu klären, ob es sich bei *hbn* eventuell um ein neues, in dieser Rolle noch nicht beschriebenes KLG handelt. Im Folgenden sollen die Argumente, die für und gegen diese Hypothese sprechen auf Grundlage der in dieser und der vorangegangenen Arbeit gewonnenen Ergebnisse weiter diskutiert werden.

Eine Gemeinsamkeit der bekannten KLG und *hbn* liegt in einer blastodermalen, streifenartigen Expression im Kopfbereich des Embryos vor (Dalton et al., 1989; Finkelstein und Perrimon, 1990; Walldorf und Gehring, 1992). In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass die KLG selbst nicht ausschließlich ein streifenähnliches Muster im Kopfbereich zeigen. So ist beispielsweise für *ems* eine ringförmige Expression festgestellt worden. Auch zeigen weitere Gene wie *toy* und *erm* eine ähnliche Expression im Kopfbereich des Embryos (Blanco und Gehring, 2008; Pfeiffer et al., 2008), gehören jedoch nicht zu den KLG. Allgemein wird für viele Gene, die an der Gehirnentwicklung beteiligt sind, auch eine Expression in der Kopfgregion festgestellt, die anhand ihrer Lage ebenfalls mit den zukünftig daraus entstehenden Strukturen verknüpft werden kann. Somit stellt das Expressionsmuster

zwar ein Vergleichskriterium dar, ist für eine eindeutige Eingruppierung jedoch keinesfalls hinreichend. Allenfalls kann aufgrund vorliegender Schicksalskarten eine zeitlich und räumlich ähnliche Expression von Hbn und den KLG festgestellt werden. Der Vergleich der Expression von Hbn gegenüber Vertretern des RDGN zeigt ebenfalls vergleichbare Muster im Bereich des SAG während der Entwicklung, sodass *hbn* von diesem Standpunkt aus betrachtet nur bedingt Ähnlichkeiten zu den KLG besitzt.

Sowohl KLG- als auch *hbn*-Mutanten zeigen Kutikuladefekte der geschlüpften Larven, genauer Defekte des cephalopharyngealen Skeletts (Finkelstein und Perrimon, 1990; Grossniklaus et al., 1992; Dissertation Petra Kaspar, 2008; Strecker et al., 1988; Walldorf und Gehring, 1992; Wimmer et al., 1993). Diese beruhen, soweit es die KLG anbelangt, auf dem namensgebenden lückenartigen Phänotypen der einzelnen Mutanten, also einer Deletion benachbarter Segmente, die sich in Kutikulapräparationen zeigt, was für eine Vergleichbarkeit spricht. Ein weiterer Aspekt, der sich in den letzten Jahren besonders für *Ems* und *Otd* im Vergleich zu den jetzt vorliegenden Daten bzgl. Hbn ergeben hat, ist die persistierende Expression in larvalen und adulten Geweben, die auch für Hbn gleichermaßen zu beobachten ist. Für *Ems* und *Otd* wurde hier eine konservierte Beteiligung an der Bildung olfaktorischer Organe gefunden, wie sie auch für die homologen Faktoren *Emx* und *Otx* der Maus festgestellt wurde (Blanco et al., 2011; Das et al., 2008; Lichtneckert et al., 2007, 2008; Sen et al., 2010, 2013). *Ems* zeigte sich letzten Endes sogar als Regulator der dorso-ventralen Musterbildung des embryonalen Gehirns im Bereich des DC und TC (Seibert et al., 2009). Im Fall von Hbn müsste eine spezifische Funktion bei der Bildung bestimmter neuronaler Gewebe im Weiteren geklärt werden, um diesen Aspekt vollständig vergleichen und den KLG gegenüberstellen zu können.

Eine weitere Gemeinsamkeit der KLG ist die direkte Regulation von proneuralen Genen wie *l'sc*. Diese Regulation zeichnet sich durch eine Aktivierung proneuraler Faktoren im procephalen Neuroektoderm aus, die in allen Mutanten der KLG in den für die jeweiligen Faktoren spezifischen Expressionsdomänen verloren geht (Younossi-Hartenstein et al., 1997). In den Untersuchungen zur *hbn*-Mutante konnte ein ebensolcher Ausfall proneuraler Genaktivität in zwei Domänen erkannt werden (Dissertation Petra Kaspar, 2008). Zu diesem Aspekt wurde von Petra Kaspar die Überlegung angestellt, dass es sich neben einem direkten regulatorischen Effekt auch um einen sekundären Effekt handeln könnte, der bereits in ES 10 zum Ausfall des *L'sc*-Musters führen könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte in diesem

Zusammenhang jedoch Apoptose als sekundärer Effekt ermittelt werden. Ein apoptotischer Verlust von Zellsubstanz des procephalen Neuroektoderms war in *hbn*-Mutanten bereits in ES 10 zu verzeichnen. Dies stellt einen Unterschied zu den bekannten KLG dar. Somit ist der strukturelle Verlust des PC in *hbn*- und *otd*-Mutanten zwar vergleichbar, lässt sich allerdings auf unterschiedliche Ursachen zurückführen. In Zusammenhang mit dieser Beobachtung erscheint der Vergleich von *hbn* mit KLG nochmals erschwert. Auch der Aspekt, dass insbesondere die KLG *ems* und *otd* (Cecchi et al., 2000) eine starke evolutionäre Konservierung zeigen, die für *hbn* nicht feststellbar ist, spricht gegen die Zuordnung von *hbn* zu den KLG. Somit beschränkt sich die Gemeinsamkeit dieser zu vergleichenden Transkriptionsfaktoren auf das wesentlichste Merkmal, die Homeodomäne, die allen gemeinsam ist. Viele Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren zeigen allgemein eine konservierte Funktion bei der Entwicklung des Nervensystems (Hirth und Reichert, 1999; Lichtneckert und Reichert, 2005; Lichtneckert et al., 2008), was für Hbn in *Drosophila* eindeutig bestätigt wurde.

In der vorangegangenen Untersuchung wurde ein eventueller regulatorischer Zusammenhang zwischen den KLG und *hbn* auf theoretischer Ebene hergestellt. Dabei wurde postuliert, dass die Veränderungen des Hbn-Expressionsmusters in embryonalen Gehirnen wahrscheinlich auf die strukturellen Veränderungen in KLG-Mutanten zurückzuführen sind. Im Verlauf dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von Hbn in *tll*- und *otd*-Mutanten am Ende der Embryonalentwicklung im Vergleich zu den neuronalen Markern FasII und HRP, die auch bei der Analyse des *hbn*-Gehirnphänotyps verwendet wurden, untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich eine wildtypische Expression von Hbn in den jeweils verbliebenen Anteilen des SAG, was einen direkten regulatorischen Einfluss dieser KLG auf Hbn zwar nicht ausschließt, aber eventuell räumlich auf das PC beschränken würde. In Untersuchungen der Reporteraktivität von *tlllacZ* im Vergleich zur Expression von Hbn konnte eine gemeinsame Expression lediglich im Bereich der embryonalen DM-Lineages und wenigen weiteren Zellen des PC beobachtet werden, was einem regulatorischen Zusammenhang im Verlauf der Neurogenese, wie er bisher postuliert wurde, widerspricht.

In der vorangegangenen Arbeit wurde nach statistischer Auswertung ein Fehlen eines frühen Streifens in *hbn*-Mutanten gefolgert. Gleichzeitig wurde der Effekt auf die Gehirnentwicklung ähnlich wie in KLG-Mutanten erst ab der Neurogenese postuliert, da hier erst ab ES 9, dem

Beginn der Neuroblastendelamination, eine Veränderung in weiten Teilen des Expressionsmusters festgestellt wurde (Dissertation Petra Kaspar, 2008). In dieser Arbeit konnte die Existenz eines frühen Streifens in *hbn*-Mutanten nun jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden. Ein tatsächlich feststellbarer Effekt der Mutation auf die Ausbildung des SAG konnte ab ES 12 in allen Gehirnen *hbn*-mutanter Embryonen anhand von HRP-Färbungen ausgemacht werden. Aus den vorliegenden Daten kann nun geschlossen werden, dass *hbn* zwar Schlüsseleigenschaften der KLG zeigt, diese sind jedoch teilweise auf andere Ursachen und/oder Mechanismen zurückzuführen. Somit ist *hbn* als KLG-ähnlich jedoch nicht als tatsächliches KLG zu bezeichnen.

5.4 Die Funktion von *drx* und *hbn* in den Typ-II-Lineages des larvalen Gehirns

In vorangegangenen Studien zu den Transkriptionsfaktoren der 57B-Region des rechten Arms des zweiten Chromosoms konnten embryonale Expressionsmuster im Nervensystem für alle 57B-TF aufgedeckt und untersucht werden (Dissertation Nicole Bach, 2012; Eggert et al., 1998; Dissertation Petra Kaspar, 2008; Walldorf et al., 2000). Das larvale Expressionsmuster dieser Faktoren wurde bisher allerdings nur rudimentär mit Auflichtmikroskopie und unter Verwendung weniger Marker dargestellt (Dissertation Nicole Bach, 2012; Davis et al., 2003; Dissertation Petra Kaspar, 2008).

Ziel dieser Arbeit war daher die genaue Analyse der Expression der Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren *Drx* und *Hbn* in der larvalen Gehirnentwicklung. Dabei stellte sich eine Region gemeinsamer Aktivität heraus, welche sich auf die Typ-II-NB-DM-Lineages bezieht. In allen DM-Lineages fand sich *Drx* mit sehr breiter Expression, *Hbn* hingegen mit geringerem Anteil. Dabei besteht Kolo-kalisation zwischen *Hbn*- und *Drx*-positiven Anteilen in allen DM-Lineages (Abb.5.3). Da *Drx* und *Hbn* bereits embryonal in Stamm- und Progenitorzellen des Gehirns, dort auch in DM-NB, vorgefunden wurden, wurde eine weitere Beteiligung bei der Differenzierung der larvalen DM-Lineages hin zum adulten Gehirn angenommen, was funktionelle Untersuchungen der Faktoren durch klonale MARCM-Analysen interessant machte, um eventuelle Phänotypen der Lineagebildung aufdecken zu können. Dabei wurden analog der embryonalen Funktion zumindest Phänotypen für die Untersuchung von *hbn* hinsichtlich der Ausbildung bzw. des Überlebens der DM-Lineages erwartet. Eventuelle Phänotypen sollten dabei in Bezug zu den bisher in der Literatur bekannten Phänotypen der larvalen Lineagebildung gestellt werden.

Die Erforschung der larvalen Typ-II-Lineages rückte in den Fokus entwicklungsbiologischer Untersuchungen, nachdem man für bestimmte Tumorsuppressorgene (Watson et al. 1994; Woodhouse et al., 1998) Effekte in der Entwicklung des Gehirns von *Drosophila* gefunden hatte, die Eigenschaften humaner Tumorbildung zeigten. Daraufhin etablierte sich *Drosophila* als Modellorganismus für diese Tumore (Tipping und Perrimon, 2014). Weiter zeigte sich, dass Prinzipien, die in der Gehirnentwicklung von *Drosophila* zum Aufbau besonders großer Lineages beitragen auch in den Gehirnen der untersuchten Säuger gelten (Kriegstein et al., 2006; Martinez-Cerdeño et al., 2006; Merkle und Alvarez-Buylla, 2006). Gerade die Regulation des Teilungspotentials der NB, INP und GMC stellt ein wichtiges Forschungsfeld dar, nicht nur wegen ihrer Bedeutung für die Erforschung von ausgebildeten Tumoren, sondern im Detail auch für die Erforschung sog. Tumorstammzellen, die den allgemeinen Ausgangspunkt vieler kanzerogener Prozesse darstellen (Bjerkwig et al., 2005; 2009; Chang et al., 2012; Chia et al., 2008; Januschke und González, 2008). Die asymmetrische Zellteilung zeigte sich hier, wie auch in anderen NB-Lineages, als Schlüssel zur differentiellen Produktion von INP und GMC. Die asymmetrische NB-Teilung bringt eine regenerierte Stammzelle und eine weitere neuronale Progenitorzelle hervor. Eine Reihe wichtiger und konservierter Faktoren spielt hierbei eine bedeutende Rolle zur Begrenzung des Teilungspotentials der Progenitorzellen. In verschiedenen Ansätzen konnten Faktoren ermittelt werden, die während der Teilung des Neuroblasten asymmetrisch an Progenitorzellen weitergegeben werden. Unter diesen Faktoren befinden sich Brain tumor (Brat) und Prospero, die durch Anlagerung an das cytoskelettale Adapterprotein Miranda (Mira) ausschließlich an GMC abgegeben werden (Betschinger et al., 2006; Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Lee et al., 2006; Shen et al., 1997). In der GMC wird Miranda proteolytisch abgebaut, dadurch können Brat sowie Pros in den Kern gelangen, um ihre Eigenschaft als transkriptionelle Regulatoren auszuüben und das Teilungspotential durch Inaktivierung der Identitätsfaktoren des Neuroblasten zu begrenzen. Außer den genannten Faktoren segregiert ebenfalls Numb in die Progenitorzelle, allerdings auf einem Miranda-unabhängigen Weg (Knoblich et al., 1995). Zusammen bilden diese Faktoren den basalen Komplex, der dem apikalen, die Stammzeleigenschaften des NB bewahrenden, Komplex, gegenübersteht (Prehoda, 2009). Zum ersten Mal wurden in larvalen Gehirnen Effekte in Typ-I-NB-Lineages für Brat und Pros beschrieben (Bello et al., 2006; Betschinger et al., 2006; Lee et al., 2006). Typ-I-NB-Lineages, in denen entweder Brat oder Pros nicht asymmetrisch

an die GMC abgegeben wird, zeichnen sich durch die Bildung von ektopischen NB zu Lasten der Neuronenpopulation aus.

Seit der gleichzeitigen Entdeckung der Typ-II-NB-Lineages 2008 durch drei Arbeitsgruppen erfuhren wiederum die Tumorsuppressoren *Brat*, *Pros* und *Numb* besondere Aufmerksamkeit. Durch klonale Analysen und in einem Screen von Neumüller et al., 2011 konnte eine starke, tumorartige Vergrößerung der Typ-II-Lineages gezeigt werden, die auf der Revertierung des Zellschicksals von Progenitorzellen zu ihren direkt vorangehenden Stammzellen beruht. Die Funktionen von *Brat* und *Numb* konnten hier somit in Zusammenhang mit der Differenzierung der Progenitorzellen gestellt werden, denn durch Verlust dieser Faktoren kommt es zur Redifferenzierung der Progenitorzelle (INP) zur eigentlichen Stammzelle (NB), wiederum unter Verlust der gesamten Neuronenpopulation (Bowman et al., 2008). Neben den genannten Faktoren spielen hier auch *Earmuff* und *Klumpfuß (Klu)* eine bedeutende Rolle in der Regulation des INP-Teilungspotentials und der Aufrechterhaltung des Neuroblasten. In *erm*-mutanten Typ-II-Lineages werden ebenfalls ektopische INP vorgefunden. *Erm* begrenzt das Teilungspotential der INP durch *pros*-Aktivierung. Ferner wirkt *Erm* als Antagonist zum Notch-Signalweg und verhindert die Dedifferenzierung der INP, indem es in unreifen INP exprimiert wird und vorübergehend die neuronale Kompetenz zur Reaktion auf NB-spezifische Selbsterneuerungssignale ausschaltet (Janssens et al., 2014; Weng et al., 2010; Xiao et al., 2012). Auch für die durch INP gebildeten GMC gilt die Einschränkung der Teilungsfähigkeit durch nukleäres *Pros* (Abb.5.3). So werden in *pros*-mutanten Typ-II-Lineages ektopische INP beobachtet (GMC→INP), allerdings keine NB, da sich diese INP nicht zu selbigen rückverwandeln, wie es in Typ-I-Lineages für GMC und in *brat*- und *numb*-Mutanten von Typ-II-Lineages für INP der Fall ist.

Im Gegensatz zu den zur Differenzierung beitragenden Faktoren, die das Teilungspotential der INP auf fünf bis sechs Teilungsrunden begrenzen, zählen *Deadpan*, *Klumpfuß*, *Notch* und *Enhancer of split* zu den Faktoren des apikalen Komplexes, die die Stammzellcharakteristika des NB aufrechterhalten. In *dpn*-Mutanten kommt es daher zu einem Verlust von Neuroblasten in larvalen Gehirnen, *klu*-mutante NB erscheinen in ihrem Durchmesser reduziert (Xiao et al., 2012; Zhu et al., 2012). Da der Durchmesser des NB in direktem Bezug zu seinem verbliebenen Teilungspotential steht, wird er daher im Laufe seiner Lineage-Bildung immer kleiner, bis er am Ende der larvalen Entwicklung selbst differenziert und entweder durch Apoptose oder durch symmetrische Zellteilung seine Aktivität beendet. Die

Aktivität der NB wird durch die Entwicklung von Polycomb group-Genen sichergestellt, die die Aktivität von Hox-Genen unterdrücken (Bello et al., 2007; Kuert et al., 2012). Am Ende der Nervensystementwicklung sind es schließlich die Hox-Gene, die das Ende der Proliferation bedingen.

In den untersuchten MARCM-Klonen der mutanten 57B-Allele konnte keine tumorartige Vergrößerung noch eine Verkleinerung der Lineage durch den Verlust von gebildeten Zellen bzw. dem Ausfall von Proliferation festgestellt werden. Die Expression der 57B-TF zeigte auch eine andere Verteilung verglichen mit den oben genannten Faktoren, was unter Rückschluss auf die vorliegenden Daten das Ausbleiben eines solchen Phänotyps erklärt. Daher müssen diese Faktoren in Typ-II- und Typ-I-Lineages andere Funktionen haben, die aufgrund der vorliegenden Daten im Bereich der neuronalen Identitätsbildung zu finden sein könnten.

Diese Hypothese wird durch das Expressionsmuster der 57B-TF unterstützt. Hbn zeigt eine Expression in distalen, Ey-positiven INP, daraus gebildeten GMC und Neuronen der DM-Lineages. Drx wird frühlarval transient und in ausdifferenzierten DM-Lineages direkt im Anschluss an die INP exprimiert, also in GMC, GC und schließlich in Neuronen. Dies bestätigt sich durch die direkte Expression im Anschluss an Dpn-markierte INP in späten L3-Gehirnen bzw. mit teilweiser Überlappung zu Ey-markierten INP, die die zuerst gebildeten INP markieren und somit am distalen Ende des INP-Bereichs liegen. Im Vergleich zur Expression von ELAV in DM-Lineage-Neuronen besteht eine Expression bis in distalste Bereiche der Lineage. Drx-positive Neurone werden somit über die gesamte Entwicklung der DM-Lineages gebildet (Abb.5.3). Drx zeigt daher eine Expression in der Mehrzahl von Neuronen der DM-Typ-II-Lineages. Daraus kann geschlossen werden, dass Drx einen der ersten exprimierten Faktoren in sekundären Neuronen der Lineage darstellt und die Identität einer sehr großen Anzahl der adulten Neurone mitbestimmt. Dies bestätigt sich ebenfalls durch die früh detektierte Expression in Nrt-markierten, sekundären Neuronen der DM-Lineages. Eine Untersuchung der Drx-Expression in Neuropilen des adulten Zentralkomplexes, der aus den DM-Typ-II-Lineages hervorgeht (Boyan und Reichert, 2011; Boyan und Williams, 2011), zeigte Drx-Expression in vergleichbarer Form zur larvalen Situation. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von Drx eine wichtige Rolle bei der Differenzierung dieser Neurone zum adulten Gehirn leisten könnte. Unterstützt wird diese These durch die Expression von Drx im Primordium des Fächerförmigen Körpers, der auch adult Drx-positive Neurone aufweist

(Daten nicht gezeigt). Eine weitere unterstützende Feststellung ist in dem variablen Phänotyp des Ellipsoidkörpers, eines weiteren Neuropils des Zentralkomplexes, zu sehen (Davis et al., 2003). Eigene Analysen vor dem Hintergrund einer Neuropilmarkierung des adulten Gehirns bestätigten darüber hinaus auch die Expression von Drx im Bereich der Protocerebralbrücke. Auch die von Pfeiffer et al., 2008 hergestellten Reporterkonstrukte zeigen in diesem Neuropil Aktivität. Durch Abgleich mit der Drx-Expression konnten wiederum Drx-positive Neurone der Protocerebralbrücke erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Somit weisen die meisten Neuropile des Zentralkomplexes Drx-Expression auf.

Die vorrangige Expression von Drx in den Neuronen der DM-Lineages der Larve deutet bereits darauf hin, dass es sich nicht um einen Timing-Faktor der Stammzellen dieser Lineages handelt, was schon in den Untersuchungen durch Bayraktar und Doe, 2013 diskutiert wurde. Dort wurde die Expression von Drx ebenfalls im Antikörperscreen untersucht, aber aufgrund der Expressionsdaten als Mitglied der Timing-Serie in NB und INP ausgeschlossen. Auch der Screen durch Neumüller et al., 2011 zeigte keine Veränderung der DM-Lineages in larvalen Entwicklungsstadien, was eine weitere Funktion von Drx bei der Differenzierung dieser Lineages im Zeitraum der puppalen Entwicklung vermuten lässt, in der die larval bereits ins Zielgebiet projizierten Faszikel zur Verschaltung kommen und so zur Differenzierung des Zentralkomplexes beitragen. Die Untersuchung einer möglichen Funktion von Drx als Identifikationsmarker von Neuronen des Zentralkomplexes kann folglich nur durch puppale und adulte MARCM-Analysen erfolgen. Dort könnten sich analog zu den durch Bayraktar und Doe gezeigten Phänotypen des Zentralkomplexes, bedingt durch Mutationen der Timing-Faktoren wie auch vor dem Hintergrund einer Mutation von Drx, weitere Veränderungen zeigen.

