

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

**Die Bedeutung des Homeoboxgens *homeobrain* für die  
embryonale Gehirnentwicklung von  
*Drosophila melanogaster***

**Dissertation**

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von

Petra Kaspar

geboren am 22. Juli 1979 in Lebach



## Abkürzungsverzeichnis

aCC	anterior Corner Cell
ADD	anteriore dorsolaterale Domäne
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal (Protein)
Da	anteriore deutocerebrale Domäne
dATP	Didesoxyadenosintriphosphat
dc	Deutocerebrum
DCT	dorsaler kommissuraler Trakt
dCTP	Didesoxycytosintriphosphat
dGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMD	dorsale Mittelliniendomäne
dMP2	dorsal Midline Precursor 2
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dUTP	desoxy Uraciltriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)N, N, N', N'-Tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
<i>et al.</i>	<i>et alii/aliae</i> (lat.: und andere)
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fpCC	friend of posterior Corner Cell
g (Normwert)	Erdbeschleunigung ( $g = 9.80665 \text{ m/s}^2$ )
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hrp	Horseradishperoxidase (Meerrettichperoxidase)
HybMix	Hybridisierungsmix
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare

---

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	Luria Bertani
LD	laterale Domäne
IDp	späte posteriore deutocerebrale Domäne
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molarität
mAb	monoclonal antibody
MeOH	Methanol
µg	Mikrogramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolarität
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MP1	Midline Precursor 1
MP2	Midline Precursor 2
mRNA	messengerRNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
ng	Nanogramm
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal (Protein)
OD	Optische Dichte (Wellenlänge in nm tiefgestellt angegeben)
Pad	anterior-dorsale protocerebrale Domäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
pc	Protocerebrum
pCC	posterior Corner Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDD	posteriore dorsolaterale Domäne
Pdm	dorsomediale protocerebrale Domäne
pg	Pikogramm
pH	Pondus hydrogenii; pH = -log c(H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> )
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
Pp	posteriore protocerebrale Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

---

S1	mandibuläres Neuromer
S2	maxilläres Neuromer
S3	labiales Neuromer
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetic Acid (Essigsäure)-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
tc	Tritocerebrum
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin
TNB	Tris-NaCl-Blockingpuffer
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TritonX-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
tRNA	Transfer-RNA
TSA	Tyramide Signal Amplification
Tween20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
U	Unit(s) (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
UAS	Upstream Activating Sequence
üN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VCT	ventraler kommissuraler Trakt
vMP2	ventral Midline Precursor 2
VNS	ventrales Nervensystem
W	Watt
<i>w</i>	<i>white</i>
WB	Western Blot
XLAG	X-linked lissencephaly with abnormal genitalia
<i>yw</i>	<i>yellow white</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtprozent
°C	Grad Celsius

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Bedeutung des Homeoboxgens <i>homeobrain</i> für die embryonale Gehirnentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2 The importance of the homeobox gene <i>homeobrain</i> for embryonic brain development of <i>Drosophila melanogaster</i>	2
<b>2. Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Drosophila</i> als Modellsystem	5
2.2 Embryonale Entwicklung des ventralen Nervensystems von <i>Drosophila</i>	6
2.3 Die Entwicklung des embryonalen Gehirns von <i>Drosophila</i>	10
2.4 Homologie des embryonalen Gehirns von <i>Drosophila</i> und Maus	13
2.5 Das Homeoboxgen <i>homeobrain</i>	14
2.6 Zielsetzung der Arbeit	15
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Material	16
3.1.1 Bezugsquellen	16
3.1.2 Puffer, Medien und Lösungen	16
3.1.3 „Kits“	20
3.1.4 Bakterienstämme	21
3.1.5 Vektoren	21
3.1.6 Oligonukleotide	22
3.1.7 Antikörper	23
3.1.7.1 Primäre Antikörper	23
3.1.7.2 Sekundäre Antikörper	24
3.1.8 Verwendete Fliegenstämme	25
3.1.9 Geräte	26
3.1.10 Internetadressen	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	27
3.2.1.2 DNA-Präzipitation	28
3.2.1.3 DNA-Restriktion	28
3.2.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	29



3.2.4.6 Anti-Cleaved-Caspase-3-Färbung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	49
3.2.4.7 Präparation von Imaginalscheiben und Gehirnen aus <i>Drosophila</i> -Larven	50
3.2.4.8 Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern an Imaginalscheiben und larvalen Gehirnen	50
3.2.4.9 „Whole mount“ <i>In situ</i> -Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	50
3.2.4.9.1 Fixieren von <i>Drosophila</i> -Embryonen für <i>In situ</i> -Hybridisierungen	50
3.2.4.9.2 Hybridisierung von Embryonen mit DIG-markierten DNA-Sonden	51
3.2.4.9.3 Präabsorption des anti-DIG-Antikörpers	52
3.2.5 Fluoreszenztechniken	52
3.2.5.1 Konventionelles Lichtmikroskop	52
3.2.5.2 Konfokales Mikroskop	53
3.2.5.3 Konfokale Aufnahmen von lebenden Embryonen	54
3.2.6 Erzeugung von digitalen 3D-Modellen	54
3.2.7 Bestimmung der Position von Expressionsdomänen in „Prozent der Eilänge“	54
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>56</b>
4.1 Erzeugung polyklonaler anti-Hbn-Antikörper	56
4.2 Embryonales und larvales Expressionsmuster von <i>hbn</i>	59
4.2.1 Embryonales Expressionsmuster von <i>hbn</i>	59
4.2.2 Larvales Expressionsmuster von <i>hbn</i>	63
4.3 Feinkartierung der embryonalen <i>hbn</i> -Expression	65
4.3.1 Expression von <i>hbn</i> im ventralen Nervensystem	65
4.3.2 Expression von <i>hbn</i> im embryonalen Gehirn	68
4.4 Analyse von <i>hbn</i> -Mutanten	75
4.4.1 Untersuchung homozygoter <i>hbn</i> -Mutanten auf Defekte der Kopfentwicklung	75
4.4.2 Untersuchung des ventralen Nervensystems homozygoter <i>hbn</i> -Mutanten	80
4.4.3 Untersuchung des embryonalen Gehirns homozygoter <i>hbn</i> -Mutanten	81
4.4.4 Ausprägungsgrad des embryonalen Phänotyps von <i>hbn</i> -Mutanten	86
4.4.5 <i>Hbn</i> -Expression der Mutanten <i>hbn</i> <sup>15227</sup> und <i>hbn</i> <sup>4028</sup>	90
4.4.6 RNA-Interferenz von <i>hbn</i>	92
4.5 Einordnung von <i>hbn</i> in eine Signalkaskade	95
4.5.1 Frühe Regulation von <i>hbn</i>	95
4.5.2 Identifizierung eines putativen Zielgens von <i>hbn</i>	97
4.6 Die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur	98
4.7 Identifizierung von Genen, die an der Bildung der präoralen Gehirnkommisur beteiligt sind	106
4.7.1 Analyse des „Bloomington Deficiency Kits“ mit den Markern FasII und Hbn	107



---

4.7.2 Feinkartierung der identifizierten Defizienzen	112
4.7.3 Putative Komponenten der Kommissurbildung	114
4.7.4 Zusätzliche das Gehirn und das Nervensystem betreffende Phänotypen	119
<b>5. Diskussion</b>	<b>121</b>
5.1 <i>Hbn</i> und die Kopflückengene	121
5.2 VNS-Phänotyp homozygoter <i>hbn</i> -Mutanten	125
5.3 Die Bildung der interhemisphärischen Brücke und der präoralen Gehirnkommisur	127
5.4 Konservierung von <i>hbn</i> im Verlauf der Evolution	130
5.5 Identifizierung neuer Gene, die an der Bildung der präoralen Gehirnkommisur beteiligt sind	132
5.5.1 Die <i>hbn</i> -Gruppe	133
5.5.2 Die <i>sim</i> -Gruppe	136
5.5.3 Die <i>fra</i> -Gruppe	137
5.5.4 Die Lückengen-Gruppe	139
5.5.5 Defizienzen mit anderen Gehirnphänotypen	139
5.6 Modell der neuronalen Migration im embryonalen Gehirn von <i>Drosophila</i>	141
5.7 Ausblick	144
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>146</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>159</b>
<b>8. Publikationen</b>	<b>171</b>
<b>Danksagung</b>	<b>172</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>173</b>

## 1. Zusammenfassung

### 1.1 Die Bedeutung des Homeoboxgens *homeobrain* für die embryonale Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und die Funktion des Homeoboxgens *homeobrain* von *Drosophila melanogaster* untersucht. Zunächst wurden polyklonale anti-Hbn-Antikörper erzeugt, um umfangreiche Expressions- und Kolokalisationsstudien durchführen zu können. *Hbn* wird embryonal bereits im Blastodermstadium und während der späteren Stadien im sich entwickelnden Gehirn und im ventralen Nervensystem in einem dynamischen Muster exprimiert. Im Larvalstadium wird *hbn* im inneren Proliferationszentrum der optischen Loben und im medialen Bereich der Gehirnhemisphären exprimiert. Die *hbn*-Expression konnte teilweise bis auf Einzelzellniveau bestimmt werden. Im ventralen Nervenstrang sind die vMP2-Neurone Hbn-positiv. Im embryonalen Gehirn wird *hbn* in vielen Neuronen des Protocerebrums und in einzelnen Neuronen des Deuto- und des Tritocerebrums exprimiert. Neurone der Cluster P2m, P2l und Td6 wurden als Hbn-positiv identifiziert. Eine phänotypische Analyse der embryonal letalen Mutanten *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> zeigte, dass ein homozygoter Funktionsverlust von *hbn* zu Fehlbildungen der cephalopharyngealen Strukturen führt, die sich vom labralen Segment ableiten. Darüber hinaus wurden schwerwiegende Defekte des embryonalen Gehirns beobachtet: Bereiche des Protocerebrums fehlen, und die präorale Gehirnkommisur wird nicht mehr ausgebildet. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen *hbn* und den Kopflückengenen, die sowohl das embryonale Expressionsmuster als auch den embryonalen Phänotyp betreffen, wurde analysiert, ob sich *hbn* in diese Gengruppe einordnen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass *hbn* die Kriterien eines Kopflückengens erfüllt, und dass ein Zielgen der Kopflückengene, *l'sc*, auch ein putatives Zielgen von *hbn* darstellt. Des Weiteren wurden die Kopflückengene *tll* und *slp1* als mögliche Regulatoren der frühen *hbn*-Expression gefunden. Die funktionelle Untersuchung von *hbn* zeigte, dass *hbn* für eine korrekte Bildung der präoralen Gehirnkommisur unentbehrlich ist: Die Hbn-positiven P2m-Neurone wandern gefolgt von weiteren Hbn-positiven Neuronen zur Mittellinie und bilden eine interhemisphärische Brücke aus, die von den kommissurbildenden Axonen zur Überwindung der Kluft zwischen den beiden Gehirnhemisphären genutzt wird. In *hbn*-Mutanten sind die Brückenneurone nicht mehr in der Lage, zur Mitte zu wandern, so dass die präorale Gehirnkommisur nicht etabliert werden kann. Es wurden transgene Fliegen erzeugt, die es ermöglichen, die *hbn*-Expression über RNAi gezielt in bestimmten Zellen zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt

herunterzuregulieren, so dass die Funktion von *hbn* auch während späterer Entwicklungsstadien untersucht werden kann. Um weitere Komponenten zu finden, die neben *hbn* für die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur notwendig sind, wurde mittels des Bloomington „Deficiency Kits“ ein genomweiter Screen durchgeführt. Bisher konnten neben *hbn*, *comm* und *jing* die Gene *Optix*, *Rho1*, *sim*, *fra*, *hh*, *NetA* und *NetB* als potentielle Faktoren der präoralen Gehirnkommisurbildung identifiziert werden.

## **1.2 The importance of the homeobox gene *homeobrain* for embryonic brain development of *Drosophila melanogaster***

In this work, the expression and function of the homeobox gene *homeobrain* of *Drosophila melanogaster* were analysed. Polyclonal anti-Hbn antibodies were generated to perform extensive expression and colocalisation studies. *Hbn* is expressed from blastoderm stage on in a dynamic pattern. During later embryonic stages, *hbn* is expressed within the developing brain and the ventral nervous system. In larvae, *hbn*-expression was observed in the inner proliferation centre of the optic lobes and in the medial region of the brain hemispheres. To some extent, the expression could be determined to single cell level. Within the ventral nerve cord, the vMP2 neurons are Hbn-positive. In the embryonic brain, *hbn* is expressed in many neurons of the protocerebrum and in a few neurons of the deuto- and the tritocerebrum. Neurons of the clusters P2m, P2l and Td6 were identified as Hbn-positive. Phenotypic analyses of the embryonic lethal mutants *hbn*<sup>15227</sup> and *hbn*<sup>4028</sup> revealed that a homozygous loss-of-function of *hbn* results in malformation of cephalopharyngeal structures deriving from the labral segment. Furthermore, severe defects of the embryonic brain were observed: wide areas of the protocerebrum are lacking, and the preoral brain commissure is absent. Because of the striking similarities between *hbn* and the cephalic gap genes concerning the embryonic expression pattern as well as the embryonic phenotype, it was examined if *hbn* can be classified as a cephalic gap gene. It was shown that *hbn* fulfils the criteria of a cephalic gap gene and that a target gene of the cephalic gap genes, *l'sc*, represents also a putative target gene of *hbn*. Moreover, the cephalic gap genes *tll* and *slp1* were identified as possible regulators of the early *hbn*-expression. Functional analyses showed that *hbn* is essential for the proper formation of the preoral brain commissure: The Hbn-positive P2m neurons move to the midline. They are followed by further Hbn-positive neurons and build up an interhemispheric bridge used by commissure-forming axons to bridge the gap between the brain hemispheres. In *hbn*-mutants, the interhemispheric bridge neurons are not able to move

to the midline, and as a consequence, the preoral brain commissure can not be established. Transgenic flies were generated allowing to down-regulate the *hbn* expression in a defined temporal and spatial pattern by RNAi and to study the *hbn* function also during later stages of development. To find further components that are besides *hbn* necessary for the development of the preoral brain commissure, a genome-wide screen was performed using the Bloomington Deficiency Kit. In addition to *hbn*, *comm* and *jing*, the genes *Optix*, *Rho1*, *sim*, *fra*, *hh*, *NetA* and *NetB* were identified as potential factors for the formation of the preoral brain commissure.

## 2. Einleitung

Das zentrale Nervensystem ist das komplexeste Organsystem eines vielzelligen Lebewesens. Seine Aufgabe ist es, Informationen zu verarbeiten, indem es Reize aufnimmt, sie weiterleitet, auswertet und speichert. Das Nervensystem besteht sowohl bei Vertebraten als auch bei vielen wirbellosen Tieren aus einer Vielzahl von Nervenzellen (Neurone), die ein hochorganisiertes Muster von Verbindungen entwickeln. Jedes Neuron steht dabei mit weiteren Neuronen oder anderen Zielzellen in Kontakt, so dass spezifische Signale übermittelt werden können. Die Kontakte werden über spezielle Fortsätze der Neurone, die Axone und Dendriten, hergestellt. Axone sind lange Fortsätze der Neurone, die Impulse vom Zellkörper weggleiten und über Synapsen mit anderen Nervenzellen oder auch Muskel- oder Drüsenzellen verbunden sind. Bei Dendriten handelt es sich um neuronale Fortsätze, die Reize von anderen Neuronen empfangen können. Das Nervensystem setzt sich nicht ausschließlich aus Nervenzellen zusammen. Ein weiterer wichtiger Zelltyp sind Gliazellen, die viele unterschiedliche Funktionen erfüllen und u.a. als Stützgewebe, als isolierende Umhüllung der Neurone oder als Migrationssubstrat für Axone dienen. Ein einzelnes Neuron ist in der Lage, tausende verschiedener Reize zu empfangen, so dass ein Nervensystem nur dann richtig funktionieren kann, wenn seine Neurone korrekt miteinander verschaltet sind. Die neuronale Plastizität, also die Fähigkeit, Verknüpfungen zwischen Neuronen zu bilden, bleibt lebenslang erhalten und spielt z.B. bei Lernprozessen eine wichtige Rolle.

Die Entwicklung des Nervensystems lässt sich in mehrere Phasen einteilen. Zunächst müssen die neuralen Zellidentitäten festgelegt werden. Anschließend folgt eine Wanderung der Neurone und Gliazellen an ihren Bestimmungsort und das Auswachsen der Axone zu den jeweiligen Zielzellen. Zwischen den Axonen und den Zielzellen müssen Synapsen ausgebildet werden, an denen die Erregungsübertragung vom Axon auf die Zielzelle stattfindet. Einer der letzten Schritte ist die Optimierung und Feinabstimmung der synaptischen Verbindungen zwischen den Nervenzellen durch Verlust von Axonfortsätzen oder Zelltod.

Die Nervensystementwicklung ist ein hochkomplizierter Prozess, der bis heute vor allem bei Vertebraten noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt werden konnte. Aufgrund seiner besonderen Komplexität ist besonders das Gehirn für die Aufklärung entwicklungsbiologischer Fragestellungen nur schwer zugänglich, so dass man sich zur Erforschung der Nervensystem- und der Gehirnentwicklung geeigneter Modellorganismen

bedient. Diese Organismen zeichnen sich dadurch aus, dass sie zwar für den experimentellen Zugang eine wesentliche Vereinfachung im Vergleich zum eigentlich interessierenden System, in den meisten Fällen der Mensch, darstellen, gleichzeitig aber die wesentlichen Elemente der ursprünglichen Fragestellung trotz dieser Vereinfachung erhalten bleiben.

## **2.1 *Drosophila* als Modellsystem**

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* zählt zu den bestuntersuchten Modellorganismen der Entwicklungsbiologie und Neurobiologie. Seit rund hundert Jahren dient *Drosophila* als Untersuchungsobjekt für die Erforschung so unterschiedlicher Bereiche wie z.B. Entwicklungsgenetik, Verhalten und Lernen, Altern, neurodegenerative Erkrankungen oder Krebsentstehung (Bier, 2005; Grotewiel *et al.*, 2005; Keene und Waddell, 2007; Leysen und Hassan, 2007; Jang *et al.*, 2007). Die Vorteile von *Drosophila* als Modellsystem bestehen neben der einfachen Haltung, der kurzen Generationszeit der Tiere und der Verfügbarkeit einer großen Anzahl von Mutanten mit verschiedenen Entwicklungsdefekten vor allem in der Vielzahl der Manipulationsmöglichkeiten auf genetischer und molekularer Ebene. Es lassen sich relativ leicht transgene Tiere erzeugen, und mittlerweile sind tausende von Mutantenstämmen kommerziell erhältlich, die mit Hilfe einer Vielzahl von Markern über verschiedene Färbemethoden analysiert und für breit angelegte Screens genutzt werden können. Ein weiterer Vorzug von *Drosophila* ist die aufgrund der geringeren Anzahl und Komplexität der Zellen im Vergleich zu Vertebraten einfache Morphologie. Das *Drosophila*-Genom kodiert für etwa 13.600 Gene und ist seit dem Jahr 2000 vollständig sequenziert (Adams *et al.*, 2000). Viele dieser Gene sind während der Evolution konserviert geblieben, und man geht davon aus, dass etwa 75% aller bekannten menschlichen Krankheitsgene homologe Sequenzen im *Drosophila*-Erbgut besitzen (Bier, 2005). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass sich viele Erkenntnisse, die mit Hilfe des Modellsystems *Drosophila* gewonnen werden konnten, auch auf höhere Organismen, z.B. auf Vertebraten einschließlich des Menschen, übertragen lassen. Auch im Bereich der Nervensystementwicklung konnten auf diese Weise viele grundlegende Mechanismen aufgedeckt werden, die im Laufe der Evolution erhalten geblieben sind. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist die Weg- und Zielfindung der axonalen Fortsätze von Neuronen, ein komplizierter Vorgang, der bei nahezu allen bilateralen Organismen für die korrekte Verbindung der einzelnen Neurone sowie der beiden Hälften des Nervensystems unerlässlich ist.

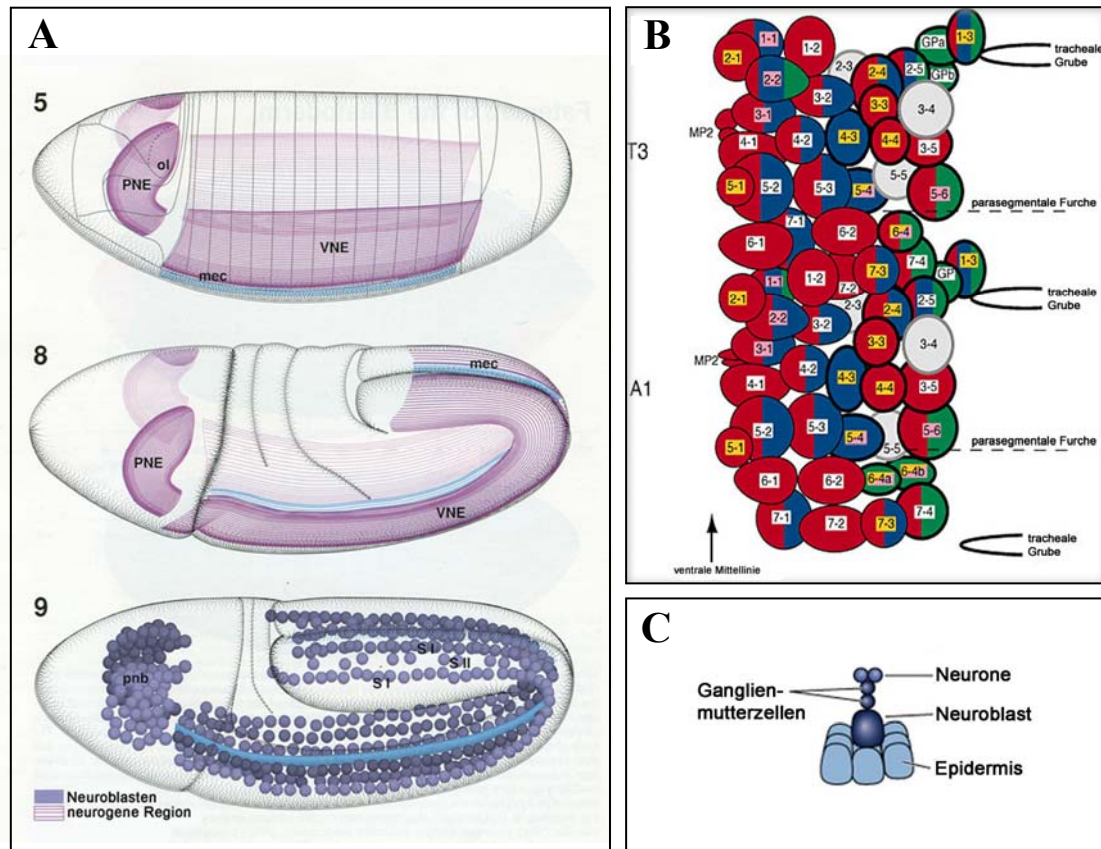
## 2.2 Embryonale Entwicklung des ventralen Nervensystems von *Drosophila*

Das Nervensystem von *Drosophila* besteht aus drei unterschiedlichen Subtypen. Das zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst das Gehirn und den ventralen Nervenstrang. Das periphere Nervensystem bildet das sensorische System, und das stomatogastrische Nervensystem innerviert das anteriore Darmsystem. Im folgenden wird ausschließlich auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems eingegangen.

Das ventrale Nervensystem (VNS) von *Drosophila*-Embryonen ist bereits sehr gut untersucht worden. Die Zellstammbäume, Anordnung und Identitäten der Neurone und Gliazellen sind im Detail beschrieben, und jede Zelle kann anhand ihrer Position und der Expression molekularer Marker identifiziert werden (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999).

Der ventrale Nervenstrang entsteht aus einer bilateral symmetrischen, zweidimensionalen Zellschicht, der ventralen neurogenen Region des Ektoderms (Abb. 2.1A). Durch die Expression der proneuralen Gene des *Achaete-Scute*-Komplexes erlangen bestimmte Gruppen neuroektodermaler Zellen das Potenzial, zu neuronalen Vorläuferzellen, den Neuroblasten, zu werden. Die Neuroblasten delaminieren in fünf aufeinanderfolgenden Wellen in einem genau festgelegten Muster aus dem Neuroektoderm. Sobald die Neuroblasten gebildet sind, hat jeder einzelne Neuroblast ein eindeutiges Entwicklungsschicksal angenommen (Abb. 2.1B). Nach der Delamination teilen sich die Neuroblasten mehrmals asymmetrisch, wobei eine kleinere Gangliemutterzelle abgespalten wird, die sich noch einmal teilt und Neurone bzw. Gliazellen hervorbringt (Abb. 2.1C). Während dieses Prozesses produziert jeder Neuroblast eine nahezu unveränderliche und eindeutige Abstammungslinie. Das Entwicklungsschicksal der einzelnen Neuroblasten wird durch Positionsinformationen innerhalb des Neuroektoderms, durch zeitliche Signale und die Kombination der Entwicklungsgene, die in den Zellen exprimiert werden, festgelegt. In jedem thorakalen und abdominalen Hemisegment delaminieren etwa 30 Neuroblasten aus der ventralen neurogenen Region. Neuroblasten, die zwar in unterschiedlichen Segmenten, aber an einander entsprechenden Positionen und zu entsprechenden Zeiten entstehen, nehmen das gleiche oder ein sehr ähnliches Entwicklungsschicksal an. Insgesamt produzieren diese 30 Neuroblasten eine Nachkommenschaft von etwa 350 Zellen (30 Gliazellen, 30 Motoneurone und 290 Interneurone), die ein Hemineuromer bilden. In jedem Segment bilden zwei Hemineuromere zusammen mit der ventralen Mittellinie ein Neuromer. Das embryonale ventrale Nervensystem besteht aus drei gnathalen, drei thorakalen und acht abdominalen Neuromeren,

wobei die Neuomere jeweils sehr ähnliche Abstammungslinien umfassen (Bhat, 1999; Urbach und Technau, 2004).



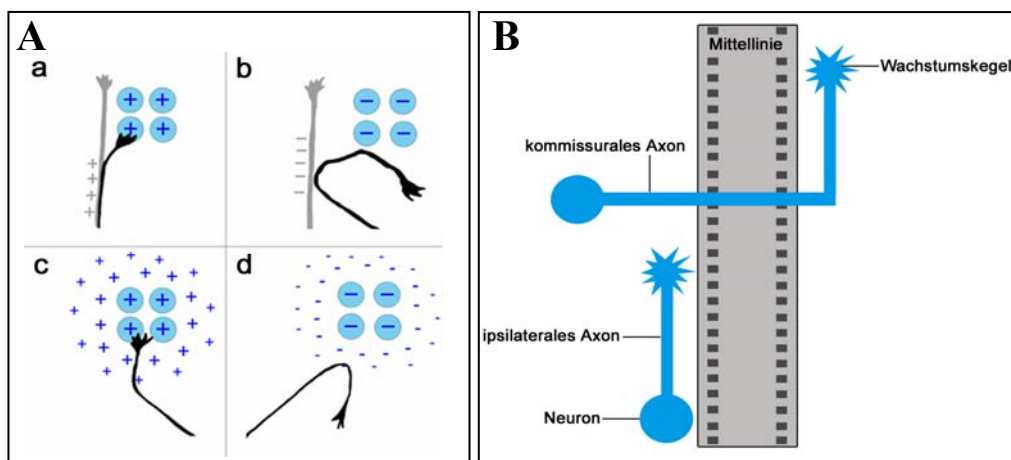
**Abb. 2.1: Frühe Neurogenese in *Drosophila*.** (A) Lage der procephalischen (PNE) und der ventralen neurogenen Region (VNE) in *Drosophila*-Embryonen der Stadien 5, 8 und 9. mec: Mesektoderm, ol: Anlage der optischen Loben, pnb: procephalische Neuroblasten (aus Hartenstein: Atlas of *Drosophila* Development). (B) Schematische Zeichnung der Anordnung der Neuroblasten im späten Embryonalstadium 11 in einem thorakalen (T3) und einem abdominalen Hemisegment (A1) (nach Bossing *et al.*, 1996). (C) Asymmetrische Teilung der Neuroblasten in Gangliennutterzellen und Neurone (nach Goodman und Doe, 1993).

Die Differenzierung der Neurone beginnt bei *Drosophila* ab dem Stadium des Keimstreifrückzugs und ist durch die Expression neuronspezifischer Gene und das Auswachsen der Axone gekennzeichnet. Das neuronale Netzwerk kann nur dann funktionieren, wenn die ausdifferenzierten Neurone richtig miteinander verschaltet sind. Während der Embryogenese bildet jedes Neuron einen axonalen Fortsatz aus, der über teilweise beträchtliche Entfernungen zu seinem Ziel findet. Das Grundgerüst der späteren longitudinalen und transversalen axonalen Bahnen wird bereits in diesem Stadium durch die Axone der sogenannten Pionierneurone festgelegt (Jacobs und Goodman, 1989; Nassif *et al.*, 1998). Die Moleküle und Mechanismen, die das Wachstum der Axone zur Mittellinie hin und über die Mittellinie hinweg kontrollieren, sind evolutionär konserviert (Yu und Bargmann, 2001). An der Spitze des wachsenden Axons befindet sich der sogenannte Wachstumskegel, ein sehr bewegliches membranöses Gebilde mit fingerförmig ausladenden Filopodien. Dieser



Wachstumskegel sucht durch Richtungswechsel und Verzweigungen ein relativ großes Areal nach dem richtigen Weg ab. Für die Orientierung des Wachstumskegels sind mehrere grundlegende Mechanismen bekannt. Ein wichtiger Mechanismus ist die Chemotaxis, d.h. Wachstumskegel können in bestimmten Stoffgradienten, die entweder anziehend oder abstoßend wirken, gerichtet auswachsen. Ein anderer Mechanismus ist die Kontaktführung, wobei der Wachstumskegel entweder eine Präferenz für oder eine Vermeidung von einem speziellen Substrat zeigt (Abb. 2.2A).

Die grundlegenden Mechanismen der Kommissurbildung im ventralen Nervensystem wurden über umfassende genetische Screens aufgeklärt. Es wurde dabei systematisch nach Mutationen gesucht, welche die Bildung der axonalen Bahnen beeinträchtigen. Embryonen tausender mutagenisierter *Drosophila*-Stämme wurden analysiert und mittels nervensystemspezifischer Antikörperfärbungen auf ZNS-Defekte untersucht. Das Ziel dieser Screens war es, die Gene zu identifizieren, die für die notwendigen Signale und Rezeptoren kodieren, mit deren Hilfe der axonale Wachstumskegel sein Ziel findet (Seeger *et al.*, 1993; Hummel *et al.*, 1999).



**Abb. 2.2: Axonale Weg- und Zielfindung.** (A) Schematische Darstellung der Mechanismen, die bei axonaler Weg- und Zielfindung eine Rolle spielen. **a:** Präferenz der Axone für andere Axone, Zellen oder extrazelluläre Matrix. **b:** Aktive Vermeidung bestimmter Unterlagen. **c:** Positive Chemotaxis. **d:** Negative Chemotaxis. (B) Schematische Darstellung ipsilateral projizierender und kontralateral projizierender (=kommissuraler) Neurone (aus Seyffert: Lehrbuch der Genetik, verändert).

Im ventralen Nervenstrang von *Drosophila* sind die meisten Axone in einem einfachen strickleiterähnlichen Muster angeordnet. Pro Segment verbinden je eine anteriore und eine posteriore Kommissur die Hemisegmente entlang der mediolateralen Achse, und zwei longitudinale Konnektive verknüpfen die einzelnen Neuomere entlang der anterior-posterioren Achse miteinander.

Die Mittellinie ist ein wichtiger Knotenpunkt für die Entscheidung navigierender Axone, welche Richtung einzuschlagen ist. Spezialisierte Mittellinienzellen sekretieren attraktive Signale, die kommissurale Axone über weite Distanzen zur Mittellinie des Zentralnervensystems führen. Anschließend kommt es zu Interaktionen zwischen den auf der Oberfläche der Mittellinienzellen präsentierten Signalen und den auf der Oberfläche des wegsuchenden Axons exprimierten Rezeptoren. Diese Interaktionen führen dazu, dass kommissurale Axone die Mittellinie nur einmal überqueren und dass ipsilateral projizierende Axone nicht zur Mittellinie gelangen (Abb. 2.2B). Sobald ein kommissurales Axon die Mittellinie überquert hat, ändert sich die molekulare Zusammensetzung seiner Oberfläche, so dass diese Axone empfänglich für repulsive Signale der Mittellinie werden, die sie vorher auf der ipsilateralen Seite der Mittellinie ignoriert haben. Gleichzeitig verlieren die kommissuralen Axone ihre Empfindlichkeit für die attraktiven Signale, die sie anfangs zur Mittellinie hingeführt haben. Dieses genau regulierte System hält die kommissuralen Axone davon ab, innerhalb der Grenzen der Mittellinie zu verweilen und sorgt dafür, dass die Axone einen Weg auf der kontralateralen Seite des Nervensystems einschlagen können (Kaprielian *et al.*, 2001).

Bei *Drosophila* sind zwei wichtige Systeme für die korrekte Navigation der Axone verantwortlich: das attraktive Netrin/Frazzled-System und das repulsive Slit/Robo-System. Sowohl die Netrine als auch Slit werden von Mittellinienzellen sezerniert und bilden Gradienten, die von den entsprechenden Rezeptoren auf den Axonen erkannt werden. Der Rezeptor der Netrine ist Frazzled (Fra), ein Transmembranprotein, das in kommissuralen und longitudinalen Axonen des Nervensystems exprimiert wird (Kolodziej *et al.*, 1996) und die Wachstumskegel zur Mittellinie hin navigiert. In *Netrin*- und *fra*-Mutanten fehlen die Kommissuren entweder ganz oder sie sind in ihrer Anzahl reduziert. Außerdem treten Lücken in den longitudinalen Axonbahnen auf (Mitchell *et al.*, 1996; Kolodziej *et al.*, 1996). Slit wirkt im Gegensatz zu Netrin abstoßend auf Wachstumskegel und verhindert, dass bestimmte Axone die Mittellinie überqueren. Ein Funktionsverlust von *slit* führt zu einem Kollaps des kommissuralen und longitudinalen Axongerüsts des Nervensystems an der ventralen Mittellinie (Rothberg *et al.*, 1988; Rothberg *et al.*, 1990). Die Abstoßung wird über den Rezeptor Roundabout (Robo) vermittelt. In *robo*-Mutanten kreuzen zu viele Axone die Mittellinie, da sowohl ipsilaterale Axone fälschlicherweise die Mittellinie überqueren als auch kommissurale Axone die Mittellinie mehr als einmal kreuzen (Seeger *et al.*, 1993; Kidd *et al.*, 1998). An der Regulation des Slit/Robo-Systems ist das Transmembranprotein Commissureless (Comm) maßgeblich beteiligt. *Comm*-Mutanten zeigen einen gegenteiligen

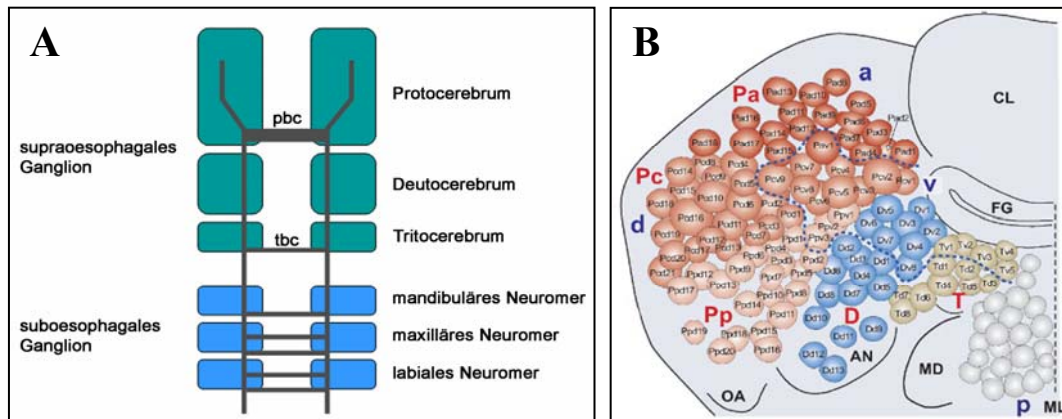
Phänotyp zu *robo*-Mutanten, da in *comm*-Mutanten überhaupt keine Axone die Mittellinie kreuzen. Die kommissuralen Neurone bilden sich zwar korrekt, aber die Axone schlagen keinen kontralateralen, sondern einen ipsilateralen Weg ein (Seeger *et al.*, 1993).

### **2.3 Die Entwicklung des embryonalen Gehirns von *Drosophila***

Das embryonale Gehirn von *Drosophila* ist komplizierter aufgebaut als der ventrale Nervenstrang, so dass sich eine detaillierte Analyse der Zellen schwieriger gestaltet. Doch auch auf diesem Gebiet lassen sich große Fortschritte verzeichnen. So ist es z.B. gelungen, die Neuroblasten anhand der Kombination der Gene, die sie exprimieren, genau zu kartieren und das Entwicklungsschicksal jeder dieser Zellen während der frühen Morphogenese zu verfolgen (Urbach und Technau, 2003). In ersten Studien wurden auch die axonalen Projektionen, die während späterer Entwicklungsstadien gebildet werden, analysiert und den entsprechenden Neuronen zugordnet (Therianos *et al.*, 1995; Nassif *et al.*, 1998). Dennoch ist über das embryonale Gehirn bis heute viel weniger bekannt als über das wesentlich einfacher aufgebaute ventrale Nervensystem von *Drosophila*.

Das Gehirn setzt sich aus dem supraoesophagalen und dem suboesophagalen Ganglion zusammen. Das supraoesophagale Ganglion wird in das Protocerebrum, das Deutocerebrum und das Tritocerebrum unterteilt, das suboesophagale Ganglion besteht aus dem mandibulären, dem maxillären und dem labialen Neuromer (Abb. 2.3A). Das im Verhältnis zur Neuralachse anterior gelegene embryonale Gehirn entwickelt sich aus einer bilateral symmetrischen Region des Kopfektoderms, der procephalischen neurogenen Region (Abb. 2.1A). Im Kopfbereich findet die Neuroblasten-Delamination zwischen den Embryonalstadien 9 und 12 in vier Wellen statt, wobei insgesamt 80 Neuroblasten entstehen (Abb. 2.3B) (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1996). Diese Neuroblasten durchlaufen eine Reihe asymmetrischer Teilungen und spalten in jedem Zellzyklus eine Gangliemutterzelle ab. Es entstehen so immer mehr Gangliemutterzellen, die sich gegenseitig in einer immer länger werdenden Kette in den Kopf des Embryos hineinschieben. Die Gangliemutterzellen teilen sich anschließend symmetrisch und bringen in den meisten Fällen jeweils zwei Neurone hervor. Bisher wurden nur wenige Neuroblasten identifiziert, aus denen auch Gliazellen hervorgehen (Urbach *et al.*, 2003). Durch diesen Prozess leitet sich die protocerebrale Gehirnanlage aus dem Bereich des Labrums und des Akrons ab, die deutocerebrale Anlage vom antennalen Segment und die tritocerebrale Anlage vom interkalaren Segment. Diese drei Neuromere bilden zusammen das supraoesophagale Ganglion. Das im Verhältnis zur

Neuralachse posterior lokalisierte suboesophagale Ganglion entsteht aus dem am rostralsten gelegenen Teil der ventralen neurogenen Region und wird in einer vergleichbaren Weise spezifiziert wie der ventrale Nervenstrang (Hartmann und Reichert, 1998).



**Abb. 2.3: Embryonales Gehirn von *Drosophila*.** (A) Schematische Darstellung des embryonalen Gehirns von *Drosophila*. pbc: präorale Gehirnkommissur, tbc: tritocerebrale Gehirnkommissur. (B) Räumliche Anordnung der Neuroblasten im embryonalen Gehirn von *Drosophila* (Embryo aufgeklappt). a: anterior, AN: antennales Segment, CL: Clypeolabrum, d: dorsal, D: Deutocerebrum, FG: Vorderdarm, MD: mandibuläres Segment, ML: ventrale Mittellinie, OA: Anlagen der optischen Loben, p: posterior, Pa: anteriore protocerebrale Gruppe von Neuroblasten, Pc: zentrale protocerebrale Gruppe, Pp: posteriore protocerebrale Gruppe, T: Tritocerebrum, v: ventral (Urbach und Technau, 2004).

In den proneuralen Clustern des procephalischen Neuroektoderms werden anders als während der Entwicklung des ventralen Nervensystems nicht alle Gene des *Achaete-Scute*-Komplexes exprimiert, sondern fast ausschließlich das proneurale Gen *lethal of scute* (*l'sc*) (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1996). Die Expression von *l'sc* im procephalischen Neuroektoderm wird von einer Gruppe von Genen reguliert, die als Kopflückengene bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um die Gene *orthodenticle* (*otd*), *tailless* (*tll*), *empty spiracles* (*ems*) und *buttonhead* (*btd*) (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1997). Diese Gene werden während des frühen Blastodermstadiums in Form einzelner Streifens im anterioren Bereich des Embryos exprimiert, der die Anlagen der entsprechenden cephalischen Segmente umfasst. Als Lückengene erfüllen die genannten Gene bestimmte Kriterien: Sie übermitteln maternale Positionsinformationen an die zygotischen Segmentierungsgene (Hülskamp und Tautz, 1991). Außerdem führt die Mutation jedes dieser Gene zu Defekten der Kopfstrukturen, die sich aus dem Kopfektoderm ableiten, und zwar einschließlich des Gehirns. Mutationen von *otd* führen zu Defekten der epidermalen Derivate des antennalen Segments und des Akrons (Finkelstein und Perrimon, 1990) und damit verbunden zu einer starken Reduktion des Protocerebrums (Hirth *et al.*, 1995). Funktionsverlustmutationen von *tll* führen dazu, dass fast das ganze Gehirn fehlt, und auch die optischen Loben sowie kutikuläre Strukturen, die sich vom Akron herleiten, lassen sich nicht mehr nachweisen (Strecker *et al.*, 1988; Pignoni *et al.*, 1990). In

*ems*-Mutanten werden Defekte des interkalaren und des antennalen Segments und auch der präantennalen Region beobachtet. Im Nervensystem führt ein Funktionsverlust von *ems* zu Defekten sowohl des deuto- als auch des tritocerebralen Neuromers (Hirth *et al.*, 1995). Fehlt die *btd*-Aktivität, kommt es zu Defekten im antennalen, im interkalaren und im mandibulären Segment (Cohen und Jürgens, 1990, 1991).

Die Wegfindung der Axone im embryonalen Gehirn ist bei weitem nicht so gut untersucht wie die axonale Wegfindung im ventralen Nervensystem von *Drosophila*. Bestimmte Cluster aus Neuronen, die als „Fibre Tract Founder Cluster“ bezeichnet werden, sind in einem linearen Muster angeordnet, das einen fast ununterbrochenen longitudinalen Trakt bildet, der vom ventralen Nervenstrang bis zur Spitze des Gehirns reicht. Sobald im Soma dieser Neurone das Adhäsionsmolekül FasciclinII (FasII) exprimiert wird, bilden sie Axone aus, die an der Oberfläche der „Founder Cluster“ entlangwachsen und für jede der Komponenten des Gehirnneuropils ein einfaches System aus Pioniertrakten formen (Nassif *et al.*, 1998).

Die Verknüpfung der beiden Hemisphären des embryonalen Gehirns von *Drosophila* wird durch drei Kommissuren gewährleistet, die präorale Gehirnkommisur, die Frontalkommisur und die tritocerebrale Gehirnkommisur. Die postorale tritocerebrale Kommissur wird zeitlich vor der präoralen Gehirnkommisur gebildet. Sie verläuft außerhalb des Gehirns und verbindet die um den einwachsenden Vorderdarm herum lokalisierten circumoesophagalen Konnektive mit den Gehirnhemisphären auf der Ebene des sich entwickelnden Tritocerebrums. Die Frontalkommisur wird aus zwei symmetrisch verlaufenden neuronalen Zellbrücken gebildet, die vom Frontalganglion aus zu jeder der beiden Hirnhemisphären verlaufen. Sie entsteht etwa zur gleichen Zeit wie die präorale Gehirnkommisur. Die präorale Gehirnkommisur wird mit Hilfe von Pionieraxonen gebildet, die in Verbindung mit einer zellulären interhemisphärischen Brücke über die Mittellinie projizieren. Diese Brücke besteht aus neuronalen Zellkörpern und einer kleinen Anzahl von Gliazellen (Therianos *et al.*, 1995; Wildemann *et al.*, 1997). Wichtige Neurone für die Bildung dieser Kommissur sind die Founder Cluster D/T, P2, P3 und P4 (Nassif *et al.*, 1998).

Es sind nur wenige Mutanten bekannt, die einen größeren Defekt der präoralen Gehirnkommisur zeigen. Bei *comm*-Mutanten fehlen nicht nur alle Kommissuren des ventralen Nervensystems, sondern auch die präorale Gehirnkommisur und die tritocerebrale Kommissur sind beeinträchtigt (Therianos *et al.*, 1995). Die einzige Kommissur, die sich bei diesen Mutanten korrekt bildet, ist die Frontalkommisur. Auch bei Mutanten des Gens *jing* kann die präorale Gehirnkommisur nicht korrekt etabliert werden, da bereits das primäre axonale Gerüst des Gehirns fehlerhaft ausgebildet ist (Sedaghat und Sonnenfeld, 2002). Die

präorale Gehirnkommisur ist in ihrer Struktur wesentlich komplizierter aufgebaut als die Kommissuren des ventralen Nervenstrangs. Der Bildungsmechanismus, der nicht dem anderer Kommissuren zu entsprechen scheint, wurde bisher noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt.

## 2.4 Homologie des embryonalen Gehirns von *Drosophila* und Maus

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die embryonalen Gehirne von *Drosophila* und Maus viele Gemeinsamkeiten aufweisen (Lichtneckert und Reichert, 2005). Beiden liegt ein dreiteiliger Grundaufbau aus Protocerebrum/Vorderhirn, Deutocerebrum/Mittelhirn und Tritocerebrum/Hinterhirn zugrunde, der auf der Expression orthologer Gene basiert. Im Protocerebrum/Vorderhirn sowie im Deutocerebrum/Hinterhirn werden Orthologe des Kopflückengens *otd/Otx2* exprimiert. Im Übergangsbereich zwischen Deutocerebrum/Mittelhirn und Tritocerebrum/Hinterhirn werden *Pax2/5/8*-Orthologe exprimiert. Im posterioren Gehirn und im angrenzenden Nervensystem werden sowohl bei Insekten als auch bei Vertebraten Hox-Gene exprimiert (Abb. 2.4) (Hirth *et al.*, 2003). Diese Expressionsmuster zeigen, dass die genetischen Mechanismen der Gehirnentwicklung in der Evolution hoch konserviert geblieben sind.

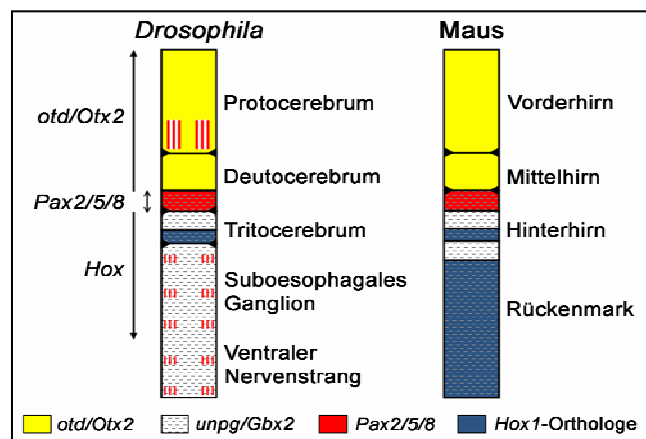


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Homologie des embryonalen Gehirns von *Drosophila* und Vertebraten (nach Hirth *et al.*, 2003, verändert).

Dies verdeutlichen auch Rettungsversuche zwischen den verschiedenen Spezies. Eine Mutation von *otd* führt bei *Drosophila* zu Deletionen der anterioren Bereiche des Gehirns, während bei der Maus das Eliminieren der Gene *Otx1* oder *Otx2* Defekte des Vorderhirns und/oder des Mittelhirns verursacht. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine ubiquitäre Überexpression von humanen *OTX1*- oder *OTX2*-Genen den Gehirn- und den

Nervensystemphänotyp von *otd*-mutanten *Drosophila*-Embryonen rettet. Wird dagegen humanes *OTX* in Wildtyp-Embryonen überexprimiert, kommt es zur Bildung ektopischer neuraler Strukturen (Leuzinger *et al.*, 1998).

Diese Sachverhalte verdeutlichen, dass der Modellorganismus *Drosophila* durchaus ein geeignetes System darstellt, die grundlegenden Mechanismen der Gehirnentwicklung näher zu untersuchen, da sich die Erkenntnisse in vielen Fällen auch auf Vertebraten übertragen lassen.

## 2.5 Das Homeoboxgen *homeobrain*

Ein für die Untersuchung der Entwicklung des embryonalen Gehirns und des Nervensystems sehr interessantes Gen befindet sich auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila* in der Region 57B5. In diesem Bereich ist das Homeoboxgen *homeobrain* (*hbn*) (Walldorf *et al.*, 2000) lokalisiert, das mit den Homeoboxgenen *orthopedia* (*otp*) (Simeone *et al.*, 1994; Kusch *et al.*, 2002) und *retinales Homeoboxgen von Drosophila* (*drx*) (Eggert *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2003) einen Cluster bildet. Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die in spezifischen Regionen des embryonalen Gehirns und des Nervensystems exprimiert werden. Homeoboxgene sind im allgemeinen unverzichtbare Entwicklungsgene, so dass *hbn* vermutlich eine wichtige Rolle für die Entwicklung dieser embryonalen Strukturen spielt. Über die genaue Funktion von *hbn* war bisher jedoch noch nichts bekannt.

Das Gen *hbn* wurde im Rahmen eines Screens isoliert, mit dem nach neuen Homeoboxgenen in *Drosophila* gesucht wurde. Die 6.25 kb lange Transkriptionseinheit besteht aus fünf Exons und vier Introns und kodiert für ein 409 Aminosäuren langes Protein. Die Homeodomäne des Hbn-Proteins erstreckt sich von Aminosäureposition 153 bis 212 der Proteinsequenz und wird der Paired-Klasse zugeordnet. Die Expression der *hbn*-mRNA beginnt während des syncytialen Blastodermstadiums in einem hufeisenähnlichen Muster im dorsalen Kopfbereich des Embryos und lässt sich während der gesamten Embryonalentwicklung in spezifischen Bereichen des Gehirns und des ventralen Nervensystems nachweisen (Walldorf *et al.*, 2000). Im Rahmen eines klassischen Mutageneseexperiments wurden 33 letale Fliegenstämme erzeugt, die Punktmutationen im genomischen Bereich 57B1 bis 57B13,14 enthalten. Durch Komplementationsanalysen mit der letalen Mutante *hbn*<sup>KG02514</sup>, bei der ein im 5'-Bereich des Gens inseriertes P-Element zu einer Inaktivierung der *hbn*-Funktion führt, konnten zwei neue

letale *hbn*-Allele, *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup>, identifiziert werden. Letalitätsanalysen zeigten, dass ein homozygoter Funktionsverlust von *hbn* bereits im Embryonalstadium zum Absterben der Tiere führt. Über Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *hbn* konnte die Punktmutation der Mutante *hbn*<sup>15227</sup> identifiziert werden, die den Funktionsverlust des Gens bewirkt: Im zweiten Exon von *hbn* wurde an der Position 262 ein einzelner Basenaustausch von Cytosin durch Thymin detektiert. Dieser Basenaustausch führt dazu, dass ein Glutamin-Kodon durch ein Stopp-Kodon ersetzt wird, wodurch es zu einem Abbruch der Proteinsynthese kommt. Es entsteht ein stark verkürztes Hbn-Protein aus nur 86 Aminosäuren, dem die Homeodomäne fehlt, so dass es nicht mehr an seine Zielsequenzen binden kann und dadurch funktionslos wird. Im Gegensatz dazu konnte bisher nicht geklärt werden, an welcher Stelle des Genoms sich die inaktivierende Punktmutation des Allels *hbn*<sup>4028</sup> befindet (Kaspar, Diplomarbeit 2003).

## 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe der zuvor identifizierten letalen *hbn*-Allele sollten Erkenntnisse über die Funktion des Transkriptionsfaktors *hbn* während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* gewonnen werden. Bisher war nicht viel mehr über dieses Gen bekannt als seine spezifische mRNA-Expression im embryonalen Gehirn und im ventralen Nervensystem.

Es sollten anti-Hbn-Antikörper erzeugt werden, um das *hbn*-Expressionsmuster auf Proteinebene genau untersuchen zu können. Die Generierung von Antikörpern in mehreren unterschiedlichen Spezies bietet den Vorteil, dass Antikörper-Mehrfachfärbungen in vielen Kombinationen durchgeführt werden können. Dadurch wird es ermöglicht, die *hbn*-Expression in Verbindung mit geeigneten Markern, die in bestimmten Zellen oder Geweben exprimiert werden, über konfokale Analysen räumlich und zeitlich genauer zu kartieren.

Nach einer möglichst detaillierten Kartierung der *hbn*-Expression im Gehirn und im Nervensystem sollten die homozygot embryonal letalen *hbn*-Allele *hbn*<sup>KG02514</sup>, *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> phänotypisch charakterisiert werden. Im Idealfall sollten spezifische Defekte der *hbn*-Mutanten aufgedeckt werden, die Hinweise auf die Funktionsweise von *hbn* geben könnten, und gegebenenfalls die Prozesse, bei denen *hbn* mitwirkt, genauer untersucht werden.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Bezugsquellen

**Chemikalien:**

Difco (Hamburg), Roth (Karlsruhe)

**Enzyme und Feinchemikalien:**

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Roche (Mannheim), Qiagen (Hilden)

**Antikörper und Seren:**

Cell Signaling Technology (Danvers, USA), Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa), Dianova (Hamburg), ICN Biomedicals (Meckenheim), Invitrogen (Karlsruhe), Molecular Probes (Leiden), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), Upstate (New York), Vector (Vector Labs, USA)

##### 3.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT aufbewahrt. Alle mit \* versehenen Lösungen wurden autoklaviert. Lösungsmittel ist im allgemeinen H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

**Ampicillinstammlösung** (-20°C, sterilfiltriert, aliquotiert):

Ampicillin-Natriumsalz, 100mg/ml in H<sub>2</sub>O

**Apfelsaftagarplatten:**

8g Agar-Agar/250ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren

8g Zucker zu 85ml Apfelsaft geben, aufkochen, Apfelsaft-Zuckerlösung zum Agar geben, Platten gießen und bei 4°C lagern

**Canadabalsam-Salicylat-Gemisch:**

2 Teile Canadabalsam + 1 Teil Methylsalicylat

**Coomassie-Färbelösung:**

0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 25% (v/v) MeOH, 7% (v/v) Essigsäure

**Coomassie-Entfärbelösung:**

70% (v/v) H<sub>2</sub>O, 10% (v/v) Essigsäure, 20% (v/v) EtOH

***Drosophila*-Standardmedium:**

64g Fadenagar in 5l H<sub>2</sub>O aufkochen, 176g Rübensirup und 640g Malzextrakt zugeben;  
144g Trockenhefe, 80g Sojamehl und 640g Maismehl in 3l H<sub>2</sub>O verrühren, zum Fadenagar-  
Rübensirup-Malzextrakt-Gemisch geben und aufkochen;  
auf 60°C abkühlen lassen, 50ml Propionsäure zugeben, in Glasröhrchen abfüllen, bei 18°C  
lagern

**Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE):**

22mM Tris-HCl, 192mM Glycin, 3.5mM SDS, pH8.8

**Elutionspuffer GST-Reinigung:**

50mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM Glutathion

**Embryonenwaschlösung:**

0.7% (w/v) NaCl, 0.03% (v/v) TritonX-100

**Ethidiumbromidstammlösung (4°C, im Dunkeln):**

10mg/ml in H<sub>2</sub>O

**Färbepuffer für *In situ*-Hybridisierung:**

100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH9.5, 1mM Levamisol, 0.1% Tween20

**Fixativ für Imaginalscheiben:**

10% (v/v) Formaldehyd in PBS

**Fixativ für *In situ*-Hybridisierung:**

100µl 10x PBS, 270µl Formaldehyd, 100µl 0.5M EGTA, 530µl H<sub>2</sub>O

**Hoyers Medium:**

50ml H<sub>2</sub>O und 30g *Gummi arabicum* üN rühren,  
200g Chloralhydrat und 16ml Glycerin zugeben und verrühren

**Hybridisierungslösung (Hybmix):**

50% deionisiertes Formamid, 5x SSC, 100µg/ml sonifizierte, gekochte Lachssperma-DNA,  
100µg/ml tRNA *E.coli*, 50µg/ml Heparin, 0.1% Tween20

**Injektionspuffer (10x):**

5mM KCl\*, 0.1mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 6.8

**IPTG-Stammlösung:**

1M in H<sub>2</sub>O

**LB-Medium\*:**

10g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, ad 1l H<sub>2</sub>O, pH7.6

**LB-Agarplatten:**

LB-Medium + 1.5% Bacto-Agar

**LiCl/Kaliumacetat-Lösung:**

1 Teil 5M Kaliumacetat + 2.5 Teile 6M LiCl

**Lysispuffer:**

100mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% (w/v) SDS

**Natriumhypochloridlösung:**

7% (v/v) Natriumhypochlorid in H<sub>2</sub>O

**PBS\* (10x):**

1.37M NaCl, 27mM KCl, 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), 15mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3

**PBS\*<sub>AK-Färbung</sub> (10x):**

1.75M NaCl, 18.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O), 84.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), pH7.4

**PBS\*<sub>In situ</sub> (10x):**

1.3M NaCl, 70mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O), pH7.4

**PBS(KM):**

1x PBS\*, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM KCl, pH7.3

**PBS(KM)T:**

1x PBS\*, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM KCl, 0.1% (v/v) Tween20, pH7.3

**PBT:**

0.1% Tween20 + 0.1% BSA in 1x PBS<sub>AK-Färbung</sub>

**PBT<sub>In situ</sub>:**

0.1% Tween20 in 1x PBS<sub>In situ</sub>

**PBT<sub>WB</sub>:**

0.05% Tween20 in 1x PBS

**PBX:**

0.3% (v/v) TritonX-100 in 1x PBS<sub>AK-Färbung</sub>

**PEM\*:**

0.1M PIPES, 1mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.1

**PEMS:**

0.1M PIPES, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM EGTA, 1.2M Sorbitol, pH7.1

**Puffer 1 zur Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):**

30mM Kaliumacetat, 100mM RbCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub> (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), 15% (v/v) Glycerin, pH5.8

**Puffer 2 zur Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):**

10mM MOPS, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM RbCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, pH6.5

**Puffer PI:**

150mM NaCl, 100mM Tris-HCl (pH7.5)

**Puffer PII :**

0.5% Blocking-Reagenz (10% Maleinsäurepuffer gelöst, autoklaviert, bei -20°C gelagert) in PI-Puffer bei 60°C gelöst

**Puffer PIII:**

100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl (pH9.5)

**SDS-Probenpuffer (2x) (Laemmli 1970):**

4% (w/v) SDS, 200mM DTT, 120mM Tris-HCl (pH6.8), 10mM 2-Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin, 0.02% (w/v) Bromphenolblau

**SSC (20x):**

3M NaCl, 0.3M Na-Citrat, pH7

**Stopp-Lade-Puffer (6x):**

1mM Na<sub>3</sub>-EDTA, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerin, 0.25% (w/v) Bromphenolblau

**TAE-Puffer (10x):**

400mM Tris-HCl (pH7.4), 200mM Natriumacetat, 10mM Na<sub>3</sub>-EDTA

**TBE-Puffer:**

90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, 10 mM Na<sub>3</sub>-EDTA

**TENS:**

10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM Na<sub>3</sub>-EDTA, 100mM NaOH, 0.5% (w/v) SDS

**TE-Puffer\* (pH8.0):**

10mM Tris-HCl, 1mM Na<sub>3</sub>-EDTA

**TNB:**

0.1M Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl, 0.5% (w/v) "Blocking-Reagenz" (TSA-Kit)

**Transferpuffer (10x) (Western Blot):**

20mM Tris-HCl\*, 150mM Glycin, pH8.3

**Vogel-Puffer (10x) (-20°C, aliquotiert):**

475µl 1M PIPES (pH6.6), 25µl 1M MgCl<sub>2</sub>, vor Gebrauch 3.6µl Mercaptoethanol zugeben

**3.1.3 „Kits“**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit</li> <li>• QIAGEN Plasmid Midi Kit</li> </ul>	Qiagen (Hilden)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit</li> </ul>	Invitrogen (NV Leek, Niederlande)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SequiTherm EXCEL<sup>™</sup> II DNA-Sequencing Kit LC</li> </ul>	Biozym (Oldendorf)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TSA<sup>™</sup> Cyanine3 System</li> <li>• TSA<sup>™</sup> Fluorescein System</li> </ul>	Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim)

### 3.1.4 Bakterienstämme

Alle benutzten Wirtsbakterien sind Derivate von *E. coli* K12.

**DH5 $\alpha$** : (supE44  $\Delta$ lac U169 ( $\Phi$ 80lacZ)  $\Delta$ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)

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

**TOP10F'**: ([lacI $^q$ , Tn10(Tet $^R$ )] mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74

deoRrec A1 araD139  $\Delta$  (ara-leu)7679 galU galK rpsL(Str $^R$ ) endA nupG)

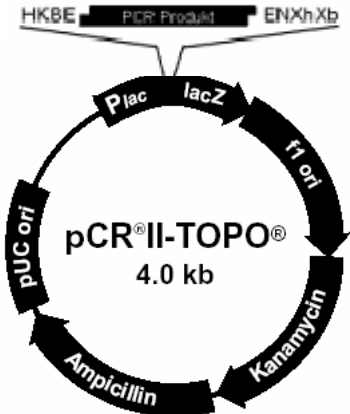
Verwendet für die Transformation von pCR $^{\text{®}}$  II-TA-TOPO $^{\text{®}}$ -Konstrukten (Grant *et al.*, 1990).

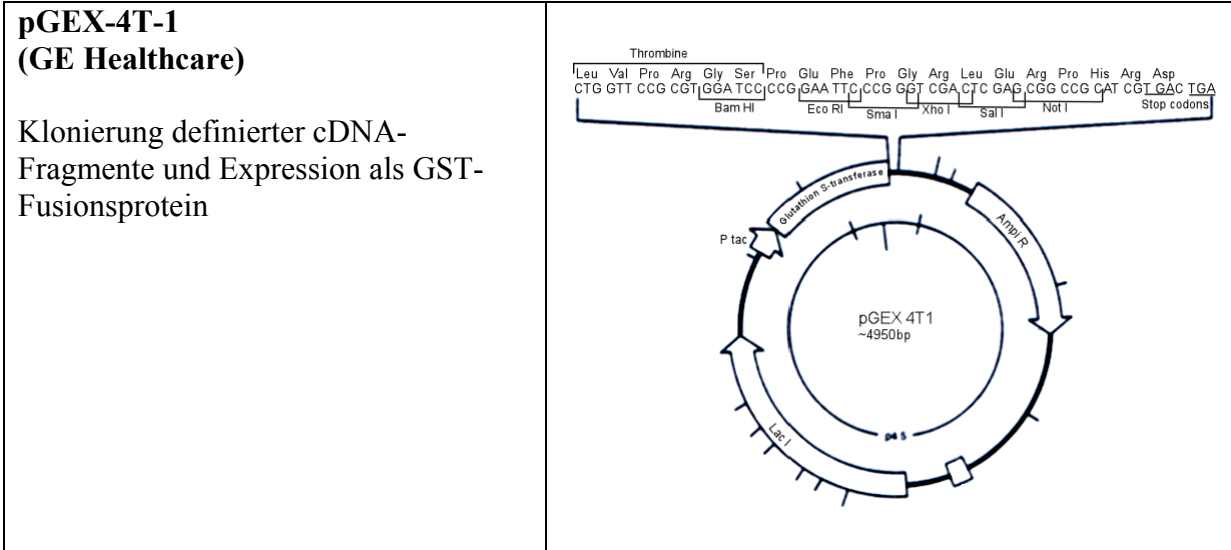
**BL21 (DE3)**: (hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1))

Verwendet für die Expression von GST-Fusionsproteinen (Sambrook und Russell, 2001).

### 3.1.5 Vektoren

Im folgenden sind die verwendeten Plasmid-Vektoren aufgeführt. Sie besitzen Antibiotika-resistenzgene zur selektiven Vermehrung in *E. coli*.

