

Biologie

Analyse syncytialer Zellverbände bei *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Sandra Heuser
aus Heessen (jetzt Hamm)

2004

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. W. Janning
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Chr. Klämbt
Tag der mündlichen Prüfung:	26. Juli 2004
Tag der Promotion:	26. Juli 2004

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

KLAPPER, R., HEUSER, S., STRASSER, T., JANNING, W. (2001) A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development* 128, 2517–2524.

Vorträge:

HEUSER, S., KLAPPER, R., STRASSER, T., JANNING, W. (2001) Syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*: A new technical approach. 8th Regional *Drosophila* Meeting in Würzburg, 22. und 23. Juni 2001.

HEUSER, S., KLAPPER, R., STRASSER, T., JANNING, W. (2003) Syncytia or individual cells? A new technique reveals cell fusion in *Drosophila melanogaster*. CellBiD in Bonn, 26. bis 29. März 2003.

Poster:

HEUSER, S., KLAPPER, R., STRASSER, T., JANNING, W. (2001) Syncytia or individual cells? 17th European *Drosophila* Research Conference in Edinburgh / Schottland, 1. bis 5. September 2001.

HEUSER, S., KLAPPER, R., STRASSER, T., JANNING, W. (2003) Syncytia or individual cells? A new technique reveals cell fusion in *Drosophila melanogaster*. CellBiD in Bonn, 26. bis 29. März 2003.

HEUSER, S., KLAPPER, R., STRASSER, T., JANNING, W. (2003) Quo vadis myoblast? 18th European *Drosophila* Research Conference in Göttingen, 2. bis 4. Oktober 2003.

Für Udo.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Embryonal- und Larvalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> unter besonderer Berücksichtigung der Mesodermentwicklung	1
1.2 Aufbau und Entwicklung der larvalen somatischen Muskulatur des Abdomens	4
1.3 Aufbau und Entwicklung der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens	7
1.4 Weitere mesodermale Derivate des Abdomens	8
1.5 Die Einzelzelltransplantationstechnik bei <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.6 Das GAL4-System bei <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.7 Das GAL4/UAS-Transplantationssystem	15
1.8 Die <i>FLP-out</i> -Technik	17
1.9 Aufgabenstellung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen	19
2.1.3 Enzyme und Kits	26
2.1.4 Verwendete Fliegenlinien	26
2.1.5 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	28
2.1.6 Geräte	29
2.1.6.1 Optische Hilfsgeräte	29
2.1.6.2 Großgeräte	30
2.1.7 Hilfsmittel	30
2.2 Die <i>Drosophila melanogaster</i>-Zucht	31
2.2.1 Aufzucht und Haltung der Fliegen	31
2.2.2 Die Gewinnung von Ablagen	31
2.3 Die Etablierung transgener <i>UAS-DsRed</i>-Linien	31
2.3.1 Molekularbiologische Arbeiten	32

2.3.1.1	Restriktionsverdau der Plasmide pDsRed und pUAST	32
2.3.1.1.1	Restriktionsverdau mit <i>Xba</i> I	32
2.3.1.1.2	DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung (nach SAMBROOK et al., 1989)	33
2.3.1.2	Vorbereitung von Insert (DsRed) und Vektor (pUAST)	33
2.3.1.2.1	DNA-Isolation aus dem Agarose-Gel mittels GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	33
2.3.1.2.2	Dephosphorylierung des Vektors	34
2.3.1.2.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Konzentrationsbestimmung (nach SAMBROOK et al., 1989)	34
2.3.1.3	Ligation	34
2.3.1.4	Amplifikation der Ligationsansätze (Mini-Kulturen) und Testverdaus	34
2.3.1.4.1	Transformation von dauerkompetenten <i>E. coli</i> -Zellen (nach SAMBROOK et al., 1989)	35
2.3.1.4.2	Amplifikation von Einzelkolonien	35
2.3.1.4.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (alkalische Lyse) (nach BIRNBOIM und DOLLY, 1979)	35
2.3.1.4.4	Restriktionsverdau mit <i>Xba</i> I	36
2.3.1.4.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung	36
2.3.1.4.6	Restriktionsverdau mit <i>Xba</i> I und <i>Sma</i> I	36
2.3.1.4.7	DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung	36
2.3.1.5	Amplifikation und Aufreinigung des positiven Ligationsansatzes	36
2.3.1.5.1	Transformation von dauerkompetenten <i>E. coli</i> -Zellen (Schüttelkultur)	37
2.3.1.5.2	Präparative Plasmidisolation mittels Jetstar Plasmid Midi Kit 50	37
2.3.1.5.3	DNA-Fällung mit Isopropanol (nach SAMBROOK et al., 1989)	37
2.3.1.5.4	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung (nach SAMBROOK et al., 1989)	37
2.3.1.5.5	DNA-Aufreinigung über Elutip-d-Säulen	38
2.3.1.5.6	DNA-Fällung mit Ethanol (nach CROUSE und AMORESE, 1987; AUSUBEL et al., 1993)	38
2.3.1.5.7	DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Konzentrationsbestimmung	38
2.3.2	Keimbahntransformation (nach RUBIN und SPRADLING, 1982)	39
2.3.2.1	Die Vorbereitung der Embryonen	39
2.3.2.2	Die DNA-Injektion	39
2.3.2.3	Die Weiterbehandlung injizierter Embryonen und die Identifizierung von Transformanten	40
2.3.3	Fliegenzucht	40

2.3.3.1	Die Bestimmung der Insertionsorte und die Isogenisierung der transgenen Linien	40
2.3.3.2	Expressionsstudien mit den <i>UAS-DsRed</i> -Linien	42
2.3.3.3	Die Modifikation der <i>UAS-DsRed</i> -Linien	43
2.4	Die Transplantationsmethode	43
2.4.1	Die verschiedenen Transplantationsserien	43
2.4.2	Der Arbeitsplatz zur Durchführung von Transplantationen	44
2.4.3	Die Herstellung von Transplantationskapillaren	45
2.4.4	Die Vorbereitung der Embryonen	45
2.4.5	Die Durchführung der Einzelzelltransplantationen	47
2.4.6	Die Durchführung der Mehrzelltransplantationen	48
2.4.7	Die Bestimmung des Transplantationsorts	48
2.4.8	Die Weiterbehandlung der Embryonen nach der Transplantation	48
2.4.8.1	Die Weiterbehandlung der Embryonen mit einem β -Galaktosidase-Marker	49
2.4.8.2	Die Weiterbehandlung der Embryonen mit einem Fluoreszenzmarker	50
2.5	Die Untersuchung von Puppen	52
2.6	Die Hitzeschock-Experimente	53
2.6.1	Die Vorbereitung der Embryonen und Larven	53
2.6.2	Der Hitzeschock	53
2.6.3	Die Weiterbehandlung der Embryonen und Larven	54
2.6.4	Die Auswertung der Hitzeschock-Klone	54
2.7	Auswertung und Dokumentation	54
3. Ergebnisse		56
3.1	Die gewählten Transplantationsbereiche	56
3.2	Das GAL4/UAS-Transplantationssystem und die Induktion verschiedener Reporterexpressionen	57
3.2.1	Die Kontrolle der Spenderlinien	58
3.2.2	Die Kontrolle der Empfängerlinien	59
3.3	Die Auswertungskriterien	59
3.4	Übersicht über alle durchgeführten Transplantationsserien	60
3.5	Transplantationen zur Bestätigung der System-Selektivität	72
3.5.1	Homotope Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm bei 40% EL aus der Spenderlinie <i>UAS-GFP</i> ; <i>daGAL4</i> in die Empfängerlinie <i>UAS-lacZ</i> (Serie A; GFP/lacZ-Doppelmarkierungsmethode)	73

3.5.2	Homotope Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm bei 40% EL aus der 2000S RITC-Dextran-markierten Spenderlinie <i>UAS-GFP</i> in die Empfängerlinie <i>daGAL4</i> (Serie B; RITC-Dextran/GFP-Doppelmarkierungsmethode)	76
3.6	Transplantationen zur Etablierung der DsRed/GFP-Methode	80
3.6.1	Homotope Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm bei 40% EL aus den Nachkommen der Kreuzung <i>UAS-DsRed</i> x <i>daGAL4</i> (Serie C), beziehungsweise aus der Linie <i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i> (Serie D) in die Empfängerlinie <i>UAS-GFP</i> (DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode)	82
3.6.2	Homotope Mehrzelltransplantationen in der Ektoderanlage bei durchschnittlich 50% EL und 50% VD aus der Spenderlinie <i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i> in die Empfängerlinie <i>UAS-GFP</i> (Serie E; DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode)	90
3.7	Kartierung des Rumpfmesoderms (von 44 bis 23% EL und 0 bis 30% VD) mittels homotoper Einzelzelltransplantationen aus der Spenderlinie <i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i> (Serien F bis H), beziehungsweise <i>UAS-GAL4</i> ; <i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i> (Serie I) in die Empfängerlinie <i>UAS-GFP</i> (DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode)	94
3.7.1	Klone in der larvalen somatischen Muskulatur	99
3.7.2	Klone im Fettkörper	101
3.7.3	Klone in der visceralen Muskulatur des Mitteldarms	104
3.7.4	Klone in der imaginalen somatischen Muskulatur	108
3.7.5	Klone in der <i>transverse nerve exit glia</i>	116
3.7.6	Klone im Dorsalgefäß	118
3.7.7	Klone im Gonadenmesoderm	122
3.7.8	Klone in der Oviduktmuskulatur	123
3.7.9	Klone in ektodermalen Derivaten	125
3.7.10	Klone in unbekanntem Strukturen	127
3.7.11	Blastoderm-Anlagenplan für das posteriore Mesoderm zwischen 44 und 23% Eilänge	127
4. Diskussion		130
4.1	Die Methode der Einzelzelltransplantation	130
4.2	Das GAL4/UAS-Transplantationssystem	132
4.3	Der Vergleich von Einzelzell- und Mehrzelltransplantationen	135
4.4	Der Vergleich der verschiedenen Doppelmarkierungsmethoden	137
4.5	Die Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien	139
4.6	Die Detektion syncytialer Zellverbände	141

4.6.1	Die Detektion bisher unbekannter syncytialer Zellverbände mesodermaler Herkunft	144
4.6.2	Die Detektion bisher unbekannter syncytialer Zellverbände ektodermaler Herkunft	146
4.6.3	Die Detektion bisher unbekannter syncytialer Zellverbände ungeklärter Herkunft	147
4.7	Zahlreiche Gewebe überdauern scheinbar unverändert die Metamorphose	148
4.7.1	Persistierende mesodermale Gewebe	148
4.7.2	Persistierende ektodermale Gewebe	150
4.8	Untersuchungen zur Bildung der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens	151
4.8.1	Die Aufklärung intra- und intersegmentaler Durchmischungsprozesse	152
4.8.2	Die Analyse der Myoblasten-Determination	156
4.9	Die Herkunft des adulten Fettkörpers	158
4.10	Die Differenzierung des Gonadenmesoderms	159
4.11	Die Herkunft der Oviduktuskultur	160
4.12	Klone in weiteren Geweben	162
4.12.1	Klone in den Thorax-Imaginalscheiben	162
4.12.2	Klone in der <i>transverse nerve exit glia</i>	162
4.12.3	Klone in unbekanntem Strukturen	163
4.13	Anlagenkartierung	164
5. Zusammenfassung		166
6. Abkürzungsverzeichnis		168
7. Literaturverzeichnis		170

The earth-bound early stages built enormous digestive tracts and hauled them around on caterpillar treads. Later in the life-history these assets could be liquidated and reinvested in the construction of an entirely new organism – a flying-machine devoted to sex.

CARROLL M. WILLIAMS, 1958

1. Einleitung

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* gehört zu den holometabolen Insekten, deren vollständige Metamorphose zu einem der faszinierendsten Prozesse in der Natur gehört. Die Verwandlung von der Larve bis zur Imago ist bis heute nicht gänzlich aufgeklärt. Das larvale Fress- und Wachstumsstadium unterscheidet sich in seiner Organisationshöhe stark vom adulten Reproduktionsorganismus. Die Determination der beiden Entwicklungsschicksale erfolgt bereits während der fortgeschrittenen Embryonalentwicklung, nämlich nach der zweiten postblastodermalen Mitose (MEISE und JANNING, 1993; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997; KLAPPER et al., 1998).

1.1 Die Embryonal- und Larvalentwicklung von *Drosophila melanogaster* unter besonderer Berücksichtigung der Mesodermentwicklung

Die Frühentwicklung von *Drosophila melanogaster* verläuft nach dem Modus der superfiziellen Furchung. Dabei bildet sich aus der Zygote nach neun synchronen Mitosen ein Syncytium, dessen 512 Kerne zunächst im gemeinsamen zentralen Dotter vorliegen. Von diesen wandern 375 Kerne in den Eicortex und circa 20 Kerne in das posteriore Polplasma, während die restlichen Kerne als spätere Vitellophagen im zentralen Dotterbereich verbleiben (ZALOKAR und ERK, 1976). Die posterior ausgelagerten Kerne differenzieren sich kurze Zeit später zu den Polzellen, welche bereits keimbahnspezifisch determiniert sind (ILLMENSEE, 1976; TURNER und MAHOWALD, 1976). Nach weiteren vier nahezu synchronen Mitosewellen erhöht sich die Kernanzahl im corticalen Cytoplasma auf ungefähr 6000. Durch das von der Peripherie ausgehende Einziehen von Zellmembranen wird circa drei Stunden nach der Eiablage das zelluläre Blastodermstadium (Stadium 5, alle Stadienbezeichnungen nach CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985) erreicht (TURNER und MAHOWALD, 1976; ZALOKAR und ERK, 1976; HARTENSTEIN und CAMPOS-ORTEGA, 1985).

Nach wenigen Minuten setzen die Gastrulationsbewegungen ein, wobei zunächst eine Invagination der ventral gelegenen Mesodermzellen entlang der Mittellinie und damit die Ausbildung der Ventralfurche erfolgt (Stadium 6). Die Keimblattzugehörigkeit der invagierenden Mesodermzellen ist bereits im zellulären Blastodermstadium determiniert (BEER et al., 1987; HOLZ et al., 1997) und wird durch die initiale Expression des *twist (twi)*-Gens reguliert (SIMPSON, 1983; NÜSSLEIN-VOLHARD et al., 1984; THISSE et al., 1987, 1988). Nach der dorsal gerichteten Wanderung der Polzellen erfolgt die proctodeale Invagination, bei der die Anlagenzellen des entodermalen posterioren Mitteldarms und des ektodermalen Enddarms in das Keimesinnere drängen (Stadium 7). Zeitgleich erfolgt die stomodeale Invagination der Anlagen des entodermalen anterioren Mitteldarms und des ektodermalen Vorderdarms am anterioren Ende der Ventralfurche.

Nach dem Schließen der Ventralfurche und der Ausbildung eines mesodermalen Rohrs (Stadium 8; POULSON, 1950; LEPTIN und GRUNEWALD, 1990) finden kurz hintereinander die ersten zwei postblastodermalen Mitosewellen in diesem Keimblatt statt (FOE und ALBERTS, 1983; FOE, 1989). Dabei flacht sich das mesodermale Rohr zu einem zweizell-schichtigen Epithel ab, welches sich bis zum Stadium 9 zu einem einzellschichtigen Gewebeverband ausbreitet und dem benachbarten Ektoderm direkt aufliegt (LEPTIN und GRUNEWALD, 1990). Bereits ab dem Stadium 9 ist auch die metamere Gliederung des Mesoderms in Form periodischer Ausbuchtungen zu beobachten (POULSON, 1950; CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985; LAWRENCE, 1992). Die dritte mesodermale Mitosewelle ist gegen Ende des Stadiums 10 im Rahmen der maximalen Keimstreifverlängerung zu beobachten (FOE, 1989). In Stadium 11 wird die morphologische Differenzierung des mesodermalen Keimblatts in das Somato- und das Splanchnopleura sichtbar (POULSON, 1950; CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985): Während sich das Splanchnopleura in Form einer bilateralen Struktur nach innen abgliedert und später die viscerale Muskulatur ausbildet (CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985; LAWRENCE, 1992; BATE, 1993), liegt das Somatopleura dem Ektoderm auf und differenziert sich im Weiteren zum Fettkörper, dem Gonadenmesoderm, den Cardioblasten und der somatischen Muskulatur (HARTENSTEIN und JAN, 1992; CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass zwischen dem späten Stadium 11 und dem Beginn des Stadiums 13 eine vierte postblastodermale Mitose innerhalb des Mesoderms stattfindet (BATE, 1993).

Die Determination des Mesoderms wird durch Signale aus dem benachbarten Ektoderm induziert (BATE und BAYLIES, 1996; AZPIAZU et al., 1996) und durch nachgeschaltete Genkaskaden modifiziert (siehe Abbildung 1). So führt der *decapentaplegic (dpp)*-Einfluss des dorsalen Ektoderms (STAEHLING-HAMPTON et al., 1994; FRASCH, 1995) über die Repression ventral exprimierter Gene zu einer Unterteilung des Mesoderms in einen

dorsalen und lateralen Sektor, während die frühe mesodermale und die ektodermale Expression der Segmentierungsgene *even-skipped (eve)* und *sloppy paired (slp)* zur anterior-posterioren Aufteilung der mesodermalen Segmente führt (AZPIAZU et al., 1996; RIECHMANN et al., 1997). Innerhalb dieser *eve*- und *slp*-Domänen können durch die Aktivierung, beziehungsweise Repression nachgeschalteter Gene wie *engrailed (en)*, *hedgehog (hh)* oder *wingless (wg)* Differenzierungsprozesse gesteuert werden, die zu einer räumlichen Festlegung der Mesodermprimordien führen (DUNIN BORKOWSKI et al., 1995; AZPIAZU et al., 1996; RIECHMANN et al., 1997; BAYLIES et al., 1995, 1998).

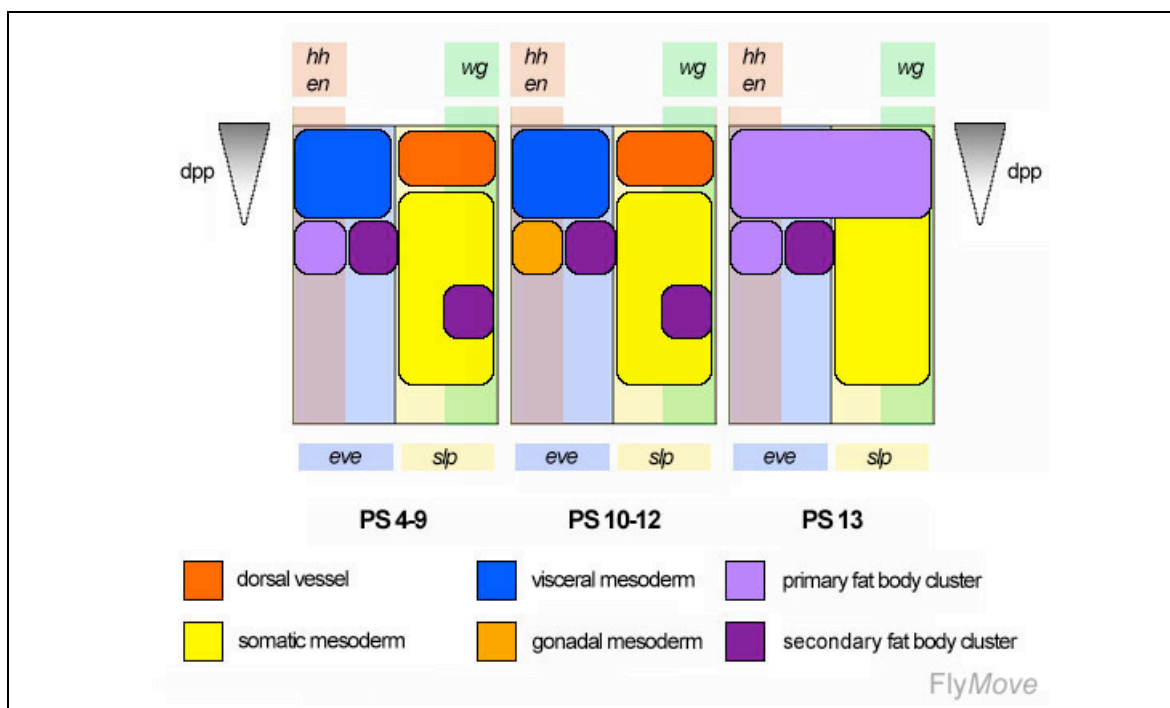


Abbildung 1: Lage der mesodermalen Primordien (verändert nach RIECHMANN et al. (1997); entnommen von <http://flymove.uni-muenster.de>). Oben befindet sich die Dorsalseite, anterior ist links.

Innerhalb der *sloppy paired (slp)*-Domäne liegt im dorsalen Bereich das Primordium des Dorsalgefäßes (außer in Parasegment 13) und weiter ventral das der somatischen Muskulatur sowie des sekundären Fettkörper-Clusters (nur Parasegmente 4 bis 12). Um die Differenzierung der somatischen Muskulatur zu ermöglichen, muss eine hohe *twist (twi)*-Expression aufrechterhalten werden. Innerhalb der *even-skipped (eve)*-Domäne liegt das Primordium der visceralen Muskulatur im dorsalen und das des primären Fettkörper-Clusters (Parasegmente 4 bis 9 und 13), beziehungsweise des Gonadenmesoderms (Parasegmente 10 bis 12) eher im ventralen Bereich. Die Vorläuferzellen dieser drei Gewebe überlappen mit der *engrailed (en)*- und *hedgehog (hh)*-Expressionsdomäne und benötigen diese Gene für ihre weitere räumliche Differenzierung. Derweil liegt für die Primordien des Dorsalgefäßes und der somatischen Muskulatur eine Überlappung mit der *wingless (wg)*-Expressionsdomäne vor, wobei das *wg*-Signal für die weitere Entwicklung dieser Mesodermderivate benötigt wird. Das ektodermale *decapentaplegic (dpp)*-Signal induziert sowohl die Entwicklung des visceralen Mesoderms als auch die des Dorsalgefäßes und der dorsalen somatischen Muskulatur.

In Stadium 12 ist sowohl die Fusion zwischen der anterioren und posterioren Mitteldarmanlage als auch die beginnende Differenzierung der visceralen (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Lawrence, 1992; Bate, 1993) und der somatischen Muskulatur (BATE, 1990) zu beobachten. Nachfolgend kommt es in Stadium 13 zum Dorsalschluss und der Einstülpung der Kopfstrukturen. Auch die morphologische Differenzierung des zentralen Nervensystems aus den zuvor ausgegliederten Neuroblasten und der Tracheen aus dem dorsalen Ektoderm findet in diesem Stadium statt. In Stadium 16 ist das larvale Muskelmuster ausdifferenziert (CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985; BATE, 1990). Die Fettkörperentwicklung wird im Stadium 17 beendet (HARTENSTEIN und JAN, 1992; HOSHIZAKI et al., 1994).

Gegen Ende der etwa eintägigen Embryonalentwicklung ist die Differenzierung aller larvalen Gewebe abgeschlossen, während die imaginalen Gewebe in Form undifferenzierter imaginaler Vorläuferzellen teilungsfähig an spezifischen Positionen vorliegen (Übersicht bei COHEN, 1993). Im Laufe der larvalen Wachstumsphase, die auf einem reinen Zellwachstum der larvalen Gewebe unter Polyploidisierung der Chromosomen beruht, finden zwei Häutungen statt. An das dritte Larvenstadium schließt sich die Verpuppung an, welche mit Ausnahme der Gonaden (BODENSTEIN, 1950), der Malpighischen Gefäße (MORGAN, 1930; BODENSTEIN, 1950; MEISE, 1987), der indirekten Flugmuskulatur (ROBERTSON, 1936; CROSSLEY, 1978; COSTELLO und WHYMAN, 1986), der visceralen Muskulatur (KLAPPER, 2000; KLAPPER et al., 2001, 2002), Teilen des Dorsalgefäßes (RIZKI, 1978a; CURTIS et al., 1999; MOLINA und CRIPPS, 2001), den Hämocyten (HOLZ et al., 2003) und Teilen des Nervensystems (Übersichten bei TRUMAN et al., 1993 und TISSOT und STOCKER, 2000) die Histolyse der larvalen Gewebe zur Folge hat. Im Laufe der Metamorphose werden die imaginalen Gewebe aus den jeweiligen Vorläuferzellen gebildet, deren Proliferation teilweise bereits im Laufe der Larvalentwicklung einsetzt. Die persistierenden larvalen Gewebe werden umstrukturiert und in die imaginalen Gewebeverbände integriert. Im Anschluss an die etwa viertägige Metamorphose erfolgt der Schlupf der reproduktionsfähigen Imago.

1.2 Aufbau und Entwicklung der larvalen somatischen Muskulatur des Abdomens

Die larvale somatische Muskulatur der Abdominalsegmente 2 bis 7 ist aus 30 syncytialen Muskeln pro Hemisegment aufgebaut, welche in einem repetitiven Muster auf der inneren Epidermisoberfläche organisiert sind. Jeder Muskel ist durch seine Größe, Position und Anheftungsstellen und sein spezifisches Innervierungsmuster individuell ansprechbar, wobei das hemisegmentale Muster des vollentwickelten Embryos mit dem des dritten

Larvenstadiums übereinstimmt (HERTWECK, 1931; POULSON, 1950; CROSSLEY, 1978; CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985, 1997; BATE, 1990, 1993).

Die Determination und Differenzierung der larvalen somatischen Muskulatur kann bis zum Stadium 10 zurückverfolgt werden, wenn in mesodermalen Domänen mit einer hohen *twist* (*twi*)-Expression (BAYLIES und BATE, 1996) 19 Zellcluster pro Hemisegment durch die Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* (*l'sc*) eine myogene Kompetenz erlangen (CARMENA et al., 1995). Durch laterale Inhibitionsprozesse im Rahmen des *Notch* (*N*)-Pathways wird in jedem Cluster eine Differenzierung in Muskelvorläuferzellen (*muscle progenitor cells*) und fusionskompetente Zellen (*fusion-competent myoblasts*) gewährleistet (CARMENA et al., 1995). Innerhalb der fusionskompetenten Zellen werden spezifisch die Gene *sticks-and-stones* (*sns*) (BOUR et al., 2000), *hibris* (*hbs*) (ARTERO et al., 2001; DWORAK et al., 2001) und *myoblast incompetent* (*minc*) (RUIZ-GOMEZ et al., 2002; identisch mit *gleeful* (*gfl*) (FURLONG et al., 2001) und *lame duck* (*lmd*) (DUAN et al., 2001)) exprimiert.

Während der dritten mesodermalen Mitosewelle teilen sich die Muskelvorläuferzellen entweder in zwei Muskelgründerzellen (*muscle founder cells*) oder eine Muskelgründerzelle und eine adulte Muskelvorläuferzelle (*adult muscle precursor*) (CARMENA et al., 1995; RUIZ-GOMEZ und BATE, 1997). Die Muskelgründerzellen sind von enormer Bedeutung für die weitere Muskulaturentwicklung: Zum einen ermöglicht die spezifische Expression der Gene *dumbfounded* (*duf*) (RUIZ-GOMEZ et al., 2000; identisch mit *kin of irregular-chiasm-C* (*kirre*) (STRÜNKELNBERG et al., 2001)), *antisocial* (*ants*) (CHEN und OLSON, 2001) und *roughest* (*rst*) (STRÜNKELNBERG et al., 2001) die Attraktion der fusionskompetenten Zellen und die nachfolgenden Fusionsprozesse. Zum anderen wird durch die differentielle Expression verschiedener Muskelidentitätsgene wie *slouch* (*S59*) (DOHRMANN et al., 1990; KNIRR et al., 1999), *apterous* (*ap*) (BOURGOUIN et al., 1992), *Krüppel* (*Kr*) (RUIZ-GOMEZ et al., 1997), *even-skipped* (*eve*) (FRASCH et al., 1987), *muscle specific homeobox* (*msh*) (NOSE et al., 1998), *ladybird* (*lb*) (JAGLA et al., 1998), *collier* (*col*) (CROZATIER und VINCENT, 1999) und *nautilus* (*nau*) (MICHELSON et al., 1990; KELLER et al., 1998) die spätere Muskelidentität festgelegt. Die Muskelgründerzellen sind somit als zelluläre Vorläufer der individuellen larvalen Muskeln zu betrachten.

Für die ab Stadium 12 einsetzende Verschmelzung der Muskelgründerzellen mit den fusionskompetenten Myoblasten kann ein zweistufiger Fusionsmechanismus postuliert werden (BATE, 1990; PAULULAT et al., 1999; RAU et al., 2001): Im ersten Schritt entstehen durch die Fusion beider Zelltypen (RUIZ-GOMEZ und BATE, 1997; LANDGRAF et al., 1999) wenigkernige syncytiale Muskelvorläufer (*muscle precursor*) mit einer definierten

Identität. Dabei führt die *duf*- und *rst*-Expression der Muskelgründerzellen zur Chemoattraktion und Adhäsion der fusionskompetenten Zellen (RUIZ-GOMEZ et al., 2000; STRÜNKELNBERG et al., 2001; TAYLOR, 2002). Zwischen den Muskelgründerzellen und den fusionskompetenten Zellen bilden sich Präfusionskomplexe (*Pre-fusion complexes*), die unter dem Einfluss von *blown fuse* (*blow*) in elektronendichte Plaques umgewandelt werden (DOBERSTEIN et al., 1997). Diese wiederum sind für die Vesikulierung der Membranen und somit die Fusion der individuellen Zellen essentiell (DOBERSTEIN et al., 1997). Durch die Verschmelzung mit weiteren benachbarten fusionskompetenten Myoblasten wachsen die Muskelvorläufer in einem zweiten Fusionsschritt kontinuierlich bis zu ihrer individuellen Größe und Kernzahl heran (BATE, 1990).

Die Differenzierungsprozesse im Rahmen der embryonalen Myogenese sind in der nachfolgenden Abbildung 2 zusammengefasst:

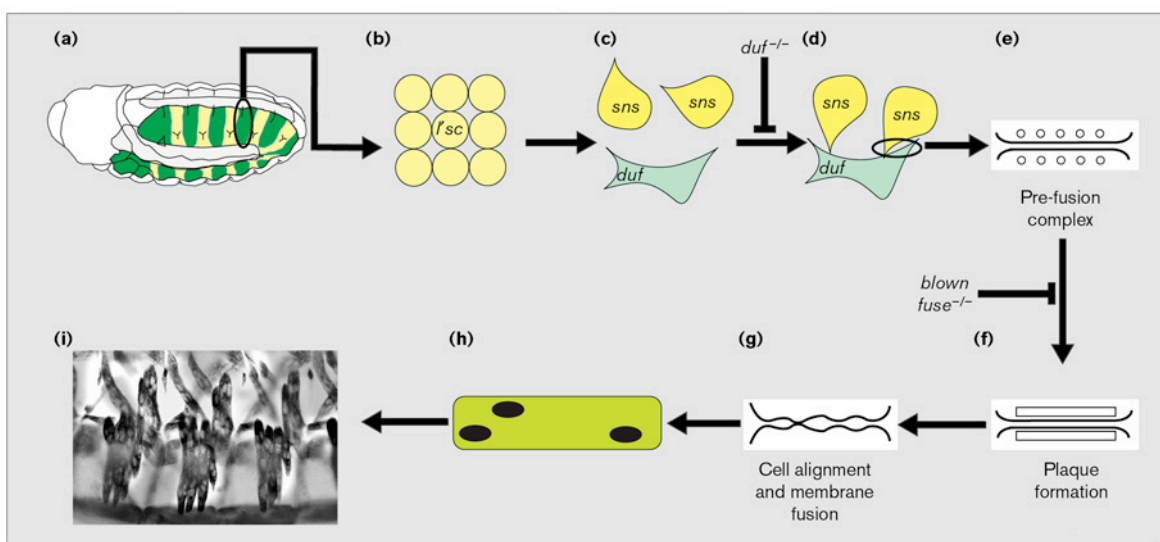


Abbildung 2: Schrittweise Ausbildung des larvalen *Drosophila*-Muskelmusters (verändert nach TAYLOR, 2000).

(a) Die modulierte *twist* (*twi*)-Expression führt zur Unterteilung des Mesoderms in verschiedene Domänen. (b) Durch einen lateralen Inhibitionsprozess, der von neurogenen Genen vermittelt wird, segregieren aus den Muskel-bildenden Regionen *lethal of scute* (*l'sc*)-exprimierende Muskelgründerzellen. (c) Die asymmetrische Teilung der Muskelgründerzellen führt zur Bildung von Muskelvorläuferzellen. In diesen wird das Gen *dumbfounded* (*duf*) exprimiert, während sich die umgebenden fusionskompetenten Myoblasten durch die Expression des Gens *sticks-and-stones* (*sns*) auszeichnen. In *duf*-Mutanten sind in diesem Stadium keine Myoblasten-Cluster sichtbar. (d) Die Filopodien der fusionskompetenten Myoblasten orientieren sich in Richtung der Muskelgründerzellen. (e) Bei der EM-Analyse der fusionierenden Myoblasten wird zunächst ein Präfusionskomplex sichtbar. In *blown fuse* (*blow*)-Mutanten stoppt der Fusionsprozess in diesem Stadium. In der EM-Analyse können zwei weitere Stadien unterschieden werden: (f) die Plaquetten-Bildung und (g) die Zellausrichtung mit anschließender Membranfusion. (h) Zunächst entstehen mehrkernige Muskelvorläufer, die durch fortschreitende Fusionsprozesse eine individuelle Muskelgröße erreichen. (i) Ausschnitt aus dem fertigen Muskelmuster.

1.3 Aufbau und Entwicklung der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens

Während der Metamorphose wird die larvale somatische Muskulatur des Abdomens nahezu vollständig histolysiert (ROBERTSON, 1936; BODENSTEIN, 1950; CROSSLEY, 1978). Die Ausnahme bilden einzelne larvale Muskeln, welche bis zum Schlupf der Imago persistieren und in den ersten 24 Stunden des Adultstadiums abgebaut werden (KIMURA und TRUMAN, 1990).

Die imaginale somatische Muskulatur des Abdomens wird *de novo* auf der wachsenden adulten Epidermis gebildet und kann aufgrund einer Rückverfolgung des persistierenden *twist (twi)*-Expressions-musters auf sechs adulte Muskelvorläuferzellen pro embryonalem abdominalem Hemisegment zurückgeführt werden (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991; siehe Abbildung 3). Die räumliche Verteilung dieser permanent *twist*-exprimierenden Vorläuferzellen (PTCs) folgt einem stereotypen Muster: Während eine Vorläuferzelle im ventralen Sektor liegt, sind zwei im lateralen und drei im dorsalen Sektor eines embryonalen Hemisegments lokalisiert. Über Ablationsexperimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen um die einzigen Vorläufer der imaginalen Muskulatur handelt und dass jeweils eine embryonale Vorläuferzelle für die Ausbildung einer speziellen Gruppe adulter Muskeln verantwortlich ist (BROADIE und BATE, 1991; siehe Abbildung 3). Auch der mesodermale Ursprung der Vorläuferzellen konnte bereits nachgewiesen werden (HOTTA und BENZER, 1972; LAWRENCE und JOHNSTON, 1982, 1986).