Hbn-Expression hingegen wird in einer geringeren Anzahl gebildeter Neuronen festgestellt, die in angrenzenden Bereichen der Lineage mit der Drx-Expression überlappen, es existieren aber auch Hbn-positive Zellen, die nicht ausschließlich zu den INP gehören. Da INP aufgrund ihrer Markerexpression eine vergleichbare Form zum Typ-I-NB darstellen, kann auch in der larvalen Entwicklung ein Bezug zur embryonalen Genfunktion von *hbn* hergestellt werden. Hbn wird embryonal ebenfalls in Typ-I-NB der DM-Lineages, nachfolgenden Progenitorzellen und Neuronen exprimiert. Vor diesem Hintergrund interessant ist die Tatsache, dass nach Löschung der embryonalen Hbn-Expression in weiten Teilen des Protocerebrum die dorso-mediale Expression erhalten bleibt und daher eventuell für die weitere Entwicklung der DM-

Lineages von Bedeutung ist. Drx zeigt in L1-Larven eine deutlich stärkere DM-Expression in primären Neuronen verglichen mit Hbn. Nach Reaktivierung der Neuroblasten erfolgt ein schneller Aufbau eines Drx-positiven DM-Zellpools. Dies gilt mit geringerer Zellzahl ebenso für Hbn, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt verglichen mit der Expression von Drx in sekundären Neuronen. Dies ist mit der Expression von Hbn in früh gebildeten, Ey-positiven INP der Timing-Serie zu erklären, da diese erst später in der Entwicklung Ey und somit eventuell auch Hbn exprimieren.

Die Untersuchung der Timing-Serie und ihres potentiellen regulatorischen Einflusses auf *hbn* wirft in Hinblick auf die Expression von Hbn in INP Fragen auf: Einerseits, ob Hbn nach Ey-Knock-down in DM-Lineages noch gebildet wird, oder ob die Ey-Expression benötigt wird, um die Hbn-Expression in DM-Lineages zu initiieren. Andererseits, ob Ey-Expression in *hbn*-mutanten MARCM-Klonen verändert ist. Für die bisher gefundenen Faktoren der Serie gilt, dass die Initiierung der Expression jeweils durch den vorangehenden Faktor ausgelöst wird und dessen Expression jeweils wiederum durch den nachfolgenden Faktor begrenzt wird (Bayraktar und Doe, 2013). In diesem Fall wäre die Schlussfolgerung, dass Hbn als letzter Faktor benötigt würde, um das zeitliche Muster von Ey zu begrenzen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da Ey den letzten Faktor der bisher aufgedeckten DM-Timing-Serie darstellt und eine Expansion der Expression in diesem Zusammenhang bedeuten würde, dass die Expression von Ey auf GMC übergreifen würde und eventuell somit auch Ey-positive Neurone in DM-Lineages gebildet würden. Eine Funktion von Hbn als Timing-Faktor wirft ebenfalls Fragen auf, die sich wie im Fall der übrigen Faktoren auf die Expression von Markern in den gebildeten Neuronen und Gliazellen beziehen, da die jeweiligen Timing-Faktoren der frühen, mittleren und späten INP jeweils die TF-vermittelte Identifikation der von ihnen gebildeten Zellen bedingen (Bayraktar und Doe, 2013). *Hbn*-mutante MARCM-Klone könnten im Fall der Expression von Toy in Neuronen bzw. von Repo in Gliazellen Unterschiede zeigen, da späte, Ey-positive INP zur Bildung dieser Zellen beitragen. Somit wäre auch eine eventuelle Rolle von Hbn bei der Regulation dieser Markerexpression möglich. Diese könnte sich auch auf andere bisher nicht bekannte, regional begrenzte Faktoren der DM-Lineages beziehen. Im Zusammenhang mit Toy wäre ein solcher Effekt weniger zu erwarten, da eine Zone mit Kolo-kalisation in Neuronen besteht und somit die Regulation der Expression dieser Faktoren wahrscheinlich auf unterschiedliche Faktoren in den INP zurückzuführen ist. Eine Überexpression von Hbn könnte ebenfalls zur Änderung der

von den INP gebildeten Neurone und Glia führen, wie es der Fall für die Überexpression von Ey in INP zeigt (Bayraktar und Doe, 2013). Ein bisher nur für Drx verwirklichter Ansatz besteht in der Überexpression von Hbn in den Stammzellarealen der DM-Lineages. Für Drx konnte dort auf Ebene der Lineage-Größe und -Beschaffenheit kein Unterschied festgestellt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Identität der Neurone, die in Abhängigkeit der TF-basierten Identität von frühen, mittelalten oder alten INP gebildet werden, durch eine Fehlexpression von Drx oder Hbn verändert wird. So könnten diese Neurone einen anderen Expressionsstatus aufzeigen, der durch Vergleichsfärbungen aufgedeckt werden kann. Grundsätzlich spricht gegen die Einordnung von Hbn zur Timing-Serie der NB und INP in DM-Lineages die Tatsache, dass Hbn nicht in NB exprimiert und nicht von diesen an die INP weitergegeben wird. Daher ist Hbn eher mit den übrigen in dieser Arbeit untersuchten Faktoren, wie Dac und Dll, zu vergleichen, die ein spezifisches Muster in der Lineage aufweisen. In der Literatur sind bisher keine Faktoren mit vergleichbaren Expressionsmustern zu Drx und Hbn beschrieben, sodass im Folgenden nur eine Funktion postuliert werden kann, die auf dieser besonderen regionalen Verteilung basiert.

Daher bezieht sich die weitere Fragestellung auf die unterschiedliche räumliche Expression der 57B-TF in den DM-Lineages untereinander und in Bezug zu anderen untersuchten Faktoren. So konnte gezeigt werden, dass Hbn und Drx ein spezifisches anterior-posteriore Muster markierter Zellen zeigen. Dies könnte eventuell im Zusammenhang mit den von Typ-II-Lineages ausgebildeten Axontrakten stehen, die in verschiedene Bereiche des larvalen Gehirns faszikulieren. So zeigen alle DM-Lineages interhemisphärische und intrahemisphärische Axontrakte (Abb.5.3). Zugehörige Neurone könnten daher durch Expression differentiell verteilter Faktoren identifiziert werden. Somit könnte die Lineage neben der proximo-distalen Untergliederung durch die Timing-Serie auch eine anterior-posteriore Musterbildung erfahren, die die Lineage weiter funktionell gliedert. Im VNS findet man die Unterteilung von Lineages in sogenannte Hemilineages wieder. Diese basiert auf der Notch-Expression in nur einer Hälfte der gebildeten Zellen, was wiederum eine Differenzierung auf Ebene der Transkription schafft (Truman et al., 2010). Verglichen mit der Expression von Dac und teilweise auch Dll wird eine dreigliedrige anterior-posteriore Expression mit den 57B-Faktoren gefunden. Diese erfolgt besonders in DM 4, welche über drei Axontrakte verfügt. Das Fehlen eines Phänotyps in larvalen, mutanten MARCM-Klonen wäre in diesem Zusammenhang erklärbar, da die Axone zu diesem Zeitpunkt nur in ihr

Zielgebiet einwachsen, es jedoch erst in der puppalen Phase zur funktionellen Verschaltung kommt. Wiederum können mutante MARCM-Klone helfen, eine abgewandelte Verteilung des anterior-posterioren Musters der 57B-TF und eventuell veränderte Grenzen zwischen diesen aufzudecken. Besondere Aufmerksamkeit gilt in diesem Zusammenhang der DM 6-Lineage, die als einzige die Expression aller drei Faktoren des 57B-Genclusters zeigt und bezüglich der in DM 1-5 vorliegenden Expressionsverteilung von Drx und Hbn einen Unterschied zeigt. Dort wird Drx vergleichbar mit Hbn im durch *ermGal4* gekennzeichneten Reporterbereich exprimiert und zeigt daher eine zu Hbn vergleichbarere Expression, wodurch der Stammzellbereich in zwei Anteile gleicher Expression geteilt wird. Dies könnte im Hinblick auf die Topologie und Identifizierung der Lineage einen bedeutenden Unterschied darstellen, der sich eventuell auf die Differenzierung des zugehörigen adulten Anteils des Zentralkomplexes auswirkt. Abbildung 5.3 fasst die diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit und die Verteilung wichtiger Vergleichsfaktoren in einer Übersicht zusammen.

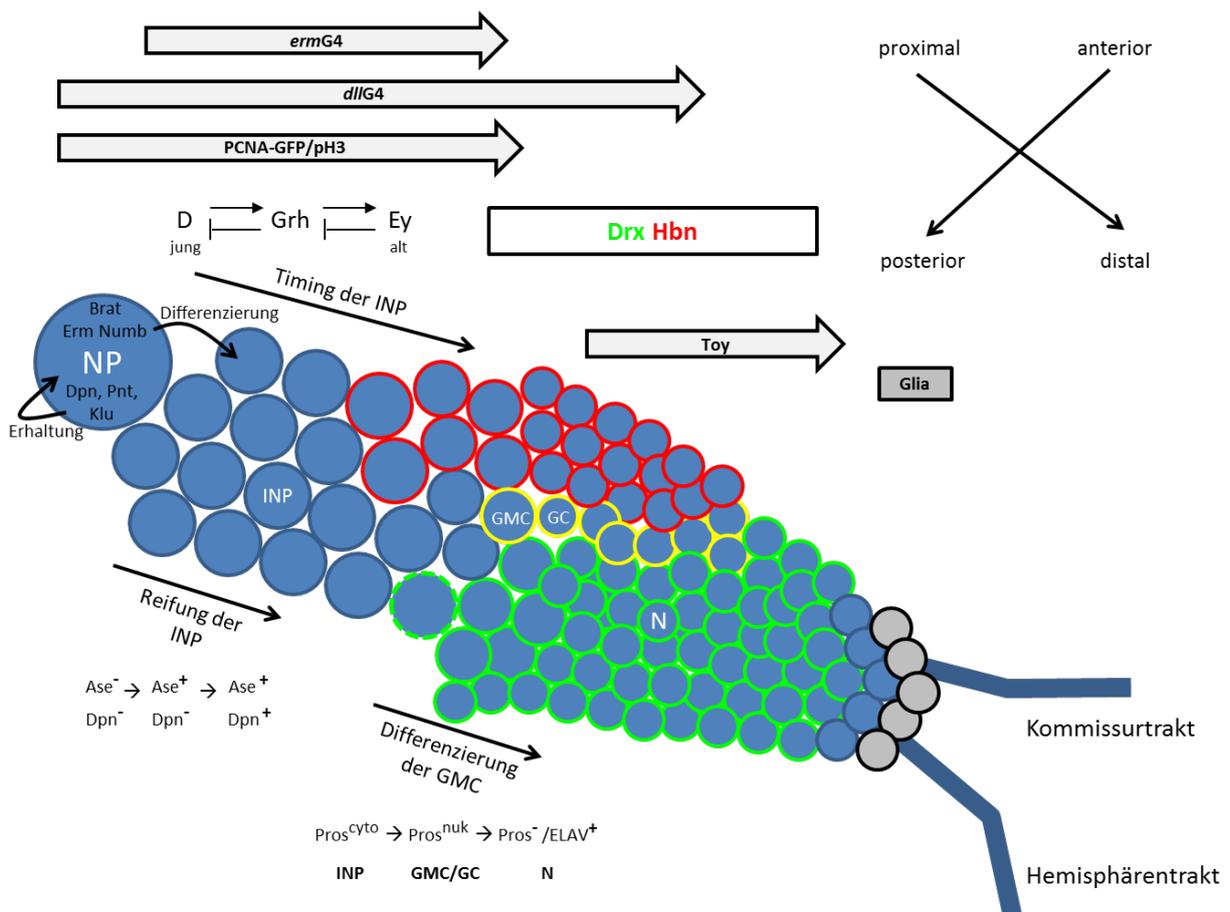


Abb.5.3: Schematische Darstellung der Zusammenhänge der 57B-bezogenen Analyse der larvalen DM-Lineages. Schematische Darstellung aller in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Expression von Drx und Hbn in den DM-Lineages im Vergleich zu den verwendeten Markerexpressionen. Schwarze Pfeile zeigen die Timing-Serie der INP, die Reifung der INP bewirkt durch die TF Asense und Deadpan sowie die Differenzierung der GMC zu GC und schließlich zu Neuronen bedingt durch Prospero und ELAV. Die Faktoren, die zur Selbsterhaltung des NB und zur Differenzierung der INP asymmetrisch verteilt werden sind am NB durch schwarze Pfeile markiert. Graue Blockpfeile geben die Lage der Aktivität der G4-Reporterkonstrukte von *dll*,

erm- und PCNA-GFP an. Unterbrochene, grüne Umrandung deutet den transienten Charakter der Expression von Drx in INP an.

5.5 Die Funktion von *drx* und *hbn* in der larvalen optischen Lobe

5.5.1 Die optische Medulla

Von den 57B-TF zeigt Hbn in den optischen Loben die stärkste Expression. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Hbn in konzentrisch angeordneten Medulla-NB exprimiert wird. In diesem Zusammenhang konnte analog zu den DM-Lineages eine Analyse bezüglich der zeitlichen Entwicklung der NB, gekennzeichnet durch deren spezifische TF-Expression, durchgeführt werden (Li et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Wie schon in DM-Lineages zeigte sich auch hier eine zeitliche Koidentität mit Ey-positiven Neuroblasten bzw. Neuroblasten, die durch *hthGal4*-positive Reporterexpression gekennzeichnet sind. Aufgrund des Musters wäre Hbn somit der potentielle zweite Faktor in dieser Timing-Serie (Abb.5.4,A,B). Durch Vergleich mit Ey-positiven NB konnte durch Färbungen gezeigt werden, dass Hbn nur in der jüngeren Hälfte der Ey-positiven NB exprimiert wird, während bei *hthGal4*-positiven NB hingegen nur der ältere Anteil anti-Hbn-Färbung aufweist, was dieses Postulat unterstützt. Auch die übrigen Faktoren der Timing-Serie zeigen jeweils ein geringes Maß an Überlappung an ihren Grenzen (Li et al., 2013). Ebenso finden sich GMC, die wie ihre vorangehenden NB im Überlappungsbereich Ey/Hbn- positiv sind. Von diesen GMC ausgehend konnte auch die differenzielle Entstehung von Ey- und Hbn-positiven Neuronen beobachtet werden, jedoch keine Neurone, die beide Faktoren gemeinsam exprimieren. Im Überlappungsbereich von Hbn und Hth werden jedoch am Neuropil Neuronen mit der Expression beider Faktoren vorgefunden.

Um nun eine funktionelle Eingliederung von Hbn in die komplexe zeitliche Abfolge von in Medulla-NB exprimierten TF klären zu können, müssen verschiedene Fragen ähnlich zur Timing-Serie für die DM-INP beantwortet werden: Einerseits, ob die Expression von Ey ohne Hbn ausfällt bzw. die Hth-Expression über die normale Bande hinaus expandiert. Durch eine dahingehende Analyse könnte geklärt werden, ob Hbn den Faktor darstellt, der benötigt wird, um die Expression von Hth zu reprimieren und die Expression von Ey anzuschalten. Dieser Faktor gilt in der zugehörigen Literatur bisher als fehlend (Li et al., 2013), da Hth einzig in der Timing-Serie der Medulla nicht für die Aktivierung des nachfolgenden Faktors (Ey) benötigt wird (Abb.5.4,C). Damit stellt sich andererseits die Frage, ob *hth*-mutante Klone eine Expression von Hbn zeigen oder ob im Fall des Expressionsausfalls somit Hth für die

Expression von Hbn benötigt wird. Für die nach Ey folgenden Faktoren konnte gezeigt werden, dass der jeweilige vorangehende Faktor für die Initiierung der Expression und der nachfolgende für die Begrenzung der Expression des vorangehenden Faktors verantwortlich ist (Li et al., 2013; Abb.5.4,C).

Der Vergleich der Hbn-positiven Neuronenpopulation mit weiteren TF, die in der larvalen Phase in Medulla-Neuronen zur Expression kommen, kann folgende Fragen klären. Welche Kombinationen von Neuronen werden neben den bereits bekannten durch die Teilung von GMC (Li et al., 2013; Abb.5.4,A,B) in Zusammenhang mit Hbn gebildet und welche NB können Hbn-positiv Neurone in Abhängigkeit von ihrer zeitlichen Musterbildung erzeugen? Da Ey-positive Medulla-NB GMC generieren, die sowohl Ey- als auch Drf-, aber scheinbar keine Hbn-positiven Neurone in diesem Bereich der Medulla bilden, und Hbn fast keine Kollokalisierung mit *drfGal4* zeigte, liegt der Schlüssel zur unabhängigen Produktion wahrscheinlich in der nur teilweisen Überlappung der Ey- und Hbn-positiven NB und GMC. Somit könnte die Expression von Hbn in Teilen der sehr breiten Expressionsbande von Ey dazu beitragen, eine Differenzierung in eine größere Anzahl von unterschiedlichen Neuronentypen zu leisten, als die Ey-positiven NB alleine bilden könnten. Im Fall der Timing-Serie der Medulla stellt Ey den einzigen Faktor dar, der verglichen mit den übrigen Mitgliedern in einer größeren Anzahl an NB vorliegt (Abb.5.4,A,B). Dadurch ist auch der Bereich Ey-positiver Neurone breiter als der von beispielsweise D- oder Slp-positiven Neuronen. Bezüglich der Bildung von Neuronen der definierten NB unterscheidet sich Hbn von den übrigen Timing-Faktoren, denn Hbn-positiv Medulla-Neurone zeigen weder Dll-, Ey- noch Toy-positive Färbung. Da große Anteile der Medulla-Neurone aus der Slp- und D-Timing-Zone Toy-positiv sind und die Hälfte der Neurone aus allen Timing-Abschnitten Apterous-positiv ist (Morante et al., 2011; Abb.5.4,A), kann eine weitere Färbung mit Apterous die Identität der Hbn-positiven Neurone weiter eingrenzen oder sogar aufklären. Ebenso kann ein Vergleich mit den Antikörpern gegen Hth, Bsh, Run und Drf sowie Slp und D die verschiedenen Kombinationen von Hbn mit anderen Faktoren eventuell weiter aufklären und in der adulten Analyse helfen, die daraus hervorgehenden Zelltypen der Medulla weiter zu definieren, da bereits eine große Anzahl an verschiedenen Neuronentypen der adulten OL durch die zugehörige Markerexpression definiert wurde (Hasegawa et al., 2011, 2013; Li et al., 2013). Abbildung. 5.4,A,B zeigt eine schematische Darstellung der durch Li et al., 2013 ermittelten Expressionsdaten von Medulla-Neuronen in Relation zur Timing-Serie. Die in

dieser Arbeit vorgefundene Expression von Hbn ist dort an den potentiellen Lokalisationen durch empirischen Abgleich eingezeichnet.

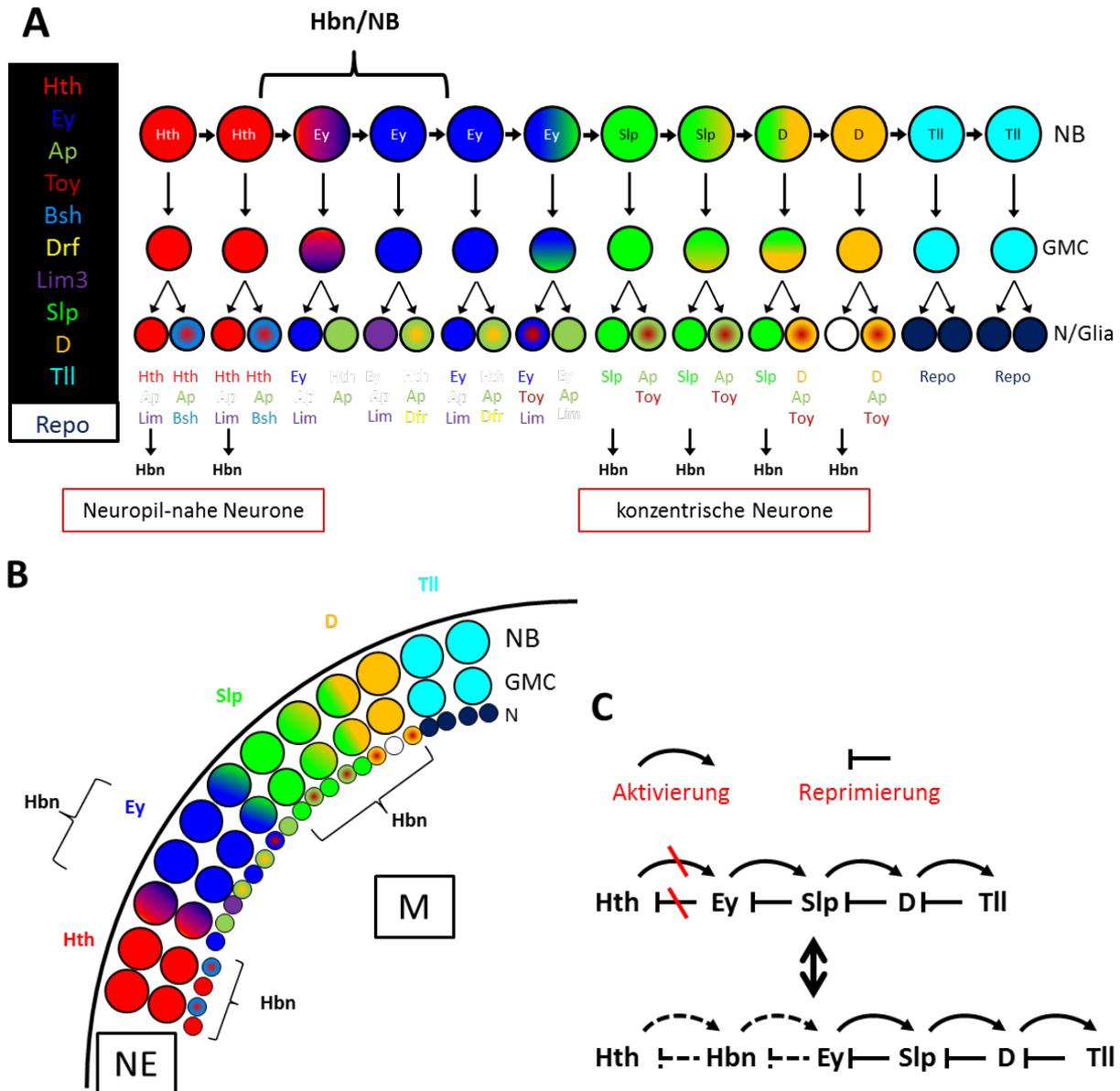


Abb.5.4: Einordnung der Hbn-positiven Medulla-Neurone in die zeitliche Entstehungskaskade. Schematische Darstellung der Timing-Serie in den NB der optischen Lobe mit allen festgestellten Übergängen der Transkriptionsfaktor-Expressionen sowie dem Expressionsstatus in den gebildeten GMC und den daraus hervorgehenden Neuronen (N). (A) Unterhalb der Neurone sind die durch Li et al., 2013 festgestellten Markerexpressionen von Neuronen aus bestimmten zeitlichen Abschnitten farblich notiert. Die Expression von Hbn wurde nach Ausschluss und im Vergleich zu den bekannten und in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren eingetragen. (B) Darstellung des Medullacortex mit der Timing-Serie, wie sie in A dargestellt ist. Mengenklammern geben die Lage der Hbn-positiven NB und Neurone an. (C) Regulatorische Zusammenhänge zwischen den Faktoren der Timing-Serie in der Medulla der optischen Lobe nach Li et al., 2013 und unter Einbeziehung der Daten zur Expression und Funktion von Hbn als potentielltem Mitglied der Timing-Serie. (M, Medulla; NE, Neuroepithel).