<p><b>pCR<math>^{\text{®}}</math> II-TA-TOPO<math>^{\text{®}}</math>-Cloning Vektor (Invitrogen)</b></p> <p>Klonierung von PCR-Produkten (TOPO TA Cloning<math>^{\text{®}}</math> Kit, Invitrogen)</p> <p>(E: <i>Eco</i>RI, B: <i>Bam</i>HI, K: <i>Kpn</i>I, H: <i>Hind</i>III, N: <i>Not</i>I, Xh: <i>Xho</i>I, Xb: <i>Xba</i>I)</p>	
---	--



### 3.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotidsynthesen wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bzw. Eurofins MWG (Ebersberg) (Sequenzierprimer) durchgeführt. Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden entsprechend der gewünschten Endprodukte ausgewählt. Einige Primer enthalten Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsenzyme.

Teilweise enthaltene Restriktionsschnittstellen: *EcoRI* (G↓AATTC), *BamHI* (G↓GATCC).

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Schmelzpunkt (2°C+4°C- Regel)
<b>hbn1</b>	CTTGGATTCATGATGACCACGACGACCT	58°C
<b>hbn2</b>	CCTGAATTCCTCAGTCGTCGCCCTTGGT	58°C
<b>hbn3</b>	ATGATGACCACGACGACC	56°C
<b>hbn3rev</b>	TTACGCGGCCTCTCCATA	56°C
<b>Lethal of scute 5'</b>	ATCATTGCGGAATCTGATTCCAC	66°C
<b>Lethal of scute 3'</b>	TTGGGACTTTTAGTAAGACCC	60°C
<b>Oligonukleotide zur Sequenzierung (fluoreszenzmarkiert):</b>		
<b>pGEX5-800</b>	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	68°C
<b>pGEX3-700</b>	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	68°C

### 3.1.7 Antikörper

#### 3.1.7.1 Primäre Antikörper

Antigen	Verdünnung	Isotyp	Bezugsquelle
<b>BP102</b>	1:5	Maus IgG	DSHB
<b>β-Galaktosidase</b>	1:1000	Kaninchen IgG	ICN
<b>β-Galaktosidase</b>	1:1000	Maus IgG	Promega
<b>Cleaved-Caspase-3</b>	1:50	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
<b>Digoxigenin, Alkalische Phosphatase- gekoppelt</b>	1:2000	Schaf IgG	Roche
<b>Dpn</b>	1:200	Kaninchen IgG	Bier <i>et al.</i> , 1992
<b>Drx</b>	1:400	Kaninchen IgG	Davis <i>et al.</i> , 2003
<b>Elav</b>	1:100	Maus IgG	DSHB
<b>Ems</b>	1:400	Kaninchen IgG	Walldorf und Gehring, 1992
<b>En</b>	1:5	Maus IgG	DSHB
<b>Fasciclin II</b>	1:5	Maus IgG	DSHB
<b>Futsch (22C10)</b>	1:5	Maus IgG	DSHB
<b>Hbn</b>	1:1000 (Embryonen und Larven) 1:500 (Western Blot)	Meerschweinchen IgG	diese Arbeit
<b>Hbn</b>	1:1000 (Embryonen) 1:500 (Western Blot)	Ratte IgG	diese Arbeit
<b>Hbn</b>	1:1000 (Embryonen) 1:500 (Western Blot)	Kaninchen IgG	diese Arbeit
<b>Hrp, FITC-gekoppelt</b>	1:250	Ziege IgG	ICN
<b>Miranda</b>	1:100	Kaninchen IgG	Betschinger <i>et al.</i> , 2006
<b>Otp</b>	1:200	Meerschweinchen IgG	Bach, 2005
<b>Phosphohiston H3</b>	1:200	Kaninchen IgG	Upstate
<b>Pros</b>	1:4	Maus IgG	DSHB
<b>Repo</b>	1:20	Maus IgG	DSHB



## 3.1.7.2 Sekundäre Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Kaninchen IgG</b>	Alexa Fluor 488	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Kaninchen IgG</b>	Alexa Fluor 568	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Kaninchen IgG</b>	Biotin	1:1000	Ziege IgG	Vector
<b>Kaninchen IgG</b>	Peroxidase	1:30000	Ziege IgG	Dianova
<b>Maus IgG</b>	Alexa Fluor 488	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Maus IgG</b>	Alexa Fluor 568	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Meerschweinchen IgG</b>	Alexa Fluor 488	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Meerschweinchen IgG</b>	Alexa Fluor 568	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Meerschweinchen IgG</b>	Biotin	1:1000	Ziege IgG	Vector
<b>Meerschweinchen IgG</b>	Peroxidase	1:30000	Ziege IgG	Dianova
<b>Ratte IgG</b>	Alexa Fluor 488	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Ratte IgG</b>	Alexa Fluor 568	1:1000	Ziege IgG	Invitrogen
<b>Ratte IgG</b>	Biotin	1:1000	Kaninchen IgG	Vector
<b>Ratte IgG</b>	Peroxidase	1:30000	Ziege IgG	Dianova

### 3.1.8 Verwendete Fliegenstämme

Fliegenstämme, die für den Defizienzen-Screen benutzt wurden, sind gesondert im Anhang aufgeführt.

Stamm	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>yw</i> <sup>67c23</sup>	Stamm für P-Element-Transformation, Wildtyp-Kontrolle	U. Walldorf
<i>hbn</i> <sup>KG02514</sup> /CyO( <i>otp-lacZ</i> )	P-Element-Mutante	Bloomington
<i>hbn</i> <sup>15227</sup> /CyO( <i>otp-lacZ</i> )	EMS-Mutante	U. Walldorf
<i>hbn</i> <sup>4028</sup> /CyO( <i>otp-lacZ</i> )	EMS-Mutante	U. Walldorf
<i>yw</i> <sup>1118</sup> ; <i>Sco</i> /CyO	Balancer 2. Chromosom	U. Walldorf
<i>w</i> <sup>1118</sup> ; <i>CxD/TM3 Sb</i>	Balancer 3. Chromosom	U. Walldorf
<i>Df(2R)Exel7166</i> /CyO	Defizienz 57B3 - 57B7	Bloomington
<i>Df(3L)brm11/TM6C</i>	Defizienz 72A3 - 72D5	Bloomington
<i>Df(2R)ST1</i> /CyO	Defizienz 42B3 - 43E18	Bloomington
<i>comm</i> <sup>O72</sup> /TM6	EMS-Mutante	Hummel <i>et al.</i> , 1999
<i>otd</i> <sup>YH13</sup> /FM7c	EMS-Mutante	Bloomington
<i>tl</i> <sup>49</sup> /TM3	Röntgenstrahlen-Mutante	Bloomington
<i>slp</i> <sup>7L48</sup> /CyO	EMS-Mutante	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
<i>ems</i> <sup>2</sup> /TM3	EMS-Mutante	Bloomington
<i>btd</i> <sup>1</sup> /FM7c	EMS-Mutante	Bloomington
<i>Actin5C-GAL4</i> /TM6	GAL4-Treiberlinie	Bloomington
P{GawB}elav <sup>C155</sup>	GAL4-Treiberlinie	Bloomington
UAS-Stinger-GFP	Effektorlinie	Barolo <i>et al.</i> , 2000

### 3.1.9 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Biometra Personal Cyclers	Biometra (Göttingen)
Bio-rad Photometer SmartSpec™ 3000	Bio-rad (München)
Bio-rad ChemiDoc XRS System	Bio-rad (München)
Bio-rad Mini-Protean®	Bio-rad (München)
Bio-rad Power-Supply	Bio-rad (München)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Eppendorf 5415R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf FemtoJet	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf miniSpin plus Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Fluoreszenz-Binokular SZX12	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop BX 61	Olympus (Hamburg)
Gel-Elektrophorese-System	Peqlab (Erlangen)
Heizschrank Celsius 2000	Memmert (Schwabach)
Kamera U-CMAD3 (CC-12 soft imaging system)	Olympus
Mikromanipulator	Leitz (Wetzlar)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
Nadelzieher	GETRA (München)
Peqlab Multi-Shaker Rotator RS-24	Peqlab (Erlangen)
QLC-100 konfokales Mikroskop	Visitech International (Sunderland, UK)
Rollmischer RM5-V	CAT (Staufen)
Schüttelinkubator Unitron	INFORS (Einsbach)
Sonifier® Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power Company (Danbury)
Sorvall® Evolution RC-Kühlzentrifuge	Sorvall (Langenselbold)
Taumler Nutator	Becton Dickinson (Sparks, USA)
UV-Gel-Dokumentationssystem Intas Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)

### 3.1.10 Internetadressen

<a href="http://flybase.bio.indiana.edu">http://flybase.bio.indiana.edu</a> (und weitere Datenbanken innerhalb der Flybase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grundlagen der <i>Drosophila</i>-Forschung</li> <li>• Datenbank der Gene/ Fliegenstämme</li> </ul>
--	---

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

Als „kompetent“ bezeichnet man Zellen, die mit geeigneten Methoden so vorbehandelt wurden, dass sie leicht in Lösung befindliche DNA aufnehmen können.

10ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von am Vortag ausgestrichenen *E. coli* DH5 $\alpha$ - bzw. *E. coli* BL21-Zellen angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200ml LB-Medium mit 2ml der üN-Kultur angeimpft und so lange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.5 bis 0.7 erreicht war, d.h. die Kultur sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Die Zellen wurden in gekühlte Zentrifugenbecher überführt, 5min auf Eis inkubiert und danach 5min bei 4°C und bei 6000xg (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 80ml kaltem Puffer1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5min auf Eis inkubiert und anschließend 5min bei 4°C und 6000xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 8ml kaltem Puffer2 resuspendiert. Die Zellen wurden zu 400 $\mu$ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### Kompetenzkontrolle der DH5 $\alpha$ - bzw. BL21-Bakterien gemessen in Kolonienzahl/ $\mu$ g DNA:

Die Transformationseffizienz sollte ca.  $1 \times 10^7$  Kolonien/ $\mu$ g DNA betragen.

Für die Transformation von je 100 $\mu$ l Bakterien wurde Plasmid-DNA in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt: 10ng, 1ng, 100pg und 10pg.

Anschließend wurden die Transformationsansätze auf geeigneten antibiotikumhaltigen Agarplatten ausplattiert und die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt. Zusätzlich wurden 100 $\mu$ l Bakterien ohne Plasmid als Negativkontrolle ausplattiert. Eine Transformations-effizienz von  $1 \times 10^7$  Kolonien/ $\mu$ g DNA liegt vor, wenn ca. 100 Klone bei der kleinsten DNA-Menge (10pg) erhalten werden.

### 3.2.1.2 DNA-Präzipitation

Unter DNA-Präzipitation versteht man das Ausfällen von DNA aus wässriger Lösung. Dies erreicht man durch Erhöhung der Salzkonzentration und Zugabe von Alkohol.

Zur DNA-Lösung wurde gegeben:

1/25 Volumen 5M NaCl (Endkonzentration 0.2M)

2.5 Volumen 100% EtOH

Die DNA wurde 30min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefällt und anschließend 15min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $13000\times g$  (Eppendorf Centrifuge 5415R) abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, das Pellet im Rotationsverdampfer (Eppendorf Concentrator 5301) getrocknet und in einem der Pelletgröße angepassten Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{steril}}$  aufgenommen.

### 3.2.1.3 DNA-Restriktion

Die Reaktionsbedingungen, unter denen ein Restriktionsverdau abläuft, sind für jedes Enzym spezifisch. Die Puffer- und Temperaturbedingungen wurden den Herstellerangaben entsprechend angepasst. Verwendet wurden ausschließlich Enzyme der Firma Fermentas GmbH.

Ansatz für einen Restriktionsverdau:

In TE-Puffer gelöste DNA

0.1 Volumen 10x Restriktionspuffer

0.1 Volumen Restriktionsenzym (4-5U)

Der Verdau wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Inkubationszeit für einen Testverdau betrug 1h, DNA für Klonierungsexperimente wurde 3h lang verdaut.

Waren bei einem Doppelverdau unterschiedliche Salzbedingungen erforderlich, wurde der Verdau zeitlich versetzt durchgeführt, wobei zwischen den beiden Restriktionen die DNA präzipitiert wurde, um den Reaktionspuffer des vorangehenden Verdaus aus dem Gemisch zu entfernen.

### 3.2.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Zur aufzutrennenden DNA-Lösung wurde 1/5 Volumen 6x Stopp-Lade-Puffer gegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte je nach Größe der Gelkammer bei 80-120V durch Horizontalgelelektrophorese in Agarosegelen (1% in 1x TAE). Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel 30min in Ethidiumbromidlösung (0.1% Ethidiumbromid-Stammlösung in 1x TAE) gefärbt. Die Gele wurden mit Hilfe des INTAS-Geldokumentationsystems im UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

### 3.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit der Firma Qiagen aus Agarosegelen isoliert. Die Arbeiten wurden entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.1.6 Dephosphorylierung mit SAP (Shrimp alkalische Phosphatase, Roche)

Wurde die Vektor-DNA mit nur einem Restriktionsenzym verdaut, erfolgte anschließend eine Dephosphorylierung, um eine Religation des Vektors während der Ligation mit Fremd-DNA zu verhindern. In einem Reaktionsgefäß wurden gemischt:

Xµl verdaute Vektor-DNA (50ng)  
0.9µl 10x Dephosphorylierungspuffer  
1.0µl SAP (1U)  
-----  
10µl Endvolumen

Das Reaktionsgemisch wurde 30min bei 37°C inkubiert („sticky ends“) und die SAP 15min bei 65°C inaktiviert. Die dephosphorylierte Vektor-DNA konnte anschließend für eine Ligation eingesetzt werden.

### 3.2.1.7 Ligation

Die Ligation von Fremd-DNA mit Plasmid-Vektoren wird in einem möglichst geringen Reaktionsvolumen durchgeführt.

In einem Reaktionsansatz wurden gemischt:

Vektor und Fremd-DNA in etwa äquimolarem Verhältnis

1µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer

1µl T4-DNA-Ligase

-----

10µl Endvolumen

Der Ligationsansatz wurde üN bei 4°C inkubiert. Die Ligation wurde durch 10min Inkubation bei 65°C und anschließend 5min Inkubation auf Eis abgestoppt. Der gesamte Ligationsansatz wurde zur Transformation in chemisch kompetente Bakterien verwendet.

### 3.2.1.8 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Bei der Transformation von Bakterienzellen wird isolierte DNA durch einen kurzen Hitzeschock in kompetente Wirtszellen eingeschleust.

Pro Transformationsansatz wurden 100µl bei -80°C gelagerte kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Der komplette Ligationsansatz (10µl) wurde zugegeben und sanft mit den Bakterien vermischt. Das Gemisch wurde 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 90s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und sofort auf Eis weitere 5min inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 1.5ml LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde 5min bei 3000xg abzentrifugiert und der Überstand bis auf einen Rest von ca.100µl dekantiert. Die Bakterien wurden in dem Überstand resuspendiert und je nach Antibiotikaresistenz des Plasmids auf den entsprechenden Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden umgedreht üN bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

### 3.2.1.9 Klonierung mit dem TOPO-TA-Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen)

PCR-Amplifikate wurden mit dem TOPO-TA-Cloning<sup>®</sup>-Kit der Firma Invitrogen kloniert. Der pCR<sup>®</sup> II-TA-TOPO<sup>®</sup>-Cloning-Vektor liegt bereits linearisiert vor und ist so konstruiert, dass PCR-Produkte direkt aus einer PCR-Reaktion heraus in diesen Vektor und damit in Bakterien kloniert werden können, ohne dass zuvor ein Restriktionsverdau, modifizierende Enzyme oder eine Aufreinigung angewendet werden muss. Die an die 3'-Enden kovalent gebundene Topoisomerase I hat Ligationseigenschaften und ligiert das PCR-Amplifikat direkt mit dem Vektor.

PCR-Amplifikate, die bei der Auftrennung im Agarosegel keine einzelne, diskrete Bande ergaben, wurden zuvor mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert. 0.5µl bis 4µl PCR-Amplifikat wurden mit 1µl „Salt-Solution“ vermischt, und steriles H<sub>2</sub>O wurde bis zu einem Endvolumen von 5µl zugegeben. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1µl TOPO<sup>®</sup>-Vektor. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 15min bei RT inkubiert. 2µl des Ansatzes wurden in ein Reaktionsgefäß mit *E. coli*-TOP10F'-Bakterien überführt, sanft vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 30s bei 42°C und anschließend 5min Inkubation auf Eis. Danach wurden 250µl SOC-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß horizontal 1h lang bei 37°C und 220rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend auf LB-Agar, der das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin) enthielt, ausplattiert und üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.1.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)

1.5ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und mindestens 6h bei 37°C und 220rpm im Schüttelinkubator inkubiert. 1ml dieser Kultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und die Bakterien in 50µl Puffer P1 (mit RNase, um RNA-Kontaminationen zu eliminieren) durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden nacheinander 300µl TENS und 150µl 3M Natriumacetat (pH5.2) zugegeben und gut gemischt. Das Gemisch wurde 2min mit 1300xg abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurde 1ml eiskaltes 100% EtOH gegeben und wiederum 2min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 100µl 70% Ethanol zum DNA-Pellet gegeben. Nach 5min Zentrifugation bei



13000xg wurde der Überstand dekantiert und das Pellet nach dem Trocknen im Rotationsverdampfer (Eppendorf Concentrator 5301) in 50µl TE-Puffer aufgenommen.

#### **3.2.1.11 Midi-Präparation von Plasmid-DNA**

Die Gewinnung größerer Mengen DNA erfolgte aus einer 250ml-üN-Kultur, die mit den verbleibenden 0.5ml Bakteriensuspension einer Plasmid-Mini-Präparation angeimpft wurde. Es wurde der Plasmid Midi Kit von Qiagen entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

#### **3.2.1.12 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch bestimmt werden. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der in ihnen enthaltenen Basen UV-Licht zwischen 250nm und 270nm Wellenlänge. Sie zeigen dabei ein Absorptionsmaximum bei 260nm. Im Vergleich dazu liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280nm. Bei 260nm Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1cm Schichtdicke der Quarzküvette ungefähr einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50\mu\text{g/ml dsDNA}$$

Der Quotient der bei 260nm und 280nm gemessenen Absorptionskoeffizienten zeigt die Reinheit der Nukleinsäure-Präparation an. Bei reiner DNA liegt der Quotient zwischen 1.8 und 2.0. Höhere Werte können ein Hinweis auf denaturierte DNA oder die Anwesenheit von RNA sein, wohingegen niedrigere Werte ein Indiz für Verunreinigungen mit organischen Lösungsmitteln oder Proteinen sind.

Die photometrischen Messungen wurden mit dem SmartSpec™ 3000-Photometer der Firma Bio-rad durchgeführt.

### 3.2.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Für die Amplifikation wurde in 500µl-Reaktionsgefäßen folgender Reaktionsansatz angesetzt:

1µg Template-DNA  
 5µl 10x PCR-Puffer  
 3µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)  
 1µl dNTP-Mix (10 mM)  
 1µl Primer A (50pmol/µl)  
 1µl Primer B (50pmol/µl)  
 1µl *Taq*-DNA-Polymerase (5U/µl)  
 H<sub>2</sub>O ad 50µl Endvolumen

Das verwendete Temperaturprofil richtet sich nach der Länge des PCR-Produktes, den Annealing-Temperaturen der Primer und nach der Menge der eingesetzten Template-DNA. Die Temperaturprofile wurden entsprechend variiert.

Standard-Temperaturprofil:

1	Initiale Denaturierung	95°C	5:00 min
2	Denaturierung	95°C	0:30 min
3	Annealing (je nach Primerpaar)	60°C (variabel)	1:00 min
4	Extension	72°C	2:00 min (je nach Produktgröße variabel)
5	Wiederholung der Schritte 2 bis 4		30x
6	Finale Extension	72°C	10:00 min
7	Kühlen	4°C	nach Bedarf

Für die Durchführung der Reaktionen wurde entweder ein Bio-rad My Cycler™ Thermal Cycler oder ein Biometra Cycler T personal verwendet.

### 3.2.1.14 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert.

Für die Sequenzierung wurde der SequiTherm EXCEL™II DNA-Sequencing Kit der Firma BIOzym™ der Herstellerangaben gemäß verwendet. Eingesetzt wurden die mit IRDye800 bzw. IRDye700 fluoreszenzmarkierten Primer pGEX5 und pGEX3, spezifische Primer für pGEX-Vektoren.

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

1	Initiale Denaturierung	94°C	3:00 min
2	Denaturierung	94°C	0:30 min
3	Annealing	67.8 °C	0:30 min
4	Extension	72°C	1:00 min
5	Wiederholung der Schritte 2 bis 4		25x
6	Kühlen	4°C	nach Bedarf

Nach Beendigung der PCR wurden zu jedem Ansatz 1.5µl Stopp-Puffer gegeben. Die Reaktionsansätze wurden 5min bei 95°C denaturiert und auf ein Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen.

Zur Herstellung des Sequenziergels wurden 29ml Rapidgel XL (40%), 105g Harnstoff, 25ml 10x TBE und 150ml H<sub>2</sub>O gemischt. Diese Gel-Stammlösung ist für fünf 40 cm-Gele ausreichend und wurde bei 4°C gelagert. Kurz vor dem Gießen eines Gels wurden 40ml der Stammlösung filtriert, und 30µl TEMED und 292µl 10% APS zugegeben. Erst nach Zugabe von TEMED und APS polymerisiert die Gelmatrix aus.

Die Elektrophorese erfolgte bei 1500V/50W in 1x TBE-Laufpuffer über 6-10h in einem automatischen Sequenzierapparat (LI-COR 4300 DNA-Analyzer). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software „e-Seq V3.0“.

### 3.2.1.15 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

Fünfzehn mit CO<sub>2</sub> betäubte Fliegen wurden in ein Reaktionsgefäß gesammelt und für 30min bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Fliegen in 200µl Lysispuffer mit einem Mikropistill gründlich zerrieben. Nach 30min Inkubation bei 65°C wurden 400µl LiCl/Kaliumacetat-Lösung zugegeben, gründlich gemischt und mindestens 10min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz 15min bei RT und 13000xg abzentrifugiert und 500µl vom Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand wurden 300µl Isopropanol gegeben und das Gemisch 15min bei RT und 13000xg zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 75µl TE durch sanftes Mischen gelöst. Die DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

### 3.2.1.16 Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde

Die Markierung der DNA-Fragmente erfolgte gemäß dem folgenden Ansatz:

100ng isoliertes DNA-Fragment  
5µl Random Primer p(dN)<sub>6</sub> (Roche)  
ad 12.5µl steriles H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 95°C für 5min denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt und folgender Mix hinzugegeben:

2 µl 10x Vogel-Puffer  
2 µl dATP, dCTP, dGTP (1 mM) (Roche)  
1.3µl dTTP (1 mM)  
0.7µl dUTP DIG-markiert (1 mM) (Roche)  
1.5µl Klenow-Fragment (2U/µl) (Fermentas GmbH)

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Nach 12h wurde zu den Proben erneut 1µl des Klenow-Fragments hinzugegeben und für weitere 4h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch Zugabe von 0.1M EDTA zu einer Endkonzentration von 50mM abgestoppt. Nun erfolgte eine Inkubation der Proben für 10min bei 65°C im Heizblock und danach eine Zugabe von 66µl H<sub>2</sub>O, 2µl Glycogen (20mg/ml) (Roche) und 12µl 3M LiCl zu

einer Endkonzentration von 300mM. Dieser Ansatz wurde gemischt, 300µl 100% EtOH zugefügt und üN bei -20°C gefällt. Nach 12h wurden die gefällten Proben für 30min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert, der Überstand danach abgenommen und mit 700µl 70% EtOH das Pellet durch eine erneute Zentrifugation für 15min bei 13000xg und 4°C gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 2min in einem Rotationsverdampfer (Eppendorf Concentrator 530) getrocknet und in 100µl HybMix aufgenommen.

Kontrolle der DIG-markierten Sonden in einem „Dot Blot“:

Die Sonde (1ng/µl) wurde in 2x SSC zu 100pg/µl, 10pg/µl und 1pg/µl verdünnt. Von der unverdünnten Sonde und von jeder Verdünnungsstufe wurde je 1µl im Raster auf eine Nylonmembran pipettiert und getrocknet. Die restliche Sonde wurde bei -20°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt. Die Sonden-DNA wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht für 2min in einem UV-Crosslinker (0.125Joule/min) fest an die Nylonmembran gebunden, damit sie bei den Waschschritten an der Membran haften bleiben. Die Membran wurde in Puffer PI unter sanftem Schütteln gewaschen, 30min in Puffer PII (> 1ml/cm<sup>2</sup>) unter leichtem Schütteln geblockt und kurz in Puffer PI gewaschen. Der Anti-DIG-Antikörper wurde zu einer Endverdünnung von 1:2000 in Puffer PI (≥ 0,2ml/cm<sup>2</sup>) zugegeben und für 30min unter leichtem Schütteln mit der Membran inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abgenommen und die Membran für 2x 15min in Puffer PI (> 1ml/cm<sup>2</sup>) unter sanftem Schütteln gewaschen. Nun wurde die Membran für 2min in Puffer PIII (≥ 0,2ml/cm<sup>2</sup>) equilibriert und im Dunkeln und ohne zu schütteln 2-5min in der Färbelösung inkubiert (≥ 0,1 ml/cm<sup>2</sup>).

Färbelösung pro 2cm<sup>2</sup>:

- 0.2ml Puffer PIII
- + 0.9µl NBT
- + 0.7µl BCIP

Die Membran wurde nach der Färbereaktion kurz in Puffer PI gewaschen.

### 3.2.2 Biochemische Methoden

#### 3.2.2.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde eine proteinkodierende Sequenz des Gens von Interesse in den Vektor pGEX4T-1 einkloniert. Wird das Konstrukt in dem Wirtsbakterium *E.coli* BL21 zur Expression gebracht, entsteht ein Fusionsprotein, das N-terminal aus GST (Glutathion-S-Transferase) und C-terminal aus dem durch die einklonierte Sequenz kodierten Protein besteht. Die Expression des GST-Fusionsproteins steht unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Solange im Medium keine Laktose vorhanden ist, lagert sich ein Repressor an diesen Promotor und es wird kein GST-Fusionsprotein produziert. Die Genexpression kann durch Metabolitzugabe induziert werden. Wird Laktose oder ein Laktose-Analogon wie IPTG zugefügt, lagert sich dieses an den *lac*-Repressor an, der sich dadurch vom *lac*-Promotor löst, so dass die Expression des gewünschten Fusionsproteins angeschaltet wird. Nach Induktion der Expression werden die Bakterienzellen durch Ultraschall aufgeschlossen und das Fusionsprotein über Affinitätschromatographie aufgereinigt. 100ml LB-Medium mit Ampicillin wurden mit einer Kolonie frisch hergestellter *E.coli* BL21/pGEX4T-1-*hbn* angeimpft und üN bei 37°C und 250rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die üN-Kultur wurde in 250ml LB-Medium mit Ampicillin auf eine OD<sub>600</sub> von 0.3 bis 0.4 verdünnt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1.0 weiter heranwachsen gelassen. Danach wurde die GST-Expression mit 1mM IPTG induziert. 3.5h nach der Induktion wurde die Bakterienkultur durch 10min Zentrifugation bei 4°C und 5000xg (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-Rotor) abgeerntet. Das Pellet wurde in 20ml 1x PBS resuspendiert und pro ml wurden 5mg Protease-Inhibitor-Gemisch (Complete Mini, Roche) zugesetzt. Danach erfolgte eine Lyse der Zellen durch 2x 1min Ultraschallbehandlung auf Eis. Nach dem Zellaufschluss wurde das Gemisch 30min bei 4°C und 20000xg zentrifugiert (Sorvall Evolution RC, SA-600-Rotor). Der Überstand enthält das gewünschte Protein und wird weiterverarbeitet.

### 3.2.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das GST-Tag (28kDa) hat eine hohe Affinität für Glutathion, so dass GST-Fusionsproteine über eine Säule mit immobilisiertem reduziertem Glutathion gereinigt werden können. Nach den Waschschrritten kann das GST-Fusionsprotein mit einer hochkonzentrierten (10mM) Glutathion-Lösung aus der Säulenmatrix eluiert werden.

Zur Vorbereitung der Säule (Econo Column<sup>®</sup>, Bio-rad) wurden 2ml Glutathione Sepharose<sup>™</sup>4B (Amersham Biosciences) 6x in 12ml PBS(KM)T gewaschen, indem die Sepharose-Matrix durch Invertieren resuspendiert und anschließend je 10min bei 1000xg abzentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrtritt wurde das PBS(KM)T nahezu vollständig abgenommen (nur so weit, dass das Säulenmaterial nicht austrocknen kann). Das aufzureinigende Proteingemisch wurde nach dem Ultraschallaufschluss 10min bei 4°C und 20000xg zentrifugiert (Sorvall Evolution RC, SA-600-Rotor) und schließlich über einen Sterilfilter (0.45µm) zum vorbereiteten Säulenmaterial gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht auf einem Rotator. Auch alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C: Das Gemisch wurde auf eine Säule pipettiert, wobei sich das Säulenmaterial absetzte. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 40ml PBT(KM)T und anschließend mit 20ml PBT(KM) gewaschen. Eluiert wurde das GST-Fusionsprotein mit 20ml Elutionspuffer (mit 10mM Glutathion). Dabei wurden 1ml-Fractionen gesammelt, die später über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, um zu überprüfen, welche Fractionen das gewünschte Fusionsprotein enthalten. Für die Immunisierung von Tieren zur Antikörperherstellung wurde 1mg Protein eingesetzt.

### 3.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Von dem Eichprotein BSA wurden Verdünnungen in Konzentrationen von 1 bis 20µg/ml in H<sub>2</sub>O hergestellt. Jeweils 800µl der BSA-Verdünnungen bzw. der verdünnten Proteinproben wurden in Plastikkuvetten pipettiert. Dazu wurden 200µl 5x Färbelösung (Roti<sup>®</sup>-Quant, Roth) gegeben und gründlich gemischt. Nach 30min wurde die OD<sub>595</sub> der BSA-Verdünnungen und der Proteinproben gegen den Nullwert (800µl H<sub>2</sub>O + 200µl 5x Färbelösung) gemessen. Die OD<sub>595</sub> der BSA-Verdünnungen wurde gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen. Die Proteinmengen der Proben wurden anhand der Eichgeraden abgelesen. Die photometrischen Messungen wurden mit dem SmartSpec<sup>™</sup>3000-Photometer der Firma Bio-rad durchgeführt.

### 3.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Zur Herstellung von 10%igen Trenngelen wurden 6.7ml Acrylamid-Mix (Rotiphorese® Gel30, Roth), 5ml Tris-HCl (1.5M, pH8.8), 7.9ml H<sub>2</sub>O, 200µl 10% SDS, 200µl 10% APS und 8µl TEMED gemischt (ausreichend für 4 Gele). Der Ansatz wurde zwischen die Glasplatten einer Gelgießapparatur der Firma Bio-rad gefüllt. Dieses Gemisch wurde bis zur vollständigen Polymerisation mit 100% Isopropanol überschichtet, damit beim Auspolymerisieren eine gerade Kante entsteht. Zur Herstellung des Sammelgels wurden 1ml Acrylamid-Mix, 2.9ml Tris-HCl (1M, pH6.5), 4.1ml H<sub>2</sub>O, 60µl 10% SDS, 60µl 10% APS und 60µl TEMED gemischt. Das Isopropanol wurde von dem auspolymerisierten Trenngel entfernt, einige Male mit H<sub>2</sub>O nachgespült, die Sammelgellösung zwischen die Glasplatten auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm gesetzt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm gezogen und die Glasplatten mit dem Gel aus der Gießapparatur entfernt. Die Geltaschen wurden vorsichtig mit H<sub>2</sub>O ausgespült und die Glasplatten in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Vor dem Auftragen der Proteinproben auf das Gel wurden zu je 50µl der aufzutrennenden Probe 50µl SDS-Probenpuffer (2x Laemmli) gegeben und die Probe 10min im Heizblock gekocht. Die Ansätze wurden mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen eingefüllt. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug zum Einlaufen der Proben bis zur Kante Sammelgel/Trenngel 60V, zur weiteren Auftrennung 110-120V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Danach wurde das Gel in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Anschließend wurde das Gel mehrmals in H<sub>2</sub>O gewaschen und danach einige Stunden in H<sub>2</sub>O mit Glycerol geschwenkt und getrocknet.

### 3.2.2.5 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Die Proteine können anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden. Nach Auftrennung des Proteingemisches über SDS-PAGE wurde das Gel zusammen mit einer aktivierten PVDF-Membran „sandwichartig“ zwischen Whatman-Papier, Schwämme und zwei Gitterplatten eingeklemmt und so in einen mit Transferpuffer gefüllten Blottingtank (Bio-rad) eingespannt, dass das Gel auf der Kathodenseite und die Membran auf der Anodenseite der Apparatur liegt. Das Blotting erfolgte bei 30V. Danach wurde die



Membran 1h unter Bewegung in 5% Magermilch in PBT<sub>WB</sub> zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 1% Magermilch in PBT<sub>WB</sub> gewaschen und für 1h mit dem primären Antikörper, der in 1% Magermilch in PBT<sub>WB</sub> verdünnt wurde, in Folie verschweißt bei RT inkubiert. Die Membran wurde 2x 10min mit 1% Magermilch in PBT<sub>WB</sub> gewaschen und für 1h mit dem sekundären peroxidasegekoppelten Antikörper, der 1:30.000 in 1% Magermilch in PBT<sub>WB</sub> verdünnt wurde, bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend 2x 10min mit PBT<sub>WB</sub> gewaschen. 2ml „Lumi-Light Luminol/Enhancer Solution“ (Roche) wurden mit 2ml „Lumi-Light Stable Peroxide Solution“ (Roche) gemischt und die Membran für 30s mit dieser Färbelösung inkubiert. Nach vollständiger Farbreaktion erfolgte die Detektion mit Hilfe des ChemiDoc XRS Systems (Bio-rad). Anschließend wurde die Membran durch mehrmaliges Schwenken in 100% MeOH inaktiviert, getrocknet und in Folie eingeschweißt aufbewahrt.

### **3.2.3 Genetische Methoden**

#### **3.2.3.1 Fliegenzucht**

Die verschiedenen *Drosophila*-Stämme wurden je nach Anzahl der Fliegen in Bechern entsprechender Größe gehalten. Die Stammhaltung erfolgte bei 18°C und ca. 65% Luftfeuchtigkeit, wobei die Generationszeit 21 Tage beträgt. Fliegen, die für Versuche benötigt wurden, wurden bei 24°C und ca. 65% Luftfeuchtigkeit gehalten, da die Generationszeit hier bei nur etwa 10 Tagen liegt.

#### **3.2.3.2 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) und Kreuzungen**

Zum gezielten Absammeln von Jungfrauen für Kreuzungen wurden die adulten Fliegen der entsprechenden Stämme durch Abschütteln entfernt und die Becher mit den darin verbleibenden Larven und Puppen bei 24°C und ca. 65% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Frisch geschlüpfte Weibchen wurden spätestens 12h danach abgesammelt, bevor die männlichen Tiere fertil wurden. Die männlichen Tiere wurden entfernt. Gekreuzt wurde je eine Fliege des einen Geschlechts mit drei Fliegen des anderen Geschlechts. Die Haltung einer Kreuzung erfolgte 14 Tage bei 24°C und ca. 65% Luftfeuchtigkeit.

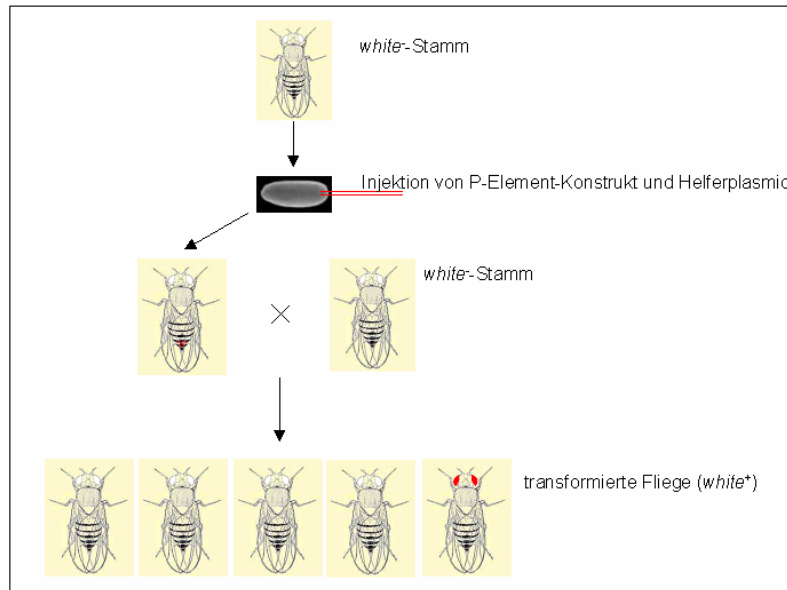
### 3.2.3.3 Keimbahntransformation von *Drosophila*-Embryonen durch P-Element-Vektoren

Die Keimbahntransformation ist eine Methode, um Fremd-DNA in Form von spezifisch klonierten Transformationskonstrukten stabil in die Keimbahn von *Drosophila*-Fliegen zu integrieren, um somit neue transgene *Drosophila*-Stämme zu erzeugen. Verwendet wurden dazu spezielle Transformationsvektoren.

Transformationsvektoren erfüllen folgende Kriterien:

- Der Vektor besitzt Teile eines P-Elementes mit den charakteristischen terminalen invertierten Sequenzwiederholungen („inverted repeats“), über die er in das Genom integriert werden kann, aber durch Deletionen selbst keine Transposase-Aktivität mehr besitzt und somit am Insertionsort stabil integriert bleibt.
- Plasmidgerüst mit Replikationsursprung („ori“) und Ampicillin-Resistenz.
- Ein *Drosophila melanogaster white*<sup>+</sup> (*w*<sup>+</sup>)-Wildtyp-Gen. Nach Integration in das Genom von *yellow white* (*yw*)-Fliegen, die phänotypisch an weißen Augen zu erkennen sind, können Transformanten durch ihre orangen bis roten Augen leicht selektiert werden.
- Ein „Polylinker“, der die Integration von Fremd-DNA in den Vektor vereinfacht.
- UAS-Sequenzen („Upstream Activating Sequences“) im Bereich des Promotors, an die der Transkriptionsfaktor GAL4 binden kann.

Dieses defekte P-Element (Transformationsvektor) kann in *trans* durch ein Helferplasmid mobilisiert werden. Verwendet wurde dazu das  $\Delta 2-3$  Helferplasmid, das ein modifiziertes P-Element mit einer Deletion des Introns zwischen dem zweiten und dritten Exon (Laski *et al.*, 1986) enthält. Dadurch besitzt dieses Plasmid Transposaseaktivität in Keimbahn- und Somazellen. Es kann aber aufgrund einer Inaktivierung seiner „inverted terminal repeats“ selbst nicht ins Genom integrieren. Werden beide Plasmide, der Transformationsvektor und das  $\Delta 2-3$  Helferplasmid, zusammen injiziert, kann eine stabile Integration des Transformationsvektors mit der in ihm klonierten Fremd-DNA in das *Drosophila melanogaster*-Genom erzielt werden (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: P-Element-Transformation bei *Drosophila melanogaster*.** Das P-Element-Konstrukt wird mit dem Helferplasmid in den posterioren Pol von ca. 30 min alten Embryonen des Stammes *yellow white* (*white<sup>-</sup>*, weiße Augen) injiziert. In einigen Fällen führt die Injektion zur Integration des Konstruktes in Keimzellen. Die erste Generation von Fliegen, bei denen nur ein Teil der Keimzellen transformiert ist, wird mit dem Rezipientenstamm rückgekreuzt. Unter den daraus entstandenen Nachkommen sollten rotäugige (*white<sup>+</sup>*) Fliegen auftauchen, bei denen auch die somatischen Zellen transformiert sind.

### 3.2.3.3.1 Injektionsmaterial

50µg DNA des Transformationskonstruktes wurden präzipitiert und in 50µl Injektionspuffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Zur Injektion wurde Injektionspuffer mit 500µg/ml Transformationskonstrukt und 150µg/ml Δ2-3 Helferplasmid eingesetzt.

### 3.2.3.3.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen

Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Plastikbehältern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Um die Fliegen an die Platten zu gewöhnen, wurden sie bereits einen Tag vor dem Absammeln auf Apfelsaftplatten gesetzt. Einige Stunden vor dem Injizieren wurden die Platten alle 30min gewechselt, um die Fliegen an den Wechselrhythmus zu gewöhnen. Alle 30min wurden die Embryonen abgesammelt und dechorioniert. Dazu wurde die Platte von toten Fliegen gereinigt, für 2min mit 7% Hypochloridlösung überschichtet und währenddessen einige Male sanft geschwenkt. Die dechorionierten Embryonen, die sich nun von der Platte gelöst hatten, wurden in einem Gazenetz aufgefangen und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Die Embryonen wurden dann mit Hilfe einer Präpariernadel unter einem Stereomikroskop auf dem Rand einer

Apfelsaftplatte so aufgereiht, dass der anteriore Teil der Embryonen zum Rand der Platte zeigte. Die Zeit für das Aufreihen betrug ca. 8min. Um die Embryonen auf einen Objektträger zu transferieren, wurde doppelseitiges Klebeband (Tesa Photo Film Tape, 12mm breit) benutzt. Anschließend wurden die Embryonen für ca. 9min in einer Kammer mit Silikagel getrocknet und dann mit Voltaleff 10S-Öl überschichtet, um sie vor dem Austrocknen zu schützen.

### **3.2.3.3.3 Injektion**

Die Injektion wurde unter einem Inversmikroskop (Zeiss Axiovert 25), kombiniert mit einem Mikromanipulator (Märzhäuser) durchgeführt. Als Injektionsnadel wurden fein ausgezogene Glaskapillaren (ca. 2-8 $\mu$ m) verwendet. Mit Hilfe einer sehr feinen Pipettenspitze (Eppendorf Microloader) wurden etwa 2 $\mu$ l Injektionsmaterial in die Spitze der Injektionsnadel gefüllt und diese in den Mikromanipulator eingesetzt. Der Objektträger mit den aufgereihten Embryonen wurde auf dem Objektisch positioniert und vorsichtig gegen die Injektionsnadel bewegt, um diese an der Spitze abzubrechen. So entstand eine feine, scharfe Öffnung. Durch Bewegung des Objektisches wurde die Nadel in die Nähe der zukünftigen Polzellen am posterioren Pol gebracht und kleine DNA-Mengen in diesen Bereich des Embryos injiziert. Die injizierte DNA-Menge wurde mittels Druckluft vom Injektor (Eppendorf FemtoJet) reguliert. Die Einstellungen konnten am Gerät vorgenommen werden, so dass die unterschiedlichen Parameter individuell, je nach Injektionsbedingungen, konstant gehalten werden konnten. Mittels eines Mausclicks wurde so eine genau definierte DNA-Menge in die Embryonen injiziert. Nachdem alle Embryonen eines Objektträgers injiziert worden waren, wurde dieser in eine feuchte Kammer gelegt und üN bei RT dort belassen.

### **3.2.3.3.4 Behandlung injizierter Embryonen**

Am folgenden Tag wurde der Klebestreifen mit den Embryonen vom Objektträger abgezogen und auf Apfelsaftplatten gelegt, auf die in der Mitte etwas Hefe gestrichen wurde. Nach Bedarf wurden die Embryonen noch mit Voltaleff 10S-Öl überschichtet und die Platten bei 24°C und ca. 65% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Jeweils fünf geschlüpfte Larven wurden mit der Präpariernadel vorsichtig in ein Futterröhrchen überführt und bei 24°C und ca. 65% Luftfeuchtigkeit weiter aufgezogen.

### 3.2.3.3.5 Selektion von Transformanten

Frisch geschlüpfte Fliegen ( $G_0$ -Generation) wurden mit  $yw$ -Fliegen des anderen Geschlechts rückgekreuzt und bei  $24^\circ\text{C}$  und ca. 65% Luftfeuchtigkeit gehalten. Deren Nachkommen wurden auf die Augenfarbe hin untersucht. Erst in dieser  $G_1$ -Generation konnte das Markergen  $w^+$  des Transformationsvektors, der in der  $G_0$  in die Keimbahn integriert wurde, exprimiert werden. Um getrennte Linien zu erhalten, wurden die  $G_1$ -Transformanten weiter mit  $yw$ -Fliegen gekreuzt. Die nächste Generation  $G_2$  wurde mit Fliegen von Balancerstämmen gekreuzt. So konnte gleichzeitig die chromosomale Lokalisation des P-Element-Transformationsvektors festgestellt werden.

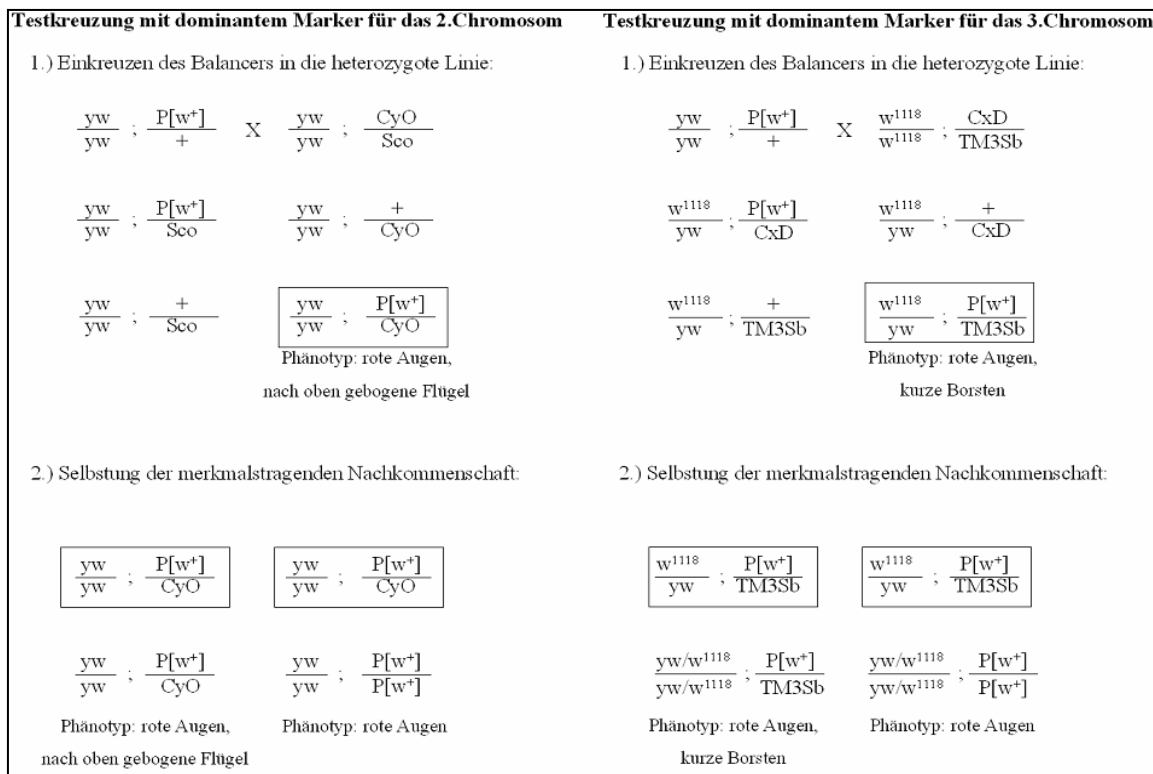
### 3.2.3.3.6 Balancieren von transgenen Fliegen

Unter Balancieren versteht man die heterozygote Stabilisierung von Mutationen, in diesem Fall die Insertion des P-Elements. Dabei werden die transformanten  $G_2$ -Fliegen mit Fliegen gekreuzt, die ein Balancerchromosom tragen.

Dieses Balancerchromosom zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

- Es trägt ein oder mehrere dominante Markergene,
- einen rezessiven Letalfaktor,
- vielfache Inversionen zur Unterdrückung von Rekombination.

Um die Lokalisation der Insertion auf dem zweiten oder dritten Chromosom nachzuweisen, wurden unabhängige Transformanten mit einem zweitchromosomalen Balancerstamm  $yw$ ;  $Sco/CyO$  und einem dritschromosomalen Balancerstamm  $w^{1118}$ ;  $CxD/TM3 Sb$  gekreuzt. In der  $G_1$ -Generation wurde auf eine Kombination vom Marker des Transformationsvektors, rote Augen ( $P[w^+]$ ), mit nach oben gebogenen Flügeln ( $CyO$ ) für eine Insertion auf dem zweiten Chromosom bzw. auf rote Augen kombiniert mit kurzen Borsten ( $TM3 Sb$ ) für eine Insertion auf dem dritten Chromosom selektiert. Solche Fliegen wurden dann jeweils untereinander gekreuzt, so dass in der  $G_2$ -Generation alle Fliegen das P-Element tragen: Zum einen P-Element über Balancer heterozygot, oder P-Element über P-Element homozygot, falls diese Fliegen lebensfähig sind. Fliegen mit Balancer über Balancer können aufgrund der rezessiven Letalfaktoren nicht auftreten (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Kreuzungsschema für das Balancieren transgener Fliegen.** Die Fliegen werden sowohl mit einem zweitchromosomalen Balancerstamm ( $yw; Sco/CyO$ ) als auch mit einem Balancerstamm für das dritte Chromosom ( $w^{1118}; CxD/TM3Sb$ ) gekreuzt. In der  $G_1$ -Generation werden Fliegen selektiert, die eine Kombination von Markern des Transformationsvektors (rote Augen,  $P[w^+]$ ) und des jeweiligen Balancerchromosoms (zweites Chromosom: nach oben gebogene Flügel ( $CyO$ ), drittes Chromosom: kurze Borsten ( $TM3Sb$ )) tragen. Diese Fliegen werden jeweils untereinander weiter gekreuzt. Wurde der Transformationsvektor in das zweite Chromosom integriert, treten in der  $G_2$ -Generation der entsprechenden Kreuzung ausschließlich rotäugige Fliegen auf, die entweder geradflügelig sind (homozygot für das P-Element) oder nach oben gebogene Flügel besitzen (heterozygot für das P-Element). Wurde der Transformationsvektor in das dritte Chromosom integriert, treten in der  $G_2$ -Generation der entsprechenden Kreuzung nur rotäugige Fliegen auf, die entweder normal lange Borsten (homozygot für das P-Element) oder kurze Borsten (heterozygot für das P-Element) besitzen.

### 3.2.4 Histologische Methoden

#### 3.2.4.1 Kutikula-Präparation

Homozygot letale Fliegenstämme wurden  $\bar{u}N$  zur Eiablage auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Gelege wurden anschließend für 48h bei  $24^\circ C$  inkubiert und alle geschlüpften, d.h. lebensfähigen Larven abgesammelt. Wildtyp-Embryonen wurden nach 1-2h Ablage für ca. 24h bei  $24^\circ C$  inkubiert. Die auf der Platte verbleibenden Embryonen wurden mit 7% Hypochloridlösung dechorioniert und mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurden sie in  $500\mu l$  MeOH +  $500\mu l$  Heptan überführt und zum Devitellinisieren 30s stark geschüttelt, so dass die Embryonen absinken. Das MeOH und das Heptan wurde abgenommen und die Embryonen dreimal mit MeOH und zweimal mit 0.1% TritonX-100 in PBS<sub>AK</sub>-Färbung gespült.

Anschließend wurden die Embryonen mit möglichst wenig Flüssigkeit auf einen Objektträger überführt. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Papiertuch aufgesaugt. Es wurden 50µl Hoyers Medium auf die Embryonen gegeben, ein Deckglas aufgelegt und für mindestens 1h bei 60°C im Brutschrank inkubiert. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch ausgewertet (Olympus BX61) und mit einer SIS Color View-Kamera (CC-12) fotografiert.

#### **3.2.4.2 Fixieren von *Drosophila*-Embryonen für Antikörperfärbungen**

Embryonen wurden auf Apfelsaftplatten gesammelt, mit 7% Hypochloridlösung dechorioniert und mit Embryonenwaschlösung gewaschen. Danach wurden sie in 500µl Heptan + 500µl Fixativ (3.7% Formaldehyd in PEM) überführt und 12min auf dem Überkopf-Rotator (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS24) fixiert. Die Embryonen befanden sich nun in der Interphase. Die untere Phase (Fixativ) und die obere Phase (Heptan) wurden abgenommen, 500µl Heptan und 500µl MeOH zugegeben und 2min stark geschüttelt. Dadurch wird die Vitellinmembran zerstört, und die Embryonen sinken ab. Die Embryonen wurden noch zweimal in MeOH gewaschen und bei -20°C in MeOH aufbewahrt.

#### **3.2.4.3 Präabsorption von Antikörpern**

Die für Färbungen eingesetzten Antikörper wurden an *Drosophila*-Embryonen präabsorbiert, um die Konzentration von spezifisch bindenden Antikörpern zu erhöhen.

Fixierte Embryonen wurden durch Entfernen des MeOHs rehydriert und 2x 5min und 1x 30min in PBT gewaschen. Um unspezifische Bindungen abzublocken, wurden 5% NGS in PBT zugegeben und die Embryonen 30min bei RT auf einem Nutator-Taumler inkubiert. Das NGS/PBT-Gemisch wurde abgenommen. Dem zu präabsorbierenden Antikörper wurde NGS in einer Endkonzentration von 5% zugefügt und das Gemisch zu den Embryonen gegeben. Das Gemisch wurde üN bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Danach wurden die Embryonen durch Zentrifugieren abgesetzt, so dass der präabsorbierte Antikörper in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Zur Konservierung des Antikörpers wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 0.02% zugegeben. Der präabsorbierte Antikörper wurde bei 4°C gelagert.

#### 3.2.4.4 Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern an *Drosophila*-Embryonen

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass zunächst ein primärer Antikörper an das nachzuweisende Protein gebunden wird. An diesen primären Antikörper bindet in einer zweiten Reaktion ein fluoreszenzgekoppelter sekundärer Antikörper, der den primären Antikörper sichtbar macht.

Fixierte Embryonen wurden 3x 5min und 4x 30min auf dem Taumler mit PBT gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen 30min mit 5% NGS in PBT abgeblockt, der primäre Antikörper zugegeben und üN bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen 3x 5min und 6x 30min mit PBT gewaschen und anschließend wieder 30min mit 5% NGS in PBT inkubiert. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper wurde zugegeben und die Reaktionsgefäße mit Alufolie umwickelt, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern. Es folgte eine Inkubation von 2h bei RT bzw. üN bei 4°C auf dem Taumler. Anschließend wurden die Embryonen 3x 5min und 6x 30min mit PBT gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBT vollständig abgenommen, die Embryonen in 80% Glycerol eingebettet und auf einen Objektträger gegeben. Die Färbungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) ausgewertet und mit einer SIS Color View-Kamera (CC-12) fotografiert oder an einem konfokalen Mikroskop (QLC-100, Visitech International) ausgewertet. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985). Die Präparate wurden bei -20°C aufbewahrt.

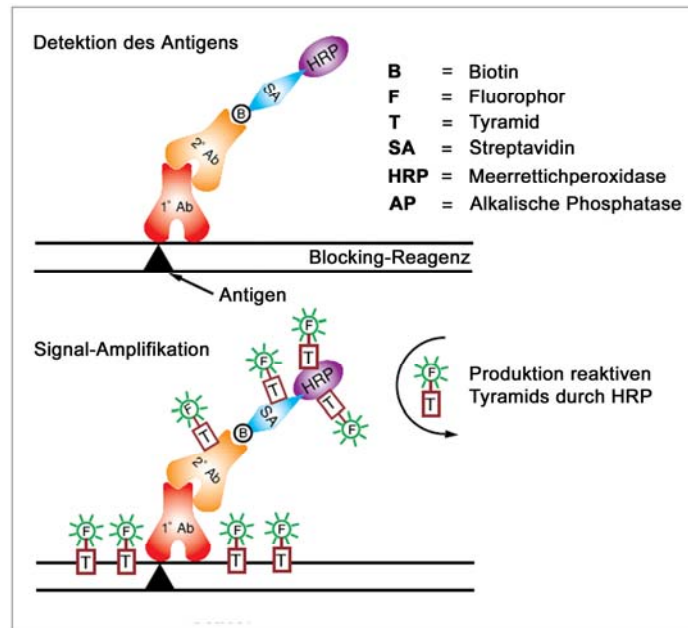
#### 3.2.4.5 Antikörperfärbung an *Drosophila*-Embryonen mit dem TSA-System

Der TSA™-Kit der Firma Perkin Elmer wurde eingesetzt, um bei einem schwachen primären Antikörper das Fluoreszenzsignal des sekundären Antikörpers zu verstärken. Das Prinzip der TSA™-Färbung zeigt Abb. 3.3.

Der eingesetzte sekundäre Antikörper ist nicht fluoreszenzmarkiert, sondern biotinyliert. Zur Detektion dieses Antikörpers wird Streptavidin zugegeben, an das HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Streptavidin besitzt eine starke Affinität zu Biotin, so dass die Streptavidin-HRP-Moleküle an den biotinylierten Antikörper gebunden werden. Das Substrat für HRP ist ein mit Cyanin3 bzw. Fluorescein fluoreszenzmarkiertes Tyramidderivat, das in eine hochreaktive Form umgewandelt wird. Die entstandenen Tyramidradikale binden an die nukleophilen Tyrosin-Seitenketten des Proteins, das durch den primären Antikörper



erkannt wurde. Der hohe Umsatz des Tyramid-Substrats durch die Peroxidase führt zu einer Signalverstärkung.



**Abb. 3.3: Schematische Darstellung der TSA-Detektion im Rahmen einer Antikörperfärbung.** Zunächst erfolgt die Bindung des primären Antikörpers an das entsprechende Antigen, danach bindet ein sekundärer biotinylierter Antikörper an den primären Antikörper. Zur Detektion des sekundären Antikörpers wird HRP-gekoppeltes Streptavidin zugegeben. Streptavidin besitzt eine starke Affinität zu Biotin, so dass die Streptavidin-HRP-Moleküle an den biotinylierten Antikörper gebunden werden. Durch das an Streptavidin gebundene HRP wird die Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Tyramidderivats zu einer radikalischen Form katalysiert (Bild entnommen und verändert aus TSA Signal Amplification Systems Broschüre, Perkin Elmer).

Fixierte Embryonen wurden 2x 5min und 4x 30min mit PBT gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden 30min mit TNB-Puffer abgeblockt. Danach wurde der primäre Antikörper zugegeben und die Embryonen üN bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Embryonen 1x 1min, 3x 5min und 6x 30min in PBT gewaschen, danach wurde wieder 30min mit TNB-Puffer geblockt. Der sekundäre Antikörper wurde zugegeben und die Embryonen üN bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen 3x 5min und 6x 30min in PBT gewaschen und danach 30min in Streptavidin-HRP (1:100 in TNB-Puffer) inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Embryonen 3x mit PBT gespült, 3x 5min und 3x 20min in PBT gewaschen. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation mit Tyramid-Fluorophor (1:100 in Amplification Diluent) bei RT. Der Farbstoff wurde danach entfernt und die Embryonen 3x mit PBT gespült, 3x 5min und 6x 20min in PBT gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das PBT vollständig abgenommen, die Embryonen in 80% Glycerol eingebettet und auf einen Objektträger gegeben. Die Färbungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) ausgewertet und mit einer SIS Color View-Kamera (CC-12) fotografiert oder an einem konfokalen Mikroskop (QLC-100,

Visitech International) ausgewertet. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985). Die Präparate wurden bei -20°C aufbewahrt.

#### **3.2.4.6 Anti-Cleaved-Caspase-3-Färbung an *Drosophila*-Embryonen (Rogulja-Ortmann et al., 2007)**

Embryonen wurden auf Apfelsaftplatten gesammelt, mit 7% Hypochloridlösung dechorioniert und mit Embryonenwaschlösung gewaschen. Danach wurden sie in 500µl Heptan + 430µl PEMS + 70µl Formaldehyd überführt und 22min auf dem Überkopf-Rotator (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS24) fixiert. Die Embryonen befanden sich nun in der Interphase. Die untere Phase (PEMS-Formaldehyd) und die obere Phase (Heptan) wurden abgenommen, 500µl Heptan und 500µl MeOH zugegeben und 2min stark geschüttelt. Dadurch wird die Vitellinmembran zerstört, und die Embryonen sinken ab. Danach wurden die Embryonen 3x in MeOH gespült und 10min in MeOH gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend 3x in PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 gespült und 2x 10min in PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 gewaschen. Der anti-Cleaved-Caspase-3-Antikörper wurde 1:50 in PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 verdünnt, zu den Embryonen gegeben und das Gemisch üN bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen 3x mit PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 gespült und 4x 15min mit PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 gewaschen. Der zweite primäre Antikörper wurde in PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 verdünnt und zu den Embryonen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C üN. Am nächsten Tag wurden die Embryonen 3x mit PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 gespült und 4x 15min mit PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 gewaschen. Die beiden sekundären Antikörper wurden in PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 verdünnt, zu den Embryonen gegeben und das Gemisch üN bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die sekundären Antikörper ihrer Markierung entsprechend detektiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBS<sub>AK-Färbung</sub>+0.1% TritonX-100 vollständig abgenommen, die Embryonen in 80% Glycerol eingebettet und auf einen Objektträger gegeben. Die Färbungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) ausgewertet und mit einer SIS Color View-Kamera (CC-12) fotografiert oder an einem konfokalen Mikroskop (QLC-100, Visitech International) ausgewertet. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985). Die Präparate wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **3.2.4.7 Präparation von Imaginalscheiben und Gehirnen aus *Drosophila*-Larven**

Larven im dritten Häutungsstadium wurden durch Waschen in PBS<sub>AK</sub>-Färbung von Futterresten befreit. Der posteriore Teil der Larven wurde entfernt und der anteriore Kopfbereich umgestülpt, so dass die Imaginalscheiben und das Gehirn für weitere Inkubationsschritte zugänglich wurden. Die präparierten Larven wurden in Reaktionsgefäßen mit PBS<sub>AK</sub>-Färbung auf Eis gesammelt und für Antikörperfärbungen verwendet.

### **3.2.4.8 Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern an Imaginalscheiben und larvalen Gehirnen**

Die präparierten Larvenhälften wurden 20min in 500µl Fixativ (10% Formaldehyd in PBS<sub>AK</sub>-Färbung) auf einem Über-Kopf-Rotator (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS 24) fixiert und anschließend 2x 5min und 6x 15min mit PBX gewaschen. Zum Abblocken unspezifischer Bindungen wurden die Larvenhälften 1h mit 4% NGS in PBX inkubiert. Die primären Antikörper wurden in 500µl PBX/4% NGS entsprechend verdünnt und die Larventeile 1h bei 4°C darin unter leichtem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde 2x 5min und 6x 15min mit PBX gewaschen und 1h mit PBX/4% NGS inkubiert. Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper wurden in 500µl PBX/4% NGS entsprechend verdünnt und die Larvenhälften 2h bei RT inkubiert und dabei sanft bewegt. Anschließend wurden die Larven 2x 5min und 6x 15min mit PBX im Dunkeln gewaschen. Die larvalen Gehirne und Imaginalscheiben wurden freipräpariert und auf einen Objektträger überführt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus) mit anschließender Aufnahme durch eine SIS Color View-Kamera (CC-12).

### **3.2.4.9 „Whole mount“ *In situ*-Hybridisierung an *Drosophila*-Embryonen**

#### **3.2.4.9.1 Fixieren von *Drosophila*-Embryonen für *In situ*-Hybridisierungen**

Embryonen wurden auf Apfelsaftplatten gesammelt, mit 7% Hypochloridlösung für 2min dechorioniert und mit Embryonenwaschlösung gewaschen. Danach wurden sie in 500µl Heptan + 500µl Fixativ (1ml 10x PBS, 2.7ml Formaldehyd, 1ml 0.5M EGTA, 5.3ml H<sub>2</sub>O<sub>steril</sub>) überführt und 15min auf dem Überkopf-Rotator (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS24) fixiert. Die Embryonen befanden sich nun in der Interphase. Die untere Phase (Fixativ) und die obere

Phase (Heptan) wurden abgenommen, 500µl Heptan und 500µl MeOH zugegeben und 2min stark geschüttelt. Dadurch wird die Vitellinmembran zerstört, und die Embryonen sinken ab. Die Embryonen wurden noch dreimal in MeOH gewaschen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in MeOH aufbewahrt.