Die adulten Muskelvorläuferzellen proliferieren ab dem zweiten Larvenstadium, so dass bis zum Ende des dritten Larvenstadiums in jedem abdominalen Hemisegment sechs räumlich getrennte Vorläufercluster vorliegen (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991; BROADIE und BATE, 1991). Diese sind in Form dreier dorsaler, zweier lateraler und eines ventralen imaginalen Muskelvorläufers morphologisch zu unterscheiden und bestehen aus jeweils acht bis 16 Zellen. Im Rahmen der Metamorphose schreitet ihre Proliferation voran, wobei die Ausbreitung der adulten Myoblasten entlang der persistierenden Nerven und deren Wachstumskegeln erfolgt (CURRIE und BATE, 1991). Bereits 28 Stunden nach Verpuppungsbeginn sind Zellfusionen zwischen den Myoblasten sichtbar (CURRIE und BATE, 1991). Das adulte Muskelmuster ist bereits 65 Stunden nach Verpuppungsbeginn fertig gestellt und setzt sich wie folgt zusammen: Die dorsale Muskelgruppe besteht aus 17 bis 22 longitudinalen Muskeln, während der lateralen Muskelgruppe circa 20 Muskeln mit dorsoventraler Orientierung angehören. In der ventralen Muskelgruppe sind fünf bis acht Muskeln, die lateral zur ventralen Mittellinie liegen, zu einem Bündel zusammengefasst. Im ersten Abdominalsegment ist dieses Muster nur leicht abgewandelt, während dessen

Komplexität in den Terminalsegmenten durch die zusätzliche Anal- und Genitalmuskulatur zunimmt (MILLER, 1950; CROSSLEY, 1978).

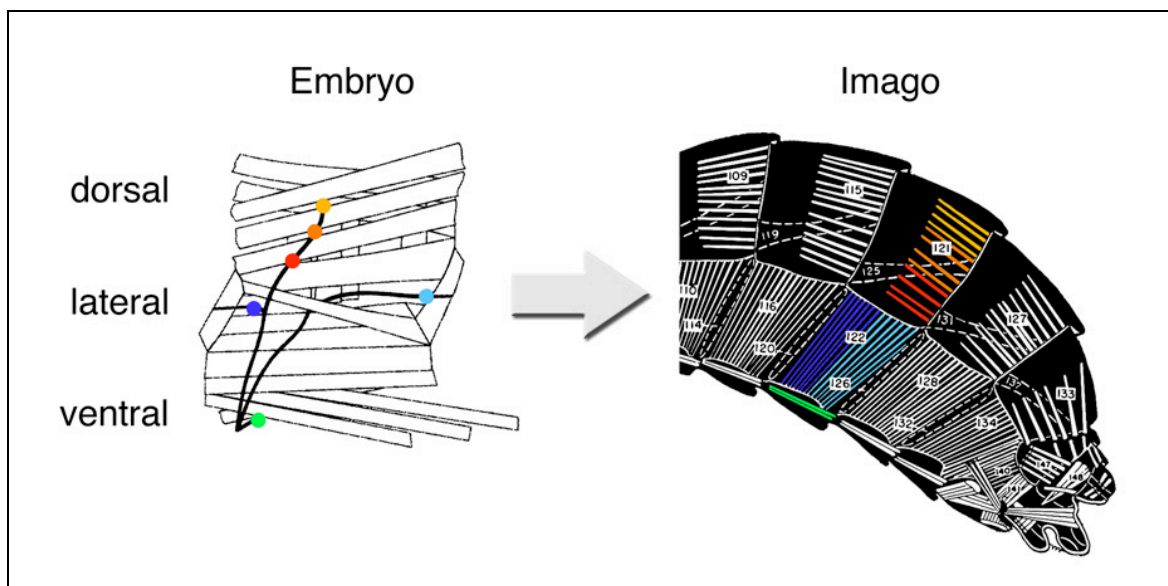


Abbildung 3: Differenzierung der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens.

In der linken Teilabbildung ist ein embryonales Hemisegment dargestellt (verändert nach FARRELL und KESHISHIAN, 1999; anterior ist links, die ventrale Mittellinie befindet sich unten). Alle adulten Muskelvorläuferzellen mit permanenter *twist*-Expression (PTCs) sind farbig dargestellt: Während die drei dorsalen PTCs rot, orange und gelb markiert sind, sind die beiden lateralen PTCs hell- und dunkelblau und die ventrale PTC grün markiert. Alle PTCs sind mit peripheren Nerven (schwarze Linien) assoziiert.

Die rechte Teilabbildung zeigt einen schematischen Sagittalschnitt durch das Abdomen einer weiblichen Imago mit dem Blick auf die rechte Körperhälfte (verändert nach MILLER, 1950). Die Zahlen benennen verschiedene dorsale (109, 115, 121, 127, 133, 147, 148) und laterale tergesternale Muskelgruppen (110, 114, 116, 120, 122, 126, 128, 132, 134, 140, 141) sowie einige temporäre dorsale Muskeln (119, 125, 131, 137). Für ein Hemisegment wurde exemplarisch die Farbgebung der linken Teilabbildung wieder aufgegriffen. Nach dem Restriktionsmodell von BATE et al. (1991), CURRIE und BATE (1991) und BROADIE und BATE (1991) gehen aus der ventralen PTC alle ventralen Muskeln, aus jedem lateralen PTC jeweils die Hälfte der lateralen Muskeln und aus jedem dorsalen PTC jeweils ein Drittel der dorsalen Muskeln des korrespondierenden imaginalen Hemisegments hervor.

1.4 Weitere mesodermale Derivate des Abdomens

Der **larvale Fettkörper** (siehe Abbildung 4) ist bilateralsymmetrisch aufgebaut und erstreckt sich von den Speicheldrüsen bis zum posterioren Enddarm als einzellschichtiges Gewebe zwischen Hautmuskelschlauch und Verdauungstrakt. Seine Struktur und Zellzahl bleibt nach der Embryogenese konstant, wobei die mononucleären Zellen polyploidisieren (RIZKI, 1978b). Wichtige Funktionen dieses Gewebes bestehen in der Energiespeicherung, dem intermediären Metabolismus, der Detoxifikation, der Zellkommunikation und der Immunantwort.

Die embryonale Differenzierung des Fettkörpers beginnt im Stadium 10 in den Parasegmenten 4 bis 9; dort wird innerhalb der *even-skipped* (*eve*)-exprimierenden lateralen Mesodermdomäne der Transkriptionsfaktor *serpent* (*srp*) in primären Clustern von Fettkörpervorläuferzellen exprimiert (ABEL et al., 1993; REHORN et al., 1996; SAM et al., 1996; siehe Abbildung 1). Im Parasegment 13 befindet sich eine zusätzliche Anhäufung von Fettkörpervorläuferzellen, die bis zum dorsalsten Mesodermrand reicht (RIECHMANN et al., 1998). Mit dem Stadium 11 können im lateralen und ventralen Mesoderm der Parasegmente 4 bis 12 zwei sekundäre Cluster von Fettkörpervorläuferzellen detektiert werden. (RIECHMANN et al., 1998). Mit der beginnenden Keimstreifverkürzung proliferieren die Vorläuferzellen im Rahmen der vierten postblastodermalen Mitose (BATE, 1993) und der entstehende Fettkörper verliert sein segmentales Erscheinungsbild.

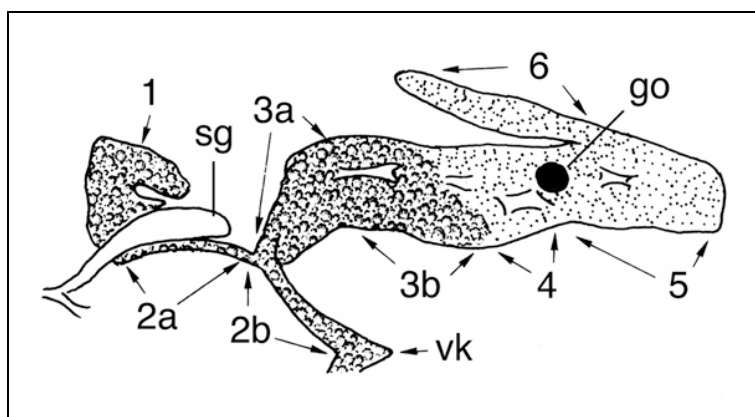


Abbildung 4: Organisation und Lage einer larvalen Fettkörperhalbseite (verändert nach RIZKI, 1978b).

Anterior ist links; (*sg*) Speicheltrichter; (*go*) Gonade; (*vk*) ventrale Kommissur; (*1* bis *6*) Bezeichnung der einzelnen Fettkörperregionen.

Während der Metamorphose werden die in den larvalen Fettkörperzellen gespeicherten Metaboliten für den Aufbau der sich bildenden imaginalen Gewebe verwendet (RIZKI und RIZKI, 1972). In frischgeschlüpften Imagines setzt sich der **adulte Fettkörper** dann aus zwei Zelltypen, nämlich den peripheren und den tiefen Fettzellen, zusammen (MILLER, 1950). Die tiefen Fettzellen (*deep fat*) füllen die abdominale Körperhöhle und stellen die Überreste des larvalen Fettkörpers dar (RIZKI, 1978b), welcher in den ersten vier Tagen des Adultstadiums kontinuierlich abgebaut wird (WIGGLESWORTH, 1949; BUTTERWORTH, 1972; POSTLETHWAIT und JONES, 1978). Im Gegensatz dazu liegen die segmental angeordneten peripheren Fettzellen (*peripheral fat masses*) der Körperwand auf und bilden den eigentlichen adulten Fettkörper. Über ihre Herkunft ist bisher nur der mesodermale Ursprung bekannt (LAWRENCE und JOHNSTON, 1986).

Die **viscerale Muskulatur des Mitteldarms** setzt sich sowohl aus longitudinal orientierten als auch aus circular verlaufenden Muskeln zusammen, die wie ein zweischichtiges Gitter den Mitteldarm umschließen und für die Peristaltik verantwortlich sind (STRASBURGER, 1932; ROBERTSON, 1936; BODENSTEIN, 1950). Obwohl für die viscerale Muskulatur stets eine mononucleäre Organisation postuliert wurde (GOLDSTEIN und BURDETTE, 1971;

ELDER, 1975; TEPASS und HARTENSTEIN, 1994), konnte kürzlich der dinucleäre Status der circulären (HEUSER, 1999; OVERESCH, 1999; SAN MARTIN et al., 2001; KLAPPER et al., 2002) und der oligonucleäre Aufbau der longitudinalen visceralen Muskulatur (HEUSER, 1999; OVERESCH, 1999; KLAPPER et al., 2001; SAN MARTIN et al., 2001) bewiesen werden (siehe Abbildung 5D). Außerdem widerlegen neuere Untersuchungen (KLAPPER, 2000; KLAPPER et al., 2002), dass die larvale viscerele Muskulatur während der Metamorphose abgebaut wird (ROBERTSON, 1936).

Die beiden visceralen Muskeltypen entstammen verschiedenen Blastodermregionen: Während die **circuläre viscerele Muskulatur** dem Rumpfmesoderm entspringt (TREMML und BIENZ, 1989; AZPIAZU und FRASCH, 1993), besitzt die **longitudinale viscerele Muskulatur** zwei Anlagen: Neben einem bereits im Blastodermstadium gewebespezifisch determinierten Primordium an der posterioren Mesodermspitze (KUSCH und REUTER, 1999; KLAPPER, 2000; KLAPPER et al., 2002), hat auch das oben genannte Rumpfmesoderm Anteil an der Bildung dieses Gewebes (KLAPPER et al., 2002).

Ab dem späten Stadium 11 sind die Vorläuferzellen der circulären und longitudinalen visceralen Muskulatur als zwei palisadenartige Strukturen entlang der aufeinander treffenden Mitteldarmprimordien morphologisch zu erkennen (PATEL et al., 1987). Diese Vorläuferzellen liegen dem Mitteldarmepihel auf (CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985; HARTENSTEIN und JAN, 1992) und sind im weiteren Entwicklungsverlauf essentiell an der regionalen Differenzierung des Mitteldarms beteiligt (BATE, 1993). Es handelt sich um drei Myoblasten-Populationen: Während die wenigen Muskelgründerzellen der circulären visceralen Muskulatur das Gen *dumbfounded* (*duf*) exprimieren (SAN MARTIN und BATE, 2001; KLAPPER et al., 2002), kann in den zahlreichen fusionskompetenten Myoblasten eine *sticks-and-stones* (*sns*)-Expression beobachtet werden (SAN MARTIN und BATE, 2001; KLAPPER et al., 2002). Im Stadium 12 strecken sich die circulären Gründerzellen und fusionieren jeweils mit einem benachbarten fusionskompetenten Myoblasten zu einem dinucleären Syncytium (KLAPPER et al., 2002). Zum gleichen Zeitpunkt migrieren die Vorläuferzellen der longitudinalen visceralen Muskulatur entlang des Mitteldarmprimordiums nach anterior und beginnen mit der Expression des *founder cell*-Markers *duf* (SAN MARTIN et al., 2001). Diese longitudinalen Gründerzellen rekrutieren nun sukzessive ihre Fusionspartner aus den verbliebenen fusionskompetenten Myoblasten. Die viscerele Myogenese ist bereits im Stadium 13 abgeschlossen (KLAPPER et al., 2002); ihr Ablauf ist in der Abbildung 5 zusammengefasst:

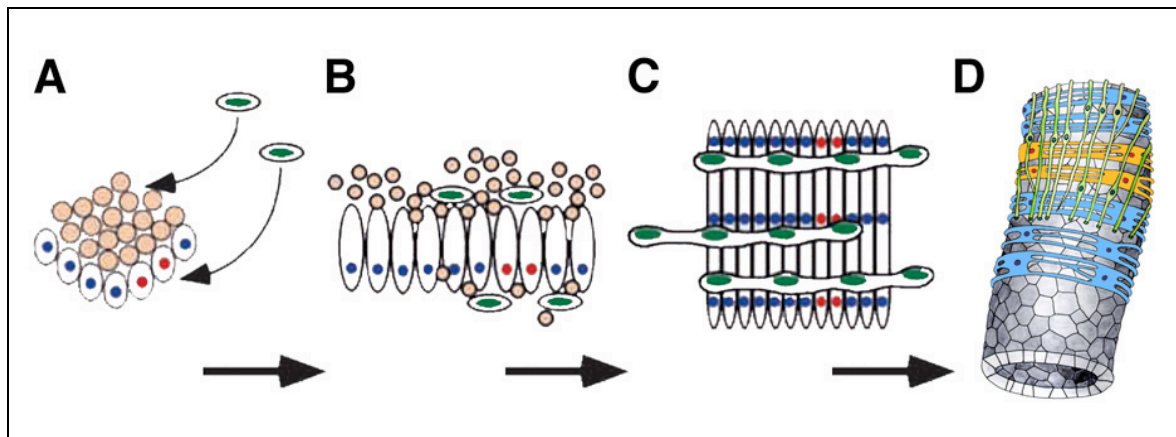


Abbildung 5: Bildung der visceralen Muskulatur des Mitteldarms (verändert nach SAN MARTIN et al., 2001).

In der Teilabbildung A ist schematisch das viscerele Mesoderm eines Embryos im späten Stadium 11 dargestellt. Dabei stellen die lachsfarbenen Zellen fusionskompetente Myoblasten dar, welche mit circulären Gründerzellen mit einer unterschiedlichen Genexpression (rote und blaue Nuclei) assoziiert sind. Bei den grün markierten Zellen handelt es sich um migrierende longitudinale Gründerzellen. Bis zum Stadium 12 (B) nehmen die circulären Gründerzellen eine palisadenförmige Gestalt an. Im Zuge der weiteren Myogenese fusionieren die fusionskompetenten Zellen sukzessiv mit beiden Gründerzelltypen, wobei die Expressionsmuster der reifen Muskeln mit dem der jeweiligen Gründerzelle übereinstimmen (C). Ab Stadium 13 umschließt dann ein Netzwerk aus inneren circulären und äußeren longitudinalen Muskeln den Mitteldarm (D).

Das **larvale Dorsalgefäß** (siehe Abbildung 6A) liegt unterhalb der dorsalen Mittellinie und zieht in Form einer tubulären peristaltischen Pumpe vom achten Abdominalsegment bis zu den Hemisphären des zentralen Nervensystems (RIZKI, 1978a; CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985). Dabei wird die Region anterior des fünften Abdominalsegments als Aorta und die posteriore Region als Herz bezeichnet. Während das Dorsalgefäß im thorakalen Bereich vermutlich nur aus Cardialzellen besteht (BATE, 1993), setzt sich dieses Organ im Abdomen aus verschiedenen Gewebetypen mesodermalen Ursprungs zusammen (RIZKI, 1978a): Zwei Reihen von kontraktile Cardialzellen (Synonyme: *myocardial cells* (RIZKI, 1978a), *cardioblasts* (RIZKI, 1978a) oder *myoendothelial cells* (RUGENDORFF et al., 1994)) bilden das zentrale Rohr und werden von mononucleären Pericardialzellen oder Nephrocyten flankiert. Drei Paar Ostia perforieren diese Röhre und ermöglichen den Einstrom der Hämolymphe. Das Dorsalgefäß ist von einer Reihe elastischer Filamente umgeben und durch *alary muscles* mit der Körperwand verbunden. Bei diesen handelt es sich um sieben Paare filigraner oligonucleärer Myofibrillen (RUGENDORFF et al., 1994), die fächerförmig im Bereich der abdominalen Segmentgrenzen vom Dorsalgefäß zur dorsolateralen Epidermis ziehen.

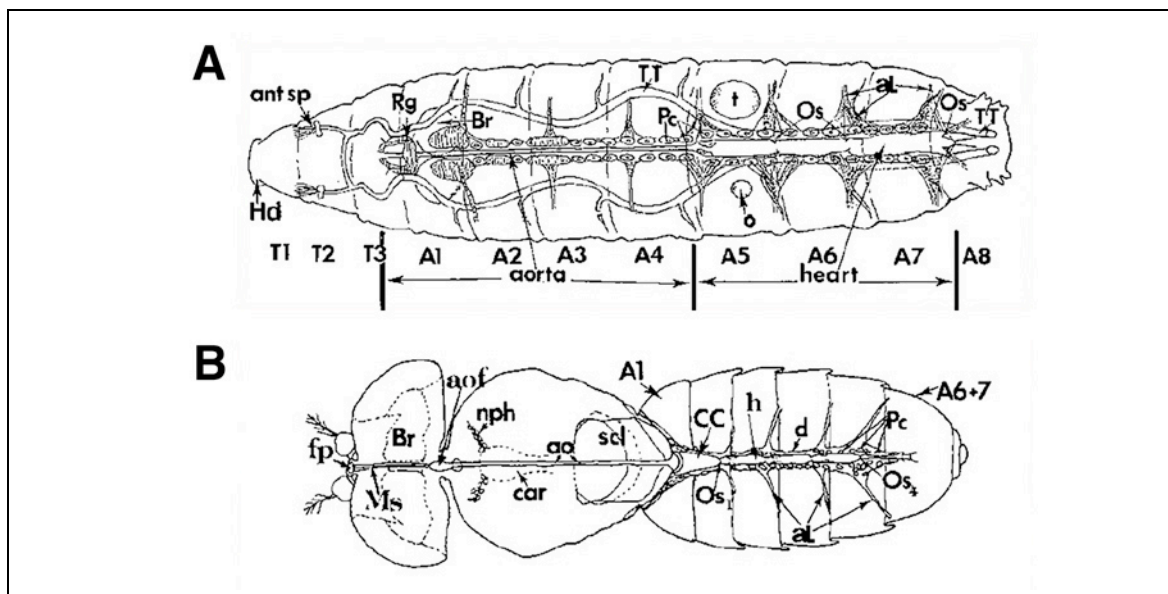


Abbildung 6: Aufbau des larvalen (A) und imaginalen (B) Dorsalgefäßes (verändert nach CURTIS et al., 1999).

Beide Teilabbildungen zeigen schematisch das circulatorische System von dorsal und *in situ*. Während in Abbildung A ein Präpupalstadium (*White Puparium*) dargestellt ist, handelt es sich in der Abbildung B um eine Imago. (A1-A8) Abdominalsegment 1 bis 8; (aL) alary muscle; (ao) Aorta; (aof) aortic funnel; (*ant sp*) anteriore Spirakel; (*Br*) Hemisphären; (*car*) Cardia; (*CC*) conicale Herzkammer (*d*) dorsales Diaphragma; (*fp*) frontales pulsatile Organ; (*h*) Herz; (*Hd*) Kopf; (*Ms*) Muskeln des frontalen pulsatile Organs; (*nph*) Nephrocyten des Thorax; (*o*) Ovar; (*Os*) Ostia; (*Pc*) Pericardialzelle; (*Rg*) Ringdrüse; (*scl*) Scutellum; (*t*) Hoden; (*TT*) Tracheenstamm; (*T1-3*) Thorakalsegment 1 bis 3.

Das Dorsalgefäß entstammt einer bilateral angeordneten Zellreihe von dorsalen mesodermalen Vorläuferzellen, die das Homeobox-Gen *tinman* (*tin*) exprimieren (BODMER, 1993; AZPIAZU und FRASCH, 1993). Durch die induktiven *wingless* (*wg*)- und *decapentaplegic* (*dpp*)-Signale des benachbarten Ektoderms wird die *tinman* (*tin*)-Expression in der dorsalsten Mesodermregion, dem so genannten cardialen Mesoderm, aufrechterhalten (FRASCH, 1995; LAWRENCE et al., 1995; WU et al., 1995; XU et al., 1998; FRASCH, 1999; LOCKWOOD und BODMER, 2002; CRIPPS und OLSON, 2002; siehe Abbildung 1). Aus dieser Domäne gehen die cardialen Vorläuferzellen hervor, in denen die Transkriptionsfaktoren *even-skipped* (*eve*), *ladybird* (*lb*), *seven-up* (*svp*), *odd-skipped* (*odd*) und *tinman* (*tin*) in verschiedenen Kombinationen exprimiert werden (WARD und SKEATH, 2000; JAGLA et al., 2002; HAN et al., 2002). Durch asymmetrische und symmetrische Teilungsprozesse entsteht schließlich die Vielfalt der das Dorsalgefäß bildenden Zelltypen (PARK et al., 1998; WARD und SKEATH, 2000; HALFON et al., 2000; CARMENA et al., 2002; HAN et al., 2002; ALVAREZ et al., 2003; HAN und BODMER, 2003).

Das **adulte Dorsalgefäß** (siehe Abbildung 6B) gleicht dem larvalen Dorsalgefäß, welches die Metamorphose zu großen Teilen überdauert und nur geringen Veränderungen unterliegt (RIZKI, 1978a; CURTIS et al., 1999; MOLINA und CRIPPS, 2001). So passt sich das Dorsalgefäß den Konturen des adulten Abdomens an, verkürzt sich, und auf der Ventralseite des Herzens bilden sich longitudinale Muskelfasern (MILLER, 1950). Der Ostia-tragende Teil des Dorsalgefäßes degeneriert und im imaginalen Gewebe entstehen *de novo* vier Paar Ostia (MOLINA und CRIPPS, 2001) sowie – zwischen dem ersten und zweiten Abdominalsegment – eine Herzkammer (*conical chamber*).

Die larvalen Gonaden setzen sich aus Keimzellen und somatischen Zellen des so genannten **Gonadenmesoderms** zusammen und sind bilateral mit dem Fettkörper des fünften Abdominalsegments assoziiert (SONNENBLICK, 1950; BODENSTEIN, 1950). Das Gonadenmesoderm kann morphologisch bis zur Keimstreif-Verkürzung zurückverfolgt werden, wenn es in Form dreier bilateraler, *eyes absent (eya)*- und *zfh-1*-exprimierender Cluster in den Parasegmenten 10, 11 und 12 in Erscheinung tritt (BROOKMAN et al., 1992; BOYLE und DiNARDO, 1995; BOYLE et al., 1997; BROIHIER et al., 1998). Die Zellen des Gonadenmesoderms arrangieren sich anschließend in Form eines Bandes, assoziieren mit den aus dem Mitteldarm migrierenden Keimzellen (SONNENBLICK, 1941) und wandern in das Parasegment 10. Dort bildet sich aus beiden Zelltypen die reife Gonade, in der die mesodermalen Zellen die Keimzellen unter dem Einfluss der Proteine E-Cadherin und Fear of Intimacy vollständig umhüllen (VAN DOREN et al., 2003; JENKINS et al., 2003). Ein weiteres Gonadenmesoderm-Cluster kann im Parasegment 13 identifiziert werden. Dieses wird als *male specific somatic gonadal precursor* bezeichnet und exprimiert neben *eyes absent (eya)* auch *Sox 100B* (DEFALCO et al., 2003). Wenn sich die Keimzellen und das übrige Gonadenmesoderm vereinigen, wandern diese Zellen in männlichen Embryonen nach anterior und lagern sich posterior an die Hoden an. In weiblichen Embryonen unterliegen diese zusätzlichen Gonadenmesoderm-Zellen unter dem Einfluss des *doublesex (dsx)*-Gens dem programmierten Zelltod (DEFALCO et al., 2003).

Im Rahmen der Metamorphose differenzieren sich die Zellen des Gonadenmesoderms zu verschiedenen imaginalen Hüllgeweben: Während aus den mesodermalen Zellen des Ovars die Epithelialhülle (*epithelial sheath*), die Peritonealhülle (*peritoneal sheath*), die *basal stalks* und die Calyx hervorgehen (MAHOWALD und KAMBYSELLIS, 1980), entwickeln sich die mesodermalen Zellen des Hodens zu Muskel- und Pigmentzellen sowie zu apikalen Zellen (*apical cell of the hub*), terminalen epithelialen Zellen und *cyst cells* der Testis (LINDSLEY und TOKUYASU, 1980; FULLER, 1993).

1.5 Die Einzelzelltransplantationstechnik bei *Drosophila melanogaster*

Transplantiert man enzymatisch oder genetisch markierte Einzelzellen von Spenderembryonen homochron in unmarkierte Empfängerembryonen derselben Spezies, so ist neben der Analyse des Proliferations- und Differenzierungsverhalten dieser Zellen auch die Kartierung von Anlagen möglich (TECHNAU, 1986, 1987; TECHNAU und CAMPOS-ORTEGA, 1986 a/b; BEER et al., 1987; PROKOP und TECHNAU, 1991; MEISE und JANNING, 1993, 1994; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997, 2003; KLAPPER et al., 1998, 2001, 2002). Dabei kann mit Hilfe homotoper Transplantationen das normale Differenzierungsverhalten der transplantierten Zellen untersucht und auf dieser Grundlage ein Anlagenplan erstellt werden, während heterotope Transplantationen Rückschlüsse auf den Determinationszustand der Zellen zum Transplantationszeitpunkt erlauben. Während die Transplantationen enzymatisch markierter Einzelzellen auf ein frühes Gastrulationsstadium beschränkt sind (TECHNAU, 1987), ermöglicht der Einsatz genetisch markierter Einzelzellen Transplantationen ab dem zellulären Blastodermstadium und somit die Analyse der frühen Entwicklungspotenz einzelner Zellen sowie die Untersuchung larvaler und imaginaler Zellschicksale zu einem späteren postembryonalen Entwicklungszeitpunkt (MEISE und JANNING, 1993, 1994; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997, 2003; KLAPPER et al., 1998, 2001, 2002; KLAPPER, 2000).

1.6 Das GAL4-System bei *Drosophila melanogaster*

Das GAL4-System ermöglicht sowohl die selektive Aktivierung klonierter Gene als auch deren ektopische Expression in einem bestimmten räumlich-zeitlichen Muster (BRAND und PERRIMON, 1993; PHELPS und BRAND, 1998) und basiert auf der Interaktion einer Treiber- und einer Effektorlinie. Dabei trägt die Treiberlinie die codierende Region des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4, welche einem starken Promotor unterstellt ist und in einem zell- und gewebespezifischen Muster transkribiert wird. Die Effektorlinie zeichnet sich durch die Integration einer fünffachen GAL4-Bindungsstelle aus, die als *Upstream Activation Sequence* (kurz: *UAS*) bezeichnet wird und gleichzeitig als Promotor eines gekoppelten Ziel-, beziehungsweise Reportergens fungiert. Da die Treiberlinie keine GAL4-Bindungsstellen besitzt und die Effektorlinie keinen *GAL4*-Transkriptionsfaktor bilden kann, bleibt das GAL4-System innerhalb der beiden Linien „stumm“.

Werden durch Kreuzen der beiden Stämme der *GAL4*-Transkriptionsfaktor und die *UAS*-Region in einen gemeinsamen Nucleus gebracht, so induziert die selektive Anheftung des *GAL4*-Proteins an die *UAS*-Region die Expression des daran gekoppelten Zielgens (siehe

Abbildung 7). In den Nachkommen dieser Kreuzung erfolgt die räumliche und zeitliche Expression des Zielgens somit in Übereinstimmung mit dem Expressionsmuster des GAL4-Proteins der Treiberlinie. Um dieses Expressionsmuster kenntlich zu machen, werden so genannte „Reportergene“ als Zielgene eingesetzt. Dabei handelt es sich zum Beispiel um das *lacZ*-Gen aus *E. coli*, welches für die β -Galaktosidase kodiert und dessen ektopische Expression durch eine X-Gal-Färbung oder eine immun-histochemische Färbung nachgewiesen werden kann.

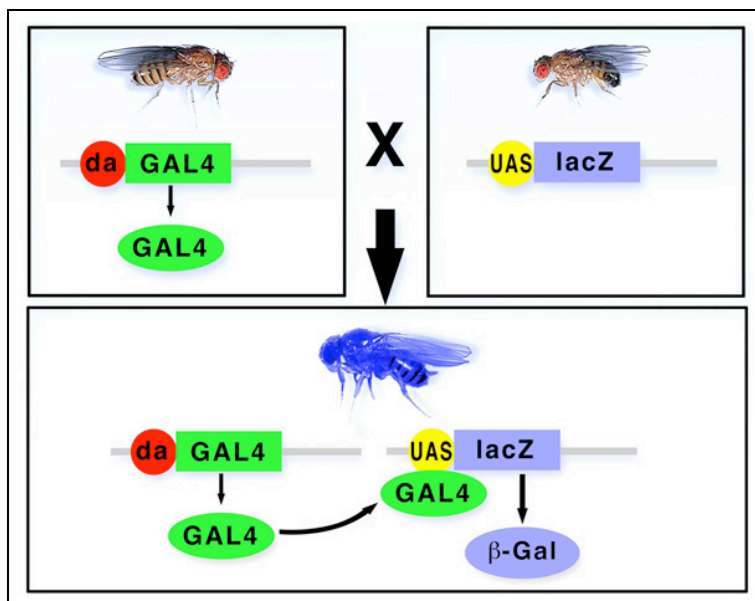


Abbildung 7: Schematische Darstellung des GAL4-Systems.

Werden Treiberlinie (links, mit regulatorischer Domäne des *daughterless*-Gens (= da)) und Effektorlinie (rechts) miteinander gekreuzt, so wird in den Nachkommen (unten) durch die Bindung des GAL4-Proteins die UAS-Region aktiviert und somit die Expression des *lacZ*-Zielgens induziert.

1.7 Das GAL4/UAS-Transplantationssystem

Bei der Kombination des GAL4-System und der Einzelzelltransplantationstechnik werden einzelne Zellen der Treiberlinie in Embryonen der Effektorlinie transplantiert und *vice versa*. Die Empfängerembryonen stellen also genetische Mosaiken dar, welche zum Transplantationszeitpunkt – dem zellulären Blastodermstadium – neben den circa 6000 Zellen der Empfängerlinie auch eine Zelle der Spenderlinie aufweisen. Diese Zellen unterschiedlichen Genotyps proliferieren und differenzieren sich bis zum Untersuchungszeitpunkt, sodass ein Zellklon der Spenderzelle entsteht.

Da die Induktion der Reporterexpression die räumliche Kolo-kalisation des *GAL4*-Transkriptionsfaktors und des *UAS-Reporter*-Konstrukts erfordert, kann sie für mononucleäre Gewebe ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 8A). Gleiches gilt für syncytiale Gewebe, welche nur die Tochterkerne einer cell-lineage aufweisen (homogene Syncytien, siehe Abbildung 8B). Somit findet die Expression des Zielgens ausschließlich in Syncytien statt, in denen sowohl Tochterkerne der Spender- als auch der Empfängerlinie

vorliegen (heterogene Syncytien, siehe Abbildung 8C) (HEUSER, 1999; KLAPPER et al., 2001, 2002).

Um neben der Zellfusion auch das Entwicklungsschicksal des mononucleären Klonanteils untersuchen und somit Aussagen über das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der transplantierten Zellen treffen zu können, muss zusätzlich die cell-lineage markiert werden. Dies geschieht durch die GAL4-induzierte Aktivierung eines weiteren Reportergens in allen Nachkommen der transplantierten Spenderzelle oder durch die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes 2000S RITC-Dextran in junge Spenderembryonen.

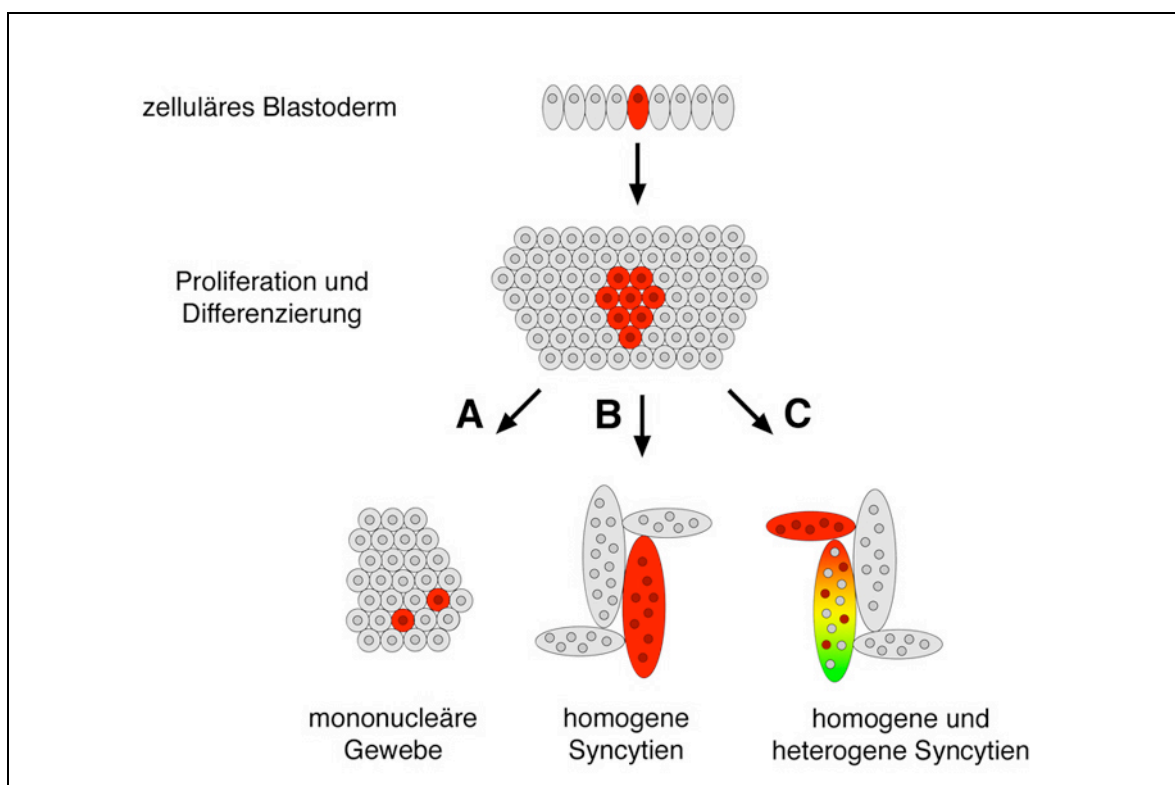


Abbildung 8: Modell zum GAL4/UAS-Transplantationssystem.