Bisher kann die Bildung der Hbn-positiven Medulla-Neurone durch Vergleich mit den übrigen Neuronen wie folgt angegeben werden. Hbn bildet einen kleinen Zellpool von nahe dem Neuropil situierten Neuronen, die aus dem Hth-positiven NB-Bereich gebildet werden und

somit zu den ältesten Neuronen gehören. Diese Neurone entstehen aus den ersten Hth-positiven NB, die durch Differenzierung des NE entstehen. Im Bereich der Ey-Überlappungszone werden eventuell Hbn-positive Neurone gebildet, die keine Markierung durch Ey tragen, jedoch in angrenzenden Teilen der Medulla liegen bzw. mit Ey-positiven Neuronen vermischt in der Medulla vorkommen (nicht in der Abb. eingetragen). Im Anschluss an dieses zeitliche Fenster liegt die Expression von Hbn in Neuronen vor, die von Hbn-negativen NB gebildet werden. Aufgrund der Lage im Vergleich zu Toy-positiven Neuronen, die in diesem Bereich entstehen, ist dies sehr wahrscheinlich. Somit entstammt der zwischen *drfGal4*- und Dll-positiven Medulla-Neuronen gelegene Anteil Hbn-positiver Neurone aus den Slp- bzw. D-positiven Bereichen und wird unter diesen in Toy-negativen Neuronen exprimiert.

Dies stellt einen starken Kontrast zu den übrigen Faktoren der NB-Timing-Serie dar, die allesamt auch eine Expression in zugehörigen GMC und dadurch auch in Neuronen zeigen. Das wiederum steht in funktionellem Widerspruch zu einer Rolle von Hbn als Timing-Faktor und eröffnet die Frage, ob auch andere Faktoren zwar eine Expression in Medulla-NB, aber nicht in direkt zugehörigen Neuronen zeigen. Dies könnte einen weiteren Mechanismus bedeuten, der an der Herstellung und Differenzierung der 70 unterschiedlichen Neuronentypen der optischen Medulla beteiligt ist, jedenfalls zumindest für das Ey-positive NB-Areal. In diesem Zusammenhang müsste geklärt werden, welcher Faktor dazu beiträgt, die in Ey/Hbn-positiven GMC vorliegende Expression von Hbn nicht an die gebildeten Neurone weiterzugeben. Auch muss das Verhalten und die Lage der Hbn-positiven Neurone im puppalen und adulten Gehirn genau untersucht werden, um die zugehörige neuronale Identität und somit Aktivität im Verbund der optischen Neuropile aufzuklären.

Die Notwendigkeit dieser Experimente wird schon durch die Kenntnis einer deutlichen Auffächerung des medullaständigen Hbn-Musters in der puppalen Phase bedingt (Daten nicht gezeigt), die eventuell durch Migration Hbn-positiver Zellen in diesem Entwicklungsstadium hervorgerufen wird. Entsprechende Migrationsereignisse wurden bereits für Ey-positive Medulla-Neurone (Morante et al., 2011) wie auch für die Neurone mit Markierung der konzentrischen Faktoren gezeigt (Hasegawa et al., 2011). Prinzipiell werden von den kortikal situierten NB der Medulla Lineages gebildet, die verschiedene Anteile von Hth-, Bsh-, Run- und Drf-positiven Neuronen tragen, was die einzelnen Neurone der Lineage je nach Bildungszeitpunkt in konzentrische Systeme und damit altersabhängige

Identifizierung untergliedert (Hasegawa et al., 2011). Die Migration der durch konzentrische Faktoren markierten Neurone in der puppalen Phase hebt das konzentrische Muster der Larve auf und führt zu einer Neuverteilung der Neurone im adulten Medulla-Neuropil (Hasegawa et al., 2011). Auch für die Hbn-positiven Neurone wurde eine Neuverteilung im adulten Medulla-Cortex vorgefunden. Die puppale Medulla könnte Phänotypen hinsichtlich der Verteilung Hbn-positiver Neurone in Abhängigkeit von Ausfällen bestimmter Timing-Faktoren bzw. konzentrischer Faktoren aufweisen. In Abhängigkeit vom Verlust dieser Faktoren könnten Hbn-positive Medulla-Neurone diese zelluläre Bewegung einstellen, was bereits für die Migration der konzentrisch markierten Neurone in Abhängigkeit von einem Ausfall der Faktoren gezeigt wurde (Hasegawa et al., 2011). Auch könnte durch Ausfall der Hbn-Expression eine Veränderung der durch nachfolgende Faktoren identifizierten Neurone und ihrer neuronalen Migration ausgelöst werden. Die Untersuchung der Migration der Hbn-positiven, optischen Neurone könnte somit eventuell zur Aufklärung der adulten Topologie der optischen Medulla beitragen.

In einer fortführenden Studie wurden die Faktoren der konzentrischen Systeme im Zusammenhang mit der Neuroblasten-Timing-Serie der Medulla untersucht. In dieser Arbeit, Suzuki et al., 2013, konnten analoge Daten zu Li et al., 2013 gewonnen werden. Darüber hinaus wurde nicht nur die durch Timing-Faktoren vermittelte zeitliche Identität der Neuroblasten gezeigt, sondern auch die Bildung von Neuronen mit konzentrischer Markierung vor dem Hintergrund des Ausfalls der Timing-Faktoren in NB untersucht. In diesem Zusammenhang konnte der Verlust von konzentrischer Genexpression gefunden werden, wobei jeweils der Faktor verloren geht, dessen zugehöriger NB in der zeitlichen Entwicklung keine Markierung durch die Timing-Serie mehr trägt. So wird beispielsweise keine Drf-Expression beobachtet, wenn Ey durch einen Knock-Down in den NB herunterreguliert wird. Hier konnte, wie im Fall von *hbn*-mutanten MARCM-Klonen, kein Einfluss der Mutationen auf die Bildung der NB und Neurone gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurde neben Hth, Ey, Slp und D auch Klu in NB detektiert, aus denen Run-positive Neurone hervorgehen. Im Gegensatz zu allen anderen Faktoren wird Klu nicht in Neuronen der Medulla exprimiert. So zeigte die Induktion von mutanten *klu*-MARCM-Klonen eine Überproduktion von NB und den Verlust der gesamten konzentrischen Expression. Interessanterweise wurde in obiger Studie auch die umgekehrte Situation durch Überexpression der Faktoren mit dem spezifischen Treiber *pxbGal4*, der die kortikal

situierten NB der Medulla anspricht, untersucht. Dabei zeigte sich beispielsweise im Fall der ektopischen Expression von *Ey* eine ebensolche Induktion von *Drf* in den Neuronen, wohingegen die *Run*-Expression ausfällt, was klar den Zusammenhang der zeitlichen Musterbildung durch die Timing-Serie auf die unterschiedlich markierten und damit identifizierten Neurone der Medulla beweist, wie es in DM-Lineages ebenfalls gezeigt wurde. Im Fall von *Hbn* als potentiell Timing-Faktor würden diese Ergebnisse wiederum neue Hypothesen bedingen, darunter welche konzentrische Markierung bzw. TF-vermittelte Identifizierung von Neuronen durch *Hbn*-Expression in NB bedingt ist. So könnte ebenfalls durch Überexpression von *Slp* und *D* in den jüngeren NB geklärt werden, ob die Expression von *Hbn* auf Ebene der Neurone von diesen Faktoren induziert wird. Im umgekehrten Fall könnten sich für diese Faktoren mutante Klone eventuell durch den Ausfall der neuronalen *Hbn*-Expression auszeichnen. Um alle regulatorischen Zusammenhänge der bekannten Faktoren in der Medulla gegenüber *Hbn* anzugehen, bliebe als letztes zu klären, ob durch Ausfall der *hth*-Expression der neuropilnahe Anteil von *Hbn*-positiven Neuronen verloren geht oder sich die NB-ständige Expression auflöst, da sie eventuell von *Hth* in der Timing-Serie induziert wird.

Ein weiteres Feld stellt der Grenzbereich *Drx*- und *Hbn*-positiver Medulla-NB dar. In diesem Fall bieten sich die bereits für *drx*¹⁰¹⁵⁵ erstellten FRT-Stämme an, mittels derer in Medulla-Klonen die Expression von mutantern *Drx* und dessen Auswirkung auf die NB-ständige Expression von *Hbn* in der Überlappungszone und eventuell darüber hinaus ermittelt werden kann. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, anstelle des panneuralen *tubulinGal4*-Treibers hier die bereits als spezifisch für den Grenzstreifen ermittelte Reporteraktivität (Daten nicht gezeigt) von *patchedGal4* als Treiber zu nutzen, um eine Expression mutanter Genvarianten in dieser Zone für *hbn* und *drx* zu gewährleisten und deren Folgen auf die Genexpression zu ermitteln. Hierbei könnten weitere Untersuchungen mittels der 57B-Deletion *Del1A*, die beide 57B-TF ausschaltet, Fragen beantworten, die sich auf die dorsalen Spitzen der Medulla beziehen, denn diese zeigten bereits in weiteren Ansätzen eine eigene zeitliche Abfolge von exprimierten TF (Bertet et al., 2014). Auch konnte *Drx* in diesem Areal als Regulator identifiziert werden (Erclik et al., 2013; unveröffentlichte Daten). Die gezeigte Verteilung von *Dll* gegenüber *Drx* und *Hbn* in den dorsalen Spitzen der Medulla liefert weitere Untersuchungsansätze, da *Dll* in dieser Region neben *Ey* und *Slp* sowie *D* einen Timing-Faktor in dieser räumlich begrenzten Zone darstellt (Bertet et al., 2014).

5.5.2 Der Lobula Komplex

In dieser Arbeit wurde bei den Untersuchungen der larval neu gebildeten Neuropile im Bereich der optischen Lobe neben der Medulla auch der Lobula Komplex, der larval die Lobula, die Lobula Plate und den Lobula Plug beinhaltet, mit Expression der 57B-TF vorgefunden. Der Lobula Komplex und besonders der Lobula Plug stellen bisher nur wenig beachtete Gebiete der larvalen Gehirnentwicklung dar. Erst die ausgebildeten adulten Neuropile, Lobula und Lobula Plate wurden bisher auf ihre Verschaltungen durch visuelle Neurone und ihre Funktion im Bereich der Verarbeitung von visuellen Reizen, besonders der Bewegungswahrnehmung, untersucht. Der Lobula Komplex wird während der larvalen Entwicklung aus der inneren Proliferationszone gebildet (Hofbauer und Campos-Ortega, 1990; Egger et al., 2010), wobei die genaue Art des stammzellvermittelten Aufbaus dieser Region noch nicht geklärt ist. Durch eine neue Untersuchung von Oliva et al., 2014 konnte jetzt erstmals *atonal*, welches neben *lethal of scute* auch zu den proneuralen Genen der embryonalen Neurogenese gehört, mit der Differenzierung der IPC und dadurch auch der Entwicklung der adulten Lobula Plate in Zusammenhang gebracht werden. Im Stammzellgebiet der Lobula konnte bisher die Aktivität beider 57B-TF beobachtet werden. Dort wurde die Expression von Drx und Hbn im dIPC überlappend vorgefunden sowie die Expression von Drx in GMC des inneren Anteils der IPC. In diesem Zusammenhang wurde auch die Expression von *dll* und *toy* im dIPC vorgefunden, jedoch mit geringerer Aktivität und Kolo-kalisation verglichen mit den 57B-TF. Auf Grundlage dieser Daten kann geschlossen werden, dass beide Faktoren hier bereits in Stammzellen Aktivität zeigen, die in der von diesen gebildeten Neuronenpopulation weiter Bestand hat. So werden besonders die Faktoren Dll/Hbn/Toy gemeinsam in den Neuronen des Lobula Plugs vorgefunden und ebenfalls teilweise kolokalisiert in Anteilen des dIPC. Daraus kann gefolgert werden, dass eine Expression dieser Faktoren in den Stammzellen der IPC eventuell direkt an ihre Nachkommen weitergegeben wird und deren Identität nachhaltig mitbestimmt. Neueste Untersuchungen des Lobula Komplexes und besonders der IPC zeigen einen dreiteiligen Aufbau letzterer, bestehend aus der oberflächennahen Zone (dIPC) mit Expression von Drx und Hbn (Abb.5.6, blauer und roter Pfeil), einer proximalen- und einer distalen Zone, in der die Drx-positiven GMC beobachtet wurden (Abb.5.6, roter Pfeil). Ferner konnte gezeigt werden, dass in der proximalen Zone Stammzellen Progenitorzellen hervorbringen, die durch Migration in Form von Zellströmen zur distalen Zone gelangen. Diese zeigen keine NB-

Markerexpression und differenzieren sich zu Typ-I-NB und bilden GMC (Aspitz und Salecker, 2015). So könnten in den oberflächennahen Anteilen der IPC bzw. den proximalen Anteilen der IPC 57B-markierte Stammzellen zur Bildung dieser Zellströme beitragen und die Neuronen der Lobula von letzteren nach Differenzierung gebildet werden.

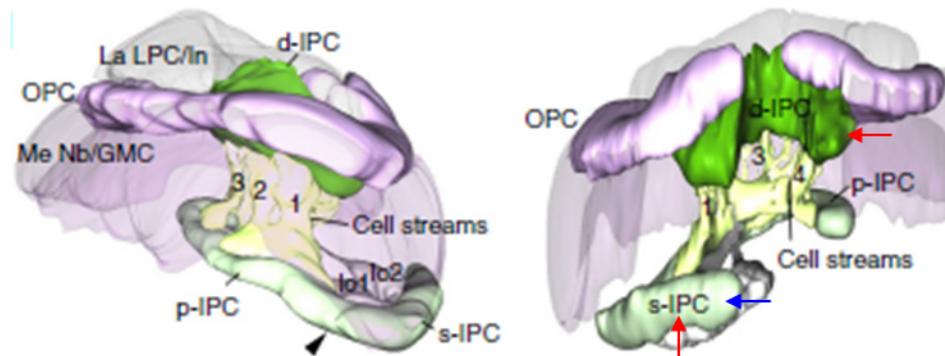


Abb.5.6: Aufbau der IPC und Expression der 57B-TF in den verschiedenen Arealen der IPC. Darstellung zeigt grün markiert den distalen Teil der IPC, in dem *Drx* exprimiert wird, roter Pfeil. In hellgrün ist jeweils der proximale Anteil (p-IPC) und der oberflächennahe Anteil (s-IPC) der IPC markiert. Der oberflächennahe Anteil, in dieser Arbeit als dIPC bezeichnet, zeigt die Expression von *Drx* und *Hbn* (blauer und roter Pfeil). Die Medulla ist in grau dargestellt, die OPC in lila. Die drei Zellströme differenzierender Progenitorzellen (1-3) sind gelb hervorgehoben. (Aspitz und Salecker, 2015)

Bisher konnte in anfänglichen Untersuchungen der adulten Expression gezeigt werden, dass *Hbn* in dem Bereich der Lobula, der aus dem Lobula Plug hervorgeht, erhalten bleibt. Adult wird keine Expression von *Drx* im Bereich der OL festgestellt. Somit scheint die *Drx*-Expression in diesem Bereich nur vorübergehend benötigt zu werden und trägt nicht zur endgültigen Differenzierung der adulten Neuropile des Lobula Komplexes bei. Die Untersuchung durch Oliva et al., 2014 beinhaltet auch ein Gal4-Konstrukt mit einem Enhancer aus dem *atonal* Genloкус, welches die Expression in den Stammzellen der IPC bis zu den adulten Geweben nachahmt. Mit Hilfe dieses Konstruktes ließe sich zumindest die Expression von *Drx* in der distalen IPC spezifisch beeinflussen und eine Funktion von *Drx* bei der larvalen Differenzierung untersuchen. Auch könnten die von Aspitz und Salecker charakterisierten *escargot*Gal4-Treiber, die in Stammzellen der IPC aktiv sind, dazu verwendet werden, die Expression der 57B-TF, *dll* und auch *toy* im Stammzellgebiet auszuschalten und Phänotypen auf Grundlage der veränderten Expression aufzudecken.

5.6 Die Expression von *drx* und *hbn* in Typ-I-Lineages im Vergleich zu den Typ-II-Lineages

Untersuchungen zu *Drx* im Kontext des PK finden ihre Relevanz bereits in embryonalen Stadien, da *Drx* in PK-NB und den Kenyonzellen exprimiert wird (Kunz et al., 2012). Diese Expression setzt sich in der larvalen Phase fort und beschränkt sich hier auf die Gesamtheit

aller vier PK-NB und Anteile der gebildeten GMC. Der bedeutendste Unterschied bezüglich der Expression von Drx zwischen den Typ-I-NB Lineages, zu denen funktional auch die PK-Lineages zählen, und den DM-Lineages, ist im Neuroblasten selbst zu finden. Sowohl vier dorsale als auch zwei anteriore Typ-I-Lineages des PC, wie auch die vier PK-Lineages zeigen Drx-Expression im NB, ebenso die NB in den dorsalen Spitzen der Medulla, wohingegen keine NB-ständige Expression in Typ-II-NB vorzufinden ist. Da INP bezüglich der stammzellspezifischen Markerexpression dem Typ-I-NB hinsichtlich Ase- und Dpn-Expression entsprechen (Bayraktar et al., 2010), bestand ein Ansatz darin, die große Zahl an DM-Lineage-INP auf eine Expression von Drx zu untersuchen. Hier zeigte sich schlussendlich, dass Drx im Verlauf der Lineagebildung in INP transient, jedoch erst in GMC mit gut detektierbarem Maß exprimiert wird. In starkem Kontrast zu den vorliegenden Daten der DM-Lineages steht die Situation in den benachbarten Typ-II-Lineages, den DL-Lineages. Hier wird Drx mit sehr starker Präsenz im Stammzellbereich vorgefunden. Der besondere Unterschied zu den DM-Lineages liegt hier in der proximalen Expression von Drx in fast allen Zellen, die durch *ermGal4* markiert werden. Somit zeigt Drx in DL-Lineages auch eine Expression in INP. In diesem Zusammenhang und auch im Zusammenhang mit den PK-Lineages konnte nun ebenfalls Hbn als zweites Mitglied des 57B-Genclusters beschrieben werden, da sowohl die DL-Lineages als auch die PK-Lineages larval Hbn-Expression zeigen. Eine Frage, die durch die unterschiedliche Expression von *drx* und *hbn* in NB der Typ-I- und Typ-II-Lineages aufkommt, bezieht sich auf die differentielle Regulation der Expression in diesen Stammzelltypen. Die Ergebnisse der stammzellbezogenen Untersuchungen zu Drx deuten darauf hin, dass es unbekannte Faktoren geben muss, die den expressionsbezogenen Unterschied von Drx zwischen Typ-I- und Typ-II-NB-Lineages bedingen und die Expression von Drx grundsätzlich verändern. Unter diesen Faktoren könnte Asense (Brand et al., 1993; Jarman et al., 1993) sein, da in der Expression dieses TF ein zentraler Unterschied zwischen den Ase/Dpn-positiven Typ-I-NB und den nur Dpn-positiven Typ-II-NB besteht (Bowman et al., 2008). Dieser prinzipielle Unterschied zwischen Typ-I- und Typ-II-NB ist durch die Expression von *pointed (pnt)*, genauer dem Faktor Pnt1 bedingt. Diese Isoform von Pnt wird ausschließlich in Typ-II-NB exprimiert, unterdrückt dort spezifisch die Expression von *asense* und fördert die Bildung von INP (Zhu et al., 2012) (Abb.5.3).

Hbn zeichnet sich ebenfalls durch larvale Expression in PK-Neuroblasten aus. Interesse an der PK-abhängigen Entwicklung in Zusammenhang mit der Expression von Hbn kam schon

bei der Betrachtung der embryonalen Entwicklung auf, da hier das PK-spezifische Konstrukt 238YGal4 in *hbn*¹⁵²²⁷-mutanten Gehirnen keine PK-spezifische Reporter-Expression mehr aufzeigte. Ob eine gemeinsame Beteiligung von Drx und Hbn an der PK-Entwicklung besteht, könnte durch Analysen mit der 57B-Defizienz Del-1A geprüft werden. Bisher wurden in dieser Arbeit nur MARCM-Klone des *drx*¹⁰¹⁵⁵-Allels auf Veränderungen des PK untersucht, wodurch die Daten des RNAi-basierten Screens von Neumüller et al., 2011 bestätigt werden konnten. In diesem Screen zeigte *hbn* wie in den übrigen Lineages des larvalen Gehirns keinen Phänotyp. Wie die Entwicklung des PK in der doppelt-mutanten Situation aussieht, bleibt zu klären.