### 3.2.4.9.2 Hybridisierung von Embryonen mit DIG-markierten DNA-Sonden

Fixierte Embryonen wurden zweimal mit MeOH gespült und danach durch 2x Spülen in einem Gemisch aus 50% MeOH und 50% (1x PBT<sub>In situ</sub> + 5% Formaldehyd) rehydriert. Nun wurden die Embryonen erneut in 1x PBT<sub>In situ</sub> + 5% Formaldehyd für 20min fixiert und danach 3x 5min in 1x PBT<sub>In situ</sub> gespült. Die Embryonen wurden einem ProteinaseK-Verdau (50µg/ml ProteinaseK in 1x PBT<sub>In situ</sub>) für 3min im  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad unterzogen. Die ProteinaseK sorgt dafür, dass die Sonde später in den Embryo eindringen und mit der komplementären mRNA hybridisieren kann. Der Verdau wurde durch 2x Spülen in 2mg/ml Glycin in 1x PBT<sub>In situ</sub> abgestoppt. Die Embryonen wurden 2x in 1x PBT<sub>In situ</sub> gespült, danach für 20min in 1x PBT<sub>In situ</sub> + 5% Formaldehyd fixiert und 5x 5min in 1x PBT<sub>In situ</sub> auf dem Taumler gespült. Nach diesem Schritt wurde ein Teil dieser Embryonen zur Präabsorption des Anti-DIG-Antikörpers eingesetzt. Danach wurden die Embryonen 2x 10min in einem Gemisch aus 50% 1x PBT<sub>In situ</sub> + 50% HybMix und dann 10min in HybMix bei  $48^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad gespült. Es erfolgte eine Prähybridisierung der Embryonen in 100µl HybMix für 2h im  $48^{\circ}\text{C}$  Wasserbad. Die Embryonen wurden  $\infty$  in 100µl Sondenmix bei  $48^{\circ}\text{C}$  hybridisiert. Der Sondenmix wurde durch Denaturieren der Sonde im  $95^{\circ}\text{C}$  Wasserbad und anschließender 1:10-Verdünnung (10µl Sonde + 90µl Hybmix) der Sonde in HybMix hergestellt. Nach 12h wurde der Sondenmix abgenommen und die Embryonen 2x 2min und 1x 20min in HybMix gewaschen. Es folgte ein Waschen der Embryonen 1x in 50% HybMix + 50% 1x PBT<sub>In situ</sub> für 20min und dann 4x für 20min in 1x PBT<sub>In situ</sub> im  $48^{\circ}\text{C}$  Wasserbad. Anschließend wurden die Embryonen für 2h bei RT mit dem präabsorbierten AP-gekoppelten Anti-DIG-Antikörper (Verdünnung 1:2000 in 1x PBT<sub>In situ</sub>) auf dem Taumler inkubiert. Die Embryonen wurden danach 1x 2min, 1x 10min und 3x 20min in 1x PBT<sub>In situ</sub> auf dem Taumler gewaschen. Danach erfolgte 2x Spülen der Embryonen in Färbepuffer für 2min. Nach dem letzten Waschschrift wurden pro ml Färbepuffer 4.5µl NBT und 3.5µl BCIP zugegeben. Die Färbelösung wurde alle 2h erneuert. Die Farbentwicklung erfolgte im Dunkeln und wurde von Zeit zu Zeit unter dem Stereomikroskop kontrolliert und durch 3x Spülen mit PBT<sub>In situ</sub> abgestoppt. Die Embryonen wurden anschließend in einer EtOH-Reihe

(30%, 50%, 70%, 90%, 100%) dehydriert und in Canadabalsam-Salicylatgemisch auf einem Objektträger eingebettet. Die Färbungen wurden am Mikroskop (Olympus BX61) ausgewertet und mit einer SIS Color View-Kamera fotografiert. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985). Die Präparate wurden bei RT aufbewahrt.

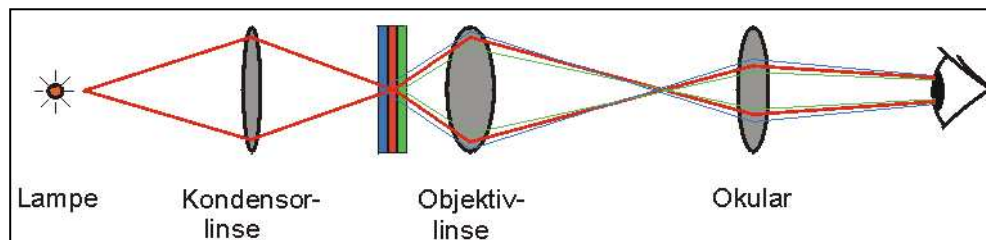
### 3.2.4.9.3 Präabsorption des anti-DIG-Antikörpers

Die Embryonen werden bis zum letzten Fixierschritt und dem folgenden fünfmaligen Spülen in 1x PBT<sub>In situ</sub> wie die Embryonen zur *In situ*-Hybridisierung behandelt. Der Antikörper wurde an Embryonen präabsorbiert, um Antikörper, die an unspezifische Bindestellen im Embryo binden und so eine unspezifische Farbreaktion nach sich ziehen würden, aus der Lösung zu entfernen. Zur Präabsorption wird der anti-DIG-Antikörper 1: 200 in 1x PBT<sub>In situ</sub> verdünnt und üN bei 4°C auf dem Taumler mit den Embryonen inkubiert.

## 3.2.5 Fluoreszenztechniken

### 3.2.5.1 Konventionelles Lichtmikroskop

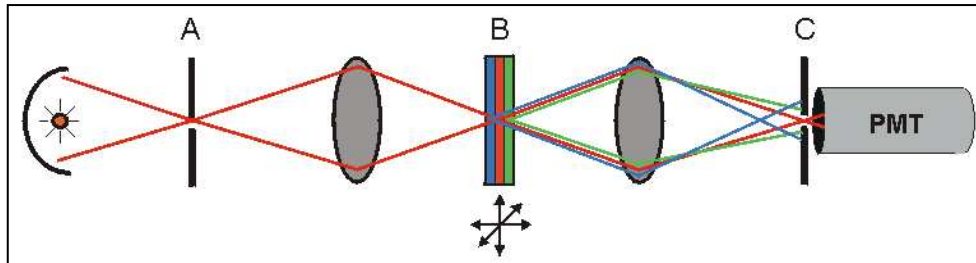
Beim konventionellen Lichtmikroskop wird das Lampenlicht durch die Kondensorlinse auf das Objekt fokussiert, das vom Objekt ausgehende Licht wird durch die Objektivlinse in die Zwischenbildebene fokussiert. Das so entstehende Bild wird durch die Okularlinse betrachtet (Abb. 3.4). Allerdings erreicht nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs (rot) das Auge, sondern auch unfokussiertes Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene (blau bzw. grün). Durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht ist die räumliche Auflösung des konventionellen Mikroskops eingeschränkt.



**Abb. 3.4:** Schematische Darstellung des Strahlengangs im konventionellen Lichtmikroskop. Rot dargestellt ist die Brennebene des Objektivs, blau und grün Bereiche außerhalb der Brennebene ([www.zoologie-skript.de](http://www.zoologie-skript.de)).

### 3.2.5.2 Konfokales Mikroskop

Um eine bessere Auflösung zu erreichen, wurde bei der Analyse verschiedener Präparate ein konfokales Mikroskop benutzt (QLC-100, Visitech International). In Abb. 3.5 ist die Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops dargestellt.



**Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Strahlengangs im konfokalen Mikroskop.** Rot dargestellt ist die Brennebene des Objektivs, blau und grün sind Bereiche außerhalb der Brennebene gekennzeichnet. A: erste Lochblende, B: Brennebene, C: zweite Lochblende, PMT: Photomultiplier ([www.zoologie-skript.de](http://www.zoologie-skript.de)).

Im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop wird beim konfokalen Mikroskop immer nur ein möglichst kleiner Fleck des Präparates beleuchtet und das Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. In Abb. 3.5 ist die einfachste Konstruktion gezeigt: Die Kondensorlinse ist hier durch eine Linse ersetzt, die mit der Objektivlinse identisch ist. Die Ausleuchtung des Präparates wird durch eine Lochblende (A) beschränkt, die auf dem Präparat scharf abgebildet wird. Eine zweite Lochblende (C) beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch den symmetrischen Aufbau des Systems sind beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal. Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, dass nur Licht aus der Brennebene des Objekts den Detektor (PMT) erreichen kann. Alle anderen (unscharfen) Ebenen werden ausgeblendet. Damit erhält man einen „optischen Schnitt“. Um daraus ein Bild zusammensetzen zu können, muss das Präparat Punkt für Punkt abgerastert werden. Dabei werden die einzelnen Bilder elektronisch gespeichert und auf einem Monitor dargestellt. Eine Serie von optischen Schnitten kann aufgezeichnet werden, indem ein Motor nach jedem aufgenommenen Bild ein Stück entlang der z-Achse weiterfährt und dann das nächste Bild aufgenommen wird („stage scanning“). Mit Hilfe eines geeigneten Computerprogramms kann aus einer solchen z-Serie die dreidimensionale Struktur des Objekts rekonstruiert werden. Die Methode ist auf Aufricht-Verfahren beschränkt. Zur Auswertung der z-Serien wurde das Programm ImageJ (National Institutes of Health) benutzt.

### **3.2.5.3 Konfokale Aufnahmen von lebenden Embryonen**

Zur Beobachtung der Gehirnentwicklung am lebenden Embryo wurden Fliegen der Treiberlinie *Elav-GAL4* mit Fliegen der Linie *UAS-Stinger-GFP* gekreuzt, um GFP in allen Neuronen zu exprimieren. Die Kreuzungen wurden 3h zur Eiablage auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Gelege wurden anschließend 13-16h bei 18°C inkubiert, damit sich möglichst viele Embryonen im Embryonalstadium 12 befinden. Die Embryonen wurden mit 7% Hypochloridlösung dechorioniert und so auf einen Objekträger mit doppelseitigem Klebeband (Tesa Photo Film Tape, 12mm breit) übertragen, dass sich die dorsale Seite der Embryonen oben befindet. Die Embryonen wurden mit Voltaleff 10S-Öl überschichtet und unter dem konfokalen Mikroskop (QLC-100, Visitech International) in Zeitabständen von 20min Bildstapel von den Gehirnen dieser Embryonen aufgenommen.

### **3.2.6 Erzeugung von digitalen 3D-Modellen**

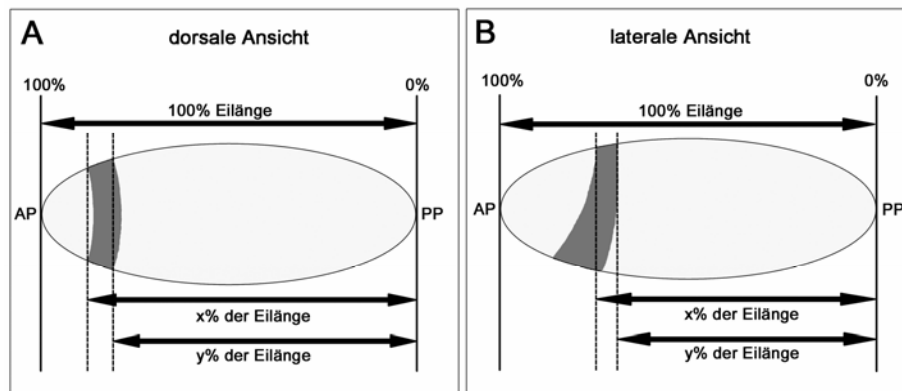
Die Grundlage, um digitale 3D-Modelle produzieren zu können, sind Bildstapel, die mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen wurden. Diese Bildstapel wurden mit Hilfe des Programms *AutoDeblur 1.4.1 (AutoQuant)* einer Dekonvolution unterzogen. Die Dekonvolution ist ein Verfahren, das eine Schärfung der Darstellung eines Objekts ermöglicht, indem aus einer Fokuserie unscharfer Bilder durch mathematische Berechnung ein scharfes, quantitativ korrektes Bild der Struktur erzeugt wird. Nach der Dekonvolution wurden die Daten in das Programm *Imaris 4.2.0 (Bitplane AG)* überführt. Mit diesem Programm wurden mit Hilfe der Funktion „*Isosurface*“ 3D-Modelle mit einer festen Oberfläche erzeugt.

### **3.2.7 Bestimmung der Position von Expressionsdomänen in „Prozent der Eilänge“**

Bestimmte embryonale Expressionsmuster, besonders Streifenmuster, können anhand der Angabe von „Prozent der Eilänge“ genau lokalisiert werden. Dabei wird je nach Morphologie des Streifens ein bestimmtes Messverfahren angewendet. Die Messungen wurden mit dem Programm *analySIS* an mindestens 20 Embryonen im Blastodermstadium durchgeführt.

Bei Streifen, die sich nicht verbreitern, wird die Lokalisation mit Hilfe von Aufnahmen bestimmt, die den Embryo aus dorsaler Sicht zeigen. Es wurde eine Linie vom anterioren Pol zum posterioren Pol des Embryos gezogen und die Gesamtlänge der anterioposterioren Achse

gemessen, wobei der anteriore Pol 100% der Eilänge und der posteriore Pol 0% der Eilänge entspricht. Anschließend wurde eine Verbindung im anterioren Bereich des Streifens gezogen, indem die anterioren Begrenzungen des Streifens auf beiden Seiten in der Peripherie des Embryos miteinander verbunden wurden. Es wurde der Abstand zwischen dem Punkt, an dem diese Linie die anterioposteriore Achse kreuzt, und dem posterioren Pol des Embryos gemessen. Dieser Wert entspricht der Lokalisation der anterioren Grenze des Streifens und wird in Prozent ausgedrückt (x% der Eilänge). Entsprechend erfolgt die Bestimmung der Lokalisation der posterioren Grenze des Streifens (y% der Eilänge) (Abb. 3.6A).



**Abb. 3.6: Schema zur Bestimmung der Lokalisation von Expressionsdomänen von *Drosophila*-Embryonen in „Prozent der Eilänge“.** (A) Verfahren zur Messung von Streifen, die sich nicht verbreitern. (B) Verfahren zur Messung von Streifen, die sich nach ventral hin verbreitern. AP: anteriorer Pol, PP: posteriorer Pol.

Verbreitert sich der Streifen, ist er z.B. dorsal schmaler als ventral, wurde die Messung mit Hilfe von Aufnahmen durchgeführt, die den Embryo aus lateraler Sicht zeigen. Dabei wurde wiederum eine Linie vom anterioren Pol zum posterioren Pol des Embryos gezogen und die Gesamtlänge der anterioposterioren Achse gemessen. Anschließend wurde eine Verbindung im anterioren dorsalen Bereich des Streifens gezogen, indem eine lotrechte Linie von der anterioren Begrenzungen des Streifens in der dorsalen Peripherie des Embryos zu der anterioposterioren Achse gezogen wurde. Es wurde der Abstand zwischen diesem Schnittpunkt und dem posterioren Pol des Embryos gemessen. Dieser Wert entspricht der Lokalisation der anterioren Grenze des Streifens und wird in Prozent ausgedrückt (x% der Eilänge). Danach wurde entsprechend eine Verbindung im posterioren dorsalen Bereich des Streifens gezogen und der Abstand zum posterioren Pol des Embryos gemessen. Dieser Wert entspricht der Lokalisation der posterioren Grenze des Streifens (y% der Eilänge) (Abb. 3.6B).



## 4. Ergebnisse

Das Gen *homeobrain* (*hbn*) von *Drosophila melanogaster* kodiert für einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor und wird während der Embryonalentwicklung in spezifischen Domänen des Gehirns und des ventralen Nervensystems exprimiert.

Ziel dieser Arbeit war eine funktionelle Analyse von *hbn* während der Entwicklung des embryonalen Zentralnervensystems von *Drosophila*. Zunächst wurden umfangreiche Kolokalisationsstudien im Wildtyp durchgeführt und *hbn*-Mutanten phänotypisch untersucht. Weiterhin wurden die Entwicklungsprozesse, an denen *hbn* beteiligt ist, genauer analysiert.

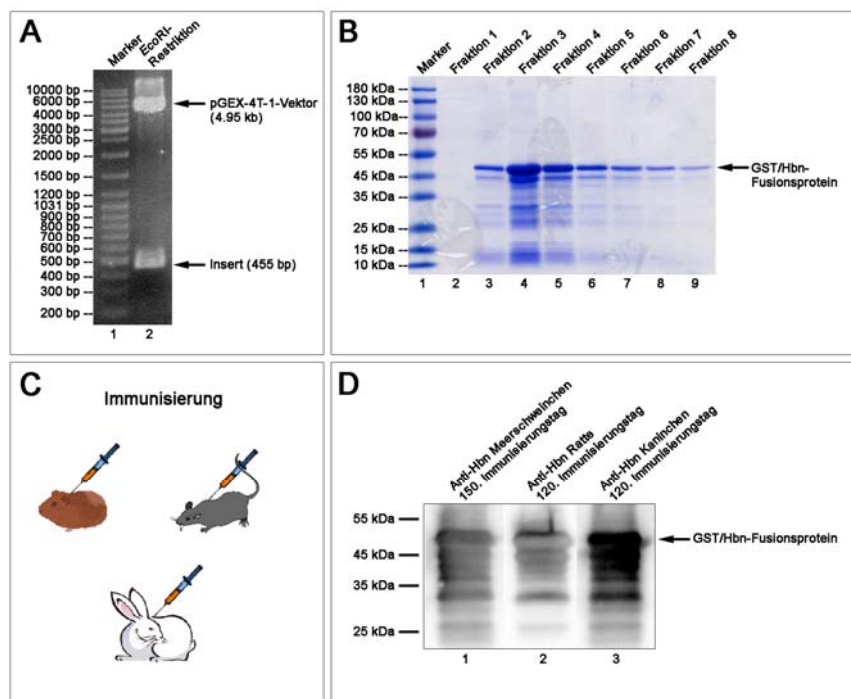
### 4.1 Erzeugung polyklonaler anti-Hbn-Antikörper

Das Expressionsmuster von *hbn* war bisher ausschließlich auf der Ebene der mRNA untersucht worden (Walldorf *et al.*, 2000). Die Proteinexpression kann sich jedoch aufgrund posttranskriptioneller Regulationen von der mRNA-Expression unterscheiden, so dass die *hbn*-Expression auch auf Proteinebene analysiert werden sollte. Um die räumliche und zeitliche Expression eines Gens auf Proteinebene untersuchen zu können, sind geeignete Antikörper notwendig. Mehrfachfärbungen in Kombination mit sogenannten Markern ermöglichen dann auch Kolokalisationsstudien. Als Marker werden spezifische Antikörper bezeichnet, die ein Antigen erkennen, dessen räumliche und zeitliche Expression genau bekannt ist. Damit solche Kolokalisationsstudien auch für das Hbn-Protein durchgeführt werden können, sollten zunächst polyklonale anti-Hbn-Antiseren in mehreren Spezies produziert werden.

Als Antigen für die Immunisierung wurde der N-terminale Bereich des Hbn-Proteins bis kurz vor die Homeodomäne gewählt. Der Bereich wird von den Basenpaaren 1 bis 455 ab dem Startkodon von *hbn* kodiert, umfasst die Aminosäuren 1 bis 151 und weist nur wenige Homologien zu anderen Proteinen auf, um eine Kreuzreaktivität mit anderen *Drosophila*-Proteinen zu vermeiden. Dieser Bereich sollte amplifiziert und im Leseraster in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Das resultierende Fusionsprotein sollte aufgereinigt und anschließend geeignete Spezies damit immunisiert werden.

Das benötigte 455 bp große Fragment wurde mit den Primern *hbn3* und *hbn3rev* aus einer *hbn*-cDNA amplifiziert und in den Vektor pCRII-TOPO kloniert. Die positiven Klone wurden sequenziert, um mögliche während der PCR aufgetretene Sequenzveränderungen auszuschließen, die zu einer Verschiebung des Leserasters oder zur Insertion eines Stopp-

Kodons führen könnten. Anschließend wurde das *hbn*-Fragment über die *EcoRI*-Schnittstellen aus dem pCRII-TOPO-Vektor in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 umklontiert (Abb. 4.1A). Klone mit der richtigen Orientierung des Inserts wurden durch Sequenzierung identifiziert. Mit Hilfe dieses pGEX-4T-1/*hbn*455bp-Konstruktes wurde ein Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt, das aus Glutathion-S-Transferase (28 kDa) und dem N-terminalen Bereich von Hbn (17 kDa) besteht. Das GST/Hbn-Fusionsprotein hat eine errechnete molekulare Masse von 45 kDa und lässt sich ab der zweiten Fraktion der gesammelten Proteinfractionen nachweisen. Die resultierende Bande liegt nicht genau bei 45 kDa, sondern erscheint etwas größer, was sich damit erklären lässt, dass Fusionsproteine aus GST und Homeodomänen-Proteinen bei der Auftrennung häufig ein etwas verändertes Laufverhalten zeigen (U. Walldorf, persönliche Mitteilung) (Abb. 4.1B).



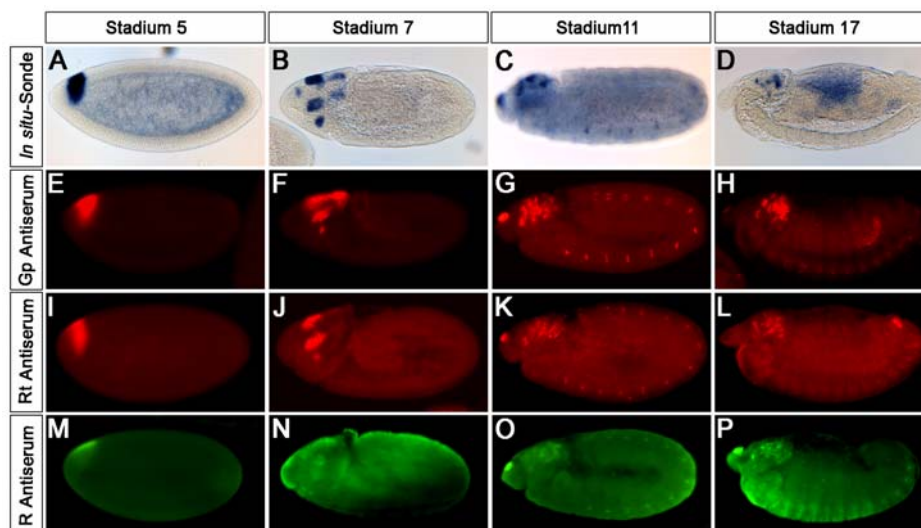
**Abb. 4.1: Erzeugung polyklonaler anti-Hbn-Antikörper in verschiedenen Spezies.** (A) Restriktion des pGEX-4T-1/*hbn*455bp-Konstruktes mit *EcoRI*. Spur1: GeneRuler™ DNA-Ladder Mix (Fermentas GmbH), Spur2: pGEX-4T-1/*hbn*455, geschnitten mit *EcoRI*. (B) Auftrennung der während der Aufreinigung des GST/Hbn-Fusionsproteins gesammelten Fraktionen in einem SDS-Polyacrylamidgel. Spur1: Protein-Molekulargewichtsmarker Roti®-Mark PRESTAINED (Roth), Spuren2-9: gesammelte Fraktionen 1-8. (C) Immunisierung eines Meerschweinchens, einer Ratte und eines Kaninchens mit dem erzeugten GST/Hbn-Fusionsprotein. (D) Western-Blot-Analyse des Meerschweinchens (150. Immunisierungstag, Spur1)-, des Ratten (120. Immunisierungstag, Spur2)- und des Kaninchens (150. Immunisierungstag, Spur3)-anti-GST/Hbn-Antiserums.

Mit dem erzeugten GST/Hbn-Fusionsprotein wurden von der Firma Pineda (Berlin) drei verschiedene Spezies (Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte) immunisiert (Abb. 4.1C). In regelmäßigen Abständen wurde den Tieren Blut entnommen und die gewonnenen Seren auf ihre Immunreaktivität getestet, indem sowohl Antikörperfärbungen an fixierten *Drosophila*-

Embryonen als auch Western-Blot-Analysen durchgeführt wurden. Die beste Immunreaktion zeigten das Kaninchen- und das Ratten-Antiserum des 120. Immunisierungstages und das Meerschweinchen-Antiserum des 150. Immunisierungstages (Abb. 4.1D, 4.2).

Die polyklonalen anti-Hbn-Antikörper hatten sich zwar bei Antikörperfärbungen mit fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern an Embryonen als immunreaktiv erwiesen, zeigten jedoch mit dieser Färbemethode nur eine sehr schwache Färbung. Aus diesem Grund wurden alle anti-Hbn-Färbungen mit dem Tyramide Signal Amplification (TSA)-System durchgeführt, wodurch eine Amplifikation des Fluoreszenzsignals erzielt wird.

Das mit Hilfe der anti-Hbn-Antikörper detektierte Expressionsmuster von Hbn auf Proteinebene sollte nun mit dem bereits bekannten Muster auf mRNA-Ebene (Walldorf *et al.*, 2000) verglichen werden. Die embryonale mRNA-Expression eines Gens kann über die Methode der „whole mount“ *In situ*-Hybridisierung mit einer DNA-Sonde dargestellt werden. Zur Herstellung einer *hbn*-Sonde wurde der kodierende Bereich von *hbn* mit den Primern *hbn1* und *hbn2* aus einer *hbn*-cDNA amplifiziert, DIG-markiert und mit dieser *hbn*-Sonde *Drosophila* Wildtyp-Embryonen verschiedener Stadien hybridisiert. Mit den präabsorbierten anti-Hbn-Antisera aller drei Spezies wurde eine Antikörperfärbung an Wildtyp-Embryonen durchgeführt und mit Hilfe des TSA-Systems verstärkt. In Abb. 4.2 ist der Vergleich der *In situ*-Hybridisierung mit den anti-Hbn-Färbungen in vier charakteristischen Stadien gezeigt.



**Abb. 4.2:** *In situ*-Hybridisierung mit einer *hbn*-Sonde im Vergleich zu Antikörperfärbungen mit in verschiedenen Spezies erzeugten polyklonalen anti-Hbn-Antikörpern an *Drosophila*-Embryonen der Stadien 5, 7, 11 und 17. Licht- (A-D) bzw. fluoreszenzmikroskopische (E-P) Aufnahmen, 100fache Vergrößerung. Embryonen aus lateraler Sicht mit anteriorem Pol links. (A-D) *In situ*-Hybridisierung mit einer *hbn*-Sonde an Wildtyp-Embryonen. (E-H) Fluoreszenz-Antikörperfärbung (TRITC) an Wildtyp-Embryonen mit anti-Hbn-Antikörpern aus Meerschweinchen (Gp). (I-L) Fluoreszenz-Antikörperfärbung (TRITC) an Wildtyp-Embryonen mit anti-Hbn-Antikörpern aus Ratte (Rt). (M-P) Fluoreszenz-Antikörperfärbung (FITC) an Wildtyp-Embryonen mit anti-Hbn-Antikörpern aus Kaninchen (R).

Die embryonalen Expressionsmuster, die über die anti-Hbn-Antikörperfärbung mit den verschiedenen Seren erzielt wurden (Abb. 4.2E-P), entsprechen in allen untersuchten Stadien weitgehend dem Expressionsmuster, das über die *In situ*-Hybridisierung mit einer *hbn*-Sonde sichtbar gemacht wurde (Abb. 4.2A-D). In den Färbungen mit den Seren aus allen drei Spezies lassen sich alle charakteristischen Expressionsmuster von Hbn identifizieren. Das typische Streifenmuster von Hbn im syncytialen Blastodermstadium (Abb. 4.2A, E, I, M) lässt sich ebenso wie die Aufspaltung der Expressionsdomänen im Stadium 7 (Abb. 4.2B, F, J, N) und die spezifische Expression im ventralen Nervensystem und im Gehirn während der späten Stadien der Embryonalentwicklung (Abb. 4.2C, D, G, H, K, L, O, P) nachweisen. Allerdings weisen die verschiedenen Seren Unterschiede in der Qualität der Färbung auf. Das Kaninchen-Antiserum zeigt neben der spezifischen Hbn-Färbung eine relativ starke unspezifische Hintergrundfärbung (Abb. 4.2M-P). Die Meerschweinchen- und Ratte-Antiseren detektieren dagegen das Hbn-Protein sehr spezifisch mit sehr geringer Hintergrundfärbung (Abb. 4.2E-L), wobei mit dem Meerschweinchen-Serum die bessere anti-Hbn-Färbung erzielt wird.

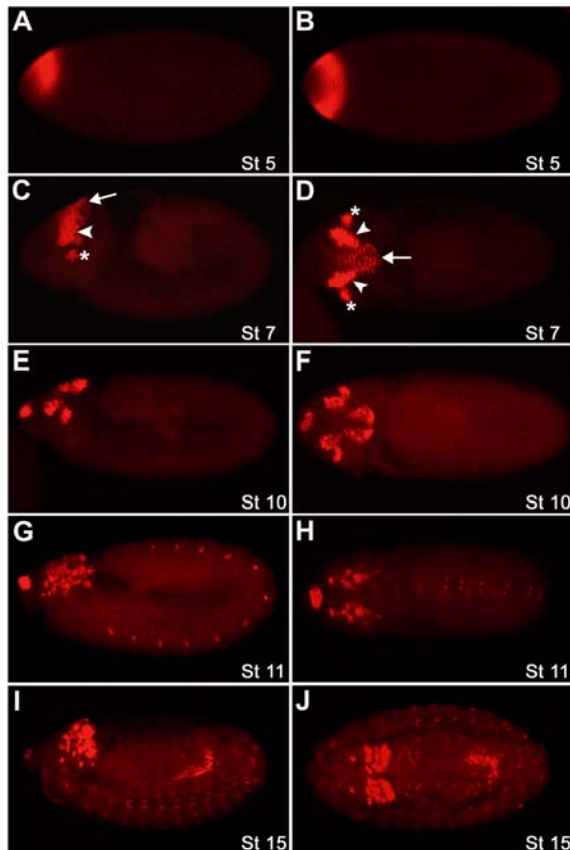
## 4.2 Embryonales und larvales Expressionsmuster von *hbn*

Mit den erzeugten anti-Hbn-Antikörpern standen nun geeignete Werkzeuge zur Verfügung, die Expression von *hbn* auf Proteinebene in verschiedenen Entwicklungsstadien genauer zu untersuchen. Eine Antikörperfärbung bietet eine bessere Auflösung als eine *In situ*-Hybridisierung, da Hbn als Transkriptionsfaktor ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist, während die Expression der mRNA im Cytoplasma der Zellen stattfindet. Auf diese Weise ist die Identifizierung einzelner Zellen bzw. Zellkerne einfacher.

### 4.2.1 Embryonales Expressionsmuster von *hbn*

Zunächst sollte die *hbn*-Expression in Wildtyp-Embryonen mit Hilfe des anti-Hbn-Antikörpers während der verschiedenen Embryonalstadien untersucht und kartiert werden (Abb. 4.3). Die Expression von *hbn* beginnt während des syncytialen Blastodermstadiums in einem charakteristischen hufeisenförmigen Streifen in der anterioren Region des Embryos (Abb. 4.3A, B). Zu Beginn der Gastrulation entsteht eine V-förmige dorsolaterale Expressionsdomäne (Abb. 4.3C, D, Pfeilköpfe). Die beiden Untereinheiten der V-Domäne sind durch eine schwächer gefärbte dorsale Mittelliniendomäne (Abb. 4.3C, D, Pfeile)

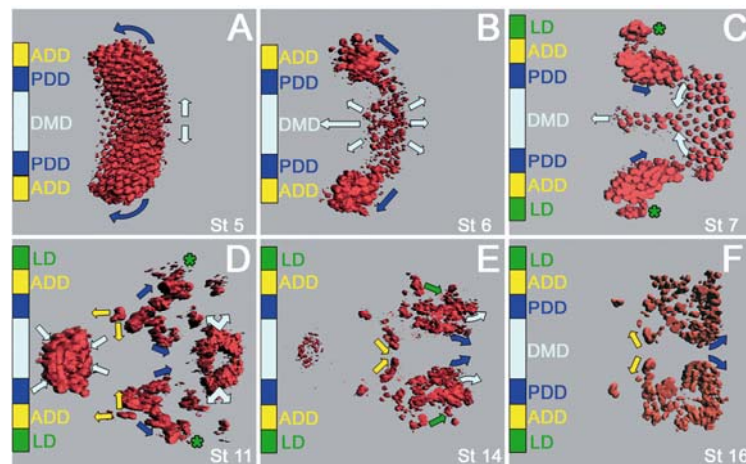
miteinander verbunden. Zusätzlich bildet sich eine mehr lateral gelegene Expressionsdomäne (Abb. 4.3C, D, Sterne). Während des Embryonalstadiums 10 teilen sich die Expressionsdomänen in kleinere Bereiche auf (Abb. 4.3E, F). Ab dem Embryonalstadium 11 lässt sich erstmals eine Expression von *hbn* in genau zwei Zellen pro Segment des ventralen Nervensystems nachweisen (Abb. 4.3G, H). Von Stadium 15 an bis zum Ende der Embryonalentwicklung wird *hbn* in großen Bereichen des embryonalen Gehirns exprimiert (Abb. 4.3I, J).



**Abb. 4.3: Expressionsmuster von Hbn während der Embryonalentwicklung von *Drosophila*.** Fluoreszenz-Antikörperfärbungen (TRITC) mit anti-Hbn-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen der Stadien 5, 7, 10, 11 und 15. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, 100fache Vergrößerung. (A, C, E, G, I) Laterale Sicht, anteriorer Pol links. (B, D, F, H, J) Dorsale Sicht, anteriorer Pol links. Die Pfeile in C und D bezeichnen die dorsale Mittelliniendomäne, Pfeilköpfe die dorso-laterale Domäne und Sterne die laterale Domäne. St: Embryonalstadium.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie das hochkomplexe Expressionsmuster von *hbn* zustande kommt. Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten: Zum einen können Positionsveränderungen Hbn-positiver Zellen eine Rolle spielen, die z.B. eine Folge morphologischer Veränderungen des Embryos während seiner Entwicklung sein können. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass die *hbn*-Expression in einzelnen Zellen an- und/oder ausgeschaltet wird und so die Dynamik des Expressionsmusters entsteht. Da das Expressionsmuster besonders in Bereichen, die während der späteren Entwicklung Domänen des Gehirns bilden, einem starken Wandel unterliegt, wurde das Augenmerk besonders auf diese anterioren Expressionsdomänen gelegt. Um die Entstehung der Expressionsdomänen auf Zellniveau genau verfolgen zu können, wurden mit einem konfokalen Mikroskop

Bildstapel von anti-Hbn gefärbten Wildtyp-Embryonen in verschiedenen Stadien aufgenommen. Aus diesen Bildstapeln lassen sich dann mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Imaris 3D-Modelle konstruieren (Abb. 4.4).



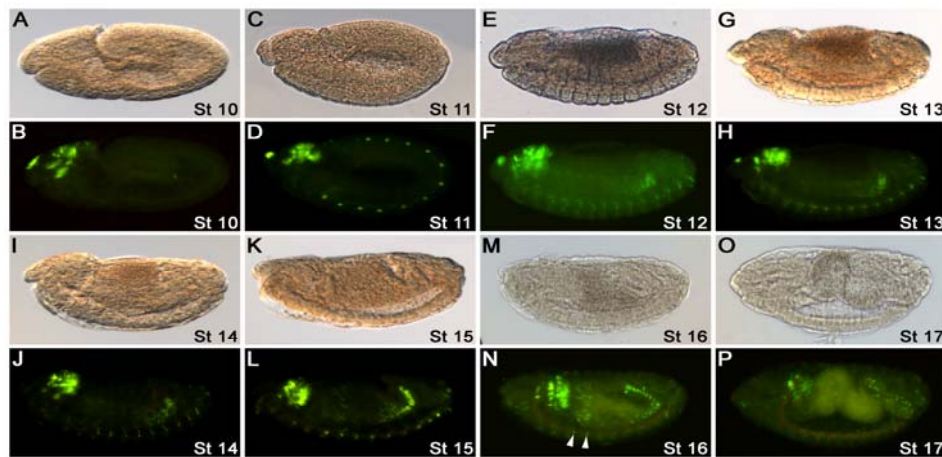
**Abb. 4.4: 3D-Modelling des *hbn*-Expressionsmusters in Wildtyp-Embryonen.** Embryonen unterschiedlicher Stadien wurden über eine Fluoreszenz-Antikörperfärbung mit anti-Hbn-Antikörpern gefärbt und die Expressionsmuster konfokal in 200facher Vergrößerung aufgenommen, wobei Bildstapel aus Einzelbildern erhalten wurden. Diese Bildstapel wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Imaris in 3D-Modelle umgewandelt. Gezeigt ist jeweils nur der anteriore Bereich der Embryonen in dorsaler Sicht, der anteriore Pol ist nach links orientiert. Die farbigen Balken bezeichnen die einzelnen Expressionsdomänen, die farbigen Pfeile die Bewegungsrichtung der jeweiligen Domäne während der Embryonalentwicklung. ADD: anteriore dorsolaterale Domäne, DMD: dorsale Mittelliniendomäne, LD: laterale Domäne, PDD: posteriore dorsolaterale Domäne, St: Embryonalstadium.

Eine genaue Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Expression mit Hilfe dieser 3D-Modelle ergab, dass die Hbn-Expressionsdomänen nicht einzeln zu einem bestimmten Zeitpunkt neu entstehen, sondern dass die Domänen weitgehend dynamisch auseinander hervorgehen. So kann bereits die früheste während der Entwicklung auftretende *hbn*-Expression, der hufeisenförmige Streifen im syncytialen Blastodermstadium, in einzelne Domänen aufgeteilt werden, die aus diesem Streifen im Zuge der weiteren Entwicklung entstehen werden (Abb. 4.4A). Die Zellen, die im dorsalen Bereich des Streifens liegen, bilden in späteren Embryonalstadien eine Domäne, die ihrer Lokalisation entsprechend als „dorsale Mittelliniendomäne“ (DMD) benannt wurde. Diese Zellen bewegen sich sowohl in laterale (Abb. 4.4A, hellblaue Pfeile) als auch in anteriore und posteriore Richtungen (Abb. 4.4B, hellblaue Pfeile). Die Zellen, die am weitesten anterior liegen, bewegen sich dabei in den vorderen Bereich des Embryos bis in die Zone hinein, aus der sich später das Clypeolabrum bilden wird (Abb. 4.4C, hellblaue Pfeile) und sammeln sich dort an (Abb. 4.4D, hellblaue Pfeile). Dabei kann ab dem Stadium 11 eine Zunahme von Hbn-positiven Zellen beobachtet werden, was durch eine gesteigerte Proliferation Hbn-positiver Zellen in diesem Bereich oder aber auch durch Neusynthese von Hbn bedingt sein könnte. Ab dem

Stadium 14 nimmt die *hbn*-Expression in der clypeolabralen Zone wieder ab, bis sie in späteren Stadien ganz verschwunden ist. Weitere Domänen, die sich aus dem frühen *hbn*-Streifen entwickeln, sind die PDD, die sogenannten „posterioren dorsolateralen Domänen“. Diese Domänen gehen aus den an die zukünftige DMD angrenzenden Bereichen des frühen Streifens hervor (Abb. 4.4A). Die Hbn-positiven Zellen aus diesen Bereichen verdichten sich zunächst (Abb. 4.4A, B, dunkelblaue Pfeile) und bewegen sich ab dem Embryonalstadium 7 in posteriore Richtung (Abb. 4.4C-F, dunkelblaue Pfeile). Die lateralsten Zellen des frühen Blastodermstreifens werden zu Domänen, die als ADD – „anteriore dorsolaterale Domänen“ – bezeichnet werden. Die ADD bilden im Embryonalstadium 7 zusammen mit den PDD die bereits oben erwähnte V-förmige dorsolaterale Domäne (Abb. 4.4C). Einige dieser Zellen bewegen sich im Embryonalstadium 11 in anteriore Richtung, während die verbleibenden Zellen in Richtung der Mittellinie wandern (Abb. 4.4D, E, gelbe Pfeile). Im Stadium 16 kehrt sich die Wanderungsrichtung dieser Zellen um, und sie bewegen sich in lateraler Richtung von der Mittellinie weg (Abb. 4.4F, gelbe Pfeile). Die „lateralen Domänen“ LD sind Domänen, die im Gegensatz zu den anderen Hbn-Expressionsdomänen nicht aus dem frühen Blastodermstreifen hervorgehen. Sie entstehen in den Embryonalstadien 6 und 7 neu (Abb. 4.4C, grüne Sterne). Die Zellen dieser Domänen bewegen sich in späteren Stadien in posteriore Richtung (Abb. 4.4E, grüne Pfeile) und bilden später laterale Bereiche der Gehirnhemisphären.

Anschließend sollte die *hbn*-Expression im ventralen Nervensystem näher betrachtet werden. Dazu wurden Wildtyp-Embryonen aller Stadien mit anti-Hbn-Antikörpern gefärbt und die einzelnen Stadien ausgewertet (Abb. 4.5).

Im Stadium 10 lässt sich noch keine *hbn*-Expression im ventralen Nervensystem nachweisen (Abb. 4.5A, B). Die Expression in Zellen des ventralen Nervenstrangs beginnt im Stadium 11 (Abb. 4.5C, D). *Hbn* wird nur in wenigen Zellen des ventralen Nervensystems exprimiert. Die Expression wird während der Embryonalstadien 11 bis 15 aufrechterhalten (Abb. 4.5E-L) und geht im Embryonalstadium 16 langsam Zelle für Zelle zurück, bis nur noch in wenigen Zellen Hbn nachweisbar ist (Abb. 4.5M, N, Pfeilköpfe). Im letzten Stadium der Embryonalentwicklung, in Stadium 17, ist überhaupt keine *hbn*-Expression im ventralen Nervensystem mehr vorhanden (Abb. 4.5O, P).



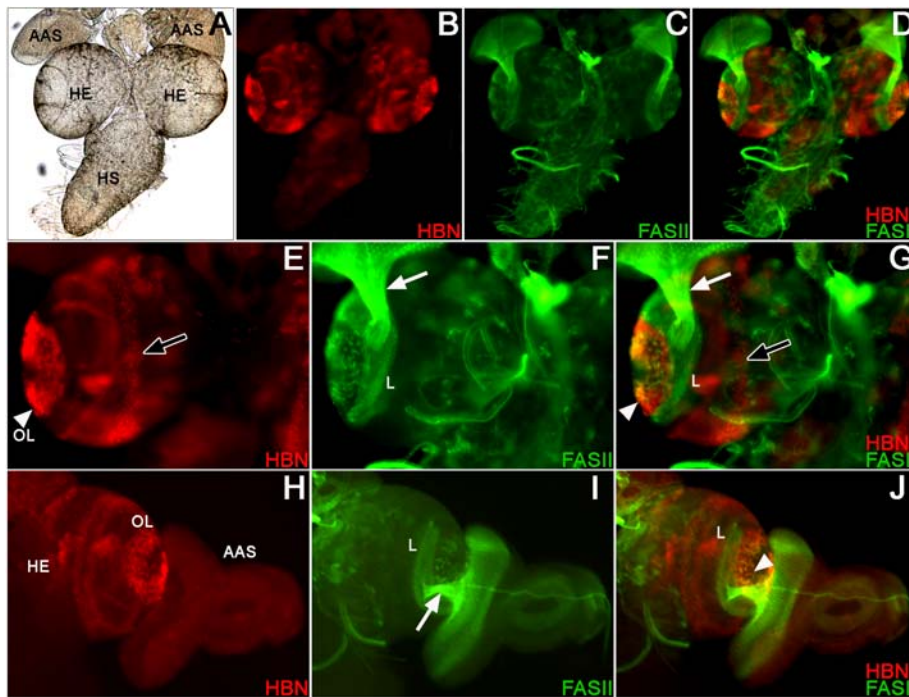
**Abb. 4.5: *Hbn*-Expression im ventralen Nervensystem von *Drosophila*-Embryonen.** Fluoreszenz-Antikörperfärbung (FITC) mit anti-Hbn-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen der Stadien 10 bis 17. Licht- (A, C, E, G, I, K, M, O) bzw. fluoreszenzmikroskopische (B, D, F, H, J, L, N, P) Aufnahmen in 100facher Vergrößerung. Alle Ansichten sind von lateral mit anteriorem Pol links. Die Pfeilköpfe in N bezeichnen einzelne Hbn-positive Zellen. St: Embryonalstadium.

#### 4.2.2 Larvales Expressionsmuster von *hbn*

Nachdem die Expressionsdomänen von *hbn* im ventralen Nervensystem und im Gehirn während der Embryonalstadien von *Drosophila* näher bestimmt worden waren, sollte die *hbn*-Expression mit Hilfe der erzeugten anti-Hbn-Antikörper auch im Larvalstadium untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Imaginalscheiben und das Gehirn aus Wildtyp-Larven des dritten Larvalstadiums herauspräpariert und eine anti-Hbn-Antikörperfärbung durchgeführt. Die Imaginalscheiben der Larve sind kleine Scheiben aus Epithelzellen und umfassen Flügelscheiben, Beinscheiben, Augenantennenscheiben, Genitalscheiben und Scheiben für die Mundwerkzeuge, die während der Metamorphose die jeweilige Körperanhänge der adulten Fliege ausbilden. In keiner dieser Strukturen konnte *hbn*-Expression nachgewiesen werden. Das larvale Gehirn zeigt hingegen mehrere Hbn-positive Domänen. Um diese Domänen näher bestimmen zu können, wurden die larvalen Gehirne in einer Doppelfärbung zusätzlich zum anti-Hbn-Antikörper mit einem anti-FasciclinII (FasII)-Antikörper gefärbt. FasII ist ein für bestimmte Neurone und Axone spezifisches Transmembranprotein (Grenningloh *et al.*, 1991). Das Ergebnis dieser Doppelfärbung ist in Abb. 4.6 gezeigt.





**Abb. 4.6: Expression von *hbn* und *FasII* im larvalen Gehirn von *Drosophila*.** Anti-Hbn- und anti-FasII-Doppelfärbungen an Gehirnen des dritten Larvalstadiums. (A-D) 100fache Vergrößerung, (E-J) 200fache Vergrößerung. (A) Larvales Gehirn des dritten Larvalstadiums im Durchlicht. (B) Larvales Gehirn aus A, aufgenommen im TRITC-Filter (568 nm). (C) Larvales Gehirn aus A, aufgenommen im FITC-Filter (488 nm). (D) Übereinanderlagerung von B und C. (E) Linke Hemisphäre des larvalen Gehirns aus A, aufgenommen im TRITC-Filter. Der Pfeilkopf deutet auf den optischen Lobus, der weiß umrandete Pfeil auf die mediale *hbn*-exprimierende Domäne. (F) Linke Hemisphäre des larvalen Gehirns aus A, aufgenommen im FITC-Filter. Der Pfeil deutet auf FasII-positive Axone, die aus dem optischen Lobus in die Augenscheibe projizieren (optischer Stiel). (G) Übereinanderlagerung von E und F. (H) Rechte Hemisphäre eines larvalen Gehirns mit anhängender Augenantennenscheibe, aufgenommen im TRITC-Filter. (I) Larvales Gehirn aus H, aufgenommen im FITC-Filter. Der Pfeil deutet auf FasII-positive Axone, die aus dem optischen Lobus in die Augenscheibe projizieren. (J) Übereinanderlagerung von H und I. Der Pfeilkopf deutet auf den optischen Lobus. AAS: Augenantennenscheibe, HE: Hemisphäre, HS: Hirnstamm, L: Lamina, OL: optischer Lobus.

Das larvale Gehirn des dritten Larvenstadiums besteht aus den beiden kugelförmigen Hemisphären mit den anhängenden Augen-Antennenscheiben und dem Hirnstamm (Abb. 4.6A). Eine Expression von *hbn* findet man ausschließlich in den Hemisphären (Abb. 4.6B, E, H). *FasII* wird in den Photorezeptor-Axonon exprimiert, die aus der Augenscheibe über den optischen Stiel in das larvale Gehirn projizieren (Abb. 4.6C, F, I, Pfeile). Die halbmondförmige Region der Hemisphäre, die von diesen Photorezeptor-Axon-Projektionen umspannt wird, grenzt den Bereich der sich entwickelnden Lamina ab (Abb. 4.6C, F, I) (Selleck und Steller, 1991). In diesem Bereich wurde keine *hbn*-Expression nachgewiesen (Abb. 4.6D, G, J). Die stärkste *hbn*-exprimierende Domäne findet man im inneren Proliferationszentrum der optischen Loben (Abb. 4.6D, G, J, Pfeilköpfe). In einigen Neuronen innerhalb dieser Strukturen wird auch *FasII* exprimiert (Abb. 4.6F, I), und es zeigte sich, dass Hbn und FasII in diesen Neuronen kolokalisiert sind (Abb. 4.6G, J, Pfeilköpfe). Eine zusätzliche, schwächere *hbn*-Expressionsdomäne erstreckt sich ringförmig über den medialen

Bereich der Hemisphären. Diese Domäne ist nicht mit *FasII*-Expression kolokalisiert (Abb. 4.6E, G, weiß umrandete Pfeile) und konnte bisher nicht näher zugeordnet werden.

### 4.3 Feinkartierung der embryonalen *hbn*-Expression

Mit den in unterschiedlichen Spezies erzeugten anti-Hbn-Antikörpern ist es möglich, die *hbn*-Expression in Kombination mit Antikörpern gegen andere *Drosophila*-Proteine zu untersuchen. Auf diese Weise lässt sich die *hbn*-Expression bis hin auf Zellniveau bestimmen, wenn Kolokalisation mit anderen Genprodukten, deren Lokalisation bekannt ist, nachgewiesen werden kann.

#### 4.3.1 Expression von *hbn* im ventralen Nervensystem

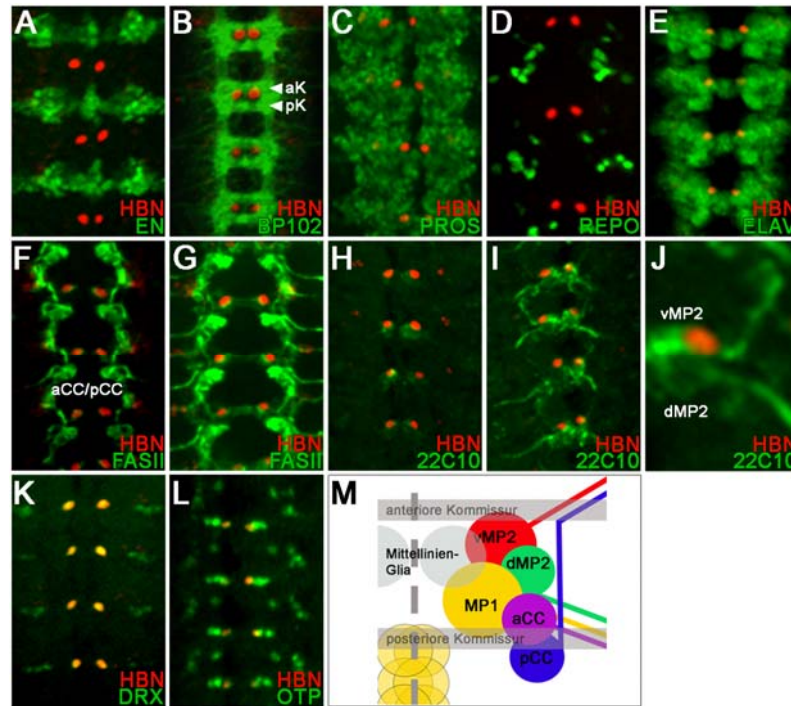
Zunächst sollte die *hbn*-Expression im ventralen Nervensystem mit Hilfe geeigneter Marker näher bestimmt werden. Dazu wurden Doppelfärbungen mit anti-Hbn-Antikörpern zusammen mit Antikörpern gegen Proteine, die spezifisch im Nervensystem exprimiert werden, durchgeführt (Abb. 4.7).

Das Segmentpolaritätsgen *engrailed* (*en*) ist ein Marker für die posterioren Segmentgrenzen des sich entwickelnden *Drosophila*-Embryos. Diese Segmentgrenzen stellen gleichzeitig die Grenzen der einzelnen Neuromere dar, aus denen das Nervensystem aufgebaut ist (Hirth *et al.*, 2003). Im Vergleich zur *en*-Expression kann zum Beispiel bestimmt werden, in welchem Neuromerbereich sich die Expressionsdomänen anderer Genprodukte befinden. Aus Abb. 4.7A wird ersichtlich, dass pro Neuomer genau zwei Zellen Hbn-positiv sind, die sich etwa in der Mitte des Segments zu beiden Seiten der Mittellinie befinden.

Während der embryonalen Entwicklung des ventralen Nervensystems werden in jedem Neuomer zwei Kommissuren gebildet, und zwar eine anteriore und eine posteriore Kommissur (Abb. 4.7M). Diese Kommissuren bestehen aus einzelnen Axonen, die mit dem Marker BP102 (Seeger *et al.*, 1993) dargestellt werden können. Doppelfärbungen mit anti-BP102- und anti-Hbn-Antikörpern zeigten, dass sich die Hbn-positiven Zellen genau zwischen der anterioren und der posterioren Kommissur befinden (Abb. 4.7B).

Ein Marker, der in großen Bereichen des Nervensystems exprimiert wird, ist *prospero* (*pros*). Das Pros-Protein wird in allen Neuroblasten kurz vor der Mitose produziert und ist in diesen Zellen asymmetrisch am basalen Pol lokalisiert. Die Neuroblasten teilen sich jeweils in einen neuen Neuroblasten und in eine Gangliennutterzelle, wobei Pros in den Kern der

Ganglienkörpermutterzelle wandert. Jede Ganglienkörpermutterzelle teilt sich und bringt zwei Neurone bzw. zwei Gliazellen hervor. In den neu entstandenen Neuronen wird *pros* nur noch transient exprimiert, während das Protein in Glioblasten und in etwa sechs longitudinalen Gliazellen pro Hemisegment weiterhin nachgewiesen werden kann (Doe *et al.*, 1991).



**Abb. 4.7: Hbn-Expression im ventralen Nervensystem von *Drosophila*-Embryonen in Kombination mit verschiedenen Nervensystemmarkern.** Doppel-Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombinationen sind farblich entsprechend angegeben. Alle Ansichten sind von ventral mit anteriorem Pol oben. (A, H) Embryonalstadium 11. (D-F, K, L) Embryonalstadium 12. (C, G, I) Embryonalstadium 13. (B) Embryonalstadium 16. (J) Vergrößerung eines Teilbereichs aus I. (M) Schematische Darstellung der Lokalisation der Pionierneurone mit ihren axonalen Projektionen im ventralen Nervensystem ([www.flymove.uni-muenster.de](http://www.flymove.uni-muenster.de), verändert). aCC: anterior Corner Cell, aK: anteriore Kommissur, dMP2: dorsal Midline Precursor Neuron 2, MP1: Midline Precursor Neuron 1, pCC: posterior Corner Cell, pK: posteriore Kommissur, vMP2: ventral Midline Precursor Neuron 2.

Eine Doppelfärbung mit anti-Pros- und anti-Hbn-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen zeigte in keinem Stadium eine Kolo-kalisation der beiden Proteine im ventralen Nervensystem (Abb. 4.7C). Das bedeutet, dass *hbn* weder in Neuroblasten noch in Ganglienkörpermutterzellen, Glioblasten oder longitudinalen Gliazellen des ventralen Nervenstrangs exprimiert wird.

Das Gen *reversed polarity (repo)* wird in allen embryonalen Gliazellen exprimiert (Campbell *et al.*, 1994), so dass diese mit einer anti-Repo-Antikörperfärbung detektiert werden können. Über Färbungen mit anti-Hbn-Antikörpern in Kombination mit anti-Repo-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen wurde nachgewiesen, dass es sich bei den Hbn-positiven Zellen nicht um Gliazellen handelt (Abb. 4.7D).

Elav (Embryonic lethal, abnormal vision) ist ein panneuraler Marker, der spezifisch für postmitotische Neurone ist (Campos *et al.*, 1987). Doppelfärbungen mit anti-Hbn- und anti-

Elav-Antikörpern zeigten eine Koexpression von Elav und Hbn in allen Hbn-positiven Zellen des ventralen Nervenstrangs (Abb. 4.7E). Dies ist ein Nachweis, dass es sich bei den Hbn-positiven Zellen des ventralen Nervensystems ausnahmslos um Neurone handelt.

Die Neurone des ventralen Nervensystems sind bereits in mehreren Arbeiten detailliert beschrieben worden (Klämbt *et al.*, 1991; Nassif *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 1999), so dass mit Hilfe dieser Informationen bestimmt werden sollte, um welchen Typ von Neuronen es sich bei den *hbn*-exprimierenden Neuronen handelt.

Die ersten Neurone des ventralen Nervensystems exprimieren ab dem Embryonalstadium 11 *FasciclinII* (*FasII*). *FasII* ist ein Transmembranprotein, das auf der Oberfläche bestimmter Neurone und ihrer Axone nachgewiesen werden kann (Grenningloh *et al.*, 1991). Die ersten *FasII*-positiven Neurone sind die „anterior Corner Cell“ (aCC), die „posterior Corner Cell“ (pCC) und „friend of posterior Corner Cell“ (fpCC) (Nassif *et al.*, 1998) (Abb. 4.7M). Während des Embryonalstadiums 12 kommt es zu einer zusätzlichen *FasII*-Expression in den „Midline Precursor Neurons“ MP1 und MP2 (Nassif *et al.*, 1998). Mit Hilfe von Doppelfärbungen mit anti-Hbn- und anti-*FasII*-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen der Stadien 12 und 13 konnte gezeigt werden, dass *hbn* nicht in den Neuronen aCC, pCC oder fpCC und auch nicht in den MP1-Neuronen exprimiert wird. Die Färbung gab stattdessen erste Hinweise darauf, dass es sich bei den Hbn-positiven Zellen des ventralen Nervensystems um MP2-Neurone handelt (Abb. 4.7F, G).

Ein spezifischer Marker, um MP2-Neurone zu detektieren, ist mAB 22C10. Dieser Antikörper erkennt das cytoskeletale Protein Futsch, ein MAP1B-ähnliches Protein, das für die Entwicklung von Dendriten und Axonen erforderlich ist (Zipursky *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 2000). Eine Färbung mit diesem Antikörper in Kombination mit anti-Hbn-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen des Stadiums 11 ergab, dass *hbn* tatsächlich in den MP2-Neuronen exprimiert wird (Abb. 4.7H).

Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung teilen sich die MP2-Neurone asymmetrisch und bringen ein größeres dMP2- („dorsal Midline Precursor“) und ein kleineres vMP2- („ventral Midline Precursor“) Interneuron hervor. Im Embryonalstadium 13 lassen sich diese beiden Neurone anhand ihrer axonalen Projektionen unterscheiden: Die vMP2-Neurone projizieren nach anterior und bilden das vMP2/pCC-Faszikel, während die dMP2-Neurone ihre Axone in posteriore Richtung aussenden und das dMP2/MP1-Faszikel bilden (Lin *et al.*, 1994) (Abb. 4.7M). Mit Hilfe dieser Unterscheidungskriterien wurden die anti-22C10- anti-Hbn-Doppelfärbungen weiter ausgewertet, und die *hbn*-Expression konnte auf diese Weise dem kleineren vMP2-Neuron zugeordnet werden (Abb. 4.7I, J).

Auch die beiden Homeoboxgene *Drosophila retinal homeobox (drx)* und *orthopedia (otp)*, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu *hbn* in der 57B Region lokalisiert sind, werden in Zellen des ventralen Nervensystems exprimiert (Simeone *et al.*, 1994; Eggert *et al.*, 1998), die bisher aber noch nicht näher bestimmt wurden. Über Doppelfärbungen sollte untersucht werden, ob diese Gene in den Hbn-positiven Zellen exprimiert werden, da ihre Expressionmuster im ventralen Nervensystem dem Muster von *hbn* sehr ähneln.

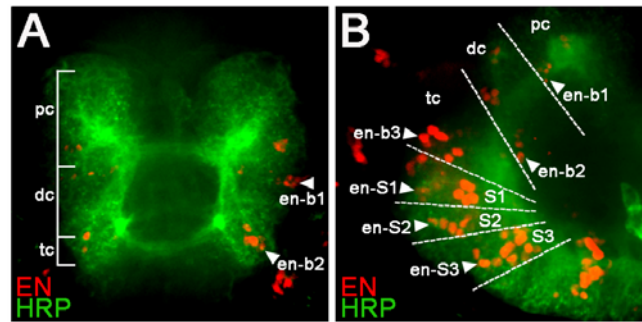
Doppelfärbungen mit anti-Drx- und anti-Hbn-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen zeigten tatsächlich eine Kolokalisation der beiden Genprodukte in den vMP2-Neuronen. Zusätzlich wird *drx* in weiter lateral gelegenen Zellclustern exprimiert, die jedoch Hbn-negativ sind (Abb. 4.7K). Auch Antikörperfärbungen mit anti-Otp-Antikörpern in Kombination mit anti-Hbn-Antikörpern zeigten zusätzlich zu einer *otp*-Expression in bisher nicht identifizierten lateralen Zellclustern eine Koexpression der beiden Gene in den vMP2-Neuronen (Abb. 4.7L).

#### 4.3.2 Expression von *hbn* im embryonalen Gehirn

Ähnlich wie bei der Feinkartierung der *hbn*-Expression im ventralen Nervensystem sollte nun eine genauere Bestimmung der Expression im embryonalen Gehirn erfolgen. Da *hbn* hier aber nicht nur in einzelnen Zellen, sondern in großen Domänen exprimiert wird, gestaltete sich die Feinkartierung ungleich aufwändiger.

Die Unterteilung des embryonalen Gehirns und des Nervensystems lässt sich mit den Markern anti-Meerrettichperoxidase (Hrp) und anti-En sichtbar machen (Abb. 4.8). Anti-Hrp ist ein Antikörper, der ein für Insektenneurone spezifisches Glykoprotein erkennt, so dass die Zellkörper der zentralen und des peripheren Nervensystems dargestellt werden können (Jan und Jan, 1982). Mit Hilfe des anti-En-Antikörpers lassen sich, wie bereits beschrieben, die posterioren Neuromergrenzen des Nervensystems darstellen (Hirth *et al.*, 2003).

Das embryonale Gehirn von *Drosophila* wird in das supraoesophagale Ganglion (Oberschlundganglion) und das suboesophagale Ganglion (Unterschlundganglion) unterteilt. Das supraoesophagale Ganglion setzt sich aus dem Protocerebrum (pc bzw. b1), dem Deutocerebrum (dc bzw. b2) und dem Tritocerebrum (tc bzw. b3) zusammen, während das suboesophagale Ganglion aus dem mandibulären Neuomer (S1), dem maxillären Neuomer (S2) und dem labialen Neuomer (S3) besteht (Hartmann und Reichert, 1998; Hirth *et al.*, 2003) (Abb. 4.8A, B).

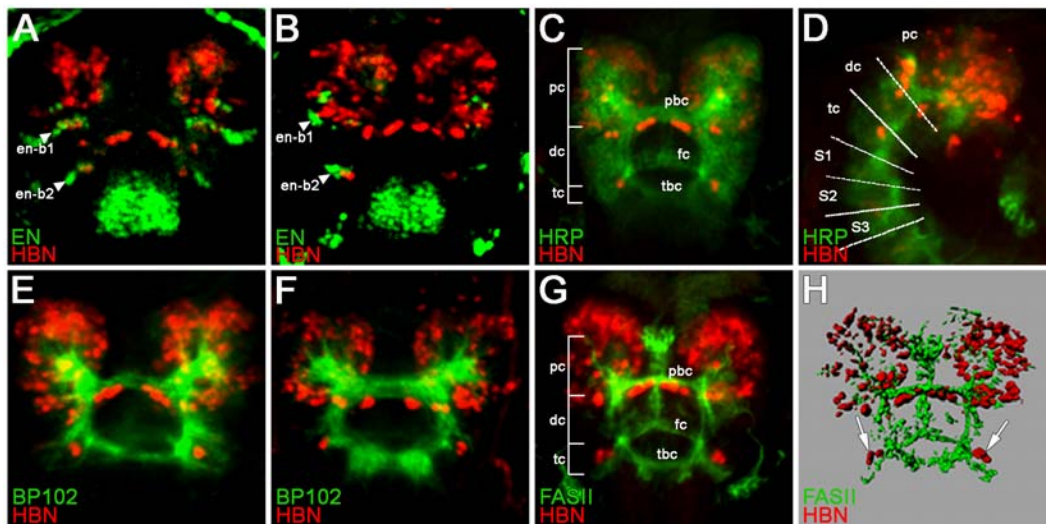


**Abb. 4.8:** Darstellung der Unterteilung des embryonalen Gehirns von *Drosophila* in einzelne Neuomere mit Hilfe der Marker En und Hrp. Doppel-Antikörperfärbungen von Wildtyp-Embryonen des Stadiums 13/14, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombination ist farblich entsprechend angegeben. (A) zeigt das embryonale Gehirn von dorsal mit anteriorem Pol unten, (B) zeigt das Gehirn von lateral mit anteriorem Pol links. Die Pfeilköpfe und die gestrichelten Linien markieren die durch *en*-Expression festgelegten Neuomergrenzen. pc bzw. b1: Protocerebrum, dc bzw. b2: Deutocerebrum, tc bzw. b3: Tritocerebrum, S1: mandibulares Neuomer, S2: maxillares Neuomer, S3: labiales Neuomer.