In der oberen Skizze ist ein Ausschnitt des zellulären Blastodermstadiums eines Empfängerembryos dargestellt, in dem die transplantierte Einzelzelle rot hervorgehoben ist (cell-lineage-Markierung). Nach der embryonalen Proliferations- und Differenzierungsphase können folgende Gewebetypen unterschieden werden:

- A) mononucleäre Gewebe: Alle Nachkommen der transplantierten Zelle können aufgrund eines intrinsischen Signals (exprimiertes Gen oder injizierter Farbstoff) identifiziert werden. Durch die räumliche Trennung der Spender- und Empfängernuclei kann das *UAS*-Reportergen-Konstrukt nicht aktiviert werden.
- B) homogene Syncytien: siehe Punkt A
- C) heterogene Syncytien: Da Kerne der Spender- und Empfängerlinie in einem gemeinsamen Cytoplasma vorliegen, kann die Expression des Reportergens in diesen Geweben induziert werden (grün markiert). Zusätzlich kann auch der cell-lineage-Anteil in diesen Syncytien detektiert werden (dargestellt durch rot-grünen Farbverlauf).

1.8 Die *FLP-out*-Technik

Die *FLP-out*-Technik nach STRUHL und BASLER (1993) (siehe Abbildung 9) macht sich die von GOLIC und LINDQUIST (1989) beschriebene zielgerichtete Induktion bestimmter Genexpressionen nach Insertion eines *flipase*-Gens in das *Drosophila*-Genom zunutze. Sie basiert auf der Hitzeschock-kontrollierten Expression der *FLP-Rekombinase* und somit der spezifischen Excision einer transkriptionalen Stopsequenz innerhalb der *FLP target sites*. Dieses führt zur Induktion des nachgeschalteten GAL4-Komplexes und so zur Aktivierung eines Reportergens (SMITH et al., 1996).

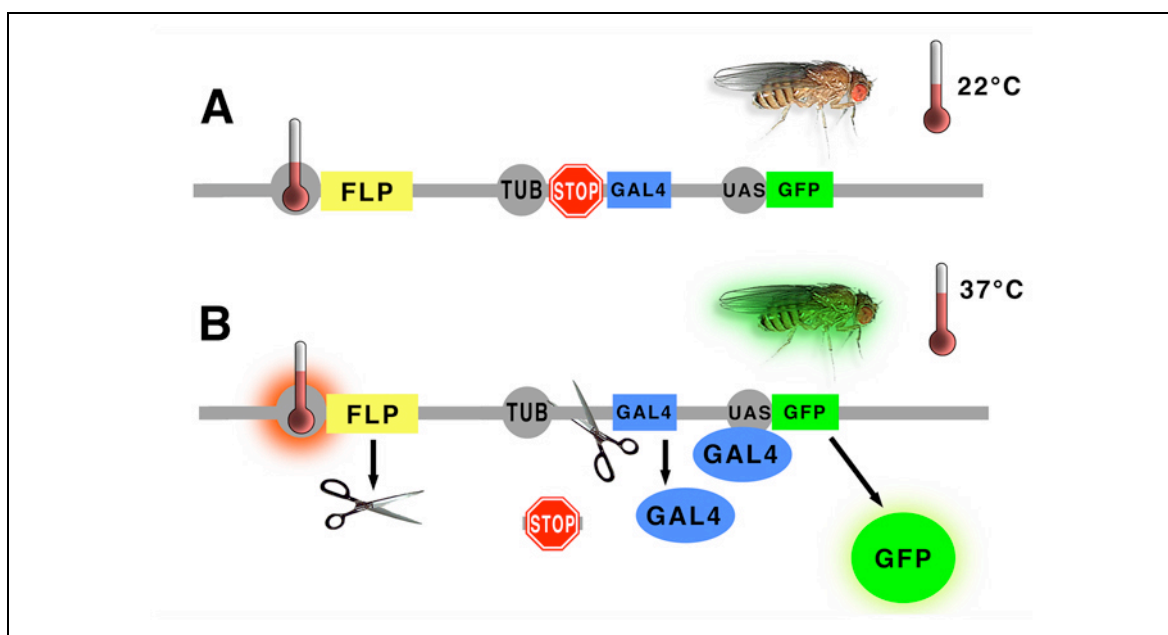


Abbildung 9: Hitzeschock-induzierte Expression des *GFP*-Reportergens.

- A) Bei einer Raumtemperatur von 22°C reprimiert die im Bereich des Tubulinpromotors (*TUB*) vorhandene Stopsequenz (*STOP*) die Expression des nachgeschalteten Transkriptionsaktivators *GAL4* und verhindert somit die Expression des *UAS-GFP*-Konstrukts.
- B) Ein Hitzeschock bei 37°C führt zur Expression des *flipase*-Gens (*FLP*), dessen Genprodukt, die *FLP*-Rekombinase, die Excision der Stopsequenz bewirkt. Der Tubulinpromotor induziert die Expression des *GAL4*-Transkriptionsaktivators, welcher wiederum durch Bindung an die *UAS*-Region die Expression des nachgeschalteten *GFP*-Reportergens aktiviert.

Hitzeschockpromotoren wie *hsp 70* steuern normalerweise die Expression von Genen, die für Schutzproteine bei *Drosophila melanogaster* codieren. Aktiv sind diese Promotoren nur in Stresssituationen, wie einer erhöhten Temperatur. Die durch einen Hitzeschock induzierte Konformationsänderung des Promotors in seine aktive Form kann so für eine zeitlich gesteuerte Expression von Zielgenen genutzt werden. Diese Aktivierung erfolgt zell- und gewebespezifisch in Abhängigkeit von der Intensität des Hitzeschocks.

1.9 Aufgabenstellung der Arbeit

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (HEUSER, 1999) konnte ich bereits zeigen, dass durch die Kombination des GAL4-Systems und der Einzelzelltransplantationstechnik selektiv heterogene Syncytien aus klonal nicht-verwandten Zellen nachgewiesen werden können. Dabei konnte die Wirksamkeit dieser Methode nur indirekt durch den Klonvergleich mit herkömmlichen Transplantationsklonen und die fehlende Markierung mononucleärer Derivate bestätigt werden. Um die Selektivität des Syncytien-Nachweises in jedem einzelnen Transplantationsklon direkt überprüfen und zusätzlich das Entwicklungsschicksal des mononucleären Klonanteils untersuchen zu können, sollte das GAL4/UAS-Transplantationssystem in der vorliegenden Arbeit um die simultane Markierung der cell-lineage erweitert werden.

Mit Hilfe der cell-lineage-Analysen herkömmlicher Einzelzelltransplantationen konnten bereits die Beziehungen verschiedener larvaler und imaginaler Mesodermderivate untersucht und deren Anlagen lokalisiert werden. Da bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit mit *lacZ*-markierten Spenderembryonen gearbeitet wurde, beschränkte sich die Untersuchung imaginaler Mesodermderivate auf den Nachweis der imaginalen Vorläuferzellen im Wanderlarvenstadium (HOLZ et al., 1997; KLAPPER et al., 1998). Erst durch die Etablierung GFP-markierter Spenderembryonen konnten Vorläuferzellen über die Metamorphose hinaus untersucht und Aussagen über ihr Proliferations- und Differenzierungsverhalten getroffen werden (HOLZ et al., 2003).

Die Vorteile der *in vivo*-Markierung sollten auch in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um die Durchmischung imaginaler Myoblasten, die Persistenz larvaler Gewebe sowie die Herkunft des adulten Fettkörpers zu untersuchen. Weiterhin sollte nach weiteren syncytialen Gewebeverbänden im Mesoderm und dem benachbarten Ektoderm gefahndet werden. Aus den Transplantationsdaten sollten außerdem die Anlagengrößen sowie Proliferationsraten verschiedener larvaler und imaginaler Mesodermderivate und deren Determinationszustände, beziehungsweise -zeitpunkte abgeleitet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylnagellack	Jade / Düsseldorf
Agar-Agar, pulverisiert	Carl-Roth GmbH + Co. / Karlsruhe
Agarose	Gibco-BRL / Eggenstein
alkalischer Phosphatase-Puffer	Boehringer / Mannheim
Ampicillin	Appligene / Heidelberg
Dan Klorix	Colgate-Palmolive / Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma / Deisenhofen
Fluoromount-G	Dianova / Hamburg
Ligationspuffer	Boehringer / Mannheim
Maismehl	Horst Küper GmbH / Oberhausen
Nipagin	Nipa-Laboratorien GmbH / Norderstedt
Packband	Tesa / Beiersdorf
Packbandkleber (VARO 45.82-28 Cham, N#3514)	Tesa / Beiersdorf
Raffinade-Zucker	Goldhand GmbH / Düsseldorf
Rhodamin B Isothiocyanat-Dextran (2000S)	Sigma-Aldrich / Taufkirchen
Trockenhefe	Hefe-Reformwerk GmbH / Radolfzell
Voltalef-Fluorocarbonöl (3S und 10S)	Atochem / Pierre-Benite, Frankreich
X-Gal	Diagnostic Chemicals / Oxford, USA

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien liegen in den Qualitäten z.A. oder reinst vor und wurden von den Firmen Merck / Darmstadt oder Serva / Heidelberg bezogen.

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

1%iges Agarose-Gel	Agarose	1 g
mit Ethidiumbromid	1x TAE	100 ml
	Ethidiumbromid-Stammlösung	3 \square l

Zunächst wird die Agarose in kochendem TAE-Puffer gelöst, dann wird unter dem Abzug die Ethidiumbromid-Stammlösung zugesetzt. Mit der noch warmen Lösung werden zuerst die Seiten der Gelkammer abgedichtet. Anschließend wird die Kammer blasenfrei bis zur halben Füllhöhe mit der Agaroselösung befüllt, wobei mit Hilfe eines Kamms die Taschen für das spätere Auftragen der Proben ausgespart werden.

<i>Drosophila</i> -Standardfutter	Agar-Agar, pulverisiert	27 g
	Maismehl	200 g
	Raffinade-Zucker	140 g
	Trockenhefe	50 g
	Nipagin	Messerspitze
	Propionsäure	10 ml
	Hefesuspension (in Leitungswasser gelöste Bäckerhefe)	

Agar, Maismehl, Zucker und Trockenhefe werden in 3 l Wasser gelöst, kurz aufgekocht und mit Nipagin und Propionsäure versetzt. Mit dem daraus resultierenden Futterbrei können bei einer Füllhöhe von circa 1,5 cm anschließend knapp 170 PS-Röhrchen befüllt werden. Nach wenigen Minuten wird dem Futterbrei zusätzlich je ein Tropfen Hefesuspension aufgesetzt. Das Verschließen der Standardfutterröhrchen mit Ceaprenstopfen erfolgt nach einer Abkühlzeit von circa 30 Minuten.

Um Futterschälchen herzustellen, wird der heiße Futterbrei in Petrischalen gefüllt, nach wenigen Minuten mit einem Tropfen Hefesuspension versehen und nach einer Abkühlzeit von circa 20 Minuten zugedeckelt.

E1-Puffer (<i>cell suspension buffer</i>)	Tris	50 mM
	EDTA	10 mM (pH 8,0)
	RNase A	100 µg/ml
E2-Puffer (<i>cell lysis reagent</i>)	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
E3-Puffer (<i>neutralisation buffer</i>)	Kaliumacetat	3,2 M (pH 5,5)

E4-Puffer (<i>equilibration buffer</i>)	NaCl	600 mM
	Natriumacetat	100 mM
	Triton X-100	0,15% (v/v) (pH 5,0)
E5-Puffer (<i>wash buffer</i>)	NaCl	800 mM
	Natriumacetat	100 mM (pH 5,0)
E6-Puffer (<i>elution buffer</i>)	NaCl	1,25 M
	Tris-HCl	100 mM (pH 8,5)
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in 1x TE	
Färbelösung (nach SIMON et al. (1985))	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,157 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,509 g
	NaCl	3,506 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,080 g
	K ₄ [Fe(CN ₆)] · 3H ₂ O	0,524 g
	K ₃ [Fe(CN ₆)]	0,408 g
	Triton X-100	1,2 ml

Dem Phosphatpuffer (aus NaH₂PO₄ · H₂O und Na₂HPO₄ · 2H₂O, in 400 ml aqua bidest. gelöst) werden sämtliche anderen Salze zugesetzt. Anschließend wird diese Lösung mit 1,2 ml Triton versehen und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die Bevorratung erfolgt in 1 ml-Portionen bei -18°C, während der Wochenbedarf bei 4°C aufbewahrt wird.

Faure'sche Lösung (nach FAUR, 1910)	Gummi arabicum, gepulvert	50 g
	Chloralhydrat	50 g
	Glycerin	20 g

Gummi arabicum und 50 ml aqua bidest. werden über Nacht gerührt und am nächsten Tag mit kleinen Portionen des Chloralhydrats versetzt. Nach dessen vollständiger Auflösung wird das Glycerin zugegeben und die fertige Lösung 90 Minuten bei 15.000 xg zentrifugiert. Die Lagerung des Überstands erfolgt bei Raumtemperatur in einem luftdichten Gefäß.

Fixierlösung (0,75%ige gepufferte Glutardialdehydlösung)	KH ₂ PO ₄	1,334 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	7,155 g
	25%iges Glutardialdehyd	15 ml

Zunächst wird ein Phosphatpuffer (0,1 M) angesetzt, indem die beiden Salze in aqua bidest. gelöst werden, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt wird und mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt wird. Nach Zugabe des Glutardialdehyds wird die Fixierlösung bei 4°C gelagert.

Glycerin (50%ig) Glycerin wird mit aqua bidest. 1:1 verdünnt.

Hämolympfersatzlösung (HE)	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,4239 g
	Na ₂ CO ₃	0,2120 g
	NaCl	1,5896 g
	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	2,4469 g
	KCl	0,7009 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,0294 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4,4360 g
	Fructose	2,5000 g
	Maltose	2,0000 g
	Sucrose	0,5000 g
Trehalose	4,0000 g	
Glucose	10,2060 g	

Bei dieser Hämolympfersatzlösung handelt es sich um eine nach SCHÄFERLING (1982) und SCHULTE (1982) vereinfachte Form der von WESSING und EICHELBERG (1978) publizierten Lösung zur Kultivierung von *Drosophila*-Organen. Zunächst werden alle Bestandteile in der oben genannten Reihenfolge in 1000 ml aqua bidest. gelöst, welches zuvor auf 8°C abgekühlt wurde. Der pH-Wert der Lösung wird auf 6,93 und die Osmolarität mit Glucose auf 300 mOsmol/kg eingestellt. Die Lösung wird anschließend in 1 ml-Portionen bei -18°C gelagert.

<i>high salt</i> -Puffer	NaCl	1 M
	Tris-HCl	20 mM (pH 7,5)
	EDTA	1 mM

Injektionslösung	Injektionspuffer (10x)	2,5 μ l
	DNA	10 μ g
	p \square 25.7wc (Helferplasmid)	2,5 μ g

Je nach Konzentration der aufgereinigten DNA werden die einzusetzenden Volumina an DNA und Helferplasmid bestimmt und zusammen mit dem Injektionspuffer in gerade so viel aqua bidest. gelöst, dass das Gesamtvolumen 25 μ l beträgt.

Injektionspuffer (10x)	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	35,6 mg
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	27,6 mg
	KCl	373,0 mg

Zunächst werden Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat in jeweils 100 ml aqua bidest. gelöst. Anschließend werden 36 ml der Dinatriumhydrogenphosphatlösung und 14 ml der Natriumdihydrogenphosphatlösung zusammengegeben und das Kaliumchlorid darin gelöst. Nachdem der pH-Wert auf 7,4 eingestellt wurde, wird mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt.

Klorixlösung (50%ig) Dan Klorix Haushaltsreiniger wird mit aqua bidest. 1:1 verdünnt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	Bacto Trypton (Pepton 140)	10 g
	Bacto Yeast Extrakt	5 g
	NaCl	10 g

Alle Bestandteile werden in 1 l aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit Hilfe von 10 N Natronlauge auf 7,0 reguliert. Um feste Agarnährböden (LB-Platten) herzustellen, wird das fertige LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar versetzt, auf Platten aliquotiert und autoklaviert.

Zur Herstellung von LB-Amp-Platten oder -medium wird der autoklavierten Lösung jeweils 1% (v/v) Ampicillin zugesetzt.

<i>low salt</i> -Puffer	NaCl	0,2 M
	Tris-HCl	20 mM (pH 7,5)
	EDTA	1 mM

Minimalagar (für Agarstreifen)	Agar-Agar, pulverisiert	8,2 g
	Wasser	300 ml

Wasser und Agar-Agar werden vermischt, kurz aufgekocht und blasenfrei in 13 ml-Portionen auf zwölf Petrischälchen verteilt. Nach dem Gelieren werden diese Schälchen sofort zugedeckt und bei 4°C gelagert.

Packbandkleber	Tesa-Packband	1 m
	Heptan	20 ml

Das Packband wird in 2 cm breite Streifen geschnitten und in Heptan gegeben. Nach Schütteln wird die überstehende Lösung mehrere Stunden bei 6.000 xg zentrifugiert und der nunmehr hellbraune, nicht mehr trübe Überstand bei Raumtemperatur gelagert.

Im Verlauf der Untersuchungen wurde unserer Arbeitsgruppe von der Firma Tesa flüssiger Packbandkleber zur Verfügung gestellt. Dieser wurde mit Heptan 1:1 verdünnt und mehrere Wochen luftdicht in einem Schraubgefäß aufbewahrt. Nach Bildung eines Bodensatzes war der Kleberüberstand uneingeschränkt verwendbar.

PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,00 g
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,20 g

Alle Bestandteile werden in aqua bidest. gelöst und der pH-Wert der Lösung mit 1 N Natronlauge auf 7,4 eingestellt. Nachdem mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt wurde, erfolgt die Lagerung bei 4°C.

RITC-Dextran-Lösung (10%ig)	KCl	149 mg
	2000S RITC-Dextran	100 mg

Um eine 0,2 molare Kaliumchloridlösung herzustellen, wird das Kaliumchlorid in 10 ml aqua bidest. gelöst. Anschließend wird das 2000S RITC-Dextran in 1 ml dieser Kaliumchloridlösung gelöst, für 2 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -18°C gelagert.

Sol A	Glucose	50 mM
	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	EDTA	10 mM
Sol B	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (w/v)
Sol C	Kaliumacetat	3 M (pH 4,8)
	Tris-HCl	10 mM (pH 4,8)
Stop- und Auftragspuffer	50x TAE	200 μ l
	Glycerin	300 μ l
	aqua bidest.	500 μ l
	Kleine Spatelspitze Bromphenolblau	
	Kleine Spatelspitze Xylencyanol	
50x TAE-Puffer (Laufpuffer)	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA	18,6 g

Zunächst wird das Tris in 800 ml aqua bidest. gelöst, dann der Eisessig zugegeben und der pH-Wert der Lösung auf 7,7 eingestellt. Nach Zugabe des EDTA wird mit aqua bidest. auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt. Zu Gebrauchszwecken wird 1x TAE-Puffer verwendet.

TE	Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
	EDTA	1 mM
Tris-HCl	1 M Trisbase; mit 2 N HCl wird der geforderte pH-Wert eingestellt.	
X-Gal (8%ig)	X-Gal	80 mg
	Dimethylformamid	1 ml

Das X-Gal wird unter dem Abzug in Dimethylformamid gelöst und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.1.3 Enzyme und Kits

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer / Mannheim
GFX [®] PCR, DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
Jetstar Plasmid MIDI Kit 50	GENOMED / Bad Oeynhausen
Längenmarker (MassRuler™ DNA Ladder Mix, 10 kb – 80 bp)	MBI Fermentas / St. Leon-Rot
Lambda-Standard <i>EcoRI/HindIII</i> (21 kb – 125 bp)	Boehringer / Mannheim
Restriktionsendonucleasen (<i>SmaI</i> und <i>XbaI</i>)	Boehringer / Mannheim
RNase A	Boehringer / Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer / Mannheim

2.1.4 Verwendete Fliegenlinien

In der Tabelle 1 sind alle Linien aufgeführt, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Die Auflistung erfolgte nach Verwendungszweck in alphabetischer, beziehungsweise numerischer Reihenfolge. Die Bezeichnung, unter der die Linien im Weiteren geführt werden, ist kursiv hervorgehoben. Mit dem Kürzel „BL“ sind alle Stämme versehen, welche aus dem *Bloomington Drosophila Stock Center* in Bloomington / Indiana, USA bezogen wurden. Die Beschreibung der Genotypen folgt der Nomenklatur nach LINDSLEY und ZIMM (1992).

Tabelle 1: Die verwendeten Fliegenlinien

Bezeichnung (Synonym)	Genotyp	Referenz / Herkunft
<i>GAL4</i>-Treiberlinien		
2702 (5053A)	w [*] ; P{w ⁺ m ^W .hs=Gaw.B}5053A/TM6B,Tb+	KLAPPER, 2000 / Javier Lopez; BL
2721	w [*] ; P{w ⁺ m ^W .hs=Gaw.B}5015	Javier Lopez; BL
3041 (<i>ap-GAL4</i>)	y w; P{w ⁺ m ^W .hs=Gaw.B}ap ^{md544} /CyO	Gines Morata; BL
3736	w1118; P{w ⁺ m ^W .hs=Gaw.B}c338/ T(2;3)apXa, P{GawB}c338	Lynn Manseau; BL
5940 (<i>GAL4-UAS</i>)	P{w ⁺ m ^C =UAS-Gal4.H}24, y1 w1118; P{UAS- Gal4.H}12B; P{UAS-Gal4.H}3A	Hugo Bellen; BL
<i>GAL4</i> ^{daG32} (<i>daGAL4</i>)	w [*] ; P{w ⁺ m ^W .hs=GAL4-da.G32}UH1	WODARZ et al., 1995 / Elisabeth Knust
<i>rP298-GAL4</i>	w [*] ; P{w ⁺ m ^W .hs}GAL4	MENON und CHIA, 2001 / Renate Renkawitz-Pohl

UAS-Effektorlinien		
14-5* (<i>UAS-DsRed</i>)	w1118; P{w[+]; UAS-DsRed}	Sandra Heuser
1521 (<i>UAS-GFP</i>)	w*; P{w ^{+mC} =UAS-GFP.S65T}T2	Corey Goodman; BL
1776 (<i>UAS-lacZ</i>)	w*; P{w ^{+mC} =UAS-lacZ.B}Bg4-1-2	BRAND und PERRIMON, 1994/Norbert Perrimon; BL
Vierfach-Balancer-Linie		
<i>CSTM</i>	w; CyO / Sp; TM2 Ubx / MKRS Sb	Laborstamm Janning
Linie für Mikroinjektionen		
w ⁸ (1118)	w1118	Christian Klämbt
heat-shock-Linie		
<i>B</i>	w hs flp; Tub > 64 > GAL4 UAS GFP / TM3	Jean-Paul Vincent
Linien zur Markierung diverser Gewebe		
5839 (<i>MHC-lacZ</i>)	P{Mhc-lacZ.H}76-25-Y	BROADIE und BATE, 1991 / Eric Fyrberg; BL
d42 (<i>twi-lacZ</i>)	P{w[+], twi/lacZ}	THISSE et al., 1991 / Rolf Reuter
<i>MHC</i> □ <i>GFP</i>	MHC-tauGFP-Transgen auf dem X-Chromosom	CHEN und OLSON, 2001 / Renate Renkawitz-Pohl
<i>P</i> (<i>btn 1.85-lacZ</i>)	w1118; P (btn 1.85-lacZ)	CHIANG et al., 1994 / Gerd Technau
Linien zur Markierung aller Gewebe		
14-5* daGAL4 (<i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>)	w*; P{w[+]; UAS-DsRed}; P{w ^{+mW.hs} =GAL4-da.G32}UH1	Laborkreuzung 14-5* x <i>daGAL4</i>
1521 daGAL4 (<i>UAS-GFP</i> ; <i>daGAL4</i>)	w*; P{w ^{+mC} =UAS-GFP.S65T}T2; P{w ^{+mW.hs} =GAL4-da.G32}UH1	Laborkreuzung 1521 x <i>daGAL4</i>
<i>UAS GAL4</i> ; <i>UAS DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>	P{w ^{+mC} =UAS-Gal4.H}24, y1 w1118; P{w[+]; UAS-DsRed}; P{w ^{+mW.hs} =GAL4-da.G32}UH1	Laborkreuzung (14-5* daGAL4 x 5940)
UAS-DsRed-Vergleichslinien		
6280	P{w ^{+mC} =UAS-AUG-DsRed}Ea, w*; P{UAS-AUG-DsRed}Eb; P{UAS-AUG-DsRed}Ec	Junko Kasuya und Linda Iverson; BL
6281	w*; P{w ^{+mC} =UAS-AUG-DsRed}B/CyO, P{ry+t7.2=sevRas1.V12}FK1	Junko Kasuya und Linda Iverson; BL
6282	w*; P{w ^{+mC} =UAS-AUG-DsRed}A	Junko Kasuya und Linda Iverson; BL
<i>UAS-RFP 18-1-N7</i>	w : Sp/SM1 : pUASp-RFP 18-1-N7/TM6 SbTb	Vladislav Verkhusha
<i>UAS-RFP 18-1-Sr3</i>	w : Sp/SM1 : pUASp-RFP 18-1-Sr3/TM6 SbTb	Vladislav Verkhusha

Zusätzlich sind alle im Rahmen dieser Arbeit generierten *UAS-DsRed*-Insertionslinien in der Tabelle 2 benannt. Linien, welche nach Kreuzung mit der Linie *daGAL4* ein identisches Expressionsmuster zeigten, deren Augenfarbe identisch war und deren P-Element-Insertionsort auf dem gleichen Chromosom lokalisiert ist, werden als Geschwisterlinien bezeichnet und in der Tabelle 2 jeweils als Gruppe zusammengefasst. Da sie vermutlich

aus der gleichen transgenen Keimzelle hervorgegangen sind, sind diese Geschwisterlinien wahrscheinlich genetisch identisch. Die drei Linien, deren Nachkommen nach der Kreuzung mit der *daGAL4*-Treiberlinie ubiquitär *DsRed* exprimieren, sind grau unterlegt.

Tabelle 2: Die etablierten *UAS-DsRed*-Linien

Linie	Genotyp	Insertionschromosom	<i>DsRed</i> -Expression
14-2*	w1118 P{w[+]; UAS-DsRed}	X-Chromosom	partiell
14-9*			
14-12*			
39-1*	w1118 P{w[+]; UAS-DsRed}	X-Chromosom	partiell
39-4*			
39-2*	w1118 P{w[+]; UAS-DsRed}	X-Chromosom	partiell
39-3*			
39-7*			
39-9*			
39-10*			
14-4*	w1118; P{w[+]; UAS-DsRed}	2. Chromosom	ubiquitär
14-5*			
14-8*			
52-3*	w1118; P{w[+]; UAS-DsRed}	2. Chromosom	partiell
14-1*	w1118; P{w[+]; UAS-DsRed}	3. Chromosom	partiell
14-6*			
14-10*			
14-11*			
14-13*			

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

E. coli-Bakterienstamm

K-12 DH 5 α

Life Technologies / Eggenstein

Plasmide

p \square 25.7wc

KARESS und RUBIN, 1984

pDsRed (#6923-1)

Clontech / Heidelberg

pUAST

BRAND und PERRIMON, 1993

2.1.6 Geräte

2.1.6.1 Optische Hilfsgeräte

Binokular (Leitz / Wetzlar)

Inverses Fluoreszenzmikroskop (Modell CK40; Olympus Optical GmbH / Hamburg):

Camera Control Unit (Modell MC-3255)	AVT Horn / Aalen
3 CCD Color Videokamera (Modell MC-3255P)	Sony Europa GmbH / Köln
Digital Still Recorder (Modell DKR-700P)	Sony Europa GmbH / Köln
Filter: FITC (Modell HQ-FITC (F41-001))	AHF Analysentechnik / Tübingen
DsRed (Modell XF137)	Omega Optical Inc. / Brattleboro, USA
EGFP (Modell HQ-EGFP (F41-017))	AHF Analysentechnik / Tübingen
Minidisc-Player (tragbar, Modell MHD-10)	Sony Europa GmbH / Köln
Objektive: SPlan4PL (0.13; 160/-)	Olympus / Hamburg
DPlan 10 (0.25; 160/0.17)	Olympus / Hamburg
NPL FLUORTAR (16/0.45 ICT; 160/0.17)	Leitz / Wetzlar
DPlan 40 (0.65; 160/0.17)	Olympus / Hamburg
Quecksilberdampflampe (Modell U-ULS100HG)	Olympus / Hamburg

Konfokales Mikroskop (Modell TCS NT; Leica Microsystems / Heidelberg):

Konventionelles Mikroskop (Modell DM RXE)	Leica / Heidelberg
Laser: Argon (488 nm)	Leica / Heidelberg
Krypton (568 nm)	Leica / Heidelberg
Objektive: PL FLUOTAR 10x/0.30	Leica / Heidelberg
HC PL APO 20x/0.70 IMM CORR	Leica / Heidelberg
PL APO 40x/1.25-0.75 OIL	Leica / Heidelberg
Quecksilberdampflampe (HBO 50W/AC)	Leica / Heidelberg

Die Speicherung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe der Leica Powerscan Software auf einem Kontrollcomputer (Windows NT PC).

Transplantations-Stereomikroskop (Modell Axioskop; Zeiss / Oberkochen):

Camera Control Unit (Modell MC-3215/PI)	AVT Horn / Aalen
3 CCD Color Videokamera (Modell MC-3215/PI)	Sony Europa GmbH / Köln
Objektive: Plan-NEOFLUAR 10x/0.30	Zeiss / Oberkochen
Plan-NEOFLUAR 20x/0.50	Zeiss / Oberkochen
Optovar	Zeiss / Oberkochen

Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50W	Zeiss / Oberkochen
Simplified Time Base Corrector (MPU-F100P)	Sony Europa GmbH / Köln
Standard-Rhodamin-Filtersatz Nr. 14	Zeiss / Oberkochen
Zeichenarm	Zeiss / Oberkochen

Die Speicherung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe des Programms Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc. / San Jose, USA) auf einem Power-Macintosh 9600/300 (Apple Computer GmbH / Feldkirchen).

2.1.6.2 Großgeräte

Kaltlichtleuchte (Modell KL1500)	Schott / Mainz
Kapillarschleifgerät (Typ 462)	Bachofer GmbH / Reutlingen
Kryobad (Modell KH-3)	Biometra / Göttingen
Kühlzentrifuge (Megafuge R 1.0)	Heraeus Christ / Hanau
Mikromanipulator (Modell E)	Leitz / Wetzlar
Nadelziehgerät (Modell PN-3)	Narishige / Tokyo, Japan
Photometer (Ultraspec 3000)	Pharmacia / Freiburg
Reaktionsgefäßschüttler (Reax 2000)	Heidolph / Schwabach
Schüttler (Modell WT-12)	Biometra / Göttingen
Streckbad (Modell 1052)	GFL / Burgwedel
Tischzentrifuge (Modell Biofuge A)	Heraeus Christ / Hanau
Thermoblock (Driblock DB.2A)	Techne / Burkhardtsdorf
Transilluminator (Modell TI 1)	Biometra / Göttingen

2.1.7 Hilfsmittel

Augenschere (Modell H-4240)	Heiss / Tuttlingen
Ceaprenstopfen (36,0 mm)	Greiner Bio-One / Frickenhausen
Edelstahl-Feindrahtgewebe (W 0,08 / D 0,05 mm)	Haver & Boecker / Oelde
Elutip-d-Säulen	Schleicher und Schüll / Dassel
Einmal-Mikropipette (10 μ l)	Brand / Hamburg
Glaskapillaren (Typ GC 100-10)	Clark Electromedical Instruments / Pangbourne, USA
Petrischalen mit Nocken (60,0 / 15 mm)	Greiner Bio-One / Frickenhausen
Pinzette (Modell Dumont Biologie 5)	Flume Technik / Essen
PS-Röhrchen (68 ml)	Greiner Bio-One / Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Plastibrand / Wertheim

2.2 Die *Drosophila melanogaster*-Zucht

2.2.1 Aufzucht und Haltung der Fliegen

Die Fliegen wurden in mit Ceaprenstopfen verschlossenen Kunststoffröhrchen (PS-Röhrchen; Höhe: 8 cm, Ø 3,4 cm) bei Raumtemperatur auf Standardfutter gehalten. Eine genaue Beschreibung der Zuchtmethode findet sich bei HARBECKE (1985).

2.2.2 Die Gewinnung von Ablagen

Zur Gewinnung von Ablagen wurden mindestens drei Tage alte Fliegen zu etwa 150 Paaren in spezielle Ablagegefäße („Glocken“) mit einer Höhe von 10 cm und einem Durchmesser von 5 cm überführt und für circa zwei Wochen bei 18°C gehalten. Eine genaue Beschreibung der Ablagegefäße findet sich bei WERTH (1984) und HARBECKE (1985).

Der eigentlichen Eiablage ging eine einstündige Vorablage auf einem frischen Futterschälchen mit Standardfutter bei 25°C voraus. Dieses diente dem Ablegen zurückgehaltener Eier, so dass die Embryonen in der späteren Eiablage ein annähernd einheitliches Entwicklungsstadium aufweisen.

Zwecks Gewinnung von Embryonen eines bestimmten Alters wurde das Futterschälchen erneut gegen ein frisches Schälchen ausgetauscht, dem zur Stimulation der Eiablage ein mit 45%iger Essigsäure getränktes Stück Filterpapier aufgelegt war. Der erneute Wechsel des Futterschälchens richtete sich nach dem gewünschten Alter der abzusammelnden Embryonen: So erfolgte der Wechsel für die Injektionsexperimente bereits nach einer halben Stunde bei 25°C (siehe Kapitel 2.3.2.1), während die Ablagen für die Transplantationsexperimente zwei Stunden bei 25°C (siehe Kapitel 2.4.4) und die für die Hitzeschock-Experimente vier Stunden bei 18 oder 25°C (siehe Kapitel 2.6.1) andauerten.

2.3 Die Etablierung transgener *UAS-DsRed*-Linien

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (HEUSER, 1999) konnte ich bereits zeigen, dass durch die Kombination der Einzelzelltransplantationstechnik und des GAL4-Systems selektiv syncytiale Zellverbände unterschiedlicher klonaler Herkunft detektiert werden können. Um neben der Zellfusion auch das Entwicklungsschicksal des mononucleären Klonanteils

untersuchen und somit Aussagen über das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der transplantierten Zelle treffen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die cell-lineage markiert. Für diesen Zweck wurde ebenfalls eine genetische *in vivo*-Markierung gewählt, um präparationsbedingte Artefakte möglichst auszuschließen und die Transplantationsklone über die gesamte Entwicklung verfolgen zu können.

Da zu Beginn dieser Dissertation für *Drosophila melanogaster* nur ein einziger *in vivo*-Marker etabliert war, nämlich das *Green Fluorescent Protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*, musste zunächst ein weiterer Fluoreszenzmarker in das *Drosophila*-Genom eingeschleust werden. Die Wahl fiel auf das *Red Fluorescent Protein* (DsRed) aus der Seeanemone *Discosoma sp.*, da sich dessen Fluoreszenzspektrum deutlich von dem des GFPs unterscheidet und laut Herstellerangaben (Clontech Laboratories GmbH / Heidelberg, Oktober 1999) beide Gene koexprimiert werden können. Um das *DsRed*-Gen für die angestrebten Transplantationen nutzen zu können, musste es erst unter die Kontrolle eines *UAS*-Promotors gebracht (siehe Kapitel 2.3.1) und anschließend in das *Drosophila*-Genom eingeschleust werden (siehe Kapitel 2.3.2). Sämtliche molekularbiologischen Arbeitsschritte wurden freundlicherweise von Dr. Anne Holz betreut und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl an der Philipps-Universität in Marburg durchgeführt.