Durch Knock-down der 57B-TF-Expression (Neumüller et al., 2011) zeigen außer den PK-Lineages keine weiteren Lineages eine morphologische Veränderung der Lineagestruktur, was die weitere Untersuchung der 57B-TF klar auf die Aufdeckung puppaler und adulter Phänotypen eingrenzt. Allerdings könnten dennoch auf Ebene der Genexpression bereits in der larvalen Entwicklung Veränderungen vorliegen, wie es z.B. bei einer Funktion ähnlich der Timing-Faktoren zu erwarten wäre, und somit Veränderungen auf der transkriptionellen Ebene von bekannten und beschriebenen Markergenen auftreten.

5.7 Ausblick

Der zur systematischen Auswertung der 57B-TF-Expression im adulten Gehirn bereits begonnene Ansatz kann vor dem Hintergrund geeigneter Marker zur Visualisierung der Synapsen und der Lineages (Lovick et al., 2013) abgeschlossen werden. Die daraus ermittelten Kenntnisse bezüglich der Expression im Zentralkomplex und den optischen Loben tragen dazu bei, die Phänotypen anhand der Induktion von mutanten MARCM-Klonen oder Knock-down-Ansätzen im Vergleich zum Wildtyp besser erfassen zu können.

In Zusammenhang mit der Entwicklung des Zentralkomplexes, der eine starke Expression aller 57B-Faktoren im Primordium, den DM-Lineages und besonders von Drx im adulten Gehirn zeigt, können verschiedene Ansätze verfolgt werden. So sollte in den larvalen DM-Lineages der Einfluss der Timing-Serie auf die Expression der 57B-TF untersucht werden. Im Umkehrschluss sollte weiter die potentielle regulatorische Funktion der 57B-TF auf die Expression von Faktoren in DM-Neuronen, die in Zusammenhang mit der Untersuchung der Timing-Serie und in dieser Arbeit gefunden wurden, untersucht werden. Dadurch könnten bereits regulatorische Zusammenhänge aufgedeckt werden, die einer weiteren Untersuchung von MARCM-Klonen in der puppalen und adulten Phase zur funktionellen

Aufklärung der Beteiligung der 57B-TF bei der Ausbildung des Zentralkomplexes dienen. Ferner stehen die Neuropile des Zentralkomplexes im Vordergrund der detaillierten Expressionsanalyse und der Untersuchungen zur neuronalen Verschaltung durch ausgewählte Reporterkonstrukte mit zeitlich und räumlich übereinstimmender Aktivität zur Expression der Faktoren des 57B-Genclusters. Dazu könnte die Vielzahl an Gal4-Reporterkonstrukten aus dem Screen von Pfeiffer et al., 2008 dienen, da diese Konstrukte und ihre Expression bereits detailliert beschrieben sind (Janelia Farm, Rubin Lab, Virginia). Somit stehen ausreichend viele Treiberlinien auch für die gezielte Induktion von MARCM-Klonen mit 57B-mutantem Hintergrund und ebenfalls für Knock-down-Experimente durch entsprechende RNAi-Linien (Dietzl et al., 2007) zur Verfügung. Diese Quellen bieten auch zahlreiche Treiberlinien für die Analyse des Pilzkörpers. Weiter existieren Pilzkörper-spezifische Konstrukte, wie beispielsweise das verwendete 238YGal4, die aus vorangegangenen Screens hervorgegangen sind, die wiederum auch Bereiche des Zentralkomplexes abdecken (Aso et al., 2008; Renn et al., 1999; Yang et al., 1995; Young und Armstrong, 2010). Auch die Tatsache, dass mittlerweile durch klonale Analysen der NB-Lineages das zentrale Gehirn der Larve und der adulten Fliege kartiert sind (Yu et al., 2013), unterstützt die Zuordnung der Expression der 57B-TF zu selbigen. So könnten schließlich Daten bezüglich der Verschaltung und dadurch auch eventuell der funktionsbezogenen Charakteristik von 57B-exprimierenden Lineages im adulten Zentralgehirn erhoben werden. Im Bereich der larvalen und adulten optischen Lobe können durch weiterführenden Abgleich der Markerexpressionen die genauen Typen Hbn-exprimierender Neurone in der Medulla bestimmt werden. Nachdem die Identität der Hbn-exprimierenden Neurone der Medulla geklärt ist, kann in zukünftigen Arbeiten mit der Untersuchung verschiedener MARCM-Ansätze begonnen werden. Dadurch könnte ein veränderter Expressionsstatus und eine damit einhergehende Identitätsveränderung der optischen Neurone untersucht werden. Auch sollte der Einfluss der Timing-Faktoren auf die Expression von Hbn bzw. die Rolle von Hbn bei der Regulation der Markerexpression in der optischen Lobe der Larve getestet werden, um die regulatorischen Zusammenhänge aufzudecken und eine Einordnung von Hbn in die Timing-Serie abschließend zu klären. Neben diesen Untersuchungen könnte auch eine mögliche regulatorische Funktion der konzentrischen Faktoren bezüglich Hbn, untersucht werden, um beispielsweise eine veränderte Re-Regionalisierung Hbn-positiver Neurone in der puppalen Phase aufzudecken. Im umgekehrten Fall könnte ebenfalls der

Einfluss der NB- und GMC-Expression von Hbn auf die Verteilung der konzentrischen Faktoren in den larvalen, kolumnaren Lineages analysiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Albornoz**, V., Mendoza-Topaz, C., Oliva, C., Tello, J., Olguin, P., Sierralta, J. (2008). Temporal and spatial expression of *Drosophila* DLGS97 during neural development. *Gene Expr Patterns* **8**: 443-451
2. **Anderson**, M. G., Perkins, G. L., Chittick, P., Shringley, R. J., Johnson, W. A. (1995). *drifter*, a *Drosophila* POU-domain transcription factor, is required for correct differentiation and migration of tracheal cells and midline glia. *Genes Dev.* **9**: 123-137
3. **Ashraf**, S. I., Ganguly, A., Roote, J., Ip, Y. T. (2004). Worniu, a Snail family zinc-finger protein, is required for brain development in *Drosophila*. *Dev Dyn.* **231**: 379-386
4. **Aso**, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I., Tanimoto, H. (2008). The Mushroom Body of Adult *Drosophila* characterized by Gal4 Drivers. *J. Neurogenetics* **23**: 156-172
5. **Aspitz**, H., **Salecker**, I. (2015). A region-spezifische neurogenesis mode requires migratory progenitors in the *Drosophila* visual system. *Nat Neurosci.* **18**: 46-55
6. **Artavanis-Tsakonas**, S., Delidakis, C., Fehon, C., Hartley, D., Herndon, V., Johansen, K., Markopoulou, K., Preiss, A., Rebay, I., Scottgale, N. (1990). Notch and the molecular genetics of neuroblast segregation in *Drosophila*. *Mol Reprod Dev.* **27**: 23-27
7. **Bach**, N. (2012). Funktionelle Analyse des Homeobox-Gens *orthopedia* in der Enddarm- und Nervensystementwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, *Universität des Saarlandes*
8. **Bailey**, T. J., El-Hodiri, H., Zhang, L., Shah, R., Mathers, P. H., Jamrich, M. (2004). Regulation of vertebrate eye development by *Rx* genes. *Int J Dev Biol.* **48**: 761-770
9. **Barolo**, S., Carver, L. A., Posakony, J. W. (2000). GFP and beta-Galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques* **29**: 726, 728, 730, 732
10. **Barthalay**, Y., Hipeau-Jacquotte, R., de la Escalera, S., Jiménez, F., Piovant, M. (1990). *Drosophila* neurotactin mediates heterophilic cell adhesion. *EMBO J.* **9**: 3603-3609
11. **Bayraktar**, O. A., Boone, J. Q., Dummond, M. L., Doe, C. Q. (2010). *Drosophila* type II neuroblast lineages keep Prospero levels low to generate large clones that contribute to the adult brain central complex. *Neural Dev.* **5**: 26 doi: 10.1186/1749-8104-5-26.
12. **Bayraktar**, O. A., Doe, C. Q. (2013). Combinatorial temporal patterning in progenitors expands neural diversity. *Nature* **498**: 449-456
13. **Bello**, B. C., Holbro, N., Reichert, H. (2007). Polycomp group genes are required for neural stem cell survival in postembryonic neurogenesis of *Drosophila*. *Development* **134**: 1091-1099
14. **Bello**, B. C., IZergina, N., Caussin, E., Reichert, H. (2008). Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Dev.* **3**: 5
15. **Bello**, B. C., Reichert, H., Hirth, F. (2006). The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the central larval brain of *Drosophila*. *Development* **133**: 2629-2648
16. **Berger**, C., Renner, S., Luer, K., Technau, G. M. (2007). The Commonly Used Marker ELAV Is Transiently Expressed in Neuroblasts and Glial Cells in the *Drosophila* Embryonic CNS. *Dev. Dyn.* **236**: 3562-3568
17. **Bertet**, C., Li, X., Erclik, T., Cavey, M., Wells, B., Desplan, C. (2014). Temporal Patterning of Neuroblasts Controls Notch-Mediated Cell Survival through Regulation of Hid or Reaper. *Cell* **158**: 1173-1186

18. **Betschinger, J., Mechtler, K., Knoblich, J. A.** (2006). Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Cell* **124**: 1241-1253
19. **Bhat, S. S., Rogers, R. C., Holden, K. R., Srivastara, A., K.** (2005). A novel in-frame deletion in ARX is associated with lissencephaly with absent corpus callosum and hypoblastic genitalia. *Am J Med Genet A*. **138**: 70-72
20. **Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., Jan, Y. N.** (1992). Deadpan, an essential pan-neural gene in *Drosophila*, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. *Genes Dev*. **6**: 2137-2151
21. **Birnbom, H. C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7**: 1513-1523
22. **Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 3312-3317
23. **Bjerkwig, R., Johansson, M., Miletic, H., Niclou, S. P.** (2009). Cancer stem cells and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. **19**: 279-284
24. **Bjerkwig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J., Terzis, A. J.** (2005). Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*. **5**: 899-904
25. **Blanco, J., Gehring, W. J.** (2008). Analysis of *twin of eyeless* regulation during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr Patterns* **8**: 523-527
26. **Blanco, J., Pandey, R., Wasser, M., Udolph, G.** (2011). Orthodenticle is necessary for survival of a cluster of clonally related dopaminergic neurons in the *Drosophila* larval and adult brain. *Neural Dev*. **6**: 34 doi: 10.1186/1749-8104-6-34.
27. **Boone, J. Q., Doe, C. Q.** (2008). Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineage containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol* **68**: 1185-1195
28. **Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q., Technau, G. M.** (1996). The Embryonic Central Nervous System Lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast Lineages Derived from the Ventral Half of the Neuroectoderm. *Dev Biol*. **179**: 41-64
29. **Bowman, S. K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K. A., Emery, G., Knoblich, J. A.** (2008). The Tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev Cell* **14**: 535-546
30. **Boyan, G. S., Reichert, H.** (2011). Mechanisms for complexity in the brain: generating the insect central complex. *Trends Neurosci*. **34**: 247-257
31. **Boyan, G. S., Reichert, H., Hirth, F.** (2003). Commissure formation in the embryonic insect brain. *Arthropod Struct Dev*. **32**: 61-67
32. **Boyan, G. S., Williams, I.** (2011). Embryonic development of the insect central complex: insights from lineages in the grasshopper and *Drosophila*. *Arthropod Struct Dev*. **40**: 334-348
33. **Brand, A. H., Livesey, F. J.** (2011). Neural Stem Cell Biology in Vertebrates and Invertebrates: More Alike than Different? *Neuron* **70**: 719-729
34. **Brand, A. H., Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415

35. **Brand, M.**, Jarman, A. P., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1993). *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* **119**: 1-17
36. **Brumby, A. M.**, **Richardson, H. E.** (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nature Reviews* **5**: 626-639
37. **Bullock, T. H.**, **Horridge, G. A.** (1965). Structure and function in the nervous system of invertebrates. Two Volumes. San Francisco: Freeman.
38. **Calleja, M.**, Moreno, E., Pelaz, S., Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**: 252-255
39. **Campbell, G.**, Göring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C. Q., Tomlinson, A. (1994). RK2, a glial specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. *Development* **120**: 2957-2966
40. **Campos, A. R.**, Rosen, D. R., Robinow, S. N., White, K. (1987). Molecular analysis of the locus *elav* in *Drosophila melanogaster*: a gene whose embryonic expression is neural specific. *EMBO J.* **6**: 425-431
41. **Campos-Ortega, J. A.** (1995). Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol.* **10**: 75-89
42. **Cecchi, C.**, Mallamaci, A., Boncinelli, E. (2000). *Otx* and *Emx* homeobox genes in brain development. *Int J Dev Biol.* **44**: 663-668
43. **Chang, K. C.**, Wang, C., Wang, H. (2012). Balancing self-renewal and differentiation by asymmetric division: insights from brain tumor suppressors in *Drosophila* neural stem cells. *Bioassays* **34**: 301-310
44. **Chell, J. M.**, **Brand, A. H.** (2010). Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cell from quiescence. *Cell* **143**: 1161-1173
45. **Chia, W.**, Somers, W. G., Wang, H., (2008). *Drosophila* neuroblast asymmetric division: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. *J Cell Biol.* **180**: 267-272
46. **Chinn, G. A.**, Hirokawa, K. E., Chuang, T. M., Urbina, C., Patel, F., Fong, J., Funatsu, N., Monuki, E. S. (2014). Agenesis of the Corpus Callosum Due to Defective Glial Wedge Formation in Lhx2 Mutant Mice. *Cereb Cortex* [Epub ahead of print]
47. **Choksi, S. P.**, Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E., van Steensel, B., Micklem, G., Brand, A.H. (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* **11**: 775-789
48. **Chu-LaGraff, Q.**, **Doe, C. Q.** (1993). Neuroblast specification and formation regulated by *wingless* in the *Drosophila* CNS. *Science* **261**: 1594-1597
49. **Clements, M.**, Duncan, D., Milbrandt, J. (2003). *Drosophila* NAB (dNAB) Is an Orphan Transcriptional Co-Repressor Required for Correct CNS and Eye Development. *Dev Dyn.* **226**: 67-81
50. **Cohen, S. M.**, **Jürgens, G.** (1990). Mediation of *Drosophila* head development by gap-like segmentation genes. *Nature* **346**: 482-485
51. **Cohen, S. M.**, **Jürgens, G.** (1991). *Drosophila* headlines. *Trends Genet.* **7**: 267-272
52. **Colombo, E.**, Collombat, P., Colasante, G., Bianchi, M., Long, J., Mansouri, A., Rubenstein, J. L., Broccoli, V. (2007). Inactivation of *Arx*, the murine ortholog of the X-linked lissencephaly with

- ambiguous genital, leads to severe disorganization of the ventral telencephalon with impaired neural migration and differentiation. *J. Neurosci.* **27**: 4786-4798
53. **Colonques**, J., Ceron, J., Reichert, H., Tejedor, F. J. (2011). A Transient Expression of *Prospero* Promotes Cell Cycle Exit of *Drosophila* Postembryonic Neurons through the Regulation of *Dacapo*. *PLoS One* **6**: e19342
 54. **Czerny**, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J., Busslinger, M. (1999). *Twin of eyeless*, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of *eyeless* in the control of eye development. *Mol Cell* **3**: 297-307
 55. **Dalton**, D., Chadwick, R., McGinnis, W. (1989). Expression and embryonic function of *empty spiracles*: a *Drosophila* homeobox gene with two patterning functions on the anterior posterior axis of the embryo. *Genes Dev.* **3**: 1940-1956
 56. **Daniel**, A., Dumstrei, K., Lengyel, J. A., Hartenstein, V. (1999). The control of cell fate in the embryonic visual system by *atonal*, *tailless* and EGFR signaling. *Development* **126**: 2945-2954
 57. **Das**, A., Den, S., Lichtneckert, R., Okada, R., Ito, K., Rodriguez, V., Reichert, H. (2008). *Drosophila* olfactory local interneurons and projection neurons derive from common neuroblast lineage specified by the *empty spiracles* gene. *Neural Dev.* **3**:33. doi: 10.1186/1749-8104-3-33.
 58. **Datta**, S., (1995). Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system. *Development* **121**: 1173-1182
 59. **Davis**, R. J., Tavsanlı, B. C., Dittrich, C., Walldorf, U., Mardon, G. (2003). *Drosophila* retinal homeobox (*drx*) is not required for establishment of the visual system, but is required for brain and clypeus development. *Dev Biol.* **259**. 272-287
 60. **Dietzl**, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**: 151-156
 61. **Doe**, C. Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* nervous system. *Development* **116**: 855-863
 62. **Doe**, C. Q., Chu-LaGriff, Q., Wright, D. M., Scott, M. P. (1991). The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* **65**: 451-464
 63. **Doe**, C. Q., Kuwada, J. Y., Goodman, C. S. (1985). From epithelium to neuroblasts to neurons: the role of cell interactions and cell lineage during insect neurogenesis. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **312**: 67-81
 64. **Dominguez**, M., **Campuzano**, S. (1993). *Asense*, a member of the *Drosophila* achaete-scute complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J.* **12**: 2049-2060
 65. **Dos Santos**, G., Schroeder, A. J., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Crosby, M. A., Thurmond, J., Emmert, D. B., Gelbart, W. M., the flybase Consortium (2015). FlyBase: introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gku1099
 66. **Driever**, W., **Nüsslein-Volhard**, C. (1988a). A Gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**: 83-93

67. **Driever, W., Nüsslein-Volhard, C.** (1988b) The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* **54**: 95-104
68. **Duffy, J. B.** (2002). GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. *Genesis* **34**: 1-15
69. **Easwaran, H. P., Leonhardt, H., Cardoso, M. C.** (2007). Distribution of DNA replication proteins in *Drosophila* cells. *BMC Cell Biol.* **8**: 42
70. **Egger, B., Boone, J. Q., Stevens, N. R., Brand, A. H., Doe, C. Q.** (2007). Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the *Drosophila* optic lobe. *Neural Dev.* **2**: 1
71. **Egger, B., Gold, K. S., Brand, A. H.** (2010). Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe. *Development* **137**: 2981-2987
72. **Eggert, T., Hauck, B., Hildebrandt, N., Gehring, W. J., Walldorf, U.** (1998). Isolation of a *Drosophila* homolog of the vertebrate homeobox gene *Rx* and its possible role in brain and eye development. *PNAS* **95**: 2343-2348
73. **Ellenbroek, S. I. J., Iden, S., Collard, J. G.** (2012). Cell polarity and cancer. *Sem. Cancer* **22**: 208-215
74. **de la Escalera, S., Bockamp, E. O., Moya, F., Piovant, M., Jiménez, F.** (1990). Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases. *EMBO J.* **9**: 3593-3601
75. **Félix, J. T., Magariños, M., Díaz-Benjumea, F. J.** (2007). Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development* **134**: 1845-1852
76. **Fernandes, V. M., Panchapakesan, S. S., Braid, L. R., Verheyen, E. M.** (2014). Nemo promotes Notch-mediated lateral inhibition downstream of proneural factors. *Dev Biol.* **392**: 334-343
77. **Finkelstein, R., Perrimon, N.** (1990). The *orthodenticle* gene is regulated by *bicoid* and *torso* and specifies *Drosophila* head development. *Nature* **346**: 485-488
78. **Florentin, A., Arama, E.** (2012). Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell. *J Cell Biol* **196**: 513-527
79. **Fröblius, A. C., Seaver, E. C.** (2006). *Capitella* sp. I *homeobrain-like*, the first lophotrochozoan member of a novel paired-like homeobox gene family. *Gene Expr Patterns* **6**: 985-991
80. **Furukubo-Tokunaga, K., Adachi, Y., Kurusu, M., Walldorf, U.** (2009). Brain patterning defects caused by mutations of the *twin of eyeless* in *Drosophila melanogaster*. *Fly* **3**: 1-7
81. **Gao, Q., Wang, Y., Finkelstein, R.** (1996). *Orthodenticle* regulation during embryonic head development in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **56**: 3-15
82. **Gehring, W. J.** (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* **236**: 1245-1252
83. **Gergen, J. P., Butler, B. A.** (1988). Isolation of the *Drosophila* segmentation gene *runt* and analysis of its expression during embryogenesis. *Genes Dev.* **2**: 1179-1193
84. **Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C., Jan, L. Y., Jan, Y. N.** (1993). Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. *Genes Dev.* **7**: 723-733
85. **González, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J., Campuzano, S.** (1989). Molecular analysis of the *asense* gene, a member of the *achete-scute complex* of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J* **8**: 3553-3562

86. **Grenningloh**, G., Rehm, E. J., Goodman, C. S. (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: *fasciclin II* functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* **67**: 45-57
87. **Grossniklaus**, U., Cadigan, K., M., Gehring, W. J. (1994). Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head. *Development* **120**: 3155-3171
88. **Grossniklaus**, U., Pearson, R. K., Gehring, W. J. (1992). The *Drosophila sloppy paired* locus encodes two proteins involved in segmentation that show homology to mammalian transcription factors. *Genes Dev.* **6**: 1030-1051
89. **Groth**, A. C., Fish, M., Nusse, R., Calos, M. P. (2004). Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase From Phage Φ C31. *Genetics* **166**: 1775-1782
90. **Haenfler**, J. M., Kuang, C., Lee, C. Y. (2012). Cortical aPKC kinase activity distinguishes neural stem cells from progenitor cells by ensuring asymmetric segregation of Numb. *Dev Biol.* **365**: 219-228
91. **Halfon**, M. S., Gisselbrecht, S., Lu, J., Estrada, B., Keshishian, H., Michelson, A. M. (2002). New fluorescent protein reporters for use with the *Drosophila* Gal4 expression system and for vital detection of balancer chromosomes. *Genesis* **34**: 135-138
92. **Halter**, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A., Technau, G. M. (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glial function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**: 317-332
93. **Hanahan**, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-580
94. **Hanström**, B. (1928). Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere. Berlin: Springer.
95. **Hartenstein**, V. (1993). Atlas of *Drosophila* Development. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
96. **Hartmann**, B., Hirth, F., Walldorf, U., Reichert, H. (2000). Expression, regulation and function of the homeobox gene *empty spiracles* in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *Mech Dev.* **90**: 143-153
97. **Hartmann**, H., Uyanik, G., Gross, C., Hehr, U., Lücke, T., Arslan-Kirchner, M., Antosch, B., Das, A. M., Winkler, J. (2004). Agenesis of the corpus callosum, abnormal genitalia and intractable epilepsy due to a novel familial mutation in the *Aristaless*-related homeobox gene. *Neuropediatrics* **35**: 157-160
98. **Hartwig**, O. (2014). Generation of a donor line for *hbn* gene targeting and screen for candidate genes concerning preoral brain commissure formation in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes
99. **Hasegawa**, E., Kaido, M., Takayama, R., Sato, M. (2013). Brain-specific-homeobox is required for the specification of neural types in the *Drosophila* optic lobe. *Dev Biol.* **377**: 90-99
100. **Hasegawa**, E., Kitada, Y., Kaido, M., Takayama, R., Awasaki, T., Tabata, T., Sato, M. (2011). Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the *Drosophila* visual center. *Development* **138**: 983-993
101. **Hayashi**, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., Ueda, R., Uemura, T., Yoshihara, M., Goto, S. (2002). GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of collections of Gal4 enhancer traps. *Genesis* **34**: 58-61