Der erste Schritt zur Kartierung der *hbn*-Expression im embryonalen Gehirn sollte die Lokalisierung der Expression im Vergleich zu den beiden Gehirnmarkern En und Hrp sein (Abb. 4.9). Die Doppelfärbung mit anti-En- und anti-Hbn-Antikörpern zeigte, dass es im embryonalen Gehirn keine Kolo-kalisation dieser beiden Proteine gibt (Abb. 4.9A). Mit Hilfe dieser Färbung lässt sich die *hbn*-Expression jedoch bereits grob den einzelnen Gehirnneuomeren zuordnen: Die größte *hbn*-Expressionsdomäne findet sich im Protocerebrum, und auch im Deutocerebrum wird *hbn* in einigen Zellen exprimiert. Im Tritocerebrum finden sich hingegen nur ganz vereinzelt Hbn-positive Zellen (Abb. 4.9B).

Ein genaueres Bild zeigt die Doppelfärbung mit anti-Hrp- und anti-Hbn-Antikörpern. Aus Abb. 4.9C und D wird ersichtlich, dass *hbn*-exprimierende Zellen einen sehr großen Bereich der beiden protocerebralen Hirnhemisphären ausmachen. Ein weiterer Cluster Hbn-positiver Zellen befindet sich unterhalb der präoralen Gehirnkommis-sur, einer wichtigen Struktur, welche die beiden Gehirnhälften miteinander verbindet. Die präorale Gehirnkommis-sur stellt nicht die einzige Verbindung zwischen den Gehirnhemisphären dar. Weitere Verbindungen sind die Frontalkommis-sur und die tritocerebrale Gehirnkommis-sur, in deren unmittelbaren Nähe sich jedoch im Unterschied zur präoralen Kommis-sur keine Hbn-positiven Zellen finden (Abb. 4.9C). Einzelne *hbn*-exprimierende Zellen können auch im Bereich der deuto/tritocerebralen Grenze nachgewiesen werden.

Die Lokalisation der Hbn-positiven Domänen wurde in Kombination mit den spezifischen Gehirnmarkern BP102 bzw. FasII näher untersucht. Wie bereits beschrieben, lassen sich mit anti-BP102 alle Axone darstellen (Seeger *et al.* 1993). Das Transmembranprotein FasII lässt sich dagegen nur auf der Oberfläche bestimmter Neurone und Axone nachweisen (Grenningloh *et al.*, 1991).



**Abb. 4.9: Expression von *hbn* im embryonalen Gehirn im Vergleich zu den Markern *En*, *Hrp*, *BP102* und *FasII*.** Doppel-Antikörperfärbungen von Wildtyp-Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombinationen sind farblich entsprechend angegeben. (A-C, E-H) Dorsale Sicht, anteriorer Pol unten. (D) Laterale Sicht, anteriorer Pol links. (A) Embryonalstadium 14. (B-D) Embryonalstadium 15. (E, G) Embryonalstadium 16. (F) Embryonalstadium 15. (H) 3D-Modell der in G gezeigten Immunfluoreszenz. Der dieser Abbildung zugrunde liegende Bildstapel wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm Imaris in ein 3D-Modell umgewandelt. Pfeilköpfe in A und B kennzeichnen die durch *en*-Expression festgelegten Neuromergrenzen, die gestrichelten Linien in D kennzeichnen die Neuromergrenzen, Pfeile in H deuten auf *Hbn*-positive Zellen im Übergangsbereich zwischen Deuto- und Tritocerebrum. pc bzw. b1: Protocerebrum, dc bzw. b2: Deutocerebrum, tc bzw. b3: Tritocerebrum, fc: Frontalkommissur, pbc: präorale Gehirnkommisur, tbc: tritocerebrale Gehirnkommisur, S1: mandibuläres Neuromer, S2: maxilläres Neuromer, S3: labiales Neuromer.

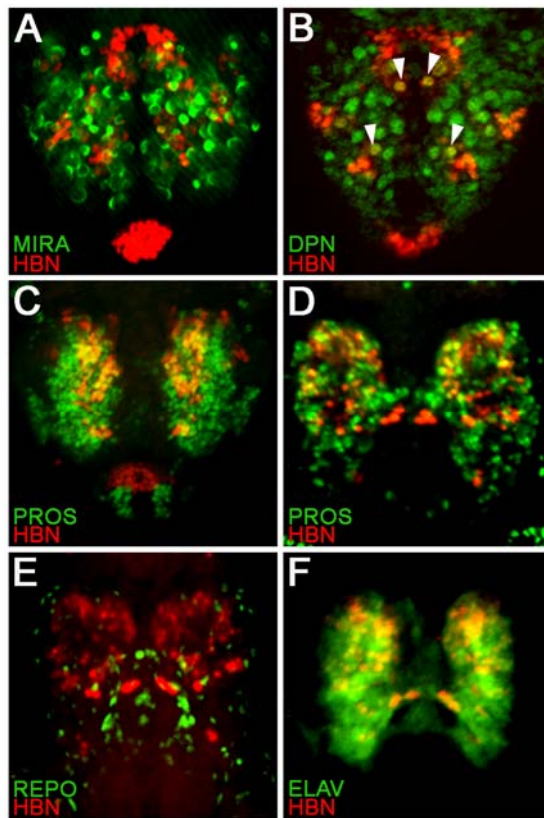
Die Doppelfärbung mit anti-*Hbn*- und anti-*BP102*-Antikörpern bestätigte, dass *hbn* in großen Domänen des Protocerebrums exprimiert wird. Im Bereich der präoralen Gehirnkommisur sind Zellcluster von jeweils drei bis vier Zellen *Hbn*-positiv (Abb. 4.9E, F).

Auch die Antikörperfärbungen mit anti-*Hbn*- und anti-*FasII*-Antikörpern zeigten, dass die größten *hbn*-exprimierenden Domänen im Protocerebrum zu finden sind. Im Grenzbereich zwischen dem Proto- und dem Deutocerebrum wird *hbn* in relativ wenigen Zellen exprimiert (Abb. 4.9G). Um die Expressionsbereiche von *hbn* genauer darstellen und beurteilen zu können, wurden die konfokalen Bildstapel, die von den anti-*Hbn*- und anti-*FasII*-gefärbten Embryonen aufgenommen worden waren, mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Imaris in 3D-Modelle umgewandelt. Aus diesen Modellen wurde ersichtlich, dass die *Hbn*-positiven Zellcluster, die im Bereich der präoralen Gehirnkommisur nachgewiesen werden können, eng mit dieser assoziiert sind und dicht unterhalb der Kommisur liegen. Außerdem konnte mit Hilfe der 3D-Modelle bestimmt werden, dass in genau drei Zellen im Übergangsbereich zwischen Deuto- und Tritocerebrum *hbn*-Expression stattfindet (Abb. 4.9H, Pfeile).

Im nächsten Schritt sollte die Frage geklärt werden, in welchen neuronalen Zelltypen *hbn* im Gehirn exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde die *hbn*-Expression in Kombination mit Neuroblasten-, Neuronen- und Gliamarkern untersucht.

Neuroblasten teilen sich asymmetrisch in eine Ganglienmutterzelle und einen weiteren Neuroblasten. Die Ganglienmutterzelle macht weitere Teilungen durch und bringt je nach Abstammungslinie Neurone und/oder Gliazellen hervor (Bernardoni *et al.*, 1999). Ein Marker, mit dem nahezu sämtliche Neuroblasten des *Drosophila*-Embryos detektiert werden können, ist Miranda (Mira). Die Expression von *mira* beginnt im Embryonalstadium 8 und findet asymmetrisch in delaminierenden Neuroblasten statt (Shen *et al.*, 1997). Mira wird nach der Teilung der Neuroblasten degradiert. Um zu untersuchen, ob es sich bei den Hbn-positiven Zellen um Mira-positive Neuroblasten handelt, wurden Wildtyp-Embryonen mit anti-Hbn- und anti-Mira-Antikörpern gefärbt. Konfokale Aufnahmen dieser Embryonen zeigten nur in sehr wenigen Neuroblasten eine mögliche Kolokalisation dieser beiden Proteine (Abb. 4.10A). Die Kolokalisationen ließen sich mit dieser Antikörperkombination nicht zweifelsfrei bestimmen, da *mira* asymmetrisch im Cytoplasma und *hbn* im Zellkern exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Doppelfärbung mit anti-Hbn- und anti-Dpn-Antikörpern durchgeführt. Deadpan (Dpn) ist ein nukleäres Protein, das in allen Neuroblasten exprimiert wird und sehr schnell nach der Teilung der Neuroblasten degradiert (Bier *et al.*, 1992). Mit Hilfe dieser Färbung konnte eine Kolokalisation von Hbn und Dpn in vier Neuroblasten bestätigt werden. Diese Neuroblasten befinden sich in der dorsalen Mittelliniendomäne (DMD) und der anterioren dorsolateralen Domäne (ADD) der *hbn*-Expression (Abb. 4.10B, Pfeilköpfe). *Pros* wird zunächst cytoplasmatisch am basalen Pol der Neuroblasten exprimiert. Nach der Teilung der Neuroblasten segregiert das Pros-Protein ausschließlich in die Ganglienmutterzelle und wird dort nach kurzer Zeit in den Zellkern transportiert. In den Neuronen kann Pros nur noch sehr kurze Zeit nachgewiesen werden. Eine Expression von *pros* ist außer in Neuroblasten auch in Glioblasten und in bestimmten Gliazellen detektierbar (Doe *et al.*, 1991). Eine Doppelfärbung mit anti-Hbn- und anti-Pros-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen zeigte im Embryonalstadium 11 in weiten Bereichen des Gehirns eine Kolokalisation der beiden Proteine (Abb. 4.10C), die im Verlauf der weiteren Embryonalentwicklung jedoch deutlich abnimmt, bis nur noch in den äußeren Bereichen der Hemisphären einzelne Zellen sowohl Hbn- als auch Pros-positiv sind (Abb. 4.10D). Da mit Hilfe der Marker Mira und Dpn bereits nachgewiesen wurde, dass *hbn* nur in sehr wenigen Neuroblasten exprimiert wird, könnte es sich bei diesen Zellen um Glioblasten bzw. um Gliazellen handeln oder auch um Neurone, die *pros* gerade noch exprimieren.





**Abb. 4.10: Doppelfärbungen an embryonalen *Drosophila*-Gehirnen mit anti-Hbn-Antikörpern in Kombination mit verschiedenen neuronalen Markern.** Doppel-Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombinationen sind farblich entsprechend angegeben. Alle Ansichten sind von dorsal, anteriorer Pol unten. Gelbe Farbe zeigt Kolokalisation an. (A, B) Embryonalstadium 10. (C) Embryonalstadium 11. (D-F) Embryonalstadium 15. Pfeilspitzen in B markieren Hbn-positive Neuroblasten.

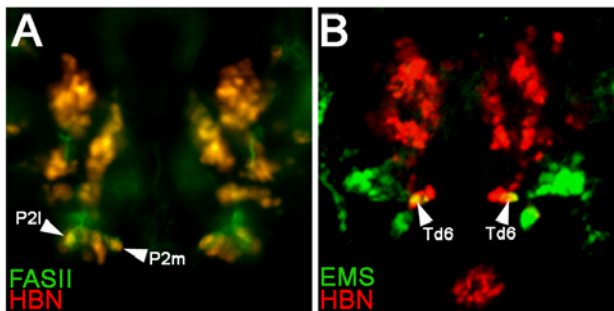
Ob *hbn* im embryonalen Gehirn in Gliazellen exprimiert wird, wurde über eine Färbung mit anti-Hbn-Antikörpern und dem Gliazellmarker anti-Repo (Campbell *et al.*, 1994) an Wildtyp-Embryonen untersucht. Es konnte anhand dieser Färbung keine Kolokalisation von Hbn und Repo nachgewiesen werden (Abb. 4.10E), so dass eine Expression von *hbn* in Gliazellen ausgeschlossen werden kann.

*Elav* wird ab dem Embryonalstadium 11 von allen postmitotischen Neuronen des Nervensystems exprimiert (Campos *et al.*, 1987) und zählt zu den frühesten neuronspezifischen Markern (Bier *et al.*, 1988). Um zu untersuchen, ob es sich bei den *hbn*-exprimierenden Zellen des embryonalen Gehirns um Neurone handelt, wurden Doppelfärbungen an Wildtyp-Embryonen mit anti-Hbn- und anti-Elav-Antikörpern durchgeführt. Aus Abb. 4.10F wird ersichtlich, dass alle Hbn-positiven Zellen auch Elav-positiv sind.

Mit allgemeinen Zelltypmarkern war bestimmt worden, dass es sich bei den *hbn*-exprimierenden Zellen im embryonalen Gehirn hauptsächlich um Neurone und wenige Neuroblasten handelt. In den letzten Jahren wurden mehrere Studien durchgeführt, die sich mit der Kartierung von Neuroblasten und Neuronen auf Einzelzellebene beschäftigen. Jeder Neuroblast und viele Neurone exprimieren eine ganz bestimmte Kombination von Genen, so dass die einzelnen Zellen anhand ihrer Genprodukte identifiziert werden können. Es sollte auf

der Grundlage dieser Arbeiten versucht werden, einzelne *hbn*-exprimierende Neurone zu identifizieren.

Über die frühe Expression von *FasII* und aufgrund ihrer Lokalisation wurden sogenannte „Fibre Tract Founder Cluster“ definiert. Diese „Founder Cluster“ bestehen jeweils aus mehreren Neuronen und bilden den Ausgangspunkt für die Ausbildung des axonalen Gerüsts (Nassif *et al.*, 1998). Es sollte untersucht werden, ob einige Neurone der „Fibre Tract Founder Cluster“ Hbn-positiv sind. Zu diesem Zweck wurden Wildtyp-Embryonen mit anti-Hbn- und anti-FasII-Antikörpern gefärbt und insbesondere die Embryonalstadien 12 und 13 analysiert.



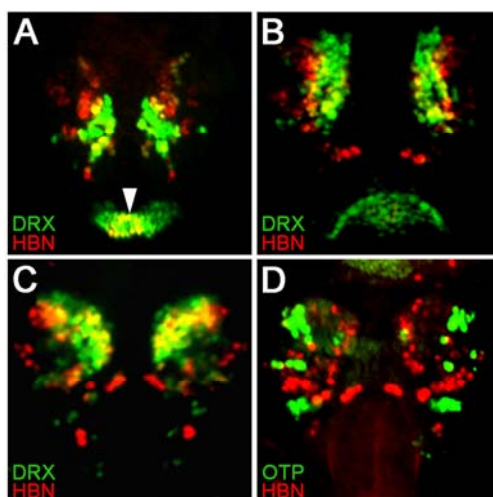
**Abb. 4.11: Hbn wird in P2l-, P2m- und Td6-Neuronen exprimiert.** Doppel-Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombinationen sind farblich entsprechend angegeben. Dorsale Sicht, anteriorer Pol unten. Gelbe Farbe zeigt Kolokalisation an. (A) Embryonalstadium 12. (B) Embryonalstadium 13.

Untersuchungen an Wildtyp-Embryonen des Embryonalstadiums 12 zeigten, dass *hbn* in den „Fibre Tract Founder Clustern“ P2m und P2l exprimiert wird (Abb. 4.11A). Diese Neurone sind vermutlich an der Bildung der präoralen Gehirnkommisur beteiligt (Nassif *et al.*, 1998), ein Prozess, über den bisher noch sehr wenig bekannt ist.

Die Neuroblasten des embryonalen Gehirns wurden genau kartiert. In jedem Neuroblast wird eine bestimmte Kombination von Markern exprimiert, die z.B. über Antikörperfärbungen oder *In situ*-Hybridisierungen nachgewiesen werden können. Auf diese Weise kann jeder Neuroblast identifiziert und sein Schicksal während der frühen Neurogenese verfolgt werden (Urbach und Technau, 2003). Es ist allerdings schwierig, diese Erkenntnisse auf die *hbn*-exprimierenden Zellen des embryonalen Gehirns zu übertragen, da es sich bei den meisten Zellen nicht um Neuroblasten, sondern bereits um Neurone handelt, also um die Nachkommenschaft von Neuroblasten. Dennoch wurde der Versuch unternommen, Kolokalisationen mit Neuroblastenmarkern zu finden, die jeweils nur für sehr wenige Neuroblasten positiv sind. Sind Neurone in der nahen Umgebung eines solchen Neuroblasten für denselben Marker positiv, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die Neurone aus diesem Neuroblasten hervorgegangen sind. So konnte mit Hilfe des Markers Empty spiracles (Ems) die Identität von einigen Hbn-positiven Neuronen bestimmt werden. Eine konfokale Auswertung von Wildtyp-Embryonen des Embryonalstadiums 13 zeigte, dass eine einzelne Zelle innerhalb der aus drei Zellen bestehenden Hbn-positiven Neuronencluster an der

deuto/tritocerebralen Grenze auch *Ems*-positiv ist (Abb. 4.11B). Da im Tritocerebrum während des Embryonalstadiums 10 nur ein einziger Neuroblast als *Ems*-positiv bestimmt wurde, nämlich der Neuroblast Td6 (Urbach und Technau, 2003), kann davon ausgegangen werden, dass die identifizierten Neurone jeweils Nachkommen der Td6-Neuroblasten sind. Aus diesem Grund wurden diese Neurone analog als Td6-Neurone bezeichnet (Abb. 4.11B, Pfeilköpfe).

Es war nicht nur von Interesse, ob in den *Hbn*-positiven Neuronen die allgemein bekannten Gehirnmarker exprimiert werden, sondern auch, ob sich eine Koexpression der beiden benachbarten Homeoboxgene der 57B-Region, *drx* und *otp*, nachweisen lässt. Für das ventrale Nervensystem war in dieser Arbeit gezeigt worden, dass eine Expression der drei 57B-Homeoboxgene in einem gemeinsamen Zelltyp, den vMP2-Neuronen, stattfindet. Es sollte nun untersucht werden, ob dies auch in Neuronen des embryonalen Gehirns der Fall ist. Die *Hbn*- und *Drx*-Expressionsdomänen überlappen in weiten Bereichen (Abb. 4.12A-C). Während der Embryonalstadien 11 bis 13 lässt sich *Drx* in vielen Neuronen der Domäne PDD nachweisen. Besonders auffällig ist in diesen Stadien außerdem eine Kolokalisation von *Hbn* und *Drx* in weiten Teilen des clypeolabralen Bereichs (Abb. 4.12A, Pfeilkopf). Ab dem Embryonalstadium 13 zeigen die der Mittellinie zugewandten Areale der protocerebralen Hemisphären eine ausgeprägte Kolokalisation von *Hbn* und *Drx* (Abb. 4.12B, C).



**Abb. 4.12: Expressionsmuster von *drx* und *otp* im Vergleich zur Expression von *hbn*.** Doppel-Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombinationen sind farblich entsprechend angegeben. Alle Ansichten von dorsal, anteriorer Pol unten. Gelbe Farbe zeigt Kolokalisation an. (A) Stadium 11. (B) Stadium 13. (C, D) Stadium 15. Der Pfeilkopf in A markiert die Position des Clypeolabrum-bereichs.

Ganz im Gegensatz dazu steht die *otp*-Expression im embryonalen Gehirn von *Drosophila*. Doppelfärbungen mit anti-*Hbn*- und anti-*Otp*-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen verdeutlichen, dass *otp* ausschließlich in den lateralen Bereichen des Gehirns exprimiert wird. In keinem *Hbn*-positiven Neuron lassen sich *otp*-Genprodukte nachweisen (Abb. 4.12D).

Die Ergebnisse der Feinkartierung der *hbn*-Expression im embryonalen Gehirn von *Drosophila* lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: *Hbn* wird in großen Bereichen der

protocerebralen Hemisphären, in einigen Zellen an der proto-/deutocerebralen Grenze und in drei Zellen an der deuto-/tritocerebralen Grenze exprimiert. Zusätzlich können auffällige, jeweils etwa drei bis vier Hbn-positive Zellen umfassende Cluster im Bereich unterhalb der präoralen Gehirnkommisur nachgewiesen werden. Mit Hilfe zelltypspezifischer Antikörper konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Hbn-positiven Zellen des Gehirns fast ausschließlich um Neurone handelt. Einige dieser Neuronen wurden näher bestimmt: *Hbn* wird sowohl in den „Fibre Tract Founder Clustern“ P2l und P2m als auch in den Td6-Neuronen exprimiert.

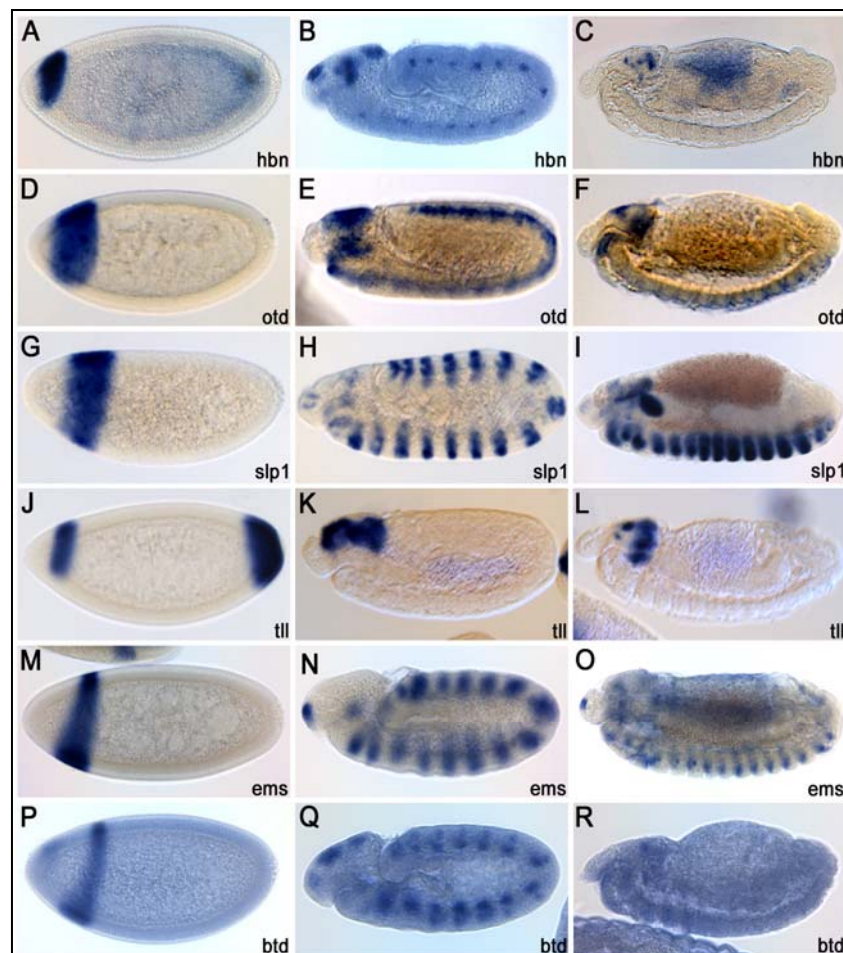
#### 4.4 Analyse von *hbn*-Mutanten

Die Bedeutung eines Gens für die Entwicklung eines Organismus kann nur dann analysiert werden, wenn Mutanten verfügbar sind, bei denen die Genfunktion ganz oder teilweise inaktiviert wurde. Im Vorfeld dieser Arbeit war bereits ein EMS-Mutageneseexperiment durchgeführt worden, um letale Mutanten der 57B-Genregion, in der *hbn* liegt, zu erzeugen (Psenner, Diplomarbeit 2001). EMS ist ein Mutagen, das zufällige Punktmutationen auslöst. Es wurden 33 letale Fliegenstämme mit Punktmutationen im genomischen Bereich 57B1 bis 57B13,14 erzeugt. Mit Hilfe der Mutante *hbn*<sup>KG02514</sup>, die aufgrund eines im 5'-Bereich von *hbn* inseriertes P-Element embryonal letal ist, wurden über Komplementationsanalysen zwei neue embryonal letale *hbn*-Allele, *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup>, identifiziert (Kaspar, Diplomarbeit 2003), die aber bisher noch nicht phänotypisch untersucht worden waren. Ein erster Schritt zur Aufklärung der Funktion von *hbn* sollte deshalb eine Analyse dieser mutanten *hbn*-Allele sein. Das spezifische Expressionsmuster von *hbn* lässt Entwicklungsdefekte von Kopfstrukturen, des embryonalen Gehirns und des ventralen Nervenstrangs in *hbn*-Mutanten vermuten.

##### 4.4.1 Untersuchung homozygoter *hbn*-Mutanten auf Defekte der Kopfentwicklung

Ein erster Anhaltspunkt, etwas über die Funktionsweise eines Gens herauszufinden, ist der Vergleich mit anderen Genen, die bestimmte Ähnlichkeiten wie z.B. ein ähnliches Expressionsmuster mit dem zu untersuchenden Gen aufweisen. Im Falle der blastodermalen Expression von *hbn* fällt eine ganze Gruppe von Genen ins Auge: die sogenannten Kopflückengene. Zu den Kopflückengenen zählen *orthodenticle* (*otd*) (Cohen und Jürgens, 1990; Finkelstein und Perrimon, 1990), *tailless* (*tll*) (Pignoni *et al.*, 1990; Margolis *et al.*,

1995), *sloppy paired 1 (slp 1)* (Grossniklaus *et al.*, 1994), *empty spiracles (ems)* (Dalton *et al.*, 1989; Walldorf und Gehring, 1992) und *buttonhead (btd)* (Wimmer *et al.*, 1993; Wimmer *et al.*, 1996). Diese Gene werden in teilweise überlappenden Domänen des Kopf-Neuroektoderms exprimiert. Mutationen der Kopflückengene führen zu lückenähnlichen Phänotypen, die mehrere aneinandergrenzende Segmente des anterioren Kopfes betreffen und sich u.a. in Deletionen kutikulärer Strukturen und dem Fehlen sensorischer Organe äußern. Die Expression der Kopflückengene beginnt während des Blastodermstadiums in einem charakteristischen Streifenmuster im anterioren Bereich des Embryos. Während der späteren Stadien der Embryonalentwicklung werden alle Kopflückengene in spezifischer Weise im Gehirn und im ventralen Nervensystem exprimiert. In Abb. 4.13 ist eine Übersicht der embryonalen mRNA-Expressionsmuster der Kopflückengene im Vergleich zur *hbn*-Expression gezeigt.

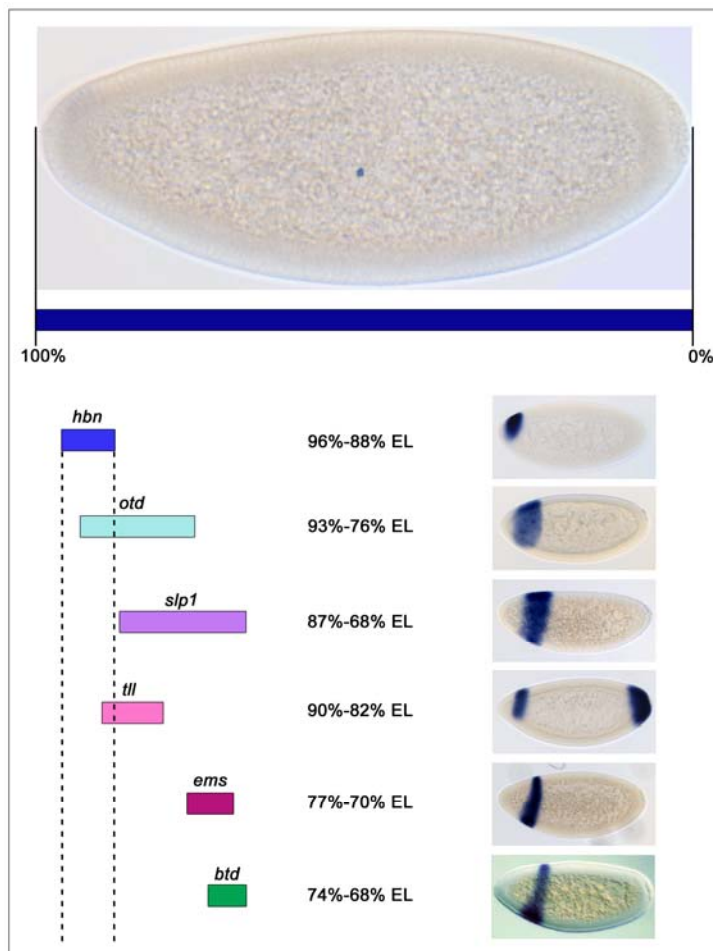


**Abb. 4.13:** Expressionsmuster von *hbn* und den Kopflückengenen *otd*, *slp1*, *tll*, *ems* und *btd* während der Embryonalentwicklung von *Drosophila*. *In situ*-Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen. Lichtmikroskopische Aufnahmen, Vergrößerung 200fach. Laterale Sicht, anteriorer Pol links. (A, D, G, J, M, P) Embryonalstadium 5. (B, N, Q) Embryonalstadium 10. (E, H, K) Embryonalstadium 11. (I, O) Embryonalstadium 14. (C, F, L, R) Embryonalstadium 15.

Vergleicht man das embryonale Expressionsmuster von *hbn* mit dem der Kopflückengene, fallen besonders die Ähnlichkeiten der frühen Expression auf. Alle Kopflückengene werden wie *hbn* in einem Streifen im anterioren Bereich des Embryos exprimiert, wobei sich die Streifen lediglich in ihrer Breite und ihrer Lokalisation unterscheiden (Abb. 4.13A, D, G, J, M, P). *Tll* wird zusätzlich in Form einer Kappe am posterioren Pol des Embryos exprimiert (Abb. 4.13J). Auch während der mittleren und späten Stadien der Embryonalentwicklung ähneln sich die Expressionsmuster von *hbn* und der Kopflückengene: Es lässt sich jeweils mRNA-Expression in spezifischen Gehirnregionen und im ventralen Nervensystem nachweisen (Abb. 4.13B, C, E, F, H, I, K, L, N, O, Q).

Die Lokalisation der einzelnen Streifen des Blastodermstadiums wurde über Messungen miteinander verglichen. In der Literatur wird die Position solcher streifenförmigen Expressionsdomänen üblicherweise in „Prozent der Eilänge“ angegeben; dabei entsprechen 100% der Eilänge dem anterioren Pol des Embryos, und 0% der Eilänge dem posterioren Pol des Embryos (Jürgens *et al.*, 1986; Gao *et al.*, 1996). Auf diese Weise wurde auch die Position des Hbn-positiven Streifens im Wildtyp bestimmt; als Referenz wurden zusätzlich die Positionen der Expressionsdomänen der Kopflückengene im Blastodermstadium ausgemessen. Zunächst wurden *In situ*-Hybridisierungen jeweils mit einer *otd*-, einer *tll*-, einer *slp1*-, einer *ems*-, einer *btd*- und einer *hbn*-Sonde an Wildtyp-Embryonen des Stadiums 5 durchgeführt. Danach wurden in genau definierter Weise die Positionen der Streifen in „Prozent der Eilänge“ bestimmt, indem die Streifen von *otd*, *tll*, *slp1* und *hbn* aus dorsaler Sicht gemessen wurden, und die sich nach ventral verbreiternden Streifen von *ems* und *btd* aus lateraler Sicht. Die Ergebnisse der Messungen zeigt Abb. 4.14.

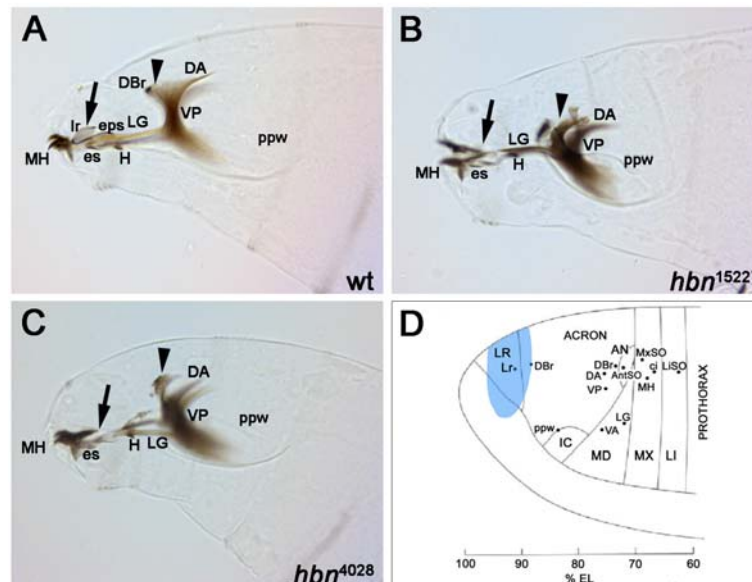
Die anteriore Expressionsdomäne von *hbn* erstreckt sich während des Blastodermstadiums von 88% bis 96% der Eilänge. Die Messungen zeigen, dass der posteriore Bereich dieser Domäne zu drei Vierteln mit der Expressionsdomäne von *otd* (76%-93% EL) überlappt. Eine weitere, jedoch geringere Überlappung findet sich mit dem *tll*-Streifen, der während des Embryonalstadiums 5 bei etwa 82% bis 90% der Eilänge lokalisiert ist. Hier ist etwa ein Viertel der posterioren *hbn*-Domäne kolokalisiert. Die Expressionsdomäne von *slp1* reicht von 68% bis 87% der Eilänge und grenzt damit knapp an den *hbn*-Streifen. Keine Überlappung findet sich bei *ems* oder *btd*: Die *ems*-Domäne liegt bei 70% bis 77% der Eilänge, und die *btd*-Domäne bei etwa 68% bis 74%. Die Expressionsdomänen dieser beiden Gene sind also deutlich weiter posterior lokalisiert als die *hbn*-Domäne.



**Abb. 4.14: Positionsbestimmung der blastodermalen Expressionsdomänen von *hbn*, *otd*, *slp1*, *tll*, *ems* und *btd*.** *In situ*-Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen des Stadiums 5. Die Lokalisation der anterioren Expressionsdomänen wurde bei jeweils 20 Embryonen ausgemessen, die Werte in „Prozent der Eilänge“ (% EL) umgewandelt und gemittelt. 100% EL entsprechen dem anterioren Pol des Embryos, 0% EL dem posterioren Pol. Die Positionen der jeweiligen Expressionsdomänen sind als farbige Balken dargestellt, die gestrichelten Linien markieren die Lokalisation der *hbn*-Expressionsdomäne.

Die Defekte der embryonalen Kopfentwicklung von Kopflückengenmutanten lassen sich durch eine klassische Methode, die Kutikulapräparation, gut nachweisen. Mit dieser Methode können die kutikularisierten Segmente des ersten Larvenstadiums dargestellt werden, so dass Kutikulapräparationen weit verbreitet genutzt werden, um erste Hinweise auf Strukturveränderungen mutanter Embryonen zu erhalten. Während des Prozesses der Kopfeinstülpung in den späten Embryonalstadien wandern die meisten Kopfstrukturen in das Innere des Embryos, und nur wenige Kopfstrukturen bleiben außen. Innerhalb des Kopfes werden kutikuläre Strukturen gebildet. Die auffälligste dieser Strukturen ist das sogenannte cephalopharyngeale Skelett, das sich im Wildtyp u.a. aus den Mundhaken, dem unpaarigen Labrum, dem unpaarigen epistomalen Sklerit, dem H-Stück und den Lateralgräten zusammensetzt. Weitere wichtige Strukturen sind die dorsalen Arme, die vertikale Platte und die dorsale Brücke (Abb. 4.15A). Um zu untersuchen, ob *hbn* für die Entwicklung des embryonalen Kopfes erforderlich ist, wurden Kutikulapräparationen von Larven des ersten Larvenstadiums der Mutanten *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> angefertigt. Der Vergleich des cephalopharyngealen Skeletts von *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten mit dem von Wildtyp-Larven zeigt, dass bei den *hbn*-Mutanten das Labrum und das epistomale Sklerit fehlen (Abb.

4.15B, C, Pfeile). Darüber hinaus können auch Veränderungen der dorsalen Brücke beobachtet werden (Abb. 4.15B, C, Pfeilköpfe). Insgesamt wirkt die Struktur im Vergleich zum Wildtyp stark kondensiert, außerdem kommt es bei einigen *hbn*-Mutanten zu Lücken in den Lateralgräten. Diese schweren Defekte sind vermutlich dafür verantwortlich, dass homozygote *hbn*-Mutanten im späten Embryonalstadium/frühen Larvenstadium absterben.



**Abb. 4.15: Struktur des cephalopharyngealen Skeletts von Wildtyp-, *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Larven des ersten Larvenstadiums.** (A-C) Kutikula-Präparationen von Wildtyp-Larven und Larven der Mutanten *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup>. Lichtmikroskopische Aufnahmen, Vergrößerung 200fach. Laterale Sicht, anteriorer Pol links. Pfeile weisen auf den Verlust von Ir und eps hin, Pfeilköpfe auf Veränderungen von DBr. (D) Auf Laser-Ablationen beruhende Schicksalskarte der Kopfsegmente im Blastoderm-Embryo (Finkelstein und Perrimon, 1990). In blau ist die Lokalisation der blastodermalen Expressionsdomäne von *hbn* eingezeichnet. AntSO: antennales sensorisches Organ, AN: antennales Segment, ci: Cirri, DA: dorsale Arme, DBr: dorsale Brücke, EL: Eilänge, eps: epistomales Sklerit, es: ektostomales Sklerit, H: Brücke des H-Stückes, IC: interkalares Segment, LiSO: labiales sensorisches Organ, LI: labiales Segment, LR: labrales Segment, Lr: Labrum, LG: Lateralgräte, MD: mandibuläres Segment, MX: maxilläres Segment, MxSO: maxilläres sensorisches Organ, MH: Mundhaken, ppw: posteriore Wand des Pharynx, VP: vertikale Platte.

Auf der Grundlage von mit Laserstrahlen behandelten Blastodermembryonen wurde eine Schicksalskarte erstellt, mit deren Hilfe Blastodermdefekte den entsprechenden Segmentanlagen zugeordnet werden konnten (Jürgens *et al.*, 1986). Die Anlagen für das Labrum und das labrale Sinnesorgan liegen bei 90% der Eilänge, und die Anlage für die dorsale Brücke ist bei etwa 88% der Eilänge lokalisiert. Diese Bereiche werden im Wildtyp von der blastodermalen *hbn*-Expressionsdomäne überdeckt, die sich von 88% bis 96% der Eilänge erstreckt (Abb. 4.15D). Die cephalopharyngealen Defekte, die in *hbn*-Mutanten beobachtet werden, liegen in den Segmentanlagen, in denen normalerweise *hbn*-Expression stattfindet und sind eine Folge des Funktionsverlustes von *hbn* in diesen embryonalen Regionen.

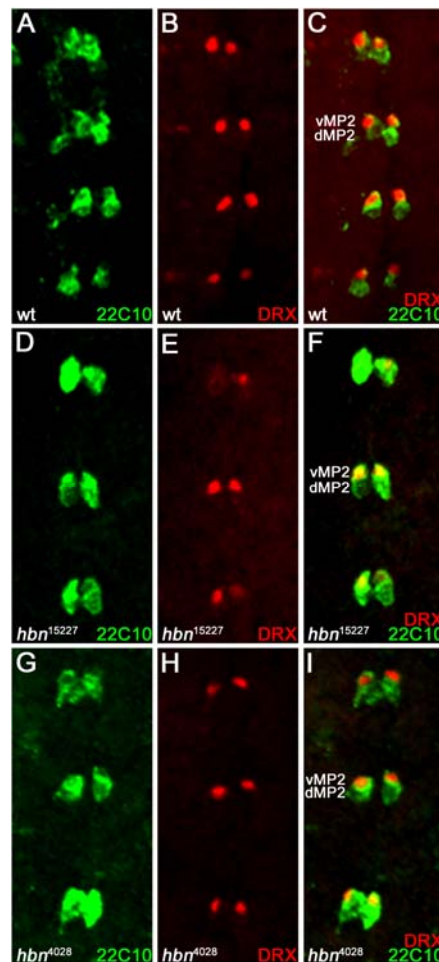


#### 4.4.2 Untersuchung des ventralen Nervensystems homozygoter *hbn*-Mutanten

Da *hbn* in bestimmten Neuronen des ventralen Nervensystems exprimiert wird, wurden homozygote *hbn*-Mutanten im Embryonalstadium mit Hilfe spezifischer Nervensystemmarker auf phänotypischen Veränderungen des ventralen Nervenstranges untersucht. Eine Schwierigkeit stellt die eindeutige Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Embryonen dar. Heterozygote Embryonen sind lebensfähig und lassen deshalb keine Veränderung im Phänotyp erwarten. Um homozygote von heterozygoten Embryonen unterscheiden zu können, war ein modifiziertes Balancerchromosom (*CyO/otp-lacZ*) in die Fliegenstämme *hbn*<sup>KG02514</sup>, *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> eingekreuzt worden (Kaspar, Diplomarbeit 2003). Heterozygote Embryonen exprimieren  $\beta$ -Galaktosidase im Enddarm und können so von homozygoten Embryonen unterschieden werden, die keine  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren. Bei jeder Antikörperfärbung von *hbn*<sup>KG02514</sup>-, *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen wurde deshalb zusätzlich eine anti- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung durchgeführt. Es besteht allerdings das Problem, dass die *otp-lacZ*-Expression ab dem Ende der Gastrulation im Embryonalstadium 11 beginnt, so dass die Embryonen erst ab diesem Stadium zuverlässig zugeordnet werden können.

Im ventralen Nervensystem wird *hbn* während der Embryonalentwicklung nur in zwei einzelnen Zellen pro Segment exprimiert, den vMP2-Neuronen. Ein Verlust der *hbn*-Funktion könnte z.B. dazu führen, dass diese Zellen nicht mehr korrekt gebildet werden und sich mit den herkömmlichen Markern nicht mehr nachweisen lassen. *Hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen wurden mit den vMP2-Markern 22C10 und Drx untersucht und überprüft, ob in homozygoten *hbn*-Mutanten die vMP2-Neurone des ventralen Nervensystems detektierbar sind. Im Wildtyp wird in den vMP2-Neuronen nicht nur *hbn*, sondern auch *drx* exprimiert, so dass Drx als Marker für vMP2-Neurone geeignet ist (Abb. 4.16A-C).

Sowohl in homozygoten *hbn*<sup>15227</sup>- als auch in *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen findet eine Expression von *drx* im ventralen Nervensystem immer noch statt (Abb. 4.16E, H), und mit Hilfe des 22C10-Markers lässt sich bestätigen, dass es sich bei den *drx*-exprimierenden Zellen in den *hbn*-Mutanten um vMP2-Neurone handelt (Abb. 4.16D, F, G, I). Diese Zellen sind also in den Mutanten vorhanden. Auch weitere Untersuchungen konnten keine offensichtliche Veränderung im ventralen Nervensystem von *hbn*-Mutanten zeigen. Im Embryonalstadium 13 lassen sich mittels des 22C10-Markers die axonalen Projektionen der MP2-Neuronen nachweisen. In *hbn*-Mutanten findet man die wildtypische Situation, die vMP2-Neurone projizieren in anteriore Richtung und die dMP2-Neurone nach posterior. Färbungen mit den allgemeinen Markern anti-Hrp, anti-FasII und anti-BP102 brachten ebenfalls keine neuen Erkenntnisse über mögliche Defekte des ventralen Nervensystems von *hbn*-Mutanten.

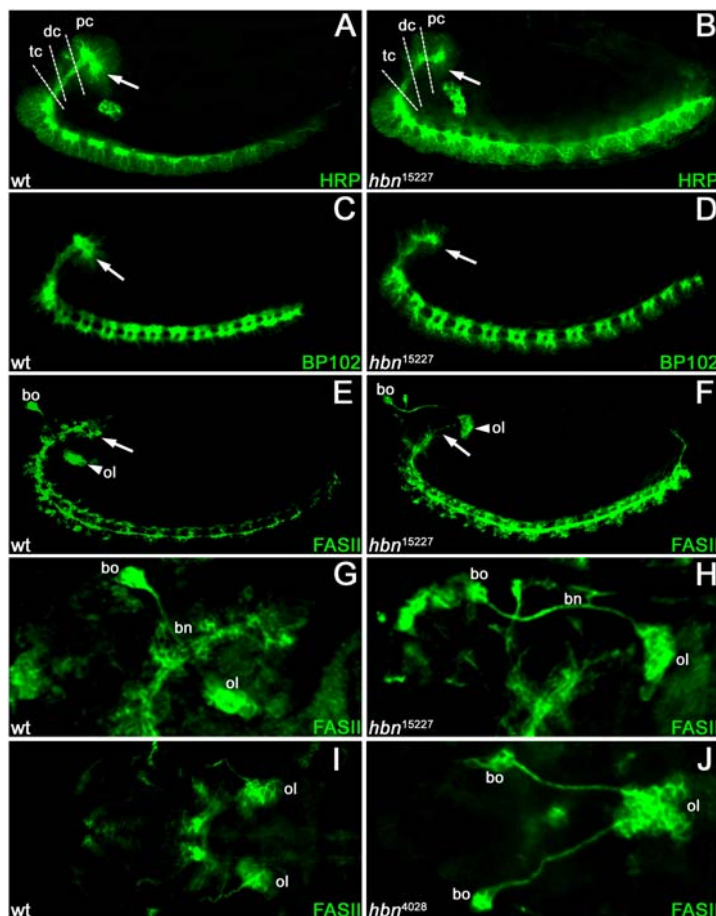


**Abb. 4.16: Vergleich des ventralen Nervensystems homozygoter *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen mit dem Nervensystem von Wildtyp-Embryonen.** Doppel-Antikörperfärbungen an Embryonen des Embryonalstadiums 11, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombinationen sind farblich entsprechend angegeben. Ventrale Sicht, anteriorer Pol oben. (A-C) Wildtyp-Embryo. (D-F) *hbn*<sup>15227</sup>-Embryo. (G-I) *hbn*<sup>4028</sup>-Embryo. dMP2: dorsal Midline Precursor Neuron 2, vMP2: ventral Midline Precursor Neuron 2.

#### 4.4.3 Untersuchung des embryonalen Gehirns homozygoter *hbn*-Mutanten

Im embryonalen Gehirn von *Drosophila* lässt sich in weitaus mehr Neuronen als im ventralen Nervensystem *hbn*-Expression nachweisen, so dass in diesem Bereich Defekte zu finden sein könnten. Aus diesem Grund sollte die Gehirnstruktur homozygoter *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen mit Hilfe allgemeiner Nervensystemmarker untersucht werden. Die Embryonen wurden mit anti-Hrp-Antikörpern (alle Neurone und Axone), anti-BP102-Antikörpern (alle Axone) bzw. anti-FasII-Antikörpern (spezifische Axone und Neurone) gefärbt. In Abb. 4.17 sind konfokale Aufnahmen der untersuchten Embryonen dargestellt. Ein Vergleich der anti-Hrp-gefärbten homozygoten *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen mit Wildtyp-Embryonen zeigt, dass das Protocerebrum der *hbn*-Mutante kleiner als im Wildtyp ist, d.h. diese Struktur ist nicht vollständig vorhanden (Abb. 4.17A, B, Pfeile). Diese Tatsache konnte mit Hilfe der anti-BP102-Färbung bestätigt werden (Abb. 4.17C, D, Pfeile). Die Analyse des Phänotyps mit der anti-FasII-Antikörperfärbung zeigte sogar noch größere Verluste des protocerebralen Gehirns als die Auswertung der anti-Hrp- und anti-BP102-Immunfluoreszenzen (Abb. 4.17E, F).

Außerdem wurden mit dieser Färbung weitere Defekte sichtbar: Die optischen Loben, die normalerweise mit dem Protocerebrum verbunden sind, sind nach dorsal delokalisiert, was gleichzeitig auch zu einer Delokalisation des Bolwig-Nervs führt, einer Verbindung zwischen den optischen Loben und den Bolwig-Organen (Abb. 4.17G, H). In mehreren Fällen konnte sogar eine Fusion der optischen Loben im Bereich der Mittellinie beobachtet werden. Die homozygoten Embryonen der *hbn*<sup>4028</sup>-Mutante zeigen die gleichen Defekte: Es fehlen protocerebrale Bereiche, wobei auch hier der FasII-Marker größere Verluste detektiert. Die optischen Loben und der Bolwig-Nerv befinden sich nicht am richtigen Ort, und die optischen Loben sind in vielen Fällen fusioniert (Abb. 4.17I, J).



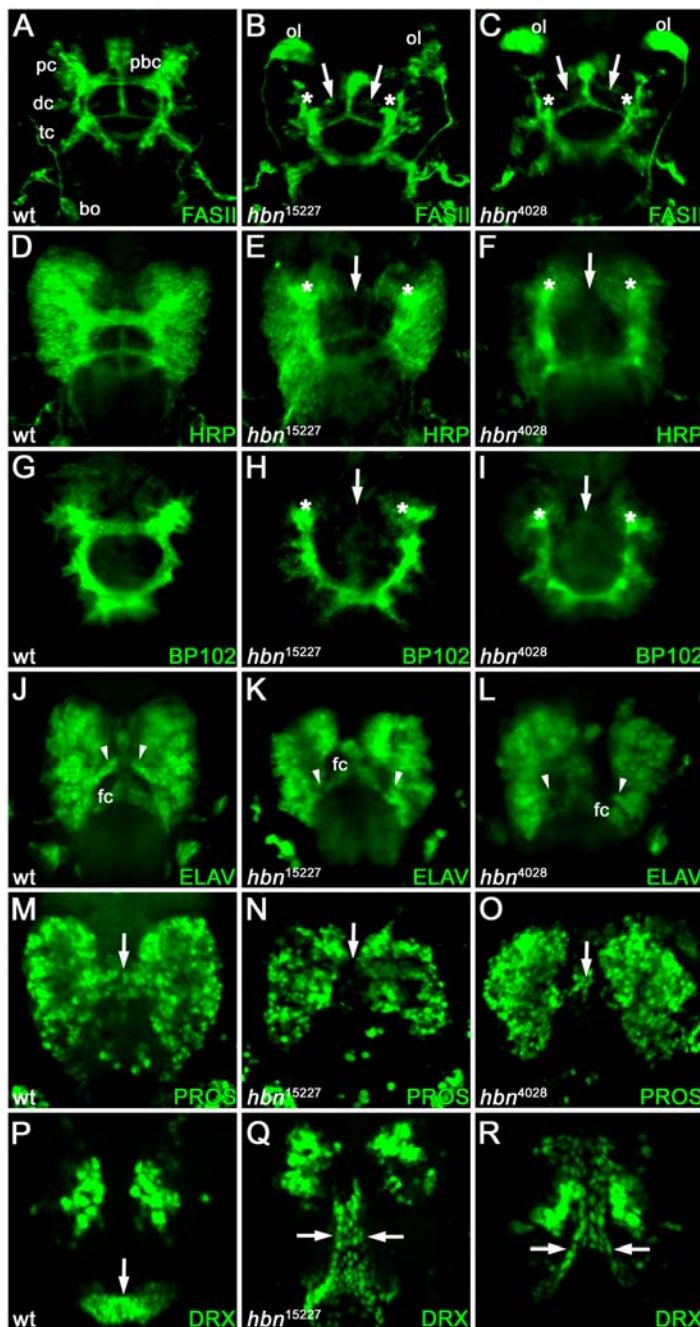
**Abb. 4.17: Homozygote Embryonen der Fliegenstämme *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> zeigen Defekte des Protocerebrums und eine Delokalisation der optischen Loben.** Antikörperfärbungen an Embryonen des Stadiums 16, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. (A, C, E, G, I) Wildtyp-Embryonen. (B, D, F, H) *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen. (J) *hbn*<sup>4028</sup>-Embryo. (A-F) Laterale Sicht, anteriorer Pol links. Pfeile in A-F weisen auf Verluste protocerebraler Strukturen hin, Pfeilköpfe in E und F auf eine Delokalisierung der optischen Loben. (G) Vergrößerter Ausschnitt aus E. (H) Vergrößerter Ausschnitt aus F. (I, J) Dorsale Sicht, anteriorer Pol links. bo: Bolwig-Organ, bn: Bolwig-Nerv, dc: Deutocerebrum, ol: optischer Lobus, pc: Protocerebrum, tc: Tritocerebrum.

Nach diesen ersten Hinweisen, dass bei homozygoten *hbn*-Mutanten protocerebrale Strukturen beeinträchtigt sind, wurden die Embryonen mit Hilfe der bereits beschriebenen Nervensystemmarker und einiger spezifischerer Marker genauer untersucht. Für die weitere Analyse wurden konfokale Aufnahmen von Embryonen aus dorsaler Sicht angefertigt, da sich so der Aufbau des Protocerebrums am besten beurteilen lässt.

Anti-FasII-Antikörperfärbungen an homozygoten *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen (Abb. 4.18A-C) zeigen, dass bei diesen Allelen nicht nur relativ große protocerebrale Domänen fehlen, sondern dass darüber hinaus auch die präorale Gehirnkommisur, die im Wildtyp die

beiden protocerebralen Gehirnhemisphären miteinander verbindet, nicht vorhanden ist. Sowohl die Frontalkommissur als auch die tritocerebrale Gehirnkommisur sind jedoch intakt. Die Delokalisation der optischen Loben ist in den Abbildungen 4.18B und C sehr deutlich zu erkennen. Ein ähnliches Bild zeigt die anti-Hrp-Antikörperfärbung, welche neben den Axonen auch die Zellkörper von Neuronen sichtbar macht (Abb. 4.18D-F). Hier erscheinen die protocerebralen Defekte zwar nicht ganz so groß wie bei anti-FasII-gefärbten *hbn*-Mutanten, aber es ist ebenfalls deutlich erkennbar, dass die präorale Gehirnkommisur fehlt. Um zu untersuchen, ob *hbn*-Mutanten tatsächlich alle Axone der präoralen Gehirnkommisur fehlen, wurden die anti-BP102-Antikörperfärbungen genauer analysiert, da mit dieser Färbung nicht nur bestimmte Axone detektiert werden können, wie es mit einem anti-FasII-Antikörper der Fall ist, sondern die Gesamtheit der Axone angefärbt wird. Mit dieser Färbung konnte bestätigt werden, dass alle Axone der präoralen Gehirnkommisur fehlen (Abb. 4.18G-I). Zur genaueren Untersuchung des Phänotyps der *hbn*-Funktionsverlustmutanten wurden Antikörperfärbungen mit spezifischeren Nervensystemmarkern durchgeführt. So wurden *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen mit einem anti-Elav-Antikörper gefärbt, um zu analysieren, ob bei den Mutanten die neuronalen Strukturen des Protocerebrums betroffen sind. Im Vergleich zum Wildtyp sind in den *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten einige Neurone der protocerebralen Domänen entweder nicht vorhanden oder nicht Elav-positiv (4.18J-L). In Wildtyp-Embryonen fällt im Bereich der präoralen Gehirnkommisur eine brückenähnliche Struktur auf, die aus Elav-positiven Zellen besteht (Abb. 4.18J, Pfeilköpfe). Die Bildung der präoralen Gehirnkommisur wird von der Bildung einer sogenannten „interhemisphärischen Brücke“, die u.a. aus Neuronen besteht, begleitet (Therianos *et al.*, 1995). Vermutlich handelt es sich bei der Elav-positiven Struktur um diese Brücke. Interessanterweise scheint sich diese Struktur in *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen nicht adäquat ausbilden zu können, da die interhemisphärische Brücke hier nur sehr rudimentär vorhanden ist (Abb. 4.18K, L, Pfeilköpfe).

Therianos *et al.* berichteten in ihrem 1995 erschienenen Artikel nicht nur von einer aus Neuronen bestehenden interhemisphärischen Brücke, sondern auch, dass die beiden Hemisphären ab dem Embryonalstadium 12 durch eine brückenähnliche Struktur aus *pros*-exprimierenden Zellen verbunden werden. Diese Struktur ist in Abb. 4.18M gezeigt (Pfeil). Vergleicht man *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen mit dem Wildtyp, so wird deutlich, dass auch die *Pros*-positive Brücke in den Mutanten nicht richtig ausgebildet ist. Besonders in *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen sieht man häufig, dass die Hirnhemisphären aufeinander zugerückt sind (Abb. 4.18N, O, Pfeile).



**Abb. 4.18: Analyse der Mutanten *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> mit nervensystemspezifischen Markern.** Antikörperfärbungen an Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Alle Ansichten dorsal, anteriorer Pol unten. (A, D, G, J, M, P) Wildtyp-Embryonen. (B, E, H, K, N, Q) *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen. (C, F, I, L, O, R) *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen. (A-O) Embryonalstadium 16. (P, R) Embryonalstadium 11. (Q) Embryonalstadium 15. Pfeile in B, C, E, F, H, I bezeichnen den Verlust der präoralen Gehirnkommisur in *hbn*-Mutanten, Sterne den Verlust von protocerebralen Domänen. Pfeilköpfe in J, K und L bezeichnen die Lage von Elav-positiven Neuronen, die im Wildtyp eine brückenartige Struktur bilden. Pfeile in M, N und O markieren die Lage von Pros-positiven Zellen, die im Wildtyp eine brückenartige Struktur bilden. Pfeile in P-R markieren die Lage von Hbn-positiven Zellen der Clypeolabrum-Domäne. bo: Bolwig-Organ, dc: Deutocerebrum, fc: Frontalkommisur, ol: optischer Lobus, pbc: präorale Gehirnkommisur, pc: Protocerebrum, tc: Tritocerebrum.

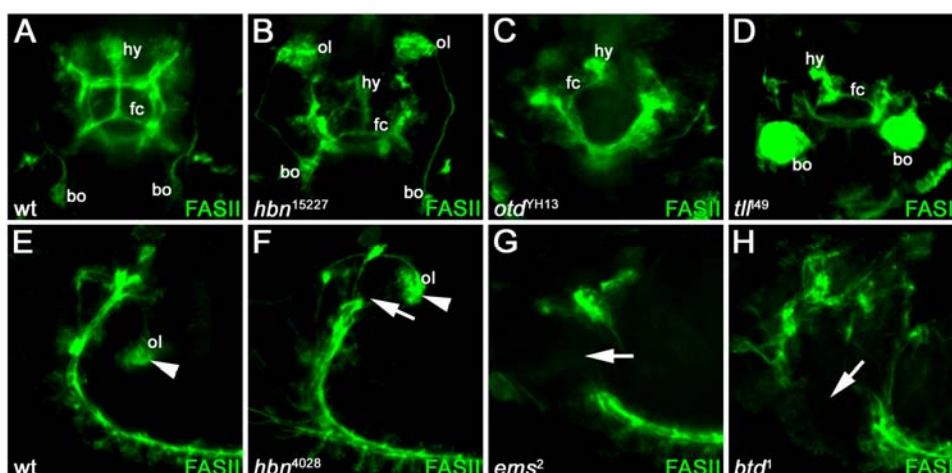
Die *hbn*-Mutanten wurden auch mit dem Gliazellmarker Repo untersucht. Dabei konnten keine offensichtlichen Veränderungen des *repo*-Expressionsmusters beobachtet werden (nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Gliazellen von der *hbn*-Mutation nicht betroffen sind.

Bei der Kartierung der *hbn*-Expression im embryonalen Gehirn hatte sich gezeigt, dass die Expression in weiten Bereichen mit den Expressionsdomänen von *drx* überlappt. Aus diesem Grund sollte auch die *drx*-Expression in *hbn*-Mutanten auf Veränderungen untersucht werden. Embryonen der Stämme *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> wurden mit anti-Drx-Antikörpern gefärbt und konfokal ausgewertet. In den Mutanten konnten Änderungen der Drx-Expressionsdomänen nachgewiesen werden. Am auffälligsten ist das Expressionsmuster während der mittleren

Stadien der Embryonalentwicklung. Im Wildtyp sind in diesen Stadien viele Zellen des Clypeolabrumbereichs Drx-positiv (Abb. 4.18P, Pfeil). Diese Expressionsdomäne befindet sich in *hbn*-Mutanten nicht am richtigen Ort und zieht sich streifenförmig bis zwischen die Gehirnhemisphären (Abb. 4.18Q, R).

In *hbn*-Mutanten ist das embryonale Gehirn schwer geschädigt: Es fehlen Bereiche des Protocerebrums, wobei größtenteils spezifische axonale Faszikel und relativ wenige Neurone betroffen sind, da die anti-FasII-gefärbten Mutanten größere Defekte zeigen als die Embryonen, die mit neuronalen Markern gefärbt wurden. Diese protocerebralen Verluste werden von einer Delokalisation der optischen Loben begleitet, da die protocerebralen Bereiche, mit denen die optischen Loben normalerweise verbunden sind, fehlen. Nicht nur das Protocerebrum ist in den *hbn*-Mutanten betroffen, sondern auch die präorale Gehirnkommisur, welche die axonale Verbindung zwischen den beiden protocerebralen Hemisphären darstellt, kann nicht mehr richtig ausgebildet werden. Dafür spricht auch, dass die aus Elav-positiven Neuronen bestehende interhemisphärische Brücke, die möglicherweise an der Bildung der präoralen Kommissur beteiligt ist, in *hbn*-Mutanten nicht intakt ist.

Dieser „lückenähnliche“ Gehirnphänotyp von *hbn*-Mutanten, bei dem im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.19A, E) der anteriore Bereich des Protocerebrums fehlt (Abb. 4.19B, F), ist mit den Gehirnphänotypen von Kopflückengenmutanten vergleichbar. Auch bei den verschiedenen Kopflückengenmutanten fehlen komplette Gehirnstrukturen. Ein Verlust der *otd*-Funktion führt beispielsweise in den späten Stadien der Embryonalentwicklung zu einer gravierenden Reduktion des Protocerebrums (Hirth *et al.*, 1995) (Abb. 4.19C).



**Abb. 4.19: Vergleich der Gehirnphänotypen von Kopflückengenmutanten mit dem Phänotyp von *hbn*-Mutanten.** Anti-FasII-Antikörperfärbungen an Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. (A-D) Dorsale Sicht, anteriorer Pol unten. (E-H) Laterale Sicht, anteriorer Pol links. (A, E) Wildtyp-Embryonen. (B) *hbn*<sup>15227</sup>-Embryo. (C) *otd*<sup>YH13</sup>-Embryo. (D) *tll*<sup>49</sup>-Embryo. (F) *hbn*<sup>4028</sup>-Embryo. (G) *ems*<sup>2</sup>-Embryo. (H) *btd*<sup>1</sup>-Embryo. Die Pfeilspitzen in E und F weisen auf die Position der optischen Loben hin, die Pfeile in F-H auf fehlende Gehirnstrukturen. bo: Bolwig-Organ, fc: Frontalkommisur, hy: hypocerebrales Ganglion.

Den größten Gehirndefekt zeigen *tll*-Funktionsverlustmutanten: Fast das gesamte Protocerebrum fehlt, und auch die optischen Loben sind betroffen (Strecker *et al.*, 1988) (Abb. 4.19D). Eine Mutation von *ems* führt zu Defekten in den deutocerebralen und tritocerebralen Neuromeren (Hirth *et al.*, 1995) (Abb. 4.19G). Ein Funktionsverlust von *btd* hat ebenfalls den Verlust deuto- und tritocerebraler Domänen zur Folge (Cohen und Jürgens, 1990) (Abb. 4.19H).

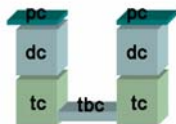
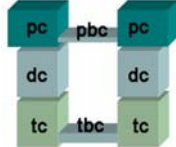
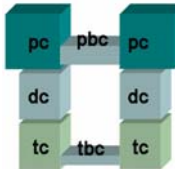
*Hbn* ähnelt den Kopflückengenen also nicht nur in seinem Expressionsmuster (Abb. 4.13, 4.14), sondern auch in der Ausprägung des Gehirnphänotyps bei Funktionsverlust.

#### 4.4.4 Ausprägungsgrad des embryonalen Phänotyps von *hbn*-Mutanten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein homozygoter Funktionsverlust von *hbn* zu gravierenden Defekten des embryonalen Gehirns führt, stellte sich die Frage, ob dieser Phänotyp bei allen *hbn*-Allelen gleich stark ausgeprägt ist, oder ob es Unterschiede im Ausprägungsgrad gibt.