2.3.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1.1 Restriktionsverdau der Plasmide pDsRed und pUAST

Um das *DsRed*-Gen aus dem pDsRed-Plasmid zu lösen, den pUAST-Vektor zu linearisieren und komplementäre, überstehende Schnittenden (*sticky ends*) am DsRed-Insert und dem Vektor zu erzeugen, wurden beide Plasmide mit der Restriktionsendonuclease *XbaI* geschnitten.

2.3.1.1.1 Restriktionsverdau mit *XbaI*

Zunächst wurden für beide Plasmide je 30 μ l Restriktionsansatz hergestellt, indem 3 μ l Boehringer-Puffer A (10x), 1 μ l *XbaI* und 15 μ l des pDsRed-, beziehungsweise 5 μ l des pUAST-Vektors zusammenpipettiert wurden und mit aqua bidest. auf das Gesamtvolumen aufgefüllt wurde. Die beiden Ansätze wurden für 105 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert und zwecks Abbruchs des Verdaus über Nacht bei 4°C gelagert.

2.3.1.1.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung

(nach SAMBROOK et al., 1989)

Die erfolgreiche Excision des DsRed-Inserts sowie die Linearisierung des pUAST-Vektors wurden im nächsten Schritt mit Hilfe der DNA-Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde ein 1%iges ethidiumbromidhaltiges Agarose-Gel der Größe 8 x 10 cm hergestellt, welches mit 1x TAE (Laufpuffer) überschichtet wurde. Vor dem Beladen wurden die Proben mit zehn Volumenprozent Stop- und Auftragspuffer versetzt, um ein Ausspülen der Proben aus den Geltaschen zu verhindern und um die Lauffront im Gel direkt verfolgen zu können. Die Auftrennung der DNA-Fragmente sowie des parallel aufgetragenen Längenmarkers (MassRuler™ DNA Ladder Mix) erfolgte für 60 Minuten bei 50 V. Anschließend wurde das Gel im UV-Durchlicht bei 302 nm photographiert.

2.3.1.2 Vorbereitung von Insert (DsRed) und Vektor (pUAST)

Damit das DsRed-Fragment in den linearisierten pUAST-Vektor eingebracht werden konnte, mussten zunächst beide DNAs aus dem Gel zurückgewonnen werden. Weiterhin musste der pUAST-Vektor dephosphoryliert werden, um seine Religation zu verhindern.

2.3.1.2.1 DNA-Isolation aus dem Agarose-Gel mittels GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit

Um das DsRed-Insert (0,72 kb-Fragment) und den linearisierten pUAST-Vektor (9,05 kb) aus dem Agarose-Gel aufzureinigen zu können, wurden die gewünschten Fragmente unter UV-Licht präzise aus dem Gel herausgeschnitten, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und gewogen. Anschließend wurden die Gelstücke in 100 µl *Capture buffer* gelöst, wobei die Reaktionsgefäße mehrmals geschüttelt und für fünf Minuten bei 60°C inkubiert wurden. Die DNA-Lösungen wurden dann auf getrennte Säulen aufgetragen und für eine Minute inkubiert. Nachdem die Säulen für 30 Sekunden bei 15.000 xg zentrifugiert worden waren, konnte der überstehende Puffer abgegossen werden. Nach dem Zusatz von jeweils 500 µl *Wash buffer* wurden die Säulen erneut für 30 Sekunden zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Säulen für zwei Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Säulen in frische Reaktionsgefäße überführt, jeweils 17 µl *Elution buffer* zugesetzt, für eine Minute inkubiert und für eine Minute bei 15.000 xg zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA befand sich nun in dem Überstand und konnte bei 4°C gelagert werden.

2.3.1.2.2 Dephosphorylierung des Vektors

Damit der geschnittene pUAST-Vektor nicht religierte, mussten die 5'-Phosphatenden durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase abgespalten werden. Dazu wurden 17 μ l des geschnittenen und aufgereinigten Vektors, 1 μ l CIP (1 Unit/ μ l) und 2 μ l alkalischer Phosphatase-Puffer zusammengegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die erneute Zugabe von 1 μ l CIP und eine Inkubation für 45 Minuten bei 50°C. Die Inaktivierung des Enzyms wurde durch eine zehnminütige Temperaturerhöhung auf 65°C erreicht.

2.3.1.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Konzentrationsbestimmung

(nach SAMBROOK et al., 1989)

Um die Konzentration der aufgereinigten DsRed- und pUAST-DNA feststellen zu können, wurde erneut ein 1%iges Agarose-Gel beladen (Anleitung siehe Kapitel 2.3.1.1.1). Als Konzentrationsmarker wurde diesmal ein Lambda-Standard (*EcoRI* / *HindIII*) aufgetragen.

2.3.1.3 Ligation

Bei der Ligrationsreaktion mit der T4-DNA-Ligase werden 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden unter Hydrolyse von ATP zu einer kovalenten Bindung verknüpft. Daher wurden in mehreren 20 μ l-Ansätzen jeweils 5 pmol des dephosphorylierten pUAST-Vektors mit dem drei- bis fünffachen des Passagierfragments (DsRed-Insert) versetzt, 2 μ l Ligationpuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase zugegeben und mit aqua bidest. auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

2.3.1.4 Amplifikation der Ligationsansätze (Mini-Kulturen) und Testverdaus

Nun wurde getestet, ob das DsRed-Insert in den linearisierten pUAST-Vektor eingebaut wurde und ob es die korrekte Einbaurichtung besaß. Dazu wurden zunächst die Ligationsansätze in *E. coli* amplifiziert und auf Ampicillin-resistente Kolonien gescreent, welche ihre Resistenz einem entsprechenden Gen auf dem pUAST-Vektor verdanken. Um zwischen religierten Vektoren, miteinander fusionierten Vektoren und der Insertion des DsRed-Fragments differenzieren zu können, wurden 20 verschiedene Ampicillin-resistente Kolonien amplifiziert. Nach Aufreinigung ihrer DNA wurde diese mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen verdaut, um über die Fragmentgrößen auf eine Integration des DsRed-Inserts und dessen räumliche Orientierung rückschließen zu können.

2.3.1.4.1 Transformation von dauerkompetenten *E. coli*-Zellen

(nach SAMBROOK et al., 1989)

Zu Beginn wurden pro Ligationsansatz 200 μ l dauerkompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe der Ligationsansätze (jeweils 20 μ l) wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie einem neunzigsekündigen Hitzeschock bei 42 $^{\circ}$ C ausgesetzt wurden. Es folgte eine fünfminütige Abkühlung auf Eis. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml LB-Medium zugegeben und unter Schütteln für 45 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit Hilfe eines abgeflämmten Drigalski-Spatels steril auf verschiedenen LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert.

2.3.1.4.2 Amplifikation von Einzelkolonien

20 Ampicillin-resistente Kolonien wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von den LB-Amp-Platten in jeweils 3 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt und über Nacht schüttelnd bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert.

2.3.1.4.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (alkalische Lyse)

(nach BIRNBOIM und DOLLY, 1979)

Von allen Ansätzen wurde je 1 ml der Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 15.000 xg zentrifugiert. Die Weiterbehandlung aller Ansätze geschah parallel nach folgendem Schema: Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde der Bakterienniederschlag in 100 μ l Sol A resuspendiert und mit 200 μ l Sol B überschichtet. Nach fünfminütigem Schütteln wurde der Suspension 150 μ l Sol C zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und für zehn Minuten bei 4 $^{\circ}$ C und 15.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit 400 μ l Isopropanol vermischt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls für zehn Minuten bei 4 $^{\circ}$ C und 15.000 xg. Abschließend wurde die gefällte DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, das Präzipitat getrocknet und in 50 μ l aqua bidest. resuspendiert. Zum Abbau der mitisolierten RNA wurden 20 μ l RNase A zugesetzt.

2.3.1.4.4 Restriktionsverdau mit *Xba*I

Um zwischen einer Religation des pUAST-Vektors und einem tatsächlichen Einbau des DsRed-Inserts zu unterscheiden, wurden alle zuvor aufgereinigten, Ampicillin-resistenten Ligationsansätze nach der Anleitung in Kapitel 2.3.1.1.1 mit der Restriktionsendonuclease *Xba*I geschnitten.

2.3.1.4.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung

Die Größe der entstandenen Fragmente wurde mit Hilfe der DNA-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Anleitung siehe Kapitel 2.3.1.1.2). Konnten in den Proben Fragmente mit einer Größe von 0,72 kb (entspricht der Größe des DsRed-Inserts) identifiziert werden, so war in diesen Fällen die Ligation erfolgreich verlaufen.

2.3.1.4.6 Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Sma*I

Im nächsten Schritt wurde die Einbaurichtung des DsRed-Inserts getestet. Dazu wurden die sechs positiven Ligationsansätze nach der Anleitung in Kapitel 2.3.1.1.1 mit den Restriktionsendonucleasen *Xba*I und *Sma*I verdaut.

2.3.1.4.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung

Erneut wurde die Größe der entstandenen Fragmente mit Hilfe der DNA-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Anleitung siehe Kapitel 2.3.1.1.2). Wurde das DsRed-Insert im Leseraster (also in 5' → 3'-Richtung) eingebaut, so konnten ein 6 kb- (linearisierter pUAST-Vektor ohne Insert) und ein 3,75 kb-Fragment (DsRed-Insert und Teile des *white*-Locus) beobachtet werden. Dies war in einem Ansatz der Fall.

2.3.1.5 Amplifikation und Aufreinigung des positiven Ligationsansatzes

Um das DsRed/pUAST-Plasmid für die geplanten DNA-Injektionsexperimente einsetzen zu können, wurde der positive Ligationansatz mit korrekter Einbaurichtung zunächst in *E. coli* amplifiziert. Nach der Präparation der Plasmid-DNA musste diese in mehreren Schritten aufgereinigt werden. Mit der abschließenden Konzentrationsbestimmung sollte das einzusetzende Volumen für die Injektionslösung ermittelt werden.

2.3.1.5.1 Transformation von dauerkompetenten *E. coli*-Zellen (Schüttelkultur)

Damit Plasmid-DNA im präparativen Maßstab isoliert werden konnte, wurden die restlichen 2 ml der mit dem positiven Ligationsansatz transformierten Bakteriensuspension (siehe Kapitel 2.3.1.4.2) in 50 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert.

2.3.1.5.2 Präparative Plasmidisolierung mittels Jetstar Plasmid Midi Kit 50

Zunächst wurden 40 ml der *E. coli*-Flüssigkultur in ein Zentrifugenschraubgefäß überführt und für zehn Minuten bei 4.000 xg zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde der Bakterienniederschlag in 4 ml E1-Puffer (*cell suspension buffer*) resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml E2-Puffer (*cell lysis reagent*) zugesetzt und für fünf Minuten geschüttelt. Danach erfolgte die Neutralisierungsreaktion, bei welcher die DNA-Lösung mit 4 ml E3-Puffer (*neutralisation buffer*) versetzt, vorsichtig geschüttelt und für zwanzig Minuten bei 4°C und 4.000 xg zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dann vorsichtig auf eine zuvor mit 10 ml E4-Puffer (*equilibration buffer*) äquilibrierte Säule gegeben. Nach dem Durchlauf wurde die Säule zweimal mit je 10 ml E5-Puffer (*wash buffer*) gewaschen. Die an die Säule gebundene DNA wurde durch die Zugabe von 5 ml E6-Puffer (*elution buffer*) gelöst und in einem frischen Zentrifugen-Schraubgefäß aufgefangen.

2.3.1.5.3 DNA-Fällung mit Isopropanol (nach SAMBROOK et al., 1989)

Die DNA-Lösung wurde mit 3,5 ml Isopropanol und 0,5 ml Natriumacetat versetzt und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung auf vier 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und für drei Stunden bei 4°C und 15.000 xg zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden jeweils 1 ml 70%iges Ethanol zugesetzt, geschüttelt und erneut für fünf Minuten bei 15.000 xg zentrifugiert. Auf die Wiederholung dieses Schrittes folgte eine sechsminütige Behandlung der Proben bei 15.000 xg in einer Vakuumzentrifuge. Anschließend wurden die DNA-Pellets in jeweils 25 µl aqua bidest. resuspendiert und für 20 Minuten vorsichtig geschüttelt.

2.3.1.5.4 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

(nach SAMBROOK et al., 1989)

Für die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung macht man sich zunutze, dass DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen. Wird bei diesem Wert in Quarz-

küvetten die Extinktion von DNA-Lösungen in einer 1:1000-Verdünnung gemessen, so kann durch den Abgleich mit einem zuvor gemessenen Nullwert (1 ml aqua bidest.) die Konzentration ermittelt werden.

2.3.1.5.5 DNA-Aufreinigung über Elutip-d-Säulen

Durch die Verwendung der Elutip-d-Säulen wurde in Verbindung mit dem *high salt*- und *low salt*-Puffer der DsRed/pUAST-Vektor so weit von Kontaminationen befreit, dass er direkt für die DNA-Mikroinjektionen eingesetzt werden konnte (siehe Kapitel 2.3.2.2). Dazu wurde zunächst eine Elutip-d-Säule äquilibriert, indem erst 2 ml des *high salt*-Puffers und anschließend 5 ml des *low salt*-Puffers unter Verwendung einer Spritze durch die Säule gepresst wurden. Dann wurde eine DNA-Lösung aus 30 µg DNA in 1 ml *low salt*-Puffer angesetzt und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurden weitere 6 ml *low salt* Puffer auf die Säule aufgetragen und die Lösung langsam mit Hilfe einer Spritze durch die Säule gedrückt. Die Säule wurde dann noch zweimal mit je 5 ml *low salt*-Puffer gewaschen, bevor die DNA mit 0,4 ml *high salt*-Puffer von der Säule eluiert wurde.

2.3.1.5.6 DNA-Fällung mit Ethanol

(nach CROUSE und AMORESE, 1987; AUSUBEL et al., 1993)

Die DNA-Lösung wurde mit 40 µl Natriumacetat (3 mol/l, pH 4) und 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt, gut geschüttelt und für zehn Minuten bei -80°C inkubiert. Danach wurde die Lösung für 30 Minuten bei 4°C und 15.000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und für 15 Minuten bei 4°C und 15.000 xg zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde die sedimentierte DNA für 15 Minuten bei 37°C in einem Heizblock getrocknet und anschließend in 11 µl aqua bidest. resuspendiert.

2.3.1.5.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration des aufgereinigten DsRed/pUAST-Konstrukts feststellen zu können, wurde 1 µl der aufgereinigten DNA in einer 1:100-Verdünnung auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen (Anleitung siehe Kapitel 2.3.1.2.3).

2.3.2 Keimbahntransformation (nach RUBIN und SPRADLING, 1982)

2.3.2.1 Die Vorbereitung der Embryonen

Es wurden mehrere halbstündige Ablagen mit der w^8 -Injektionslinie durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2) und die abgelegten Embryonen mit der stumpfen Seite eines Skalpells abgesammelt. Anschließend wurden die Embryonen chemisch entchorionisiert (abgewandelt nach ROBERTS, 1986), wobei die mit der stumpfen Seite einer Skalpellklinge abgesammelten Embryonen in ein Stahldrahtnetzchen übertragen wurden, welches sich in einem mit PBS gefüllten Blockschälchen befand. Nach dem Waschen mit PBS zur Entfernung von Futter- und Heferesten erfolgte unter Binokularkontrolle die Entchorionisierung der Embryonen in 50%iger Klorix-Lösung für etwa 90 Sekunden. Hiernach wurden die Embryonen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Streifens Edelstahl-Feindrahtgewebe und einer Pinzette auf einen Streifen Minimalagar überführt, welcher das Austrocknen der nunmehr ungeschützten Embryonen verhinderte und bei der Anordnung der Embryonen als Unterlage diente. Die Embryonen wurden mit einer stumpfen Präpariernadel so ausgerichtet, dass die Mikrophyten nach rechts zeigten. Dann wurde ein Deckglas (24 x 50 mm) mit 30 μ l Packbandkleber beschichtet und kurz an der Luft getrocknet. Durch das vorsichtige Auflegen des Deckglases auf den Agarstreifen konnten die Embryonen in ihrer definitiven Orientierung (also mit dem posterioren Pol zum Deckglasrand gewandt und circa 2 bis 4 mm von diesem entfernt) aufgeklebt werden.

Anschließend folgte die von aktueller Temperatur und Luftfeuchtigkeit abhängige Trocknung der Embryonen unter Lupenkontrolle für etwa zehn Minuten, um den Innendruck zu vermindern und somit ein Auslaufen des Embryos bei der Injektion zu vermeiden. Das Deckglas mit den aufgeklebten Embryonen wurde mit Hilfe eines kleinen, verriebeenen 10S-Voltalef-Fluorocarbonöltropfens an der Längsseite eines Objektträgers fixiert. Nach hinreichender Trocknung wurden die Embryonen mit luftdurchlässigem 10S-Voltalef-Fluorocarbonöl überschichtet und bis zum Beginn der Injektionen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.3.2.2 Die DNA-Injektion

Zunächst wurde eine Injektionskapillare hergestellt, indem eine Glaskapillare (Typ GC 100-10) mit einem Nadelziehgerät ausgezogen und die Kapillarenspitze mindestens fünf Minuten mit einem Kapillarschleifgerät geschliffen wurde. Anschließend wurde diese über

einen Tecalan-Schlauch mit einer 10ml-Injektionsspritze verbunden, mit der Injektionslösung beladen und am Mikromanipulator befestigt.

Die Injektion erfolgte in den posterioren Pol von Embryonen, welche sich im Kernteilungsstadium 1 bis 8 (nach ZALOKAR und ERK, 1976), beziehungsweise im Stadium 1 bis 2 (nach CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985) befanden. Dazu wurde die Kapillare durch Bewegung des Kreuztisches in den Embryo gestoßen und mit Hilfe des Luftdrucksystems ein kleiner Tropfen der Injektionslösung in den Bereich der späteren Polzellen entlassen. Ungeeignete Embryonen wurden mit der Kapillare aufgerissen und so abgetötet.

2.3.2.3 Die Weiterbehandlung injizierter Embryonen und die Identifizierung von Transformanten

Nach erfolgreicher Injektion wurden die aufgeklebten Embryonen unter 10S-Voltalef-Fluorocarbonöl bis zum übernächsten Tag bei 18°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Die geschlüpften Larven wurden mit Hilfe einer stumpfen Präpariernadel auf Standardfutterröhrchen gesetzt (circa 30 Larven pro Röhrchen) und bei Raumtemperatur gehalten.

Die frisch geschlüpften Fliegen der G₀-Generation wurden virginell mit Fliegen der w⁸-Injektionslinie in Einzelzuchtkreuzungen verpaart. Aufgrund der keimbahnspezifischen Integration des P-Elements konnten Transformanten in der F₁-Generation anhand des auf dem P-Element liegenden *white*⁺-Gens erkannt werden. Dessen Expressivität variierte dabei stark: Je nach Insertionsort reichte die Augenfarbe von hellorange bis hellrot (KLEMENZ et al., 1987). Die heterozygot transgenen Fliegen der F₁-Generation wurden erneut virginell mit Tieren der w⁸-Injektionslinie in Einzelzuchtkreuzungen verpaart, um Mehrfachinsertionen zu isolieren und genetisch verschiedene Insertionslinien zu etablieren.

2.3.3 Fliegenzucht

2.3.3.1 Die Bestimmung der Insertionsorte und die Isogenisierung der transgenen Linien

Zunächst wurden Doppelbalancer-Fliegen der *CSTM*-Linie (CyO / Sp; TM2, Ubx / MKRS, Sb) virginell gegen die heterozygot transgenen Tiere der F₂-Generation ausgekreuzt. In der resultierenden F₃-Generation konnten heterosomale Insertionen detektiert werden: Fand die

Insertion des P-Elements auf dem X-Chromosom statt, traten nie Männchen mit orangefarbenen Augen auf; war das Y-Chromosom betroffen, waren nie rotäugige Weibchen zu beobachten.

Um autosomale Insertionen zu lokalisieren, wurden die Fliegen der *CSTM*-Linie erneut virginell gegen transgene F_3 -Fliegen gekreuzt. Die Segregation der *white*⁺-Insertion in Bezug auf die vier dominanten Marker in der F_4 -Generation erlaubte Rückschlüsse auf die Lokalisation der autosomalen P-Insertionen in den verschiedenen transgenen Linien. Trägt ein transgenes Individuum beispielsweise beide Marker eines Chromosomenpaares (wie Cy und Sp für das zweite Chromosom), scheidet dieses Chromosomenpaar als Insertionsort aus.

Parallel hierzu wurden transgene F_3 -Fliegen mit einer definierten Markerkombination (zum Beispiel Cy; Sb) virginell miteinander gekreuzt, was zu einem Markerverlust in der F_4 -Generation und somit zur Isogenisierung der transgenen Linien führte. Im Falle der heterosomalen P-Insertionen führte die konsequente Kreuzung der Nachkommen mit einer intensiveren Augenfarbe zum Erhalt homozygoter Linien.

Alle Kreuzungsschritte sind in der folgenden schematischen Übersicht noch einmal zusammengefasst:

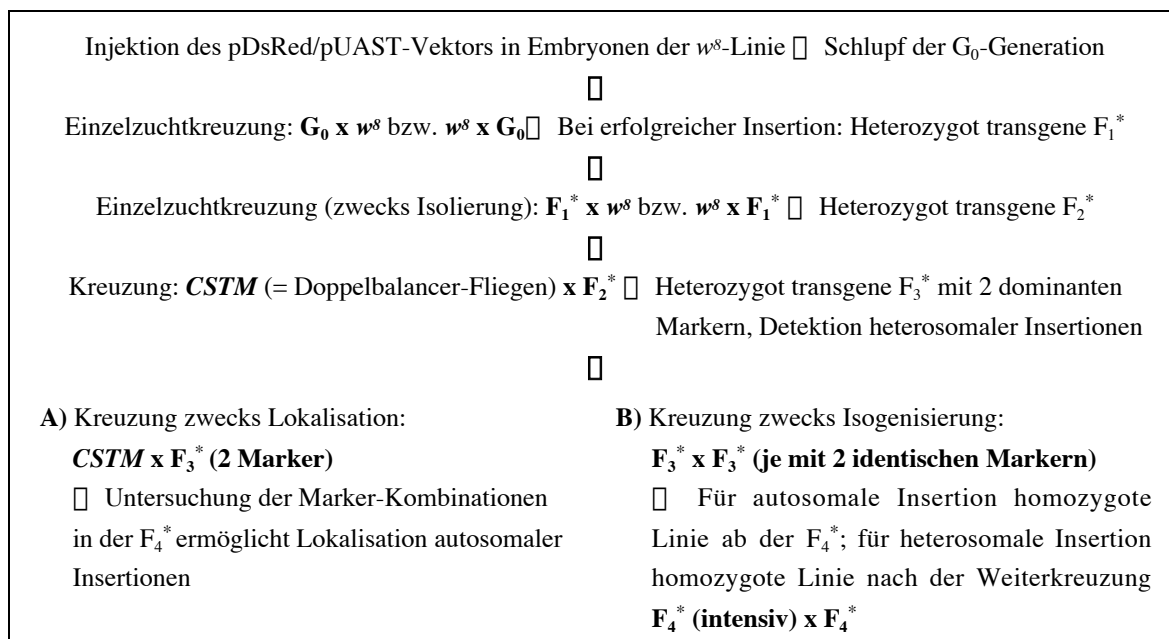


Abbildung 10: Verlaufsschema zur Etablierung transgener *UAS-DsRed*-Linien (B) sowie der Lokalisation ihrer P-Insertionen (A).

Die Kreuzung transgener Nachkommen ist gekennzeichnet durch ein *. (G_0) Generation Nullstart-generation; (F_1^* bis F_4^*) transgene Filialgeneration 1 bis 4.

2.3.3.2 Expressionsstudien mit den *UAS-DsRed*-Linien

Einzelzelltransplantationen mit genetisch markierten Zellen ermöglichen die klonale Analyse larvaler und imaginaler Gewebe, sofern der genetische Marker zellautonom und dauerhaft in allen Nachkommen der transplantierten Zelle exprimiert wird. Weiterhin darf die Expression des Markers nicht auf bestimmte Gewebe beschränkt sein, da sonst keine Aussagen zum Proliferations- und Differenzierungsverhalten der transplantierten Zelle gemacht werden können.

Um die Eignung der 19 isogenisierten *UAS-DsRed*-Linien (siehe Tabelle 2) für die geplanten Transplantationsexperimente zu testen, wurden diese jeweils mit der ubiquitär treibenden *daGAL4*-Linie gekreuzt. Anschließend wurden die Nachkommen als späte Embryonen sowie als präparierte Larven und Imagines am Inversen Fluoreszenzmikroskop auf die Expression des *DsRed*-Reportergens untersucht. Es zeigte sich, dass bei 16 der 19 untersuchten Linien die *DsRed*-Expression auf verschiedene Gewebe beschränkt war, während eine ubiquitäre Expression nur in drei Fällen zu beobachten war. Weiterhin konnte die Expression stets erst ab dem zweiten Larvenstadium nachgewiesen werden, da dem Fluoreszenznachweis des *DsRed* ein mindestens 48-stündiger Reifungsprozess vorausgeht (BAIRD et al., 2000). Um mit der idealen *DsRed*-Spenderlinie zu arbeiten, wurden auch alle publizierten *UAS-DsRed*-Linien (6280, 6281, 6282, *UAS-RFP 18-1-N7* und *UAS-RFP 18-1-Sr3*) auf ihre Eignung überprüft. Sie mussten jedoch wegen ihrer schwachen und partiellen *DsRed*-Expression verworfen werden.

Weil in den drei verbliebenen *UAS-DsRed*-Geschwisterlinien (14-4*, 14-5* und 14-8*) die Intensität der *DsRed*-Expression zwischen den verschiedenen Gewebetypen stark variierte, wurden diese Linien zusätzlich mit verschiedenen gewebespezifischen *GAL4*-Treiberlinien (Linien 2702, 2721, 3041 und 3736) gekreuzt. In den Nachkommenschaften entsprach die *DsRed*-Expression stets den zu erwartenden Expressionsmustern. Somit sind prinzipiell alle larvalen und imaginalen Gewebe zur *DsRed*-Expression fähig.

Weil im Rahmen der geplanten Transplantationsexperimente *DsRed* und *GFP* koexprimiert werden sollten, wurden die drei *UAS-DsRed*-Linien zusätzlich mit einer *UAS-GFP*; *daGAL4*-Treiberlinie gekreuzt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass in den Nachkommen beide Gene sowohl im Wanderlarven- als auch im Adultstadium in allen Geweben koexprimiert wurden.

2.3.3.3 Die Modifikation der *UAS-DsRed*-Linien

Um zusätzlich eine homozygote, ubiquitär *DsRed*-exprimierende Linie für den Einsatz als Spenderlinie zu generieren, wurde die *UAS-DsRed*-Linie 14-5* (Insertion auf dem 2. Chromosom) und die Linie *daGAL4* (Insertion auf dem dritten Chromosom) mit Doppelbalancer-Fliegen der *CSTM*-Linie (CyO / Sp; TM2, Ubx / MKRS, Sb) ausgekreuzt. Anschließend wurden die F₁-Fliegen mit einer definierten Markerkombination (Cy; Sb) herausortiert und die beiden Ansätzen gegeneinander gekreuzt, was zu einem Markerverlust in der F₂-Generation und somit zur Isogenisierung der Linie *UAS-DsRed; daGAL4* führte.

Um die \square im Vergleich zum GFP schwache \square *DsRed*-Expression zu verstärken, wurden in einem weiteren Ansatz zunächst Doppelbalancer-Fliegen der *CSTM*-Linie mit der zuvor generierten Linie *UAS-DsRed; daGAL4* sowie einer *GAL4-UAS*-Verstärkerlinie (HASSAN et al., 2000) ausgekreuzt. Anschließend wurden in der F₁-Generation für den *UAS-DsRed; daGAL4*-Ansatz Weibchen mit einer Sp; Ubx-Markerkombination und für den *UAS-GAL4*-Ansatz Männchen mit einer Cy; Sb-Markerkombination herausortiert und gegeneinander gekreuzt. In der F₂-Generation wurden Fliegen mit einer definierten Markerkombination (Cy; Sb) herausortiert und miteinander gekreuzt, was zu einem Markerverlust in der F₃-Generation und somit zur Isogenisierung der Linie *UAS-GAL4; UAS-DsRed; daGAL4* führte.

2.4 Die Transplantationsmethode

2.4.1 Die verschiedenen Transplantationsserien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neun verschiedene Transplantationsserien durchgeführt, welche in der Tabelle 3 aufgelistet sind. Eine Transplantationsserie zeichnet sich dadurch aus, dass an allen Transplantationstagen die Spender- und Empfängerlinie, die Anzahl der transplantierten Zellen sowie der Transplantationsbereich gleich gewählt wurden. Die Transplantationsserien A bis I sind chronologisch aufgelistet. Der Umfang der verschiedenen Transplantationsserien war zunächst abhängig von der aktuellen Fragestellung zum Untersuchungszeitpunkt sowie der Eindeutigkeit der Resultate. Außerdem forcierte die Etablierung neuer Transplantationslinien (siehe Kapitel 2.3) sowie die Neuschaffung von Fluoreszenzfiltersätzen die Konzeption der Transplantationsserien.

Tabelle 3: Transplantationsserien und die dafür verwendete Spender- und Empfängerlinien

Transplantations- serie	Spenderlinie	Empfängerlinie	Einzelzell- Transplantationen	Mehrzell- Transplantationen	Angestrebter Transplantations- bereich
A	<i>UAS-GFP; daGAL4</i>	<i>UAS-lacZ</i>	✓		40% EL / 0-30% VD
B	<i>UAS-GFP + 2000S RITC-Dextran</i>	<i>daGAL4</i>	✓		40% EL / 0-30% VD
C	F ₁ aus <i>UAS-DsRed</i> x <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>		✓	40% EL / 0-30% VD
D	<i>UAS-DsRed; daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>		✓	40% EL / 0-30% VD
E	<i>UAS-DsRed; daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>		✓	50% EL / 50% VD
F	<i>UAS-DsRed; daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	✓		40% EL / 0-30% VD
G	<i>UAS-DsRed; daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	✓		35% EL / 0-30% VD
H	<i>UAS-DsRed; daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	✓		25-35% EL / 0-30% VD
I	<i>UAS-GAL4; UAS-DsRed; daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	✓		25-35% EL / 0-30% VD

2.4.2 Der Arbeitsplatz zur Durchführung von Transplantationen

Sämtliche Transplantationen wurden in einem Klimaraum bei 18°C durchgeführt. Das Transplantations-Stereomikroskop, der Mikromanipulator und das Druckregulierungssystem (bestehend aus einem Dreiwegehahn und einer Injektionsspritze) standen auf einer schwingungsfrei gelagerten Marmorplatte.

Das Stereomikroskop besaß einen vertikal beweglichen Tubus und einen horizontal beweglichen und drehbaren Kreuztisch. Zusätzlich war an diesem zwecks Vermessung der Eilänge ein Zeichenarm angebracht, über den eine größenverstellbare Skala auf den Embryo eingeblendet werden konnte. Der für die Transplantationen notwendige 3D-Effekt und die 160fache Vergrößerung wurden durch die Verwendung einer Interferenzphasenkontrasteinrichtung, eines *long distance*-Objektivs (Plan-NEOFLUAR 10x/0,30), einer 1,6fachen Zwischenvergrößerung (Optovar) und einer 10fachen Okularvergrößerung erzielt.

Die Transplantationskapillare war an dem Instrumentenhalter des Mikromanipulators befestigt und über einen Schlauch und einen Dreiwegehahn zur Druckregulation an eine Injektionsspritze angeschlossen. Das gesamte System einschließlich der Kapillare war

vollständig mit 3S-Voltalef-Fluorocarbonöl gefüllt, wobei die Veränderung des Öldrucks durch Drehen eines Schraubenvortriebs am Spritzenkolben erfolgte.

2.4.3 Die Herstellung von Transplantationskapillaren

Für die Transplantationen wurden Glaskapillaren vom Typ GC 100-10 verwendet und mit einem Nadelziehgerät ausgezogen. Die Kapillarenspitze wurde dann unter Lupenkontrolle mit einer Augenschere so abgeschnitten, dass ihr Innendurchmesser mit circa 8-9 μm etwa dem Durchmesser einer Zelle entsprach (MEISE und JANNING, 1993). Dazu wurde eine bereits erprobte Referenzkapillare zum Vergleich neben die zu kürzende Kapillare gelegt. Anschließend erfolgte ein mindestens fünfminütiger Schliff der Kapillarenspitze mit einem Kapillarschleifgerät in einem Winkel von 30°.

Vor den anstehenden Transplantationen wurde die Kapillare an dem Instrumentenhalter des Mikromanipulators angebracht, über das Druckregulierungssystem vollständig mit 3S-Voltalef-Fluorocarbonöl gefüllt und einer mikroskopischen Kontrolle auf potenzielle Defekte oder Verunreinigungen unterzogen.

2.4.4 Die Vorbereitung der Embryonen

Die Vorbereitung der Embryonen orientierte sich im Wesentlichen an der von MEISE (1992) beschriebenen Methodik. In der vorliegenden Arbeit wurden die Embryonen allerdings chemisch entchorionisiert (siehe Kapitel 2.3.2.1) und auf einen Streifen Minimalagar überführt. Die anterior-posteriore sowie die dorsoventrale Anordnung der entchorionisierten Embryonen im Präblastodermstadium erfolgte unter Verwendung einer stumpfen Präpariernadel und war abhängig von der Transplantationsserie: Im Falle homotoper Transplantationen in der Ektodermanlage wurden die Spender- und Empfängerembryonen gegenläufig und mit der Dorsalseite nach unten angeordnet. Für homotope Transplantationen im medianen Rumpfmesoderm wurden die Spenderembryonen mit der Ventralseite nach rechts angeordnet, während bei den Empfängern die Ventralseite nach links zeigte. Im Gegensatz dazu wurden die Empfängerembryonen für die homotopen Transplantationen im posterioren Rumpfmesoderm um 15° von der Längsachse weggedreht, um sie im rechten Winkel zur Injektionsrichtung der Kapillare auszurichten. Insgesamt wurden für jeden Transplantationstag circa 35 Spender- und 55 Empfängerembryonen angeordnet.

Zwei Deckgläser (22 x 22 mm für die Spender, 24 x 36 mm für die Empfänger) wurden jeweils mit circa 25 μl Packbandkleber beschichtet und kurz an der Luft getrocknet. Durch

das vorsichtige Auflegen der Deckgläser auf den Agarstreifen konnten die Embryonen in ihrer definitiven Orientierung aufgeklebt werden. Mit Hilfe der Präpariernadel wurde neben die aufgeklebten Embryonen eine Nummerierung in den Packbandkleber geritzt, welche eine eindeutige Zuordnung der Embryonen ermöglichte.