102. **He, J.**, Zhang, G., Almeida, A. D., Cayouette, M., Simons, B. D., Harris, W. A. (2012). How variable clones build an invariant retina. *Neuron* **75**: 786-798
103. **Heberlein, U.**, Mlodzik, M., Rubin, G. M. (1991). Cell-fate determination in the developing *Drosophila* eye: role of the rough gene. *Development* **112**: 703-712
104. **Herzig, C. H.**, Thor, S., Thomas, J. B., Reichert, H., Hirtz, F. (2001). Expression and function of the LIM homeodomain protein Apterous during brain development of *Drosophila*. *Dev Genes Evol.* **211**: 545-554
105. **Hirth, F.**, Hartmann, B., Reichert, H. (1998). Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* **125**: 1579-1589
106. **Hirth, F.**, Kammermeier, L., Walldorf, U., Noll, M., Reichert, H. (2003). An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from *Drosophila*. *Development* **130**: 2365-2373
107. **Hirth, F.**, **Reichert, H.** (1999). Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. *Bioessays* **21**: 677-684
108. **Hirth, F.**, Therianos, S., Loop, T., Gehring, W. J., Reichert, H., Furukubo-Tokunaga, K. (1995). Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* **15**: 769-778
109. **Hofbauer, A.**, **Campos-Ortega, J. A.** (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol.* **198**: 264-274
110. **Holmgren, B.** (1916). Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns der Polychaeten, Onychophora, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insekten. *Kungl. Svenska. Vetensk. Handlingar.* **56**: 1-303
111. **Homem, C. C.**, **Knoblich, J. A.** (2012). *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development* **139**: 4297-4310
112. **Horn, C.**, Jaunich, B., Wimmer, E. A. (2000). Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev Genes Evol.* **210**: 623-629
113. **Hortsch, M.**, Patel, N. H., Bieber, A. J., Traquina, Z. R., Goodman, C. S. (1990). *Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* **110**: 1327-1340
114. **Huang, Z.**, **Kunes, S.** (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* **86**: 411-422
115. **Hülkamp, M.**, **Tautz, D.** (1991). Gap genes and gradients - The logic behind the gaps. *Bio Essays* **13**: 261-268
116. **Hummel, T.**, Krukkert, K., Roos, J., Klämbt, C. (2000). *Drosophila* Futsch/22C10 Is a MAP1B-like Protein Required for Dendritic and Axonal Development. *Neuron* **26**: 357-370
117. **Ikeshima-Kataoka, H.**, Skeath, J. B., Nabeshima, Y., Doe, C. Q., Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric division. *Nature* **390**: 625-629
118. **Ingham, P. W.** (1988). The molecular genetics of embryonic patterning formation in *Drosophila*. *Nature* **335**: 25-34.

119. **Ingham**, P. W. (1991). Segment polarity in genes and cell patterning within *Drosophila* body segments. *Curr Opin Gen Dev.* **1**: 261-267
120. **Isshiki**, T., Pearson, B., Holbrook, S., Doe, C. Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* **106**: 511-521
121. **Ito**, K., **Hotta**, Y. (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblast in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* **149**: 134-148
122. **Izergina**, N., Balmer, J., Bello, B., Reichert, H. (2009). Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Dev.* **4**: 44
123. **Jan**, L. Y., **Jan**, Y. N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 2700-2704
124. **Janssens**, D. H., Komori, H., Grbac, D., Chen, K., Koe, C. T., Wang, H., Lee, C. Y. (2014). Earmuff restricts progenitor cell potential by attenuating the competence to respond to self-renewal factors. *Development* **141**: 1036-1046
125. **Januschke**, J., **González**, C., (2008). *Drosophila* asymmetric division, polarity and cancer. *Oncogene* **27**: 6994-7002
126. **Jarman**, A. P., Brand, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1993). The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development* **119**: 19-29
127. **Jiang**, Y., **Reichert**, H. (2013). Analysis of neural stem cell self-renewal and differentiation by transgenic RNAi in *Drosophila*. *Arch Biochem Biophys.* **534**: 38-43
128. **Jones**, B., **McGinnis**, W. (1993). A new *Drosophila* homeobox gene, *bsh*, is expressed in a subset of brain cells during embryogenesis. *Development* **117**: 793-806
129. **Jürgens**, G., Lehmann, R., Schardin, M., Nüsslein-Volhard, C. (1986). Segmental organization of the head in the embryo of *Drosophila melanogaster*. A blastoderm fate map of the cuticle structures of the larval head. *Roux's Arch Dev Biol.* **195**: 359-377
130. **Kammermeier**, L., Leemans, R., Hirth, F., Flister, S., Wenger, U., Walldorf, U., Gehring, W. J., Reichert, H. (2001). Differential expression and function of the *Drosophila Pax6* genes *eyeless* and *twin of eyeless* in embryonic central nervous system development. *Mech Dev.* **103**: 71-78
131. **Kaspar**, P. (2008). Die Bedeutung des Homeoboxgens *homeobrain* für die embryonale Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, *Universität des Saarlandes*
132. **Kawamori**, H., Tai, M., Sato, M., Yasugi, T., Tabata, T. (2011). Fat/Hippo pathway regulates the progress of neural differentiation signaling in the *Drosophila* optic lobe. *Develop. Growth Differ.* **53**: 653-667
133. **Knoblich**, J. A., Jan, L. A., Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* **377**: 624-627
134. **Kriegstein**, A., Noctor, S., Martinez-Cerdeño, V. (2006). Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci.* **7**: 883-890
135. **Kuert**, P. A., Bello, B. C., Reichert, H. (2012). The *labial* gene is required to terminate proliferation of identified neuroblasts in postembryonic development of the *Drosophila* brain. *Biology Open* **000**: 1-

136. **Kumar**, A. Fung, S., Lichtneckert, R., Reichert, H., Hartenstein, V. (2009). Arborization Pattern of *Engrailed*-Positive Neural Lineages Reveal Neuromere Boundaries in the *Drosophila* Brain Neuropil. *J Comp Neurol.* **517**: 87-104
137. **Kunisch**, M., Haenlin, M., Campos-Ortega, J. A. (1994). Lateral Inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene *delta* is enhanced by proneural proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **21**: 10139-10143
138. **Kunz**, T., Kraft, K. F., Technau, G. M., Urbach, R. (2012). Origin of *Drosophila* mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *Development* **139**: 2510-2522
139. **Kurant**, E., Pai, C. Y., Sharf, R., Halachmi, N., Sun, Y. H., Salzberg, A. (1998). *dorsotonals/homothorax*, the *Drosophila* homologue of *meis1*, interacts with *extradenticle* in patterning of the embryonic PNS. *Development* **125**: 1037-1048
140. **Kurusu**, M., Awasaki, A., Masuda-Nakagawa, L. M., Kawauchi, H., Ito, K., Furukubo-Tokunaga, K. (2002). Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of *fasciclin II*. *Development* **129**: 409-419
141. **Kurusu**, M., Maruyama, Y., Adachi, Y., Okabe, M., Suzuki, W., Furukubo-Tokunaga, K. (2009). A conserved nuclear receptor, *Tailless*, is required for efficient proliferation and prolonged maintenance of mushroom body progenitors in the *Drosophila* brain. *Dev Biol.* **326**:224-236
142. **Kurusu**, M., Nagao, T., Walldorf, U., Flister, S., Gehring, W. J., Furukubo-Tokunaga, K. (2000). Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the *Drosophila* brain, by *eyeless*, *twin of eyeless*, and *dachshund* genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 2140-2144
143. **Larsen**, C., Shy, D., Spindler, S. R., Fung, S., Pereanu, W., Younossi-Hartenstein, A., Hartenstein, V. (2009). Patterns of growth, axonal extension and axonal arborization of neuronal lineages in the developing *Drosophila* brain. *Dev Biol.* **335**: 289-304
144. **Lee**, B. P., **Jones**, B. W. (2005). Transcriptional regulation of the *Drosophila* glial gene *repo*. *Mech Dev.* **122**: 849-862
145. **Lee**, C. Y., Robinson, K. J., Doe, C. Q. (2006). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* **439**: 594-598
146. **Lee**, C. Y., Wilkinson, B. D., Siegrist, S. E., Wharton, R. P., Doe, C. Q. (2006). Brat is a Miranda cargo protein that promotes neural differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell* **4**: 441-449
147. **Lee**, T., **Luo**, L. (1999). Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis. *Neuron* **22**: 451-461
148. **Lee**, T., **Luo**, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* **24**: 251-254
149. **Leuzinger**, S., Hirth, F., Gerlich, D., Acampora, D., Simeone, A., Gehring, W. J., Finkelstein, R., Furukubo-Tokunaga, K., Reichert, H. (1998). Equivalence of the fly *orthodenticle* gene and human *OTX* genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* **125**: 1703-1710
150. **Li**, L., **Vaessin**, H. (2000). Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev.* **14**: 147-151

151. Li, X., Chen, Z., Desplan, C. (2013). Temporal Patterning of Neural Progenitors in *Drosophila*. *Curr Top Dev Biol.* **105**:69-96
152. Li, X., Erlik, T., Bertet, C., Chen, Z., Vouter, R., Venkatesh, S., Morante, J., Celik, A., Desplan, C. (2013). Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblast controls neural fate. *Nature* **498**: 456-464
153. Lichtneckert, R., Bello, B., Reichert, H. (2007). Cell lineage-specific expression and function of the *empty spiracles* gene in adult brain development of *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**: 1291-1300
154. Lichtneckert, R., Nobs, L., Reichert, H. (2008). *Empty spiracles* is required for the development of olfactory projection neuron circuitry in *Drosophila*. *Development* **135**: 2415-2424
155. Lichtneckert, R., Reichert, H. (2005). Insight into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity* **94**: 465-477
156. Lin, S. C., Chang, Y. Y., Chan, C. C. (2014). Strategies for gene disruption in *Drosophila*. *Cell Biosci.* **4**: 63 doi: 10.1186/2045-3701-4-63. eCollection 2014.
157. Lovick, J. K., Ngo, K. T., Omoto, J. J., Wong, D. C., Nguyen, J. D., Hartenstein, V. (2013). Postembryonic lineages of the *Drosophila* brain: I. Development of the lineage-associated fiber tracts. *Dev Biol.* **15**: 228-257
158. Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A., Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**:1-6
159. Lundgren, S. E., Callahan, C. A., Thor, S., Thomas J. B. (1995). Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homeodomain gene *apterous*. *Development* **121**: 1769-1773
160. Mardon, G., Solomon, N. M., Rubin, G. M. (1994). *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**: 3473-3486
161. Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A., Jamrich, M. (1997). The *Rx* homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* **387**: 603-607
162. Martinez-Cerdeño, V., Noctor, S. C., Kriegstein, A. R. (2006). The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb Cortex.* **1**: 152-162
163. Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H., Izumi, H. (1998). *miranda* localizes *stufen* and *prospero* asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* **125**: 4089-4098
164. Mazza, M. E., Pang, K., Reitzel, A. M., Martindale, M. Q., Finnerty, J. R. (2010). A conserved cluster of three PRD-class homeobox genes (*homeobrain*, *rx* and *orthopedia*) in the Cnidaria and Protostomia. *Evodevo.* **1**: 3
165. McGinnis, W., Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**: 283-302
166. Mendoza, C., Olguin, P., Lafferte, G., Thomas, U., Ebisch, S., Gundelfinger, E. D., Kukuljan, M., Sierralta, J. (2003). Novel Isoforms of Dlg Are Fundamental for Neural Development in *Drosophila*. *J Neuro.* **23**: 2093-2101
167. Merkle, F. T., Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol.* **18**: 704-709

168. **Minden**, J. (2008). Dissection of the embryonic brain using photoactivated gene expression. *Adv Exp Med Biol.* **628**: 57-68
169. **Mlodzik**, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S., Rubin, G. M. (1990). The *Drosophila seven-up* Gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* **60**: 211-224
170. **Morante**, J., **Desplan**, C. (2008). The Color-Vision Circuit in the Medulla of *Drosophila*. *Curr Biol.* **18**: 553-565
171. **Morante**, J., Erclik, T., Desplan, C. (2011). Cell migration in *Drosophila* optic lobe neurons is controlled by *eyeless/Pax6*. *Development* **138**: 687-693
172. **Moreau-Fauvarque**, C., Taillebourg, E., Boissoneau, E., Mesnard, F., Dura, J. M. (1998). The receptor tyrosine kinase *linotte* is required for neuronal pathway selection in the *Drosophila* mushroom bodies. *Mech Dev.* **78**: 47-61
173. **Morgan**, T. H. (1914). No crossing over in the Male of *Drosophila* in the Second and Third Pairs of Chromosomes. *Biol Bull.* **26**: 195-204
174. **Nassif**, C., Noveen, A., Hartenstein, V. (1998). Embryonic Development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of Pioneer Tracts. *J. Comp. Neurol.* **402**: 10-31
175. **Neumüller**, R. A., **Knoblich**, J. A. (2011). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* **23**: 2675-2699
176. **Neumüller**, R. A., Richter, C., Fischer, A., Neumüller, K. G., Knoblich, J. A. (2011). Genome-Wide Analysis of Self-Renewal in *Drosophila* Stem Cells by Transgenic RNAi. *Cell Stem Cell* **8**: 580-593
177. **Noveen**, A., Daniel, A., Hartenstein, V. (2000). Early development of the *Drosophila* mushroom body: the roles of *eyeless* and *dachshund*. *Development* **127**: 3475-3488
178. **Nüsslein-Volhard**, C., **Wieschaus**, E. (1980). Mutations effecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801
179. **Oliva**, C., Choi, C. M., Nicolai, L. J., Mora, N., De Geest, N., Hassan, B. A. (2014). Proper connectivity of *Drosophila* motion detector neurons requires Atonal function in progenitor cells. *Neural Dev.* **9**:4
180. **Page**, D. T. (2002) Inductive Patterning of the embryonic brain in *Drosophila*. *Development* **129**: 2121-2128
181. **Pai**, C. Y., Kuo, T. S., Jaw, T. J., Kurant, E., Chen, C. T., Bessarab, D. A., Salzberg, A., Sun, Y. H. (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, Extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**: 435-446
182. **Panganiban**, G., Nagy, L., Carroll, S. B. (1994). The role of the *Distal-less* gene in the development and evolution of insect limbs. *Curr Biol.* **4**: 671-675
183. **Panganiban**, G., **Rubenstein**, L. R. (2002). Developmental functions of the *Distal-less/Dlx* homeobox genes. *Development* **129**: 4371-4386
184. **Pankratz** M. J., **Jäckle**, H. (1993). Blastoderm segmentation. Bate Martinez Arias, 1993: 467-516
185. **Pereanu**, W., **Hartenstein**, V. (2006). Neuronal Lineages of the *Drosophila* Brain: A three-dimensional Digital Atlas of the Pattern of Lineage Location and Projection at the Late Larval Stage. *J. Neurosci.* **26**: 5534-5553

186. **Pereanu, W.**, Younossi-Hartenstein, A., Lovick, J., Spindler, S., Hartenstein, V. (2011). Lineage-Based analysis of the Development of the Central Complex of the *Drosophila* Brain. *J Comp Neurol.* **519**: 661-689
187. **Pérez-Gómez, R.**, Slováková, J., Rives-Quinto, N., Krejci, A., Carmena, A. (2013). A Serrate-Notch-Canoe complex mediates essential interactions between glia and neuroepithelial cells during *Drosophila* optic lobe development. *J. Cell Science* **126**: 4873-4884
188. **Pfeiffer, B. D.**, Jenett, A., Hammonds, A. S., Ngo, T. B., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J. W., Wan, K. H., Lavery, T. R., Mungall, C., Svirskas, R., Kadonaga, J. T., Doe, C. Q., Eisen, M. B., Celniker, S. E., Rubin, G. M. (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**: 9715-9720
189. **Piñeiro, C.**, Lopes, C. S., Casares, F. (2014). A conserved transcriptional network regulates lamina development in the *Drosophila* visual system. *Development* **141**: 2838-2847
190. **Prehoda, K. E.** (2009). Polarization of *Drosophila* neuroblasts during asymmetric division. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(2):a001388. doi: 10.1101/cshperspect.a001388.
191. **Quiring, R.**, Walldorf, U., Kloter, U., Gehring, W. J. (1994). Homology of the *eyeless* Gene of *Drosophila* to the *Small eye* Gene in Mice and Aniridia in Humans. *Science* **265**: 785-789
192. **Reichert, H.** (2005). A tripartite organization of the urbilaterian brain: developmental genetic evidence from *Drosophila*. *Brain Res Bull.* **66**: 491-494
193. **Rempel, J. G.** (1975). The evolution of the insect head: the endless dispute. *Quaestiones Entomologicae* **11**: 7-25
194. **Renn, S. C. P.**, Armstrong, J. D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K., Taghert, P. H. (1999). Genetic Analysis of *Drosophila* Ellipsoid Body Neuropil: Organization and Development of the Central Complex. *J. Neurobiol.* **41**:189-207
195. **Richter, S.**, Hartmann, B., Reichert, H. (1998). The *wingless* gene is required for embryonic brain development in *Drosophila*. *Dev Genes Evol.* **208**: 37-45
196. **Riebli, N.**, Viktorin, G., Reichert, H. (2013). Early-born neurons in type II neuroblast lineages establish a larval primordium and integrate into adult circuitry during central complex development in *Drosophila*. *Neural Dev.* **8**: 6
197. **Rieckhof, G. E.**, Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M., Mann, R. S. (1997). Nuclear Translocation of Extradenticle Requires *homothorax*, which encodes an Extradenticle-Related Homeodomain Protein. *Cell* **91**: 171-183
198. **Rizzo, J. M.**, **Buck, M. J.** (2012). Key principles and critical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prev Res.* **5**: 887-900
199. **Robertson, K.**, Mergliano, J., Minden, J. S. (2003). Dissecting *Drosophila* embryonic brain development using photoactivated gene expression. *Dev Biol.* **260**: 124-137
200. **Robinow, S.**, **White, K.** (1991) Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol.* **22**: 443-461
201. **Rogers, B. T.**, **Kaufmann, T. C.** (1996). Structure of the insect head as revealed by the EN protein pattern in developing embryos. *Development* **122**: 3419-3432

202. **Rogulja-Ortmann, A., Technau, G. M.** (2008). Multiple roles for Hox genes in segment-specific shaping of CNS lineages. *Fly* **2**: 316-319
203. **Rubin, G. M., Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* transposable element vectors. *Science* **218**: 348-353
204. **Rudolph, K. M., Liaw, G. W., Daniel, A., Green, P., Courey, A. J., Hartenstein, V., Lengyel, J. A.** (1997). Complex regulatory region mediates *tailless* expression in early embryonic patterning and brain development. *Development* **124**: 4297-4308
205. **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. G., Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487-491
206. **Salvaterra, P. M., Kitamoto, T.** (2001). *Drosophila* cholinergic neurons and processes visualized with Gal4/UAS-cd8GFP. *Gene Expr Patterns* **1**: 73-82
207. **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
208. **Sato, M., Suzuki, T., Nakai, Y.** (2013). Waves of differentiation in the fly visual system. *Dev Biol.* **380**: 1-11
209. **Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol.* **189**: 186-204
210. **Schmidt-Ott, U., Gonzalez-Gaitan, M., Jäckle, H., Technau, G. M.** (1994). Number, identity and sequence of the *Drosophila* head segments as revealed by neural elements and their deletion patterns in mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 8363-8367
211. **Schmidt-Ott, U., Technau, G. M.** (1992). Expression of *en* and *wg* in the embryonic head and brain of *Drosophila* indicates a refolded band of seven segment remnants. *Development* **116**: 111-125
212. **Schmidt-Ott, U., Technau, G. M.** (1994). Fate mapping in the procephalic region of the embryonic head. *Roux's Arch Dev Biol.* **203**: 367-373
213. **Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W.** (2012). NIH ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**: 671-675
214. **Sedaghat, Y., Sonnenfeld, M.** (2002). The *rjing* gene is required for embryonic brain development in *Drosophila*. *Dev Genes Evol.* **212**: 272-287
215. **Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., Goodman, C. S.** (1993). Mutations effecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* **10**: 409-426
216. **Seibert, J., Volland, D., Urbach, R.** (2009). Ems and Nkx6 are central regulators in dorsoventral patterning of the *Drosophila* brain. *Development* **136**: 3937-3947
217. **Sen, S., Hartmann, B., Reichert, H., Rodriguez, V.** (2010). Expression and function of the *empty spiracles* gene in olfactory sense organ development of *Drosophila melanogaster*. *Development* **137**: 3687-3695