Um die Penetranz des *hbn*-Phänotyps in den verschiedenen *hbn*-Mutanten zu untersuchen, wurden Embryonen der Fliegenstämme *hbn*<sup>15227</sup>, *hbn*<sup>4028</sup> und *hbn*<sup>KG02514</sup> mit einem anti-FasII-Antikörper gefärbt. Als Referenz zu diesen *hbn*-Allelen wurden auch Embryonen des Defizienzstammes *Df(2R)Exel7166* gefärbt, dem die genomische Region von *hbn* komplett fehlt und der folglich den stärksten Phänotyp zeigen sollte. Wie bereits beschrieben, ist der Gehirnphänotyp mit dem FasII-Marker am deutlichsten erkennbar. Außerdem lassen sich mit dem FasII-Marker die Axone des Nervensystems am besten beurteilen. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Die nachgewiesenen Phänotypen wurden in drei Klassen eingeteilt: Die erste Klasse stellt der „starke“ FasII-Phänotyp dar, bei dem die komplette präorale Gehirnkommisur und große Bereiche des Protocerebrums fehlen. Die zweite Klasse, der „schwache“ FasII-Phänotyp, zeichnet sich dadurch aus, dass die präorale Gehirnkommisur nicht komplett fehlt, sondern deutlich reduziert ist. Auch die protocerebralen Defekte sind nicht ganz so groß wie bei Embryonen mit starkem FasII-Phänotyp. Die dritte Klasse wird von Embryonen repräsentiert, die einen „wildtypischen“ FasII-Phänotyp zeigen, d.h. es ist kein offensichtlicher Gehirndefekt zu erkennen.

**Tab. 4.1: Statistische Auswertung des Ausprägungsgrades des embryonalen Phänotyps von *hbn*-Mutanten.** Embryonen der Stämme *Df(2R)Exel7166*, *hbn*<sup>15227</sup>, *hbn*<sup>4028</sup> und *hbn*<sup>KG02514</sup> wurden mit einem anti-FasII-Antikörper gefärbt. Die FasII-Gehirnphänotypen von jeweils 50 homozygoten Embryonen wurden fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Phänotypen wurden in drei Klassen unterteilt: Bei einem „starken“ FasII-Gehirnphänotyp fehlen die präorale Gehirnkommisur und große protocerebrale Bereiche; bei einem „schwachen“ FasII-Gehirnphänotyp ist die präorale Gehirnkommisur stark reduziert, und es fehlen geringere Bereiche des Protocerebrums; bei einem „wildtypischen“ Phänotyp sind mit dem FasII-Marker keine offensichtlichen Gehirndefekte feststellbar. dc: Deutocerebrum, pbc: präorale Gehirnkommisur, pc: Protocerebrum, tbc: tritocerebrale Gehirnkommisur, tc: Tritocerebrum.

<i>hbn</i> -Allel	Ausprägungsgrad der Gehirndefekte		
	stark	schwach	kein Defekt
			
<i>Df(2R)Exel7166</i>	98%	2%	0%
<i>hbn</i> <sup>15227</sup>	91%	5%	4%
<i>hbn</i> <sup>4028</sup>	64%	21%	15%
<i>hbn</i> <sup>KG02514</sup>	1%	1%	98%

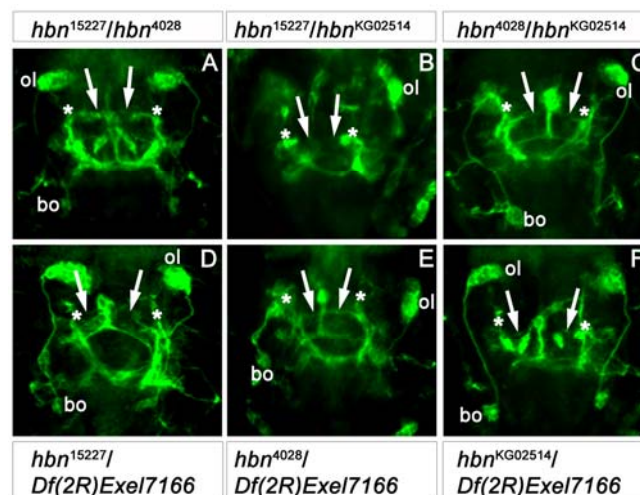
Wie aus Tab. 4.1 ersichtlich wird, zeigen 98% der homozygoten Embryonen der Defizienz *Df(2R)Exel7166* einen starken FasII-Gehirnphänotyp. Nur bei 2% der Embryonen wurde ein schwacher Phänotyp gefunden, und es konnte kein Embryo ohne einen sichtbaren Gehirndefekt nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt mit 91% ein deutlich höherer Prozentsatz homozygoter *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen einen starken FasII-Gehirnphänotyp im Vergleich zu homozygoten *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen mit nur 64%. Bei 21% der homozygoten *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen wurde ein schwacher Phänotyp beobachtet, während nur 5% der *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen diesem Phänotyp zugeordnet werden konnten. Deutliche Unterschiede gibt es auch bei dem Prozentsatz der Embryonen, bei denen keine Veränderung im FasII-Gehirnphänotyp nachgewiesen werden konnte: Nur 4% der *hbn*<sup>15227</sup>-Mutante zeigen einen wildtypischen Gehirnphänotyp, wohingegen der Phänotyp bei 15% der *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen als wildtypisch bestimmt wurde. Ein ganz anderes Bild zeigte sich bei der Auswertung der anti-FasII-gefärbten homozygoten *hbn*<sup>KG02514</sup>-Embryonen: Hier konnte jeweils nur bei 1% der Embryonen ein starker bzw. schwacher Phänotyp bestimmt werden. Somit sind bei 98% der homozygoten *hbn*<sup>KG02514</sup>-Mutanten keine erkennbaren Gehirndefekte mit dem FasII-Marker nachweisbar.

Diese statistische Auswertung zeigt, dass es sich bei *hbn*<sup>15227</sup> um ein sehr starkes *hbn*-Allel mit einem stark ausgeprägten Gehirnphänotyp handelt, da der Ausprägungsgrad des



Phänotyps annähernd so groß ist wie bei Embryonen, denen die gesamte *hbn*-Region fehlt. Bei *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten treten deutlich mehr Embryonen mit einem schwachen oder einem wildtypischen Gehirnphänotyp auf, so dass die Penetranz des Phänotyps hier schwächer ist als bei dem *hbn*<sup>15227</sup>-Allel. Als ein sehr schwaches Allel erwies sich bei dieser Untersuchung das Allel *hbn*<sup>KG02514</sup>, das nur zu einem sehr geringen Prozentsatz Defekte im embryonalen Gehirn aufweist.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte untersucht werden, ob es sich bei den beobachteten Gehirnphänotypen tatsächlich um Effekte handelt, die durch Mutationen im *hbn*-Gen verursacht werden. Da eine EMS-Mutagenese ungerichtet erfolgt, besteht die Möglichkeit, dass die beiden EMS-Mutanten *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> außer den Mutationen, die *hbn* betreffen, zusätzliche Punktmutationen in anderen Bereichen des Genoms enthalten und die beobachteten Gehirndefekte nicht nur durch den Funktionsverlust von *hbn*, sondern durch Mutationen von anderen Genen bewirkt werden. Diese Frage kann über die Untersuchung von transheterozygoten Embryonen geklärt werden. Es wurden deshalb die allelischen Kombinationen *hbn*<sup>15227</sup>/*hbn*<sup>4028</sup>, *hbn*<sup>15227</sup>/*hbn*<sup>KG02514</sup>, *hbn*<sup>4028</sup>/*hbn*<sup>KG02514</sup>, *hbn*<sup>15227</sup>/*Df(2R)Exel7166*, *hbn*<sup>4028</sup>/*Df(2R)Exel7166* und *hbn*<sup>KG02514</sup>/*Df(2R)Exel7166* auf ihren Gehirnphänotyp hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Auswertung zeigt Abb. 4.20.

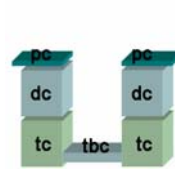
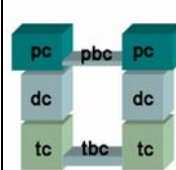
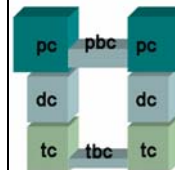


**Abb. 4.20: Analyse des Gehirnphänotyps in verschiedenen transheterozygoten Kombinationen von *hbn*-Allelen.** Anti-FasII-Antikörperfärbungen an transheterozygoten Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Alle Ansichten sind von dorsal mit anteriorem Pol unten. (A) *hbn*<sup>15227</sup>/*hbn*<sup>4028</sup>. (B) *hbn*<sup>15227</sup>/*hbn*<sup>KG02514</sup>. (C) *hbn*<sup>4028</sup>/*hbn*<sup>KG02514</sup>. (D) *hbn*<sup>15227</sup>/*Df(2R)Exel7166*. (E) *hbn*<sup>4028</sup>/*Df(2R)Exel7166*. (F) *hbn*<sup>KG02514</sup>/*Df(2R)Exel7166*. Pfeile markieren den Verlust der präoralen Gehirnkommisur, Sterne die Abwesenheit protocerebraler Bereiche. bo: Bolwig-Organ, ol: optischer Lobus.

Alle allelischen Kombinationen zeigen einen Gehirnphänotyp, der dem in homozygoten *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen identifizierten Phänotyp entspricht: Die präorale Gehirnkommisur fehlt entweder ganz oder ist bis auf wenige Axone stark reduziert, und es

fehlen protocerebrale Bereiche (Abb. 4.20A-F). Außerdem lässt sich auch bei diesen allelischen Kombinationen eine Delokalisation der optischen Loben bis hin zu einer Fusion der optischen Loben beobachten. Da die transheterozygoten Embryonen unterschiedliche rezessive Mutationen tragen, aber immer noch den gleichen Gehirnphänotyp zeigen wie im homozygoten Zustand, kann daraus geschlossen werden, dass die Mutationen dasselbe Gen betreffen müssen. Wäre dies nicht der Fall, würden die Transheterozygoten zwei rezessive Mutationen in zwei unterschiedlichen Genen tragen, was zu einem dominanten wildtypischen Phänotyp führen würde. Über die verschiedenen allelischen Kombinationen konnte bestätigt werden, dass der beobachtete Gehirnphänotyp tatsächlich auf den Funktionsverlust von *hbn* zurückzuführen ist und nicht durch eine EMS-induzierte Mutation in einem anderen Gen verursacht wird. Auch die transheterozygoten *hbn*-Allele wurden statistisch ausgewertet. Dazu wurde wie bereits bei den homozygoten *hbn*-Allelen bestimmt, wieviel Prozent der Embryonen einen starken, einen schwachen oder einen Gehirnphänotyp ohne sichtbare Defekte aufweisen. Die Ergebnisse dieser Auswertung zeigt Tab. 4.2.

**Tab. 4.2: Statistische Auswertung des Ausprägungsgrades des embryonalen Gehirnphänotyps von transheterozygoten *hbn*-Mutanten.** Embryonen der allelischen Kombinationen  $hbn^{15227}/Df(2R)Exel7166$ ,  $hbn^{4028}/Df(2R)Exel7166$ ,  $hbn^{KG02514}/Df(2R)Exel7166$ ,  $hbn^{15227}/hbn^{4028}$ ,  $hbn^{15227}/hbn^{KG02514}$  und  $hbn^{4028}/hbn^{KG02514}$  wurden mit einem anti-FasII-Antikörper gefärbt. Die FasII-Gehirnphänotypen von jeweils 50 homozygoten Embryonen wurden fluorezenzmikroskopisch ausgewertet. Die Phänotypen wurden in drei Klassen unterteilt: Bei einem „starken“ FasII-Gehirnphänotyp fehlen die präorale Gehirnkommisur und große protocerebrale Bereiche; bei einem „schwachen“ FasII-Gehirnphänotyp ist die präorale Gehirnkommisur stark reduziert, und es fehlen geringere Bereiche des Protocerebrums; bei einem „wildtypischen“ Phänotyp sind mit dem FasII-Marker keine offensichtlichen Gehirndefekte feststellbar. dc: Deutocerebrum, pbc: präorale Gehirnkommisur, pc: Proto-cerebrum, tbc: tritocerebrale Gehirnkommisur, tc: Tritocerebrum.

<i>hbn</i> -Allel	Ausprägungsgrad der Gehirndefekte		
	stark	schwach	kein Defekt
			
$hbn^{15227}/Df(2R)Exel7166$	96%	3%	1%
$hbn^{4028}/Df(2R)Exel7166$	50%	26%	24%
$hbn^{KG02514}/Df(2R)Exel7166$	12%	31%	57%
$hbn^{15227}/hbn^{4028}$	50%	42%	8%
$hbn^{15227}/hbn^{KG02514}$	62%	24%	12%
$hbn^{4028}/hbn^{KG02514}$	53%	34%	13%

Die allelische Kombination der Defizienz *Df(2R)Exel7166*, der die genomische *hbn*-Region komplett fehlt, ergibt erwartungsgemäß mit jedem der *hbn*-Allelen *hbn*<sup>15227</sup>, *hbn*<sup>4028</sup> und *hbn*<sup>KG02514</sup> einen deutlichen Anstieg des Prozentsatzes an starken Gehirnphänotypen (Tab. 4.2). Die allelische Kombination *hbn*<sup>15227</sup>/*hbn*<sup>4028</sup> zeigt zu 50% einen starken Phänotyp, zu 42% einen schwachen Phänotyp und zu 8% keinen Effekt. Bei der allelischen Kombination *hbn*<sup>15227</sup>/*hbn*<sup>KG02514</sup> zeigen 62% der Embryonen einen starken, 24% einen schwachen Gehirnphänotyp und 12% keine Defekte im embryonalen Gehirn. Die Kombination der Allele *hbn*<sup>4028</sup> und *hbn*<sup>KG02514</sup> ergibt zu 53% einen starken Phänotyp, zu 34% einen schwachen Phänotyp und zu 13% keinen offensichtlichen Gehirnphänotyp.

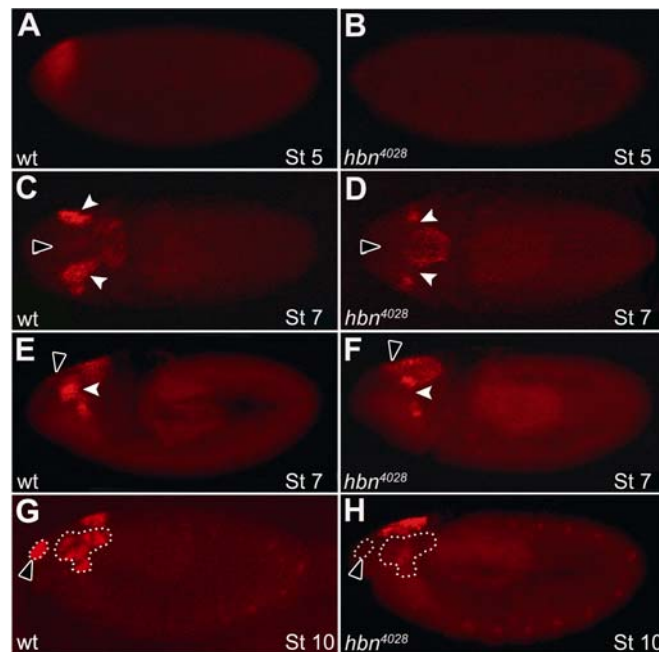
#### 4.4.5 *Hbn*-Expression der Mutanten *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup>

Da sich gezeigt hatte, dass es Abweichungen im Ausprägungsgrad des Gehirnphänotyps homozygoter *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten gibt, wurde untersucht, in welchem Maße in diesen beiden Mutanten *hbn*-Expression nachgewiesen werden kann, und ob es Unterschiede im Expressionsmuster gibt.

In homozygoten *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen lässt sich über eine Antikörperfärbung mit dem N-terminalen anti-Hbn-Antikörper keine *hbn*-Expression nachweisen, obwohl in diesem Fliegenstamm ein C-terminal verkürztes, 86 Aminosäuren langes Hbn-Protein synthetisiert werden sollte. Vermutlich ist dieses Protein zu klein, um von dem Antikörper erkannt zu werden, oder es wird sehr schnell abgebaut.

Embryonen der Mutante *hbn*<sup>4028</sup> zeigen hingegen eine nachweisbare *hbn*-Expression, die allerdings im Vergleich zur Wildtyp-Expression einige Veränderungen aufweist. In Abb. 4.21 ist das *hbn*-Expressionsmuster von *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die Auswertung des *hbn*-Expressionsmusters von frühen *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen des Embryonalstadiums 5 zeigte, dass bei auffällig vielen Embryonen die typische streifenförmige Expressionsdomäne des Blastodermstadiums fehlt (Abb. 4.21A, B). Im Zuge der weiteren Entwicklung zeigen homozygote Embryonen des Embryonalstadiums 7 ein unvollständiges Expressionsmuster von *hbn*, bei dem im Vergleich zum Wildtyp die V-förmigen Domänen, die sich jeweils aus ADD und PDD zusammensetzen, fehlen (Abb. 4.21C-F, weiße Pfeilspitzen). Die Antikörperfärbungen zeigen nur noch die beiden lateralen Domänen LD und die dorsale Mittelliniendomäne DMD. Die Hbn-positiven Zellen, die im Wildtyp aus DMD in den clypeolabralen Bereich wandern (Abb. 4.21C, E, weiß umrandete Pfeilspitzen), zeigen dieses Verhalten in den *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten nicht und verbleiben innerhalb der DMD-

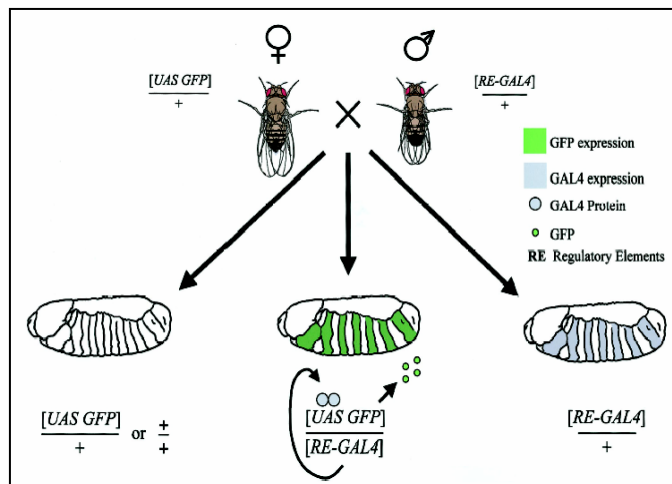
Domäne (Abb. 4.21D, F, weiß umrandete Pfeilspitzen). Als Folge fehlt in den folgenden Embryonalstadien die clypeolabrale *hbn*-Expressionsdomäne (Abb. 4.21G, H, weiß umrandete Pfeilspitzen). Außerdem sind die lateralen Domänen, die aus ADD und PDD hervorgehen, nicht vorhanden (Abb. 4.21G, H). In den späteren Stadien der Embryonalentwicklung fällt weiterhin auf, dass bei *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen keine *hbn*-Expression in den vMP2-Neuronen zu finden ist (nicht gezeigt).



**Abb. 4.21: Vergleich der *hbn*-Expression in Wildtyp-Embryonen mit der Expression in *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen.** Anti-Hbn-Antikörperfärbung an Embryonen der Stadien 5, 7 und 10. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. (A, B, E-H) Laterale Sicht, anteriorer Pol links. (C, D) Dorsale Sicht, anteriorer Pol links. (C-F) Weiße Pfeilspitzen weisen auf die wildtypische Position der V-förmigen *hbn*-Expressionsdomänen ADD und PDD hin. Weiß umrandete Pfeilspitzen markieren die Position der Hbn-positiven Zellen, die im Wildtyp in den clypeolabralen Bereich einwandern. (G, H) Gestrichelte Linien markieren wildtypische Expressionsdomänen, die in der Mutante fehlen. Weiß umrandete Pfeilspitzen weisen auf den clypeolabralen Bereich hin. Bei dem punktförmigen Expressionsmuster im Bereich des ventralen Nervensystems handelt es sich nicht um die spezifische Expression von *hbn* in den vMP2-Neuronen, sondern um eine Kreuzreaktion des anti-Hbn-Antikörpers mit Tracheen-Vorläuferzellen. St: Embryonalstadium.

#### 4.4.6 RNA-Interferenz von *hbn*

Um untersuchen zu können, zu welchen Zeiten und an welchen Orten *hbn* für seine Funktion in einzelnen Entwicklungsprozessen gebraucht wird, ist es von Vorteil, wenn man *hbn* gezielt in bestimmten Zellen zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt ausschalten und die einzelnen Prozesse entkoppeln kann. Ein geeignetes Werkzeug hierfür stellt das UAS-GAL4-System dar (Abb. 4.22).



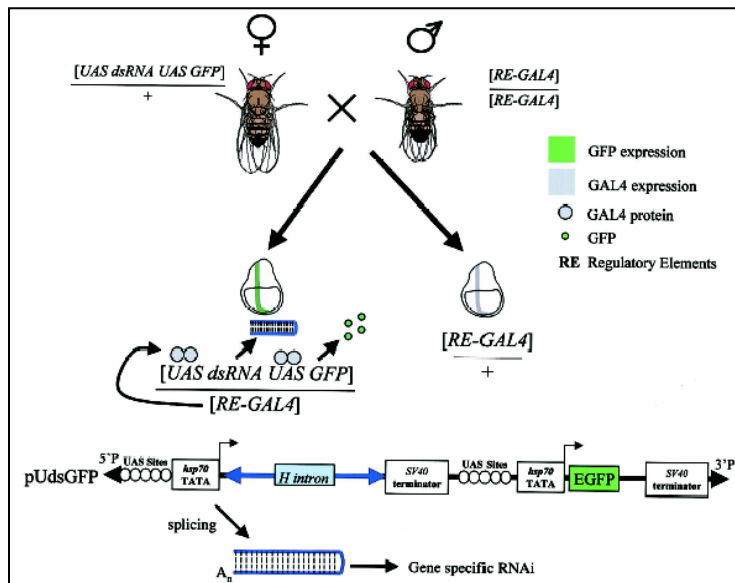
**Abb. 4.22: Prinzip des UAS-GAL4-Systems.** Die Kreuzung einer GAL4-Treiberlinie mit einer UAS-Linie ermöglicht eine zeit- und gewebespezifische Gen-Expression, wie hier am Beispiel von GFP gezeigt (Duffy 2002).

Dieses *in vivo* System besteht aus zwei transgenen Fliegenlinien, einer GAL4-Treiberlinie und einer UAS-Linie. In der GAL4-Treiberlinie wird ein in der Fliege natürlicherweise nicht vorkommender Transkriptionsfaktor aus der Hefe (GAL4) unter der Kontrolle eines bestimmten regulatorischen Elementes zelltypspezifisch exprimiert. Kreuzt man die Treiberlinie mit einer UAS-Linie, welche die Erkennungssequenz für den GAL4-Faktor (UAS) enthält, bindet GAL4 an die UAS-Sequenz und induziert so die Expression des gewünschten Gens, das hinter die UAS-Sequenz kloniert wurde (z.B. GFP, Abb. 4.22). Dieses System ermöglicht eine durch den Promotor der Treiberlinie spezifizierte räumlich und zeitlich gerichtete Expression eines bestimmten DNA-Abschnitts oder Gens.

Auf diese Weise ist es auch möglich, die Expression eines Gens gezielt in bestimmten Körperzellen nahezu auszuschalten und die Effekte dieses Funktionsverlustes zu untersuchen. Eine Methode, mit der man ein Ausschalten bzw. einen „Knockdown“ der Genexpression auf RNA-Ebene erreichen kann, ist die RNA-Interferenz (RNAi).

Es wurden transgene Linien erzeugt, die ein *hbn*-spezifisches RNAi-Konstrukt enthalten. In den Vektor pUdsGFP wurde ein „inverted repeat“ des *hbn*-Gens unter der Kontrolle einer UAS-Sequenz kloniert. Dieser „inverted repeat“ kodiert sowohl für einen „sense“- als auch für einen „anti-sense“-RNA-Strang, die durch ein Intron aus dem Gen *Hairless* voneinander getrennt sind. Nach Aktivierung der Transkription durch Kreuzung mit einem spezifischen

GAL4-Stamm wird das Intron herausgespleißt, die beiden RNA-Stränge lagern sich zusammen und bilden eine genspezifische doppelsträngige RNA (Abb. 4.23).



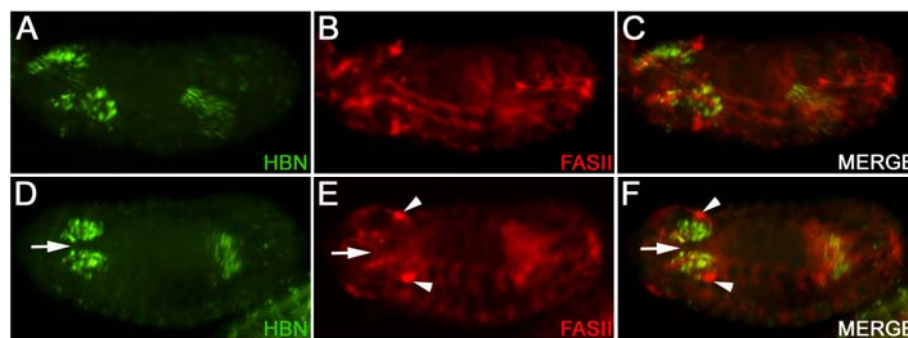
**Abb. 4.23: Gerichtete RNA-Interferenz durch spleißaktivierte Doppelstrangbildung.** Bei Kreuzungen mit einem GAL4-Treiber werden sowohl das „inverted repeat“-Konstrukt des Gens von Interesse als auch GFP im entsprechenden GAL4-Muster exprimiert. Wird das Intron des „inverted repeat“-Konstruktes durch Spleißen entfernt, entsteht eine Doppelstrangstruktur und führt zu einem durch RNAi vermittelten „Knockdown“ des interessierenden Gens. Da auch GFP unter GAL4-Kontrolle steht, sind gleichzeitig die Zellen, in denen RNAi stattfindet, markiert (Duffy 2002).

Die *hbn*-dsRNA wird von Dicer in 21 bis 23 Nukleotide große einzelsträngige Sequenzen prozessiert. Diese lagern sich an die zelluläre *hbn*-RNA an, und die nun teilweise doppelsträngige *hbn*-RNA wird von einem Nuklease-Komplex, dem RNA Induced Silencing Complex (RISC), zerstört. Auf diese Weise kommt es zu einem zell- bzw. gewebespezifischen „Knockdown“ der *hbn*-Expression.

Das pUdsGFP-*hbn*-Konstrukt lag bereits vor und wurde freundlicherweise von Dr. M. Faust für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt wurde in *yw*-Embryonen injiziert, und es wurden sieben unabhängige Transformanten erhalten. Eine Linie trägt das pUdsGFP-*hbn*-Konstrukt auf dem zweiten Chromosom, eine Linie enthält eine zweifache Insertion auf dem zweiten und dem dritten Chromosom, und bei vier transgenen Linien wurde das Konstrukt im X-Chromosom integriert. In allen Fällen führt das Integrationsereignis nicht zu Letalität, d.h. Fliegen, die homozygot für das Konstrukt pUdsGFP-*hbn* sind, sind lebensfähig. Die erzeugten transgenen Fliegen können nun mit Fliegenstämmen gekreuzt werden, die GAL4 in bestimmten Körperzellen, z.B. im Gehirn oder im Nervensystem, exprimieren. Bei den Nachkommen kommt es in diesen Zellen zu einem „Knockdown“ der *hbn*-Expression. Gleichzeitig kann mit Hilfe des GFP-Markers, der in dem pUdsGFP-*hbn*-Konstrukt enthalten ist, verfolgt werden, in welchen Zellen tatsächlich RNAi stattfindet.

Um einen spezifischen „Knockdown“ der *hbn*-Expression zu erzielen, sind *hbn*-GAL4-Linien notwendig. Da solche Treiberlinien bisher nicht verfügbar sind, wurde zunächst mit Hilfe einer *Actin5C*-GAL4-Treiberlinie getestet, ob die erzeugten transgenen Linien in der Lage

sind, RNAi zu induzieren. *Actin5C* (*Act5C*) ist unter anderem an der cytoskeletalen Organisation und an der Cytokinese beteiligt und wird in allen Zellen exprimiert. Steht GAL4 unter dem Einfluss eines *Act5C*-Enhancers, wird GAL4 deshalb auch in allen Zellen exprimiert. Der transgene Fliegenstamm pUdsGFP-*hbn2* wurde mit einem *Actin5C*-GAL4-Stamm gekreuzt und die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Embryonen mit einem anti-Hbn- und einem anti-FasII-Antikörper gefärbt, um sowohl die *hbn*-Expression als auch die Struktur des Nervensystems beurteilen zu können. Die Ergebnisse der Antikörperfärbung an *Act5C*-GAL4/pUdsGFP-*hbn2*-Embryonen zeigt Abb. 4.24.



**Abb. 4.24: Effekte einer Inaktivierung von *hbn* durch RNA-Interferenz.** Anti-Hbn- und anti-FasII-Antikörperfärbung an *Act5C*-GAL4/pUdsGFP-*hbn2*-Embryonen des Stadiums 14. Die Antikörper sind farblich entsprechend angegeben. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 100facher Vergrößerung. Dorsale Sicht, anteriorer Pol links. Die Pfeile in **D**, **E** und **F** markieren nicht vollständig eingewanderte P2m-Neurone bzw. die nicht vollständig ausgebildete präorale Gehirnkommisur. Die Pfeilköpfe in **E** und **F** weisen auf delokalisierte optische Loben hin.

Die Phänotypen der *Act5C*-GAL4/ pUdsGFP-*hbn2*-Embryonen sind breit gefächert. Sie reichen von einem völlig kollabierten Nervensystem über ein nicht ganz so stark beeinträchtigtes Nervensystem (Abb. 4.24A-C) bis hin zum bekannten *hbn*-Gehirnphänotyp (Abb. 4.24D-F), der allerdings nur in sehr wenigen Fällen beobachtet werden kann. Es konnte mit dieser Kreuzung nachgewiesen werden, dass der transgene Fliegenstamm pUdsGFP-*hbn2* in der Lage ist, *hbn*-RNAi zu induzieren.

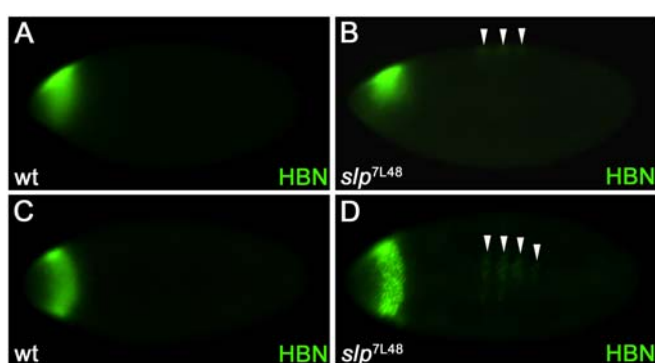
Die Vielfalt der beobachteten Phänotypen kann damit zusammenhängen, dass die Degradation der Ziel-mRNA über nur etwa 20 Nukleotide große einzelsträngige Sequenzen vermittelt wird. Bei einer hohen Sequenzähnlichkeit mit anderen Genen kann es dazu kommen, dass sich die kurzen Sequenzen an diese Gene anlagern und somit einen „Knockdown“ mehrerer unterschiedlicher Gene induzieren (Dietzl *et al.*, 2007).

## 4.5 Einordnung von *hbn* in eine Signalkaskade

### 4.5.1 Frühe Regulation von *hbn*

Es wurde gezeigt, dass einige Kopflückengene, deren Expressionsmuster während des Blastodermstadiums miteinander überlappen, sich untereinander regulieren (Hartmann *et al.*, 2001). Daher sollte untersucht werden, ob die *hbn*-Expression insbesondere während der frühen Entwicklungsstadien durch eines oder mehrere der Kopflückengene reguliert wird. Besonders *otd* und *tll* waren dabei von Interesse, da nachgewiesen wurde, dass die blastodermalen Expressionsmuster von *otd* und *tll* mit dem blastodermalen Expressionsmuster von *hbn* überlappen (Abb. 4.14).

Mutanten der Kopflückengene *otd*, *tll*, *slp1*, *ems* und *btd* wurden mit einem anti-Hbn-Antikörper gefärbt und die verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien auf Veränderungen der *hbn*-Expression untersucht. Während des Blastodermstadiums konnten keine Veränderungen der streifenförmigen *hbn*-Expressionsdomäne, wie z.B. eine Veränderung der Form oder der Position, beobachtet werden. Blastodermale *slp1*-Mutanten zeigen allerdings im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.25A, C) eine ektopische *hbn*-Expression in Form von drei bis vier Streifen im medialen dorsalen Bereich des Embryos (Abb. 4.25B, D). Dies ist jedoch die einzige Abweichung des *hbn*-Expressionsmusters, das in *slp1*-Mutanten nachgewiesen werden kann. In allen anderen Stadien gibt es keine Unterschiede zum wildtypischen Expressionsmuster.

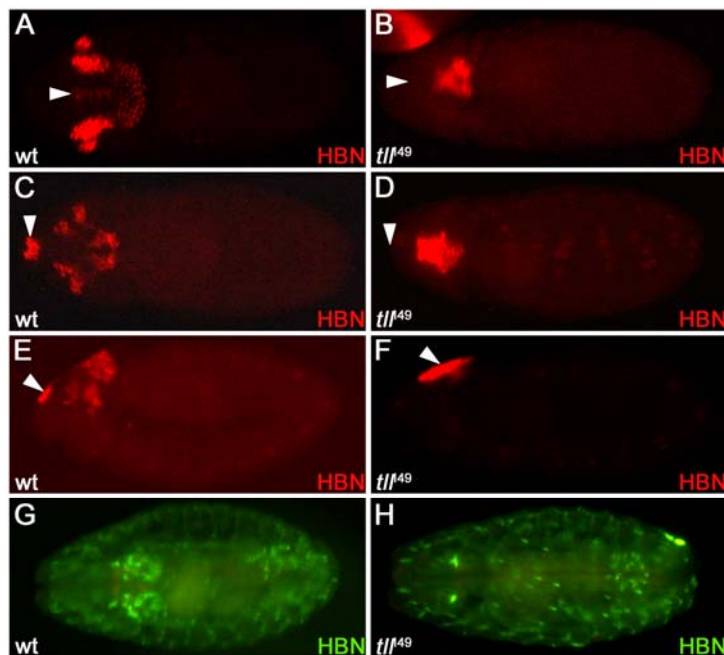


**Abb. 4.25: *Hbn*-Expression in *slp*<sup>7L48</sup>-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen.** Anti-Hbn-Antikörperfärbung an Embryonen des Stadiums 5. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 100facher Vergrößerung. (A, C) Wildtyp-Embryonen. (B, D) *slp*<sup>7L48</sup>-Embryonen. (A, B) Laterale Sicht, anteriorer Pol links. (C, D) Dorsale Sicht, anteriorer Pol links. Pfeilspitzen in B und D weisen auf ektopische *hbn*-Expression hin.

Bei *tll*-Mutanten kommt es ab dem Embryonalstadium 7 in allen Entwicklungsstadien zu deutlichen Veränderungen des *hbn*-Expressionsmusters (Abb. 4.26). Während des Stadiums 7 ist die *hbn*-Expression im Vergleich zum Wildtyp auf einen dorsalen Bereich konzentriert (Abb. 4.26A, B). Dies deutet darauf hin, dass die lateralen Expressionsdomänen LD, ADD und PDD fehlen und nur noch DMD vorhanden ist. Außerdem wandern die Hbn-positiven

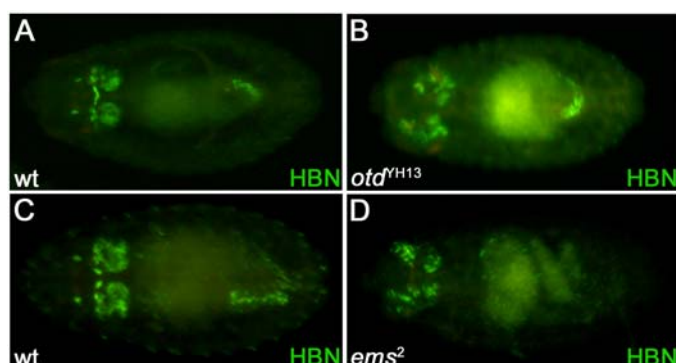


Zellen, die sich normalerweise während der Stadien 7 bis 10 in den clypeolabralen Bereich bewegen (Abb. 4.26A, C, Pfeilspitzen), nicht aus der DMD-Domäne heraus (Abb. 4.26B, D, Pfeilspitzen). Auch im Embryonalstadium 10 bleibt die Expression im dorsalen Bereich konzentriert, während die clypeolabrale Expressionsdomäne aufgrund der fehlenden Einwanderung der Zellen nicht vorhanden ist (Abb. 4.26C-F, Pfeilspitzen). Gegen Ende der Embryonalentwicklung zeigt sich, dass die *hbn*-Expression nicht wie im Wildtyp ausgeprägt in beiden Hemisphären stattfindet (Abb. 4.26G), sondern auf zwei winzige Bereiche reduziert ist (Abb. 4.26H). Bei diesen beiden Bereichen handelt es sich um die deuto- und tritocerebralen Expressionsdomänen von *hbn*.



**Abb. 4.26: Hbn-Expression in *tll<sup>49</sup>*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen.** Anti-Hbn-Antikörperfärbungen an Embryonen, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 100facher Vergrößerung. (A, C, E, G) Wildtyp-Embryonen. (B, D, F, H) *tll<sup>49</sup>*-Embryonen. (A, B) Embryonalstadium 7. (C-F) Embryonalstadium 10. (G, H) Embryonalstadium 16. (A-D, G, H) Dorsale Sicht, anteriorer Pol links. (E, F) Laterale Sicht, anteriorer Pol links. Pfeilspitzen in A-E bezeichnen die wildtypische Position der einwandernden Hbn-positiven clypeolabralen Zellen. Die Pfeilspitze in F weist auf die Position dieser Zellen in *tll<sup>49</sup>*-Mutanten hin.

Bei *otd*- und *ems*-Mutanten lässt sich erst in den mittleren bis späten Stadien der Embryonalentwicklung eine Veränderung des *hbn*-Expressionsmusters feststellen, wenn sich der Gehirnphänotyp der Mutanten bereits etabliert hat (Abb. 4.27), so dass sich dieses veränderte Muster durch das Fehlen bestimmter Gehirnbereiche erklären lässt. Die *btd*-Mutanten zeigten insgesamt so starke Defekte, dass die Embryonen nicht auswertbar waren.



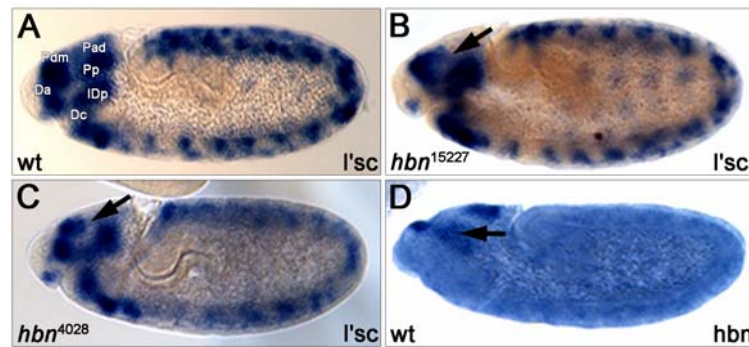
**Abb. 4.27: Hbn-Expression in *otd<sup>YH13</sup>*- und *ems<sup>2</sup>*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen.** Anti-Hbn-Antikörperfärbung an Embryonen, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 100facher Vergrößerung. (A, C) Wildtyp-Embryonen. (B) *otd<sup>YH13</sup>*-Embryo. (D) *ems<sup>2</sup>*-Embryo. (A, B) Embryonalstadium 14. (C, D) Embryonalstadium 15. (A-D) Dorsale Sicht, anteriorer Pol links.

#### 4.5.2 Identifizierung eines putativen Zielgens von *hbn*

Da *hbn* sowohl in seinem Expressionsmuster (Abb. 4.13) als auch in seinem Phänotyp (4.19) auffallende Übereinstimmungen mit den Kopflückengenen zeigt, sollte untersucht werden, ob auch Zielgene von *hbn* mit denen dieser Gengruppe identisch sind.

Es ist gezeigt worden, dass *otd*, *tll*, *ems* und *btd* die Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* (*l'sc*) kontrollieren. Die Expression von *l'sc* ist für die Entwicklung eines Großteils der procephalischen Neuroblasten notwendig. Der Funktionsverlust von *otd*, *tll*, *ems* oder *btd* führt dazu, dass *l'sc* in der entsprechenden Domäne nicht mehr exprimiert wird. Die Neuroblasten, die normalerweise aus dieser Domäne segregieren, fehlen in den Mutanten, was zu Gehirndefekten führt (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1997). Die Vermutung liegt nahe, dass auch *hbn* innerhalb seiner Expressionsdomänen die Expression von *l'sc* kontrollieren könnte, was bedeuten würde, dass der „lückenähnliche“ Gehirnphänotyp der *hbn*-Mutante ebenfalls durch den Verlust bestimmter Neuroblasten hervorgerufen wird. Um zu untersuchen, ob es Zusammenhänge zwischen der Expression von *hbn* und *l'sc* gibt, wurden mit einer *l'sc*-Sonde *In situ*-Hybridisierungen an *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen durchgeführt. Zur Herstellung der Sonde wurde der aus nur einem Exon bestehende *l'sc*-Genbereich mit den Primern Lethal of Scute 5' und Lethal of Scute 3' aus genomischer DNA amplifiziert und DIG-markiert. Mit dieser Sonde wurden Wildtyp-, *hbn*<sup>15227</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen hybridisiert. Die *l'sc*-Expression innerhalb des procephalischen Neuroektoderms wurde in mehrere Domänen unterteilt (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1996). Während des Embryonalstadiums 10 wird *l'sc* in relativ großen, ineinander übergehenden Domänen exprimiert, aus denen eine Anzahl von Neuroblasten delaminiert. Es handelt sich dabei unter anderem um die Domänen Pad (anterior-dorsale protocerebrale Domäne), Pdm (dorsomediale protocerebrale Domäne), Pp (posteriore protocerebrale Domäne), IDp (späte posteriore deutocerebrale Domäne) und Da (anteriore deutocerebrale Domäne) (Abb. 4.28A).

Vergleicht man die *l'sc*-Expressionsdomänen in den Mutanten *hbn*<sup>15227</sup> und *hbn*<sup>4028</sup> mit dem Wildtyp, fällt auf, dass die Expression im procephalischen Bereich verändert ist: Es fehlen die anterior-dorsale protocerebrale Domäne Pad, und auch die dorsomediale protocerebrale Domäne Pdm der *l'sc*-Expression ist nicht vollständig vorhanden (Abb. 4.28B, C, Pfeile). Um zu überprüfen, ob in diesen Domänen normalerweise *hbn*-Expression zu finden ist, wurden Wildtyp-Embryonen des entsprechenden Embryonalstadiums, die mit einer *hbn*-Sonde hybridisiert worden waren, mit den Embryonen verglichen, die mit der *l'sc*-Sonde hybridisiert worden waren. Dieser Vergleich zeigt, dass sich im Bereich der Pad auch etwa die laterale Domäne LD der *hbn*-Expression befindet (Abb. 4.28D).



**Abb. 4.28: Untersuchung der *l'sc*-Expression in *hbn*-Mutanten.** Lichtmikroskopische Aufnahmen in 100facher Vergrößerung. Alle Embryonen sind Stadium 10-Embryonen und aus lateraler Sicht mit anteriorem Pol links dargestellt. (A) *In situ*-Hybridisierung mit einer *l'sc*-Sonde an einem Wildtyp-Embryo. Da: anteriore deutocerebrale Domäne, Dc: Deutocerebrum, IDp: späte posteriore deutocerebrale Domäne, Pad: anterior-dorsale protocerebrale Domäne, Pdm: dorsomediale protocerebrale Domäne, Pp: posteriore protocerebrale Domäne. (B) *In situ*-Hybridisierung mit einer *l'sc*-Sonde an einem *hbn*<sup>15227</sup>-Embryo. Der Pfeil weist auf einen Verlust der Pad und eines Teils der Pdm hin. (C) *In situ*-Hybridisierung mit einer *l'sc*-Sonde an einem *hbn*<sup>4028</sup>-Embryo. Der Pfeil weist auf einen Verlust der Pad und eines Teils der Pdm hin. (D) *In situ*-Hybridisierung mit einer *hbn*-Sonde an einem Wildtyp-Embryo. Der Pfeil markiert die laterale Domäne LD der *hbn*-Expression.

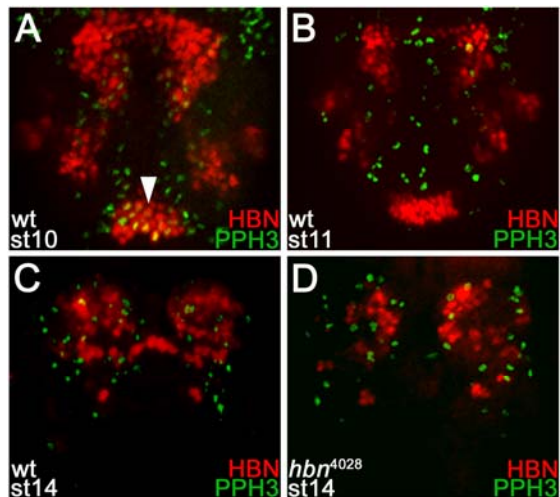
Der Vergleich von *hbn* mit den Kopflückengenen gibt zwar Hinweise auf ein mögliches Zielgen von *hbn* (*l'sc*) und auf putative Regulatoren der frühen *hbn*-Expression (*slp1* und *tll*), dennoch fehlt immer noch ein Anhaltspunkt, durch welche Vorgänge ein Verlust der *hbn*-Funktion die beobachteten Gehirndefekte verursacht. So wäre es möglich, dass die frühe Expression von *hbn* keinen Einfluss auf die Bildung der Gehirnstrukturen hat, sondern erst die Expression in späteren Stadien für diese Bereiche wichtig wird.

#### 4.6 Die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur

Die Abwesenheit von Organstrukturen, wie es im embryonalen Gehirn homozygoter *hbn*-Mutanten beobachtet wird, kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Es kann z.B. die Apoptose organspezifischer Zellen eine Rolle spielen, die zu einem Verlust bestimmter Strukturen des Organs führt. Auch eine Veränderung des Proliferationsmusters von Zellen kann Strukturveränderungen von Organen zur Folge haben, wenn Zellen nicht mehr proliferieren, die dies im Normalfall tun. Zu Defekten in der Organentwicklung kann es auch kommen, wenn Zellen nicht mehr ihr vorbestimmtes Schicksal eingehen und sich zu anderen Zelltypen entwickeln. Es kann auch vorkommen, dass bestimmte organspezifische Zellen zwar vorhanden sind, sich aber aus verschiedenen Gründen nicht an der richtigen Position befinden. Alle diese Ursachen können dazu führen, dass im Verlauf der Entwicklung bestimmte Strukturen fehlen.

Es wurde untersucht, welche dieser Ursachen den Verlust protocerebraler Strukturen und der präoralen Gehirnkommisur von homozygoten *hbn*-Mutanten bewirkt. Im ersten Schritt

wurde das Proliferationsverhalten Hbn-positiver Zellen im Wildtyp und in *hbn*-Mutanten analysiert. Ein geeigneter Marker, um die Proliferation von Zellen darzustellen, ist der Antikörper anti-Phosphohiston H3 (Bello *et al.*, 2006). Phosphohiston H3 (PPH3) ist spezifisch für Zellen, die sich in der Mitose befinden. Es wurden Doppelfärbungen mit anti-Hbn- und anti-PPH3-Antikörpern an Wildtyp-Embryonen und an *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen durchgeführt. Das Ergebnis der Doppelfärbungen zeigt Abb. 4.29.

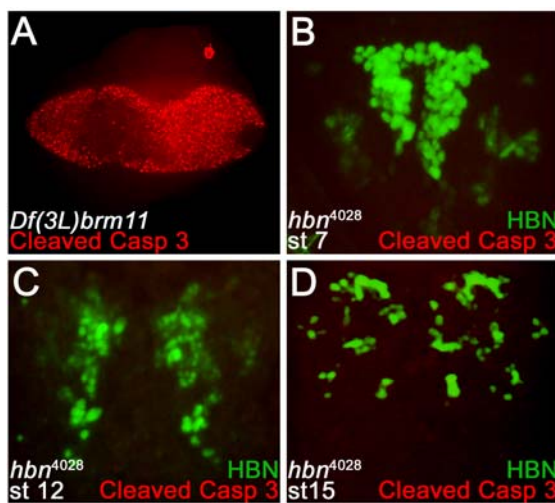


**Abb. 4.29: Analyse des Proliferationsverhaltens Hbn-positiver Zellen im Wildtyp und in *hbn*-Mutanten.** Anti-Hbn- und anti-PPH3-Doppelantikörperfärbung an Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombinationen sind farblich entsprechend dargestellt. Alle Ansichten sind von dorsal mit anteriorem Pol unten. (A) Wildtyp-Embryo, Embryonalstadium 10. Die Pfeilspitze markiert die clypeolabrale Expressionsdomäne von *hbn*. (B) Wildtyp-Embryo, Embryonalstadium 11. (C) Wildtyp-Embryo, Embryonalstadium 14. (D) *hbn*<sup>4028</sup>-Embryo, Embryonalstadium 14.

Während der Embryonalentwicklung eines Wildtyp-Embryos lässt sich nur in sehr wenigen Hbn-positiven Zellen Proliferation nachweisen (Abb. 4.29A-C). Diese Zellen befinden sich hauptsächlich im clypeolabralen Bereich (Abb. 4.29A, Pfeilspitze). Während des Embryonalstadiums 7 findet man viele proliferierende Zellen im Bereich der DMD, die jedoch nicht Hbn-positiv sind, sondern sich zwischen den Hbn-positiven Zellen befinden (nicht gezeigt). Im Vergleich zum Wildtyp kann in homozygoten *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten weder eine Zunahme noch eine Abnahme des Proliferationsverhaltens festgestellt werden (Abb. 4.29D).

Die Ausprägung des Gehirnphänotyps in *hbn*-Mutanten hat seine Ursache also nicht in einem veränderten Proliferationsmuster von Hbn-positiven Zellen. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob in *hbn*-Mutanten eine verstärkte Apoptoseaktivität nachgewiesen werden kann. Apoptotische Zellen können mit Hilfe des Antikörpers anti-Cleaved-Caspase-3 nachgewiesen werden (Brennecke *et al.*, 2003). Da der Apoptose-Nachweis in *Drosophila*-Embryonen relativ schwierig ist, wurde dieser Antikörper zunächst an Embryonen der Defizienz *Df(3L)brm11* getestet. Diesen Embryonen fehlt u.a. das *thread*-Gen, das *Drosophila*-Homolog des Gens inhibitor of apoptosis 1, d.h. sie sterben bereits in einem sehr frühen Stadium aufgrund verstärkter Apoptose ab und können deshalb als Positivkontrolle dienen. Eine Färbung mit dem anti-Cleaved-Caspase-3-Antikörper an diesen Embryonen zeigt ein

positives Ergebnis (Abb. 4.30A), so dass dieser Antikörper für Doppelfärbungen in Kombination mit einem anti-Hbn-Antikörper an *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen eingesetzt werden kann.

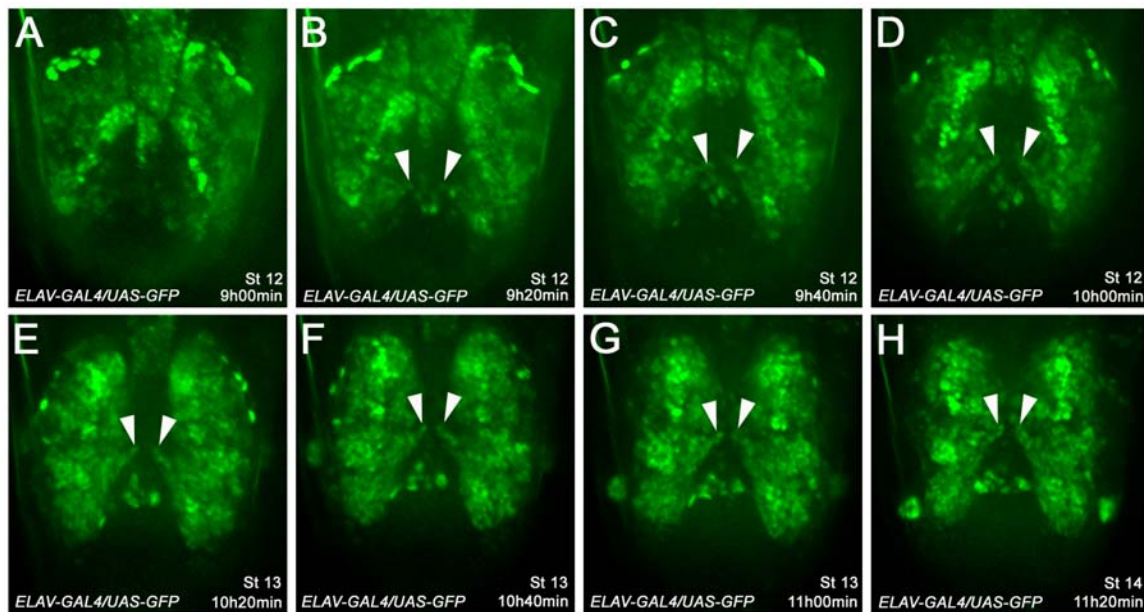


**Abb. 4.30: Untersuchung homozygoter *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen auf Apoptose.** Konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. (A) Anti-Cleaved-Caspase-3-Färbung an *Df(3L)brm11*-Embryo (Positivkontrolle). Laterale Sicht, anteriorer Pol links. (B, C, D) Doppelfärbung mit anti-Hbn- und anti-Cleaved-Caspase-3-Antikörpern an *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen. Dorsale Sicht, anteriorer Pol unten. (B) Stadium 7. (C) Stadium 12. (D) Stadium 15.

Es wurden unterschiedliche Embryonalstadien von *hbn*<sup>4028</sup> untersucht, die mit einem anti-Cleaved-Caspase-3- und einem anti-Hbn-Antikörper gefärbt worden waren. In keinem dieser Stadien konnte Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 4.30B-D).

Auch homozygote *hbn*<sup>15227</sup>-Embryonen wurden auf diese Weise auf Veränderungen im Proliferationsverhalten und auf eine gesteigerte Apoptoserate untersucht (nicht gezeigt), doch auch hier konnten keine Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die naheliegende Vermutung, dass die Gehirndefekte in *hbn*-Mutanten aufgrund fehlerhafter Proliferation oder vermehrter Apoptose von Zellen zustande kommen, wurde hiermit widerlegt.

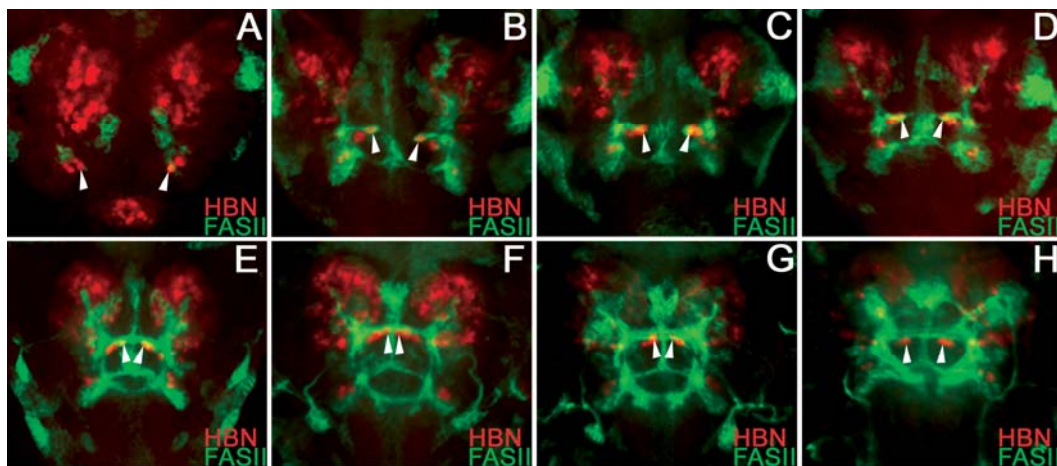
Um Hinweise zu erhalten, wie der *hbn*-Gehirnphänotyp, insbesondere der Verlust der präoralen Gehirnkommisur, etabliert wird, wurde die Bildung dieser Struktur unter wildtypischen Bedingungen näher untersucht. Fliegen der Treiberlinie *Elav-GAL4* wurden mit Fliegen der Linie *UAS-Stinger-GFP* gekreuzt, um GFP in allen Neuronen zu exprimieren und die Gehirnentwicklung am lebenden Embryo verfolgen zu können. Die GFP-Expression beginnt in den *Elav-GAL4/UAS-Stinger-GFP*-Embryonen etwa neun Stunden nach der Eiablage im Embryonalstadium 12 (Abb. 4.31A).



**Abb. 4.31: Verlauf der embryonalen Gehirnentwicklung eines *Drosophila*-Embryos in den Stadien 12 bis 14.** Konfokale Aufnahmen eines Elav-GAL4/UAS-Stinger-GFP-Embryos in Zeitabständen von 20 min (200fache Vergrößerung). Die Pfeilköpfe markieren in Richtung der Mittellinie einwandernde Elav-positive Neurone im Bereich der sich bildenden präoralen Gehirnkommisur.

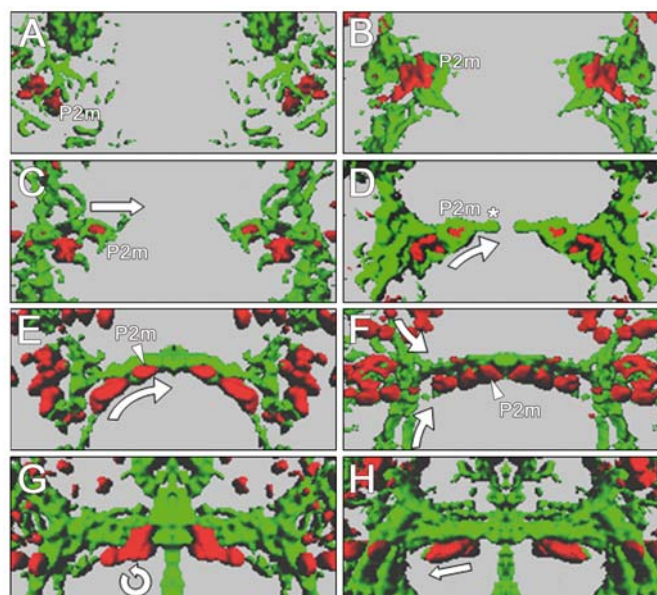
Im Verlauf der weiteren Embryonalentwicklung bilden sich die Gehirnhemisphären und sind dabei bestimmten morphologischen Bewegungen unterworfen. Außerdem fällt eine Gruppe von Neuronen auf, die sich aus dem medialen Bereich heraus in Richtung der Mittellinie bewegen (Abb. 4.31A-H, Pfeilköpfe). Diese Neurone befinden sich in dem Bereich, in dem sich die präorale Gehirnkommisur ausbildet und stellen die von Therianos *et al.* (1995) postulierte interhemisphärische Brücke dar. Die Kolokalisationsstudien mit Elav und Hbn hatten Hinweise darauf gegeben, dass die Neurone dieser interhemisphärischen Brücke Hbn-positiv sind (Abb. 4.10F). Um zu untersuchen, ob und in welcher Weise die mit der präoralen Gehirnkommisur assoziierten Hbn-positiven Neurone an der Bildung dieser Struktur beteiligt sind, wurde die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur in verschiedenen Embryonalstadien von Wildtyp-Embryonen mit den Markern Hbn und FasII betrachtet.

Aus Abb. 4.32 wird ersichtlich, dass die Hbn-positiven P2m-Neurone der beiden Gehirnhemisphären sich während der Embryonalstadien 12 bis 13 einander nähern (Abb. 4.32A, B, C, D, Pfeilköpfe), bis im Bereich der Mittellinie ein Kontakt der Neurone hergestellt wird (Abb. 4.32E, F). Hinter den P2m-Neuronen bewegen sich jeweils zwei weitere Hbn-positive Neurone her, so dass eine Brückenstruktur entsteht, die von Pionieraxonen dazu benutzt wird, den Abstand zwischen den beiden Hemisphären zu überwinden. Etwa ab dem Embryonalstadium 16 bewegen sich die Hbn-positiven Neurone wieder in lateraler Richtung von der Mittellinie weg (Abb. 4.32G, H, Pfeilköpfe).



**Abb. 4.32: Bildung der präoralen Gehirnkommisur in Wildtyp-Embryonen.** Anti-FasII- und anti-Hbn-Doppelantikörperfärbung an Embryonen, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Alle Embryonen aus dorsaler Sicht, anteriorer Pol unten. (A) Embryonalstadium 12. (B) Frühes Embryonalstadium 13. (C) Embryonalstadium 13. (D) Spätes Embryonalstadium 13. (E) Embryonalstadium 14. (F) Embryonalstadium 15. (G) Embryonalstadium 16. (H) Embryonalstadium 17. Die Pfeilspitzen markieren die Position der Hbn-positiven P2m-Neurone.

Um diesen Mechanismus genauer untersuchen zu können, wurden aus den konfokalen Bildstapeln, die in Abb. 4.32 dargestellt sind, mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Imaris 3D-Modelle generiert. Diese 3D-Modelle sind in Abb. 4.33 gezeigt.

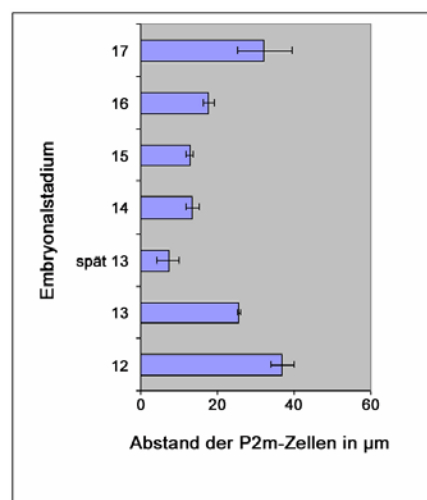


**Abb. 4.33: Modell der Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur in *Drosophila*-Embryonen.** Die in Abb. 4.32 gezeigten konfokalen Bildstapel wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Imaris in 3D-Modelle umgewandelt. Es wurde jeweils nur eine Gehirnhemisphäre umgewandelt, die anschließend dupliziert und gespiegelt wurde. In rot sind Hbn-positiv Neurone dargestellt, in grün FasII-positiv Neurone und Axone. (A) Embryonalstadium 12. (B) Frühes Embryonalstadium 13. (C) Embryonalstadium 13. (D) Spätes Embryonalstadium 13. (E) Embryonalstadium 14. (F) Embryonalstadium 15. (G) Embryonalstadium 16. (H) Embryonalstadium 17. Die Pfeile in C-E, G und H markieren die Bewegungsrichtung der P2m-Neurone, der obere Pfeil in F die Bildung von DCT, der untere Pfeil in F die Bildung von VCT. Der Stern in E bezeichnet die P2m-Neurone kurz vor dem ersten Kontakt.

Man kann erkennen, dass sich die Hbn-positiven P2m-Neurone der beiden Gehirnhemisphären aufeinander zu bewegen (Abb. 4.33A-C, Pfeil) und sich während des Embryonalstadiums 13 an der Mittellinie treffen. Die Wachstumskegel der beiden P2m-Neurone gelangen im späten Embryonalstadium 13 in Kontakt (Abb. 4.33D, Stern) und verbinden die beiden Hemisphären miteinander. Im Kielwasser der P2m-Neurone wandern weitere Hbn-positive Neurone in Richtung der Mittellinie und bilden während des Embryonalstadiums 14 eine interhemisphärische Brücke (Abb. 4.33E). Nun können die Pionieraxone der deuto/tritocerebralen Neurone und der P2l-Neurone die Kluft zwischen den Gehirnhemisphären überwinden, indem sie sich an dieser Brücke orientieren (Abb. 4.33E, F). Der Teil der Kommissur, der von diesen Axonen gebildet wird, heißt ventraler Kommissurtrakt (VCT). Während der Embryonalstadien 15 und 16 werden die dorsalen Kommissurtrakte (DCT) der präoralen Gehirnkommisur gebildet, die aus den Neuronenclustern P3l und P4l hervorgehen (Nassif *et al.*, 1998) (Abb. 4.33G, H). Die Hbn-positiven Neurone ändern ihre Bewegungsrichtung (Abb. 4.33G) und ziehen sich in Richtung der longitudinalen Axone zurück (Abb. 4.33H).

Die Tatsache, dass eine solche interhemisphärische Hbn-positive Brücke gebildet wird, weist darauf hin, dass diese Neurone eine wichtige Rolle bei der Entstehung der präoralen Gehirnkommisur spielen.