Anschließend folgte die von aktueller Temperatur und Luftfeuchtigkeit abhängige Trocknung der Embryonen unter Lupenkontrolle für etwa zehn Minuten, um den Innendruck zu vermindern und somit ein späteres Herausdrücken der transplantierten Zelle zu vermeiden. Die Deckgläser mit den aufgeklebten Embryonen wurden für den Transport und die Handhabung bei der Transplantation mit Hilfe zweier kleiner, verriebener 10S-Voltalef-Fluorocarbonöltropfen an der Längsseite eines Objektträgers fixiert. Dabei standen die mit den Embryonen beklebten Längsseiten leicht über, um bei der späteren Transplantation die Manipulation mit der Kapillare zu erleichtern und eine bessere optische Kontrolle zu gewährleisten. Nach hinreichender Trocknung wurden die Embryonen mit luftdurchlässigem 10S-Voltalef-Fluorocarbonöl überschichtet und bis zum Beginn der Transplantation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Für die Transplantationsserie B wurde den Spenderembryonen nach der von TECHNAU (1986) beschriebenen Methode bereits im Präblastoderm eine 10%ige RITC-Dextran-Lösung injiziert. Hierzu wurden zunächst Injektionskapillaren hergestellt, indem Glaskapillaren vom Typ GC 100-10 mit einem Nadelziehgerät ausgezogen und die Kapillarspitzen mindestens fünf Minuten mit einem Kapillarschleifgerät geschliffen wurden. Für die Herstellung von Befüllkapillaren wurden 10 μ l Einmal-Mikropipetten über einem Bunsenbrenner ausgezogen und die Spitzen abgebrochen. Eine Befüllkapillare wurde anschließend über einen Tecalan-Schlauch mit einer 10 ml-Injektionsspritze verbunden und mit Hilfe dieses Luftdrucksystems die RITC-Dextran-Lösung aufgezogen. Dann konnte die gefüllte Befüllkapillare vorsichtig in das breite Ende der Injektionskapillare eingeführt und die RITC-Dextran-Lösung in die Injektionskapillare entlassen werden.

Vor den Injektionen wurde die befüllte Injektionskapillare an dem Instrumentenhalter des Mikromanipulators angebracht und über einen Tecalan-Schlauch mit einer 10 ml-Injektionsspritze verbunden. Mit diesem Luftdrucksystem wurde in jeden Spender gerade so viel Lösung injiziert, bis im Interferenzphasenkontrast im Bereich der Einstichstelle eine rote Färbung sichtbar wurde, der Embryo jedoch nicht auslief. Bei Erreichen des zellulären Blastodermstadiums musste nun bei jedem Embryo zunächst die Einstichstelle wiedergefunden werden, da nur hier die Transplantationskapillare eingeführt werden konnte, ohne den Embryo zum Platzen zu bringen. Die entnommenen Zellen wurden dann, wie im nächsten Kapitel beschrieben, vereinzelt und transplantiert.

2.4.5 Die Durchführung der Einzelzelltransplantationen

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) erfolgten nach der von MEISE und JANNING (1993) beschriebenen Methodik, welche auf dem von TECHNAU (1986) publizierten Verfahren basiert: Zunächst wurde am Rand des mit den Embryonen beklebten Deckglases ein circa 5 μ l großer Tropfen der Hämolympfersatzlösung auf die Ölschicht gesetzt. Mit Hilfe der Transplantationskapillare konnte diese Lösung in Form kleiner Tropfen so zwischen den Spenderembryonen abgesetzt werden, dass jeweils ein Tropfen zwischen zwei Embryonen unter der Ölschicht festgeklemmt war. Die überschüssige Hämolympfersatzlösung wurde zurück in den Tropfen entlassen, bis die Phasengrenze zwischen der Lösung und dem Öl in der Kapillare im Mikroskopblickfeld sichtbar war.

Alle Transplantationen wurden homochron im zellulären Blastodermstadium (Stadium 5 nach CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985, beziehungsweise spätes Stadium 5(2) und Stadium 5(3) nach LAWRENCE und JOHNSTON, 1989) und somit vor Einsetzen der Gastrulationsbewegungen und Ausbildung der Kopffalte durchgeführt. Hatte ein Spender das zelluläre Blastodermstadium erreicht, wurde die Kapillare durch Bewegung des Kreuztisches in den Embryo gestoßen und circa 10 Zellen aus dem der Einstichstelle gegenüberliegenden Keimepithel in die Kapillare aufgesogen (TECHNAU, 1986). Diese entnommenen Zellen wurden in den hinter dem Spenderembryo liegenden Tropfen Hämolympfersatzlösung entlassen, wobei die erste und letzte Zelle verworfen wurden. Die Vereinzelung der Zellen erfolgte über ein mehrmaliges Einsaugen des Zellverbandes in die Kapillare, welches zu einer Ablösung einzelner Zellen führte. Eine so vereinzelt Zelle konnte dann mit etwas Hämolympfersatzlösung in die Kapillare aufgenommen werden.

Die Kapillare mit der vereinzelt Zelle musste dann durch Bewegen des Kreuztisches so vor einem geeigneten Empfänger positioniert werden, dass die Kapillarenspitze senkrecht zu der beabsichtigten Einstichstelle orientiert war. Nach dem Ausloten der richtigen Einstichhöhe durch leichte vertikale Bewegung mit dem Mikromanipulator wurde die Kapillare mit einer schnellen Bewegung des Kreuztisches in den Embryo gestochen und gerade soweit wieder zurückgezogen, bis sich ihre angeschrägte Austrittsöffnung in dem Keimepithel befand. Anschließend konnte die Zelle durch leichte Erhöhung des Öldrucks in der Kapillare zwischen die Zellen des Empfängerepithels gesetzt werden, wobei die Kapillare gleichzeitig zurückgezogen wurde.

2.4.6 Die Durchführung der Mehrzelltransplantationen

Für die Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserien C, D und E) wurden den Spendern 15 bis 20 Zellen entnommen. Diese wurden direkt nach Augenmaß und – je nach Fragestellung – zu drei bis 15 Zellen in Empfängerembryonen des gleichen Entwicklungsstadiums transplantiert.

2.4.7 Die Bestimmung des Transplantationsorts

Zur Bestimmung der Transplantationseilänge wurde über einen Zeichenarm eine Skala auf die Längsachse des Embryos eingespiegelt, welche der Embryonengröße durch Veränderung der Zeichenarmvergrößerung angepasst werden konnte. Somit war ein direktes Ablesen der Eilänge (EL; dabei 0% EL = posteriorer Pol des Embryos) für den Entnahmort und die Integrationsstelle möglich (TECHNAU, 1986).

Die gewünschte dorsoventrale Ausrichtung (VD; dabei 0% = Ventralseite des Embryos) musste bereits bei der Anordnung der Embryonen auf dem Agarstreifen vorgenommen werden, da ein nachträgliches Bewegen der aufgeklebten Embryonen nicht möglich war. Da der *Drosophila*-Embryo im Blastodermstadium bis auf die etwas stärker konvex gekrümmte Ventralseite keine sichtbaren Markierungen aufweist, war eine Bestimmung der tatsächlichen dorsoventralen Transplantationsposition direkt nach der Transplantation nicht möglich. Erst nach dem Einsetzen der Gastrulation konnte anhand der charakteristischen Gastrulationsbewegungen (zum Beispiel dem Wandern der Polzellen oder der Bildung der Kopffalte) eine Bestimmung der VD-Position für die Spender- und Empfängerembryonen vorgenommen werden, wobei diese Abschätzung in 5%-Intervallen erfolgte. Um einer Fehlbestimmung der VD-Position vorzubeugen, wurden noch zwei Nachkontrollen unter dem Binokular vorgenommen, welche den Vorteil eines besseren räumlichen Eindrucks besaßen. Dabei fand die erste Nachkontrolle am Ende des Transplantationstages statt, wenn alle Embryonen mindestens das Stadium 6 erreicht hatten. Die zweite Nachkontrolle erfolgte nach circa 16 Stunden Entwicklungszeit bei 18°C, d.h. im Stadium des verkürzten Keimstreifs. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden alle nicht verwendeten Empfängerembryonen mit einer stumpfen Präpariernadel abgetötet.

2.4.8 Die Weiterbehandlung der Embryonen nach der Transplantation

Nach der Transplantation wurden die aufgeklebten Embryonen unter 10S-Voltalef-Fluorocarbonöl bis zum übernächsten Tag bei 18°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Kurz vor dem Schlüpfen erfolgte der Transfer auf Raumtemperatur, was eine gesteigerte

Schlupfaktivität zur Folge hatte und das Absammeln der Larven erleichterte. Die geschlüpften Larven wurden mit Hilfe einer stumpfen Präpariernadel auf individuelle Futterschälchen gesetzt und je nach gewünschter Entwicklungsgeschwindigkeit bei 18°C oder Raumtemperatur gehalten.

Lag das Interesse bei der Untersuchung der Imagines, so wurden die Larven des späten dritten Larvenstadiums nach ihrer Untersuchung auf Transplantationsklone mit einer stumpfen Pinzette auf individuelle Standardfutterröhrchen gesetzt, welche bei Raumtemperatur gehalten wurden. Die frisch geschlüpften Fliegen wurden sofort auf neue Standardfutterröhrchen überführt.

Die Empfänger aller Transplantationen wurden – ungeachtet ihres Entwicklungsstadiums – auf zwei verschiedene Markierungen untersucht: Zunächst wurde überprüft, zu welchen Geweben sich die Nachkommen der transplantierten Zelle(n) differenziert hatten (= cell-lineage-Klon). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, ob Spender- und Empfängerzellen miteinander fusioniert waren, um heterogene syncytiale Zellverbände zu bilden (= Syncytien-Klon). Da man per Definition als „Klon“ die genetisch identischen Nachkommen einer Mutterzelle bezeichnet, ist die Verwendung dieses Begriffs strenggenommen nur bei der cell-lineage-Auswertung von Einzelzelltransplantationen korrekt. Um jedoch umständliche Formulierungen zu vermeiden, werden die aus Mehrzelltransplantationen resultierenden Zellmarkierungen sowie die syncytialen Markierungen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als „Klone“ bezeichnet.

2.4.8.1 Die Weiterbehandlung der Embryonen mit einem β -Galaktosidase-Marker

In der Transplantationsserie A wiesen die Empfänger eine *lacZ*-Expression im syncytialen Klonanteil auf (siehe Kapitel 3.5.1). Der Nachweis der gebildeten β -Galaktosidase erfolgte durch eine chemische Nachweisreaktion in präparierten Larven des Wanderlarvenstadiums. Dazu wurden die Empfängerlarven mit einer Pinzette aus ihren Futterschälchen abgesammelt und zur Reinigung von Futter- und Heferesten für circa zehn Minuten auf einen feuchten Papierstreifen gesetzt. Danach erfolgte für ein bis zwei Sekunden das Eintauchen in ein auf 60°C erhitztes Streckbad, was neben dem Abtöten der Larve auch eine unmittelbare und dauerhafte Streckung der Larvenmuskulatur zur Folge hatte (HOOPER, 1986). Anschließend wurde die Larve sofort in einem Tropfen PBS auf einem silikonisierten Objektträger mit einer Augenschere der Länge nach aufgeschnitten und mit Hilfe zweier feiner Pinzetten unter Binokularvergrößerung aufpräpariert. Die Gewebe wurden in einem Blockschälchen zunächst für 20 Minuten in Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal für je zehn Minuten in PBS gewaschen.

Für den histochemischen β -Galaktosidase-Nachweis, welcher auf der enzymatischen Aktivität der β -Galaktosidase beruht, wurde das PBS anschließend durch eine auf Raumtemperatur vorgewärmte Lösung aus 1 ml Färbelösung und 25 μ l 8%igem X-Gal substituiert. Es folgte eine drei- bis vierstündige Inkubation bei Raumtemperatur, bei der sich in den *lacZ*-exprimierenden Geweben ein unlöslicher blauer Indigofarbstoff bildete. Nach der Färbereaktion wurden die präparierten Larven mehrmals kurz in PBS gewaschen, um ausgefallene X-Gal-Kristalle zu entfernen. Schließlich wurden die Gewebe in 50%iges Glycerin überführt und bis zur Auswertung bei 4°C aufbewahrt.

Nach einer ersten Analyse unter dem Binokular wurden die β -Galaktosidase-markierten Gewebe mit Hilfe von Pinzetten und Augenschere freipräpariert und in einen sehr kleinen Tropfen Faure'sche Lösung auf einen Objektträger überführt. Nach dem Ausrichten der Gewebe und einstündiger Trocknung wurde ein Deckglas mit einem großen Tropfen dieses Einbettungsmediums versehen und unter leichtem Druck aufgelegt. Alle Präparate wurden leicht gequetscht, um ihre Ebenheit zu gewährleisten und somit die mikroskopische Auswertung zu ermöglichen. Nach einigen Wochen wurden die Präparate mit Acrylnagellack versiegelt und so für mehrere Jahre haltbar gemacht.

2.4.8.2 Die Weiterbehandlung der Embryonen mit einem Fluoreszenzmarker

In allen Transplantationsserien waren die cell-lineage und (mit Ausnahme der Serie A) der syncytiale Klonanteil fluoreszenzmarkiert. Als Marker dienten dabei sowohl die cytoplasmatisch exprimierten Proteine GFP (Transplantationsserie A bis I) und DsRed (Transplantationsserie C bis I) als auch der für die Transplantationsserie B in die Spenderembryonen injizierte Fluoreszenzfarbstoff 2000S RITC-Dextran. Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Spenderembryonen ermöglichte die Untersuchung des Teilungsverhaltens und des Entwicklungsschicksals der transplantierten Zelle und ihrer Nachkommen *in vivo*.

Die Kontrolle der mit 2000S RITC-Dextran-markierten Spenderembryonen erfolgte vor und nach den Transplantationen sowie kurz vor dem Schlupf der ersten Larven unter Verwendung der Fluoreszenzeinrichtung des Transplantations-Stereomikroskops.

Alle anderen Spenderembryonen wurden kurz vor dem Schlüpfen der ersten Larven mit Hilfe eines Inversen Fluoreszenzmikroskops auf die Expression des *GFP*- und *DsRed*-Fluoreszenzmarkers untersucht. Die Kontrolle aller aufgeklebten Spenderembryonen diente der kontinuierlichen Überprüfung der Spenderlinien.

Alle Embryonen, welche mit 2000S RITC-Dextran-markierte Zellen erhalten hatten (Transplantationsserie B), wurden kurz vor dem Schlupf der ersten Larven durch eine zehnkündige Behandlung mit 60°C heißem Leitungswasser abgetötet. Direkt im Anschluss wurde das Deckglas mit den abgetöteten Embryonen mit Hilfe eines 10S-Voltalef-Fluorcarbonöltropfens auf einem Objektträger fixiert, mit diesem Öl überschichtet, mit Deckglassplittern umgeben und mit einem 24 x 50 mm Deckglas bedeckt. Diese Präparation ermöglichte eine Untersuchung der Embryonen von der Ober- und Unterseite. Die Analyse der Transplantationsklone erfolgte mittels eines Konfokalen Mikroskops. Da Voruntersuchungen ergeben hatten, dass das injizierte 2000S RITC-Dextran während der Larvalentwicklung abgebaut wird, wurden die Transplantationsklone nur im Embryonalstadium 15 bis 17 (nach CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985) ausgewertet.

Die Empfänger aller anderen Transplantationsserien, in denen die fluoreszierenden Proteine GFP und/oder DsRed nachgewiesen werden sollten (Transplantationsserien A, C, D, E, F, G, H und I), wurden mit Hilfe des Inversen Fluoreszenzmikroskops untersucht, die resultierenden Klone protokolliert und mit Hilfe eines Mini-Disc-Writers aufgezeichnet. Während alle Empfänger im Wanderlarvenstadium auf Transplantationsklone untersucht wurden, fand ein zusätzlicher Klonnachweis im Adultstadium zunächst nur probeweise für einige Empfänger der Transplantationsserie D statt. Eine kontinuierliche Untersuchung aller adulten Empfänger erfolgte erst ab der Transplantationsserie F, als die Analyse imaginaler Strukturen von Interesse war.

Die Art der Untersuchung der Transplantationsklone mittels Inverser Fluoreszenzmikroskopie richtete sich nach dem Untersuchungsstadium: Die Wanderlarven wurden mit Hilfe einer Pinzette aus dem Futter herausgesucht und – wie bereits in Kapitel 2.4.8.1 beschrieben – auf einem angefeuchteten Papierstreifen für circa zehn Minuten gründlich von Hefe- und Futterresten gereinigt. Die zu untersuchenden Tiere wurden dann nacheinander jeweils auf ein Deckglas der Größe 72 x 26 mm gesetzt, mit einem Tropfen Wasser überschichtet und mit einem 24 x 36 mm großen Deckglas abgedeckt. Durch vorsichtiges Schieben des oberen Deckglases konnten die Larven einmal um die gesamte Körperlängsachse gedreht und von allen Seiten auf einen Klon untersucht werden. Die Larven wurden nach der Untersuchung in individuelle Standardfutterröhrchen überführt, wo sie sich bei Raumtemperatur zur Fliege weiterentwickeln konnten.

Im Gegensatz dazu wurden die Imagines unterschiedlichen Alters zunächst für mindestens eine Minute etherisiert und dann auf einem 72 x 26 mm großen Deckglas am Inversen Mikroskop auf fluoreszierende Klone untersucht. Anschließend wurden die Tiere sofort in einem Tropfen Fluoromount-G auf einem Deckglas der Größe 72 x 26 mm mit Hilfe

zweier feiner Pinzetten unter Binokularvergrößerung aufpräpariert. Dazu wurden sie dekaptiert, die Extremitäten entfernt und das Abdomen und der Thorax ventral mit einer Augenschere geöffnet. Nach dem vorsichtigen Ausräumen des Abdomens mit Hilfe der Pinzetten wurden der Verdauungstrakt, die inneren Genitalien sowie die Karkasse in dem Fluoromounttropfen ausgerichtet und mit einem Deckglas der Größe 36 x 24 mm abgedeckt. Anschließend konnten die Präparate beidseitig am Inversen Mikroskop untersucht werden.

2.5 Die Untersuchung von Puppen

Während sich zahlreiche Untersuchungen mit der detaillierten Aufklärung der embryonalen Myogenese beschäftigen (Übersicht bei BAYLIES et al., 1998; siehe Kapitel 1.2), liegen zur Bildung der imaginalen somatischen Muskulatur bisher nur wenige Studien vor. Bei diesen handelt es sich hauptsächlich um deskriptive Analysen zur Bildung der Thoraxmuskulatur. Für diese Körperregion konnten die pupale Expression der Muskelgründerzell-Determinante *dumbfounded (duf)* (KOZOPAS und NUSSE, 2002) sowie des Muskelidentitätsgens *apterous (ap)* (GHAZI et al., 2000; BERNARD et al., 2003) gezeigt werden. Diese Befunde deuten auf die Determination von Muskelgründerzellen während der thorakalen imaginalen Myogenese und somit auf eine Analogie zur embryonalen Myogenese hin.

Um auch die abdominalen Myoblasten auf mögliche Determinationsprozesse untersuchen zu können, wurden die Nachkommen der Kreuzungen *rP298-GAL4* (laut NOSE et al. (1998) und RUIZ-GOMEZ et al. (2000) mit einem *duf*-spezifischen Expressionsmuster) x *UAS-GFP* und *ap-GAL4* x *UAS-GFP* in verschiedenen Metamorphosestadien auf die Expression des *GFP*-Reportergens untersucht. Um definierte Stadien untersuchen zu können und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die bei 25°C gehaltenen Standardfutterröhrchen mit den Kreuzungsansätzen zunächst in halbstündigen Abständen kontrolliert. Dabei wurden alle sich verpuppenden Larven (*White puparium* nach den Kriterien von BAINBRIDGE und BOWNES, 1981) vorsichtig mit einem feuchten Pinsel abgesammelt und in ein Blockschälchen überführt. Dieses Gefäß wurde zusätzlich mit einem feuchten Papier versehen, abgedeckt und bis zum gewünschten Untersuchungszeitpunkt bei 25°C inkubiert.

Für die Erstuntersuchung wurde jede Puppe vorsichtig mit einem feuchten Pinsel auf ein 72 x 26 mm großes Deckglas übertragen. Dort wurde sie mit einem 18 x 18 mm großen Deckglas mit Knetgummifüßen abgedeckt und nachträglich mit PBS überschichtet. Durch

vorsichtiges Schieben des oberen Deckglases konnte die Puppe gedreht und somit am Inversen Mikroskop von allen Seiten untersucht werden.

Um das Expressionsmuster genauer untersuchen zu können, wurde anschließend – bei allen mehr als 13 Stunden alten Puppen – das braune, lichtundurchlässige Puparium entfernt. Dazu wurde das obere Deckglas entfernt, der Tropfen PBS abgesaugt und das Puparium mit Hilfe zweier feiner Pinzetten unter Binokularvergrößerung sukzessive abgezupft. Die freigelegte Puppe wurde anschließend wieder mit einem 18 x 18 mm großen Deckglas mit Knetgummifüßen bedeckt, vorsichtig mit PBS überschichtet und am Inversen Mikroskop untersucht.

2.6 Die Hitzeschock-Experimente

Mit Hilfe der *FLP-out*-Technik nach STRUHL und BASLER (1993) sollten nach Abschluss der postblastodermalen Mitosen Klone in der Epidermis induziert werden, um über die Ausdehnung dieser Klone Rückschlüsse auf die Kopplung von Epidermiszellen zu erhalten. Um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, folgte die Durchführung der Hitzeschock-Experimente einer festgelegten Anleitung (nach OVERESCH, 1999). Dazu wurden verschiedene Hitzeschock-Zeiten und Aufzuchttemperaturen getestet, um die idealen Versuchsbedingungen zu ermitteln.

2.6.1 Die Vorbereitung der Embryonen und Larven

Zunächst wurden mehrere vierstündige Ablagen mit der *heat-shock*-Linie *B* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2) und die Ablageschälchen für 24 Stunden bei 25°C oder für 48 Stunden bei 18°C gelagert. Anschließend wurden mit einer stumpfen Präpariernadel alle Embryonen im Stadium 17 (nach CAMPOS-ORTEGA und HARTENSTEIN, 1985) oder die frisch geschlüpften Larven in ein engmaschiges Stahldrahtnetzchen überführt, welches sich in einem mit PBS gefüllten Blockschälchen befand.

2.6.2 Der Hitzeschock

Für den eigentlichen Hitzeschock wurde das Stahldrahtnetzchen mit den abgesammelten Embryonen oder den frischgeschlüpften Larven in ein frisches Blockschälchen überführt. Dieses war mit PBS gefüllt und befand sich bereits seit einer Stunde in einem auf 37°C

justierten Brutschrank. Das Stahldrahtnetzchen verblieb für neun bis zwölf Minuten in diesem Brutschrank.

2.6.3 Die Weiterbehandlung der Embryonen und Larven

Anschließend wurde das Stahldrahtnetzchen mit seinem Inhalt für fünf Minuten in ein frisches, mit PBS gefülltes Blockschälchen überführt. Dieses befand sich in einem Bad aus kaltem Leitungswasser. Dann wurde das Stahldrahtnetzchen unter dem Binokular leicht schräg gestellt, so dass sich die Embryonen oder Larven am Rand sammelten und zwischen die Schenkel einer Pinzette geführt werden konnten. Mit Hilfe der Pinzette konnten die Hitzeschock-behandelten Tiere auf frische Futterschälchen oder Standardfutterröhrchen überführt werden. Ihre weitere Haltung erfolgte bei 18°C oder Raumtemperatur.

2.6.4 Die Auswertung der Hitzeschock-Klone

Da die Hitzeschock-induzierten Klone cytoplasmatisch *GFP* exprimierten, erfolgte deren Nachweis mit Hilfe des Inversen Fluoreszenzmikroskops. Dazu wurden die behandelten Tiere im Wanderlarvenstadium mit einer Pinzette abgesammelt und auf einem angefeuchteten Papierstreifen für circa zehn Minuten gründlich von Hefe- und Futterresten gereinigt. Danach wurden die Larven durch ein- bis zweisekündiges Eintauchen in ein auf 60°C erhitztes Streckbad einzeln abgetötet (siehe Kapitel 2.4.8.1). Jede Larve wurde sofort auf ein Deckglas der Größe 72 x 26 mm gesetzt, mit einem Tropfen PBS überschichtet und mit einem 24 x 36 mm großen Deckglas abgedeckt. Durch vorsichtiges Schieben des oberen Deckglases konnten die Larven nun von allen Seiten auf Klone untersucht werden.

2.7 Auswertung und Dokumentation

Die mikroskopische Auswertung der Dauerpräparate (X-Gal-Färbungen von β -Galaktosidase-Transplantationsklonen und verschiedenen Linien) wurde am Transplantations-Stereomikroskop unter Verwendung der Interferenzphasenkontrasteinrichtung durchgeführt. Für die Auswertung der *DsRed*- und/oder *GFP*-exprimierenden Embryonen, Larven, Puppen und Fliegen sowie der larvalen Hitzeschock-Klone wurde das Inverse Mikroskop verwendet. Die Untersuchung der 2000S RITC-Dextran/GFP-Transplantationsklone erfolgte am Konfokalen Mikroskop.

Für die fotografische Dokumentation wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich digitalisierte Bilder verwendet. Dauerpräparate wurden über eine 3 CCD Farb-Videokamera aufgenommen und mit Hilfe des Programms Photoshop 5.5 der Firma Adobe auf einem Power-Macintosh im psd-Format gespeichert. Fluoreszenzpräparate wurden am Inversen Mikroskop über eine 3 CCD Farb-Videokamera und ein Bildverstärkungssystem auf Mini-Discs im TIF-Format zwischengespeichert und anschließend auf einen Macintosh-Computer überspielt. Die Speicherung der Bilddateien am Konfokalen Mikroskop erfolgte entweder im BMP-Format (Einzelbilder) oder im TIF-Format (Bildstapel). Alle Bilder wurden an diversen Macintosh-Computern mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Photoshop 6.0 vergrößert, beschriftet und bei Bedarf aufintegriert.

Sämtliche Informationen, die aus der klonalen Analyse hervorgegangen sind, wurden mit dem Datenbank-Programm FileMaker Pro 5.5 erfasst, verwaltet und ausgewertet.

Abbildungen aus veröffentlichten Artikeln und Lehrbüchern anderer Autoren wurden im Text entsprechend als Fremdquelle gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Die gewählten Transplantationsbereiche

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Transplantationsexperimente im Bereich des Rumpfmesoderms durchgeführt. Dieser mit Hilfe konventioneller cell-lineage-Analysen bereits gut untersuchte Bereich wurde gewählt, da zur Etablierung und Überprüfung des neuen experimentellen Ansatzes viele Vergleichsdaten herangezogen werden konnten (BEER et al., 1987; KLAPPER et al., 1998). Außerdem ist von dieser Region bereits bekannt, dass aus ihr einige syncytial organisierte Gewebe hervorgehen (BATE, 1993; HEUSER, 1999). Insgesamt wurden 1673 Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) zwischen 44 und 23% EL und beidseitig der dorsalen Mittellinie von 0 bis 30% VD durchgeführt. Der Transplantationsbereich der 259 Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserien C und D) erstreckte sich auf das Rumpfmesoderm von 45 bis 38% EL (siehe jeweils Abbildung 11).

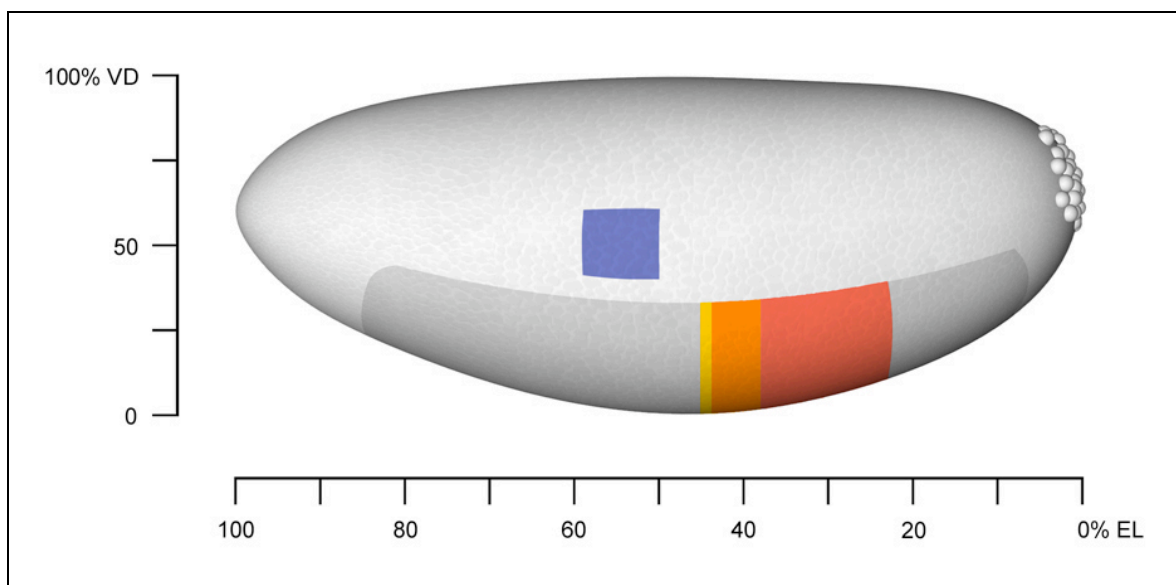


Abbildung 11: Die Transplantationsbereiche.

Der Abschnitt des Rumpfmesoderms, in dem Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) durchgeführt wurden, ist rot hervorgehoben, während der Bereich der Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserien C und D) gelb markiert ist. Die Überlagerung beider Regionen erscheint orange. Mehrzelltransplantationen in der Ektodermanlage (Transplantationsserie E) wurden im blau markierten Transplantationsbereich durchgeführt.

Um Klone in den Thorax-Imaginalscheiben zu erzeugen, wurden weiterhin 171 Mehrzelltransplantationen bei 48 bis 59% EL und 40 bis 60% VD im Bereich der präsumtiven neuronalen Region (HARTENSTEIN et al., 1985) ausgeführt (Transplantationsserie E, siehe Abbildung 11). In dieser Region konnten bereits MEISE und JANNING (1994) sowie BOSSINGER (2002) die Anlagen der thorakalen Imaginalscheiben lokalisieren.

3.2 Das GAL4/UAS-Transplantationssystem und die Induktion verschiedener Reporterexpressionen

Wie schon in der Einleitung dargelegt wurde (siehe Kapitel 1.7), werden bei der Kombination von GAL4-System und Einzelzelltransplantationstechnik einzelne Zellen einer Treiberlinie in Embryonen der Effektorlinie oder *vice versa* transplantiert. Da die Induktion der Reporterexpression eine Kolokalisation des *GAL4*-Transkriptionsfaktors und des *UAS*-Reporter-Konstrukts auf zellulärer Ebene erfordert, beschränkt sich der Nachweis des Reportergens auf heterogene Syncytien (HEUSER, 1999; KLAPPER et al., 2001, 2002). Diese selektive Reporter-Induktion ist wegen der zugrunde liegenden Beschränkungen auch für die Transplantationsklone aus Mehrzelltransplantationen zu erwarten.

Die Selektivität dieses Transplantationssystems konnte bisher nur indirekt durch den Klonvergleich mit herkömmlichen Transplantationsklonen und die fehlende Markierung mononucleärer Derivate bestätigt werden (HEUSER, 1999; KLAPPER et al., 2002). Da der herkömmliche Vergleich der syncytialen Klone mit den cell-lineage-Transplantationsklonen anderer Arbeiten nur statistisch möglich war, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation bei allen Transplantationen zusätzlich die cell-lineage der transplantierten Zelle markiert. Diese Doppelmarkierung hat den Vorteil, dass nun für jeden einzelnen Transplantationsklon die cell-lineage-Markierung mit der partiellen Syncytien-Markierung verglichen und somit die Selektivität des Syncytien-Nachweises überprüft werden kann. Weiterhin ist neben dem Nachweis von Zellfusionen auch gleichzeitig die Untersuchung des Entwicklungsschicksals des mononucleären Klonanteils möglich, wodurch Aussagen über das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der transplantierten Zellen getroffen werden können.

3.2.1 Die Kontrolle der Spenderlinien

Um alle Spenderzellen sowie deren Nachkommen zu identifizieren, wurden verschiedenartig markierte Spenderembryonen verwendet: Zum einen wurden genetisch markierte Spenderembryonen benutzt, in welchen das nachzuweisende Reporter-gen in allen Zellen und Entwicklungsstadien exprimiert wird. Dieses wurde durch eine ubiquitäre Expression des *GAL4*-Transkriptionsfaktors unter der Kontrolle des *Drosophila*-eigenen *daughterless*-Promotors ermöglicht, welcher die *UAS*-Reporter-gen-Sequenz in allen Zellen aktivierte. Neben dieser zellautonomen genetischen Spendermarkierung (Transplantationsserien A, C, D, E, F, G, H und I) wurden auch Spenderembryonen eingesetzt, denen im Präblastodermstadium der Fluoreszenzfarbstoff 2000S RITC-Dextran injiziert worden war (Transplantationsserie B).

Um bei den genetisch markierten Spenderlinien die ubiquitäre Expression der Reporter-gene zu überprüfen, wurden jeweils 30 Embryonen, Larven und Imagines der Linien *UAS-GFP; daGAL4* (Verwendung in der Transplantationsserie A), *UAS-DsRed; daGAL4* (Verwendung in den Transplantationsserien D bis H) und *UAS-GAL4; UAS DsRed; daGAL4* (Verwendung in der Transplantationsserie I) präpariert und mit Hilfe des Inversen Fluoreszenzmikroskops untersucht. Die Überprüfung aller Entwicklungsstadien zeigte, dass beide Fluoreszenzmarker prinzipiell ubiquitär exprimiert wurden, wobei die Intensität der DsRed-Fluoreszenz deutlich schwächer ausfiel als die des verwendeten S65T-GFP. Im Falle der *UAS-DsRed; daGAL4*- und *UAS-GAL4; UAS DsRed; daGAL4*-Embryonen war die *DsRed*-Expression aufgrund des mindestens 48-stündigen Reifungsprozesses des DsRed (BAIRD et al., 2000) erwartungsgemäß kaum detektierbar. Im Wanderlarvenstadium variierte die Intensität des DsRed-Markers in den beiden DsRed-Spenderlinien zell- und gewebespezifisch, weshalb der Fettkörper, Teile des Mitteldarms, die Thorax-Imaginal-scheiben und die Gonaden gefleckt erschienen; dabei wurden jedoch niemals unmarkierte Zellen beobachtet. Die Imagines beider Linien zeigten eine schwächere *DsRed*-Expression in den Extremitäten und dem Kopfbereich. Allgemein konnte in der Linie *UAS-GAL4; UAS DsRed; daGAL4* aufgrund der *UAS-GAL4*-Autoregulation (HASSAN et al., 2000) eine erhöhte Intensität der DsRed-Fluoreszenz festgestellt werden; dafür zeichnete sich diese Linie durch eine verringerte Vitalität aus. Die untersuchten Tiere der *UAS-GFP; daGAL4*-Linie wiesen in allen Untersuchungsstadien eine so intensive GFP-Fluoreszenz auf, dass ungefärbte Zellen zwischen den stark fluoreszierenden Zellen nicht hätten identifiziert werden können.

3.2.2 Die Kontrolle der Empfängerlinien

Da der Nachweis des syncytialen Klonanteils auf einer induzierten Reporterexpression beruht, muss gewährleistet sein, dass in den verwendeten Empfängerlinien keine Spontanexpression des jeweiligen Markers auftritt. Deshalb wurden zunächst 20 Wanderlarven der Linie *UAS-lacZ* (Verwendung in der Transplantationsserie A) präpariert, mit Hilfe der X-Gal-Färbemethode angefärbt und auf ihre endogene *lacZ*-Expression untersucht. Dabei zeigte sich eine schwache Hintergrundfärbung in zwei Mitteldarmabschnitten, einigen einzelnen Zellen des Darms, des Ventrikels und der Speicheldrüsen, den anterioren und posterioren Spirakeln und den Önocyten, die gut von einer *GAL4*-induzierten Färbereaktion zu unterscheiden war. Dieser Befund entsprach den Ergebnissen früherer Untersuchungen und bestätigt die Eignung der Linie für die angestrebten Untersuchungen (HEUSER, 1999).