218. **Sen, S.**, Reichert, H., VijayGhaghavan, K. (2013). Conserved roles of *ems/Emx* and *otd/Otx* in olfactory visual system development in *Drosophila* and mouse. *Open Biol.* **3**: 3(5):120177. doi: 10.1098/rsob.120177.
219. **Shen, C. P.**, Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1997). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* **90**: 449-458
220. **Sibarita, J. B.** (2005). Deconvolution microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **95**: 201-243
221. **Simeone, A.**, D'Apice, M. R., Nigro V, Casanova, J., Graziani, F., Acampora, D., Avantaggiato, V. (1994). *Orthopedia*, a novel homeobox containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and *Drosophila*. *Neuron* **13**: 83-101
222. **Skeath, J. B.**, **Carroll, S. B.** (1994). The *achete-scute* complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J.* **10**: 714-721
223. **Small, S.**, **Levine, M.** (1991). The initiation of pair-rule-stripes in the *Drosophila* blastoderm. *Curr Opin Gen Dev.* **1**: 255-260
224. **Sousa-Nunes, R.**, Yee, L. L., Gould, A. P. (2011). Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature* **471**: 508-512
225. **Spana, E. P.**, **Doe, C. Q.** (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**: 3187-3195
226. **Spindler, S. R.**, **Hartenstein, V.** (2010). The *Drosophila* neural lineages: a model system to study brain development and circuitry. *Dev Genes Evol.* **220**: 1-10
227. **Sprecher, S. G.**, Müller, M., Kammermeier, L., Miller, D. F., Kaufman, T. C., Reichert, H., Hirth, F. (2004). Hox gene cross-regulation interactions in the embryonic brain of *Drosophila*. *Mech Dev.* **121**: 527-536
228. **Sprecher, S. G.**, Reichert, H., Hartenstein, V. (2007). Gene expression patterns in primary neuronal clusters of the *Drosophila* embryonic brain. *Gene Expr Patterns* **7**: 584-595
229. **Stefanatos, R. K. A.**, **Vidal, M.** (2011). Tumor invasion and metastasis in *Drosophila*: A bold past, a bright future. *J Genet Genomics.* **28**: 431-438
230. **Strecker, T. R.**, Merriam, J. R., Lengyel, J. A. (1988). Graded requirement for the zygotic terminal gene, *tailless*, in the brain and tail region of the *Drosophila* embryo. *Development* **102**: 721-734
231. **Suzuki, T.**, Kaido, M., Takayama, R., Sato, M. (2013). A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the *Drosophila* visual center. *Development* **380**: 12-24
232. **Technau, G. M.**, Berger, C., Urbach, R. (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn.* **235**: 861-869
233. **Tettamanti, M.**, Armstrong, J. D., Endo, K., Yang, M. Y., Furukubo-Tokunaga, K., Kaiser, K., Reichert, H., (1997). Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centers for associative learning and memory. *Dev Genes Evol.* **207**: 242-252
234. **Therianos, S.**, Leuzinger, S., Hirth, F., Goodman, C. S., Reichert, H. (1995). Embryonic development of the *Drosophila* brain: Formation of commissural and descending pathways. *Development* **121**: 3849-3860

235. **Tipping, M., Perrimon, N.** (2014). *Drosophila* as a model for context-dependent tumorigenesis. *J Cell Physiol.* **229**: 27-33
236. **Truman, J. W., Moats, W., Altman, J., Marin, E. C., Williams, D. W.** (2010). Role of Notch signaling in establishing the hemilineages of secondary neurons in *Drosophila melanogaster*. *Development* **137**: 53-61
237. **Tsuji, T., Hasegawa, E., Isshiki, T.** (2008). Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors. *Development* **135**: 3859-3869
238. **Urbach, R., Schnabel, R., Technau, G. M.** (2003). The patterning of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development. *Development* **130**: 3589-3606
239. **Urbach, R., Technau, G. M.** (2003). Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* **130**: 3621-3637
240. **Vaessin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L. Y., Jan, Y. N.** (1991) prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in *Drosophila*. *Cell* **67**: 941-953
241. **van Meyel, D. J., O'Keefe, D. D., Thor, S., Jurata, L. W., Gill, G. N., Thomas, J. B.** (2000). Chip is an essential cofactor for Apterous in the regulation of axon guidance in *Drosophila*. *Development* **127**: 1823-1831
242. **Venken, K. J., Carlson, J. W., Schulze, K. L., He, Y., Spokony, R., Wan, K. H., Koriabine, M., de Jong, P. J., White, K. P., Bellen, H. J., Hoskins, R. A.** (2009). Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* **6**: 431-434
243. **Venken, K. J., He, Y., Hoskins, R. A., Bellen, H. J.** (2006). P[acman]: a BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. *Science* **314**: 1747-1751
244. **Viktorin, G., Riebli, N., Popkova, A., Giangrande, A., Reichert, H.** (2011). Multipotent neural stem cells generate glia cells of the central complex through transit amplifying intermediate progenitors in *Drosophila* brain development. *Dev Biol.* **356**: 553-565
245. **Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Dürrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M. C., Schmidt, M., Qin, G., Wichmann, C., Kittel, R., Sigrist, S. J., Buchner, E.** (2006). Bruchpilot, a Protein with Homology to ELKS/CAST, Is Required for Structural Integrity and Function of Synaptic Active Zones in *Drosophila*. *Neuron* **49**: 833-844
246. **Wallace, K., Liu, T.-H., Vaessin, H.** (2000). The Pan-Neural bHLH Proteins DEADPAN and ASENSE Regulate Mitotic Activity and cdk Inhibitor *dacapo* Expression in the *Drosophila* Larval Optic Lobes. *Genesis* **26**: 77-85
247. **Walldorf, U., Gehring, W. J.** (1992). *Empty spiracles*, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO J.* **11**: 2247-2259
248. **Walldorf, U., Kiewe, A., Wickert, M., Ronshaugen, M., McGinnis, W.** (2000). *Homeobrain*, a novel paired-like homeobox gene is expressed in the *Drosophila* brain. *Mech Dev.* **96**: 141-144

249. **Wang, X.**, Sun, B., Yasuyama, K., Salvaterra, P. M. (1994). Biochemical analysis of proteins recognized by anti-HRP antibodies in *Drosophila melanogaster*: identification and characterization of neuron specific and male specific glycoproteins. *Insect Biochem Mol Biol.* **24**: 233-242
250. **Watson, K. L.**, Justice, R. W., Bryant, P. J. (1994). *Drosophila* in cancer research. The first fifty tumor suppressor genes. *J Cell Sci suppl.* **18**: 19-33
251. **Weng, M.**, Golden, K. L., Lee, C. Y. (2010). dFzefz/Earmuff maintains the Restricted Developmental of Intermediate Neuronal Progenitors in *Drosophila*. *Dev Cell* **18**: 126-135
252. **Weng, M.**, Lee, C.-Y. (2011) Keeping neuronal progenitor cells on a short leash during *Drosophila* neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* **21**: 36-42
253. **Weng, M.**, Haenfler, J. M., Lee, C. Y. (2012). Changes in Notch Signaling Coordinates Maintenance and Differentiation of the *Drosophila* Larval Optic Lobe. *Dev. Neurobiol.* **72**: 1376-1390
254. **Wildemann, B.**, Reichert, H., Bicker, G. (1997). Embryonic brain tract formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol.* **206**: 536-540
255. **Wimmer, E. A.**, Jäckle, H., Pfeifle, C., Cohen, S. M. (1993). A *Drosophila* homologue of human SP1 is a head-specific segmentation gene. *Nature* **366**: 690-694
256. **Woodhouse, E.**, Hersperger, E., Shearn, A. (1998). Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes. *Dev Genes Evol.* **8**: 542-550
257. **Xiao, Q.**, Komori, H., Lee, C. Y. (2012). *klumpfuss* distinguishes stem cells from progenitor cells during asymmetric neuroblast division. *Development* **139**: 2670-2680
258. **Xiong, W. C.**, Okano, H., Patel, H., Blendy, J. A., Montell, C. (1994). *repo* encodes a glial-specific homeodomain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev.* **8**: 981-994
259. **Yang, J. S.**, Awasaki, T., Yu, H. H., He, Y., Ding, P., Kao, J. C., Lee, T. (2013). Diverse neural lineages make stereotyped contributions to the *Drosophila* locomotor control center, the central complex. *J Comp Neurol.* **521**: 2645-2662
260. **Yang, M. Y.**, Armstrong, J. D., Vilinsky, I., Strausfeld, N. J., Kaiser, K. (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap-expression patterns. *Neuron* **15**: 45-54
261. **Yasugi, T.**, Sugie, A., Umetsu, D., Tabata, T. (2010). Coordinating sequential action of EGFR and Notch signaling pathways regulates proneural wave progression in the *Drosophila* optic lobe. *Development* **137**: 3193-3203
262. **Yasugi, T.**, Umetsu, D., Murakami, S., Sato, M., Tabata, T. (2008). *Drosophila* optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT. *Development* **136**: 1471-1480
263. **Young, J. M.**, **Armstrong, J. D.**, (2010). Building the Central Complex in *Drosophila*: The Generation and Development of Distinct Neural Subsets. *J Comp Neurol.* **518**: 1525-1541
264. **Younossi-Hartenstein, A.**, Green, P., Liaw, G. J., Rudolph, K., Lengyel, J., Hartenstein, V. (1997). Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tll*, *otd*, *ems*, and *btd*. *Dev. Biol.* **182**: 270-280
265. **Younossi-Hartenstein, A.**, Nassif, C., Green, P., Hartenstein, V. (1996). Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J. Comp. Neurol.* **370**: 313-329

266. **Younossi-Hartenstein**, A., Nguyen, B., Shy, D., Hartenstein, V. (2006). Embryonic Origin of the *Drosophila* Brain Neuropile. *J. Comp. Neurol.* **497**: 981-998
267. **Yu**, H. H., Awasaki, T., Schroeder, M. D., Long, F., Yang, J. S., Yisheng, H., Ding, P., Kao, J. C., Wu, G. Y., Peng, H., Myers, G., Lee, T. (2013). Clonal development and organization of the adult *Drosophila* central brain. *Curr. Biol.* **23**: 633-643
268. **Zhang**, L., Mathers, P. H., Jamrich, M. (2000). Funktion of *Rx*, but not *Pax6*, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* **28**: 135-142
269. **Zhu**, S., Barshaw, S., Wildonger, J., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (2012). Ets transcription factor Pointed promotes the generation of intermediate neural progenitors in *Drosophila* larval brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* **108**: 20615-20620
270. **Zhu**, S., Wildonger, J., Barshaw, S., Younger, S., Huang, Y., Lee, T. (2012). The bHLH Repressor Deadpan Regulates the Self-renewal and Specification of *Drosophila* Larval Neural Stem Cells independently of Notch. *PLoS ONE* **7**: e46472

7. Anhang

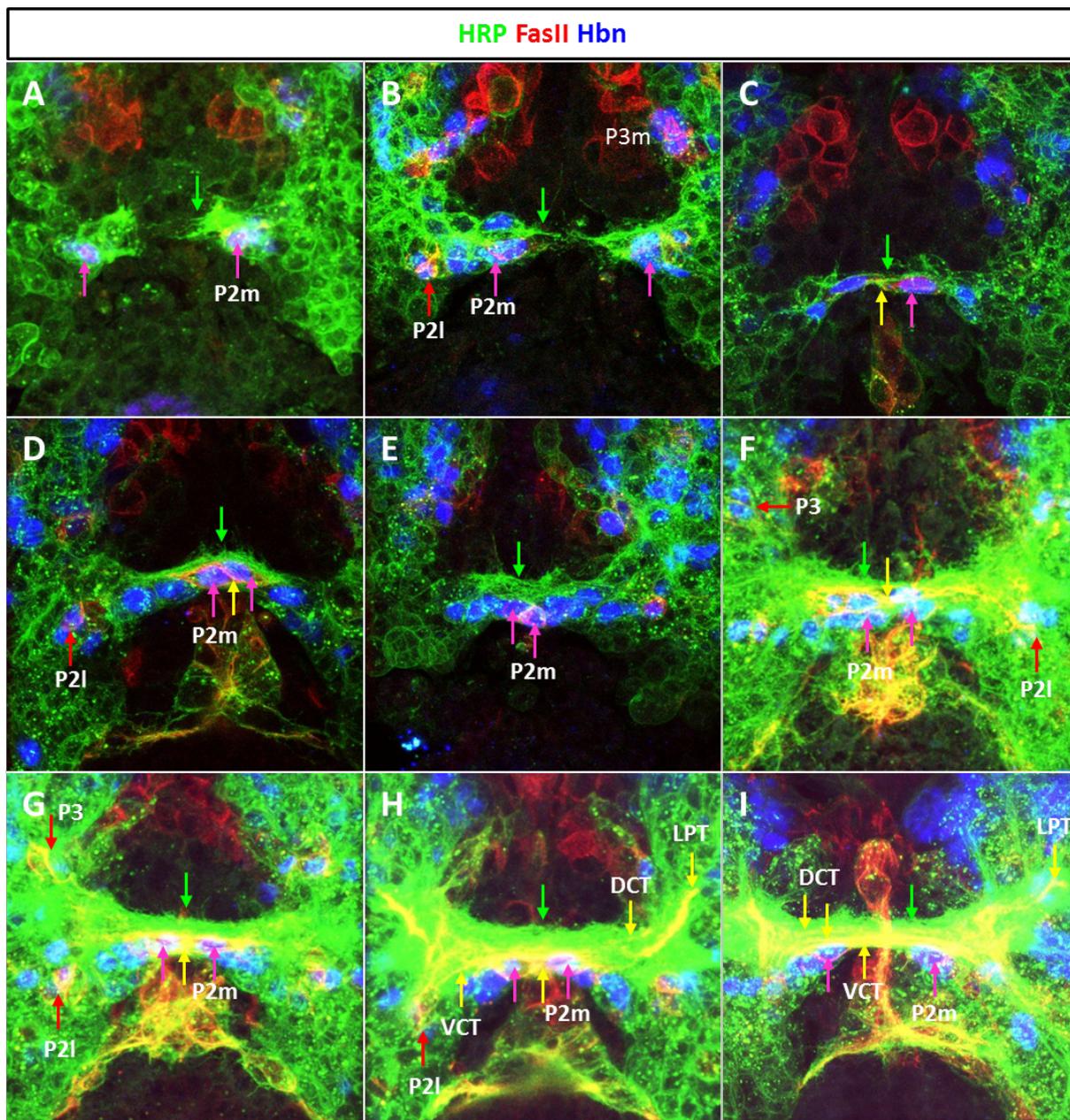


Abb.7.1: Detaildarstellung der Kommissurbildung. Konfokale Aufnahmen von yw-Embryonen (A, spätes ES 12 bis I, ES 14) in anterior-dorsaler Aufsicht (63x, Zoom) mit anti-FasII-, -Hbn- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: Grüne Pfeile zeigen die HRP-pos. Wachstumskegel sowie Axontrakte. Lila Pfeile markieren die P2m-Pionierzellen. Rote Pfeile markieren die P2I bzw. P3-Pioniercluster. Gelbe Pfeile markieren die Pioniertrakte DCT, VCT und den LPT. (A) Vergrößerte Darstellung der Hemisphärenvorsprünge mit weit in die Mittellinie hineinreichenden, HRP-pos. Wachstumskegeln. (B) Verlängerte Vorsprünge. Beginnende Aufreihung der Hbn-pos. Neurone hinter den P2m-Pionierneuronen bis zur P2I-Pionierzelle. In der Mittellinie treffen HRP-pos. Wachstumskegel aufeinander. P3m-Pioniercluster anterior der Hemisphärenvorsprünge dorso-medial an der Mittellinie. (C) Dünne, etablierte Zellbrücke mit FasII/Hbn-pos. Zellen in der Mittellinie. (D) Zellbrücke fertig assembliert. Vermehrtes Aufkommen von anterioren, HRP-pos. Axontrakten. FasII-Färbung der P2m-Pionierzelle erscheint prominent. (E) Weitere einwachsende HRP-pos. Trakte, P2m-Pionierneurone verbleiben zentral. (F) Flanken der Zellbrücke zeigen dichtere neuronale Verbindung zu den Hemisphären. Die Kommissur wird durch einen FasII-pos. Pioniertrakt der P2m-Neurone durchzogen. Beginn der Bildung des dorsalen und ventralen Kommissurtraktes von P2I und P3 aus. Prominente FasII/Hbn-pos. Pionierzellen weiterhin um die Mittellinie angeordnet. (G) Die Kommissur ist teilweise etabliert. Zentrale FasII/Hbn-pos. Pionierzellen weiterhin stark gefärbt mit FasII-pos. Projektionen. P3 und P2I nahe der Kommissur bilden den DCT bzw. VCT in Richtung der PHK aus. HRP-pos. Kommissuranteil stark verdichtet und vergrößert. (H) Kommissur weiter

vergrößert. DCT und VCT gut sichtbar in der Kommissur angekommen, LPT lateral der Kommissur erkennbar. Zentrale FasII/Hbn-pos. Pionierzellen in unveränderter Position; Kommissur noch weiter durch HRP-pos. Trakte verdichtet. (I) FasII/Hbn-pos. P2m-Pionierzellen bewegen sich von der Mittellinie aus zu den Hemisphären. Drei FasII-Kommissurtrakte sichtbar sowie der LPT lateral der PHK im PCN.

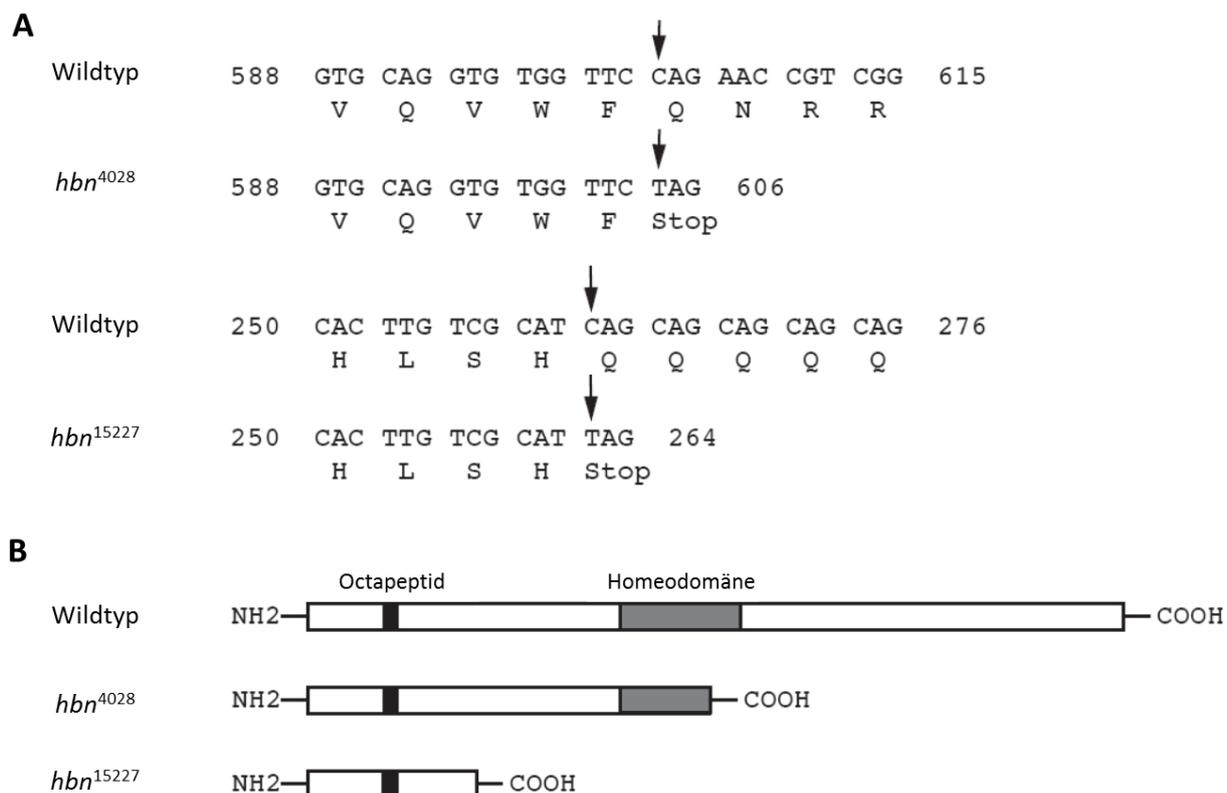


Abb.7.2: Ergebnis der Sequenzierung des *hbn*⁴⁰²⁸-Allels im Vergleich zu *hbn*¹⁵²²⁷. (A) Schwarze Pfeile zeigen die Position des durch EMS-Mutagenese entstandenen Stopp-Codons der *hbn*-Allele an Position 604 mit Basenaustausch von C nach T für *hbn*⁴⁰²⁸ und an Position 263 mit Basenaustausch von C nach T für *hbn*¹⁵²²⁷ (Dissertation Petra Kaspar, 2008). (B) Vergleich des wildtypischen Proteins mit den trunkierten Proteinen Hbn⁴⁰²⁸ und Hbn¹⁵²²⁷. Schwarzer Kasten zeigt die Position des Octapeptides und grauer Kasten die Lage der Homeodomäne.