Um abzuschließen, dass sich die P2m-Neurone während der Bildung der präoralen Gehirnkommisur tatsächlich einander räumlich annähern, wurde eine statistische Auswertung der einzelnen Embryonalstadien durchgeführt. Wildtyp-Embryonen wurden mit einem anti-Hbn-Antikörper gefärbt und der Abstand zwischen den Zellkernen der beiden Hbn-positiven P2m-Neurone gemessen. Das Ergebnis dieser statistischen Auswertung zeigt Abb. 4.34.



**Abb. 4.34: Statistische Auswertung der Abstände zwischen den P2m-Neuronen während der Embryonalentwicklung.** Wildtyp-Embryonen wurden mit einem anti-Hbn-Antikörper gefärbt und die Abstände zwischen den Hbn-positiven P2m-Neuronen in den Embryonalstadien 12, 13, spät 13, 14, 15, 16 und 17 gemessen.

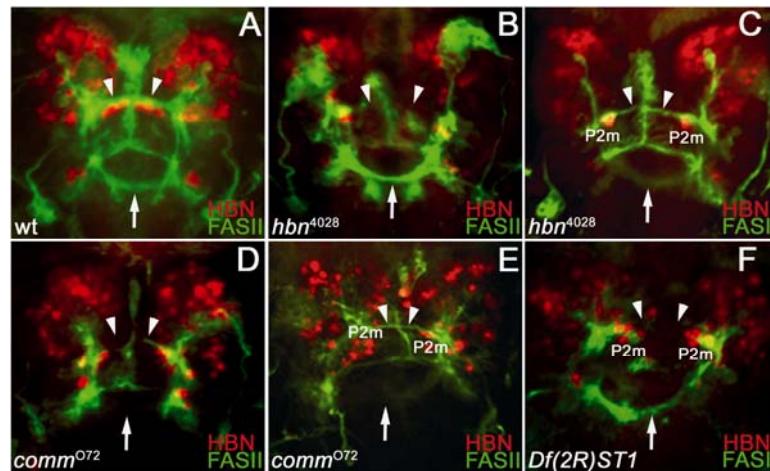


Wie Abb. 4.34 zeigt, findet man während der Embryonalstadien 12 und 17 den mit etwa 36µm größten Abstand zwischen den P2m-Neuronen. Zu Beginn des Stadiums 13 verringert sich der Abstand auf 25µm und beträgt im späten Embryonalstadium 13 nur noch 7µm. Anschließend vergrößert sich der Abstand zwischen den P2m-Neuronen wieder und beträgt während der Stadien 14 und 15 dann 13µm und im Stadium 16 wieder 18µm.

Die korrekte Bildung der interhemisphärischen Brücke scheint einen kritischen Schritt für die Bildung der präoralen Gehirnkommisur darzustellen. Da die brückenbildenden Neurone Hbn-positiv sind und die präorale Gehirnkommisur in *hbn*-Mutanten fehlt, ist zu vermuten, dass bei diesen Mutanten die Brückenneurone nicht richtig positioniert oder sogar vollständig fehlen. Dies sollte an *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen, in denen, wie bereits erwähnt, *hbn*-Expression nachgewiesen kann, untersucht werden. Es wurden Wildtyp- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen mit anti-Hbn- und anti-FasII-Antikörpern gefärbt, um die Gehirnstruktur und die Lokalisation der brückenbildenden Neurone sichtbar zu machen, und konfokal ausgewertet. In Abb. 4.35A und B ist gezeigt, dass in *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen des Stadiums 15 im Vergleich zum Wildtyp die P2m-Neurone und auch die anderen Hbn-positiven Brückenneurone sich nicht mehr in Richtung der Mittellinie bewegen und stattdessen im Bereich der longitudinalen Axone verbleiben. Die Folge ist, dass sich keine präorale Gehirnkommisur bilden kann (Abb. 4.35B, Pfeilköpfe). Den Beweis, dass die P2m-Neurone nicht fehlen, sondern nicht korrekt positioniert werden, findet man bei schwachen *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten: Hier wandern die P2m-Neurone noch ein kurzes Stück ein und lassen sich dadurch eindeutig identifizieren (Abb. 4.35C).

Wenn die Brückenneurone tatsächlich essentiell für die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur sind, sollten diese auch in anderen Kommisurmutanten an falscher Stelle lokalisiert sein. Zwei Gene, die ebenfalls eine Rolle bei der Bildung der präoralen Gehirnkommisur spielen, sind *commisureless (comm)* und *jing*. In *comm*-Mutanten werden die Kommisuren des ventralen Nervenstrangs nicht gebildet (Seeger *et al.*, 1993), und auch die Gehirnkommisuren entwickeln sich mit Ausnahme der Frontalkommisur nicht (Therianos *et al.*, 1995). *Jing* ist für die korrekte Bildung des primären Axongerüsts des Gehirns erforderlich, so dass in *jing*-Mutanten die präorale Gehirnkommisur nicht ausgebildet werden kann (Sedaghat und Sonnenfeld, 2002). Es wurden sowohl Embryonen der Mutante *comm*<sup>072</sup> als auch Embryonen der Defizienz *Df(2R)ST1*, die unter anderem für das *jing*-Gen defizient ist und statt einer *jing*-Mutante eingesetzt wurde, mit anti-Hbn- und anti-FasII-Antikörpern gefärbt, um zu untersuchen, ob auch bei diesen Mutanten die Hbn-

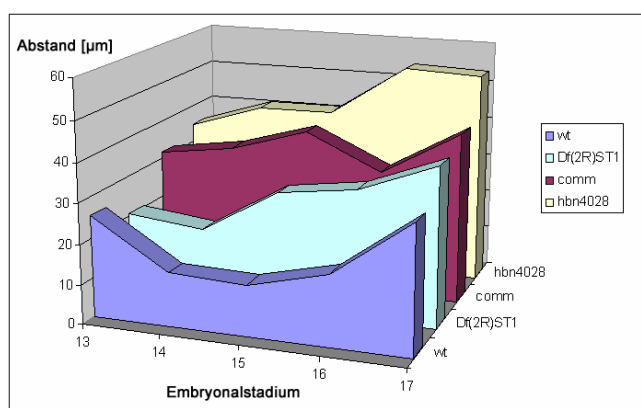
positiven Brückenneurone nicht richtig positioniert sind. Die konfokale Auswertung der Antikörperfärbung ist in Abb. 4.35D, E, F gezeigt.



**Abb. 4.35: Die Neurone der interhemisphärischen Brücke sind in Mutanten mit defekter präoraler Gehirnkommisur falsch lokalisiert.** Doppelfärbungen mit anti-Hbn- und anti-FasII-Antikörpern an Embryonen des Stadiums 15, konfokale Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombination ist farblich entsprechend dargestellt. Alle Ansichten von dorsal mit anteriorem Pol unten. (A) Wildtyp-Embryo. (B, C) *hbn*<sup>4028</sup>-Embryo. (D, E) *comm*<sup>072</sup>-Embryo. (F) *Df(2R)ST1*-Embryo. Dieser Defizienz fehlt u.a. das *jing*-Gen. Die Pfeilköpfe markieren die wildtypische Position der präoralen Gehirnkommisur, Pfeile die wildtypische Position der tritocerebralen Gehirnkommisur.

Auch in homozygoten *comm*<sup>072</sup>-Mutanten sind die Hbn-positiven Brückenneurone an falscher Stelle lokalisiert und bewegen sich nicht zur Mittellinie (Abb. 4.35D, E). Eine ähnliche Situation findet man bei *Df(2R)ST1*-Embryonen: Die P2m-Neurone bleiben im Bereich der longitudinalen Axone und können den Abstand zwischen den Hemisphären nicht überwinden (Abb. 4.35F).

Um abzuschließen, dass im Vergleich zum Wildtyp in Kommissurmutanten tatsächlich die Positionierung der P2m-Neurone gestört ist, wurde wiederum eine statistische Auswertung durchgeführt. Es wurden bei anti-Hbn- und anti-FasII-gefärbten *hbn*<sup>4028</sup>-, *comm*<sup>072</sup>- und *Df(2R)ST1*-Embryonen die Abstände zwischen den P2m-Neuronen im Verlauf der Embryonalentwicklung gemessen. Die Ergebnisse dieser Auswertung zeigt Abb. 4.36.



**Abb. 4.36: Statistische Auswertung der Abstände zwischen den P2m-Neuronen während der Embryonalentwicklung von Gehirnkommisurmutanten im Vergleich zum Wildtyp.** Wildtyp-, *Df(2R)ST1*-, *comm*<sup>072</sup>- und *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen wurden mit einem anti-Hbn-Antikörper gefärbt und die Abstände zwischen den Hbn-positiven P2m-Neuronen in den Embryonalstadien 13, 14, 15, 16 und 17 gemessen.

Wie aus Abb. 4.36 ersichtlich wird, sind bei den Mutanten *hbn*<sup>4028</sup>, *comm*<sup>072</sup> und *Df(2R)ST1* zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung die P2m-Neurone einander so weit genähert wie im Wildtyp. Insbesondere während der Embryonalstadien 14 und 15, wenn die P2m-Neurone im Wildtyp den geringsten Abstand zeigen, sind in den Gehirnkommisurmutanten die P2m-Neurone viel zu weit voneinander entfernt, um die Lücke zwischen den beiden Gehirnhemisphären zu überwinden. Den größten Abstand zwischen den P2m-Neuronen zeigt die *hbn*-Mutante. Diese fehlerhafte Lokalisation der Brückenneurone ist der Grund dafür, dass in den untersuchten Mutanten keine präorale Gehirnkommisur gebildet werden kann. Tendenziell wird der Abstand der P2m-Neurone bei den untersuchten Mutanten während der Embryonalentwicklung sogar immer größer, was sich durch ein Auseinanderdriften der Gehirnhemisphären, denen die stabilisierende präorale Gehirnkommisur fehlt, erklären lässt.

#### **4.7 Identifizierung von Genen, die an der Bildung der präoralen Gehirnkommisur beteiligt sind**

Die Untersuchung der Funktion von *hbn* hatte ergeben, dass die Aktivität dieses Gens unerlässlich für eine korrekte Bildung der präoralen Gehirnkommisur ist: Liegt ein homozygoter Funktionsverlust von *hbn* vor, ist die Entwicklung dieser wichtigen Kommisur gestört. Es wurde gezeigt, dass im Wildtyp die Hbn-positiven P2m-Neurone gefolgt von weiteren Hbn-positiven Neuronen in Richtung Mittellinie wandern und auf diese Weise eine Art Brücke aus Neuronen bilden. Die Axone, die an der Bildung der präoralen Gehirnkommisur beteiligt sind, benutzen diese Struktur, um die Kluft zwischen den beiden Gehirnhemisphären zu überwinden und in die gegenüberliegende Hirnhälfte zu projizieren. In *hbn*-Mutanten sind die P2m- und die übrigen Brückenneurone nicht mehr in der Lage, sich zur Mittellinie zu bewegen, so dass die interhemisphärische Brücke nicht ausgebildet wird. Dies hat zur Folge, dass die Pionieraxone sich nicht adäquat orientieren können und die präorale Gehirnkommisur nicht richtig etabliert wird.

Die Bildung der präoralen Gehirnkommisur ist ein komplizierter Prozess, und obwohl der grundlegende Mechanismus aufgeklärt wurde, bleiben noch viele Fragen offen. Besonders die Etablierung der interhemisphärischen Brücke muss genauer untersucht werden. Auf welche Weise orientieren sich die Hbn-positiven Brückenneurone, um die interhemisphärische Brücke überhaupt bilden zu können? Auf welche Signale reagieren diese Neurone, und wo sind mögliche Signalzentren lokalisiert? Durch welchen Mechanismus erkennen die

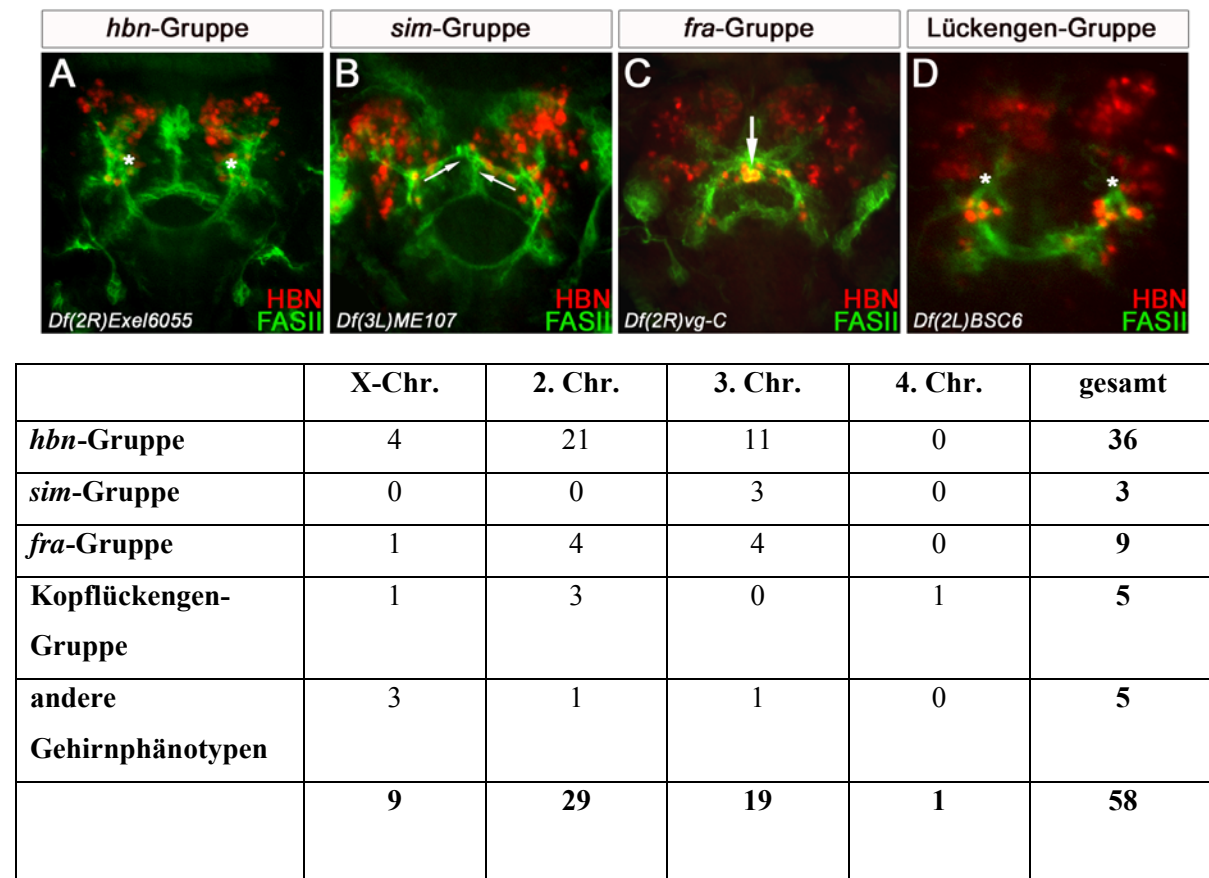
Pionieraxone die Neurone der interhemisphärischen Brücke, die sie als Orientierungshilfe benutzen sollen, um zur gegenüberliegenden Gehirnhemisphäre zu gelangen?

Um diese Fragen beantworten zu können und damit den Prozess der Brücken- und Kommissurbildung besser zu verstehen, müssen möglichst viele unterschiedliche Mutanten zur Verfügung stehen, die Defekte dieser Strukturen aufweisen. Bisher sind nur die Gene *comm* und *jing* bekannt, deren Funktionsverlust einen solchen Phänotyp verursacht. Aus diesem Grund wurde entschieden, ein genomweites Screening nach neuen Komponenten der präoralen Kommissurbildung durchzuführen. Ermöglicht wird dieses Vorgehen durch Defizienzstämmen des Bloomington *Drosophila* Stock Centers. Jeder Stamm ist für eine bestimmte genomische Region defizient. Zurzeit sind 270 unterschiedliche Defizienzstämmen erhältlich, die das *Drosophila*-Genom zu 95% abdecken und als sogenannter „Deficiency Kit“ für jedes Chromosom zusammengefasst sind. Embryonen dieser Defizienzstämmen sollten mit dem axonalen Marker FasII auf Veränderungen der präoralen Gehirnkommisur und mit dem Marker Hbn auf Veränderungen der interhemisphärischen Brücke untersucht werden. Auf diese Weise sollte, wenn möglich, der Prozess der Kommissurbildung in seine einzelnen Schritte unterteilt werden. Defizienzen, die eine entsprechende Veränderung des embryonalen Phänotyps bewirken, sollten dann möglichst bis auf Einzelgenniveau eingeschränkt werden, um die Gene zu identifizieren, die für eine korrekte Bildung der interhemisphärischen Brücke und damit der präoralen Gehirnkommisur notwendig sind.

#### **4.7.1 Analyse des „Bloomington Deficiency Kits“ mit den Markern FasII und Hbn**

Es wurden Embryonen von insgesamt 250 Defizienzstämmen des „Bloomington Deficiency Kits“ analysiert. 39 dieser Stämme tragen Defizienzen des X-Chromosoms, 99 tragen Defizienzen des zweiten Chromosoms, 109 Stämme enthalten Defizienzen des dritten Chromosoms und 3 Stämme Defizienzen des vierten Chromosoms. Die Embryonen wurden in einer Doppelfärbung mit anti-FasII-Antikörpern als axonaler Marker und mit anti-Hbn-Antiserum als Marker für die P2m-Neurone und die übrigen Neurone der interhemisphärischen Brücke gefärbt, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und auf ihren Gehirnphänotyp untersucht. In erster Linie wurden die Struktur der präoralen Gehirnkommisur und das Wanderungsverhalten der Hbn-positiven Brückenneurone beurteilt. Die beobachteten Gehirnphänotypen wurden in fünf unterschiedliche Gruppen eingeteilt: die *hbn*-Gruppe, die *sim*-Gruppe, die *fra*-Gruppe, die Lückengen-Gruppe und eine Gruppe von

Gehirnphänotypen, die sich in keine der genannten Gruppen einordnen lassen. Beispiele für diese Gruppen sind in Abb. 4.37 dargestellt.



**Abb. 4.37: Einteilung der beim Defizienzen-Screening beobachteten Gehirnphänotypen in verschiedene Gruppen.** Dargestellt sind exemplarisch Defizienzen, die den jeweiligen Phänotyp zeigen. Konfokale Aufnahmen, Vergrößerung 200fach. Dorsale Sicht, anteriorer Pol unten. (A, C, D) Embryonalstadium 16. (B) Embryonalstadium 14. Sterne in A und D weisen auf protocerebrale Verluste hin, die Pfeile in B auf den zu steilen Einwanderungswinkel der Hbn-positiven Brückenneurone und der Pfeil in C auf die Konzentration der Hbn-positiven Neurone an der Mittellinie. Unterhalb der Aufnahmen ist die Anzahl der während des Screens den jeweiligen Gruppen zugeordneten Defizienzstämmen inklusive der chromosomalen Lokation angegeben.

### Die *hbn*-Gruppe

Der *hbn*-Gruppe wurden Defizienzstämmen zugeordnet, deren Embryonen einen Phänotyp zeigen, der dem Gehirnphänotyp homozygoter *hbn*-Mutanten gleicht: Die P2m-Neurone und die übrigen Hbn-positiven Brückenneurone wandern nicht zur Mittellinie, sondern verbleiben im Bereich der longitudinalen Konnektive des Gehirns. Eine präorale Gehirnkommisur bildet sich nicht oder nur sehr rudimentär aus, eventuell fehlen auch protocerebrale Bereiche (Abb. 4.37A).

### Die *sim*-Gruppe

Charakteristisch für die *sim*-Gruppe ist ein zu steiler Einwanderungswinkel der P2m- und der Brückenneurone, wodurch auch ein zu steiler Winkel der präoralen Gehirnkommisur bedingt ist (Abb. 4.37B). Benannt wurde diese Gruppe nach dem Gen *single minded (sim)*, da dieser Phänotyp zuerst bei *sim*-Mutanten identifiziert wurde.

### Die *fra*-Gruppe

Bei Defizienzstämmen der *fra*-Gruppe wandern deutlich mehr Hbn-positive Neurone in Richtung Mittellinie als im Wildtyp, und in manchen Fällen wandern diese Neurone zu weit ein und konzentrieren sich im Bereich der Mittellinie (Abb. 4.37C). Dieses Verhalten wurde erstmalig bei *frazzled (fra)*-Mutanten beobachtet. Die präorale Gehirnkommisur besteht bei Mutanten dieser Phänotypgruppe meist aus deutlich mehr Axonen, als das bei Wildtyp-Embryonen der Fall ist.

### Die Lückengen-Gruppe

Defizienzstämme, die zu der Lückengen-Gruppe gehören, zeichnen sich dadurch aus, dass wie bei Lückengenmutanten wie z.B. *otd* oder *tll* komplette Gehirnbereiche nicht vorhanden sind (Abb. 4.37D).

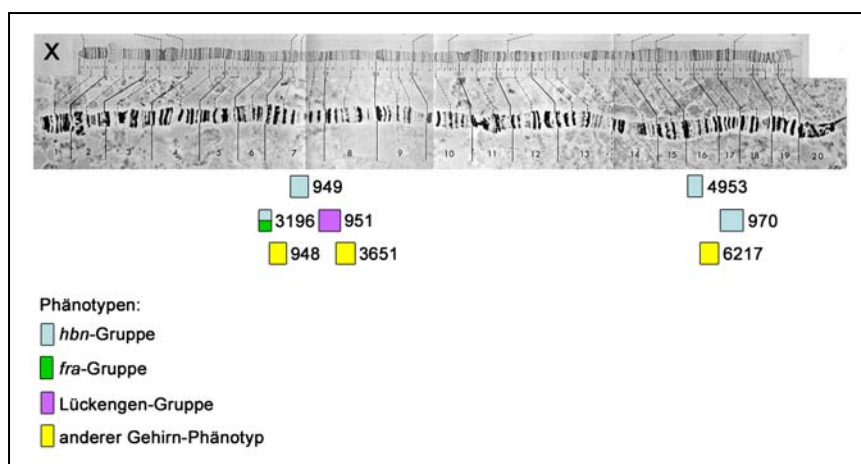
In einer fünften Gruppe wurden alle Defizienzstämme mit Gehirnphänotypen, die sich keiner der vier Hauptgruppen zuordnen lassen, zusammengefasst.

Die Tabelle in Abb. 4.37 zeigt, wie viele Defizienzstämme zu jeder Gruppe identifiziert wurden.

Insgesamt zeigten 58 Defizienzstämme der 250 analysierten Stämme einen embryonalen Gehirnphänotyp, der sich in die genannten Gruppen einordnen lässt. 36 Stämme wurden gefunden, die sich der *hbn*-Gruppe zuordnen lassen. 4 dieser Stämme sind defizient für Bereiche des X-Chromosoms, 21 für Bereiche des zweiten Chromosoms und 11 für Bereiche des dritten Chromosoms. Für die *sim*-Gruppe wurden 3 Stämme gefunden, die alle defizient für Bereiche des dritten Chromosoms sind. 9 Stämme wurden der *fra*-Gruppe zugeordnet, von denen sich 1 Stamm auf das X-Chromosom und jeweils 4 Stämme auf das zweite und dritte Chromosom verteilen. 5 Defizienzstämme wurden der Lückengen-Gruppe zugewiesen. Jeweils einer dieser Stämme beinhaltet Defizienzen des X-Chromosoms bzw. des vierten Chromosoms, während 3 Stämme für Bereiche des zweiten Chromosoms defizient sind. 5 Stämme mit Auffälligkeiten des embryonalen Gehirns ließen sich in keine dieser Gruppen

einordnen und bilden deshalb eine eigene Gruppe. Ein Beispiel für diese Gruppe ist der Defizienzstamm Bl 3651 („Bl“ steht für die Nummerierung des Bloomington Stock Centers. Die genauen Bezeichnungen der Defizienzen sind im Anhang aufgelistet). Hier wird keine präorale Gehirnkommisur gebildet, obwohl die Hbn-positiven Brückenneurone korrekt eingewandert sind und die interhemisphärische Brücke vorhanden ist.

Die chromosomalen Lokalisationen der identifizierten Defizienzen, die einen spezifischen Defekt des embryonalen Gehirns zeigen, sind in den Abbildungen 4.38, 4.39, 4.40 und 4.41 graphisch dargestellt. Eine Auflistung der Defizienzen befindet sich außerdem im Anhang dieser Arbeit (Tab. 7.3).



**Abb. 4.38:** Graphische Darstellung der Lokalisation identifizierter X-chromosomaler Defizienzen, die einen spezifischen Defekt des embryonalen Gehirns zur Folge haben.

Unter den X-chromosomalen Defizienzstämmen fanden sich Stämme, die Phänotypen der *hbn*-Gruppe, der *sim*-Gruppe und Phänotypen zeigten, die sich in keine der definierten Gruppen einteilen lassen. Auffällig ist, dass die identifizierten Defizienzen zwei Cluster in den chromosomalen Regionen 6 bis 8 und den Bereichen 16 bis 18 bilden (Abb. 4.38).

Es wurden zweitchromosomale Defizienzstämmen identifiziert, die Vertreter der *hbn*-Gruppe, der *fra*-Gruppe und der Lückengen-Gruppe darstellen. Ein Stamm wurde der *hbn*- und auch gleichzeitig der *fra*-Gruppe zugeordnet, da einige Embryonen dieser Defizienz einen *hbn*-Phänotyp zeigen, aber auch Embryonen mit einem *fra*-Phänotyp gefunden wurden. Zwei Defizienzstämmen lassen sich keiner der definierten Gruppen zuordnen. Auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms befindet sich in den chromosomalen Regionen 21 bis 25 ein Cluster aus Defizienzen, die der *hbn*-Gruppe zugeordnet wurden. Auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms sind dagegen alle identifizierten Defizienzen, die einen Effekt zeigen, relativ gleichmäßig verteilt. Außerdem befindet sich auch hier eine Defizienz, die sowohl der *hbn*- als auch der *fra*-Gruppe zugeordnet wurde (Abb. 4.39).

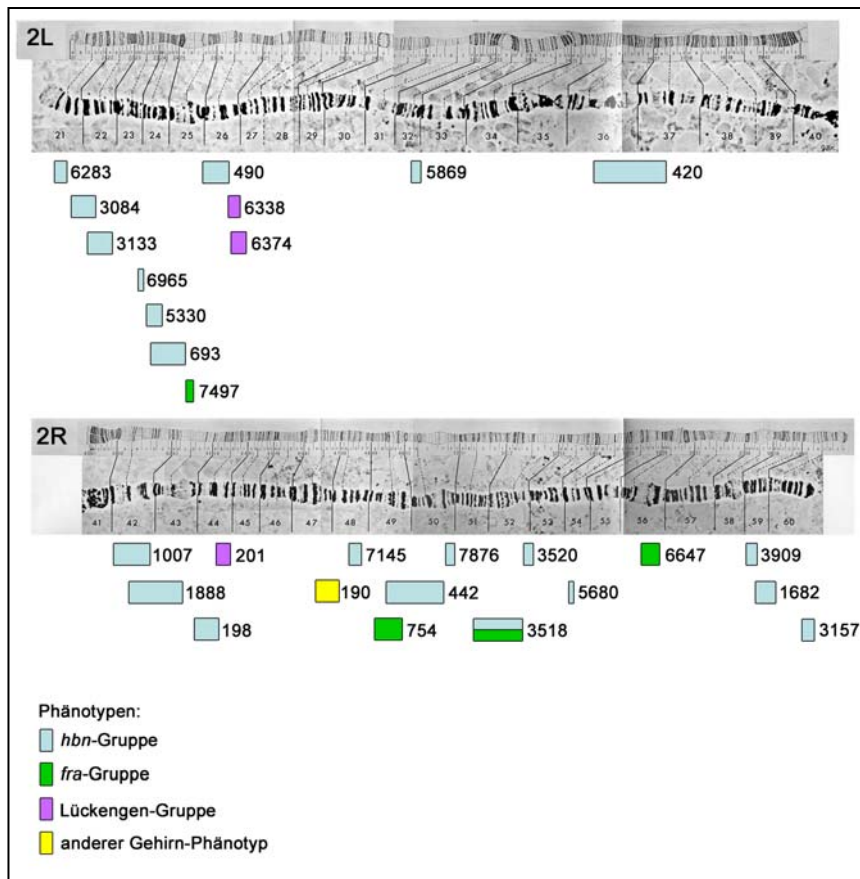


Abb. 4.39: Graphische Darstellung der Lokalisation identifizierter zweitchromosomaler Defizienzen, die einen spezifischen Defekt des embryonalen Gehirns zur Folge haben.

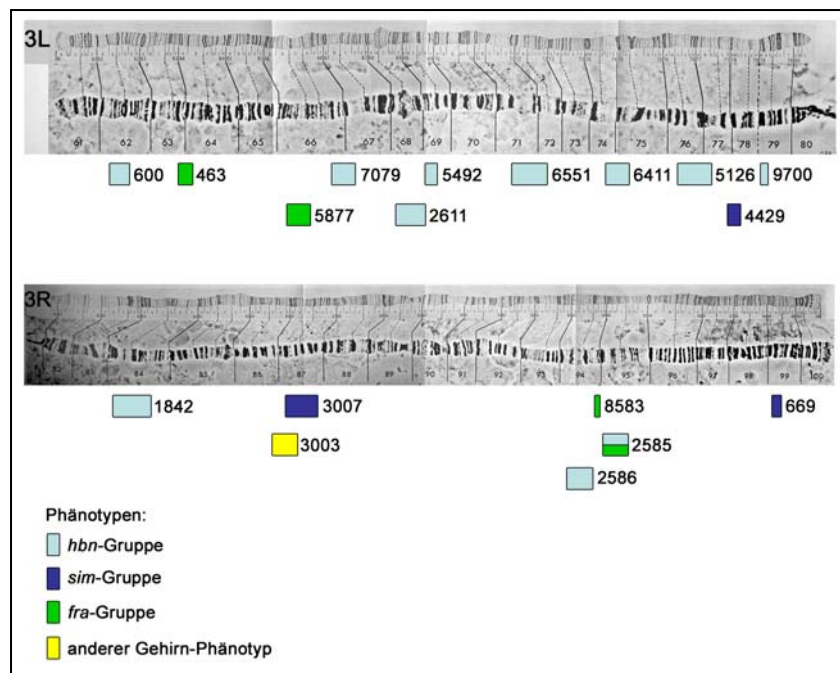
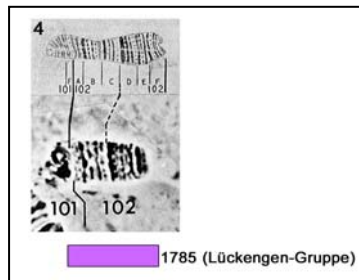


Abb. 4.40: Graphische Darstellung der Lokalisation identifizierter dritschromosomaler Defizienzen, die einen spezifischen Defekt des embryonalen Gehirns zur Folge haben.



Für das dritte Chromosom wurden Defizienzstämme ermittelt, deren Phänotyp in die *hbn*-Gruppe, die *sim*-Gruppe und die *fra*-Gruppe eingeordnet werden kann. Außerdem wurden zwei Defizienzstämme gefunden, die in keine der definierten Gruppen passen. Auf dem rechten Arm des Chromosoms liegen auffallend viele Bereiche, deren Verlust einen *hbn*-ähnlichen Phänotyp verursacht. Auch eine Defizienz, die neben einem Phänotyp der *hbn*-Gruppe auch einen Phänotyp der *fra*-Gruppe zeigt, ist hier lokalisiert (Abb. 4.40).



**Abb. 4.41:** Graphische Darstellung der Lokalisation einer identifizierten viertchromosomalen Defizienz, die einen spezifischen Defekt des embryonalen Gehirns zur Folge hat.

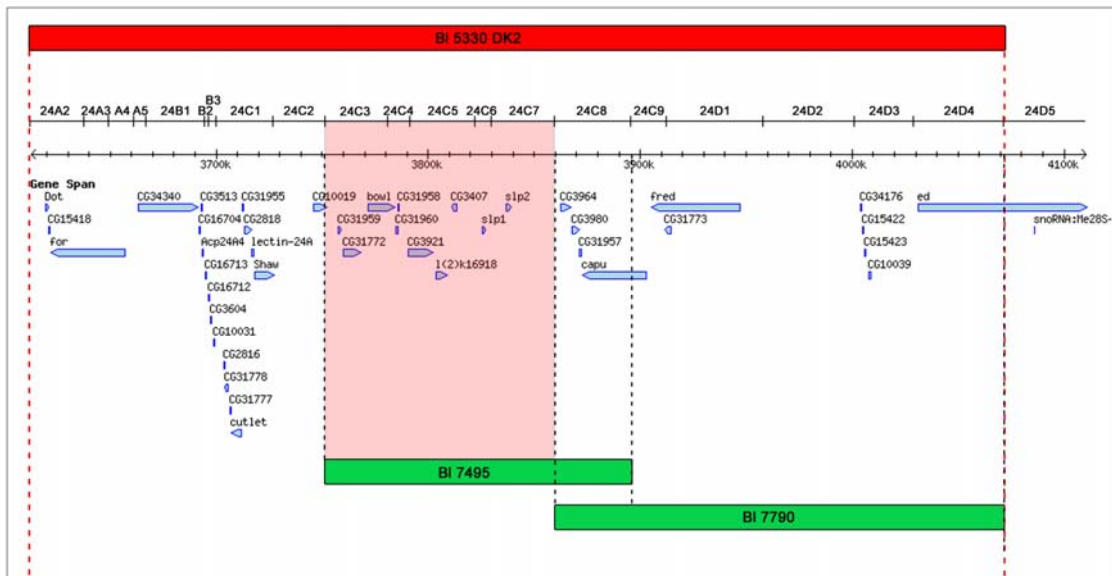
Das vierte Chromosom von *Drosophila* ist im Vergleich mit den anderen drei Chromosomen sehr klein. Es wurde ein Defizienzstamm identifiziert, der einen lückengenähnlichen Defekt des embryonalen Gehirns zeigt. Diese Defizienz umfasst fast das komplette Chromosom (Abb. 4.41).

#### 4.7.2 Feinkartierung der identifizierten Defizienzen

Die in den Defizienzstämmen deletierten Regionen sind in der Regel sehr groß und umfassen mehrere hundert kb. Das bedeutet, dass in jedem Defizienzstamm mindestens 50 Gene deletiert sind. Da es das Ziel dieses Defizienzen-Screens ist, möglichst viele einzelne Gene zu finden, die an der korrekten Einwanderung der Hbn-positiven Brückenneurone und der Bildung der präoralen Gehirnkommisur beteiligt sind, sollen die identifizierten Defizienzen, die einen Effekt zeigen, möglichst bis auf Einzelgenniveau eingeschränkt werden.

Zur näheren Eingrenzung der Bereiche, in denen sich Kandidatengene befinden, wurden anti-FasII- und anti-Hbn-Doppelfärbungen an Embryonen von weiteren 71 Defizienzstämmen des Bloomington Stock Centers durchgeführt, bei denen kleinere genomische Regionen deletiert sind (siehe Tab. 7.1 im Anhang). Nach Möglichkeit wurden für diese Einschränkungen „Exelixis“-Defizienzstämme mit exakt definierten Bruchpunkten ausgewählt. Diese Stämme wurden generiert, indem durch die Rekombination zweier P-Elemente, deren Integrationsort im Genom bereits bekannt war, Teile der dazwischenliegenden Region deletiert wurden.

Durch dieses Verfahren sind bei „Exelixis“-Stämmen die Bruchpunkte bis auf das Nukleotid genau bekannt (Parks *et al.*, 2004). Die Deletionsstämme wurden so gewählt, dass sie den deletierten Bereich des ursprünglich identifizierten Defizienzstammes nach Möglichkeit überlappend abdecken. Am Beispiel des Defizienzstammes BI 5330 (zweitchromosomale Defizienz, Lokalisation 24A2 bis 24D4), der anhand seines Phänotyps in die *hbn*-Gruppe eingeordnet wurde, soll an dieser Stelle die Vorgehensweise bei der näheren Eingrenzung gezeigt werden.



**Abb. 4.42: Genomische Lokalisation des deletierten Bereiches des Bloomington-Defizienzstammes BI 5330.** Neben der Lokalisation des im Stamm BI 5330 (rot) deletierten Bereiches (rote gestrichelte Linie) sind die zur weiteren Einschränkung dieses Bereiches verwendeten Stämme BI 7495 und BI 7790 (grün) mit der Lage ihrer deletierten Bereiche eingezeichnet. Die Bereiche sind teilweise überlappend, wobei die äußeren Grenzen durch gestrichelte Linien markiert sind. Der genauer eingegrenzte Bereich, der die entsprechenden Kandidatengene enthält, ist rot unterlegt.

In Abb. 4.42 ist dargestellt, dass sich der deletierte Bereich des Defizienzstammes BI 5330 etwa von Region 24A2 bis 24D4 erstreckt und insgesamt ca. 41 Gene umfasst. Die Bestimmung der deletierten Bereiche erfolgt bei Defizienzstämmen des „Deficiency Kits“ cytologisch über das Bandenmuster der Chromosomen, so dass die Bruchpunkte nicht so genau bekannt sind wie bei Exelixis-Defizienzen. Das Gen, dessen Funktionsverlust für den *hbn*-ähnlichen Phänotyp dieses Defizienzstammes verantwortlich ist, muss innerhalb dieser Region lokalisiert sein. Um den Bereich näher einzugrenzen, wurden die Defizienzstämme BI 7495 (Exelixis) und BI 7790 (Exelixis) eingesetzt. Die Lage ihrer Deletionen unterteilt die Ausgangsdefizienz des Stammes BI 5330 in kleinere Regionen. Embryonen dieser beiden Defizienzstämme wurden mit anti-FasII- und anti-Hbn-Antikörpern gefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, bei welchem der Defizienzstämme sich der gleiche Gehirnphänotyp nachweisen lässt wie bei dem Ausgangsdefizienzstamm BI 5330.

Dies war bei Stamm Bl 7495 der Fall. Das bedeutet, dass sich das gesuchte Gen in dem genomischen Bereich befindet, der im Stamm Bl 7495 deletiert ist; dabei handelt es sich um den Bereich 24C3 bis 24C8. Der Stamm Bl 7790 zeigt dagegen den ursprünglichen Phänotyp nicht. Da die defizienten Regionen von Bl 7495 und Bl 7790 im Bereich 24C8 überlappen, kann der Bereich, in dem das gesuchte Gen liegt, weiter auf den Bereich 24C3 bis 24C7 eingeschränkt werden (Abb. 4.42, rot unterlegter Bereich). In diesem Bereich sind zehn bekannte Gene lokalisiert. Um festzustellen, welches dieser Gene für den Phänotyp verantwortlich ist, müssen nun Einzelmutanten dieser Gene gefärbt und auf den gesuchten Phänotyp analysiert werden. Bisher wurden bereits *spl1*-Mutanten untersucht, die den Effekt jedoch nicht zeigen, d.h. *spl1* kann ausgeschlossen werden, so dass nur die übrigen neun Gene in Betracht kommen.

#### 4.7.3 Putative Komponenten der Kommissurbildung

Die während des Screenings identifizierten Defizienzstämmen, die einen der gesuchten Effekte zeigten, wurden so weit wie möglich auf die beschriebene Weise weiter eingeschränkt. Zum Teil wurden auch ausgewählte einzelne Gene identifizierter Bereiche getestet, die bekanntermaßen an der Gehirn- oder Nervensystementwicklung beteiligt sind. Auf diese Weise konnten 21 von 54 Defizienzen eingengt werden. In sieben Fällen konnten sogar einzelne Gene identifiziert werden, die an dem jeweils beobachteten Effekt beteiligt sein könnten. Die einzelnen Defizienzstämmen sind zusammen mit den für die jeweilige Eingrenzung verwendeten Stämmen in Tab. 4.5 aufgelistet.

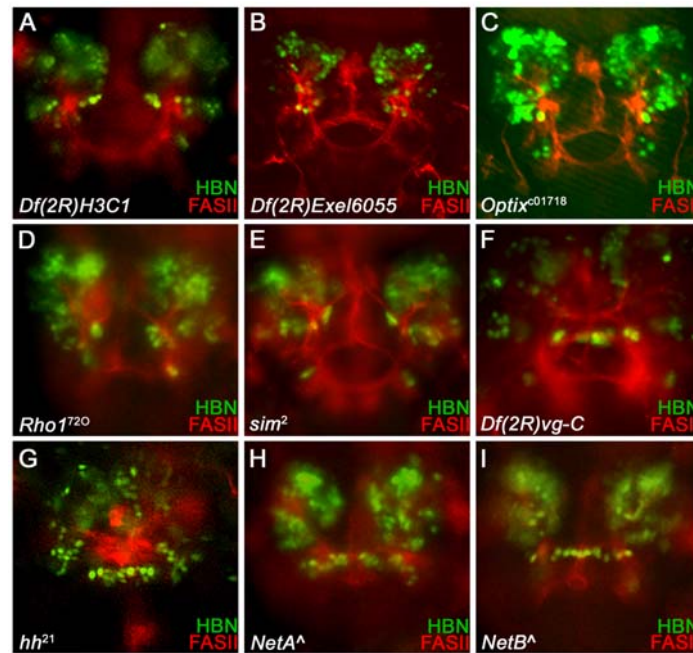
**Tab. 4.5: Auflistung der identifizierten Defizienzstäme, die über kleinere Defizienzen eingeschränkt wurden.** Die ausgewählten Defizienzen der *hbn*-Gruppe, der *sim*-Gruppe, der *fra*-Gruppe, der Lückengen-Gruppe sowie Defizienzen, die sich in keine dieser Gruppen einordnen lassen, sind mit Stämmen, die zur Eingrenzung der jeweiligen Deletion verwendet wurden, aufgeführt. DK1: Stämme des „Bloomington Deficiency Kits“ des X-Chromosoms, DK2: Stämme des zweiten Chromosoms, DK3: Stämme des dritten Chromosoms. Grün unterlegt sind Einschränkungsdefizienzen, in denen der Phänotyp der Ausgangsdefizienz wiedergefunden wurde. Kandidatengene (rot) ergaben sich aus der Einengung der genomischen Region der einzelnen Defizienzen.

Defizienz	Stämme zum Eingrenzen	eingeschränkte Region	Kandidatengene nach Eingrenzung
<i>hbn-Gruppe</i>			
<b>BI 970 DK1</b> X;17A1-18A2	1538, 8036, 7762		89 Kandidatengene
<b>BI 6283 DK2</b> 2L;21B7-21C3	3277 ( <i>smo</i> )		35 Kandidatengene
<b>BI 3084 DK2</b> 2L;21D1-22B2	7775, 7490, 7492, 7776, 10444 ( <i>Dock</i> ), 8616 ( <i>S</i> ), 3102 ( <i>lea</i> )		151 Kandidatengene
<b>BI 3133 DK2</b> 2L;22A2-22E1	8000	22B5-22D1	50 Kandidatengene
<b>BI 5330 DK2</b> 2L;24A2-24D4	7495, 7790, 9604	24C1-24C7	CG10019, <i>bowl</i> , CG31958, CG3407, CG31959, CG31960, CG31772, CG3921, l(2)k16913, <i>slp2</i>
<b>BI 693 DK2</b> 2L;24C2-25C9	7495, 7790, 3080		
<b>BI 490 DK2</b> 2L;25F3-26D11	7500, 9297		120 Kandidatengene
<b>BI 5869 DK2</b> 2L;32D1-32F3	7511, 7512	32D5-32E4	21 Kandidatengene
<b>BI 420 DK2</b> 2L;36C2-37C1	7838, 8935, 7845	36F7-37C5	91 Kandidatengene
<b>BI 1007 DK2</b> 2R;42A1-42F1		42B3	<i>jing</i>
<b>BI 1888 DK2</b> 2R;42B3-43E18			
<b>BI 198 DK2</b> 2R;43F-44D8	7537, 7538, 7540, 3377 ( <i>ptc</i> ), <i>Optix</i>	44A3	<i>Optix</i>
<b>BI 442 DK2</b> 2R;49C1-50D2	7916, 7872, 7873, 12655 ( <i>Drl-2</i> ), 2785 ( <i>fas</i> ), 8740 ( <i>shot</i> )		190 Kandidatengene
<b>BI 3518 DK2</b> 2R;51D3-52F9	9064, 8914, 7750, 7879, 7325 ( <i>Rho1</i> ), 11072 ( <i>Lis-1</i> )	52E5	<i>Rho1</i>
<b>BI 3909 DK2</b> 2R;59A1-59D4	7559, 7265, 7906	59C1-59C4	32 Kandidatengene
<b>BI 1682 DK2</b> 2R;59D5-60B8	7909, 6137		180 Kandidatengene
<b>BI 600 DK3</b> 3L;62A10-62D5	7567, 9693, 8056, 8096	62B4-62B7	24 Kandidatengene
<b>BI 7079 DK3</b> 3L;66F1-67B3	9561, 2479		47 Kandidatengene
<b>BI 2611 DK3</b> 3L;68A2-69A1	7594, 7595, 8068	68E1-68F1	47 Kandidatengene
<b>BI 6551 DK3</b> 3L;71C2-72C1		71F2	<i>commissureless (comm)</i>

<b>BI 1842 DK3</b> 3R;84A5-84D9	2006, 1938, 7625	84B2-84C4	25 Kandidatengene
<b>sim-Gruppe</b>			
<b>BI 3007 DK3</b> 3R;87B11-87E11	7646, 2055 ( <i>sim</i> <sup>2</sup> )	87D11	<i>single minded (sim)</i>
<b>BI 669 DK3</b> 3R;99A1-99B11	8925, 7690		63 Kandidatengene
<b>fra-Gruppe</b>			
<b>BI 754 DK2</b> 2R;49A4-49F1		49A10-49B3	<i>frazzled (fra)</i>
<b>BI 3518 DK2</b> 2R;51D3-52F9	9064, 8914, 7750, 7879, 7325 ( <i>Rho1</i> ), 11072 ( <i>Lis-1</i> )		160 Kandidatengene
<b>BI 463 DK3</b> 3L;63E6-64A9	7576, 7578	63F7-64A5	35 Kandidatengene
<b>BI 5877 DK3</b> 3L;66A17-66C5	7930, 7591		82 Kandidatengene
<b>BI 8583 DK3</b> 3R;94E1-94F2	7741, 7990, 861 ( <i>pnt</i> ), <i>hh</i>	94E1	<i>hedgehog (hh)</i>
		12F1-12F2	<i>NetrinA (NetA)</i>
		12F2-12F3	<i>NetrinB (NetB)</i>
<b>Lückengen-Gruppe</b>			
<b>BI 951 DK1</b> X;7F1-8C6		7F10-8A1	<i>orthodenticle (otd)</i>
<b>BI 6374 DK2</b> 2L;26D10-27C1	9615, 7801	26F1-27A1	24 Kandidatengene
<b>BI 201 DK2</b> 2R;44D1-44F12	7864		86 Kandidatengene
<b>andere Gehirnphänotypen</b>			
<b>BI 948 DK1</b> X;7A2-7C1	8955	7A3-7B2	20 Kandidatengene
<b>BI 3651 DK1</b> X;8B5-8D8	8033	8B6-8C13	33 Kandidatengene
<b>BI 190 DK2</b> 2R;47D3-48B2	7542, 9595		102 Kandidatengene
<b>BI 3003 DK3</b> 3R;86E2-87C7	7639, 7963, 7640, 7965, 7641, 7643, 7645, 7932	86E4-86E11	28 Kandidatengene

In Abb. 4.43A, B, C ist beispielhaft die phänotypische Eingrenzung des Defizienzstammes BI 198 (*Df(2R)H3C1*) gezeigt, der die Region 43F bis 44D8 deletiert. Embryonen dieses Ausgangsstammes zeigen einen *hbn*-ähnlichen Phänotyp, der sich dadurch äußert, dass die Hbn-positiven Brückenneurone nicht einwandern und keine interhemisphärische Brücke bilden (Abb. 4.43A). Im nächsten Schritt wurden die Defizienzstämme BI 7537 (43F1-44A4),

Bl 7538 (44A4-44C2), und Bl 7540 (44C4-44D1) getestet, die kleinere Regionen innerhalb der Ausgangsregion deletieren. Der ursprüngliche *hbn*-ähnliche Phänotyp wurde ausschließlich in Embryonen des Stammes Bl 7537 (*Df(2R)Exel6055*) wiedergefunden (Abb. 4.43B), was bedeutet, dass sich das den Phänotyp verursachende Gen in der Region 43F1 bis 44A4 befinden muss. Es wurden anschließend verschiedene Einzelmutanten aus dieser genomischen Region getestet. Der gesuchte Phänotyp konnte schließlich Mutanten des Gens *Optix* zugeordnet werden (Abb. 4.43C).



**Abb. 4.43: Zusammenfassung der Phänotypen der Mutanten, die auf Einzelgeniveau eingeschränkt werden konnten.** Doppelfärbungen mit anti-Hbn- und anti-FasII-Antikörpern an Embryonen, konfokale (B, C) und fluoreszenzmikroskopische (A, D-I) Aufnahmen in 200facher Vergrößerung. Die Antikörperkombination ist farblich entsprechend dargestellt. Alle Ansichten von dorsal, anteriorer Pol unten. (A) *Df(2R)H3C1*-Embryo, Stadium 15. (B) *Df(2R)Exel6055*-Embryo, Stadium 16. (C) *Optix<sup>c01718</sup>*-Embryo, Stadium 15. (D) *Rho1<sup>720</sup>*-Embryo, Stadium 14. (E) *sim<sup>2</sup>*-Embryo, Stadium 14. (F) *Df(2R)vg-C*-Embryo, Stadium 16. (G) *hh<sup>21</sup>*-Embryo, Stadium 16. (H) *NetA<sup>Δ</sup>*-Embryo, Stadium 13. (I) *NetB<sup>Δ</sup>*-Embryo, Stadium 14.

Auf die beschriebene Weise konnte auch der Defizienzstamm Bl 3518, der ebenfalls der *hbn*-Gruppe zugeordnet wurde, auf das Gen *Rho1* eingegrenzt werden (Abb. 4.43D). Darüber hinaus wurden unter den Defizienzstämmen der *hbn*-Gruppe auch Defizienzen, bei denen *jing* bzw. *comm* deletiert wird, anhand des Phänotyps gefunden. Dies kann als eine Positivkontrolle gewertet werden, dass die Vorgehensweise tatsächlich geeignet ist, Kommissurmutanten aufzufinden. Die Defizienz Bl 3467, die laut Angaben des Bloomington Stock Centers den 57B-Bereich und damit *hbn* nicht abdeckt, zeigte dagegen nicht den erwarteten *hbn*-Gehirnphänotyp, und es ließ sich keine Veränderung der *hbn*-Expression feststellen, die bei 25% der Embryonen fehlen sollte. Bei Embryonen der Defizienz

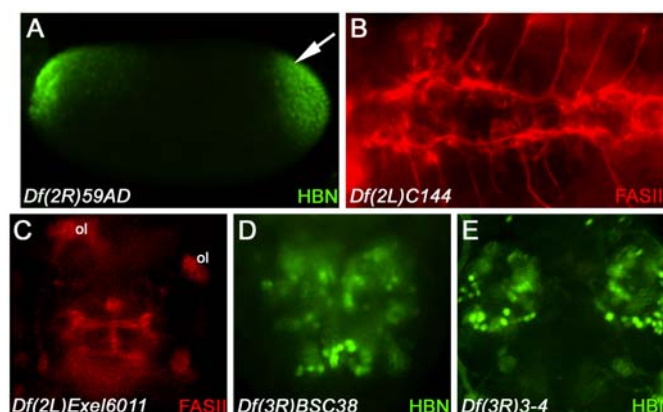
*Df(2R)Exel7166*, die einen kleineren Bereich inklusive der 57B-Region deletiert und in dieser Arbeit für Kreuzungsexperimente benutzt wurde, ließen sich jedoch sowohl der *hbn*-Phänotyp als auch das Fehlen der *hbn*-Expression in 25% der Embryonen nachweisen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die genomische Region, in der *hbn* lokalisiert ist, in dem Fliegenstamm Bl 3467 nicht deletiert ist.

Innerhalb der *sim*-Gruppe, die sich dadurch auszeichnet, dass die P2m- und die übrigen Brückenneurone in einem zu steilen Winkel in Richtung Mittellinie wandern, konnte *single-minded (sim)*, das im Stamm Bl 3007 nicht abgedeckt wird, als Einzelgen eingegrenzt werden (Abb. 4.43E). Von den Defizienzstämmen, die der *fra*-Gruppe zugeordnet wurden, konnten die Stämme Bl 754 und Bl 8583 näher bestimmt werden. Bei Defizienz Bl 754 ist das Gen *frazzled (fra)* für den beobachteten Phänotyp verantwortlich (Abb. 4.43F). Diese Zuordnung wurde hier nicht wie bei den anderen Defizienzen über chromosomale Einschränkungen vorgenommen, sondern aufgrund des für *fra*-Mutanten charakteristischen VNS-Phänotyps (fehlende Kommissuren) bestimmt, der in homozygoten Embryonen dieser Defizienz auftritt. Bei Defizienz Bl 8583 ist *hedgehog (hh)* (Abb. 4.43G) dafür verantwortlich, dass zu viele Neurone zur Mittellinie wandern und sich dort ansammeln. In der Lückengen-Gruppe konnte *otd* als bereits bekanntes Lückengen im Defizienzstamm Bl 951 identifiziert werden.

Neben dem systematischen Screening des „Bloomington Deficiency Kits“ wurde ein weiterer Ansatz verfolgt. Es wurden zusätzlich Mutanten untersucht, die bekanntermaßen an der axonalen Wegfindung im ventralen Nervensystem beteiligt sind. Eine Komponente des repulsiven Slit/Robo-Systems, *comm*, hatte sich bereits als ein Gen erwiesen, dass auch für die Bildung der präoralen Gehirnkommisur eine Rolle spielt. Embryonen von *slit*- und *Robo*-Mutanten wurden ebenfalls mit den Markern FasII und Hbn untersucht, wobei jedoch keine Veränderung der Einwanderung der Hbn-positiven Brückenneurone oder der präoralen Gehirnkommisur nachgewiesen werden konnte. *Fra* als Bestandteil des attraktiven Fra/Netrin-Systems war dagegen bereits im Rahmen des Defizienzen-Screens identifiziert worden. Die Analyse von *NetrinA (NetA)*- und *NetrinB (NetB)*-Mutanten ergab, dass diese Mutanten aufgrund ihres Gehirnphänotyps der *fra*-Gruppe zugeordnet werden können (Abb. 4.43H, I).

#### 4.7.4 Zusätzliche das Gehirn und das Nervensystem betreffende Phänotypen

Während der Analyse der Defizienzstämmen wurden neben der Beurteilung der Lokalisation der Brückenneurone und der Struktur der präoralen Gehirnkommisur weitere auffällige Faktoren berücksichtigt, die sich mit den Markern Hbn und FasII an *Drosophila*-Embryonen nachweisen lassen. Häufig wurden Veränderungen des *hbn*-Expressionsmusters beobachtet (26 Defizienzen). Dabei gab es Unterschiede im Zeitpunkt der veränderten Expression. Das Expressionsmuster war beispielsweise manchmal schon ab der frühen Entwicklung verändert, oder aber erst in den späten Stadien. Es fehlten Expressionsdomänen, und auch ektopische Expressionsdomänen wurden gefunden (Abb. 4.44A, Pfeil). Auch Defekte des ventralen Nervensystems konnten bei vielen Defizienzen festgestellt werden (51 Defizienzen). Zu diesen Defekten zählen z.B. fehlende Kommissuren (Abb. 4.44B) oder fehlende Konnektive, ein an der Mittellinie kollabiertes Nervensystem oder ein fragmentiertes oder kondensiertes Nervensystem. Relativ häufig konnte eine Delokalisation der optischen Loben nachgewiesen werden (17 Defizienzen). Bei diesen Stämmen sind die optischen Loben nicht mehr korrekt mit dem embryonalen Gehirn verbunden (Abb. 4.44C), und in manchen Mutanten sind die Loben fusioniert oder auch stark vergrößert. Bei einigen Defizienzstämmen sind dagegen nicht nur die optischen Loben, sondern die kompletten Hirnhemisphären miteinander verschmolzen (8 Defizienzen, Abb. 4.44D). Auch der gegenteilige Effekt wurde beobachtet, nämlich dass der Abstand zwischen den Hemisphären zu groß ist (5 Defizienzen, Abb. 4.44E).



**Abb. 4.44: Beispiele für zusätzliche auffällige Nervensystem-Phänotypen, die während der Analyse der Bloomington-Defizienzstämmen gefunden wurden.** Anti-Hbn- bzw. anti-FasII-Antikörperfärbungen an *Drosophila*-Embryonen, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 100facher (A), 200facher (C-E) bzw. 400facher (B) Vergrößerung. (A) Embryonalstadium 5. Laterale Sicht, anteriorer Pol links. Der Pfeil deutet auf eine ektopische *hbn*-Expressionsdomäne. (B) Embryonalstadium 15. Ventrale Sicht, anteriorer Pol links. (C) Embryonalstadium 15. ol: Optische Loben. (D, E) Embryonalstadium 16. (C-E) Dorsale Sicht, anteriorer Pol unten.



Die einzelnen Defizienzen, die einen dieser Phänotypen zeigen, sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Der Defizienzen-Screen stellt eine gute Grundlage dar, unterschiedliche Fragestellungen auf dem Gebiet der embryonalen Nervensystem- und Gehirnentwicklung anzugehen. Ein erstes Ziel soll es sein, möglichst viele Komponenten zu identifizieren, die für das korrekte Einwandern der Hbn-positiven Brückenneurone und die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur notwendig sind. Erste putative Gene, die bei diesen Prozessen eine Rolle spielen könnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt. Es handelt sich dabei neben den bereits bekannten Komponenten *hbn*, *comm* und *jing* um die Gene *Optix*, *Rhol*, *sim*, *fra*, *hh*, *NetA* und *NetB*. Auch für weitere Ansätze, die über den Bereich der Kommissurbildung hinausgehen, ist dieser Defizienzen-Screen sehr geeignet, wie die Aufstellung der zusätzlich beobachteten Phänotypen beweist. Es können Themengebiete wie die Regulation der *hbn*-Expression, die Entwicklung des ventralen Nervensystems oder die Entwicklung der optischen Loben mit Hilfe der bereits bestimmten Defizienzstämmen untersucht werden.

## 5. Diskussion

Die embryonale Entwicklung des Gehirns und des Nervensystems ist einer der kompliziertesten Vorgänge, die in der Entwicklungsbiologie untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das nervensystemspezifische Homeoboxgen *homeobrain* von *Drosophila* charakterisiert und seine Funktion während der embryonalen Gehirnentwicklung untersucht. Neben umfangreichen Expressionsstudien auf Proteinebene sollte die phänotypische Analyse embryonal letaler Mutanten zur Bearbeitung dieser Fragestellung beitragen.

### 5.1 *Hbn* und die Kopflückengene

Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob *hbn* als „neues“ Kopflückengen bezeichnet und in diese Gruppe von Genen eingeordnet werden kann. Bevor man darüber entscheiden kann, muss definiert werden, welche Eigenschaften ein Kopflückengen auszeichnen. Die wichtigsten Merkmale eines Kopflückengens sind eine blastodermale streifenförmige Expression im anterioren Bereich des Embryos sowie kutikuläre und das Gehirn betreffende lückenähnliche Kopfdefekte, wenn das Gen mutiert ist. Ein weiteres Kennzeichen von Kopflückengenmutanten ist der Verlust der Expression von *l'sc*, eines potenziellen Zielgens der Kopflückengene (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1997), in Bereichen, in denen das Kopflückengen normalerweise exprimiert wird.

Die embryonale Expression von *hbn* beginnt während des Blastodermstadiums in Form eines hufeisenähnlichen Musters im Kopfbereich des Embryos (Walldorf *et al.*, 2000) und ist den blastodermalen Expressionsdomänen der Kopflückengene sehr ähnlich. Ein Funktionsverlust von *hbn* führt zu Defekten des cephalopharyngealen Skeletts. Fehlbildungen dieser Strukturen wurden auch bei Mutanten der Kopflückengene *otd-*, *tll-*, *ems-*, *btd-* und *slp1* gefunden (Finkelstein und Perrimon, 1990; Strecker *et al.*, 1988; Walldorf und Gehring, 1992; Wimmer *et al.*, 1993; Grossniklaus *et al.*, 1992). Homozygoten *hbn*-Mutanten des ersten Larvenstadiums fehlen das Labrum und das epistomale Sklerit, außerdem können Defekte der dorsalen Brücke beobachtet werden. Diese Verluste decken sich mit den Vorhersagen, die mit Hilfe einer Schicksalskarte des Blastoderm-Embryos (Jürgens *et al.*, 1986) getroffen werden konnten, da die blastodermale Expressionsdomäne von *hbn* in einem Bereich liegt, aus dem das Labrum, das epistomale Sklerit und die dorsale Brücke hervorgehen. Ähnliche cephalopharyngeale Defekte werden bei *tll*-Mutanten gefunden, in denen es u.a. ebenfalls zu

Fehlbildungen der dorsalen Brücke kommt (Strecker et al., 1988). Die übrigen Defekte liegen bei *tll*-Mutanten weiter posterior als bei *hbn*-Mutanten, so dass man davon ausgehen kann, dass die Überlappung der blastodermalen Expressionsdomänen von *hbn* und *tll* genau in dem Bereich liegt, aus dem die dorsale Brücke hervorgeht.

Labrale Defekte wurden bei Mutanten des Gens *Optix* gefunden (Coiffier et al., 2008). *Optix* wird während des Blastodermstadiums sehr ähnlich wie *hbn* in einem hufeisenförmigen Muster im anterioren Bereich des Embryos exprimiert (Seimiya und Gehring, 2000). Die Expressionsdomäne ist im Vergleich zur *hbn*-Expression lediglich etwas weiter nach posterior verlagert, deckt aber immer noch die Bereiche ab, aus denen in späteren Stadien das Labrum entsteht. Ein weiteres Beispiel ist das Lückengen *giant* (*gt*). *Gt* wird während des zellulären Blastodermstadiums in vier Streifen exprimiert. Die Streifen 1, 3 und 4 decken Regionen ab, aus denen jeweils labrale, labiale und abdominale Strukturen hervorgehen. Eine Mutation von *gt* führt zu Deletionen von Strukturen, die sich aus den labralen und labialen Segmenten ableiten (Mohler et al., 1989; Petschek et al., 1990; Finkelstein und Perrimon, 1990).

Nicht nur die cephalopharyngealen Fehlbildungen, sondern auch die lückenähnlichen Defekte des embryonalen Gehirns von *hbn*-Mutanten ähneln den Phänotypen von Kopflückengenmutanten: Es fehlen protocerebrale Strukturen und auch die präorale Gehirnkommisur, die wichtigste Verbindung der beiden Gehirnhemisphären. Die Abwesenheit ganzer embryonaler Gehirnbereiche wird auch bei Mutanten der Kopflückengene *otd*, *tll*, *ems* und *btd* beobachtet (Hirth et al., 1995; Strecker et al., 1988; Younossi-Hartenstein et al., 1997).

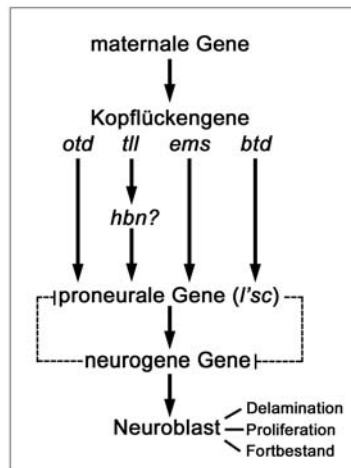
Die Expression des proneuralen Gens *l'sc* ist in *hbn*-Mutanten verändert. *L'sc* ist für die Entwicklung eines Großteils der procephalischen Neuroblasten erforderlich (Younossi-Hartenstein et al., 1997). Ähnlich wie in Kopflückengenmutanten können in *hbn*-Mutanten bestimmte *l'sc*-Expressionsdomänen nicht mehr nachgewiesen werden. Im Embryonalstadium 10 fehlt die anterior-dorsale protocerebrale Domäne Pad, und die dorsomediale protocerebrale Domäne Pdm ist nicht vollständig vorhanden. Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass *l'sc* auch ein Zielgen von *hbn* sein könnte. Morphologisch lässt sich nachweisen, dass *hbn* in procephalischen neuroektodermalen Domänen exprimiert wird, wobei allerdings nur wenige procephalische Neuroblasten Hbn-positiv sind. Es muss daher genauer untersucht werden, ob der Verlust der *l'sc*-Expressionsdomänen durch eine fehlende direkte Aktivierung von *l'sc* durch *hbn* bedingt ist, oder ob sekundäre Effekte eine Rolle spielen. In *hbn*-Mutanten könnten beispielsweise die *l'sc*-exprimierenden Zellen der Pad- und der Pdm-Domäne fehlen, so dass es durch diese fehlenden Zellen zu einer Veränderung des *l'sc*-Expressionmusters kommt.