Die Untersuchung der embryonalen Eigenfluoreszenz der Linie *daGAL4* (Verwendung in der Transplantationsserie B) ergab, dass diese sehr schwach und somit praktisch zu vernachlässigen war.

Im Falle der Empfängerlinie *UAS-GFP* (Verwendung in den Transplantationsserien C bis I) wurden jeweils 30 Larven und Imagines auf ihre Eigenfluoreszenz untersucht. Dabei zeigte sich im Wanderlarvenstadium eine schwache Fluoreszenz im Mittel- und Enddarm, den Malpighischen Gefäßen, den anterioren und posterioren Spirakeln und in einem definierten Muster im Ventralganglion. Bei den Imagines dieser Linie war die Intensität der Eigenfluoreszenz abhängig vom Alter und Ernährungszustand der untersuchten Tiere und konnte im Mittel- und Enddarm, den Malpighischen Gefäßen, dem Fettkörper, den Ovariolen, den Hoden und der Analplatte beobachtet werden.

Bei allen Linien und Untersuchungsstadien zeigte sich eine vergleichsweise schwache cytoplasmatische Hintergrundfärbung, die aufgrund ihrer Intensität und Reproduzierbarkeit gut von einer *GAL4*-induzierten Reporterexpression zu unterscheiden ist.

3.3 Die Auswertungskriterien

In der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Transplantationen ausgewertet, bei denen Spender- und Empfängerembryonen ein korrektes Blastoderm ausgebildet hatten und keine Anzeichen von Defekten aufwiesen. Die Empfänger durften außerdem nicht zu stark getrocknet oder durch den Transplantationsvorgang in Mitleidenschaft gezogen worden sein.

Alle Einzelzell- und Mehrzelltransplantationen wurden „angestrebt homotop“ durchgeführt, das heißt, dass der Zellentnahmeort und der Integrationsort nach den zugrunde gelegten Transplantationskriterien (MEISE und JANNING, 1993) eine Abweichung von maximal 5% EL und 10% VD nicht überschreiten durften. Weil sich bei der Durchführung der Mehrzelltransplantationen jedoch der Einzugsbereich der entnommenen Zellen vergrößert, ist eine genauere Lokalisation des Entnahmeortes nicht mehr möglich. Somit wurden die Mehrzelltransplantationen zwar „angestrebt homotop“ durchgeführt, verliefen *per se* aber in den meisten Fällen leicht heterotop.

3.4 Übersicht über alle durchgeführten Transplantationsserien

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit ist chronologisch nach der Durchführung der neun Transplantationsserien aufgebaut. Diese Gliederung erlaubt es, die sukzessive Bearbeitung der Fragestellungen, die sich zum Teil erst im Verlauf der Untersuchungen ergeben haben, zu verfolgen. In der Tabelle 4 sind alle Transplantationsserien und die jeweils damit untersuchten Fragestellungen aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über alle Transplantationen und die damit verbundenen Fragestellungen

Serie	Spender	Empfänger	Angestrebter Trans.-Bereich	Transplantationsart	Untersuchungsstadium			Anzahl Trans.	Ziel / Fragestellung
					Embryo	Larve	Imago		
A	<i>UAS-GFP</i> ; <i>daGAL4</i>	<i>UAS-lacZ</i>	38-40% EL 0-30% VD	Einzelzelltrans.		✓		45	Methodenbestätigung: Wird das <i>lacZ</i> -Reportergen ausschließlich im syncytialen Klonanteil exprimiert?
B	<i>UAS-GFP</i> + 2000S RIIC- Dextran	<i>daGAL4</i>	37-44% EL 0-30% VD	Einzelzelltrans.	✓			71	Methodenbestätigung: Wird das <i>GFP</i> -Reportergen ausschließlich im syncytialen Klonanteil exprimiert?
C	<i>UAS-DsRed</i> x <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	39-45% EL 0-30% VD*	Mehrzelltrans.		✓		31	Mehrzelltransplantationen zur Erhöhung der Klonrate; Kann <i>DsRed</i> als cell-lineage-Marker und zur Koexpression mit <i>GFP</i> verwendet werden?
D	<i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	38-45% EL 0-30% VD ^{w*}	Mehrzelltrans.		✓	✓*	228	Mehrzelltransplantationen zur Erhöhung der Klonrate; Erlernen und Verbessern des <i>DsRed</i> / <i>GFP</i> -Nachweises; Methodenbestätigung
E	<i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	48-59% EL 40-60% VD	Mehrzelltrans.		✓		171	Mehrzelltransplantationen zur Erhöhung der Klonrate; Klone in den Imaginalscheiben?
F	<i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	37-44% EL 0-30% VD	Einzelzelltrans.		✓	✓	374	Kartierung larvaler und imaginaler Mesodermanlagen; Überdauern larvale Klone die Metamorphose?
G	<i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	33-38% EL 0-30% VD	Einzelzelltrans.		✓	✓	157	Kartierung larvaler und imaginaler Mesodermanlagen; Überdauern larvale Klone die Metamorphose?
H	<i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	23-35% EL 0-30% VD	Einzelzelltrans.		✓	✓	970	Kartierung larvaler und imaginaler Mesodermanlagen; Überdauern larvale Klone die Metamorphose?
I	<i>UAS-GAL4</i> ; <i>UAS-DsRed</i> ; <i>daGAL4</i>	<i>UAS-GFP</i>	25-34% EL 0-30% VD	Einzelzelltrans.		✓	✓	56	Verstärkung der <i>DsRed</i> - und <i>GFP</i> -Expression; Kartierung larvaler und imaginaler Mesodermanlagen; Überdauern larvale Klone die Metamorphose?
								□ 2103	

VD*: Alle Transplantationen ohne VD-Kontrolle

VD^{w*}: Bei einigen Transplantationen keine VD-Kontrolle

✓*: Sporadisch untersucht

grau unterlegt: Mehrzelltransplantationen

Obwohl die 1932 Transplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien A, B, C, D, F, G, H und I) bei 0 bis 30% VD durchgeführt werden sollten, wurde im Rahmen der nachträglichen VD-Kontrolle bei 34 Spendern (=□% aller Spender) eine dorsoventrale Entnahmeposition zwischen 30 und 50% VD festgestellt. Bei den Transplantationsserien C und D wurde sogar weitgehend auf eine VD-Bestimmung verzichtet, da diese Mehrzelltransplantationen hauptsächlich der Eingewöhnung mit dem Fluoreszenzmarker DsRed dienten.

Weiterhin stellte sich im Nachhinein heraus, dass 181 der 1673 im Rumpfmesoderm durchgeführten Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) nicht die in Kapitel 3.3 geforderten Homotopiekriterien für die dorsoventrale Orientierung erfüllten. Der Anteil der so entstandenen VD-heterotopen Transplantationen beträgt 11% an allen Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm und wurde bei der detaillierten Auswertung der verschiedenen Transplantationsserien berücksichtigt.

Die Untersuchung der Empfänger zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten ergab sich durch die Wahl von cell-lineage- und Syncytien-Marker und die aktuelle Fragestellung zum Untersuchungszeitpunkt: Da zum Beispiel die □-Galaktosidase nur nach Präparation mit Hilfe der X-Gal-Färbemethode nachgewiesen werden konnte, beschränkte sich deren Nachweis im Rahmen der Transplantationsserie A auf einen Entwicklungszeitpunkt, nämlich das Wanderlarvenstadium.

Im Falle der mit 2000S RITC-Dextran markierten Spenderembryonen (Transplantationsserie B) hatten Voruntersuchungen ergeben, dass dieser Fluoreszenzmarker während der Larvalentwicklung, bei der die Larve auf ein zweihundertfaches ihrer ursprünglichen Körpergröße anwächst (CHURCH und ROBERTSON, 1966), stark ausdünn. Somit war die Untersuchung der Klone in dieser Transplantationsserie auf ein spätes Embryonalstadium beschränkt.

Mit der simultanen Verwendung der Fluoreszenzmarker DsRed und GFP (ab Transplantationsserie C) ergab sich die Möglichkeit, die transplantierten Zellen und ihre Nachkommen *in vivo* über die gesamte Entwicklung bis hin zur Imago zu verfolgen. Da der cell-lineage-Marker DsRed erst im Laufe der Larvalentwicklung nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 2.3.3.2 und 3.2.1), wurde auf die Untersuchung von Embryonen verzichtet. Die Verfolgung von in der Larve detektierten Klonen über die Metamorphose hinaus wurde im Rahmen der Einarbeitungsphase (Transplantationsserie D) ansatzweise ausprobiert und ab der Transplantationsserie F systematisch betrieben. Der Klonnachweis in Imagines ermöglichte sowohl die Redetektion persistierender larvaler Gewebe als auch den Nachweis der

Durchmischung imaginaler Vorläuferzellen. Um alle Markierungen nachweisen zu können, war jedoch eine Präparation der Imagines unabdingbar. Die Untersuchung von Imagines unterschiedlichen Alters ermöglichte Rückschlüsse auf die postpupalen Differenzierungsgeschehnisse: So war bereits bekannt, dass der larvale Fettkörper in den ersten zwei bis vier Tagen des Adultstadiums vollständig abgebaut wird (WIGGLESWORTH, 1949; BUTTERWORTH, 1972; POSTLETHWAIT und JONES, 1978). Daher wurden alle bis zum Imaginalstadium überlebenden Empfänger – ungeachtet ihrer Markierungen im Wanderlarvenstadium – im Alter von einem bis zu sieben Tagen auf Transplantationsklone untersucht. Die Ausnahme machte dabei die Transplantationsserie D, bei der nur 26 der 85 untersuchten Larven über die Metamorphose hinaus untersucht wurden. Die imaginale Klonauswertung beschränkte sich in diesem Fall auf solche Empfänger, bei denen bereits im Larvenstadium eine Markierung nachgewiesen werden konnte.

In Tabelle 5 sind die absoluten und relativen Transplantationsdaten aller Transplantationsserien bis zur Untersuchung der Empfänger im Wanderlarvenstadium aufgelistet. Für die Transplantationsserien A, C, D, E, F, G, H und I wurden verschiedene Quotienten ermittelt: Während es sich bei der „Schlupfrate“ um den Anteil der geschlüpften Empfängerlarven an der Gesamtzahl der jeweiligen Transplantationen handelt, gibt die „Letalitätsrate_{Larval}“ den Anteil der bis zum Wanderlarvenstadium verstorbenen Empfänger an den geschlüpften Larven wieder. Unter dem Begriff „Überlebensrate_{Larval}“ ist das Verhältnis der untersuchten Wanderlarven zu der Gesamtzahl der jeweiligen Transplantationen zusammengefasst. Die „Klonrate_{Larval}“ gibt den Anteil der untersuchten Wanderlarven mit Klon an der Summe der untersuchten Wanderlarven an. Dieser Quotient wurde sowohl für die cell-lineage-Markierung als auch für den syncytialen Klonanteil ermittelt.

Tabelle 5: Transplantationsdaten bis zum Wanderlarvenstadium

Serie	Transplan- tationen	geschlüpfte Larven	Schlupf- rate	Letalitäts- rate _{Larval}	untersuchte Larven	Überlebens- rate _{Larval}	Larven mit cell- lineage-Klon	Klonrate _{Larval} (cell-lineage)	Larven mit Syncytien-Klon	Klonrate _{Larval} (Syncytien)
A	45	41	91%	17%	34	76%	23	68%	17	50%
B	71	—	—	—	71*	—	33*	46%*	28*	39%*
C	31	23	74%	13%	20	65%	16	80%	14	70%
D	228	138	61%	38%	85	37%	81	95%	75	88%
E	171	130	76%	45%	72	42%	68	94%	15	21%
F	374	288	77%	22%	226	60%	177	78%	133	59%
G	157	128	82%	20%	103	66%	73	71%	49	48%
H	970	802	83%	29%	572	59%	429	75%	362	63%
I	56	45	80%	29%	32	57%	22	69%	15	47%
□	2103	1595	---	---	1144	---	922	---	708	---

— : nicht untersucht

grau unterlegt: Mehrzelltransplantationen

* : Da in der Transplantationsserie B der Klonnachweis nur in abgetöteten Embryonen möglich war, konnte für diese Versuchsreihe nur die „Klonrate_{Embryonal}“ ermittelt werden. Diese befindet sich in der Spalte „Klonrate_{Larval}“ und gibt den Anteil der untersuchten Embryonen mit Klon an der Summe der untersuchten Embryonen wieder.

Beim Vergleich der relativen Transplantationsdaten wurde eine Gemeinsamkeit für alle Transplantationsserien, bei denen die Klonauswertung im Wanderlarvenstadium erfolgte, deutlich: Innerhalb der Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, F, G, H und I) und der Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserien C bis E) lagen die Daten meist näher beieinander als zwischen diesen beiden Transplantationsarten. Daher werden im Folgenden zunächst die Mittelwerte der Quotienten aus Einzelzell- und Mehrzelltransplantationen miteinander verglichen, bevor die Gegenüberstellung bestimmter Transplantationsserien erfolgt.

Während nach den 1602 Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserie A, F, G, H und I) 967 Empfänger (=60%) bis zum Wanderlarvenstadium überlebten, waren es nach den 430 Mehrzelltransplantationen nur 177 Empfänger (=41%). Dieser Unterschied in der Vitalität zeigte sich jedoch nicht nur in der Überlebensrate_{Larval}, sondern bereits in der Schlupf- (81% zu 68%) und der Letalitätsrate_{Larval} (26% zu 39%). Die Zufälligkeit dieser Abweichungen wurde mit Hilfe von Vierfelder- χ^2 -Tests untersucht, bei denen als Nullhypothese postuliert wurde, dass die beiden zu vergleichenden Ereignisse mit der gleichen statistischen Wahrscheinlichkeit auftreten. Der Grenzwert für die Ablehnung der Nullhypothese lag für diese und alle weiteren statistischen Untersuchungen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($P \leq 0,01$). Da die Nullhypothese für die Schlupfrate, die Letalitätsrate_{Larval} und die Überlebensrate_{Larval} jeweils mit $P \leq 0,001$ abgelehnt werden musste, ist die erhöhte embryonale und larvale Letalität der Mehrzelltransplantations-Empfänger nicht zufallsbedingt, sondern beruht auf dieser Transplantationsart.

Weiterhin fällt bei der Klonauswertung auf, dass nach den Einzelzelltransplantationen 75% der untersuchten Empfänger einen cell-lineage-Klon aufwiesen, während es nach den Mehrzelltransplantationen 93% der Tiere waren. Auch für diesen Befund ist die Abweichung nicht zufällig ($P \leq 0,001$), sondern vermutlich methodisch bedingt. Die erhöhte Klonrate nach Mehrzelltransplantationen spiegelt die höhere Wahrscheinlichkeit der Integration und Weiterentwicklung mindestens einer der transplantierten Zellen wider.

Vergleicht man die Klonraten der Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm, bei denen die Klonauswertung im Wanderlarvenstadium erfolgte (Transplantationsserien A, F, G, H und I), so nimmt die Transplantationsserie A mit ihrer *UAS-GFP*, *daGAL4*-Spender- und *UAS-LacZ*-Empfängerlinie scheinbar eine Sonderstellung ein: Während 68% der Empfänger dieser Serie einen cell-lineage-Klon und 50% einen Syncytien-Klon zeigen, liegen die Klonraten bei den Transplantationsserien F bis I (mit einer *DsRed*-Spender- und einer *UAS-GFP*-Empfängerlinie) durchschnittlich bei 75% für cell-lineage-Klone und bei 60% für syncytiale Markierungen. Die beobachtete Abweichung der beiden Klonraten ist

jedoch nur zufällig (mit $P=0,03$ für die cell-lineage-Klonrate und $P=0,32$ für die Syncytien-Klonrate) und hängt nicht von den verwendeten Stämmen ab. Auch der Vergleich der Klonraten nach der Verwendung verschiedener DsRed-Spenderlinien erscheint zunächst auffällig: Während nach den Einzelzelltransplantationen mit der Spenderlinie *UAS-DsRed; daGAL4* (Transplantationsserien F, G und H) insgesamt 75% der Empfänger einen cell-lineage-Klon und 60% einen Syncytien-Klon aufwiesen, sanken die Klonraten_{Larval} bei der Verwendung der *UAS-GAL4; UAS-DsRed; daGAL4*-Spenderlinie (Transplantationsserie I) auf 69% (cell-lineage), beziehungsweise 47% (Syncytien). Diese Differenzen sind jedoch ebenfalls nur rein zufällig (mit $P=0,37$ für die cell-lineage- und $P=0,12$ für die Syncytien-Klonrate).

In den 71 Empfängern der Transplantationsserie B verlief der Klonnachweis im späten Embryo in 33 Fällen (=46%) für cell-lineage-Klone und in 28 Fällen (=39%) für syncytiale Markierungen positiv. Diese beiden Klonraten_{Embryonal} sind deutlich niedriger als die durchschnittlichen larvalen Klonraten aller anderen Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien A, F, G, H und I) mit einer cell-lineage-Klonrate von 75% und einer Syncytien-Klonrate von 60%. Die niedrigeren Klonraten der Transplantationsserie B sind nicht zufällig (jeweils $P<0,001$), sondern vermutlich methodisch bedingt. Dabei ist zu beachten, dass im Falle der Transplantationsserie B alle transplantierten Empfänger, ohne Rücksicht auf ihre Vitalität, untersucht wurden. Diese fehlende Unterscheidung in letale und vitale Empfängerembryonen führte vermutlich zu einer systematischen Absenkung der Klonraten_{Embryonal}.

Im nächsten Schritt wurde ausgewertet, welchem Keimblatt die Klone in den untersuchten Embryonen und Wanderlarven der verschiedenen Transplantationsserien zugeordnet werden konnten (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Keimblattzugehörigkeit der Klone in den untersuchten Embryonen und Larven

Serie	cell-lineage-Klon				Syncytien-Klon			
	Mesoderm	Ektoderm	Mesoderm + Ektoderm	unbekannt	Mesoderm	Ektoderm	Mesoderm + Ektoderm	unbekannt
A	21	2	0	0	17	0	0	0
B	30*	2*	0*	1*	28*	0*	0*	0*
C	15	1	0	0	14	0	0	0
D	46	7	28	0	73	1	1	0
E	1	63	4	0	4	10	1	0
F	137	40	0	0	133	0	0	0
G	53	20	0	0	49	0	0	0
H	376	50	0	3	359	1	0	2
I	16	6	0	0	15	0	0	0
∑	695	191	32	4	692	12	2	2

*: Untersuchung embryonaler Klone

grau unterlegt: Mehrzelltransplantationen

Nach den 1932 im Rumpfmesoderm angestrebten Transplantationen (Transplantationsserien A, B, C, D, F, G, H und I) konnten 722 cell-lineage-Klone (=85%) und 689 Syncytien-Klone (=99,4%) mit einer mesodermalen Keimblattzugehörigkeit nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war der Klonnachweis in den ektodermalen Derivaten für diese Transplantationen auf 18% (cell-lineage), beziehungsweise 0,4% (Syncytien) beschränkt. Das Auftreten ektodermaler Klone ist nach Transplantationen im Rumpfmesoderm generell möglich, wenn Zellen aus einer mesodermalen Grenzposition entnommen wurden. Da für das gesamte Ektoderm jedoch bisher eine mononucleäre Organisation postuliert wurde, überraschte der Nachweis syncytialer Markierungen in ektodermalen Derivaten. Der Syncytiennachweis verlief jedoch auch in 11 von 67 ektodermalen Klonen (=16%) der Transplantationsserie E (Mehrzelltransplantationen im Ektoderm) positiv. Die genaue Gewebzugehörigkeit, Morphologie und Ausdehnung dieser Klone wird im Laufe der weiteren Auswertung (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.7) besprochen.

Nach den 171 im Ektoderm angestrebten Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserie E) konnten 93% aller cell-lineage- und 67% aller Syncytien-Klone in rein ektodermalen Derivaten detektiert werden. In wenigen Fällen (1% der cell-lineage- und 27% der Syncytien-Klone) wurden Markierungen in rein mesodermalen Derivaten entdeckt, welche auf Zellentnahmen im Keimblattgrenzbereich zurückzuführen sind. Zusätzlich traten, wie auch schon für die im Rumpfmesoderm angestrebten Mehrzelltransplantationen gezeigt, in seltenen Fällen Keimblatt-überlappende Klone auf (6% der cell-lineage- und 7% der Syncytien-Klone). Solche Überlappungen zwischen mesodermalen und ektodermalen

Derivaten konnten nur nach Mehrzelltransplantationen beobachtet werden. Da die Keimblätter im zellulären Blastoderm und somit zum Transplantationszeitpunkt bereits determiniert sind (BEER et al., 1987; MEISE und JANNING, 1993; HOLZ et al., 1997), können sich die Nachkommen einer einzelnen transplantierten Zelle nur zu Derivaten eines definierten Keimblattes entwickeln. Werden mehrere Zellen mit unterschiedlicher Keimblattzugehörigkeit transplantiert, so können die hieraus hervorgehenden Transplantationsklone an dementsprechend vielen Bildungsleistungen teilhaben.

In vier Fällen wurden nach den im Rumpfmesoderm angestrebten Einzelzelltransplantationen cell-lineage-Klone unbekannter Keimblattzugehörigkeit detektiert, von denen zwei sogar den Syncytien-Marker GFP exprimierten. Bei diesen nicht-überlappenden Klonen war es nicht möglich, von ihrer Morphologie und Position auf ein definiertes Gewebe oder Keimblatt zurück zu schließen.

Bei fünf der neun Transplantationsserien wurden die Empfänger – zusätzlich zum larvalen Klonnachweis – als Imagines auf potenzielle Markierungen untersucht. Damit diese Transplantationsserien (D, F, G, H und I) besser miteinander verglichen werden können, sind alle absoluten und relativen Transplantationsdaten in der Tabelle 7 aufgeführt. Für die Auswertung dieser Untersuchungsreihen wurden die Quotienten „Letalitätsrate_{Pupal}“, „Überlebensrate_{Imaginal}“ und „Klonrate_{Imaginal}“ eingeführt: Die „Letalitätsrate_{Pupal}“ gibt dabei den Anteil der nicht-geschlüpften Imagines an den untersuchten Larven wieder. Da die untersuchten Larven der verschiedenen Transplantationsserien teilweise präpariert oder in seltenen Fällen versehentlich bei der Untersuchung zerquetscht wurden, bezieht sich dieser Quotient auf die Summe der nicht-präparierten Larven. Die „Überlebensrate_{Imaginal}“ setzt die untersuchten Imagines zu der Summe der Transplantationen ins Verhältnis, während unter dem Begriff „Klonrate_{Imaginal}“ der Anteil der untersuchten Imagines mit Klon an den untersuchten Imagines zu verstehen ist. Erneut wurde dieser Quotient nicht nur für die cell-lineage-Markierung, sondern auch für den syncytialen Klonanteil ermittelt.

Tabelle 7: Transplantationsdaten für die postlarvalen Untersuchungen

Serie	präparierte Larven	letale Puppen	Letalitätsrate _{Pupal}	untersuchte Imagines	Überlebensrate _{Imaginal}	Imagines mit cell-lineage-Klon	Klonrate _{Imaginal} (cell-lineage)	Imagines mit Syncytien-Klon	Klonrate _{Imaginal} (Syncytien)
D	56	13	45%	16	—	10	63%	4	25%
F	2	127	57%	97	26%	25	26%	7	7%
G	1	78	76%	24	15%	5	21%	1	4%
H	4	332	58%	236	24%	69	29%	28	12%
I	—	18	56%	14	25%	6	43%	1	7%
□	189	568	---	387	---	115	---	41	---

—: nicht untersucht

*: Untersuchung embryonaler Klone
grau unterlegt: Mehrzelltransplantationen

Beim Vergleich der Klondaten ist zu beachten, dass in die postlarvale Untersuchungsphase der Transplantationsserie D nur 26 Empfänger eingingen, in welchen allesamt bereits im Larvenstadium ein Klon nachgewiesen werden konnte. Da für die Transplantationsserien F

bis I alle überlebenden Imagines – ungeachtet ihrer larvalen Markierung – ausgewertet wurden, können deren Klonraten_{Imaginal} nicht mit denen der vorselektierten Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserie D) verglichen werden. Weiterhin kann für die Transplantationsserie D keine Überlebensrate_{Imaginal} ermittelt werden, da bei diesem Quotienten die untersuchten Imagines zu der Summe der Transplantationen ins Verhältnis gesetzt werden und hier nur ein Bruchteil der Empfänger weiter ausgewertet wurde.

Beim Vergleich der Letalitätsraten_{Pupal} fällt auf, dass dieser Wert mit 45% nach den Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserie D) deutlich niedriger ausfällt als der Durchschnittswert nach den Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien F bis I) mit 60%. Diese Abweichung ist jedoch rein zufällig ($P \geq 0,1$). Im Gegensatz dazu ist die deutlich erhöhte Letalitätsrate_{Pupal} der Transplantationsserie G von 76%, verglichen mit der durchschnittlichen Letalitätsrate_{Pupal} der restlichen Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien F, H und I mit 58%), nicht zufällig ($P \leq 0,001$), sondern vermutlich methodisch bedingt. Da sich die letztgenannten Transplantationsserien nur in ihrem Transplantationsbereich unterscheiden, müssen für die erhöhte Letalität in der Transplantationsserie G äußere Faktoren wie die Raumtemperatur oder der Zustand des Futters in Betracht gezogen werden.

Wie schon bei der Auswertung der Einzelzelltransplantationen im Wanderlarvenstadium vermerkt wurde (siehe Tabelle 5), war auch bei der anschließenden Untersuchung im Adultstadium der Anteil der cell-lineage-Klone immer größer als der Anteil syncytialer Markierungen. Dieser Befund ist erneut darauf zurückzuführen, dass der Syncytien-Marker nur in dem cell-lineage-Anteil nachgewiesen werden kann, in dem eine Fusion von Spender- und Empfängerzellen stattgefunden hat.

Vergleicht man die Klonraten_{Imaginal} aller Einzelzelltransplantationen miteinander, so scheinen der cell-lineage-Klonanteil der Transplantationsserie I (=43%) und der Syncytien-Klonanteil der Transplantationsserie H (=12%) gegenüber dem Mittelwert der anderen Transplantationsserien (28% (cell-lineage), beziehungsweise 7% (Syncytien)) deutlich erhöht zu sein. Im Vierfelder- χ^2 -Test zeigt sich jedoch, dass diese Abweichungen rein zufällig sind (mit $P \geq 0,22$ (cell-lineage) und $P \geq 0,1$ (Syncytien)).

Ein Vergleich der durchschnittlichen larvalen (siehe Tabelle 5) und imaginalen Klonraten (siehe Tabelle 7) nach Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien F, G, H und I) enthüllt, dass weitaus mehr Larven einen cell-lineage-Klon (75%) aufweisen als die überlebenden Imagines (28%). Diese eindeutige Diskrepanz zwischen den verschiedenen Untersuchungsstadien kommt dadurch zustande, dass die meisten larvalen Klone während

der Metamorphose histolysiert und durch imaginale Gewebe ersetzt werden. Der Nachweis eines cell-lineage-Klons ist im Adultstadium somit nur möglich, wenn sich eine bereits in der Larve markierte imaginale Vorläuferzelle ausdifferenziert oder ein larvaler cell-lineage-Klon die Metamorphose überdauert.

Weiterhin ist der Anteil der syncytialen Markierungen an den detektierten cell-lineage-Klonen nach den Einzelzelltransplantationen sehr verschieden: Während er für die untersuchten Larven bei 80% liegt, beträgt dieser Wert bei den zugehörigen Imagines nur 25%. Diese Abweichung ist nicht zufällig (mit $P < 0,001$).

Um die Klone differenzierter auswerten zu können, wurde die Keimblattzugehörigkeit der Klone in den untersuchten Imagines der verschiedenen Transplantationsserien ermittelt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Keimblattzugehörigkeit der Klone in den untersuchten Imagines

Serie	cell-lineage-Klon			Syncytien-Klon	
	Mesoderm	Ektoderm	unbekannt	Mesoderm	Ektoderm
D	9	0	1	4	0
F	20	5	0	7	0
G	4	1	0	1	0
H	59	10	0	28	0
I	6	0	0	1	0
Σ	98	16	1	41	0

grau unterlegt: Mehrzelltransplantationen

Da alle der hier ausgewerteten Transplantationen angestrebt im Rumpfmesoderm durchgeführt wurden, war die Mehrzahl (=85%) aller cell-lineage-Klone mesodermalen Ursprungs. Der Anteil von 14% ektodermaler cell-lineage-Klone ist auf eine Zellentnahme aus einer mesodermalen Randposition zurückzuführen. Nach einer Mehrzelltransplantation (Transplantationsserie D) konnte im Adultstadium eine reine cell-lineage-Markierung im abdominalem Glia- oder Nervengewebe detektiert werden, die im Wanderlarvenstadium nicht nachgewiesen werden konnte. Da es sich außerdem um einen nicht-überlappenden Klon handelte, war dessen Zuordnung zu einem definierten Keimblatt unmöglich. Der Nachweis von syncytialen Markierungen war nur in mesodermalen Derivaten möglich und beschränkte sich auf 41 von 387 untersuchte Imagines (=11%).

In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen Transplantationsserien chronologisch ausgewertet. Im Hinblick auf die verschiedenen Fragestellungen werden die detektierten cell-lineage- und Syncytien-Markierungen der unterschiedlichen Untersuchungsstadien an entsprechender Stelle verglichen. Dort finden sich auch Aussagen über die Klongrößen, -überlappungen und -persistenzen.

3.5 Transplantationen zur Bestätigung der System-Selektivität

Wie schon in Kapitel 3.2 beschrieben wurde, konnte die Selektivität des Syncytien-Nachweises bei der Durchführung der GAL4/UAS-Transplantationstechnik bislang nur indirekt durch fehlende Markierungen in mononucleären Geweben bestätigt werden (HEUSER, 1999). Um die Methode zu verifizieren und für weitere Untersuchungen nutzen zu können, wurden der cell-lineage-Klonanteil und die syncytiale Markierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit parallel analysiert. Mit Hilfe verschiedener Doppelmarkierungen konnte die Selektivität des Syncytien-Nachweises dabei in jedem einzelnen Empfänger direkt überprüft werden. Außerdem war neben dem Nachweis von Zellfusionen auch die Untersuchung aller Nachkommen der transplantierten Zelle möglich, womit auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten dieser Zelle zurück geschlossen werden konnte. Die zusätzliche Markierung der cell-lineage erfolgte zum einen mit genetisch (siehe Kapitel 3.5.1) und zum anderen mit Farbstoff-markierten (siehe Kapitel 3.5.2) Spenderembryonen.

3.5.1 Homotope Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm bei 40% EL aus der Spenderlinie *UAS-GFP; daGAL4* in die Empfängerlinie *UAS-lacZ* (Serie A; GFP/lacZ-Doppelmarkierungsmethode)

Um simultan cell-lineage- und Syncytien-Klone im gleichen Individuum zu erzeugen, wurden im zellulären Blastodermstadium einzelne Zelle der Linie *UAS-GFP; daGAL4* in Empfängerembryonen der Linie *UAS-lacZ* transplantiert (siehe Abbildung 12).

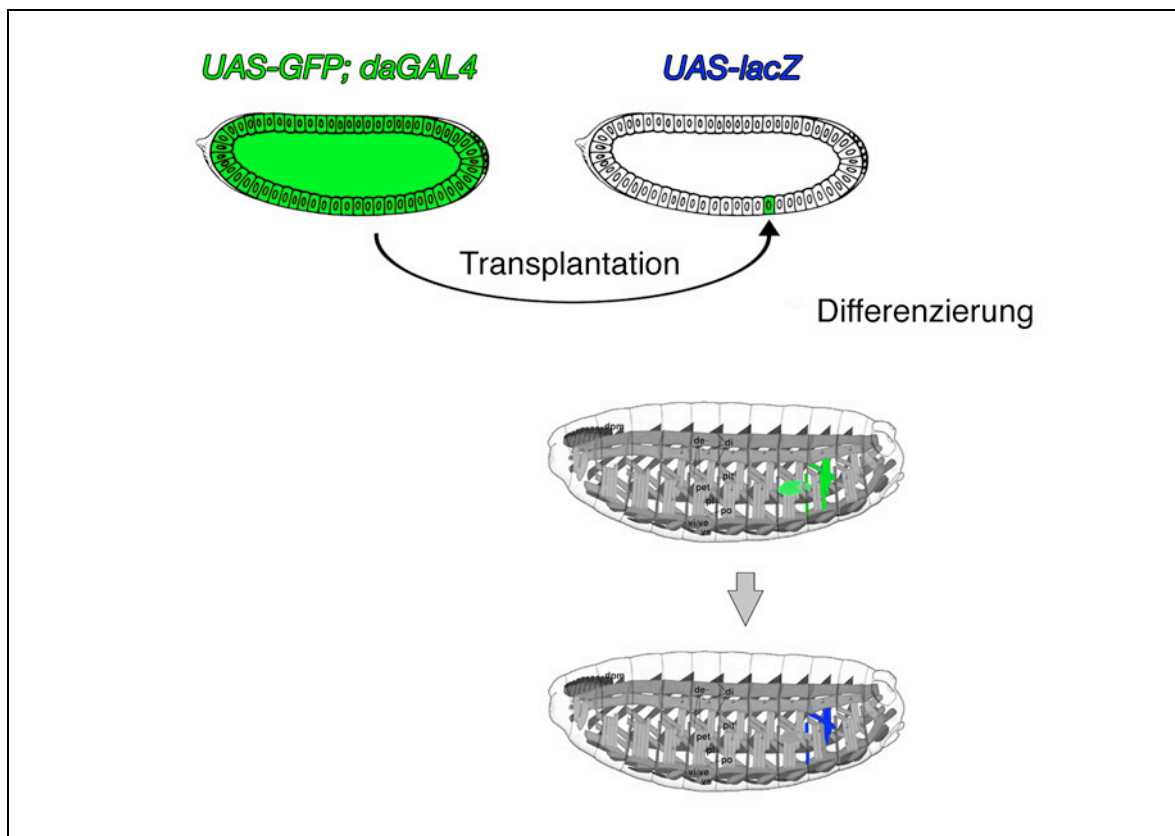


Abbildung 12: Modell zur GFP/lacZ-Doppelmarkierungsmethode.

Werden Zellen aus *UAS-GFP; daGAL4* in *UAS-lacZ*-Embryonen transplantiert, so können alle Nachkommen dieser Zellen aufgrund ihrer *GFP*-Expression *in vivo* detektiert werden (hier dargestellt für einige somatische Muskeln und wenige Fettkörperzellen (grün)). Weil die Induktion der *lacZ*-Expression eine Kolokalisation des *GAL4*-Transkriptionsfaktors und des *UAS-lacZ*-Konstrukts in einem gemeinsamen Cytoplasma erfordert und eine zellautonome Restriktion des *GAL4* postuliert werden kann, ist dieses Ereignis auf heterogene Syncytien beschränkt (hier verdeutlicht für einige somatische Muskeln (blau)). Da der Nachweis der gebildeten β -Galaktosidase präparativ erfolgt, kann der Vergleich von cell-lineage- und Syncytien-Klon nur retrospektiv erfolgen.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle konnten im Wanderlarvenstadium aufgrund ihrer cytoplasmatischen *GFP*-Expression mit Hilfe eines Inversen Fluoreszenzmikroskops *in vivo* detektiert und dokumentiert werden. Bei der anschließenden Präparation und X-Gal-Färbung der Empfängerlarven beschränkte sich der β -Galaktosidase-Nachweis auf das

Cytoplasma jener Gewebe, die durch die Fusion von Spender- und Empfängerzellen entstanden sind.