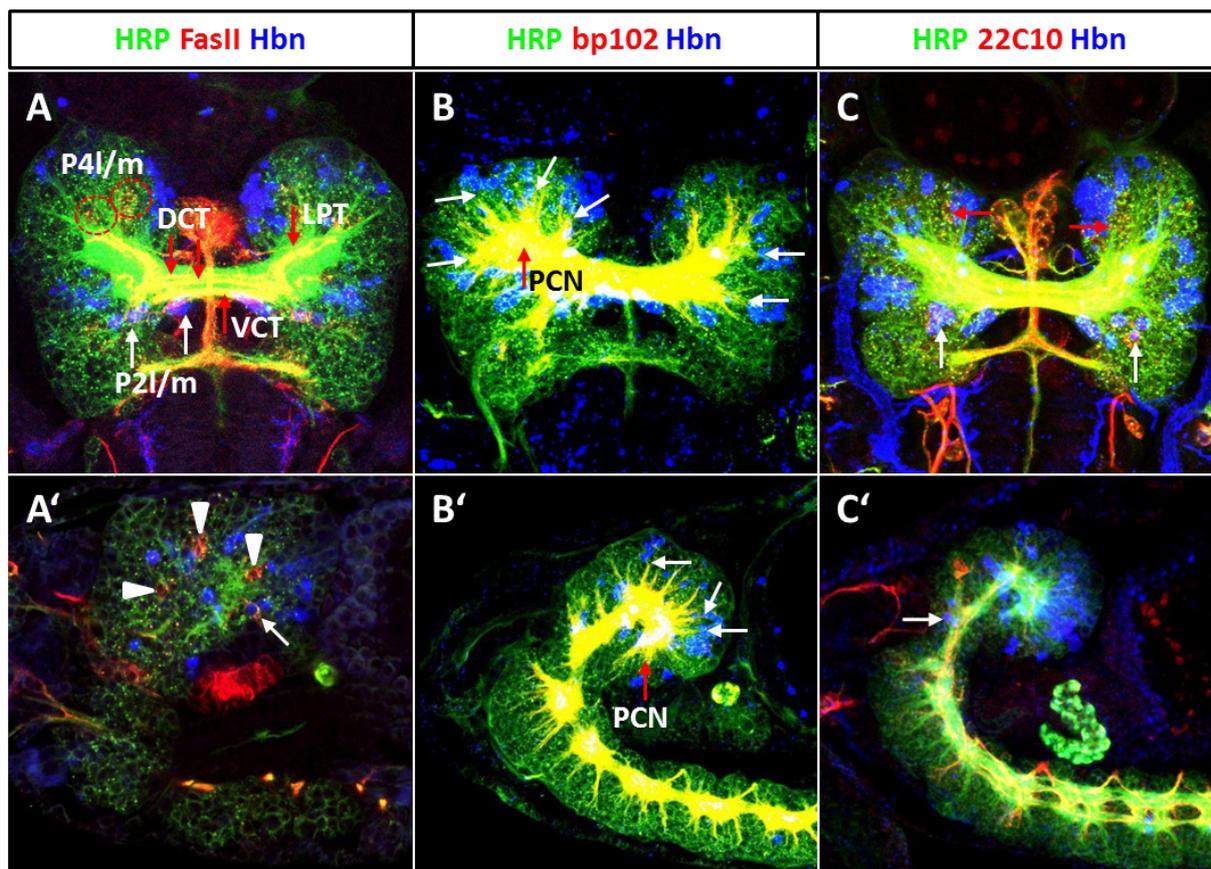


Abb.7.3: Vergleich der ES 16 Hbn-Expression mit bekannten neuronalen Membranmarkern. Konfokale Aufnahme in anterior-dorsaler und -lateraler Ansicht (ES 16; A,A' 63x; B-C' 40x) von *yw*-Embryonen mit (A,A', B,B', C,C') anti-Hbn- und -HRP- und (A,A') -FasII-, (B,B') -bp102-, (C,C') -22C10-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten bzw. nach links: (A) Weiße Pfeile zeigen auf FasII/Hbn-pos. P2m- und P2l-Neurone, gestrichelte, rote Kreise markieren die P4l bzw. P4m Pioniercluster. Rote Pfeile zeigen auf den LPT der P4-Cluster bzw. DCT und VCT der P4-, P2l- sowie P2m-Pioniercluster. (A') In lateraler Aufsicht auf die Hemisphäre erscheinen vier FasII-pos. Neurone (weiße Dreiecke), weißer Pfeil zeigt Hbn-pos. P5l-Pioniercluster. (B,B') Weiße Pfeile zeigen bp102-pos., axonale Trakte, die von Lineages mit Hbn-pos. Neuronen gebildet werden und im Neuropil enden. PCN durch roten Pfeil angezeigt. (C) Weiße Pfeile zeigen im posterioren PC liegende Hbn/22C10-pos. Neurone, rote Pfeile zeigen im anterioren PC liegende 22C10-pos. Neurone. (C') Weißer Pfeil deutet auf im TC liegende Hbn/22C10-pos. Neurone hin. (DCT, dorsaler Kommissurtrakt; LPT, longitudinaler-protocerebraler Trakt; PCN, Protocerebralkonnektiv; VCT, ventraler Kommissurtrakt).

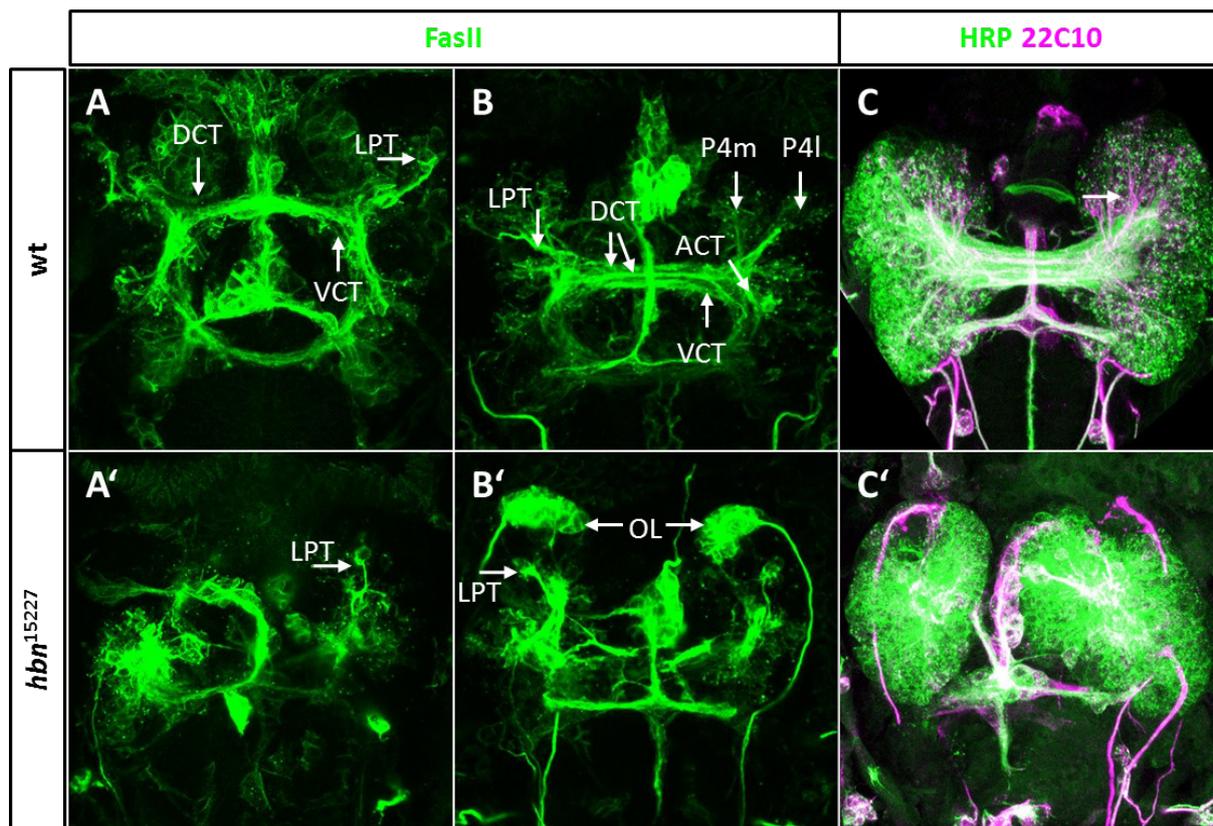
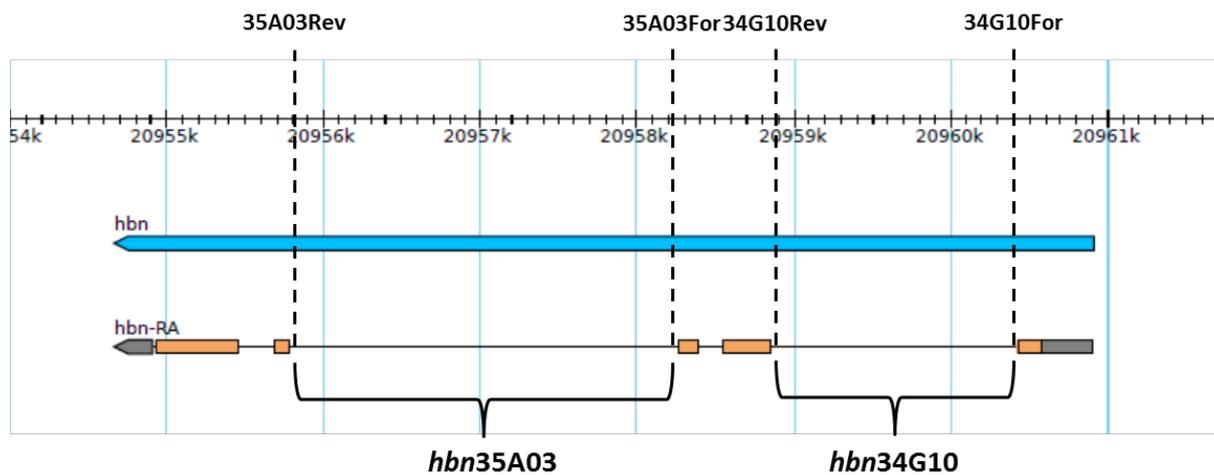


Abb.7.4: Vergleich der ftfc im Verlauf der Entwicklung sowie 22C10-Expression in wt und *hbn*-Mutante. Konfokale Aufnahmen (63x) in anterior-dorsaler Aufsicht des embryonalen Gehirns von (A-C) *yw*- und (A'-C') *hbn*¹⁵²²⁷-Embryonen mit (A,A',B,B') anti-FasII- sowie (C,C') -22C10- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) FasII-Muster in ES 13/14. Weiße Pfeile zeigen DCT, VCT und LPT an. (A') FasII-Muster in ES 13 von *hbn*¹⁵²²⁷. Weißer Pfeil zeigt verkürzten und delokalisierten LPT an. (B) FasII-Muster in ES 16. Weiße Pfeile zeigen die protocerebralen P4-Gründerzellcluster, die drei FasII-pos. Kommissurprojektionen der Kommissur, zwei aus dem dorsalen und eines aus dem ventralen Areal sowie den LPT und ACT. (B') FasII-Muster in ES 16 von *hbn*¹⁵²²⁷. Weiße Pfeile zeigen die delokalisierte OL und den verkürzten und delokalisierten LPT an. P4-Gründercluster sind nicht vorhanden, der ACT lässt sich nicht differenzieren. (C) 22C10-Färbung in wt ES 16. Weißer Pfeil zeigt auf gut sichtbare 22C10-pos. Axontrakte des PC. (C') 22C10-Färbung in *hbn*¹⁵²²⁷. Protocerebrales 22C10-Muster ist in Mutante nicht mehr vorhanden. (ACT, antenno-cerebraler Trakt; DCT, dorsaler Kommissurtrakt; LPT, longitudinaler-protocerebraler Trakt; VCT, ventraler Kommissurtrakt).



Konstrukt	Primer A	Primer B	Größe
34G10	34G10For	34G10Rev	1673bp
35A03	35A03For	35A03Rev	2670bp

Abb.7.5: Die *hbn*-Reporterkonstrukte aus dem *hbn*-Intronbereich. Lage und Name der zur Amplifikation der *hbn*-Intronbereiche (*hbn34G10* und *hbn35A03*) verwendeten Primer und Größe der in pHPelican-lacZ bzw. pBPGW-Gal4 klonierten Fragmente. (FlyBase BLAST; Dos Santos et al., 2015).

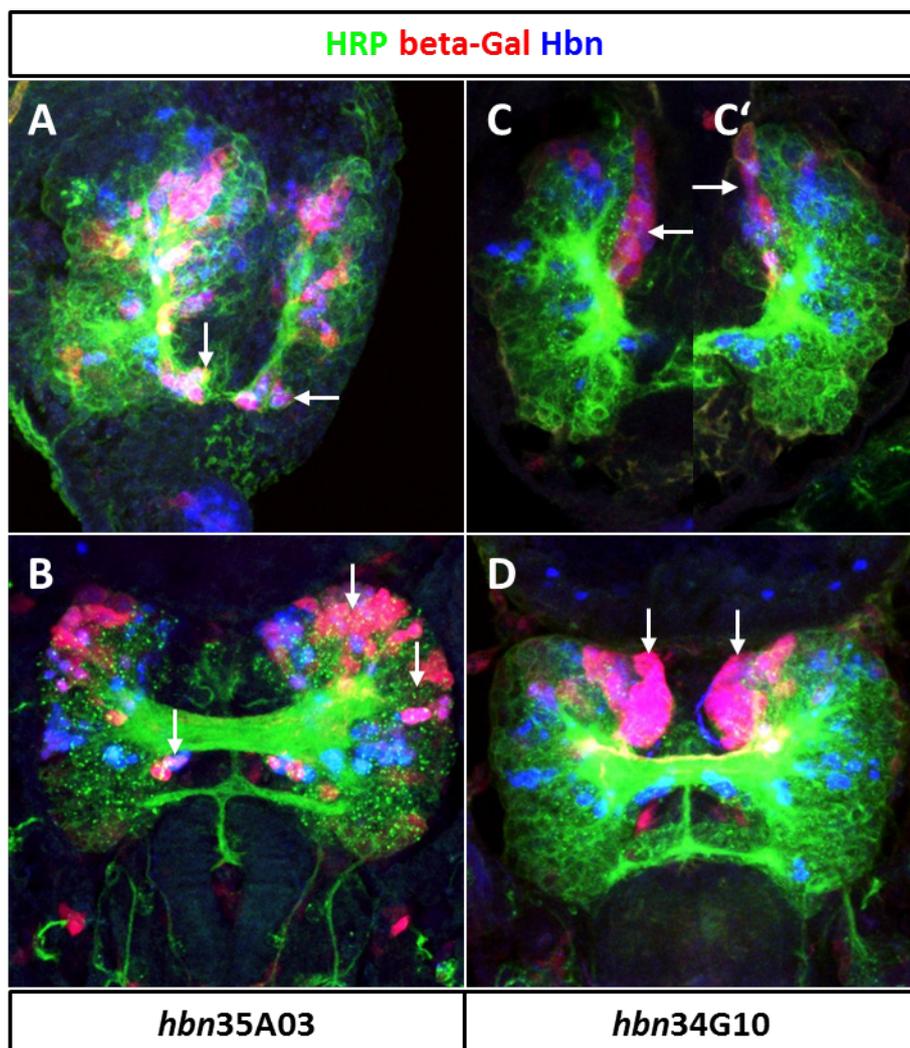


Abb.7.6: *hbn*-Intronbereiche zeigen Reporteraktivität in P2m-Pionierneuronen und in DM-Lineages. Konfokale Aufnahmen (40x) von *hbnlacZ*-Reporterstämmen mit (A,B) *hbn*-Intronbereich 35A03 und (C,D) *hbn*-Intronbereich 34G10 mit anti-beta-Gal-, -Hbn- und -HRP-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten: (A) ES 12-Embryo mit Hemisphärenvorsprüngen. Weiße Pfeile zeigen die Konstruktaktivität in den Hbn-pos. Pioneerneuronen. (B) ES 16-Embryo. Weißer Pfeil an finaler Kommissur zeigt die Pioneerneurone, übrige weiße Pfeile zeigen die Konstruktaktivität in dorso-zentralen und dorso-lateralen Teilen des PC. (C,C') Zwei konfokale Ebenen des ES 13. Weiße Pfeile zeigen die Konstruktaktivität in dorso-medialen Lineages. (D) ES 15-Embryo. Weiße Pfeile zeigen die Aktivität des Konstruktes in den Hbn-pos. DM-Lineages.

Konstrukte (pHPelican-lacZ bzw. Gal4-Reporter) wurden vor Beginn dieser Arbeit im Labor hergestellt und von Best-Gene transformiert. Die Konstrukte wurden dazu gepoolt injiziert. Die erhaltenen transformierten Fliegenlinien wurde im Verlauf dieser Arbeit nach Präparation von genomischer DNA mittels PCR unter Verwendung von Vektor- (pHP3') und Insert spezifischer Primer (*hbn5* und *hbn7*) auf Vorhandensein des jeweiligen Konstruktes getestet und anschließend entsprechend balanciert.

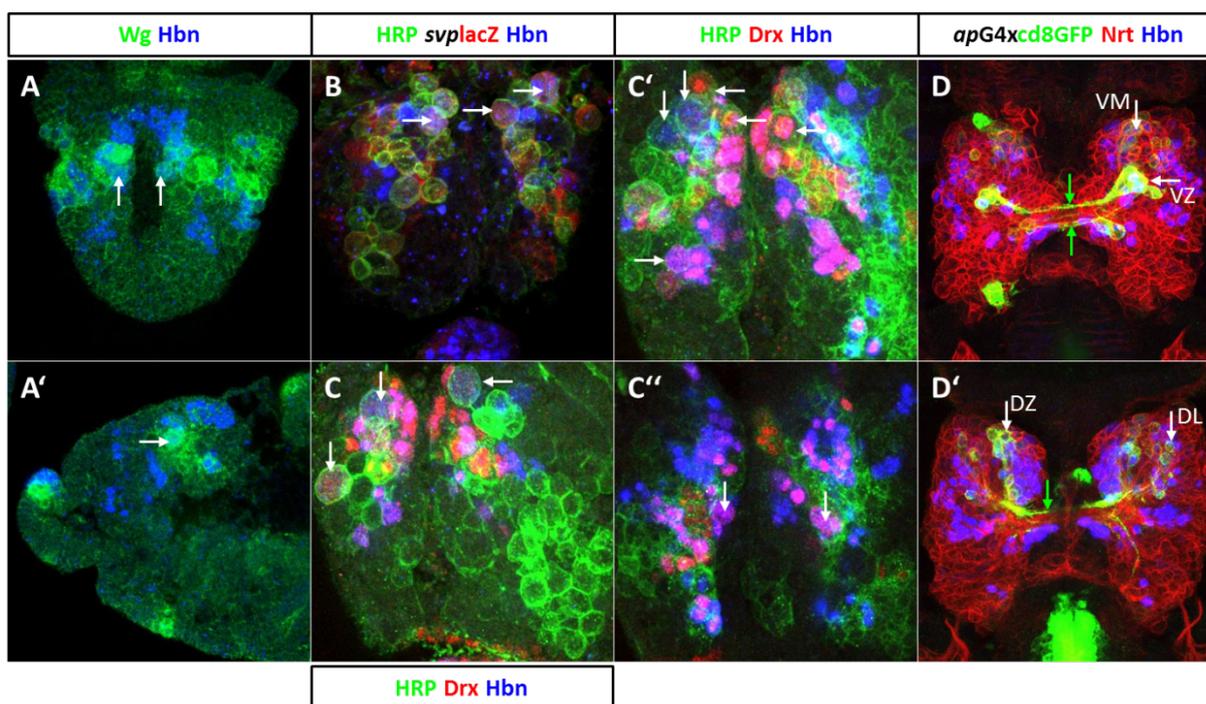


Abb.7.7: Hbn-pos. NB im Vergleich zu Wg, *svplacZ* und Drx sowie *apG4*/Hbn-pos. Neurone mit Kommissurprojektion. Konfokale Aufnahmen in (A,B,C-C',D,D') anterior-dorsaler und (A') lateraler Ansicht von (A,A',C-C') *yw*- und (B) *svplacZ* sowie (D,D') *apG4xcd8GFP*-Embryonen (A,A', ES 9, 40x; B, ES 10, 40x; C-C', ES 10/11, 40x; D,D', ES 16, 63x) mit (A,A') anti-Hbn- und -Wg-, (B) anti-beta-Gal-, -Hbn- und -HRP-, (C-C') -Drx-, -Hbn-, -HRP-, (D,D') -GFP-, -Hbn- und -Nrt-Färbung, alle Embryonen anterior nach unten bzw. nach links: (A,A') weiße Pfeile zeigen auf Hbn/Wg-pos. NB. (B) Weiße Pfeile zeigen Hbn/*svplacZ*-pos. NB. (C-C') Weiße Pfeile zeigen Drx-pos. (rot), Drx/Hbn-pos. NB (lila) und Hbn-pos. NB (blau). (D,D') Weiße Pfeile zeigen auf dorso-zentrale (DZ), -laterale (DL) sowie ventro-mediale (VM) und-zentrale (VZ) *apG4*/Hbn-pos. Neurone. Grüne Pfeile zeigen auf *apG4*/Hbn-pos. Neurone mit interhemisphärischen Kommissurtrakten.

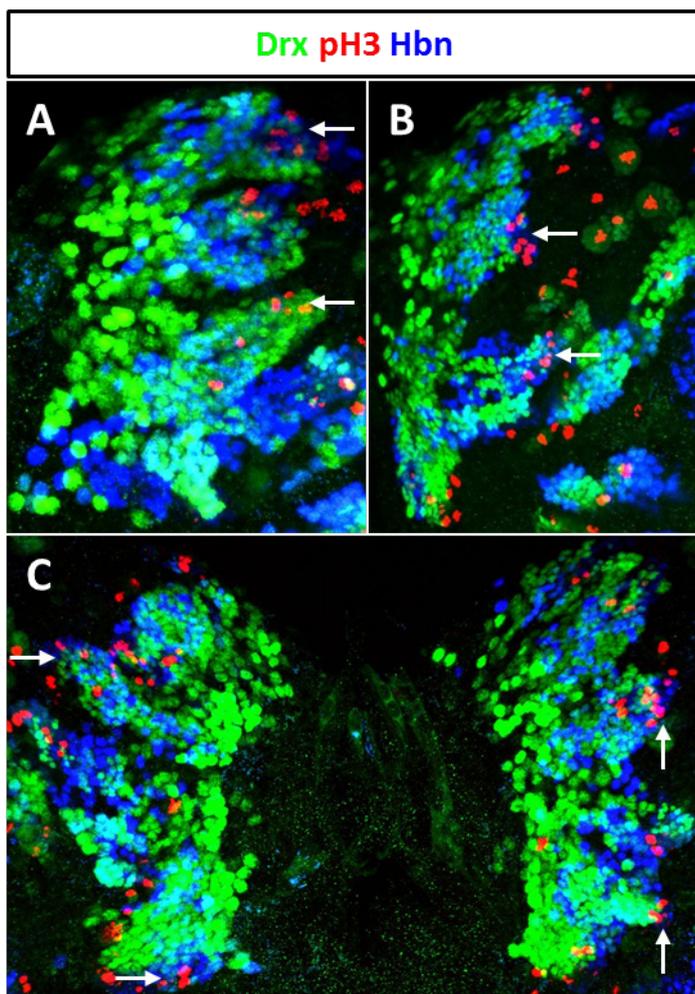


Abb.7.8: Proliferation in DM-Lineages im Verlauf der Entwicklung. Konfokale Aufnahmen (40x) in dorsaler Ansicht der DM-Lineages eines *yw*- (A) L2-, (B) eines frühen L3- und (C) eines späten L3-Gehirns mit anti-Drx-, -Hbn- und -pH3-Färbung: (A-C) Weiße Pfeile zeigen auf die im proximalen Bereich der DM-Lineages liegenden Progenitorzellen mit pH3-pos. Färbung in Nachbarschaft zu 57B-TF-pos. Zellen oder kolokalisiert mit 57B-TF-pos. Zellen.