Aufgrund der oben genannten Kriterien Expression, Phänotyp und potenzielle Zielgene lässt sich *hbn* als Kopflückengen bezeichnen.

Es wurde außerdem analysiert, ob die *hbn*-Expression von Kopflückengenen kontrolliert wird. Während des Blastodermstadiums zeigt keine der untersuchten Kopflückengenmutanten eine Veränderung der *hbn*-Domäne, wie z.B. ein komplettes Fehlen oder eine Verschiebung entlang der anterioposterioren Achse. In *slp1*-Mutanten wurden in diesem Stadium ektopische *hbn*-Expressionsdomänen in Form von drei bis vier schmalen Streifen im medial-dorsalen Bereich der Embryonen nachgewiesen. Ein solches Expressionsmuster wurde zwar in manchen Wildtyp-Embryonen auf mRNA-Ebene beobachtet, wurde bisher aber noch nie auf Proteinebene detektiert. Im Wildtyp scheint *hbn*-mRNA in diesen Domänen exprimiert zu werden, die entweder nicht translatiert wird, oder das Protein wird in diesen Bereichen schnell abgebaut, ein Sachverhalt, der in *slp1*-Mutanten verändert ist. *Slp1* könnte ein Repressor von *hbn* sein, der die Translation des Hbn-Proteins in diesen Domänen verhindert. In *otd*- und *ems*-Nullmutanten wurden in relativ späten Stadien der Embryonalentwicklung Veränderungen des *hbn*-Expressionsmusters detektiert. Zu diesem Zeitpunkt sind die Gehirnphänotypen dieser Mutanten bereits etabliert, so dass sich die veränderte *hbn*-Expression vermutlich auf die Strukturveränderungen der Embryonen und nicht auf fehlende Regulationsmechanismen zurückführen lässt. Eine auffallende Veränderung der *hbn*-Expression wurde in *tll*-Mutanten ab dem Embryonalstadium 7 beobachtet. Es ist zu untersuchen, ob die einzelnen *hbn*-Expressionsdomänen während der früheren Embryonalstadien zu einer einzigen verschmolzen sind, oder ob einzelne Expressionsdomänen fehlen. Des Weiteren muss bestimmt werden, ob die veränderte Expression und das fehlende Einwandern der clypeolabralen Zellen auf die veränderte Morphologie der Embryonen zurückzuführen ist, oder ob eine Regulation der *hbn*-Expression durch *tll* stattfindet. Wenn sich bestätigt, dass *hbn* durch *tll* reguliert wird, und dass *hbn* seinerseits die Expression von *l'sc* kontrolliert, wäre dies ein Hinweis darauf, dass *hbn* einen Platz in der Signalkaskade der Kopflückengene einnimmt. Dabei könnte *hbn* zwischen *tll* und *l'sc* stehen (Abb. 5.1).

Eine direkte transkriptionelle Regulation zwischen Kopflückengenen wurde bisher nur für *tll* und *ems* nachgewiesen: *Tll* inhibiert die Expression von *ems* im frühen embryonalen Kopf und in der protocerebralen Gehirnanlage (Hartmann *et al.*, 2001). Für die Regionalisierung der anterioren Kopffregion wurde das sogenannte kombinatorische Modell vorgeschlagen (Cohen und Jürgens, 1990). Dieses Modell besagt, dass die Segmentidentität durch die individuelle Kombination aktiver Kopflückengene innerhalb des Segments spezifiziert wird.

Die kombinierte Expression von *otd*, *ems* und *btd* würde beispielsweise das antennale Segment spezifizieren. Es wurde jedoch gezeigt, dass dieses Modell zumindest für *btd* nicht zutrifft, da eine ektopische Expression von *btd* im frühen Blastodermstadium anterior und posterior zur normalen Expressionsdomäne keine Störung der Kopfentwicklung verursacht und nicht wie erwartet zu einem zusätzlichen antennalen Segment führt (Wimmer *et al.*, 1997).



**Abb. 5.1: Mögliche Position von *hbn* innerhalb der Signalkaskade der Kopflückengene.**

Viele Transkriptionsfaktoren, welche die Entwicklung regulieren, kontrollieren eine Vielzahl unterschiedlicher Abläufe, indem sie während der Entwicklung zu unterschiedlichen Zeiten und an unterschiedlichen Orten exprimiert werden (Rudolph *et al.*, 1997), so dass auch bei den Kopflückengenen zwischen frühen und späten Funktionen unterschieden werden muss. Vergleicht man den räumlichen Umfang der Expressionsdomänen der Kopflückengene in Wildtyp-Embryonen mit der Größe und der Lokalisation der Gehirndefekte in den entsprechenden Mutanten, wird deutlich, dass sich das späte Expressionsmuster dieser Gene nach der Gastrulation besser mit der Lokalisation der Gehirndefekte deckt als ihre blastodermale Expression (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1997). Einen direkten Beweis für eine solche späte Rolle der Kopflückengene während der embryonalen Gehirnentwicklung liefern genetische Rettungsexperimente. Eine Inaktivierung des *otd*-Gens führt zur Deletion der protocerebralen Gehirnanlage und zu Defekten der Axonogenese im ventralen Nervensystem (Finkelstein *et al.*, 1990; Hirth *et al.*, 1995; Klämbt *et al.*, 1991), die durch eine ubiquitäre Überexpression von *otd* wieder aufgehoben werden können. Interessanterweise liegt das Zeitfenster, in dem die *otd*-Expression für eine Rettung des Gehirndefektes erforderlich ist, deutlich nach der Gastrulation (Stadium 7 bis 8), aber vor der Neuroblasten-Delamination. Um die VNS-Defekte zu retten, muss *otd* sogar noch später exprimiert werden (Stadium 10

bis 11) (Leuzinger *et al.*, 1998). Es bleibt zu überprüfen, ob auch bei *hbn* zwischen räumlich und zeitlich verschiedenen Funktionen zu unterscheiden ist. Ein geeignetes Werkzeug, um diese Fragestellung zu untersuchen, stellt das *hbn*-Allel *hbn*<sup>4028</sup> dar. Dieses Allel bietet den Vorteil, dass die Mutanten nicht nur den ausgeprägten *hbn*-Gehirnphänotyp zeigen, sondern dass sich im Gegensatz zum *hbn*<sup>15227</sup>-Allel *hbn*-Expression auf Proteinebene nachweisen lässt. Das Expressionsmuster weist deutliche Veränderungen im Vergleich zum *hbn*-Muster in Wildtyp-Embryonen auf. Zunächst muss weiter untersucht werden, auf welche Weise die Blastodermexpression verändert ist, da bisher lediglich über statistische Auswertungen nachgewiesen wurde, dass überdurchschnittlich viele Embryonen keine Blastodermexpression zeigen. In den späten Stadien der Embryonalentwicklung konnte gezeigt werden, dass die für die Ausprägung der interhemisphärischen Brücke wichtigen P2m-Neurone in *hbn*<sup>4028</sup>-Embryonen zwar vorhanden, aber offensichtlich nicht mehr in der Lage sind, zur Mittellinie zu wandern. Hier liegt möglicherweise eine späte Funktion von *hbn*, die für die Migration dieser Neurone erforderlich ist. Eine frühe Funktion könnte die Aktivierung von *l'sc* sein: Wird *l'sc* in bestimmten Domänen nicht mehr von *hbn* aktiviert, fehlen in diesen Bereichen später die Neuroblasten, was die protocerebralen Defekte von *hbn*-Mutanten erklären könnte.

## 5.2 VNS-Phänotyp homozygoter *hbn*-Mutanten

*Hbn* wird in den vMP2-Neuronen des ventralen Nervensystems exprimiert. Phänotypische Untersuchungen der Mutanten *hbn*<sup>4028</sup> und *hbn*<sup>15227</sup> ergaben, dass ein Verlust der *hbn*-Funktion offensichtlich nicht zu einem Fehlen der vMP2-Neurone führt. Auch die Projektionsrichtung des axonalen Ausläufers verläuft wie in der Wildtyp-Situation in anteriore Richtung, wobei jedoch bisher nicht untersucht wurde, ob diese Axone noch mit den entsprechenden Axonen des angrenzenden Hemisegments faszikulieren. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass in *patched (ptc)*-Mutanten die vMP2-Neurone nicht richtig spezifiziert werden, was zu axonalen Wegfindungsdefekten und Faszikulation mit den falschen axonalen Trakten führt (Merianda *et al.*, 2005). Im Wildtyp findet im späten Embryonalstadium 11 eine Migration der vMP2- und der dMP2-Neurone statt: Kurz nachdem diese Neurone aus dem MP2-Vorläufer gebildet wurden, migrieren die vMP2-Neurone in anteriore und die dMP2-Neurone in posteriore Richtung, bis sie sich in der gleichen dorsoventralen Ebene befinden (Spana *et al.*, 1995; Spana und Doe, 1996; Kim *et al.*, 2007). Diese Migrationsbewegung ist auch in den *hbn*-Mutanten nachweisbar. Die Migration der MP2-Neurone könnte für die Differenzierung dieser Zellen wichtig sein. Ein sehr komplizierter Migrationsprozess wurde für die RP2-

Neurone des ventralen Nervensystems nachgewiesen, die sich nach Abschluss der Migration fast wieder an ihrer Ausgangsposition befinden. In Mutanten, in denen diese Neurone nicht migrieren, sind sie nicht in der Lage, ihre korrekten axonalen Projektionen auszubilden (Bhat, 2007). Es wurden zwar in *hbn*-Mutanten keine offensichtlichen Defekte der vMP2-Neurone gefunden, dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Zellidentität der vMP2-Neurone verändert ist. Der MP2-Vorläufer, aus dem vMP2 und dMP2 hervorgehen, ist im Wildtyp morphologisch mit einem Neuroblasten identisch, hat aber ein anderes Zellteilungsprogramm. Während aus der dorsalen Oberfläche von Neuroblasten durchschnittlich fünf kleinere Gangliumutterzellen knospen, teilt sich die MP2-Zelle nur einmal und produziert die beiden postmitotischen Neurone vMP2 und dMP2. Dieser Prozess wird über den Delta-Notch-Signalweg unter Vermittlung der asymmetrisch lokalisierten Proteine Numb, Sanpodo, Mastermind und Odd-Skipped reguliert (Spana und Doe, 1996; Skeath und Doe, 1998; Schuldt und Brand, 1999; Bardin *et al.*, 2004). In *hbn*-Mutanten muss überprüft werden, ob diese Komponenten, die für die Identität von vMP2 bzw. dMP2 verantwortlich sind, richtig verteilt sind, da ein Funktionsverlust oder die ektopische Expression einzelner dieser Faktoren zu einer Transformation von vMP2-Neuronen in dMP2-Neurone und umgekehrt führen kann (Spana *et al.*, 1995; Schuldt und Brand, 1999). Es ist aber auch möglich, dass die fehlende *hbn*-Funktion tatsächlich keinen Einfluss auf die Entwicklung des ventralen Nervensystems und der vMP2-Neurone hat. Ähnliches wurde für das Chaperon Hsp23 beobachtet, das u.a. in den MP2-Vorläufern, den VUM-Neuronen und in der Mittellinienglia exprimiert, jedoch weder für die Entwicklung noch für die Funktion dieses Gewebes erforderlich ist (Michaud und Tanguay, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass alle drei Homeoboxgene des 57B-Clusters, *hbn*, *drx* und *otp*, gemeinsam in den vMP2-Neuronen exprimiert werden. Dies deutet auf eine gemeinsame Funktion der Gene in diesen Zellen hin. Es ist möglich, dass der Funktionsverlust eines einzelnen dieser Gene nicht ausreicht, um eine Veränderung des VNS-Phänotyps zu bewirken. Aus diesem Grund muss die phänotypische Untersuchung auf Defizienzen ausgedehnt werden, denen dieser genomische Bereich vollständig fehlt, da erst ein Verlust aller drei Gene zu Defekten in den vMP2-Neuronen führen würde, falls *hbn*, *drx* und *otp* redundante Funktionen für die Entwicklung dieser Neurone erfüllen. Erste morphologische Analysen zeigten bereits, dass auch in 57B-Defizienzen sowohl vMP2- als auch dMP2-Neurone vorhanden sind. Mögliche Fehlbildungen oder Fehldifferenzierungen dieser Zellen sind jedoch nicht auszuschließen, so dass die Neurone vor allem in den späteren Entwicklungsstadien näher zu untersuchen sind.

### 5.3 Die Bildung der interhemisphärischen Brücke und der präoralen Gehirnkommisur

Bei *Drosophila* werden während der Embryogenese eine Reihe wichtiger Gehirnverbindungen gebildet. Dabei werden drei bedeutende axonale Pfade über die Mittellinie etabliert: die präorale Gehirnkommisur, die Frontalkommisur, welche die beiden Frontalganglien mit tritocerebralen Bereichen verknüpft, und die postorale tritocerebrale Kommisur. Außerdem werden zwei longitudinale Trakte gebildet, die dem Tritocerebrum entspringen und die paarigen circumoesophagalen Konnektive bilden (Therianos *et al.*, 1995; González-Gaitán und Jäckle, 1995; Wildemann *et al.*, 1997; Boyan *et al.*, 2003).

Die wichtigste Verbindung zwischen den beiden Gehirnhemisphären ist die präorale Gehirnkommisur. Die beiden procephalischen neurogenen Regionen, aus denen die Hirnhemisphären entstehen, sind anfangs noch voneinander getrennt. Die präorale Gehirnkommisur wird von Pionieraxonen gebildet, die in enger Verbindung mit einer interhemisphärischen zellulären Brücke zur Mittellinie projizieren. Diese interhemisphärische Brücke besteht aus neuronalen Zellkörpern (Therianos *et al.*, 1995; Wildemann *et al.*, 1997). Neurone, die für die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur wichtig sind, sind die „Fibre Tract Founder Cluster“ D/T, P2l, P2m, P3l und P4l. Die Kommisur wird aus drei Pionierfaszikeln gebildet, und zwar aus zwei ventralen kommissuralen Trakten (VCT) und einem dorsalen kommissuralen Trakt (DCT) (Nassif *et al.*, 1998). Es wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen gezeigt, dass Neurone der „Fibre Tract Founder Cluster“ P2l und P2m Hbn-positiv sind, und zum anderen, dass die P2m-Neurone unmittelbar an der Bildung der interhemisphärischen Brücke beteiligt sind. Die P2m-Neurone wandern gefolgt von weiteren Hbn-positiven Neuronen zur Mittellinie und etablieren auf diese Weise eine Brücke aus Hbn-positiven Neuronen, die der von Therianos und Mitarbeitern beschriebenen interhemisphärischen Zellbrücke entspricht. Diese Struktur bildet die Grundlage für die Wegfindung der ventralen Pionierfaszikel. Oberhalb der Brücke aus Hbn-positiven Neuronen befindet sich eine weitere brückenähnliche Struktur, die aus Pros-positiven Zellen und Gliazellen besteht. In *hbn*-Mutanten fehlen sowohl die beiden VCTs als auch DCT, und neben der interhemisphärischen Brücke wird auch die Brücke aus Pros-positiven Zellen nicht gebildet. Ob die Pros-Brücke zur Bildung der präoralen Gehirnkommisur erforderlich ist, wurde bisher nicht untersucht. Sie könnte denjenigen Pionierfaszikeln als Orientierungshilfe dienen, die DCT etablieren. Es ist aber auch möglich, dass die Pros-Brücke für DCT nicht entscheidend ist, sondern dass sich diese Faszikel an den beiden bereits gebildeten VCTs orientieren.



Es stellt sich die Frage, auf welche Weise die aus Hbn-positiven Neuronen bestehende interhemisphärische Brücke aufgebaut wird. Dabei kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Zum einen könnten sich die Brückenneurone bereits an ihrer endgültigen Position befinden, bevor sie Hbn-positiv werden. Die *hbn*-Expression würde in diesem Fall Neuron für Neuron angeschaltet werden, so dass eine Hbn-positive Zellreihe zwischen den Gehirnhemisphären entsteht, die von den Pionieraxonen als Orientierungshilfe für ihren Weg zur anderen Hemisphäre benutzt wird. Ein Signal, das die Expression in den einzelnen Zellen nacheinander initiiert, könnte im Bereich der Mittellinie lokalisiert sein. Dies würde bedeuten, dass die Expression zunächst in den Neuronen angeschaltet wird, die räumlich am nächsten zur Mittellinie liegen, und das Anschalten der *hbn*-Expression von den inneren Brückenneuronen zu den äußeren erfolgt. Die Brücke bildet sich jedoch von außen nach innen in Richtung der Mittellinie, so dass diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich ist. Sollte ein solcher Bildungsmechanismus dennoch zutreffen, müsste es zwei Signalzentren geben, die lateral von der zukünftigen interhemisphärischen Brücke liegen und das Anschalten der *hbn*-Expression von außen nach innen steuern.

Andererseits könnten sich die im Bereich der künftigen Hirnhemisphären befindlichen P2m-Neurone teilen und die Nachkommenschaft dabei in Richtung der Mittellinie schieben. Dieser Fall kann jedoch ausgeschlossen werden, da in dieser Domäne keine mitotischen Hbn-positiven Neurone nachgewiesen werden konnten.

Während der Entwicklung sind bestimmte Bereiche des embryonalen Gehirns einer morphologischen Bewegung unterworfen. Die Kopfeinstülpung führt zur Verlagerung anteriorer Teile des Gehirns in posteriore Richtung. Zusätzlich kommt es zu einer Rotation der anterioren Anlagen des Gehirns (Schmidt-Ott und Technau, 1994). Die Ausbildung der interhemisphärischen Brücke kann allerdings nicht allein eine Folge dieser morphologischen Bewegungen sein, wie die Untersuchung der Gehirnentwicklung an lebenden Embryonen zeigte. Vermutlich sind für die Translokation der Hbn-positiven Brückenneurone zusätzlich aktive Migrationsprozesse verantwortlich. Diese Möglichkeit wird durch die Tatsache gestützt, dass in *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten in einigen Fällen die Brückenneurone zwar ein kurzes Stück in Richtung der Mittellinie wandern, aber offensichtlich nicht in der Lage sind, den gesamten Weg zurückzulegen. Außerdem scheinen auch die Hbn-positiven Zellen, die normalerweise aus der DMD-Domäne in den clypeolabralen Bereich wandern, einem Migrationsprozess zu unterliegen, der in *hbn*<sup>4028</sup>-Mutanten gestört ist. Neuronale Migration wurde bereits für einige Neurone des ventralen Nervensystems von *Drosophila* beschrieben, wobei die Migration tendenziell zur ventralen Mittellinie hin gerichtet erfolgt (Schmid *et al.*,

1999). Ein Beispiel sind die RP1-Neurone, die für die Trennung der anterioren und der posterioren Kommissuren wichtig sind. Diese Neurone entstehen lateral von der Mittellinie und migrieren in medialer Richtung zwischen die beiden Kommissuren, bis sie ihre Zielposition erreicht haben (Jacobs und Goodman, 1989; Klämbt *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1999). Sobald die beiden kontralateralen Wachstumskegel der RP1-Neurone den Kontakt mit dem jeweiligen Zellkörper hergestellt haben, migrieren die beiden Zellkörper zur Mittellinie (Patel *et al.*, 1987). Das gleiche Prinzip wird auch für die P2m-Neurone des embryonalen Gehirns beobachtet: Die Wachstumskegel der P2m-Neurone berühren sich, und dann erst bewegen sich die Zellkörper zur Mittellinie. Diese Analogie weist darauf hin, dass dieser Mechanismus ebenfalls auf Migrationsereignisse zurückzuführen ist. Ein sehr komplexes Migrationsverhalten wurde bei dem Neuronenpaar RP2/sib beobachtet. Die Migration dieser Neurone ist vom *wg*-Signalweg abhängig und für die korrekte Entwicklung dieser Zellen notwendig: In *wg*-Mutanten sind die RP2-Neurone an der falschen Stelle lokalisiert und senden ihre axonalen Projektionen nicht richtig aus (Bhat, 2007). Um endgültig zu beweisen, dass neuronale Migration für die Bildung der interhemisphärischen Brücke verantwortlich ist, sind Time Lapse-Aufnahmen notwendig. Die Neurone der interhemisphärischen Brücke sind Elav-positiv (Wildemann *et al.*, 1997), so dass in einem ersten Ansatz mit Hilfe eines unter der Kontrolle von Elav-GAL4 stehenden Reportergens die Entwicklung dieser Struktur im lebenden Embryo verfolgt wurde. In den frühen Entwicklungsstadien, wenn die Migration beginnt, ist das Reportergen jedoch noch zu schwach exprimiert, um eine eindeutige Entscheidung zu treffen. Außerdem ist Elav ein panneuraler Marker, so dass die zweifelsfreie Zuordnung der die interhemisphärische Brücke bildenden Neurone schwierig ist. Es wäre von Vorteil, ausschließlich die Migration Hbn-positiver Neurone beobachten zu können. Dazu müssen allerdings entsprechende regulatorische Elemente der *hbn*-Expression bekannt sein. Es stellt sich die Frage, auf welche Weise sich die brückenbildenden Neurone orientieren können. Die Zellen könnten sich beispielsweise an bereits vorhandenen Strukturen entlang bewegen, wie es z.B. für Gliazellen des peripheren Nervensystems beschrieben wurde, die an Axonen entlang migrieren (Edenfeld *et al.*, 2005; Edenfeld *et al.*, 2007). Die embryonalen Gehirnkommisuren sind nahezu orthogonal um den Vorderdarm herum angeordnet, wobei die präorale Gehirnkommisur und die Frontalkommisur oberhalb und die tritocerebrale Gehirnkommisur unterhalb des Darms liegen. Es wurde gezeigt, dass auch die Frontalkommisur mit der Unterstützung einer neuronalen Zellbrücke gebildet wird. Diese Brücke verläuft entlang des Vorderdarmdaches in die tritocerebralen Bereiche des Gehirns. Die interhemisphärische Brücke verbindet die beiden Gehirnhemisphären ebenfalls oberhalb

des Vorderdarms, ist jedoch deutlich vom Vorderdarmdach abgetrennt (Wildemann *et al.*, 1997), so dass ausgeschlossen werden kann, dass sich die Neurone der interhemisphärischen Brücke an dieser Struktur orientieren. Möglicherweise orientieren sich die Neurone an den Zellen der unterhalb liegenden Zellbrücke, die für die Etablierung der Frontalkommissur entscheidend ist. Wenn die Bildung der interhemisphärischen Brücke auf komplex regulierten Migrationsereignissen beruht, muss daran ein räumlich und zeitlich genau aufeinander abgestimmtes Netzwerk beteiligt sein. Dieser Prozess wurde bei *Drosophila* bisher kaum untersucht.

#### 5.4 Konservierung von *hbn* im Verlauf der Evolution

Viele Kopflückengene sind im Laufe der Evolution sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion konserviert geblieben. Gene mit Sequenzhomologien zu *hbn* wurden sowohl bei den Coelenterata als auch bei den Bilateria gefunden. In zwei Klassen der Cnidaria, den Anthozoa (*Nematostella vectensis*) und den Hydrozoa (*Hydra vulgaris*), können *hbn*-Homologe gefunden werden. In verschiedenen Unterklassen der Bilateria, den Protostomia und den Deuterostomia, ist *hbn* in der Ecdysozoa-Gruppe (*Drosophila spec.*, *Anopheles gambiae*), in den Lophotrochozoa (*Capitella spec.*), in den Echinodermata (*Strongylocentrotus purpuratus*) und in den Hemichordata (*Sacciglossus kowaleskii*) vorhanden (Fröbius und Seaver, 2006; Ryan *et al.*, 2006; Howard-Ashby *et al.*, 2006). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine *hbn*-Homologen in Vertebraten bekannt. *Hbn* scheint im Laufe der Evolution zu dem Zeitpunkt verlorengegangen zu sein, als das Notochord zum ersten Mal gebildet wurde. Computer-Analysen zeigen, dass das am nächsten mit *hbn* verwandte Gen in Vertebraten *Aristaless Related Homeobox (ARX)* ist. ARX ist wie Hbn ein Homeobox-Transkriptionsfaktor der Paired-Klasse und für die Differenzierung der Hoden und des embryonalen Vorderhirns sowie für die Proliferation neuronaler Vorläufer und die Differenzierung und tangentielle Migration von Interneuronen wichtig (Gécz *et al.*, 2006; Friocourt *et al.*, 2006). ARX wurde mit einer speziellen Form der Lissenzephalie, XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia), in Verbindung gebracht. Die Lissenzephalie ist eine auf Migrationsstörungen von Neuronen zurückzuführende Fehlbildung des menschlichen Gehirns. Diese Entwicklungsstörung ist durch eine fehlerhafte Lokalisation von kortikalen Neuronen gekennzeichnet, die durch abnormale radiale Migration von Projektionsneuronen in den Neocortex verursacht wird. Die Oberfläche des Gehirns ist relativ glatt („smooth brain“), da die normalen kortikalen Falten fehlen (Kitamura *et al.*, 2002; Vallee und Tsai, 2006). XLAG ist eine besondere Form der

Lissenzephalie, die zu einer Agenesie, d.h. einem vollständigen Fehlen des Corpus Callosum führt (Dobyns *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2004). Neben Mutationen in *ARX* wurden Mutationen in den Genen *Lissencephaly-1 (LIS1)*, *14-3-3-ε*, *Doublecortin (DCX)*, *Reelin (RLN)* und *Tubulin Alpha 1A (TUBA1A)* als Ursachen von Lissenzephalie identifiziert. *LIS1*, *14-3-3-ε*, *DCX* und *TUBA1A* sind an der Nukleokinese migrierender Neurone beteiligt (Reiner *et al.*, 1993; Hattori *et al.*, 1994; des Portes *et al.*, 1998; Shaw, 2000; Keays *et al.*, 2007; Poirier *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2008). *RELN* spielt eine Rolle in einem Transduktionssignalweg über das Apolipoprotein E2 (Hiesberger *et al.*, 1999).

Der Corpus Callosum oder Balken ist das wichtigste interhemisphärische Faserbündel im Säugergehirn und verbindet Neurone der linken und rechten Hemisphäre miteinander. Beim Menschen besteht diese Struktur aus über 190 Millionen Axonen (Mihirshahi, 2006). Verschiedene Mechanismen wurden für die Bildung des Corpus Callosum vorgeschlagen (Paul *et al.*, 2007; Lindwall *et al.*, 2007). Eine wichtige, für die Entwicklung des Corpus Callosum erforderliche Struktur ist die subcallosale Schlinge. Sie ist genau ventral zum sich entwickelnden Corpus Callosum positioniert und stellt ein Führungssubstrat für die sich ausdehnenden callosalen Fasern dar. Bei Mäusen machen Neurone den Hauptanteil der subcallosalen Schlinge aus, die aus der subventrikulären Zone zur Mittellinie wandern. Die Axone des Corpus Callosum überqueren die Mittellinie dorsal zur subcallosalen Schlinge (Silver *et al.*, 1982; Shu und Richards, 2001; Shu *et al.*, 2003). Eine Entfernung der Schlinge *in utero* führt zu einer Agenesie des Corpus Callosum. In chirurgisch induzierten acallosen Tieren konnte eine Rettung der subcallosalen Schlinge *in vivo* erzielt werden (Silver *et al.*, 1982; Silver und Owaga, 1983; Katz *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1986). Die subcallosale Schlinge ist eine transiente Struktur, die bis zu den frühen postnatalen Stadien proliferativ bleibt und im Stadium P10 verschwindet (Shu *et al.*, 2003). Diese Führungsstruktur, die durch migrierende Neurone gebildet wird, erinnert sehr an die interhemisphärische Brücke in *Drosophila*, die eine unverzichtbare Struktur für die Bildung der präoralen Gehirnkommisur darstellt. Auffallende Ähnlichkeiten zeigt auch der Vergleich von *hbn* mit *ARX*. Die beiden Gene ähneln sich nicht nur in ihrer Genstruktur (Homeodomänen-Transkriptionsfaktor), sondern auch im Zelltyp, in dem die Expression stattfindet (Neurone) und vor allem in der Manifestation des Phänotyps (putative neuronale Migrationsdefekte und Verlust der wichtigsten Gehirnkommisur). *ARX* scheint also ein funktionelles Homolog von *hbn* im Säuger darzustellen. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass das *aristaless (al)*-Gen von *Drosophila*, das die größte Sequenzhomologie zu *ARX* aufweist, nach dem heutigen Kenntnisstand keine Funktion im embryonalen Gehirn erfüllt, sondern hauptsächlich an der

Entwicklung der adulten Körperanhänge, der Arista und der tarsalen Klauen erforderlich ist (Schneitz *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1993; Campbell und Tomlinson, 1998; Kojima *et al.*, 2005). *Al* wurde wahrscheinlich im Laufe der Evolution dupliziert, und eine der beiden Kopien übernahm Funktionen für die Gehirnentwicklung und blieb bis hin zu den Säugern konserviert.

### **5.5 Identifizierung neuer Gene, die an der Bildung der präoralen Gehirnkommisur beteiligt sind**

Bisher war wenig über den Mechanismus der Bildung der präoralen Gehirnkommisur während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* und die an diesem Prozess beteiligten Gene bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor *hbn* als eine wichtige Komponente für die Entwicklung der präoralen Gehirnkommisur identifiziert. Um den Vorgang der Gehirnkommisurbildung umfassender untersuchen zu können, müssen weitere Gene gefunden werden, die an diesem Prozess mitwirken. Eine Methode, möglichst viele an einem bestimmten Prozess beteiligte Gene zu identifizieren, sind genomweite Screenings. Eine gute Grundlage für solche Screenings stellt der Bloomington Deficiency Kit dar, der das *Drosophila*-Genom zu 95% mit defizienten Fliegenstämmen abdeckt. Mit Hilfe dieser Defizienzen wurden bereits viele unterschiedliche Fragestellungen untersucht. Es wurde z.B. nach einem Faktor gesucht, der für die achiasmatische Chromosomensegregation während der Meiose in *Drosophila*-Oocyten verantwortlich ist. Über Kreuzungsexperimente mit unterschiedlichen Defizienzstämmen konnte das Gen *matrimony* (*mtrm*) identifiziert werden (Harris *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel ist ein Screening nach Upstream-Faktoren und Signalkaskaden, welche die Expression des retinalen Determinationsgens *dachshund* (*dac*) regulieren. Es wurde untersucht, bei welchen Defizienzstämmen es zu einem Verlust oder einem Gewinn der embryonalen *dac*-Expression kommt. Auf diese Weise konnten die TGF $\beta$ -Signalkaskade, der Transkriptionsfaktor *zerknüllt* (*zen*) und verschiedene andere Musterbildungsgene identifiziert werden, die dafür sorgen, dass *dac* nicht in den „falschen“ Kopfreionen exprimiert wird (Anderson *et al.*, 2006). Für die Identifizierung von Regulatoren der Expression des an der dorsoventralen Musterbildung des Neuroektoderms beteiligten Homeoboxgens *intermediate neuroblasts defective* (*ind*) wurde die Sammlung von Exelixis-Defizienzstämmen des Bloomington Stock Centers eingesetzt. Über *In situ*-Hybridisierungen mit einer *ind*-Sonde an defizienten Embryonen wurde das Gen *shrew* als

Regulator gefunden. Mutationen in diesem Gen führen zu einem Verlust der dorsalen Spezifizierung, so dass die Embryonen ventralisiert sind (Bonds *et al.*, 2007).

Die Methode des Defizienzen-Screens wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um Gene zu identifizieren, die für die Bildung der interhemisphärischen Brücke und der präoralen Gehirnkommisur wichtig sind. Anhand ihrer Phänotypen wurden Defizienzen mit Defekten in diesen Strukturen bestimmten Gruppen zugeteilt.

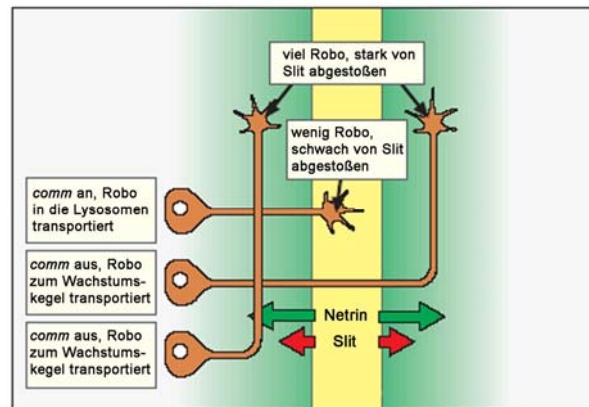
### 5.5.1 Die *hbn*-Gruppe

Defiziente Embryonen, die den gleichen Phänotyp wie *hbn*-Mutanten aufweisen, d.h. bei denen die Hbn-positiven Brückenneurone nicht einwandern und keine präorale Gehirnkommisur gebildet wird, wurden der *hbn*-Gruppe zugeordnet. Insgesamt wurden 36 Defizienzen dieser Gruppe zugeteilt, von denen zwei bis auf Einzelgeniveau (*Optix* und *Rhol*) eingeschränkt werden konnten. Zur *hbn*-Gruppe gehören auch die beiden bereits bekannten Kommissurmutanten *comm* und *jing*, die im Defizienzen-Screen ebenfalls identifiziert werden konnten.

#### *Commissureless (comm)*

Das Gen *comm* ist auf dem dritten Chromosom in der Region 71F1 lokalisiert. *Comm* ist ein intrazellulärer Rezeptor, der an der Regulation des repulsiven Slit/Robo-Systems während der axonalen Wegfindung im ventralen Nervensystem beteiligt ist. Das extrazelluläre Protein Slit wird von den Mittellinien-Gliazellen sezerniert und vermittelt über die Rezeptoren der Roundabout (Robo)-Familie ein repulsives Signal (Kidd *et al.*, 1998; Rajagopalan *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000; Dickson und Gilestro, 2006). Während die kommissuralen Axone über die Mittellinie wachsen, ist nur wenig Robo-Protein in ihren Wachstumskegeln vorhanden, so dass die Abstoßung durch das Repellens Slit an der Mittellinie gering ist. Sobald die Axone die Mittellinie überquert haben, ist viel mehr Robo in den Wachstumskegeln vorhanden und die Axone werden durch Slit abgestoßen. Im Gegensatz zu den kommissuralen Axonen exprimieren ipsilateral projizierende Axone konstant große Mengen des Robo-Proteins, so dass diese Axone immer in gleichem Maße von der Mittellinie abgestoßen werden. Die Robo-Dosis im Bereich des Wachstumskegels wird durch *Comm* reguliert. Im Wildtyp wird *Comm* ausschließlich zum Zeitpunkt des Überquerens der Mittellinie in kommissuralen Neuronen synthetisiert und reguliert zellautonom die Menge an Robo, welche die Membran des Wachstumskegels erreicht. *Comm* sorgt dafür, dass Robo in

die Endosomen transportiert und degradiert wird. *Comm* selbst wird vermutlich ebenfalls schnell degradiert, so dass nach dem Kreuzen der Mittellinie wieder mehr Robo-Protein in den Wachstumskegeln vorhanden ist und ein erneutes Überqueren der Mittellinie unterbunden wird (Abb. 5.2) (Keleman *et al.*, 2002; Georgiou und Tear, 2002; Myat *et al.*, 2002).



**Abb.5.2:** Schematische Darstellung des Slit/Robo-Systems im ventralen Nervenstrang von *Drosophila* (nach Dickson, 2002, verändert).

Im Gegensatz zu *comm* zeigen Mutanten der beiden anderen Komponenten dieses Systems, *slit* und *robo*, keinen Defekt der interhemisphärischen Brücke oder der präoralen Gehirnkommisur. Im Gegensatz zu der Situation im ventralen Nervensystem scheint *comm* in einem von *slit* und *robo* unabhängigen Mechanismus an der Bildung dieser Strukturen beteiligt zu sein.

### Jing

Das Gen *jing* liegt auf dem zweiten Chromosom in der Region 42B3-C1. Auch bei *jing*-Mutanten können ein Verlust der präoralen Gehirnkommisur und eine fehlende interhemisphärische Brücke beobachtet werden. *Jing* ist ein Zinkfingertranskriptionsfaktor, der in der Mittellinienglia des embryonalen ZNS und im embryonalen Gehirn von *Drosophila* während früher und später Stadien der Differenzierung exprimiert wird, aber auch in trachealen Zellen und in Oocyten. In den Oocyten erfüllt *jing* eine Funktion während der Initiation der Borderzellenmigration (Liu und Montell, 2001; Sedaghat und Sonnenfeld, 2002; Sedaghat *et al.*, 2002; Sonnenfeld *et al.*, 2004). Auch für die Entwicklung von Flügeln und Beinen ist *jing* wichtig (Culi *et al.*, 2006; McClure und Schubiger, 2008). Im embryonalen Gehirn ist die Funktion von *jing* für die Differenzierung Repo-, Castor- und Sim-positiver Zellen erforderlich (Sedaghat und Sonnenfeld, 2002). Im ventralen Nervensystem spielt *jing* eine Rolle für die laterale Positionierung von lateraler Glia, Neuronen und longitudinalen Axonen und auch für das Überleben von Gliazellen (Sun *et al.*, 2006).

### Optix

Das Gen *Optix* ist auf dem zweiten Chromosom in der Region 44A3 lokalisiert. *Optix* ist ein Transkriptionsfaktor der *Six/sine oculis*-Genfamilie und enthält sowohl eine Six-Domäne als auch eine Homeodomäne. Es wurde gezeigt, dass eine ektopische Expression von *Optix* zur Bildung ektopischer Augen führt (Seimiya und Gehring, 2000). Die Expression von *Optix* wird in Thorax und Abdomen des Embryos durch Hox-Gene reprimiert, um die Bildung von Kopfstrukturen zu unterdrücken (Coiffier *et al.*, 2008). *Optix* ist ein kopfspezifisches Gen, das ausschließlich in den Kopfreionen des Embryos exprimiert wird. Die Expression ist der von *hbn* sehr ähnlich und beginnt während des Blastodermstadiums ringförmig am anterioren Pol des Embryos. Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird *Optix* im Clypeolabrum und im Ektodermbereich, der das supraoesophagale Ganglion überdeckt, exprimiert (Seimiya und Gehring, 2000). Ein Funktionsverlust von *Optix* beeinflusst die Kopfentwicklung: Strukturen, die sich vom Labrum ableiten, fehlen, und auch die Mundhaken fehlen oder sind deutlich reduziert (Coiffier *et al.*, 2008). Dieser Phänotyp ähnelt dem von *hbn*-Mutanten, denen ebenfalls u.a. die labralen Strukturen fehlen. Da die Expression und der embryonale Phänotyp von *Optix* der Expression und den Phänotypen von Kopflückengenmutanten ebenfalls sehr ähnlich sind, kann *Optix* wie *hbn* auch dieser Gruppe von Genen zugerechnet werden. Mutationen in der Homeodomäne oder der Six-Domäne des *Optix*-Homologs von Vertebraten, *SIX3*, führen zu einer schwerwiegenden Fehlbildung des Gehirns, die als Holoprosenzephalie bezeichnet wird (Wallis *et al.*, 1999; Pasquier *et al.*, 2000). Die Holoprosenzephalie stellt die häufigste angeborene Gehirnfehlbildung des Menschen dar und entsteht durch eine unvollständige Teilung des Vorderhirns als Folge einer Störung im Bereich des Mittellinienentwicklungsfeldes des Kopfes. Die schwerste Form der Holoprosenzephalie ist mit einer Agenesie des Corpus Callosum verbunden. Holoprosenzephalie ist oft mit charakteristischen Gesichts- und Augenfehlbildungen verbunden, wie z.B. Lippenkiefergaumenspalte und Zyklopie (Wallis und Muenke, 1999; Wallis und Muenke, 2000; Cohen, 2001; Dubourg *et al.*, 2007; Shiota *et al.*, 2007).

### Rho1

*Rho1* (Synonyme: *Drho*, *Rho*, *RhoA*) liegt auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms an der Position 52E5. *Rho1* gehört neben *Rac* und *Cdc42* zur Rho-Familie der kleinen GTPasen, einer Gruppe evolutionär konservierter Proteine. Diese Proteine vermitteln Signalwege, die für eine Vielzahl zellulärer Prozesse verantwortlich sind. Viele dieser zellulären Prozesse gehen mit einer dynamischen cytoskeletalen Umorganisation einher. Es handelt sich dabei um



Prozesse, welche die Form, die adhäsiven Eigenschaften und die Bewegung von Zellen bestimmen, wie z.B. Zellularisierung, Cytokinese, Gastrulation und Rückenschluss (Settleman, 2001). Eine dynamische Umorganisation der Cytoskeletts spielt auch bei der neuronalen Migration im Säuger eine Rolle. Sowohl das Mikrotubuli- als auch das Aktin-Netzwerk als Komponenten des Cytoskeletts sind an der Motilität der Zellen beteiligt. Eine Unterbrechung der Aktin-Dynamik kann die neuronale Migration vollständig inhibieren (Rivas und Hatten, 1995). Mutationen, die das Aktin-Netzwerk destabilisieren, beeinflussen außerdem stark die Entwicklung des zentralen Nervensystems. Dies ist auch bei der periventriculären Heterotopie der Fall, bei der die Neurone nicht in der Lage sind, aus den Keimblättern zu migrieren und stattdessen Klumpen bilden, welche die lateralen Ventrikel des Gehirns umsäumen (Fox *et al.*, 1998). Die periventriculäre Heterotopie wird durch Mutationen in Filamin1 verursacht, einem Protein, das für die Quervernetzung von Aktin zuständig ist. Filamin1 interagiert mit verschiedenen Gruppen von Transmembranproteinen und dient als Gerüst für die Signalproteine der Rho-GTPase-Familie, die bekanntermaßen an der Neuritenextension und neuronalen Migration beteiligt sind (Dhavan und Tsai, 2001; Luo, 2000; Stossel *et al.*, 2001; Ayala *et al.*, 2007).

### 5.5.2 Die *sim*-Gruppe

Zur *sim*-Gruppe gehören Embryonen, bei denen die Brückenneurone nur ein kurzes Stück in einem zu steilen Winkel einwandern und deren Gehirnkommisur entweder nicht oder nur dünn gebildet wird. Dieser Gruppe wurden drei Defizienzen zugeordnet, von denen eine bis auf Einzelgenniveau (*sim*) eingeschränkt werden konnte.

#### Single-minded (*sim*)

*Sim* liegt auf dem dritten Chromosom in der Region 87D11 und kodiert für einen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor, der als Masterregulator der Mittellinienzellen fungiert. *Sim* ist u.a. für die Differenzierung von Mittellinienzellen in Neurone und Gliazellen verantwortlich (Crews *et al.*, 1988; Nambu *et al.*, 1990, 1991). Mutationen von *sim* führen zu einem ausgeprägten Phänotyp im Ventralganglion: Die Kommissuren bilden sich nicht, und die longitudinalen Trakte kollabieren an der Mittellinie zu einem fusionierten Strang (Thomas *et al.*, 1988; Klämbt *et al.*, 1991). Dieser Phänotyp wird durch den Verlust von Mittellinienzellen und den damit verbundenen Verlust von abstoßenden Molekülen wie z.B. Slit, die von diesen Zellen sezerniert werden, verursacht (Kidd *et al.*, 1999). Im embryonalen

Gehirn von *sim*-Mutanten bilden sich die longitudinalen circumoesophagalen Konnektive aufgrund einer Lücke in der Anordnung der longitudinalen Gliazellen, die sich normalerweise um den einwachsenden Vorderdarm herum bilden, nicht (Therianos *et al.*, 1995). Für die Entwicklung Sim-positiver Zellen ist der Transkriptionsfaktor *jing* erforderlich. Sowohl eine Änderung der normalen *Jing*-Dosis in Sim-positiven Zellen als auch eine Überexpression von *sim* im embryonalen Gehirn bewirken eine Störung der Axonogenese, wobei besonders die präorale Gehirnkommisur und die tritocerebrale Kommisur betroffen sind. In *sim*-exprimierenden Zellen werden vermutlich ähnliche Moleküle durch die Expression von *sim* und *jing* aktiviert und/oder reprimiert (Sedaghat und Sonnenfeld, 2002). Bei der Maus und beim Menschen sind zwei Homologe von *sim* bekannt. In der Maus werden *Sim1* und *Sim2* schon früh im sich entwickelnden Vorderhirn exprimiert (Fan *et al.*, 1996). Das humane *SIM2* kartiert in der sogenannten chromosomalen Down-Syndrom-Region. Als Down-Syndrom bezeichnet man die Verdreifachung (Trisomie) des 21. Chromosoms oder von Teilen davon. Man geht davon aus, dass drei Kopien von *SIM2* zu einigen spezifischen Down-Syndrom-Phänotypen beitragen. *SIM2* hat eine potentielle Funktion als transkriptioneller Repressor und bildet vermutlich Dimere mit anderen Transkriptionsfaktoren. Zudem erfüllt das humane *SIM2* während der Neurogenese wahrscheinlich eine analoge Rolle zu *sim* in *Drosophila* (Chrast *et al.*, 1997).

### 5.5.3 Die *fra*-Gruppe

Defizienzen, die der *fra*-Gruppe zugeordnet wurden, zeichnen sich dadurch aus, dass zu viele Hbn-positive Neurone zu weit zur Mittellinie einwandern, wodurch teilweise eine zu stark ausgeprägte präorale Gehirnkommisur bedingt ist. Insgesamt wurden dieser Gruppe neun Defizienzen zugeordnet, von denen zwei bis auf Einzelgenniveau (*fra*, *hh*) eingeschränkt werden konnten. *NetA*- und *NetB*-Mutanten gehören ebenfalls zur *fra*-Gruppe.

#### Hedgehog (*hh*)

Das Gen *hedgehog* (*hh*) ist auf dem dritten Chromosom in der Region 94D10-13 lokalisiert. Die Hh-Familie sekretierter Proteine reguliert sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten zahllose Entwicklungsprozesse (McMahon *et al.*, 2003; Huangfu und Anderson, 2006). Der *hh*-Signalweg ist bei *Drosophila* u.a. an der Segmentierung des dorsalen Kopfneuroektoderms beteiligt. Aus dieser Region, die auch als anteriore Gehirn- und Augenanlage bezeichnet wird, entwickeln sich sowohl das visuelle System als auch das Protocerebrum. *Hh* steuert in den

Zellen des Augenfeldes die Expression der Determinanten für das larvale und das adulte Auge. Die Überexpression von *hh* führt zu einer ektopischen Induktion von larvalem Augengewebe an der dorsalen Mittellinie, ein Phänotyp, der an Zyklopie erinnert (Chang *et al.*, 2001). Der *hh*-Signalweg ist auch für die Determination und die Morphogenese des Corpus Cardiacum wichtig. Diese Struktur ist ein Bestandteil der Ringdrüse, die mit dem neuroendokrinen Kompartiment des Insektengehirns verbunden ist. Ein Verlust von *hh* führt zu Defekten der Proliferation und der Migration der Vorläuferzellen des Corpus Cardiacum (De Velasco *et al.*, 2004). In Vertebraten wurden drei *hh*-Homologe identifiziert (Echelard *et al.*, 1993; Marigo *et al.*, 1995). *Sonic hedgehog* (*Shh*) ist für die Bildung vieler verschiedener Organsysteme sehr wichtig, z.B. für das Gehirn, die Augen, die Somiten, das Rückenmark, craniofaciale Strukturen und die Gliedmaßen (Wallis und Muenke, 2000). *Shh* wird im Hensenschen Knoten, im Notochord und in der Mittellinie des sich entwickelnden Gehirns exprimiert und ist für die Entwicklung des Neuralrohrs wichtig. Ein Funktionsverlust von *Shh* kann zu Holoprosenzephalie führen. Bei Mäusen hat eine gezielte Unterbrechung des *Shh*-Gens strukturelle Defekte der Mittellinie, Entwicklungsdefekte des ventralen Vorderhirns, Gliedmaßenanomalien und Zyklopie zur Folge (Chiang *et al.*, 1996).

#### *Frazzled* (*fra*), *NetrinA* (*NetA*) und *NetrinB* (*NetB*)

*Fra* liegt auf dem zweiten Chromosom in der Region 49A10-B3, *NetA* ist auf dem X-Chromosom in der Region 12F1-2 lokalisiert und *NetB* auf dem X-Chromosom in der Region 12F2-3. Netrine sind eine Familie konservierter sekretierter Proteine, die als „Wegweiser“ für migrierende Zellen und axonale Wachstumskegel dienen. Sie können auf bestimmte Axone anziehend, auf andere abstoßend wirken. Netrine wirken durch Rezeptoren, die zu zwei unterschiedlichen Familien gehören. Bei diesen beiden Familien handelt es sich zum einen um die Deleted-in-Colorectal-Cancer (DCC)-Familie und zum anderen um die UNC5-Familie (Keleman und Dickson, 2001). *Fra* zählt zu den DCC-Rezeptoren (Kolodziej *et al.*, 1996). Diese Rezeptoren sind Transmembranrezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie. Man geht davon aus, dass die DCC-Rezeptoren Anziehung und in einigen Fällen auch Abstoßung vermitteln, während die UNC5-Rezeptoren ausschließlich Abstoßung vermitteln (Keleman und Dickson, 2001). Die beiden Netrine von *Drosophila*, *NetA* und *NetB*, werden von Mittellinienzellen des zentralen Nervensystems und von spezifischen Muskeln in der Peripherie exprimiert (Harris *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 1996; Keleman und Dickson, 2001). *NetA* und *NetB* wirken über den Rezeptor *fra* als attraktive Signale und weisen kommissuralen Axonen den Weg in Richtung der Mittellinie und Motoaxonen den Weg zu den Muskeln, die

von ihnen innerviert werden sollen (Harris *et al.*, 1996; Kolodziej *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 1996; Winberg *et al.*, 1998). Bei *Drosophila* wirkt das Netrin/Frazzled-System auch als Signalgeber für die Navigation der Dendriten der Motoneurone RP3, aCC und RP2. Bei Vertebraten sind die Netrine nicht nur an der axonalen Wegfindung und der Migration von Zellen beteiligt, sondern regulieren auch verschiedene Prozesse wie Zelladhäsion, Motilität, Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen in vielen nicht-neuralen Geweben (Cirulli und Yebra, 2007).

#### **5.5.4 Die Lückengen-Gruppe**

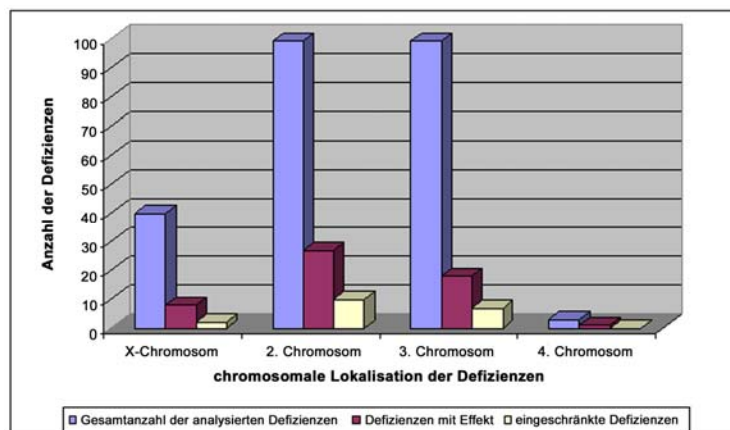
In die Lückengen-Gruppe wurden Defizienzen eingeordnet, die einen ähnlichen Gehirnphänotyp wie Kopflückengenmutanten zeigen, d.h. dass komplette Gehirnbereiche fehlen. Bisher wurden dieser Gruppe fünf Defizienzen zugeordnet. Eine dieser Defizienzen deckt das Kopflückengen *otd* nicht ab und zeigt den entsprechenden Phänotyp mit fehlendem Protocerebrum und teilweise fehlendem Deutocerebrum. Weitere Defizienzen wurden bisher nicht auf Einzelgenniveau eingegrenzt. Für die Aufklärung der Bildung der präoralen Gehirnkommisur ist diese Defizienzgruppe nicht sehr gut geeignet, da zu große Gehirnbereiche fehlen. Für die Aufklärung zukünftiger Fragestellungen können jedoch auch diese Defizienzen von großem Nutzen sein.

#### **5.5.5 Defizienzen mit anderen Gehirnphänotypen**

In diese Gruppen wurden Defizienzen eingeteilt, die einen interessanten Gehirnphänotyp zeigen, der dazu beitragen kann, die Fragestellung der präoralen Gehirnkommisurbildung weiter zu bearbeiten, aber nicht in eine der bereits genannten Gruppen eingeordnet werden kann. Fünf Defizienzen mit einem solchen Phänotyp wurden bisher identifiziert, aber noch nicht auf Einzelgenniveau eingeschränkt. Die interessanteste dieser Defizienzen bildet keine präorale Gehirnkommisur aus, obwohl eine interhemisphärische Brücke etabliert wird. Es gibt mehrere Möglichkeiten, diesen Phänotyp zu erklären. Zum einen könnten die Neurone, die Axone über die interhemisphärische Brücke projizieren, beeinträchtigt sein, so dass sie keine Axone mehr ausbilden können. Zum anderen könnten auch die Hbn-positiven Brückenneurone selbst Signale aussenden, die dafür notwendig sind, dass Axone die interhemisphärische Brücke erkennen und als Gerüst benutzen. Fehlen diese Signale, können sich die Axone nicht orientieren. Wenn dieser Fall zutrifft, handelt es sich bei dem

verantwortlichen Gen, das in der Defizienz deletiert ist, vermutlich um ein Downstream-Gen von *hbn*.

Interessanterweise sind für alle Kandidatengene, die bisher während des Defizienzen-Screens als Regulatoren für die Bildung der präoralen Gehirnkommisur bei *Drosophila* identifiziert wurden, orthologe Gene im Säuger bekannt, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der embryonalen Gehirnentwicklung spielen und bei Funktionsverlust teilweise sogar einen sehr ähnlichen Phänotyp verursachen. Hier fallen besonders die Vertebraten-Homologen von *Optix* (*SIX3*) und *hh* (*Shh*) auf. Mutationen dieser Gene führen zu Holoprosenzephalie, einer schwerwiegenden Fehlentwicklung des Gehirns, die auch mit einer Agenesie des Corpus Callosum verbunden sein kann. Dies verdeutlicht einmal mehr das große Potenzial des Screens, der sich noch in der Anfangsphase befindet. Bisher wurden von den 58 Defizienzen, die einen interessanten Gehirnphänotyp zeigen, 21 Defizienzen auf einen kleineren Bereich eingeschränkt, wobei fünf Defizienzen bis auf Einzelgenniveau eingegrenzt werden konnten (Abb. 5.3).



**Abb. 5.3:** Statistische Darstellung der Anzahl der insgesamt analysierten Defizienzen, der Defizienzen, die einen Effekt auf die Bildung der präoralen Gehirnkommisur bzw. auf die Lokalisation der Hbn-positiven Brückenneurone zeigen, und der Defizienzen, die auf kleinere Bereiche bzw. bis auf Einzelgenniveau eingeschränkt wurden.

Es gibt jedoch auch Grenzen in der Anwendbarkeit des Defizienzen-Screens. Die Defizienzen des Bloomington Deficiency Kits sind relativ groß und deletieren im Durchschnitt etwa 50 bis 100 Gene. Der Verlust einer so großen Anzahl von Genen kann in einigen Fällen zu so schweren Defekten der Embryonen führen, dass sie phänotypisch nicht mehr auswertbar sind. Ein phänotypischer Effekt kann außerdem durch die Deletion einer Kombination bestimmter Gene und nicht durch die Deletion eines Einzelgens zustande kommen. Mit dieser Methode werden sich daher nicht ausnahmslos alle Gene, die an einem bestimmten Prozess beteiligt sind, identifizieren lassen.

## 5.6 Modell der neuronalen Migration im embryonalen Gehirn von *Drosophila*

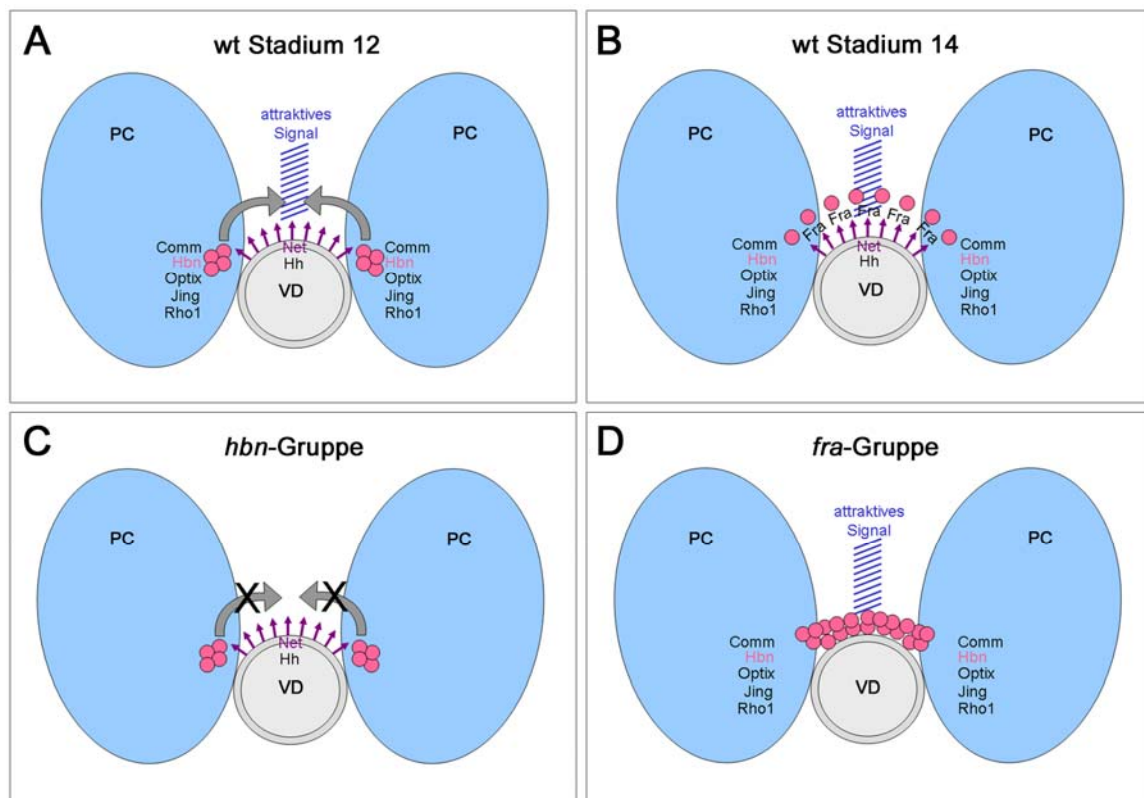
Die neuronale Migration ist ein sehr komplexer Prozess (Marín *et al.*, 2006; Maness und Schachner, 2007; Ghashgaei *et al.*, 2007), und Fehler in diesem Prozess führen zur Fehlbildung wichtiger neuraler Strukturen (LoTurco und Bai, 2006). In *hbn*-Funktionsverlustmutanten wurden putative Migrationsstörungen in Neuronen der interhemisphärischen Brücke beobachtet. Beim Menschen sind sehr ähnliche Defekte bekannt, die auf Migrationsstörungen von Neuronen zurückzuführen sind (Gressens, 2006). Wenn auch die Bildung der interhemisphärischen Brücke auf komplex regulierten Migrationsereignissen beruht, muss daran ein zeitlich und räumlich genau aufeinander abgestimmtes molekulares Netzwerk beteiligt sein. Bei Vertebraten sind mehrere Komponenten bekannt, die für neuronale Migration notwendig sind. Zu diesen Komponenten zählen extrazelluläre „Wegweiser“, neurotrophe Faktoren, Zelladhäsionskomplexe und cytoskeletale Modifikationen (Ayala *et al.*, 2007). Die Mittellinie ist ein wichtiger Bereich für die Ausschüttung extrazellulärer „Wegweiser“, die von neuronengekoppelten Rezeptoren erkannt werden (Garbe und Bashaw, 2004). Diese wirken entweder abstoßend oder anziehend, was durch ihre jeweiligen extrazellulären Rezeptoren vermittelt wird (Kolodziej *et al.*, 1996; Hiramoto *et al.*, 2000; Dickson, 2002; Bashaw, 2004). Die Translokation von Neuronen wird über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt, die zu den Migrationskomponenten geleitet werden, zu denen wiederum cytoskeletale Proteine wie Aktin, Tubulin, MAP1b, MAP2, Tau und Dynein gehören (Dehmelt und Halpain, 2004).

Mit Hilfe des Defizienzen-Screens wurde eine Anzahl von Genen identifiziert, die für die Etablierung der interhemisphärischen Brücke wichtig sind. Auf der Grundlage der Phänotypen können Aussagen getroffen werden, welche Rolle diese Gene für den Migrationsprozess der Brückenneurone spielen, und wie sie in einem Netzwerk verknüpft sein könnten. Die Migration der Hbn-positiven Brückenneurone muss einerseits durch anziehende Faktoren vermittelt werden, die von Mittellinienzellen sekretiert werden und den Neuronen das Signal geben, in Richtung der Mittellinie zu wandern (Abb. 5.4A). Ein Kandidat für dieses attraktive Signalzentrum wurde bisher noch nicht gefunden. Das attraktive Signal muss von den entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Hbn-positiven Brückenneurone interpretiert, weitergeleitet und verarbeitet werden. An diesem Vorgang sollten Gene beteiligt sein, die der *hbn*-Gruppe zugeordnet wurden. Vermutlich sind die Transkriptionsfaktoren Hbn, Optix und Jing an der Weitervermittlung des Signals beteiligt. *In situ*-Hybridisierungen zeigen, dass auch *Optix* und *jing* in den Brückenneuronen exprimiert sein könnten. *Optix* ist

dabei vermutlich ein Downstream-Gen von *hbn*, da sich diese beiden Gene sehr in Expression und Phänotyp ähneln, wobei die phänotypischen Effekte bei *Optix*-Mutanten tendenziell geringer sind als bei *hbn*-Mutanten. Welche Rolle *comm* spielen könnte, ist bisher noch nicht bekannt, es konnte auch noch nicht festgestellt werden, ob *comm* in den Brückenneuronen oder in Mittellinienzellen exprimiert wird. Für die Formveränderung und Fortbewegung migrierender Zellen sind cytoskeletale Komponenten maßgeblich. Zu diesen Komponenten gehört auch Rho1 und trägt deshalb wahrscheinlich zu dem eigentlichen Migrationsvorgang bei. Weitere wichtige Signalzentren für die Hbn-positiven Brückenneurone sind das Ektoderm und das Mesoderm des Vorderdarms. Es wurde gezeigt, dass *hh* im Vorderdarm unmittelbar an das Gehirn angrenzend exprimiert wird, und dass ein Verlust der *hh*-Funktion zu Musterbildungsdefekten des Gehirns führt. Es wurde u.a. eine Verdickung der präoralen Gehirnkommisur beobachtet (Page 2002), die in dieser Arbeit bestätigt wurde und auf ein vermehrtes Einwandern Hbn-positiver Neurone zurückzuführen ist. Es ist deshalb davon auszugehen, dass Hh als repulsives Signal vom Vorderdarm sezerniert wird und dafür sorgt, dass die Brückenneurone oberhalb der Darmoberfläche wandern (Abb. 5.4B). Auch die Netrine könnten ein repulsives Signal darstellen. *NetA* und *NetB* werden im visceralen Mesoderm exprimiert (Mitchell et al., 1996). Auf der Oberfläche der Hbn-positiven Brückenneurone befinden sich vermutlich *fra*-Rezeptoren. An diese Rezeptoren binden die vom Vorderdarm sezernierten Netrine und wirken abstoßend auf die Neurone. Da die Netrine im ventralen Nervensystem nur über relativ kurze Distanzen agieren (Brankatschk und Dickson, 2006), könnte dies auch im Bereich des Vorderdarms der Fall sein, so dass die Brückenneurone in einem gewissen Abstand vom Vorderdarm migrieren können (Abb. 5.4B). Das Netrin/Frazzled-System war bisher vor allem als attraktives System der axonalen Wegfindung bekannt (Harris et al., 1996; Kolodziej et al., 1996; Mitchell et al., 1996). Auf die Migration der Brückenneurone scheint dieses System einen gegenteiligen Effekt auszuüben. Ein solcher gegenteiliger Effekt des Netrin/Frazzled-Systems auf axonale Wegfindung und auf die neuronale Migration kann damit erklärt werden, dass unterschieden werden muss, ob nur der axonale Wachstumskegel seine Lokalisation verändert und das Neuron an seinem Platz bleibt, oder ob die ganze Zelle ihre Position verändern soll. Möglicherweise könnten dabei ähnliche Verteilungsmechanismen der Rezeptoren eine Rolle spielen, wie sie für die Unterscheidung der axonalen und der dendritischen Wegfindung vermutet werden (Furrer et al., 2003).