Im Rahmen der Transplantationsserie A wurden 45 homotope Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm durchgeführt, aus denen 34 Empfänger bis zum Wanderlarvenstadium überlebten (=76%). In 23 dieser Empfänger konnte ein cell-lineage-Klon (=58%) und in 17 eine syncytiale Markierung (=50%) nachgewiesen werden. Diese Klone betreffen sind in der nachfolgenden Tabelle 9 aufgeführt:

Tabelle 9: Klonverteilung nach homotopen Einzelzelltransplantationen mit der GFP/lacZ-Doppelmarkierungsmethode

cell-lineage-Klon	Anzahl	korrespondierender Syncytien-Klon	Anzahl
Nicht-überlappende Klone			
SM	12 (2*)	SM	12 (2*)
FK	1	—	—
PNS	1	—	—
ZNS	1 (1*)	—	—
unbekannte Struktur	2 (1*)	—	—
Zwischensumme	17 (4*)	Zwischensumme	12 (2*)
Zwei Gewebe-überlappende Klone			
SM und FK	1	SM	1
SM und long. VM	1	SM	1
SM und IM	1	SM	1
SM und Glia	2	SM	1
Zwischensumme	5	Zwischensumme	4
Drei Gewebe-überlappende Klone			
SM, FK und IM	1	SM	1
Summe	23 (4*)	Summe	17 (2*)

SM: Somatische Muskulatur; FK: Fettkörper; PNS: Peripheres Nervensystem; ZNS: Zentrales Nervensystem; long. VM: longitudinale viscerale Muskulatur; IM: Imaginaler Muskelvorläufer
 —: keine Markierung detektiert
 alle mit * gekennzeichneten Klone stammen aus heterotopen Transplantationen

In den 23 cell-lineage-Klonen waren die Markierungen zum Großteil auf ein Gewebe beschränkt (=74%), sie konnten aber auch zwischen zwei (=22%) oder drei Geweben (=4%) überlappen. Dabei waren stets nur Derivate eines Keimblatts markiert. Die vier Klone aus heterotopen Transplantationen werden in die weitere Auswertung miteinbezogen, da nur Aussagen zum Verhältnis der Markierungen getroffen werden und keine Anlagenkartierung durchgeführt wird.

Beim Vergleich der cell-lineage-Klone und der korrespondierenden Syncytien-Klone fiel auf, dass die Expression des *lacZ*-Syncytien-Markers in allen Fällen auf den Klonanteil in der larvalen somatischen Muskulatur beschränkt war. Der Syncytien-Marker konnte niemals in mononucleären Geweben wie dem Fettkörper (drei Klone; siehe Abbildung 13), dem Nervensystem (ein Klon im Ventralganglion (= ZNS) und ein Klon in einer Sinneszelle (= PNS)), den imaginalen Muskelvorläufern (zwei Klone) oder der mesodermalen Glia (zwei Klone) detektiert werden, was die Selektivität des GAL4/UAS-Transplantationssystems bestätigt.

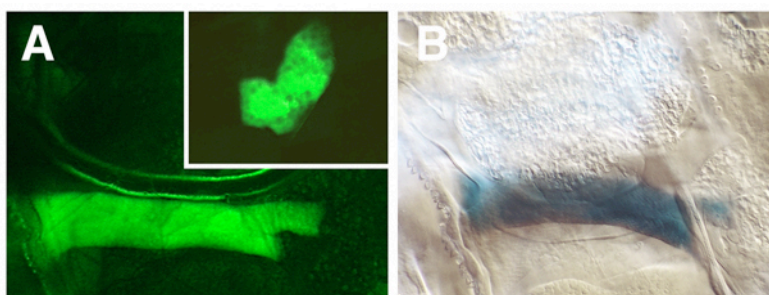


Abbildung 13: Überlappender Klon zwischen larvaler somatischer Muskulatur und Fettkörper.

Während der cell-lineage-Marker *GFP* in einem larvalen somatischen Muskel und zwei Fettkörperzellen exprimiert wird (A), beschränkt sich der Nachweis des Syncytien-Marker *lacZ* auf den larvalen somatischen Muskel (B). Der Fettkörperanteil ist in der Abbildung A separiert dargestellt, weil diese Markierung fernab der Muskelmarkierung detektiert wurde.

Auch bei dem Klon in der longitudinalen visceralen Muskulatur, einem als syncytial beschriebenen Gewebe (HEUSER, 1999; KLAPPER et al., 2001, 2002; SAN MARTIN et al., 2001), fiel der Nachweis des Syncytien-Markers negativ aus. In zwei weiteren Fällen wurden reine cell-lineage-Klone detektiert, welche aufgrund ihrer Größe und Position keinem bekannten Gewebe zugeordnet werden konnten. Da diese unbekannt Strukturen nicht mit Markierungen in anderen Geweben überlappten, konnte auch deren Keimblattzugehörigkeit nicht geklärt werden (siehe Kapitel 3.4).

Innerhalb der somatischen Muskulatur waren ein bis acht Muskeln markiert (\emptyset 3,3 Muskeln pro Klon), wobei die syncytiale Markierung niemals größer als die cell-lineage-Markierung ausfiel (siehe Abbildung 13 und 14). Bei der Auswertung der markierten Muskelklone bezüglich ihrer räumlichen Anordnung wurden keine segmentalen Zugehörigkeiten, sondern nur Halbseitenverteilungen notiert. Dabei fiel auf, dass nur 11% der Klone bilateral vorlagen, während 56% auf die linke und 33% auf die rechte Körperhälfte beschränkt waren. Bei den meisten Klonen waren ventrale Muskeln markiert (89%), während nur 28% der Markierungen in lateralen und 17% in dorsalen Muskeln nachgewiesen werden konnten (Mehrfachnennungen sind möglich).

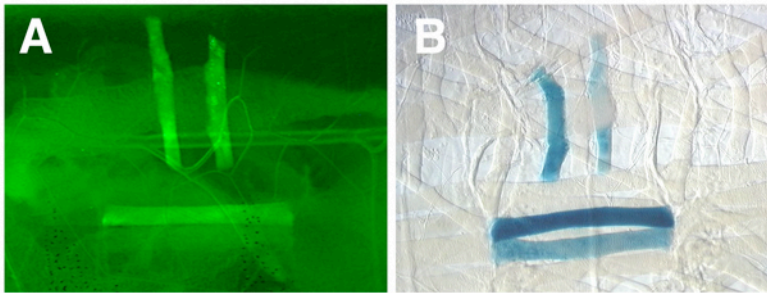


Abbildung 14: Klon in der larvalen somatischen Muskulatur.

Der cell-lineage-Marker *GFP* (A) und der Syncytien-Marker *lacZ* (B) werden unterschiedlich stark in denselben vier somatischen Muskeln exprimiert. Somit sind alle Nachkommen der transplantierten Zelle an der Ausbildung heterogener Syncytien beteiligt.

3.5.2 Homotope Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm bei 40% EL aus der 2000S RITC-Dextran-markierten Spenderlinie *UAS-GFP* in die Empfängerlinie *daGAL4* (Serie B; RITC-Dextran/GFP-Doppelmarkierungsmethode)

Das GFP/*lacZ*-Doppelmarkierungssystem (siehe Kapitel 3.5.1) hat den Nachteil, dass der Nachweis von β -Galaktosidase und GFP nicht simultan erfolgen kann und die Empfänger für den Nachweis syncytialer Markierungen präpariert werden müssen. Da die klonale Analyse bei diesem System somit nur indirekt und retrospektiv möglich ist, wurde für die weiteren Untersuchungen eine doppelte *in vivo*-Markierung angestrebt. Weil zu diesem Zeitpunkt jedoch nur das fluoreszierende Protein GFP in *Drosophila melanogaster* etabliert war, musste auf die Injektion eines Fluoreszenzfarbstoffs zurückgegriffen werden.

Um die cell-lineage zu markieren, wurde den Spenderembryonen der Linie *UAS-GFP* im Präblastodermstadium der rote Fluoreszenzfarbstoff 2000S RITC-Dextran injiziert (siehe Abbildung 15). Dieser Farbstoff wird in die zu transplantierende Zelle eingelagert und bei den folgenden Zellteilungen an deren Tochterzellen weitergegeben, weshalb nach der Transplantation in *daGAL4*-Empfänger der Nachweis des gesamten cell-lineage-Klons möglich war. Im Gegensatz dazu blieb die Induktion der *GFP*-Expression auf heterogene Syncytien beschränkt, da dieser Prozess die Interaktion von Spender- und Empfänger-kernen erfordert. Weil es sich beim GFP ebenfalls um einen Fluoreszenzmarker handelt, konnten mit dieser Methode die cell-lineage-Klone und die korrespondierenden syncytialen Markierungen mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskops simultan detektiert werden. Dazu wurden die beiden Fluoreszenzsignale getrennt aufgezeichnet und später mit digitaler Bildbearbeitungssoftware zu einem Überlagerungsbild zusammengesetzt. Da Voruntersuchungen ergeben hatten, dass das RITC-Dextran während der Larvalentwicklung bis unter die Nachweisgrenze ausdünn, wurden mit dieser Methode nur Empfänger in späten Embryonalstadien untersucht.

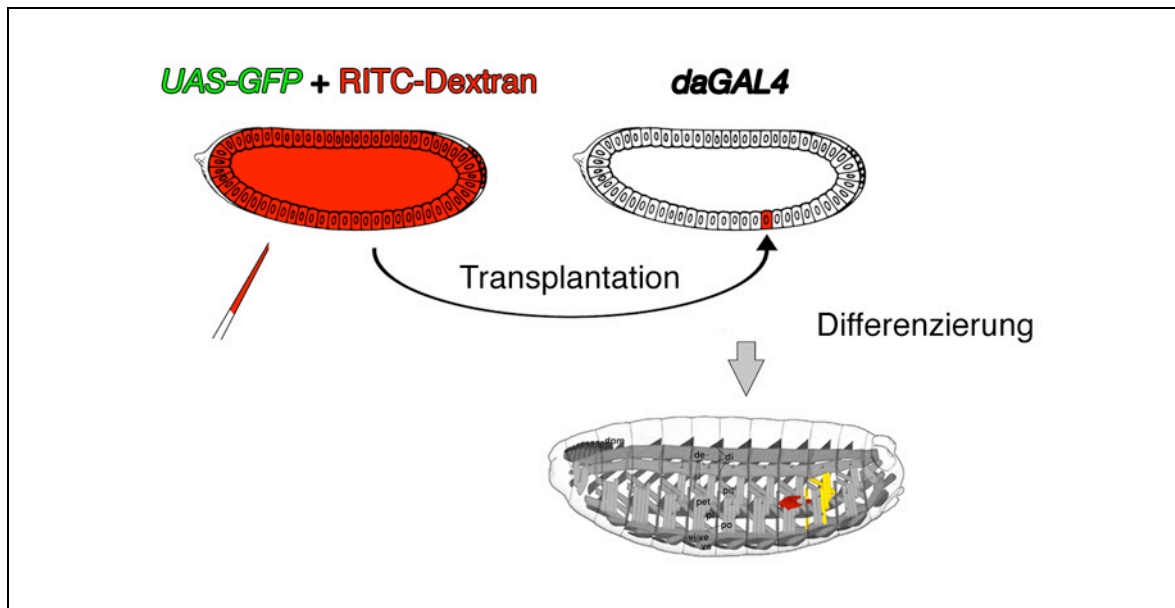


Abbildung 15: Modell zur RITC-Dextran/GFP-Doppelmarkierungsmethode.

Um alle Nachkommen der transplantierten Zelle zu detektieren, wird den *UAS-GFP*-Spenderembryonen im Präblastodermstadium der rote Fluoreszenzfarbstoff 2000S RITC-Dextran injiziert. Anschließend werden diese vorbehandelten Zellen in Empfänger der Linie *daGAL4* transplantiert. In den ausdifferenzierten Empfängern sind alle mononucleären Gewebe, die nur von den Nachkommen der transplantierten Zelle abstammen, mit RITC-Dextran markiert (hier gezeigt für einige Fettkörperzellen (rot)). Die zusätzliche *GFP*-Expression ist auf Syncytien beschränkt, die Kerne der Spender- und der Empfängerlinie enthalten (hier dargestellt für einige larvale somatische Muskeln; die Detektion beider Marker erscheint im Überlagerungsbild gelb).

Für die Transplantationsserie B wurden 71 homotope Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm durchgeführt. Alle Empfänger wurden zum Ende der Embryonalentwicklung abgetötet und konfokal auf Markierungen untersucht. Dabei konnten in 33 Fällen (=46%) cell-lineage-Klone detektiert werden, von denen 28 zusätzlich eine syncytiale Markierung aufwiesen. Die beobachteten Klone sind in der Tabelle 10 aufgelistet:

Tabelle 10: Klonverteilung nach homotopen Einzelzelltransplantationen mit der RITC-Dextran/GFP-Doppelmarkierungsmethode

cell-lineage-Klon	Anzahl	korrespondierender Syncytien-Klon	Anzahl
Nicht-überlappende Klone			
SM	19 (2*)	SM	19 (2*)
FK	2	—	—
circ. VM	1	circ. VM	1
ZNS	2	—	—
unbekannte Struktur	1	—	—
Zwischensumme	25 (2*)	Zwischensumme	20 (2*)
Zwei Gewebe-überlappende Klone			
SM und FK	5	SM	5
SM und circ. VM	1	SM und circ. VM	1
SM und unbekannte Struktur	2	SM und unbekannte Struktur SM	1 1
Zwischensumme	8	Zwischensumme	8
Summe	33 (2*)	Summe	28 (2*)

SM: Somatische Muskulatur; FK: Fettkörper; circ. VM: circuläre viscerale Muskulatur; ZNS: Zentrales Nervensystem

—: keine Markierung detektiert

alle mit * gekennzeichneten Klone stammen aus heterotopen Transplantationen

In 25 cell-lineage-Klonen war die Markierung auf ein Gewebe beschränkt, während sie in acht Fällen zwischen zwei mesodermalen Derivaten überlappte. Bei zwei der Gewebe-überlappenden Klone erfolgte der Nachweis in einer unbekanntem Struktur. Für den Vergleich der cell-lineage-Klone und der korrespondierenden syncytialen Markierungen wurden auch die beiden Klone aus heterotopen Transplantationen herangezogen. Es zeigte sich, dass die Expression des Syncytien-Markers *GFP* auf die somatische Muskulatur, die circuläre viscerale Muskulatur und eine unbekanntem Struktur beschränkt war, während er niemals in mononucleären Geweben wie dem Fettkörper (sieben Klone, siehe Abbildung 16) oder dem Nervensystem (zwei Klone im Ventralganglion (inklusive der abgehenden Motoneurone)) detektiert werden konnte. Somit konnte erneut die Selektivität des Syncytien-Nachweises beim Gebrauch des GAL4/UAS-Transplantationssystem bestätigt werden.

Die 27 Klone in der somatischen Muskulatur wurden bei dieser Transplantationsserie nur auf ihre Größe, das heißt die Anzahl der markierten Muskeln pro Klon, untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein bis zehn Muskeln markiert sein konnten ($\bar{\emptyset}$ 3,7 Muskeln pro Klon), wobei die syncytiale Markierung nie die cell-lineage-Markierung überschritt.

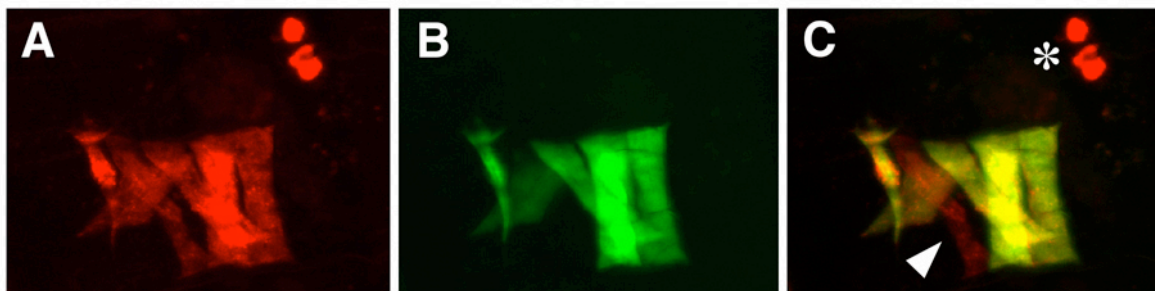


Abbildung 16: Überlappende Klon zwischen embryonaler somatischer Muskulatur und Fettkörper.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle sind durch den cell-lineage-Marker RITC-Dextran rot markiert (A), während die heterogenen Syncytien zusätzlich *GFP* exprimieren (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass der Syncytien-Marker *GFP* nicht im mononucleären Fettkörper exprimiert wird (*). In diesem Gewebe kann nur der cell-lineage-Marker detektiert werden. Im Gegensatz dazu sind die meisten somatischen Muskeln doppelmarkiert und repräsentieren somit Syncytien aus klonal nicht-verwandten Zellen. Nur ein somatischer Muskel setzt sich ausschließlich aus Nachkommen der transplantierten Zelle zusammen, weshalb in ihm ausschließlich der cell-lineage-Marker detektiert werden kann (Pfeilspitze).

In den beiden Klonen in der circulären visceralen Muskulatur waren in einem Fall zwei Muskeln doppelmarkiert, während bei dem anderen Klon in einem der acht markierten Muskeln nur der cell-lineage-Marker detektiert werden konnte (siehe Abbildung 17). Die genaue Analyse der markierten Muskeln ergab, dass diese dinucleär organisiert waren und eine Hälfte des Mitteldarms umschlossen. Der Befund, dass die circuläre viscerale Muskulatur des Mitteldarms aus dinucleären Syncytien aufgebaut ist, konnte auch im Rahmen der weiteren Transplantationen bestätigt werden (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.7.3).

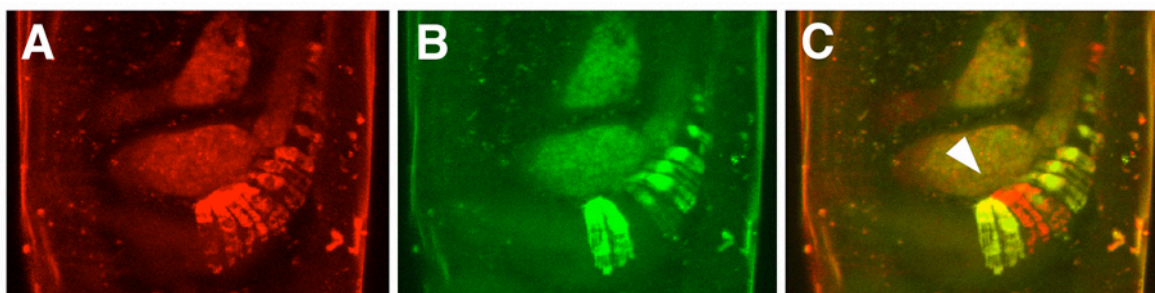


Abbildung 17: Klon in der circulären visceralen Muskulatur eines Embryos im Stadium 17.

Während in allen Nachkommen der transplantierten Zelle der cell-lineage-Marker RITC-Dextran nachgewiesen werden kann (A), ist die Expression des Syncytien-Markers *GFP* auf Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass sieben der acht RITC-Dextran-markierten circulären visceralen Muskeln den Syncytien-Marker exprimieren. Somit setzt sich nur ein circulärer visceraler Muskel ausschließlich aus Nachkommen der transplantierten Zelle zusammen (Pfeilspitze).

3.6 Transplantationen zur Etablierung der DsRed/GFP-Methode

Weil die RITC/GFP-Doppelmarkierungsmethode präparativ sehr aufwendig und auf den Klonnachweis im Embryonalstadium beschränkt ist, wurde nach einer anderen Möglichkeit der simultanen *in vivo*-Markierung gesucht. Die Wahl fiel auf eine genetische Markierung, da diese Methode die Verfolgung der Transplantationsklone über die gesamte Entwicklung ermöglichen sollte. Daher wurde das *DsRed*-Gen der Seeanemone *Discosoma sp.* unter die Kontrolle eines *UAS*-Promotors kloniert (siehe Abbildung 18A und B), in das *Drosophila*-Genom eingeschleust und auf seine Expressionsfähigkeit getestet (siehe Kapitel 2.3.3.2 und 3.2.1; Abbildung 18C). Weil sich die Fluoreszenzspektren der Proteine DsRed und GFP stark voneinander abgrenzen (MATZ et al., 1999; PATTERSON et al., 2001; siehe Abbildung 18D) und die zugehörigen Gene koexprimiert werden können (eigene Voruntersuchungen; MATZ et al., 1999; BLOEMBERG et al., 2000; LAIRD et al., 2001; LAUF et al., 2001; FINLEY et al., 2001), wurden diese beiden genetischen Marker für alle folgenden Transplantationen (Transplantationsserien C bis I) genutzt.

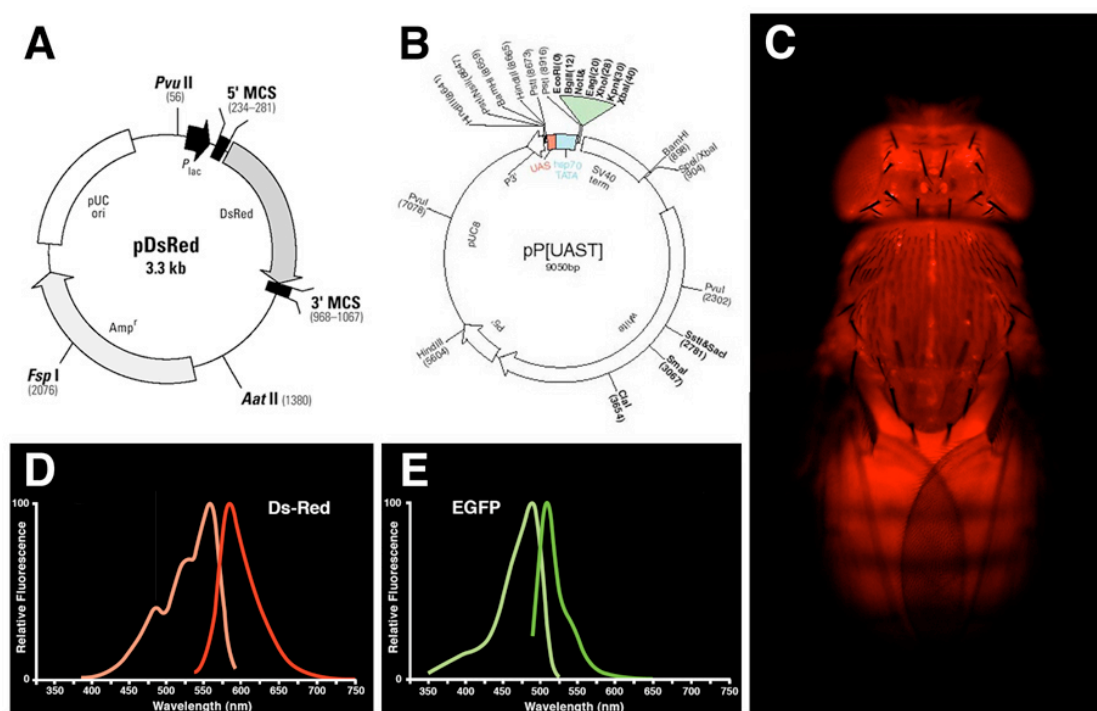


Abbildung 18: Die Etablierung transgener *UAS-DsRed*-Linien.

- A) Das pDsRed-Plasmid der Firma Clontech (entnommen von der Homepage der Firma Clontech: http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors_dis/pDsRed.shtml).
- B) Der Integrationsvektor pUAST (entnommen von der Homepage der Arbeitsgruppe von Andrea Brand: <http://www.welc.cam.ac.uk/~brandlab/reagents/pUAST.html>).
- C) Ubiquitäre *DsRed*-Expression in einer Imago der Linie *UAS-DsRed; daGAL4*.
- D) Fluoreszenzspektrum des Proteins DsRed (verändert nach PATTERSON et al., 2001).
- E) Fluoreszenzspektrum des Proteins S65T-GFP (verändert nach PATTERSON et al., 2001).

Nach der Transplantation einzelner Zellen der Linie *UAS-DsRed; daGAL4* in *UAS-GFP*-Empfänger wird der Marker *DsRed* in der gesamten cell-lineage exprimiert, während die *GFP*-Expression auf die Interaktion von Spender- und Empfängerkernen angewiesen und somit auf syncytiale Klonanteile unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt ist (siehe Abbildung 19).

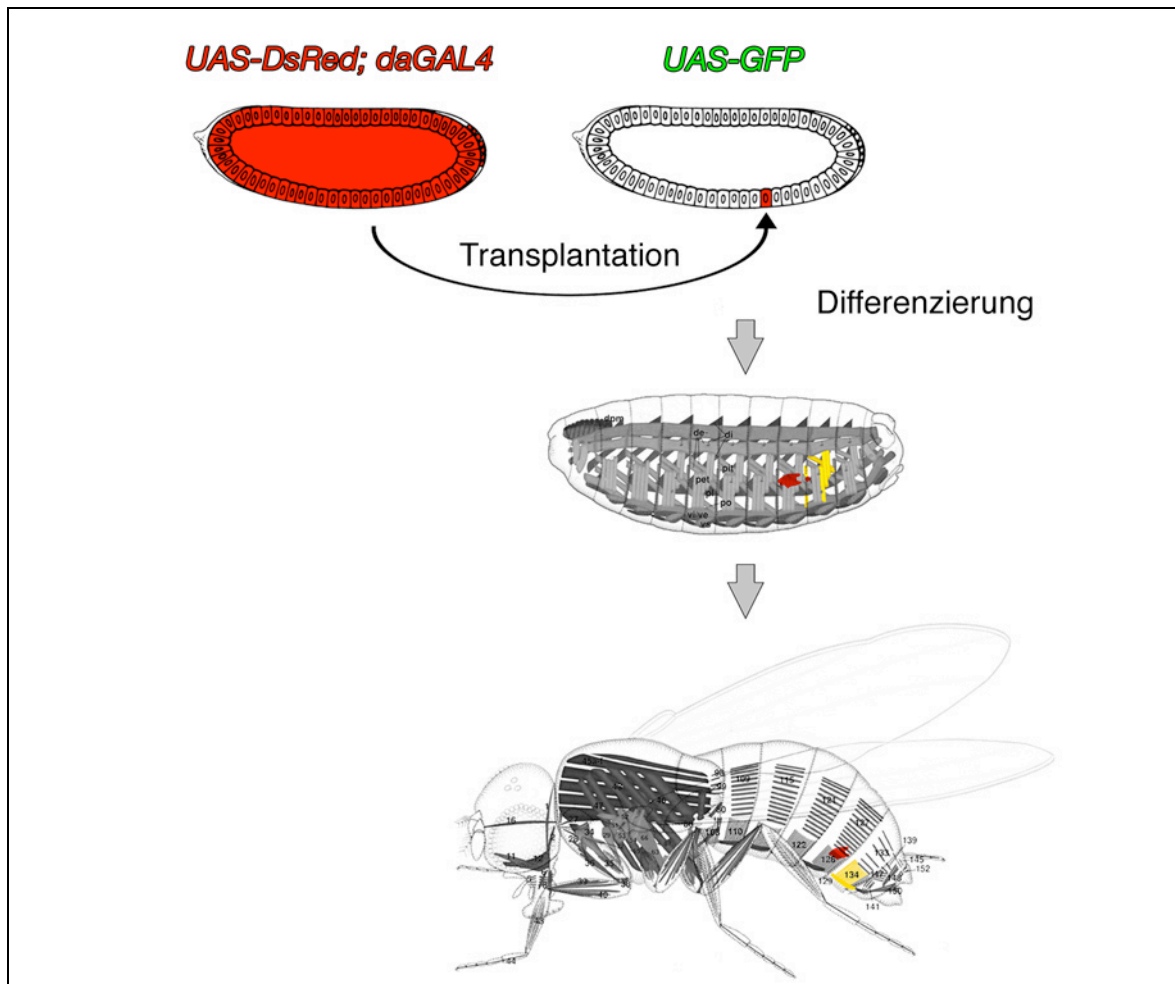


Abbildung 19: Schematische Darstellung der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode.

Werden Zellen aus *UAS-DsRed; daGAL4* in *UAS-GFP*-Embryonen transplantiert, so können alle Nachkommen dieser Zellen aufgrund ihrer *DsRed*-Expression detektiert werden. Weil die Induktion der *GFP*-Expression eine Kolokalisation des *GAL4*-Transkriptionsfaktors und des *UAS-GFP*-Konstrukts in einem gemeinsamen Cytoplasma erfordert, ist dieses Ereignis auf heterogene Syncytien beschränkt.

Werden die ausdifferenzierten Empfänger untersucht, so kann in allen mononucleären Geweben, die von den Nachkommen der transplantierten Zelle abstammen, ausschließlich der cell-lineage-Marker *DsRed* nachgewiesen werden (rot; hier gezeigt für einige Fettkörperzellen und einen imaginalen Muskelvorläufer). In heterogenen Syncytien (wie der larvalen somatischen Muskulatur) ist eine Überlappung der *DsRed*- und *GFP*-Expression zu beobachten, welche im Überlagerungsbild gelb erscheint.

Während der Metamorphose werden die meisten larvalen Gewebe abgebaut und aus den stark proliferierenden imaginalen Zellen entwickelt sich die spätere Fliege. Die Nachkommen der transplantierten Zelle können aufgrund ihrer kontinuierlichen *DsRed*-Expression auch im Adultstadium nachgewiesen werden (hier rot dargestellt für einige imaginale somatische Muskeln), während die Induktion der *GFP*-Expression nur nach der Durchmischung und Fusion von imaginalen Spender- und Empfängerzellen zu beobachten ist (gelb; hier demonstriert für einige imaginale somatische Muskeln).

Durch die posttranslationale Prozessierung des DsRed (BAIRD et al., 2000) war dessen Nachweis auf postembryonale Stadien beschränkt, weshalb die erste Klonkontrolle erst im Wanderlarvenstadium erfolgte. Dabei wurden die beiden cytoplasmatisch lokalisierten Marker mit Hilfe eines Inversen Fluoreszenzmikroskops *in vivo* detektiert und dokumentiert. Weil die Marker konstitutiv über die gesamte Entwicklung exprimiert wurden, beschränkte sich ihr Nachweis nicht nur auf das Larvenstadium, sondern war auch in ausdifferenzierten imaginalen Geweben möglich. Bei der Untersuchung der Larven und Imagines wurden die DsRed- und GFP-Fluoreszenzsignale jeweils getrennt aufgezeichnet und später mit digitaler Bildbearbeitungssoftware zu entsprechenden Überlagerungsbildern zusammengesetzt.

3.6.1 Homotope Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm bei 40% EL aus den Nachkommen der Kreuzung *UAS-DsRed* x *daGAL4* (Serie C), beziehungsweise aus der Linie *UAS-DsRed*; *daGAL4* (Serie D) in die Empfängerlinie *UAS-GFP* (DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode)

Zunächst sollte geklärt werden, ob sich die DsRed-Fluoreszenz zur Markierung von Transplantationsklonen eignet und ob *DsRed* und *GFP* tatsächlich problemlos koexprimiert werden können. Da für Mehrzelltransplantationen eine höhere cell-lineage-Klonrate als nach vergleichbaren Einzelzelltransplantationen gezeigt werden konnte (BOSSINGER, 2002; STRASSER, 2002), wurde auf diese Transplantationsart zurückgegriffen. Zur Wahl des Transplantationsbereiches trugen mehrere Faktoren bei: Zum einen ist das Rumpfmesoderm bei 40% EL Manipulationen gut zugänglich, da – im Gegensatz zum anterioren und posterioren Pol des Embryos – die Injektion der Transplantationskapillare problemlos möglich ist. Außerdem wurde das Rumpfmesoderm in diesem Bereich bereits eingehend untersucht (KLAPPER et al., 1998; HEUSER, 1999; Transplantationsserien A und B der vorliegenden Arbeit) und die resultierenden mesodermalen Derivate sind gut identifizierbar.

Die Transplantationsserien C und D unterschieden sich nur durch die genetische Konstitution der Spenderlinie: Während für die Serie C heterozygote Nachkommen der Kreuzung *UAS-DsRed* x *daGAL4* verwendet wurden, handelte es sich bei den Spendern der Linie D um homozygote Tiere der Linie *UAS-dsRed*; *daGAL4*. Da die Intensität der DsRed-Fluoreszenz in den cell-lineage-Klonen beider Transplantationsserien gleichwertig war und sich die Abweichung der beiden Klonraten (siehe Tabelle 5) als zufälliges Ereignis entpuppte (mit $P=0,02$ für die cell-lineage- und $P=0,04$ für die syncytialen Klone), wurden beide Serien im Weiteren gemeinsam ausgewertet.

Aus den 259 homotopen Mehrzelltransplantationen der Transplantationsserien C und D überlebten 105 Empfänger bis zum Wanderlarvenstadium (=41%). Die Untersuchung dieser Larven ergab, dass 97 Tiere (=92%) einen cell-lineage-Klon aufwiesen. In 89 dieser Empfänger konnte zusätzlich eine syncytiale Markierung nachgewiesen werden (Klonrate_{Larval} (Syncytien) 35%).

Die Klongröße ist herkömmlicherweise als die Anzahl der markierten Zellen pro Klon definiert. Da in der vorliegenden Arbeit mit einem cytoplasmatisch exprimierten cell-lineage-Marker gearbeitet wurde, konnte in markierten syncytialen Geweben nicht zwischen Spender- und Empfängerkernen differenziert werden. Außerdem führten die Mehrzelltransplantationen zu ausgedehnten Markierungen, deren vollständige Detektion sich in unpräparierten Larven schwierig gestaltete. Aus diesen Gründen wird – und zwar nur für die Mehrzelltransplantationen – die Anzahl der markierten Gewebe pro Klon als ein Maß für die Klongröße eingesetzt.