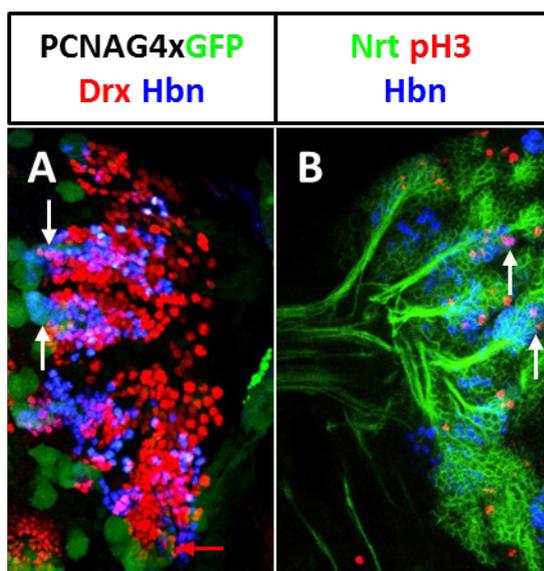


Abb.7.9: Proliferation in den DM-Lineages. Konfokale Aufnahmen (40x) in dorsaler Ansicht der DM-Lineages von (A) PCNAG4xGFP- und (B) *yw*-L3-Gehirnen mit (A) anti-Drx-, -Hbn- sowie (B) -Hbn- und -Nrt-Färbung: (A) Weiße Pfeile zeigen auf den proximalen Bereich der DM 3, 4 und 6 mit Drx- und Hbn-Expression im Reporterbereich. Roter Pfeil zeigt auf DM 6-Lineage in der hauptsächlich Drx-pos. Progenitorzellen mit PCNA-GFP-Signal vorliegen. (B) Weiße Pfeile zeigen auf Hbn/pH3-pos. Zellen im proximalen Bereich der DM 2 und 4.

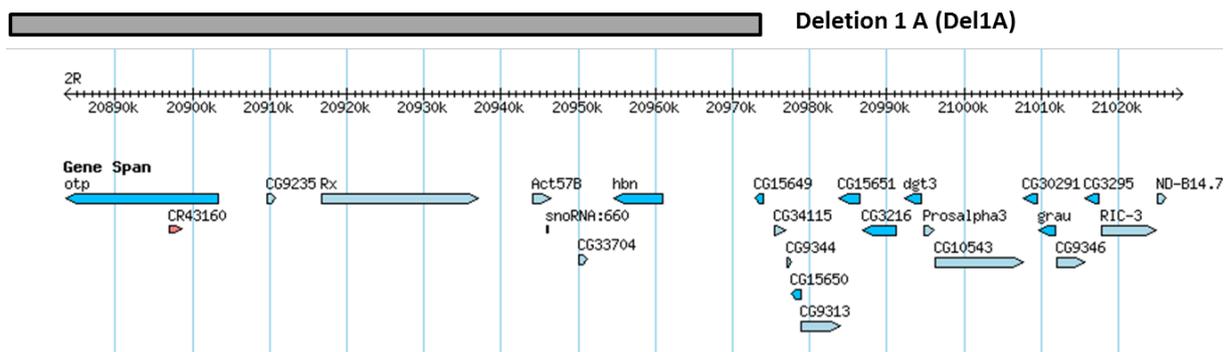


Abb.7.10: Die chromosomale Deletion 1 A. Deletiert werden in der 57B-Region des rechten Armes des zweiten Chromosoms die Homedomänen-Transkriptionsfaktoren *orthopedia* (*otp*), *drosophila retinales homeoboxgen* (*Rx*) und *homeobrain* (*hbn*) sowie Actin 57B (*Act57B*), außerdem zwei weitere CGs. (FlyBase BLAST; Dos Santos et al., 2015).

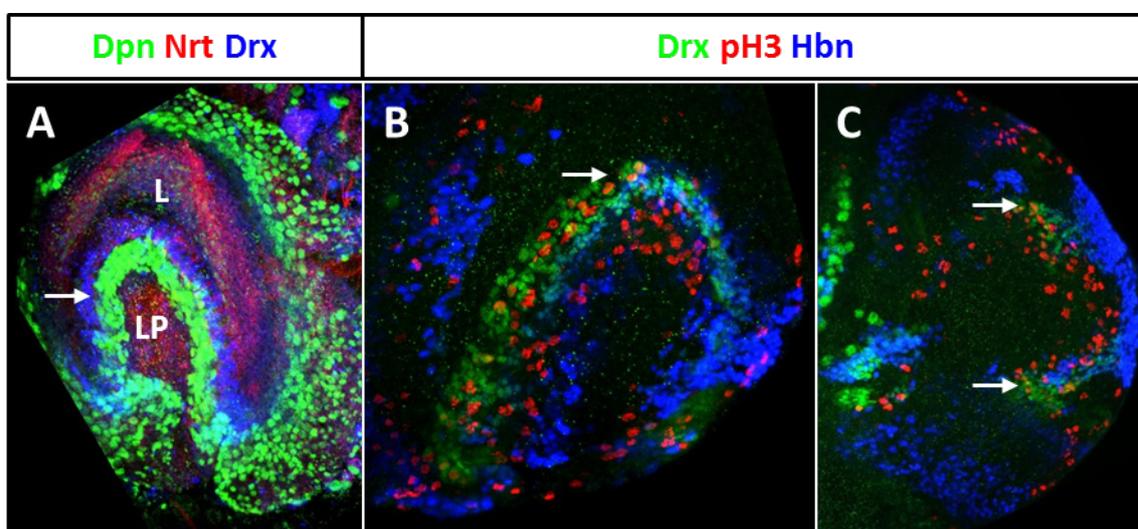


Abb.7.11: Proliferation von Drx-pos. Progenitorzellen in der Lobula. Konfokale Aufnahme (40x) in (A,B) lateraler Aufsicht und (C) eines medialen optischen Schnittes mit (A) anti-Dpn-, -Drx-, -Nrt- und (B,C) -Drx-, -Hbn- und -pH3-Färbung: (A) Weißer Pfeil zeigt auf Drx-pos. Zellen in direkter Nachbarschaft zu NB der Lobula. (B) Weißer Pfeil zeigt auf Drx/pH3-pos. GMC in der Lobula. (C) Weiße Pfeile zeigen auf Drx/pH3-pos. GMC der Lobula in Nachbarschaft zu Hbn-pos. Neuronen des Lobula Plugs. (L, Lamina; LP, Lobula Plug).

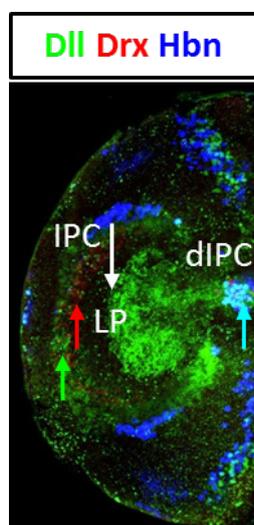


Abb.7.12: Verteilung der 57B-TF gegenüber Dll in dem dIPC und dem Lobula/IPC. Konfokale Aufnahme (40x) in medialem Schnitt eines *yw*-L3-Gehirns mit anti-Dll-, -Drx-, -Hbn-Färbung: Weißer Pfeil zeigt auf die Lage der Stammzellen der IPC in der Lobula. Roter Pfeil zeigt auf Drx-pos. Zellen, die benachbart zu Dll-pos. Zellen liegen (grüner Pfeil). Türkisfarbener Pfeil zeigt auf Dll/Hbn-pos. Zellen im dorsalen Ausläufer der IPC. (dIPC, dorsaler Ausläufer des inneren Proliferationszentrums; IPC, inneres Proliferationszentrum; LP, Lobula Plug).

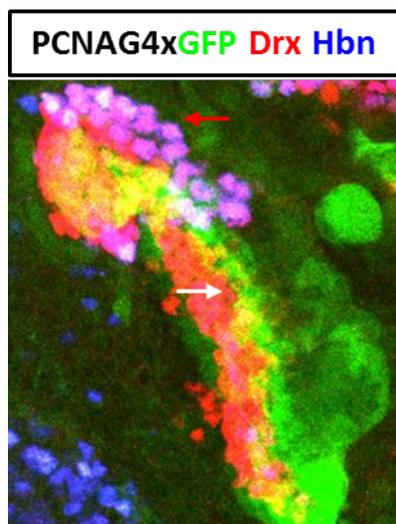


Abb.7.13: Proliferation im dorsalen Ausläufer des inneren Proliferationszentrums von 57B-TF-pos. Stammzellen. Konfokale Aufnahme (40x) in dorsaler Aufsicht eines PCNAG4xGFP-L3-Gehirns mit anti-Drx- und-Hbn-Färbung: Weißer Pfeil zeigt auf PCNAG4/Drx-pos. Stammzellen der dIPC. Roter Pfeil deutet auf die Drx/Hbn-pos. Zone der dIPC.

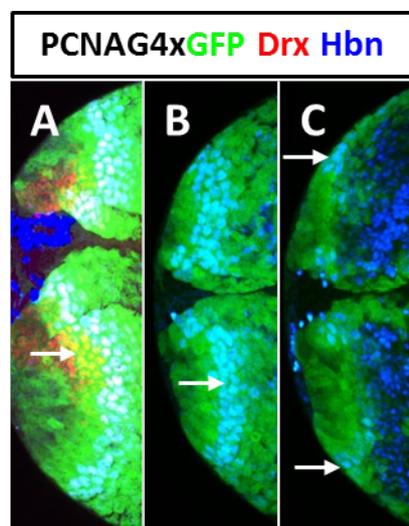


Abb.7.14: 57B-TF-positive NB im Cortex der optischen Medulla. Konfokale Aufnahme (40x) von PCNAG4xGFP-L3-Gehirnen in (A,B) dorsaler Aufsicht und (C) medialem Schnitt mit (A) anti-Drx-, -Hbn- und (B,C) -Hbn-Färbung: (A) Weißer Pfeil zeigt auf Drx-pos. NB in den DSM. (B) Weißer Pfeil zeigt auf Hbn-pos. NB im Cortex der Medulla. (C) Medialer Schnitt. Weiße Pfeile zeigen auf die im Cortex der Medulla situierten NB. Unter den NB liegen die zugehörigen GMC. Hbn-pos. Neurone liegen tiefer in der Medulla.

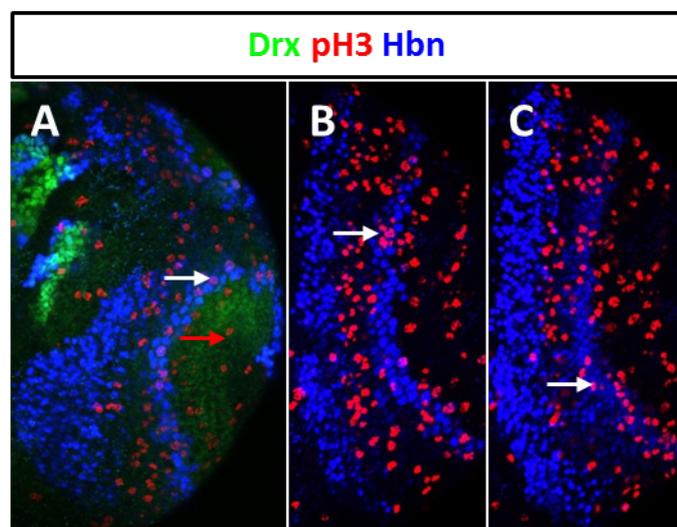


Abb.7.15: Proliferation im Cortex der Medulla. Konfokale Aufnahmen (40x) von yw-L3-Gehirnen in (A) dorsaler und (B,C) ventraler Ansicht mit (A) anti-Drx-, -Hbn-, -pH3- bzw. (B,C) -Hbn- und -pH3-Färbung: (A) Weißer Pfeil zeigt auf Hbn/pH3-pos. NB im dorsalen Cortex der Medulla. Roter Pfeil zeigt auf Drx/pH3-pos. NB in den DSM. (B) Weißer Pfeil zeigt auf Hbn/pH3-pos. NB im ventralen Cortex der Medulla. (C) Weißer Pfeil zeigt auf Hbn/pH3-pos. GMC im ventralen Bereich der Medulla.

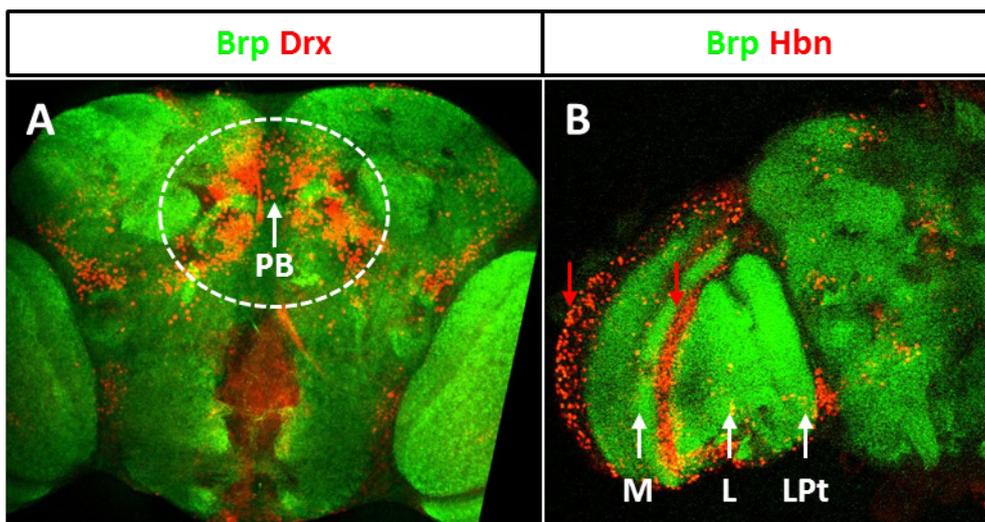


Abb.7.16: Drx zeigt in adulten Gehirnen Expression im Zentralkomplex und Hbn in der optischen Lobe. Konfokale Aufnahmen in (A) rückwärtiger Ansicht mit Fokus auf die Protocerebrale Brücke (PB) und (B) in medialem Schnitt der OL mit Ansicht der Medulla (M), der Lobula (L) und der Lobula Plate (LPt) mit anti-Brp- (Wagh et al., 2006) und (A) -Drx- sowie (B) -Hbn-Färbung: (A) Weißer Pfeil zeigt auf die Protocerebrale Brücke im Zentralkomplex, der durch den gestrichelten, weißen Kreis räumlich angezeigt ist. (B) Weiße Pfeile zeigen auf drei Neuropile der adulten optischen Lobe, die Medulla, die Lobula und die Lobula Plate. Rote Pfeile zeigen von links nach rechts auf die Hbn-Expression im Cortex der Medulla und im Lobula-Rim.

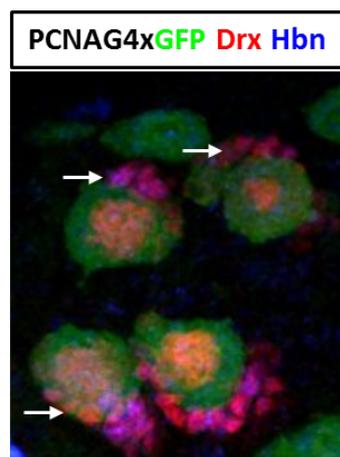


Abb.7.17: Proliferation in NB und GMC des Pilzkörpers. Konfokale Aufnahme (40x) in dorsaler Aufsicht eines PCNAG4xGFP-L3-Gehirns mit anti-Drx- und -Hbn-Färbung: Weiße Pfeile zeigen auf Drx/Hbn-posit. GMC der PK-Lineages mit schwacher PCNAG4-Färbung.

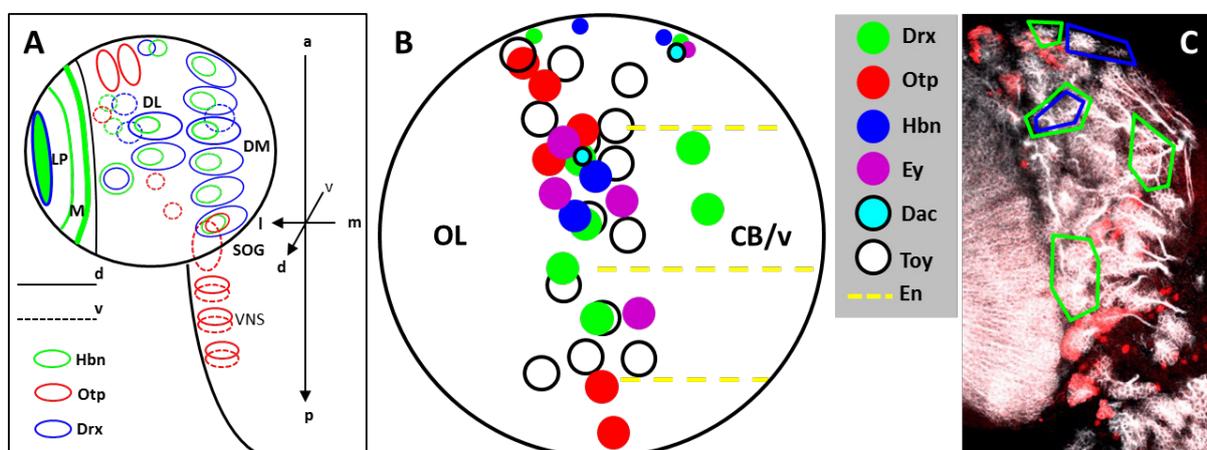


Abb.7.18: Zusammenfassung larvaler Expression und ventrale Expression aller 57B-TF: (A) Schematische Darstellung des larvalen Gehirns und der Expression aller 57B-TF im Vergleich. (B) Schematische Darstellung aller 57B-TF-Expressionen in ventralen Lineages des CB im Vergleich zu Faktoren des RDGN. Koexpressionen durch Überlappung angezeigt. (C) Schematische Darstellung der Expression von Drx und Hbn vor dem Hintergrund einer konfokalen Aufnahme (40x) eines *yw*-L3-Gehirns mit anti-Nrt- und -Otp-Färbung.

8. Danksagung

Vor allem danke ich Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf für den Auftrag, das 57B-Gencluster in der Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila melanogaster* analysieren zu dürfen und für die Möglichkeit einer freien Vorgehensweise bei der Wahl der Fragestellungen und Methoden, die entlang der Arbeit zur Anwendung kamen.

Mein Dank für die gute Zusammenarbeit, die Einarbeitung und der ständigen Hilfestellung bei allen Versuchen gilt den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Entwicklungsbiologie; insbesondere Denise Dewald für die stete Unterstützung in allen Belangen innerhalb unserer Forschungen.

Bruno Bello und Gudrun Viktorin danke ich für ihre Ratschläge und Unterstützung bei der Etablierung der larvalen Forschung. Rolf Urbach und Karolin Kraft danke ich für die Hinführung zur Untersuchung des Pilzkörper.

Philipp Hudalla danke ich für sechs Jahre ununterbrochene Bereitschaft über das Wesen der Promotion diskutieren zu können und eine Teilnahme an allen Unwegsamkeiten, die sich in dieser Phase meines Lebens ergaben.

Meiner Kommilitonin, Katja Berger, danke ich für eine Vielzahl aufmunternder E-mails, die den Doktorandenalltag erheblich erleichterten und die immerwährende Freundschaft während unseres gemeinsamen Studiums und beim Erstellen unserer wissenschaftlichen Arbeiten.

Den Arbeitsgruppen der Professoren Dieter Bruns und Peter Lipp danke ich für die Möglichkeit, meine konfokalen Aufnahmen zu machen und die stete Bereitschaft, mir bei mikroskopischen Problemen zur Seite zu stehen. Besonders Christian Junker möchte ich für die Bereitstellung seiner Expertise im Umgang mit diesen Geräten danken.

Allen meinen Freunden gilt mein Dank für ihr Verständnis und die schöne Zeit, die ich mit ihnen verbringen konnte und den Glauben an meine Person, der diese Arbeit begleitete.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meines Werdegangs und die Möglichkeit meine Ausbildung frei von finanziellen Sorgen absolvieren zu können.

9. Lebenslauf

Name: Jens Dieter Kolb

Geburtsdatum: 20.01.1984

Geburtsort: Saarbrücken-St. Annual

Schulbildung: 1990-1994

Grundschule St. Annual

1994-2003

Otto-Hahn-Gymnasium Saarbrücken

Juni 2003: Abitur

Studium: Oktober 2003 - November 2008

Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie
an der Universität des Saarlandes

Diplom: 06.11. 2008

Prüfungsfächer: Entwicklungsbiologie, Zellbiologie, Genetik

Thema der Diplomarbeit:

Aufklärung der Lokalisation und *in vivo* Topologie des zellulären HDEL-
Rezeptors Erd2p mit Hilfe von ERD2-HIS4C

Topologiereporterfusionsproteinen und Bimolekularer
Fluoreszenzkomplementation

Promotion: März 2009:

Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe
Walldorf am Institut für Entwicklungsbiologie, Universität des
Saarlandes