Bei Mutanten der *hbn*-Gruppe sind die Brückenneurone nicht in der Lage, zur Mittellinie zu wandern (Abb. 5.4C). Dafür kann es mehrere Ursachen geben. Eine Möglichkeit wäre, dass

von der Mittellinie sezernierte attraktive Signale nicht mehr interpretiert werden können, weil die entsprechenden Rezeptoren nicht intakt sind oder die Signale nicht übermitteln können. Zum anderen könnte das attraktive Signalzentrum an der Mittellinie fehlen, oder die Neurone können nicht entsprechend reagieren, wenn zur Migration erforderliche cytoskeletale Komponenten fehlen. Bei den Mutanten der *fra*-Gruppe wandern zu viele Neurone zu weit in die Mittellinie ein (Abb. 5.4D). Dies kann dadurch bedingt sein, dass auf Neuronen, die nicht zur Mittellinie wandern sollen, bestimmte Rezeptoren fehlen, die normalerweise auf repulsive Signale reagieren, so dass die Neurone fälschlicherweise zur Mittellinie wandern können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass bei Mutanten dieses Phänotyps nicht die Rezeptoren auf den Neuronen fehlen, sondern das repulsive Signalzentrum selbst.



**Abb. 5.4: Modellvorstellung zur Regulation der Migration Hbn-positiver Neurone im embryonalen Gehirn von *Drosophila*.** (A, B) Die Gene der *hbn*-Gruppe stellen Komponenten eines attraktiven Systems dar, die Gene der *fra*-Gruppe gehören zu einem repulsiven System. (C) Sind Gene der *hbn*-Gruppe mutiert, können die Hbn-positiven Brückenneurone nicht zur Mittellinie wandern, und es wird keine interhemisphärische Brücke gebildet. (D) Sind Gene der *fra*-Gruppe mutiert, wandern zu viele Hbn-positive Brückenneurone zur Mittellinie, und es bildet sich eine zu kompakte interhemisphärische Brücke. PC: Protocerebrum. VD: Vorderdarm. Rosafarbene Kreise stellen Hbn-positive Brückenneurone dar, violette Pfeile das sekretierte Net-Signal.

Welche Rolle die Gene der *sim*-Gruppe für die Migration der Hbn-positiven Brückenneurone spielen, ist bisher noch schwierig zu erklären. In Mutanten dieser Gruppe wandern die Hbn-positiven Brückenneurone ein kurzes Stück in einem zu steilen Winkel ein. Dieses Verhalten könnte damit begründet werden, dass die entsprechenden Gene zu einem Signalzentrum im



Bereich der Mittellinie gehören, dass attraktive Signale für die Hbn-positiven Brückenneurone sezerniert. Wird kein anziehendes Signal sezerniert, könnten sich die Neurone an einem zusätzlichen Zentrum orientieren, das weiter dorsal liegt, so dass der Einwanderungswinkel steiler wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Gene der *sim*-Gruppe im Vorderdarm exprimiert werden und dort als attraktives Signal wirken. Bei einem fehlenden Signal würden die Hbn-positiven Neurone stärker von den Hh-Signalen reprimiert und in einem größeren Abstand vom Vorderdarm wandern. Es wurde jedoch gezeigt, dass *sim* selbst zwar im Vorderdarm exprimiert wird, jedoch im ventralen Bereich des Vorderdarms (Page, 2003), so dass der Abstand von den Brückenneuronen wahrscheinlich zu groß ist, um als Signal zu wirken. Der zu steile Einwanderungswinkel der Brückenneurone lässt sich durch morphologische Veränderungen des Gehirns erklären. In *sim*-Mutanten ist die Bildung der longitudinalen circumoesophagealen Konnektive des embryonalen Gehirns gestört (Therianos *et al.*, 1995). Sind die Konnektive verkürzt oder fehlen ganz, ist auch die Lokalisation des Protocerebrums verändert und nach ventral verschoben. Das bedeutet, dass sich auch der Winkel ändert, in dem die Brückenneurone den Darm überqueren müssen, und steiler wird. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Situation auch in den anderen Defizienzen der *sim*-Gruppe gefunden werden kann.

## 5.7 Ausblick

Die Funktionsanalyse des Homeoboxgens *hbn* zeigte, dass dieses Gen unerlässlich für die Bildung der präoralen Gehirnkommisur ist. Mit Hilfe des Defizienzen-Screens können weitere Gene identifiziert werden, die eine Rolle für die korrekte Einwanderung der Hbn-positiven Brückenneurone und für die Bildung der präoralen Gehirnkommisur spielen. In den letzten Jahren wurde eine genomweite Bibliothek transgener Fliegen erzeugt, die durch RNAi eine Inaktivierung bestimmter Genfunktionen in einem spezifischen Gewebe ermöglichen (Dietzl *et al.*, 2007), so dass die Kandidatengene systematisch in *hbn*-exprimierenden Zellen herunterreguliert und so neue Zielgene von *hbn* gefunden werden können. Auf diese Weise könnte es gelingen, den Signalweg weiter aufzuklären, der für die Bildung der präoralen Gehirnkommisur verantwortlich ist. Für diese Analysen müssen zunächst *hbn*-spezifische Treiberlinien erzeugt werden, was nur möglich ist, wenn die regulatorischen Elemente der *hbn*-Expression bekannt sind. Von besonderem Interesse ist es, das regulatorische Element für die *hbn*-Expression in den P2m-Neuronen zu finden, um Treiberlinien zu erzeugen, mit deren Hilfe bestimmte Gene gezielt in diesen Neuronen fehlexprimiert oder herunterreguliert und

der resultierende Effekt auf die Migration der Zellen und die Bildung der interhemisphärischen Brücke beobachtet werden kann. In vielen Fällen führte die Analyse von Genen, die sich von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila* erwiesen hatten, unmittelbar zur Entdeckung homologer Gene, die von ähnlicher Wichtigkeit für die Entwicklung des Nervensystems höherer Organismen einschließlich der Säugetiere sind. Dies könnte auch der Fall für einige der Gene sein, die über den Defizienzen-Screen identifiziert wurden, so dass dieser Screen nicht nur für die Aufklärung der Gehirnentwicklung von *Drosophila* von Nutzen ist, sondern auch zur Aufdeckung der Mechanismen der Gehirnentwicklung von Säugern beitragen kann.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams MD, Celniker SD, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF *et al.* (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195
2. Anderson J, Salzer CL, Kumar JP (2006) Regulation of the retinal determination gene *dachshund* in the embryonic head and developing eye of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 297:536-549
3. Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128:29-43
4. Bach N (2005) Charakterisierung des Homöobox-Gens *orthopedia* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
5. Bardin AJ, Le Borgne R, Schweisguth F (2004) Asymmetric localization and function of cell-fate determinants: a fly's view. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:6-14
6. Barolo S, Carver LA, Posakony JW (2000) GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques* 29:726, 728, 730, 732
7. Bashaw GJ (2004) Semaphorin signaling unplugged: a nervy AKAP cAMP(s) out on plexin. *Neuron* 42:363-366
8. Bello B, Reichert H, Hirth F (2006) The *brain tumor* gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*. *Development* 133:2639-2648
9. Bernardoni R, Kammerer M, Vonesch JL, Giangrande A (1999) Gliogenesis depends on *glide/gcm* through asymmetric division of neuroglioblasts. *Dev. Biol.* 216:265-275
10. Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA (2006) Asymmetric segregation of the tumor suppressor *brat* regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 124:1241-1253
11. Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 6:9-23
12. Bier E, Ackerman L, Barbel S, Jan L, Jan YN (1988) Identification and characterization of a neuron-specific nuclear antigen in *Drosophila*. *Science* 240:913-916
13. Bier E, Vaessin H, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN (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
14. Bhat KM (1999) Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* 21:472-485
15. Bhat KM (2007) Wingless activity in the precursor cells specifies neuronal migratory behavior in the *Drosophila* nerve cord.
16. Bonds M, Sands J, Poulson W, Harvey C, Von Ohlen T (2007) Genetic screen for regulators of *ind* expression identifies *shrew* as encoding a novel Twisted gastrulation-like protein involved in Dpp signaling. *Dev. Dyn.* 236:3524-3531

17. Bossing T, Udolph G, Doe CQ, Technau GM (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.
18. Boyan G, Reichert H, Hirth F (2003) Commissure formation in the embryonic insect brain. *Arthropod Struct. Dev.* 32:61-77
19. Brankatschk M, Dickson BJ (2006) Netrins guide *Drosophila* commissural axons at short range. *Nat. Neurosci.* 9:188-194
20. Brennecke J, Hipfner DJ, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113:25-36
21. Campbell G, Goring H, Lin T, Spana E, Andersson S, Doe CQ, Tomlinson A (1994) RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. *Development* 120:2957-2966
22. Campbell G, Tomlinson A (1998) The roles of the homeobox genes *aristales* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development* 125:4483-4493
23. Campbell G, Weaver T, Tomlinson A (1993) Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: The role of *wingless*, *decapentaplegic*, and the homeobox gene *aristales*. *Cell* 74:1113-1123
24. Campos AR, Rosen DR, Robinow SN, 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
25. Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1985) The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo
26. Chang T, Mazotta J, Dumstrei K, Dumitrescu A, Hartenstein V (2001) Dpp and Hh signaling in the *Drosophila* embryonic eye field. *Development* 128:4691-4704
27. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature* 383:407-413
28. Chrast R, Scott HS, Chen H, Kudoh J, Rossier C, Minoshima S, Wang Y, Shimizu N, Antonarakis SE (1997) Cloning of two human homologs of the *Drosophila single-minded* gene SIM1 on chromosome 6q and SIM2 on 21q within the Down syndrome chromosomal region. *Genome Res.* 7:615-624
29. Cirulli V, Yebra M (2007) Netrins: beyond the brain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:296-306
30. Cohen MM Jr. (2001) Problems in the definition of holoprosencephaly. *Am. J. Med. Genet.* 103:183-187
31. Cohen SM, Jürgens G (1990) Mediation of *Drosophila* head development by gap-like segmentation genes. *Nature* 346:482-485
32. Cohen SM, Jürgens G (1991) *Drosophila* headlines. *Trends Genet.* 7:267-272
33. Coiffier D, Charroux B, Kerridge S (2008) Common functions of central and posterior Hox genes for the repression of head in the trunk of *Drosophila*. *Development* 135:291-300

34. Crews ST, Thomas JB, Goodman CS (1988) The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* 52:143-151
35. Culi J, Aroca P, Modolell J, Mann RS (2006) *jing* is required for wing development and to establish the proximo-distal axis of the leg in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173:255-266
36. 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
37. Davis RJ, Tavsanli BC, 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
38. Dehmelt L, Halpain S (2004) Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J. Neurobiol.* 58:18-33
39. Des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y *et al.* (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 92:51-61
40. De Velasco B, Shen J, Go S, Hartenstein V (2004) Embryonic development of the *Drosophila* corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by *sine oculis* and *glass*. *Dev. Biol.* 274:280-294
41. Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:749-759
42. Dickson BJ (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298:1959-1964
43. Dickson BJ, Gilestro GF (2006) Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22:651-675
44. Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448:151-156
45. Dobyns WB, Berry-Kravis E, Havernick NJ, Holden KR, Viskochil D (1999) X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia. *Am. J. Med. Genet.* 86:331-337
46. Doe CQ, Chu-LaGriff Q, Wright DM, Scott MP (1991) The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* 65:451-464
47. Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V (2007) Holoprosencephaly. *Orphanet J. Rare Dis.* 2:8
48. Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15
49. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430

50. Edenfeld G, Altenhein B, Zierau A, Cleppien D, Krukkert K, Technau G, Klämbt C (2007) Notch and Numb are required for normal migration of peripheral glia in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 301:27-37
51. Edenfeld G, Stork T, Klämbt C (2005) Neuron-glia interaction in the insect nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15:34-39
52. Eggert T, Hauck B, Hildebrandt N, Gehring WJ, Walldorf U (1998) Isolation of a *Drosophila* homolog of the vertebrate homeobox gene *Rx* and its possible role in brain and eye development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2343-2348
53. Fan CM, Kuwana E, Bulfone A, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA, Crews S, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M (1996) Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila single-minded* suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol. Cell Neurosci.* 7:1-16
54. Finkelstein R, Perrimon N (1990) The *orthodenticle* gene is regulated by *bicoid* and *torso* and specifies *Drosophila* head development. *Nature* 346:485-488
55. Finkelstein R, Smouse D, Capaci TM, Spradling AC, Perrimon N (1990) The *orthodenticle* gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4:1516-1527
56. Fox JW, Lamperti ED, Ekşioğlu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA *et al.* (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21:1315-1325
57. Friocourt G, Poirier K, Rakic S, Parnavelas JG, Chelly J (2006) The role of ARX in cortical development. *Eur. J. Neurosci.* 23:869-876
58. Fröblius AC, Seaver EC (2006) *Capitella* sp. I *homeobrain-like*, the first lophotrochozoan member of a novel paired-like homeobox gene family. *Gene Expr. Patterns* 6:985-991
59. Furrer MP, Kim S, Wolf B, Chiba A (2003) Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat. Neurosci.* 6:223-230
60. Garbe DS, Bashaw GJ (2004) Axon guidance at the midline: from mutants to mechanisms. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39:319-341
61. Gao Q, Wang Y, Finkelstein R (1996) *Orthodenticle* regulation during embryonic head development in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 56:3-15
62. Gécz J, Cloosterman D, Partington M (2006) *ARX*: a gene for all seasons. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:308-316
63. Georgiou M, Tear G (2002) Commissureless is required both in commissural neurons and midline cells for axon guidance across the midline. *Development* 129:2947-2956
64. Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES (2007) Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat. Rev. Neurosci.* 8:141-151
65. González-Gaitán M, Jäckle H (1995) Invagination centers within the *Drosophila* stomatogastric nervous system anlage are positioned by *Notch*-mediated signaling which is spatially controlled through *wingless*. *Development* 121:2313-2325

66. Goodman CS, Doe CQ (1993) Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In: Bate CM, Martinez-Arias A (eds) The development of *Drosophila melanogaster*, Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 1131-1206
67. Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation restriction mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4645-4649
68. Grenningloh G, Rehm EJ, Goodman CS (1991) Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. Cell 67:45-57
69. Gressens P (2006) Pathogenesis of migration disorders. Curr. Opin. Neurol. 19:135-140
70. Grossniklaus U, Cadigan KM, Gehring WJ (1994) Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head. Development 120:3155-3177
71. Grossniklaus U, Pearson RK, Gehring WJ (1992) The *Drosophila sloppy paired* locus encodes two proteins involved in segmentation that show homology to mammalian transcription factors. Genes Dev. 6:1030-1051
72. Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P, Cook-Wiens E (2005) Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. Ageing Res. Rev. 4:372-397.
73. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580
74. Harris D, Orme C, Kramer J, Namba L, Champion M, Palladino MJ, Natzle J, Hawley RS (2003) A deficiency screen of the major autosomes identifies a gene (*matrimony*) that is haplo-insufficient for achiasmate segregation in *Drosophila* oocytes. Genetics 165:637-652
75. Harris R, Sabatelli LM, Seeger MA (1996) Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. Neuron 17:217-228
76. Hartenstein V (1993) Atlas of *Drosophila* development. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
77. Hartmann B, Reichert H (1998) The genetics of embryonic brain development in *Drosophila*. Mol. Cell. Neurosci. 12:194-205
78. Hartmann B, Reichert H, Walldorf U (2001) Interaction of gap genes in the *Drosophila* head: *tailless* regulates expression of *empty spiracles* in early embryonic patterning and brain development. Mech. Dev. 109:161-172
79. Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (1994) Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. Nature 370:216-218
80. Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. Neuron 24:481-489
81. Hiramoto M, Hiromi Y, Giniger E, Hotta Y (2000) The *Drosophila* Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. Nature 406:886-889

82. Hirth F, Kammermeier L, Frei E, Walldorf U, Noll M, Reichert H (2003) An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from *Drosophila*. *Development* 130:2365-2373
83. Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, 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
84. Howard-Ashby M, Materna SC, Brown CT, Chen L, Cameron RA, Davidson EH (2006) Identification and characterization of homeobox transcription factor genes in *Strongylocentrotus purpuratus*, and their expression in embryonic development. *Dev. Biol.* 300:74-89
85. Huangfu D, Anderson KV (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 133:3-14
86. Hülkamp M, Tautz D (1991) Gap genes and gradients - The logic behind the gaps. *Bioessays* 13:261-268
87. Hummel T, Krukkert K, Roos J, Davis G, Klämbt C (2000) *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26:357-370
88. Hummel T, Schimmelpfeng K, Klämbt C (1999) Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. I. Identification of the required gene functions. *Dev. Biol.* 209:381-398
89. Jacobs JR, Goodman CS (1989) Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. II. Behavior of pioneer growth cones. *J. Neurosci.* 9:2412-2422
90. Jan LY, Jan YN (1982) Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2700-2704
91. Jang AC, Starz-Gaiano, Montell DJ (2007) Modeling migration and metastasis in *Drosophila*. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12:103-114
92. Jürgens G, Lehmann R, Schardin M, Nüsslein-Volhard C (1986) Segmental organisation 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
93. Kaprielian Z, Runko E, Imondi R (2001) Axon guidance at the midline choice point. *Dev. Dyn.* 221:154-181
94. Kaspar P (2003) Untersuchungen zur Funktion, Lokalisation und Regulation des Homöoboxgens *homeobrain* von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
95. Kato M, Das S, Petras K, Kitamura K, Morohashi K, Abuelo DN, Barr M, Bonneau D, Brady AF, Carpenter NJ *et al.* (2004) Mutations of *ARX* are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat.* 23:147-159
96. Katz MJ, Lasek RJ, Silver J (1983) Ontophylogenetics of the nervous system: development of the corpus callosum and evolution of axon tracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5936-5940
97. Keays DA, Tian G, Poirier K, Huang G-J, Siebold C, Cleak J, Oliver PL, Fray M, Harvey RJ, Molnár Z *et al.* (2007) Mutations in  $\alpha$ -Tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* 128:45-57



98. Keene AC, Waddell S (2007) *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:341-354
99. Keleman K, Rajagopalan S, Cleppien D, Teis D, Paiha K, Huber LA, Technau GM, Dickson BJ (2002) Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell* 110:415-427
100. Keleman K, Dickson BJ (2001) Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32:605-617
101. Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionary conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215
102. Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785-794
103. Kim IO, Jeon S-H, Kim SH (2007) CNS midline cells are required for establishment and differentiation of *Drosophila* MP2 interneurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:535-541
104. Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K *et al.* (2002) Mutation of *ARX* causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat. Genet.* 32:359-369
105. Klämbt C, Jacobs JR, Goodman CS (1991) The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* 64:801-815
106. Kojima T, Tsuji T, Saigo K (2005) A concerted action of a paired-type homeobox gene, *aristaleless*, and a homolog of *Hox11/tlx* homeobox gene, *clawless*, is essential for the distal tip development of the *Drosophila* leg. *Dev. Biol.* 279:434-445
107. Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN (1996) *frazzled* encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87:197-204
108. Kusch T, Storck T, Walldorf U, Reuter R (2002) Brachyury proteins regulate target genes through modular binding sites in a cooperative fashion. *Genes Dev.* 16:518-529
109. Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
110. Laski FA, Rio DC, Rubin GM (1986) Tissue specificity of *Drosophila* P-element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44:7-19
111. Leuzinger S, Hirth F, Gerlich D, Acampora D, Simeone A, Gehring WJ, Finkelstein R, Furukubo-Tokunaga K, Reichert H (1998) Equivalence of the fly *orthodenticle* gene and the human *OTX* genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125:1703-1710
112. Leyssen M, Hassan BA (2007) A fruitfly's guide to keeping the brain wired. *EMBO Rep.* 8:46-50

113. Lichtneckert R, Reichert H (2005) Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity* 94:465-477
114. Lin DM, Fetter RD, Kopczyński C, Grenningloh G, Goodman CS (1994) Genetic analysis of fasciclin II in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation and altered fasciculation. *Neuron* 13:1055-1069
115. Lindwall C, Fothergill T, Richards LJ (2007) Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17:3-14
116. Liu Y, Montell DJ (2001) *Jing*: a downstream target of *slbo* required for developmental control of border cell migration. *Development* 128:321-330
117. LoTurco JJ, Bai J (2006) The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci.* 29:407-413
118. Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1:173-180
119. Maness PF, Schachner M (2007) Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10:19-26
120. Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG, Seidman CE *et al.* (1995) Cloning, expression and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene *hedgehog*. *Genomics* 28:44-51
121. Marín O, Valdeolmillos M, Moya F (2006) Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci.* 29:655-661
122. Margolis JS, Borowsky ML, Steingrímsson E, Shim CW, Lengyel JA, Posakony JW (1995) Posterior stripe expression of *hunchback* is driven from two promoters by a common enhancer element. *Development* 121:3067-3077
123. McClure KD, Schubiger G (2008) A screen for genes that function in leg disc regeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* 125:67-80
124. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53:1-114
125. Merianda TT, Botta V, Bhat KM (2005) Patched regulation of axon guidance is by specifying neural identity in the *Drosophila* nerve cord. *Dev. Genes Evol.* 215:285-296
126. Michaud S, Tanguay RM (2003) Expression of the Hsp23 chaperone during *Drosophila* embryogenesis: association to distinct neural and glial lineages. *BMC Dev. Biol.* 3:9
127. Míhrshahi R (2006) The corpus callosum as an evolutionary innovation. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 306:8-17
128. Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ (1996) Genetic analysis of *Netrin* genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17:203-215
129. Mohler J, Eldon ED, Pirrotta V (1989) A novel spatial transcription pattern associated with the segmentation gene, *giant*, of *Drosophila*. *EMBO J.* 8:1539-1548

130. Myat A, Henry P, McCabe V, Flintoft L, Rotin D, Tear G (2002) *Drosophila* Nedd4, a ubiquitin ligase, is recruited by Commissureless to control cell surface levels of the roundabout receptor. *Neuron* 35:447-459
131. Nambu JR, Franks RG, Hu S, Crews ST (1990) The *single-minded* gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* 63:63-75
132. Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA Jr, Crews ST (1991) The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67:1157-1167
133. Nassif C, Noveen A, Hartenstein V (1998) Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. *J. Comp. Neurol.* 402:10-31
134. Page DT (2002) Inductive pattern of the embryonic brain in *Drosophila*. *Development* 129:2121-2128
135. Page DT (2003) A function of Egf receptor signaling in expanding the developing brain in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 13:474-482
136. Parks AL, Cook KR, Belvin M, Dompe NA, Fawcett R, Huppert K, Tan LR, Winter CG, Bogart KP, Deal JE *et al.* (2004) Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.* 36:288-292
137. Pasquier L, Dubourg C, Blayau M, Lazaro L, Le Marec B, David V, Odent S (2000) A new mutation in the six-domain of SIX3 gene causes holoprosencephaly. *Eur. J. Hum. Genet.* 8:797-800
138. Patel NH, Snow PM, Goodman CS (1987) Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48: 975-988
139. Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH (2007) Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:287-299
140. Petschek JP, Mahowald AP (1990) Different requirements for *l(1)giant* in two embryonic domains of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.* 11:88-96
141. Pignoni F, Baldarelli RM, Steingrímsson E, Diaz RJ, Patapoutian A, Merriam JR, Lengyel JA (1990) The *Drosophila* gene *tailless* is expressed at the embryonic termini and is a member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 62:151-163
142. Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, Fallet-Bianco C, Pasquier L, Toutain A, Tuy FP *et al.* (2007) Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (*TUBA1A*). *Hum. Mutat.* 28:1055-1064
143. Psenner K (2001) Molekulargenetische Untersuchungen des Homöobox Genkomplexes 57B von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Hohenheim
144. Rajagopalan S, Vivancos V, Nicolas E, Dickson BJ (2000) Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* 103:1033-1045.

145. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364:717-721
146. Rivas RJ, Hatten ME (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15:981-989
147. Rogulja-Ortmann A, Lüer K, Seibert J, Rickert C, Technau GM (2007) Programmed cell death in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* 134:105-116
148. Rothberg JM, Hartley DA, Walther Z, Artavanis-Tsakonas SA (1988) *slit*: An EGF-homologues locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic nervous system. *Cell* 55:1047-1059
149. Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas SA (1990) *slit*: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev.* 4:2169-2187
150. Rudolph KM, Liaw G-J, Daniel A, Green P, Courey AJ, Hartenstein V, Lengyel JA (1997) Complex regulatory region mediating *tailless* expression in early embryonic patterning and brain development. *Development* 124:4297-4308
151. Ryan JF, Burton PM, Mazza ME, Kwong GK, Mullikin JC, Finnerty JR (2006) The cnidarian-bilaterian ancestor possessed at least 56 homeoboxes: evidence from the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Genome Biol.* 7:R64
152. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* 239:487-491
153. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3<sup>rd</sup> Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press
154. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
155. Schmid A, Chiba A, Doe CQ (1999) Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* 126:4653-4689
156. Schmidt H, Rickert C, Bossing T, Vef O, Urban J, Technau GM (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
157. Schmidt-Ott U, Technau GM (1994) Fate-mapping in the procephalic region of the embryonic *Drosophila* head. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 203:367-373
158. Schneitz J, Spielmann P, Noll M (1993) Molecular genetics of *aristalless*, a *prd*-type homeobox gene involved in the morphogenesis of proximal and distal pattern elements in a subset of appendages in *Drosophila*. *Genes Dev.* 7:114-129
159. Schuldt AJ, Brand AH (1999) Mastermind acts downstream of notch to specify neuronal cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Dev. Biol.* 205:287-295
160. Sedaghat Y, Miranda WF, Sonnenfeld MJ (2002) The *jing* Zn-finger transcription factor is a mediator of cellular differentiation in the *Drosophila* CNS midline and trachea. *Development*

---

129:2591-2606

161. Sedaghat Y, Sonnenfeld M (2002) The *jing* gene is required for embryonic brain development in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* 212:277-287
162. Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10:409-426
163. Seimiya M, Gehring WJ (2000) The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an *eyeless*-independent mechanism. *Development* 127:1879-1886
164. Selleck SB, Steller H (1991) The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of *Drosophila*. *Neuron* 6:83-99
165. Settleman J (2001) Rac 'n Rho: The music that shapes a developing embryo. *Dev. Cell* 1:321-331
166. Seyffert W (ed) (2003) *Lehrbuch der Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin
167. Shaw A (2000) The 14-3-3 proteins. *Curr. Biol.* 10:R400
168. Shen CP, Jan LY, Jan YN (1997) Miranda is required for the asymmetric localization of prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* 90:449-458
169. Shiota K, Yamada S, Komada M, Ishibashi M (2007) Embryogenesis of holoprosencephaly. *Am. J. Med. Genet. A.* 143:3079-3087
170. Shu T, Li Y, Kellner A, Richards LJ (2003) The glial sling is a migratory population of developing neurons. *Development* 130:2929-2937
171. Shu T, Richards LJ (2001) Cortical axon guidance by the glial wedge during development of the corpus callosum. *J. Neurosci.* 2:2749-2758
172. Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J (1982) Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J. Comp. Neurol.* 210:10-29
173. Silver J, Ogawa MY (1983) Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* 220:1067-1069
174. Simeone A, D'Apice MR, 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
175. Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS (2000) Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28:753-766
176. Skeath JB, Doe CQ (1998) Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development* 125:1857-1865
177. Smith GM, Miller RH, Silver J (1986) Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure and induced regeneration upon transplantation. *J. Comp. Neurol.* 251:23-43

178. Sonnenfeld MJ, Barazesh N, Sedaghat Y, Fan C (2004) The *jing* and *ras1* pathways are functionally related during CNS midline and tracheal development. *Mech. Dev.* 121:1531-1547
179. Spana EP, Doe CQ (1996) Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17:21-26
180. Spana EP, Kopczynski C, Goodman CS, Doe CQ (1995) Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Development* 121:3489-3494
181. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:138-145
182. Strecker TR, Merriam JR, Lengyel JA (1988) Graded requirement for the zygotic terminal gene, *tailless*, in the brain and tail region of the *Drosophila* embryo. *Development* 102:721-734
183. Sun X, Morozova T, Sonnenfeld M (2006) Glial and neuronal functions of the *Drosophila* homolog of the human SWI/SNF gene *ATR-X (DATR-X)* and the *jing* zinc-finger gene specify the lateral positioning of longitudinal glia and axons. *Genetics* 173:1397-1415
184. Tearle R, Nüsslein-Volhard C (1987) Tübingen mutants and stocklist. *Drosophila* Info. Serv. 66:209-269
185. Tian G, Kong XP, Jaglin XH, Chelly J, Keays D, Cowan NJ (2008) A Pachygyria-causing  $\alpha$ -Tubulin mutation results in inefficient cycling with CCT and a deficient interaction with TBCB. *Mol. Biol. Cell* 19:1152-1161
186. Therianos S, Leuzinger S, Hirth F, Goodman CS, Reichert H (1995) Embryonic development of the *Drosophila* brain: formation of commissural and descending pathways. *Development* 121:3849-3860
187. Thomas JB, Crews ST, Goodman CS (1988) Molecular genetics of the *single-minded* locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52:133-141
188. Urbach R, Schnabel R, Technau GM (2003) The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* 130:3589-3606
189. Urbach R, Technau GM (2003) Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development* 130:3621-3637
190. Urbach R, Technau GM (2004) Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *Bioessays* 26:739-751
191. Vallee RB, Tsai J-W (2006) The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes Dev.* 20:1384-1393
192. Walldorf U, Gehring WJ (1992) *Empty spiracles*, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO J.* 11:2247-2259
193. 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

194. Wallis DE, Muenke M (1999) Molecular mechanisms of holoprosencephaly. *Mol. Genet. Metab.* 68:126-138
195. Wallis DE, Muenke M (2000) Mutations in holoprosencephaly. *Hum. Mutat.* 16:99-108
196. Wallis DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, Richieri-Costa A, Gillessen-Kaesbach G, Zackai EH, Rommens J, Muenke M (1999) Mutations in the homeodomain of the human *SIX3* gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.* 22:196-198
197. Wildemann B, Reichert H, Bicker G (1997) Embryonic brain tract formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.* 206:536-540
198. Wimmer EA, Cohen SM, Jäckle H, Desplan C (1997) *buttonhead* does not contribute to a combinatorial code proposed for *Drosophila* head development. *Development* 124:1509-1517
199. Wimmer EA, Frommer G, Purnell BA, Jäckle H (1996) *buttonhead* and *D-Spl*: a novel *Drosophila* gene pair. *Mech. Dev.* 59:53-62
200. Wimmer EA, Jäckle H, Pfeifle C, Cohen SM (1993) A *Drosophila* homologue of human SP1 is a head-specific segmentation gene. *Nature* 366:690-694
201. Winberg ML, Mitchell KJ, Goodman CS (1998) Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins and IgCAMs. *Cell* 93:581-591
202. Younossi-Hartenstein A, Green P, Liaw G-J, Rudolph K, Lengyel J, Hartenstein V (1997) Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tll*, *otd*, *ems* and *btd*. *Dev. Biol.* 182:270-283
203. Younossi-Hartenstein A, Nassif C, Green P, Hartenstein V (1996) Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J. Comp. Neurol.* 370:313-329
204. Yu TW, Bargmann CI (2001) Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci. Suppl.* 4:1169-1176
205. Zipursky SL, Venkatesh TR, Teplow DB, Benzer S (1984) Neuronal development in the *Drosophila* retina: Monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* 36:15-26

## 7. Anhang

**Tab. 7.1: Im Defizienzen-Screen eingesetzte Stämme des Bloomington Stock Centers (Indiana University, USA).**

Stammnummer	Bezeichnung	Bruchpunkte
<b>Defizienzen-Sammlung („Deficiency Kit“ DK1) des X-Chromosoms:</b>		
Bl 1329	Df(1)BA1	1A1;2A
Bl 936	Df(1)64c18	2E1-2;3C2
Bl 939	Df(1)dm75e19	3C11;3E4
Bl 940	Df(1)A113	3D6-E1;4F5
Bl 944	Df(1)JC70	4C15-16;5A1-2
Bl 5705	Df(1)BA2-8	4F5;5A13
Bl 945	Df(1)C149	5A8-9;5C5-6
Bl 946	Df(1)C149	5A8-9;5C5-6
Bl 5281	Df(1)dx81	5C3-10;6C3-12
Bl 9625	Df(1)ED6878	6C12;6D8
Bl 3196	Df(1)Sxl-bt	6E2;7A6
Bl 948	Df(1)ct-J4	7A2-3;7C1
Bl 3221	Df(1)ct4b1	7B2-4;7C3-4
Bl 949	Df(1)C128	7D1;7D5-6
Bl 950	Df(1)RA2	7D10;8A4-5
Bl 951	Df(1)KA14	7F1-2;8C6
Bl 3651	Df(1)lz-90b24	8B5-6;8D8-9
Bl 952	Df(1)C52	8E;9C-D
Bl 954	Df(1)v-L15	9B1-2;10A1-2
Bl 3560	Df(1)v-N48	9F;10C3-5
Bl 962	Df(1)N105	10F7;11D1
Bl 967	Df(1)C246	11D-E;12A1-2
Bl 1039	Df(1)RK4	12F5-6;13A9-B1
Bl 7339	In(1)AC2[L]AB[R]	9D5-E1;9E7-8 + 13B5-6;13B5-6;13E1-2
Bl 3347	Df(1)sd72b	13F1;14B1
Bl 2099	Df(1)XR38	14A;15D
Bl 125	Df(1)4b18	14B8;14C1
Bl 3217	Tp(1;2)r[+]75c	14B13;15A9
Bl 5272	Df(1)r-D1	14C5-6;15B1
Bl 4741	Df(1)B25	15D3;16A4-6
Bl 4953	Df(1)BK10	16A2;16C7-10
Bl 6217	Df(1)RR79	16C;16F
Bl 970	Df(1)N19	17A1;18A2
Bl 971	Df(1)JA27	18A5;18D



Bl 972	Df(1)HF396	18E1-2;20
Bl 977	Df(1)DCB1-35b	19F1-2;20E-F
Bl 3714	Df(1)A209	20A-20F
<b>Defizienzen-Sammlung („Deficiency Kit“ DK2) des 2. Chromosoms:</b>		
Bl 3638	Df(2L)net-PMF	21A1;21B7-8
Bl 6283	Df(2L)BSC4	21B7-C1;21C2-3
Bl 8672	Df(2L)BSC106	21B8;21C4
Bl 6608	Df(2L)BSC16	21C3-4;21C6-8
Bl 3084	Df(2L)ast2	21D1-2;22B2-3
Bl 3133	Df(2L)dp-79b	22A2;22D5-E1
Bl 7144	Df(2L)BSC37	22D2-3;22F1-2
Bl 6648	Df(2L)dpp[d14]	22E4-F2;22F3-23A1
Bl 90	Df(2L)C144	22F4-23A1;23C2-4
Bl 1567	Df(2L)JS17	23C1-2;23E1-2
Bl 6875	Df(2L)BSC28	23C5-D1;23E2
Bl 6965	Df(2L)BSC31	23E5;23F4-5
Bl 6507	Df(2L)drm-P2	23F3-4;24A1-2
Bl 5330	Df(2L)ed1	24A2;24D4
Bl 693	Df(2L)sc19-8	24C2-8;25C8-9
Bl 8674	Df(2L)BSC109	25C4;25C8
Bl 7497	Df(2L)Exel6011	25C8;25D5
Bl 781	Df(2L)cl-h3	25D2-4;26B2-5
Bl 490	Df(2L)E110	25F3-26A1;26D3-11
Bl 6299	Df(2L)BSC5	26B1-2;26D1-2
Bl 6338	Df(2L)BSC6	26D3-E1;26F4-7
Bl 6374	Df(2L)BSC7	26D10-E1;27C1
Bl 2414	Df(2L)spd[j2]	27C1-2;28A
Bl 5420	Df(2L)Dwee1-W05	27C2-3;27C4-5
Bl 4956	Df(2L)XE-3801	27E2;28D1
Bl 7147	Df(2L)BSC41	28A4-B1;28D3-9
Bl 140	Df(2L)Trf-C6R31	28DE;28DE
Bl 179	Df(2L)TE29Aa-11	28E4-7;29B2-C1
Bl 2892	Df(2L)N22-14	29C1-2;30C8-9
Bl 6478	Df(2L)BSC17	30C3-5;30F1
Bl 1045	Df(2L)Mdh	30D-30F;31F
Bl 8469	Df(2L)BSC50	30F4-5;31B1-4
Bl 3366	Df(2L)J2	31B;32A
Bl 7142	Df(2L)BSC32	32A1-2;32C5-D1
Bl 7143	Df(2L)BSC36	32D1;32D4-E1
Bl 5869	Df(2L)FCK-20	32D1;32F1-3

Bl 3079	Df(2L)Prl	32F1-3;33F1-2
Bl 6999	Df(2L)BSC30	34A3;34B7-9
Bl 3138	Df(2L)b87e25	34B12-C1;35B10-C1
Bl 3588	Df(2L)TE35BC-24	35B4-6;35F1-7
Bl 1491	Df(2L)r10	35D1;36A6-7
Bl 2583	Df(2L)cact-255rv64	35F-36A;36D
Bl 420	Df(2L)TW137	36C2-4;37B9-C1
Bl 567	Df(2L)pr-A16	37B2-12;38D2-5
Bl 167	Df(2L)TW161	38A6-B1;40A4-B1
Bl 7531	Df(2L)Exel6049	39E7;40D3
Bl 4959	Df(2L)C'	h35;h38L
Bl 749	ln(2R)bw[Vde2L]Cy[R]	h42-h43;42A2-3
Bl 1007	Df(2R)nap9	42A1-2;42E6-F1
Bl 1888	Df(2R)ST1	42B3-5;43E15-18
Bl 3368	Df(2R)cn9	42E;44C
Bl 198	Df(2R)H3C1	43F;44D3-8
Bl 201	Df(2R)H3E1	44D1-4;44F12
Bl 3591	Df(2R)Np5	44F10;45D9-E1
Bl 4966	Df(2R)w45-30n	45A6-7;45E2-3
Bl 6917	Df(2R)BSC29	45D3-4;45F2-6
Bl 9410	Df(2R)BSC132	45F6;46B12
Bl 1743	Df(2R)B5	46A;46C
Bl 1702	Df(2R)X1	46C;47A1
Bl 447	Df(2R)stan1	46D7-9;47F15-16
Bl 190	Df(2R)en-A	47D3;48B2
Bl 1145	Df(2R)en30	48A3-4;48C6-8
Bl 7145	Df(2R)BSC39	48C5-D1;48D5-E1
Bl 4960	Df(2R)CB21	48E;49A
Bl 7146	Df(2R)BSC40	48E1-2;48E2-10
Bl 5879	Df(2R)BSC3	48E12-F4;49A11-B6
Bl 754	Df(2R)vg-C	49A4-13;49E7-F1
Bl 442	Df(2R)CX1	49C1-4;50C23-D2
Bl 6516	Df(2R)BSC18	50D1;50D2-7
Bl 7875	Df(2R)Exel7130	50D4;50E4
Bl 9496	Df(2R)BSC134	50E1;50E6
Bl 7876	Df(2R)Exel7131	50E4;50F6
Bl 6455	Df(2R)BSC11	50E6-F1;51E2-4
3 Bl 518	Df(2R)Jp1	51D3-8;52F5-9
Bl 3520	Df(2R)Jp8	52F5-9;52F10-53A1
Bl 7445	Df(2R)BSC49	53D9-E1;54B5-10

Bl 7414	Df(2R)BSC44	54B1-2;54B7-10
Bl 5680	Df(2R)robl-c	54B17-C4;54C1-4
Bl 5574	Df(2R)k10408	54C1-4;54C1-4
Bl 7441	Df(2R)BSC45	54C8-D1;54E2-7
Bl 6779	Df(2R)14H10Y-53	54D1-2;54E5-7
Bl 6780	Df(2R)14H10W-35	54E5-7;55B5-7
Bl 1547	Df(2R)PC4	55A;55F
Bl 757	Df(2R)P34	55E2-4;56C1-11
Bl 6647	Df(2R)BSC22	56D7-E3;56F9-12
Bl 3467	Df(2R)AA21	56F9-17;57D11-12
Bl 7896	Df(2R)Exel7162	56F11;56F16
Bl 6609	Df(2R)BSC19	56F12-14;57A4
Bl 5246	Df(2R)Egfr5	57D2-8;58D1
Bl 282	Df(2R)X58-12	58D1-2;59A
Bl 3909	Df(2R)59AD	59A1-3;59D1-4
Bl 7273	Df(2R)vir130	59B;59D8-E1
Bl 1682	Df(2R)or-BR6	59D5-10;60B3-8
Bl 9691	Df(2R)BSC155	60B9;60C4
Bl 2604	Df(2R)Px2	60C5-6;60D9-10
Bl 9069	Df(2R)ED4065	60C8;60E8
Bl 2471	Df(2R)M60E	60E2-3;60E11-12
Bl 3157	Df(2R)ES1	60E6-8;60F1-2
Bl 4961	Df(2R)Kr10	60F1;60F5
<b>Defizienzen-Sammlung („Deficiency Kit“ DK3) des 3. Chromosoms:</b>		
Bl 2577	Df(3L)emc-E12	61A;61D3
Bl 439	Df(3L)Ar14-8	61C5-8;62A8
Bl 7566	Df(3L)Exel6087	62A2;62A7
Bl 600	Df(3L)Aprt-1	62A10-B1;62D2-5
Bl 2400	Df(3L)R-G7	62B4-7;62D5-E5
Bl 6755	Df(3L)BSC23	62E8;63B5-6
Bl 3650	Df(3L)M21	62F;63D
Bl 3649	Df(3L)HR119	63C2;63F7
Bl 463	Df(3L)GN34	63E6-9;64A8-9
Bl 3096	Df(3L)ZN47	64C;65C
Bl 4393	Df(3L)XDI98	65A2;65E1
Bl 6867	Df(3L)BSC27	65D4-5;65E4-6
Bl 6964	Df(3L)BSC33	65E10-F1;65F2-6
Bl 1420	Df(3L)pbl-X1	65F3;66B10
Bl 5877	Df(3L)ZP1	66A17-20;66C1-5
Bl 1541	Df(3L)66C-G28	66B8-9;66C9-10

Bl 6460	Df(3L)BSC13	66B12-C1;66D2-4
Bl 3024	Df(3L)h-i22	66D10-11;66E1-2
Bl 4500	Df(3L)Scf-R6	66E1-6;66F1-6
Bl 7079	Df(3L)BSC35	66F1-2;67B2-3
Bl 997	Df(3L)AC1	67A2;67D11-13
Bl 6471	Df(3L)BSC14	67E3-7;68A2-6
Bl 2611	Df(3L)vin5	68A2-3;69A1-3
Bl 5492	Df(3L)eyg[C1]	69A4-5;69D4-6
Bl 6456	Df(3L)BSC10	69D4-5;69F5-7
Bl 6457	Df(3L)BSC12	69F6-70A1;70A1-2
Bl 4366	In(3LR)C190[L]Ubx[42TR]	70A1-2;70C3-4
Bl 3124	Df(3L)fz-GF3b	70C1-2;70D4-5
Bl 3126	Df(3L)fz-M21	70D2-3;71E4-5
Bl 6551	Df(3L)XG5	71C2-3;72B1-C1
Bl 3640	Df(3L)brm11	71F1-4;72D1-10
Bl 2993	Df(3L)st-f13	72C1-D1;73A3-4
Bl 2998	Df(3L)81k19	73A3;74F
Bl 6411	Df(3L)BSC8	74D3-75A1;75B2-5
Bl 2608	Df(3L)W10	75A6-7;75C1-2
Bl 2990	Df(3L)Cat	75B8;75F1
Bl 8082	Df(3L)ED4782	75F2;76A1
Bl 6754	Df(3L)fz2	75F10-11;76A1-5
Bl 6646	Df(3L)BSC20	76A7-B1;76B4-5
Bl 5126	Df(3L)XS533	76B4;77B
Bl 2052	Df(3L)rdgC-co2	77A1;77D1
Bl 3127	Df(3L)ri-79c	77B-C;77F-78A
Bl 5878	Df(3L)ri-XT1	77E2-4;78A2-4
Bl 4429	Df(3L)ME107	77F3;78C8-9
Bl 4430	Df(3L)Pc-2q	78C5-6;78E3-79A1
Bl 8101	Df(3L)ED4978	78D5;79A2
Bl 9700	Df(3L)BSC223	79A3;79B3
Bl 5951	Df(3L)HD1	79D3-E1;79F3-6
Bl 1518	Df(3R)ME15	81F3-6;82F5-7
Bl 4787	Df(3R)3-4	82F3-4;82F10-11
Bl 5694	Df(3R)e1025-14	82F8-10;83A1-3
Bl 7623	Df(3R)Exel6144	83A6;83B6
Bl 8103	Df(3R)ED5177	83B4;83B6
Bl 7443	Df(3R)BSC47	83B7-C1;83C6-D1
Bl 1990	Df(3R)Tpl10	83C1-2;84B1-2
Bl 2393	Df(3R)WIN11	83E1-2;84A5

Bl 1884	Df(3R)Scr	84A1-2;84B1-2
Bl 1842	Df(3R)Antp17	84A5;84D9
Bl 1968	Df(3R)p712	84D4-6;85B6
Bl 1962	Df(3R)p-XT103	85A2;85C1-2
Bl 6756	Df(3R)BSC24	85C4-9;85D12-14
Bl 1931	Df(3R)by10	85D8-12;85E7-F1
Bl 7080	Df(3R)BSC38	85F1-2;86C7-8
Bl 3128	Df(3R)M-Kx1	86C1;87B1-5
Bl 3003	Df(3R)T-32	86E2-4;87C6-7
Bl 3007	Df(3R)ry615	87B11-13;87E8-11
Bl 1534	Tp(3;Y)ry506-85C	87D1-2;88E5-6
Bl 383	Df(3R)ea	88E7-13;89A1
Bl 756	Df(3R)sbd105	88F9-89A1;89B9-10
Bl 1920	Df(3R)sbd104	89B5;89C2-7
Bl 1467	Df(3R)P115	89B7-8;89E7
Bl 4431	Df(3R)DG2	89E1-F4;91B1-B2
Bl 3011	Df(3R)Cha7	90F1-F4;91F5
Bl 3012	Df(3R)DI-BX12	91F1-2;92D3-6
Bl 4962	Df(3R)H-B79	92B3;92F13
Bl 7413	Df(3R)BSC43	92F7-93A1;93B3-6
Bl 2425	Df(3R)e-N19	93B;94
Bl 3340	Df(3R)e-R1	93B6-7;93D2
Bl 2586	Df(3R)23D1	94A3-4;94D1-4
Bl 8491	Df(3R)BSC55	94D2-10;94E1-6
Bl 8583	Df(3R)BSC56	94E1-2;94F1-2
Bl 4940	Df(3R)mbc-30	95A5-7;95C10-11
Bl 2585	Df(3R)mbc-R1	95A5-7;95D6-11
Bl 7992	Df(3R)Exel9014	95B1;95D1
Bl 7675	Df(3R)Exel6196	95C12;95D8
Bl 4432	Df(3R)crb-F89-4	95D7-D11;95F15
Bl 2363	Df(3R)crb87-5	95F7;96A17-18
Bl 3468	Df(3R)slo8	96A2-7;96D2-4
Bl 7681	Df(3R)Exel6202	96C9;96E2
Bl 7682	Df(3R)Exel6203	96E2;96E6
Bl 9500	Df(3R)BSC140	96F1;96F10
Bl 5601	Df(3R)Esp13	96F1;97B1
Bl 1910	Df(3R)TI-P	97A;98A1-2
Bl 823	Df(3R)D605	97E3;98A5
Bl 7412	Df(3R)BSC42	98B1-2;98B3-5
Bl 430	Df(3R)3450	98E3;99A6-8

Bl 669	Df(3R)Dr-rv1	99A1-2;99B6-11
Bl 3547	Df(3R)L127	99B5-6;99F1
Bl 3546	Df(3R)B81	99D3;3Rt
<b>Defizienzen-Sammlung („Deficiency Kit“ DK1) des 4. Chromosoms:</b>		
Bl 1785	C(4)RM	101F1;102F8
Bl 7084	Df(4)O2	<102C02;102D02>
Bl 759	Df(4)G	102E2-7;102E-F2
<b>Defizienzen, die nicht in einer der oben aufgeführten Defizienzen-Sammlungen enthalten waren und zusätzlich bezogen wurden:</b>		
Bl 8955	Df(1)ED6906	7A3;7B2
Bl 8033	Df(1)ED6957	8B6;8C13
Bl 1538	Df(1)os[UE69]	17A2;17A12
Bl 8036	Df(1)ED447	17C1;17F1
Bl 7762	Df(1)Exel9051	17D1;17D3
Bl 7775	Df(2L)Exel7005	21D2;21D4
Bl 7490	Df(2L)Exel6003	21D3;21E3
Bl 7776	Df(2L)Exel7006	21F2;21F4
Bl 7492	Df(2L)Exel6005	22A3;22B1
Bl 5450	Df(2L)frtz14	22A3;22B3
Bl 8000	Df(2L)Exel6006	22B5;22D1
Bl 7782	Df(2L)Exel7010	22D4;22E1
Bl 9604	Df(2L)BSC171	24C1;24C6
Bl 7495	Df(2L)Exel6009	24C3;24C8
Bl 7790	Df(2L)Exel8010	24C8;24D4
Bl 3080	Df(2L)M24F11	24D3-4;24F7-25A3
Bl 7500	Df(2L)Exel6014	25F5;26A3
Bl 9297	Df(2L)ED384	26B2;26D7
Bl 9615	Df(2L)BSC188	26F1;27A1
Bl 7801	Df(2L)Exel7027	26F5;27B1
Bl 7511	Df(2L)Exel6028	32D5;32E4
Bl 7512	Df(2L)Exel6029	32E4;32F2
Bl 7838	Df(2L)Exel7068	36C7;36C10
Bl 8935	Df(2L)ED1203	36F7;37C5
Bl 7845	Df(2L)Exel7073	37B1;37B9
Bl 7537	Df(2R)Exel6055	43F1;44A4
Bl 7538	Df(2R)Exel6056	44A4;44C2
Bl 7540	Df(2R)Exel6058	44C4;44D1
Bl 7864	Df(2R)Exel7098	44D5;44E3
Bl 7542	Df(2R)Exel6060	47D6;47F8
Bl 9595	Df(2R)BSC160	47F12;48A5

Bl 7916	Df(2R)Exel8056	49C2;49E1
Bl 7872	Df(2R)Exel7124	49D4;50A1
Bl 7873	Df(2R)Exel7128	50C5;50C9
Bl 9064	Df(2R)ED2426	51E2;52B1
Bl 7879	Df(2R)Exel7135	51E2;51E11
Bl 8914	Df(2R)ED2436	51F11;52D11
Bl 7750	Df(2R)Exel6285	52A4;52B5
Bl 7559	Df(2R)Exel6079	59A3;59B1
Bl 7265	Df(2R)Frd-R1	59C1;59C4
Bl 7906	Df(2R)Exel7177	59C3;59D2
Bl 7909	Df(2R)Exel7180	59E3;59F6
Bl 6137	Df(2R)3-659	59F6;60A5
Bl 9693	Df(3L)BSC181	62A11;62B7
Bl 7567	Df(3L)Exel6088	62B4;62B7
Bl 8056	Df(3L)ED4284	62B4;62B12
Bl 8096	Df(3L)ED4287	62B4;62E5
Bl 7576	Df(3L)Exel6097	63E3;63F2
Bl 7578	Df(3L)Exel6099	63F7;64A5
Bl 7930	Df(3L)Exel9034	66A22;66B3
Bl 7591	Df(3L)Exel6112	66B5;66C8
Bl 9561	Df(3L)BSC170	66F4;67A1
Bl 2479	Df(3L)29A6	66F5;67B1
Bl 8068	Df(3L)ED4470	68A6;68E1
Bl 7594	Df(3L)Exel6115	68E1;68F1
Bl 7595	Df(3L)Exel6116	68F2;69A2
Bl 2006	Df(3R)Scx2	84A5;84C4
Bl 1938	Df(3R)Antp2	84B2;84D3
Bl 7625	Df(3R)Exel6146	84C8;84D9
Bl 7639	Df(3R)Exel6160	86E4;86E11
Bl 7963	Df(3R)Exel8153	86E8;86E14
Bl 7640	Df(3R)Exel6161	86E14;86E18
Bl 7965	Df(3R)Exel7310	86F6;87A1
Bl 7641	Df(3R)Exel6162	87A1;87B5
Bl 7643	Df(3R)Exel6164	87B5;87B10
Bl 7932	Df(3R)Exel7317	87B10;87C3
Bl 7645	Df(3R)Exel6166	87C5;87C7
Bl 7741	Df(3R)Exel6274	94E4;94E11
Bl 7990	Df(3R)Exel9012	94E9;94E13
Bl 7690	Df(3R)Exel6212	99A1;99A5
Bl 8925	Df(3R)ED6316	99A5;99C1

**Tab. 7. 2: Auflistung der Einzelmutanten, die während des unter 4.7 beschriebenen Defizienzen-Screens getestet wurden.**

Stammnummer	Mutante	Genotyp	chromosomale Lokalisation
Bl 3277	<i>smoothened</i> ( <i>smo</i> )	smo <sup>3</sup> b <sup>1</sup> pr <sup>1</sup> /CyO	21B7
Bl 10444	<i>dreadlocks</i> ( <i>dock</i> )	y[1] w[67c23]; P {w[+mC]=lacW} dock[k13421]/CyO	21E2
Bl 8616	<i>Star (S)</i>	S[1]/SM1; Sb[1]/TM6	21E4
Bl 3102	<i>leak (lea)</i>	lea[2] cn[1] bw[1] sp[1]/CyO	22A1
Bl 2073	<i>decapentaplegic</i> ( <i>dpp</i> )	dpp[e87] cn[1] bw[1]/CyO	22F1
Bl 2061	<i>decapentaplegic</i> ( <i>dpp</i> )	dpp[H46] wg[Sp-1] cn[1] bw[1]/CyO, P {w[+mC]=dpp-P23} RP1	22F1
Bl 8874	<i>DP</i> <i>transcription</i> <i>factor (Dp)</i>	Dp(?;2)bw[D], so[3] bw[D]/CyO	24F4-25A1
Bl 3375	<i>wingless (wg)</i>	wg[1-8] cn[1] bw[1] sp[1]/CyO	27F1
Bl 10716	<i>Optix</i>	w <sup>1118</sup> ; PBac{PB}Optix <sup>co1718</sup> /CyO	44A3
Bl 3377	<i>patched (ptc)</i>	ptc[9] cn[1] bw[1] sp[1]/CyO	44D5-44E1
Bl 12655	<i>Derailed 2</i> ( <i>Drl-2</i> )	w[1118]; P {w[+mGT]=GT1} Drl-2[BG02105]	49F1
Bl 2785	<i>faint sausage</i> ( <i>fas</i> )	cn[1] fas[1] bw[1] sp[1]/CyO	50B6-50C3
Bl 8740	<i>short stop</i> ( <i>shot</i> )	P {ry[+t7.2]=neoFRT} 42D shot[V104]/SM5	50C6-50C9
Bl 11072	<i>Lisencephaly-1</i> ( <i>Lis-1</i> )	y[1] w[67c23]; P {w[+mC]=lacW} Lis- 1[k13209]/CyO	52F4-52F5
Bl 7325	<i>Rho1</i>	y[1] w[*]; Rho1[720]/CyO	52E5
Bl 2264	<i>zerknüllt (zen)</i>	zen[4] p[p]/TM3, Sb[1]	84A5
Bl 5338	<i>hedgehog (hh)</i>	P {ry[+t7.2]=ftz/lacC} 4; hh[21]/TM3, Sb[1]	94E1
Bl 861	<i>pointed (pnt)</i>	pnt[Delta88]/TM3, Sb[1]	94E10-94E13
	<i>NetrinA (NetA)</i>	NetA <sup>A</sup> (Brankatschk und Dickson, 2006)	12F1-12F2
	<i>NetrinB (NetB)</i>	NetB <sup>A</sup> (Brankatschk und Dickson, 2006)	12F2-12F3
Bl 2055	<i>single-minded</i> ( <i>sim</i> )	sim[2] kar[1]/TM3, P {ry[+t7.2]=ftz/lacC} SC1, Sb[1] ry[RK]	87D11



**Tab. 7.3: Auflistung der Defizienzstämme, die einen embryonalen Gehirnphänotyp zeigen.** DK1 bezeichnet die Stämme des „Bloomington Deficiency Kits“ des X-Chromosom, DK2 bezeichnet Stämme des zweiten Chromosoms, DK3 Stämme des dritten Chromosoms und DK4 Stämme des vierten Chromosoms.

<i>hbn</i> -Gruppe	<i>sim</i> -Gruppe	<i>fra</i> -Gruppe	Lückengen-Gruppe	anderer Gehirnphänotyp
BI 3196 DK1	BI 4429 DK3	BI 3196 DK1	BI 951 DK1	BI 948 DK1
BI 949 DK1	BI 3007 DK3	BI 7497 DK2	BI 6338 DK2	BI 3651 DK1
BI 4953 DK1	BI 669 DK3	BI 754 DK2	BI 6374 DK2	BI 6217 DK1
BI 970 DK1		BI 3518 DK2	BI 201 DK2	BI 190 DK2
BI 6283 DK2		BI 6647 DK2	BI 1785 DK4	BI 3003 DK3
BI 3084 DK2		BI 463 DK3		
BI 3133 DK2		BI 5877 DK3		
BI 6965 DK2		BI 8583 DK3		
BI 5330 DK2		BI 2585 DK3		
BI 693 DK2				
BI 490 DK2				
BI 5869 DK2				
BI 420 DK2				
BI 1007 DK2				
BI 1888 DK2				
BI 198 DK2				
BI 7145 DK2				
BI 442 DK2				
BI 7876 DK2				
BI 3518 DK2				
BI 3520 DK2				
BI 5680 DK2				
BI 3909 DK2				
BI 1682 DK2				
BI 3157 DK2				
BI 600 DK3				
BI 7079 DK3				
BI 2611 DK3				
BI 5492 DK3				
BI 6551 DK3				
BI 6411 DK3				
BI 5126 DK3				
BI 9700 DK3				
BI 1842 DK3				
BI 2586 DK3				
BI 2585 DK3				

**Tab. 7.4: Auflistung der Defizienzstämmen, die auffällige, das Nervensystem betreffende Phänotypen zeigen.** DK1 bezeichnet die Stämme des „Bloomington Deficiency Kits“ des X-Chromosom, DK2 bezeichnet Stämme des zweiten Chromosoms, DK3 Stämme des dritten Chromosoms und DK4 Stämme des vierten Chromosoms. VNS: ventrales Nervensystem.

verändertes <i>hbn</i> -Expressionsmuster	VNS-Defekte	delokalisierte optische Loben	Hirnhemisphären fusioniert	Abstand zwischen den Hirnhemisphären zu groß
BI 729 DK1	BI 729 DK1	BI 970 DK1	BI 201 DK2	BI 945 DK1
BI 977 DK1	BI 951 DK1	BI 3221 DK1	BI 447 DK2	BI 1039 DK1
BI 1329 DK1	BI 952 DK1	BI 3714 DK1	BI 1145 DK2	BI 6217 DK1
BI 3714 DK1	BI 970 DK1	BI 7339 DK1	BI 2585 DK3	BI 3909 DK2
BI 140 DK2	BI 977 DK1	BI 8703 DK1	BI 3003 DK3	BI 4787 DK3
BI 179 DK2	BI 3196 DK1	BI 757 DK2	BI 4431 DK3	
BI 190 DK2	BI 3217 DK1	BI 3133 DK2	BI 7080 DK3	
BI 442 DK2	BI 3714 DK1	BI 3368 DK2	BI 7412 DK3	
BI 567 DK2	BI 7339 DK1	BI 3909 DK2		
BI 3079 DK2	BI 4741 DK1	BI 5680 DK2		
BI 3909 DK2	BI 90 DK2	BI 6455 DK2		
BI 6338 DK2	BI 190 DK2	BI 6647 DK2		
BI 8469 DK2	BI 198 DK2	BI 7497 DK2		
BI 439 DK3	BI 201 DK2	BI 7531 DK2		
BI 1420 DK3	BI 282 DK2	BI 3003 DK3		
BI 1842 DK3	BI 420 DK2	BI 7079 DK3		
BI 2425 DK3	BI 693 DK2	BI 1785 DK4		
BI 2990 DK3	BI 754 DK2			
BI 3012 DK3	BI 757 DK2			
BI 3546 DK3	BI 1547 DK2			
BI 3547 DK3	BI 3079 DK2			
BI 5601 DK3	BI 3084 DK2			
BI 6756 DK3	BI 3366 DK2			
BI 7080 DK3	BI 3368 DK2			
BI 7674 DK3	BI 3591 DK2			
BI 8583 DK3	BI 4960 DK2			
BI 9500 DK3	BI 5330 DK2			
	BI 6507 DK2			
	BI 6647 DK2			
	BI 7445 DK2			
	BI 8469 DK2			
	BI 439 DK3			
	BI 1534 DK3			
	BI 1842 DK3			
	BI 1990 DK3			

---

	BI 2425 DK3			
	BI 2586 DK3			
	BI 2990 DK3			
	BI 3003 DK3			
	BI 3007 DK3			
	BI 3011 DK3			
	BI 3128 DK3			
	BI 3546 DK3			
	BI 5601 DK3			
	BI 5878 DK3			
	BI 6551 DK3			
	BI 6756 DK3			
	BI 7079 DK3			
	BI 8583 DK3			
	BI 9500 DK3			
	BI 1785 DK4			

## 8. Publikationen

**Kaspar P**, Faust M, Walldorf U:

The *Drosophila* gene *homeobrain* is required for the formation of the preoral brain commissure.

*Manuskript in Vorbereitung*

**Kaspar P**, Faust M, Walldorf U:

A genome-wide deficiency screen identifies new genes that are essential for the formation of the preoral brain commissure of *Drosophila*.

*Manuskript in Vorbereitung*

**Teile der Arbeit wurden auf folgenden wissenschaftlichen Fachtagungen vorgestellt:**

- 10th European Symposium on *Drosophila* Neurobiology, Neuchâtel (2004)
- 5. GfE School „Molecular Control of Organ Development“, Günzburg (2004)
- GfE Meeting Developmental Biology, Münster (2005)
- 11th Regional *Drosophila* Meeting, Leipzig (2005)
- GfE Meeting Developmental Biology, Marburg (2007)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas, die fachliche Unterstützung und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Uli Müller von der Fachrichtung Zoologie der Universität des Saarlandes danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Dr. Michael Faust, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, für die gute Betreuung der Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern der AG Walldorf für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich mich bei Doris Hemmer für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken. Danke auch an die Ehemaligen Mona Raffael, Ruth-Jessica Wild, Birgit Wahl, Marc Linzmayer und Caroline Schmidt, die freundschaftlich mit mir verbunden blieben.

Dem Institut für Molekulare Zellbiologie danke ich für die Bereitstellung des konfokalen Mikroskops, und besonders Dr. Lars Kästner für Wartung und Reparaturen. Bedanken möchte ich mich auch bei Karin Hammer für die Einführung in die Software Imaris.

Ich danke den Mitgliedern des Graduiertenkollegs „Zelluläre Regulation und Wachstum“ für die Möglichkeit neue Techniken und hilfsbereite Leute verschiedener Fachrichtungen kennenzulernen.

Meinen Freunden, vor allem meiner langjährigen Weggefährtin Andrea Jaeckel, danke ich dafür, dass sie mir immer wieder Mut gemacht haben.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, die mich in jeder Lebenslage unterstützen, mich bestärken und an mich glauben. Ohne sie wäre mir ein Studium und vieles mehr nicht möglich gewesen.

## **Lebenslauf**

**Name:** Petra Kaspar

**Geburtsdatum:** 22.07.1979

**Geburtsort:** Lebach

**Schulbildung:** 1985 – 1989:  
Grundschule Primstal  
1989 – 1998:  
Hochwaldgymnasium Wadern  
Juni 1998: Abitur

**Studium:** Oktober 1998 - Dezember 2003:  
Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes  
19.10.2000: Vordiplom  
17.12.2003: Diplom  
Prüfungsfächer: Genetik, Mikrobiologie, Virologie  
Thema der Diplomarbeit:  
„Untersuchungen zur Lokalisation, Regulation und Funktion des  
Homöoboxgens *homeobrain* von *Drosophila melanogaster*“

**Promotion:** Februar 2004:  
Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von  
Herrn Prof. Dr. Walldorf am Institut für Entwicklungsbiologie,  
Universität des Saarlandes