Die detektierten Markierungen der Transplantationsserien C und D reichten von nicht-überlappenden Klonen bis zu sechs Gewebe-überlappenden Klonen. Bei der genauen Betrachtung dieser Klone wurde festgestellt, dass die Klongröße nicht von der Anzahl der transplantierten Zellen abhing: So wurde nach der Transplantation von fünf Zellen der größte Klon detektiert (in dem vier mesodermale und zwei ektodermale Keimblattderivate überlappten), während nach der Transplantation von acht bis 15 Zellen höchstens drei Gewebe überlappten. Weil die cell-lineage-Klone nach der Transplantation mehrerer Zellen sowieso keine Rückschlüsse auf die klonale Verwandtschaft der markierten Gewebe zulassen, wurde für die weitere Auswertung nur die Häufigkeit bestimmter Gewebemarkierungen berücksichtigt (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Markierungsverteilung nach Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm mit der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode

Markiertes Gewebe (Larve)	cell-lineage-Markierungen	Syncytien-Markierungen
SM	89 (1*)	88 (1*)
FK	50 (1*)	3
long. VM	23	5
circ. VM	10	9
IM	6	—
Glia	2	—
Dorsalgefäß	2	—
ZNS	22	—
PNS	2	—
Epidermis	11	2
Trachee	1	—
unbekannte Struktur	9	7
Summe	227 (2*)	114 (1*)

SM: Somatische Muskulatur; FK: Fettkörper; long. VM: longitudinale viscerale Muskulatur; circ. VM: circuläre viscerale Muskulatur; IM: Imaginaler Muskelvorläufer; ZNS: Zentrales Nervensystem; PNS: Peripheres Nervensystem
 —: keine Markierung detektiert
 alle mit * gekennzeichneten Klone stammen aus heterotopen Transplantationen

Da in der weiteren Auswertung nur die cell-lineage- und die Syncytien-Markierungen miteinander verglichen werden sollten, wurden auch die beiden Markierungen aus heterotopen Transplantationen berücksichtigt. Der cell-lineage-Marker DsRed konnte hauptsächlich in mesodermalen Derivaten wie der larvalen somatischen Muskulatur (n₁₃₈₉), dem Fettkörper (n₁₃₉₀), der longitudinalen (n₁₃₉₃) und circulären (n₁₃₉₀) visceralen Muskulatur, imaginalen Muskelvorläufern (n₁₃₉₄) und dem Dorsalgefäß (n₁₃₉₂) nachgewiesen werden. In 36 Fällen waren auch ektodermale Derivate wie das Ventralganglion (n₁₃₉₂); teilweise mit abgehenden Motoneuronen), das periphere Nervensystem (n₁₃₉₂), die Epidermis (n₁₃₉₁) und Tracheen (n₁₃₉₁) markiert. Für die beiden Glia-Markierungen sowie die neun Klone in unbekanntem Strukturen konnte aufgrund der Mehrzelltransplantationsproblematik nicht auf das zugehörige Keimblatt geschlossen werden.

Beim Nachweis der *GFP*-Expression zeigte sich, dass dieser Syncytien-Marker hauptsächlich in bereits bekannten syncytialen Geweben wie der larvalen somatischen Muskulatur (n₁₃₈₈) sowie der longitudinalen (n₁₃₉₃) und circulären visceralen Muskulatur (n₁₃₉₀) verbreitet war. Zusätzlich konnte er auch in sieben Fällen in unbekanntem Strukturen, die

eine Muskel-ähnliche Morphologie aufwiesen, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20).

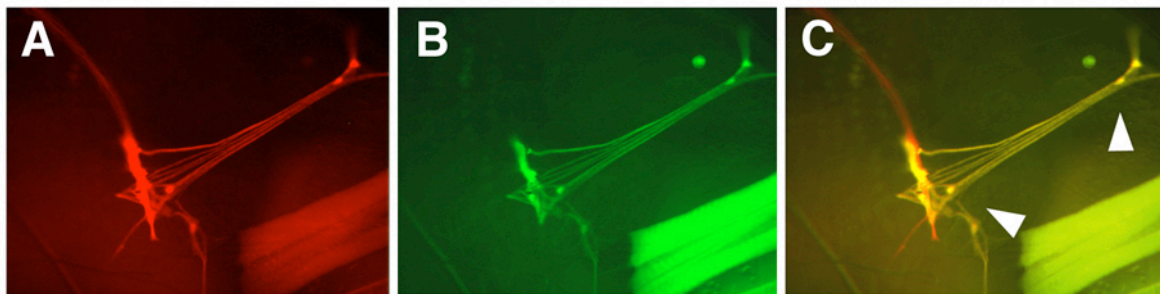


Abbildung 20: Überlappende Klon zwischen larvaler somatischer Muskulatur und einer unbekanntem Struktur.

Während in allen Nachkommen der transplantierten Zelle der cell-lineage-Marker DsRed nachgewiesen werden kann (A), ist die Expression des Syncytien-Markers *GFP* auf Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass beide Marker in zwei larvalen somatischen Muskeln sowie einer „muskelähnlichen“ unbekanntem Struktur mit mindestens zwei Nuclei (Pfeilspitzen) koexprimiert werden.

Überraschenderweise konnte der Syncytien-Marker auch in zwei als mononucleär beschriebenen Geweben nachgewiesen werden: Während die Koexpression von cell-lineage- und Syncytien-Marker auf drei der 50 Fettkörper-Markierungen beschränkt blieb (siehe Abbildung 21), waren zwei der elf Epidermis-Markierungen davon betroffen (siehe Abbildung 22).

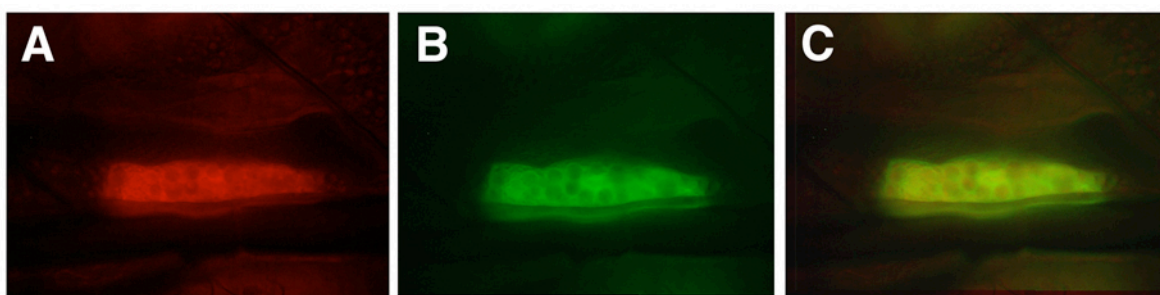


Abbildung 21: Klon im larvalen Fettkörper.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle sind durch den cell-lineage-Marker DsRed rot markiert (A), während die syncytialen Gewebe unterschiedlicher klonaler Herkunft zusätzlich *GFP* exprimieren (B). In dem Überlagerungsbild (C) ist zu erkennen, dass beide Marker in den drei Fettkörperzellen koexprimiert werden, obwohl dieses Gewebe als mononucleär beschrieben ist.

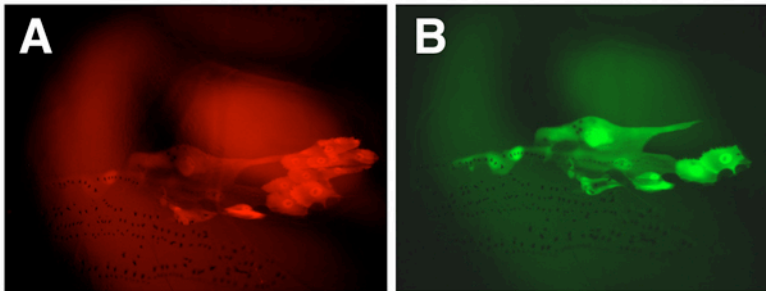


Abbildung 22: Klon in der larvalen Epidermis.

Während alle Nachkommen der transplantierten Zelle den cell-lineage-Marker *DsRed* exprimieren (A), ist die Expression von *GFP* auf miteinander fusionierte Zellen unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). Da sich die Wanderlarve bei der Untersuchung bewegte, sind die beiden Fluoreszenzaufnahmen nicht deckungsgleich und konnten somit nicht zu einem Überlagerungsbild zusammengesetzt werden. Beim Vergleich der Einzelaufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass der Syncytien-Marker in acht der 14 *DsRed*-markierten Zellen nachgewiesen werden kann. Es fällt weiterhin auf, dass die Epidermiszellen eine sehr unterschiedliche Größe und Form besitzen.

Bei den meisten untersuchten Klone war der syncytiale Anteil erwartungsgemäß kleiner als die cell-lineage-Markierung. Die Ausnahme bildeten jedoch acht Klone in der larvalen somatischen Muskulatur, bei denen die Expression des Syncytien-Markers die des cell-lineage-Markers um ein bis drei Muskeln übertraf (siehe Abbildung 23). Für diese Beobachtung gibt es verschiedene Erklärungen: Zum einen ist die Fluoreszenz des *DsRed* prinzipiell wesentlich schwächer als die des koexprimierten *S65T-GFP* (siehe Kapitel 2.3.3.2 und 3.2.1). Außerdem besitzen die larvalen somatischen Muskeln mit ihren drei bis 25 Zellkernen pro Muskel (BATE, 1990) ein sehr großes gemeinsames Cytoplasma, in dem weite Diffusionsstrecken zwischen den einzelnen Kernen liegen. Innerhalb eines Muskelklons wird also der von den Spenderkernen gebildete *GAL4*-Transkriptionsaktivator durch das Cytoplasma diffundieren, um in allen Zellkernen die *GAL4*-Kaskade zu aktivieren. Da die translatierten Proteine *DsRed* und *GFP* keine Kernimportsequenz besitzen, können sie sich ungehindert innerhalb des Cytoplasmas verteilen. Befinden sich in einem Muskelklon viele Empfänger- und nur wenige Spenderkerne, so wird verhältnismäßig wenig *DsRed* gebildet, welches außerdem innerhalb des Muskels stark ausdünn und aufgrund seiner schwachen Fluoreszenz möglicherweise unter die Nachweisgrenze fällt.

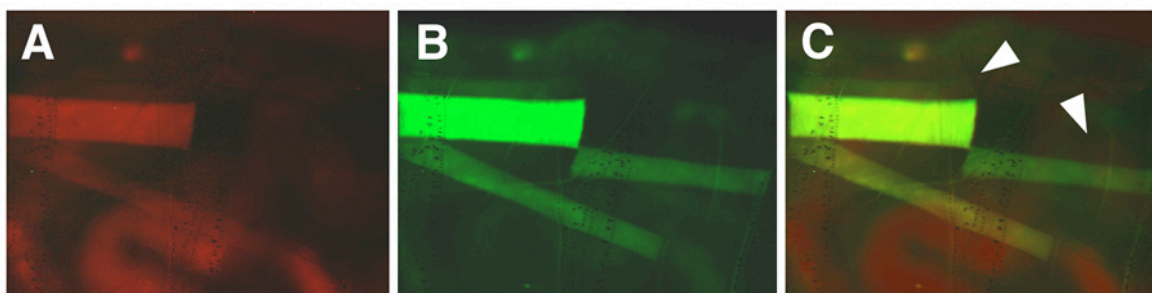


Abbildung 23: Klon in der larvalen somatischen Muskulatur.

Beim Vergleich der cell-lineage- (A) und der Syncytien-Markierung (B) fällt auf, dass in zwei der vier markierten Muskeln nur der Syncytien- und nicht der cell-lineage-Marker exprimiert wird (siehe Pfeilspitzen in Überlagerungsbild C).

Die Markierungen in der larvalen somatischen Muskulatur fielen häufig sehr groß aus (bis zu 23 markierte Muskeln pro Klon), weshalb auf eine nähere Charakterisierung verzichtet wurde.

Im Rahmen der Transplantationsserie D wurden versuchsweise 26 Larven mit einem Klon über die Metamorphose hinaus verfolgt. Von diesen Empfängern überlebten 16 Tiere bis zur Untersuchung als Imago (=62%). In zehn Empfängern konnte ein cell-lineage-Klon und in vier Imagines eine syncytiale Markierung detektiert werden, wobei das Alter der untersuchten Tiere nicht notiert wurde. Eine Übersicht über die verschiedenen Klone findet sich in der nachfolgenden Tabelle 12:

Tabelle 12: Klonverteilung nach Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm mit der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode

cell-lineage-Klon (Imago)	Anzahl	korrespondierender Syncytien-Klon	Anzahl
SM	3	SM SM (teilweise)	1 1
FK	2	—	—
SM und FK	4	SM (teilweise)	2
Nerven / Glia	1	—	—
Summe	10	Summe	4

SM: Somatische Muskulatur; FK: Fettkörper

—: keine Markierung detektiert

teilweise: Der Syncytien-Marker GFP konnte nur in einem Teil der DsRed-markierten Muskeln nachgewiesen werden

Bei den zehn Imagines mit einem cell-lineage-Klon war in sechs Fällen nur ein Gewebe markiert. Alle zwei Gewebe-überlappenden Klone zeigten Markierungen in der imaginalen somatischen Muskulatur und dem Fettkörper.

Insgesamt konnten sieben cell-lineage-Markierungen in der imaginalen somatischen Muskulatur detektiert werden. Da dieses Gewebe während der Metamorphose *de novo* aus imaginalen Myoblasten gebildet wird (siehe Kapitel 1.3), sollte der cell-lineage-Marker DsRed in den entsprechenden Empfängern bereits im Wanderlarvenstadium in den zugehörigen imaginalen Muskelvorläufern nachgewiesen worden sein. Dieser Nachweis konnte allerdings nur für zwei Klone erbracht werden (siehe Tabelle 13). In beiden Fällen war dabei jeweils nur ein imaginaler Muskelvorläufer markiert, während die cell-lineage-Markierung im Adultstadium nicht auf die zu erwartende Muskel-Subpopulation beschränkt blieb. Die vier Empfänger, in denen im Larvalstadium ebenfalls Markierungen in imaginalen Muskelvorläufern detektiert wurden, überlebten die Metamorphose nicht. Bei dieser Auswertung muss berücksichtigt werden, dass die cell-lineage-Klone in den untersuchten Larven aufgrund der Transplantation mehrerer Zellen oft sehr groß ausfielen. Da die imaginalen Muskelvorläufer im Vergleich zu larvalen somatischen Muskeln sehr klein und filigran sind, wurden entsprechende Markierungen in diesem Gewebe vermutlich übersehen.

Tabelle 13: Ausdehnung der Markierungen in der imaginalen somatischen Muskulatur

Markierung in IM	cell-lineage-Markierung (Imago)	Syncytien-Markierung (Imago)
X	A3/A4, lateral, bilateral	A3/A4, lateral, rechts
—	A3, lateral, links	A3, lateral, links
—	A4, lateral (wenige Fasern), rechts	—
—	A4, lateral, rechts	A4, lateral (wenige Fasern), rechts
—	A5, lateral (wenige Fasern), rechts	—
X	A4, lateral, links	A4, lateral (wenige Fasern), links
—	A3, dorsal, links (wenige Fasern)	—

IM: imaginaler Muskelvorläufer

X: cell-lineage-Markierung in imaginalem Muskelvorläufer detektiert

A: Abdominalsegment (3, 4 oder 5)

—: keine Markierung detektiert

Der Nachweis des Syncytien-Markers GFP beschränkte sich auf vier Markierungen in der imaginalen somatischen Muskulatur (siehe Abbildung 24). Die Induktion der *GFP*-Expression lässt darauf schließen, dass während der imaginalen Myogenese Myoblasten unterschiedlicher klonaler Herkunft miteinander fusioniert sein müssen. Somit sind die Myoblasten eines imaginalen Muskelvorläufers – entgegen der gängigen Lehrbuchmeinung (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991; BROADIE und BATE, 1991) – nicht streng auf die Bildung definierter Muskeln determiniert. Vielmehr lassen die untersuchten Markierungen (siehe Tabelle 13) darauf schließen, dass sich die proliferierenden Myoblasten benachbarter imaginaler Muskelvorläufer während der Metamorphose durch-

mischen können (und zwar innerhalb eines Hemisegments (n=4) oder zwischen angrenzenden Hemisegmenten (n=1)), um schließlich miteinander zu fusionieren. Das Auftreten reiner cell-lineage-Markierungen in allen (n=3) sowie in vereinzelt Muskeln eines Klons (n=1) zeigt aber auch, dass sich die einzelnen imaginalen Muskeln des Abdomens aus klonal verwandten Myoblasten zusammensetzen können. Im Rahmen der Transplantationsserien F bis I konnten noch weitere Markierungen in diesem Gewebe detektiert und ausgewertet werden (siehe Kapitel 3.7.4).

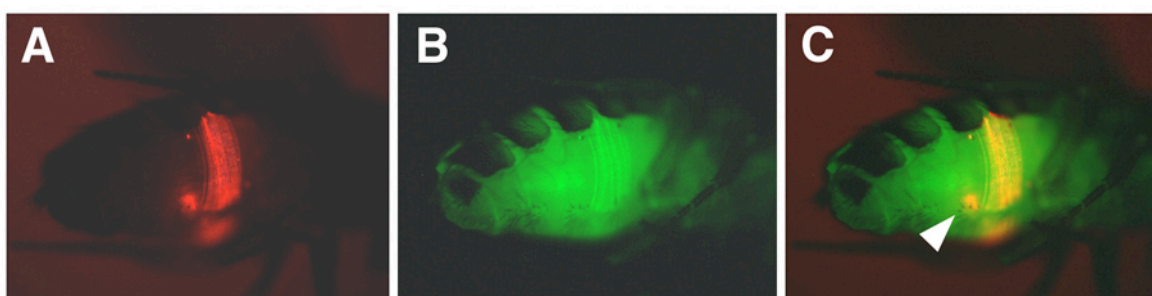


Abbildung 24: Überlappender Klon zwischen imaginaler somatischer Muskulatur und Fettkörper im Abdomen einer unpräparierten Imago.

Während in allen Nachkommen der transplantierten Zelle der cell-lineage-Marker DsRed nachgewiesen werden kann (A), ist die Expression des Syncytien-Markers *GFP* auf Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass sich die Koexpression der beiden Marker auf einige laterale Muskeln der rechten Körperhälfte (Abdominalsegmente 3 und 4) beschränkt. In der lateralen Muskulatur der linken Körperhälfte (Abdominalsegment 4) sowie in einigen Fettkörperzellen (Pfeilspitze) kann ausschließlich der cell-lineage-Marker detektiert werden.

Bei sechs Klonen konnte eine reine cell-lineage-Markierung im Fettkörper detektiert werden, deren Morphologie mit der Struktur larvaler Fettkörperzellen übereinstimmte. Da in allen Fällen weniger markierte Zellen als im Wanderlarvenstadium detektiert werden konnten, hatte die postpupale Degeneration des larvalen Fettkörpers (WIGGLESWORTH, 1949; BUTTERWORTH, 1972; POSTLETHWAIT und JONES, 1978) offensichtlich schon eingesetzt. In sechs weiteren Imagines konnte die in der Wanderlarve detektierte Fettkörper-Markierung nicht wieder gefunden werden, sodass auf einen vollständigen Abbau des larvalen Fettkörpers zum Untersuchungszeitpunkt geschlossen werden konnte. Das Alter der untersuchten Imagines wurde nicht notiert.

In einem Fall wurde im Abdomen der untersuchten Imago eine reine cell-lineage-Markierung nachgewiesen, deren Lage und Morphologie auf die Zugehörigkeit zum peripheren Nervensystem hindeutete. Dabei konnte nicht entschieden werden, ob Nerven- oder Gliazellen markiert waren. Von dieser Markierung war im Wanderlarvenstadium keine Notiz genommen worden.

3.6.2 Homotope Mehrzelltransplantationen in der Ektodermanlage bei durchschnittlich 50% EL und 50% VD aus der Spenderlinie *UAS-DsRed*; *daGAL4* in die Empfängerlinie *UAS-GFP* (Serie E; DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode)

Die Klone aus den Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm haben bestätigt, dass mit Hilfe der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode tatsächlich alle Nachkommen der transplantierten Zelle verfolgt werden können, wobei simultan deren Fusion mit klonal nicht verwandten Zellen nachgewiesen werden kann (siehe Kapitel 3.6.1). Nach diesen Voruntersuchungen sollte die DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode nun zur Untersuchung der Thorax-Imaginalscheiben eingesetzt werden. Für die Flügel-Imaginalscheiben sind neben langen cytoplasmatischen Zellausläufern, den Cytonemen (RAMIREZ-WEBER und KORNBERG, 1999), so genannte *translumenal extensions* beschrieben worden (GIBSON und SCHUBIGER, 2000), welche ebenfalls dem Austausch von Positionsinformationen dienen sollen. Da im Rahmen dieser Zell-Zell-Kontakte die Ausbildung temporärer syncytialer Strukturen denkbar wäre, sollte diese Möglichkeit mit Hilfe des GAL4/UAS-Transplantationssystems überprüft werden.

Daher wurden 171 Mehrzelltransplantationen in dem Bereich der Ektodermanlage durchgeführt, in dem die Anlage der thorakalen Imaginalscheiben lokalisiert worden ist (MEISE und JANNING, 1994). Durch die Transplantation mehrerer Zellen sollte die Klonrate und somit auch die mögliche Trefferquote erhöht werden (siehe Kapitel 3.4). Bei der Untersuchung der 72 bis zum Wanderlarvenstadium überlebenden Larven (=100%) wurden in 68 Fällen cell-lineage- (=94%) und in 15 Fällen Syncytien-Klone (=21%) detektiert. Weil in diesen Klonen gleichzeitig bis zu vier Gewebe (und zwei Keimblätter) markiert sein konnten und somit viele Kombinationsmöglichkeiten existierten, wurden in der nachfolgenden Übersicht nur die Häufigkeiten der einzelnen Gewebemarkierungen aufgelistet:

Tabelle 14: Markierungsverteilung nach Mehrzelltransplantationen in der Ektodermanlage mit der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode

Markiertes Gewebe (Larve)	cell-lineage-Markierungen	Syncytien-Markierungen
SM	4	4
FK	2	—
ZNS	58	1
PNS	2	—
Epidermis	59	9
Trachee	2	—
Imaginalscheibe	2	1
Glia	2	—
Apodem	1	—
unbekannte Struktur	5	2
Summe	137	17

SM: Somatische Muskulatur; FK: Fettkörper; ZNS: Zentrales Nervensystem; PNS: Peripheres Nervensystem
 —: keine Markierung detektiert

Auch bei dieser Transplantationsserie konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der transplantierten Zellen und der Klongröße registriert werden. Der cell-lineage-Marker DsRed konnte hauptsächlich in ektodermalen Derivaten wie dem zentralen Nervensystem (n=38; meist mit abgehenden Motoneuronen), dem peripheren Nervensystem (n=2; jeweils *multiple dendritic neurons*), der Epidermis (n=59), den Tracheen (n=2), den Imaginalscheiben (n=2) sowie den Apodemen (n=1) nachgewiesen werden. In sechs Fällen waren auch mesodermale Derivate wie die larvale somatische Muskulatur (n=4) und der Fettkörper (n=2) markiert. Für die beiden Glia-Markierungen und die fünf Klone in unbekanntem Strukturen konnte nicht auf das zugehörige Keimblatt geschlossen werden.

Der Syncytien-Marker GFP konnte in allen cell-lineage-Klonen in der larvalen somatischen Muskulatur (n=4) detektiert werden. Weiterhin war ein Nachweis des Syncytien-Markers auch in zwei Muskel-ähnlichen Geweben unbekannter Struktur möglich. Außerdem wurde dieses Protein in einer der beiden Imaginalscheiben-Markierungen gesichtet (siehe Abbildung 25). Leider konnte bei der *in vivo*-Untersuchung nicht festgestellt werden, um welche Imaginalscheibe es sich genau handelte, und nach der Präparation dieses Empfängers wurden alle Imaginalscheiben vergeblich auf eine DsRed- oder GFP-Fluoreszenz untersucht.

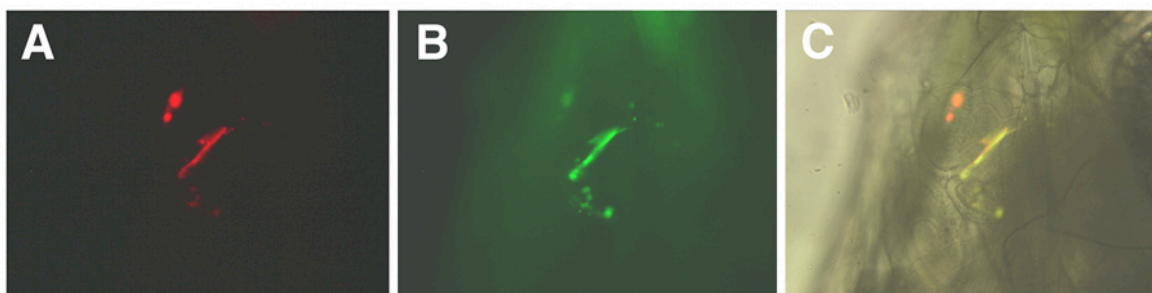


Abbildung 25: Klon in einer Imaginalscheibe.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle sind durch den cell-lineage-Marker DsRed rot markiert (A), während die heterogenen Syncytien zusätzlich *GFP* exprimieren (B). In das Überlagerungsbild (C) wurde zusätzlich eine Durchlichtaufnahme des Untersuchungsbereichs eingeblendet, welche die Gewebezugehörigkeit der Markierungen belegen soll. Bei der *in vivo*-Aufnahme konnte jedoch nicht ermittelt werden, um welche Imaginalscheibe es sich handelt. Zu sehen ist allerdings die nahezu vollständige Koexpression beider Marker in vielen kleinen Zellen (=Imaginale Zellen) und einer aufgelagerten fädigen Struktur.

Bei einer der 58 cell-lineage-Markierungen im zentralen Nervensystem konnte der Syncytien-Marker innerhalb des Ventralganglions auch in einer Subpopulation der DsRed-markierten Neurone detektiert werden. Auch in 15% aller Epidermis-Markierungen konnte für einen Teil der Zellen eine Kolokalisation von cell-lineage- und Syncytien-Marker nachgewiesen werden (siehe Abbildung 26).

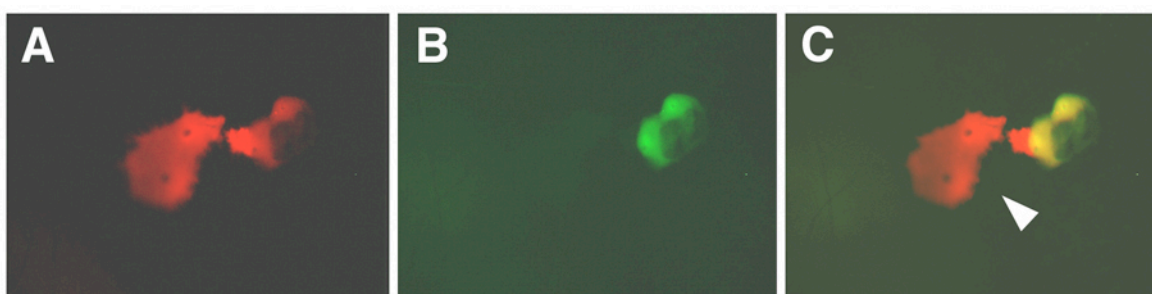


Abbildung 26: Klon in der larvalen Epidermis.

Während alle Nachkommen der transplantierten Zelle den cell-lineage-Marker *DsRed* exprimieren (A), ist die Expression von *GFP* auf miteinander fusionierte Zellen unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). Im Überlagerungsbild (C) ist deutlich zu erkennen, dass die Expression des Syncytien-Markers auf zwei zusammenhängende Epidermiszellen beschränkt ist, während der cell-lineage-Marker zusätzlich noch in drei weiteren Epidermiszellen nachgewiesen werden kann. Die markierten Epidermiszellen sind unterschiedlich groß und verschieden strukturiert. Bei drei Zellen können Einbuchtungen der Zellmembran beobachtet werden (Pfeilspitze).

Da sich auch im Rahmen meiner Diplomarbeit (HEUSER, 1999) und der Transplantationsserie D (siehe Kapitel 3.6.1) Hinweise auf die Existenz bislang unbekannter syncytialer Zellverbände in der Epidermis ergeben hatten, sollte dieses Phänomen näher untersucht werden. Deshalb wurden mit Hilfe der *FLP-out*-Technik (STRUHL und BASLER, 1993) nach Abschluss der postblastodermalen Mitosen cytoplasmatisch *GFP*-exprimierende Klone in

der Epidermis induziert und auf ihre Häufigkeit, Größe und Morphologie untersucht. In Anlehnung an OVERESCH (1999) wurde unter verschiedenen Versuchsbedingungen gearbeitet, um eine möglichst niedrige Klonrate zu erzielen und somit unabhängige Einzelklone zu erhalten. Die Ausdehnung der seltenen Epidermisklone sollte dann Rückschlüsse auf die strukturelle oder funktionale Kopplung von Epidermiszellen zulassen.

Obwohl die Hitzeschock-Behandlungen in verschiedenen Entwicklungsstadien und über unterschiedliche Zeiträume durchgeführt und für die *heat-shock*-Linie sowie die behandelten Larven zwei Aufzuchttemperaturen getestet wurden, konnte die Klonrate nicht kontinuierlich auf ein Minimum abgesenkt werden. Es zeigte sich, dass veränderte Versuchsbedingungen teilweise zu gleichen, gleiche Bedingungen teilweise zu unterschiedlichen Klonraten und -größen führten. Außerdem konnten in den unbehandelten Referenzlarven, die bei der gleichen Temperatur wie die Hitzeschock-behandelten Tiere gehalten wurden, in 38% der Larven Spontanklone unterschiedlichen Ausmaßes detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Stopsequenz innerhalb der *FLP target sites* auch ohne Hitzeschock verloren ging.

Wenngleich die Hitzeschock-Experimente unbefriedigend verliefen, wurden die resultierenden Klone trotzdem mit Hilfe der Inversen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die 289 untersuchten Epidermis-Klone beschränkten sich zu 54% auf einzelne Zellen, in 126 Fällen (=44%) erstreckten sie sich jedoch auf zwei und in sieben Fällen (=2%) auf drei bis sechs Zellen. Allerdings waren auch in den Fettkörper-Klonen, die im Übrigen häufiger als Epidermis-Klone auftraten, häufig zwei und mehr benachbarte Zellen markiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Klone aus unbekanntem Gründen bereits zur Zeit der postblastodermalen Mitosen entstanden sind, obwohl die dafür notwendigen Hitzeschock-Behandlungen erst nach deren Abschluss durchgeführt worden sind. Somit können mit Hilfe der *FLP-out*-Technik keine Aussagen über die cytoplasmatische Kopplung einzelner Epidermis-Zellen getroffen werden konnten. Allerdings stimmt die Morphologie der epidermalen Hitzeschock-Klone mit der für die Transplantationsklone beschriebenen Vielfalt überein: Die Form der Epidermiszellen konnte oval, eckig oder halbmondförmig sein und die Zellgröße war sehr variabel. Weiterhin wies die Zellmembran in vielen Fällen Bläschen, Fortsätze oder filamentöse Strukturen auf (Übersicht siehe Abbildung 27).

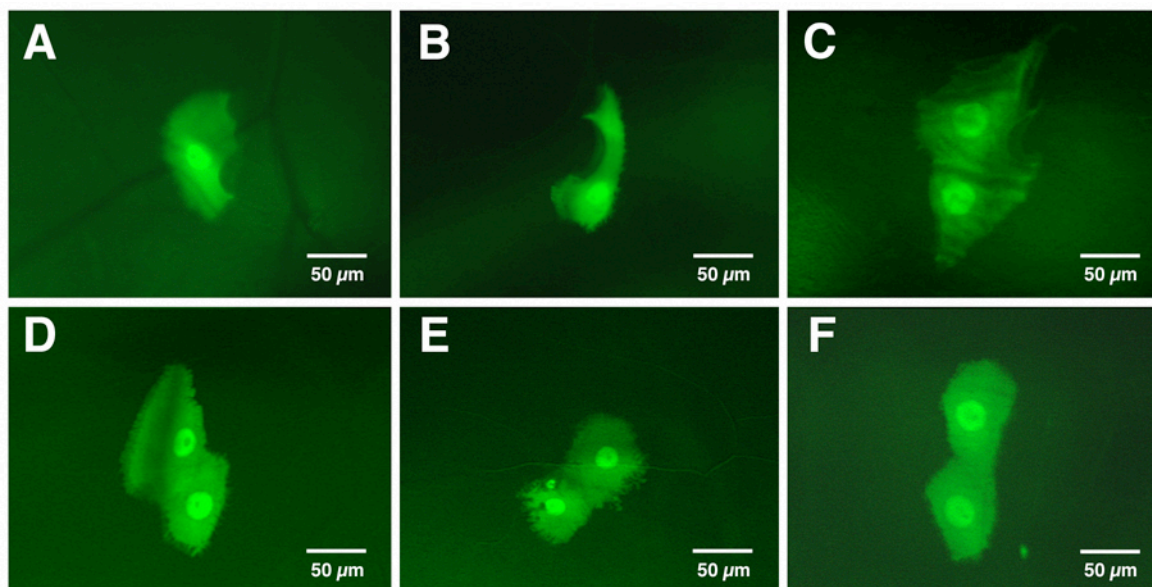


Abbildung 27: Erscheinungsformen der larvalen Epidermisklone des Hitzeschock-Experiments.

Der Vergleich der verschiedenen Epidermis-Klone macht deutlich, dass Form und Größe der markierten Zellen sehr unterschiedlich sein können. Die Zellen können entweder unregelmäßig geformt sein (A, B, C), filamentöse Fortsätze besitzen (D, E) oder eine sphärische Form aufweisen (F). Sind zwei benachbarte Epidermiszellen markiert, so kann zwischen diesen häufig keine eindeutige Zellgrenze identifiziert werden (D, E, F).

Da im Rahmen der Transplantationsserie B nach 171 Mehrzelltransplantationen nur in zwei Fällen Klone in den Imaginalscheiben erzielt werden konnten, schien das GAL4/UAS-Transplantationssystem für die Abklärung der Imaginalscheiben-Organisation nicht geeignet zu sein.

3.7 Kartierung des Rumpfmesoderms (von 44 bis 23% EL und 0 bis 30% VD) mittels homotoper Einzelzelltransplantationen aus der Spenderlinie *UAS-DsRed; daGAL4* (Serien F bis H), beziehungsweise *UAS-GAL4; UAS-DsRed; daGAL4* (Serie I) in die Empfängerlinie *UAS-GFP* (DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode)

Zu Beginn dieser Untersuchungen standen zwei Fragestellungen im Mittelpunkt des Interesses: Zum einen hatten Transplantationsklone in der imaginalen somatischen Muskulatur bereits Hinweise auf die Durchmischung imaginaler Myoblasten gegeben (HEUSER, 1999; Transplantationsserie D (siehe Kapitel 3.6.1)). Um das Restriktions- und Determinationsverhalten der imaginalen Vorläuferzellen genauer bestimmen zu können, sollten weitere Transplantationsklone über die Metamorphose hinaus beobachtet werden. Zum anderen war für die Epithelialhülle (*epithelial sheath*) der Ovariolen sowie die Peritonealhülle (*peritoneal sheath*) des Ovars bekannt, dass diese ein gazeartiges Netzwerk aus Muskelfasern bilden (MILLER, 1950; SANDBORN et al., 1967; KING, 1970) und aus den

mesodermalen Zellen des larvalen Ovars hervorgehen (BODENSTEIN, 1950; KING, 1970). Da auch eigene Untersuchungen der Linien *MHC-lacZ* und *MHC* \square *GFP* die filigrane muskuläre Organisation der imaginalen Hüllgewebe bestätigten, sollten Transplantationsklone im larvalen Gonadenmesoderm sowie den resultierenden adulten Strukturen auf die Fusion von Zellen unterschiedlicher klonaler Herkunft untersucht werden.

Um beide Fragestellungen in einem Untersuchungsansatz abklären zu können, wurden Transplantationen in der posterioren Hälfte des Rumpfmesoderms durchgeführt. Dabei wurden stets nur einzelne Zellen transplantiert, um von der Größe und Gewebezugehörigkeit der detektierten cell-lineage-Klone Rückschlüsse auf deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten an definierten Blastodermpositionen ziehen zu können. Somit war neben der Untersuchung der imaginalen somatischen Muskulatur und des Gonadenmesoderms auch die retrospektive Kartierung weiterer larvaler und imaginaler Anlagen möglich.

In die hier vorgestellte Anlagenkartierung flossen die Ergebnisse aus vier verschiedenen Transplantationsserien ein: Weil sich die Transplantationsserien F, G und H nur hinsichtlich des untersuchten Eilängen-Bereichs unterschieden, können die resultierenden Markierungen für die weitere Auswertung zusammengefasst werden. In der Transplantationsserie I wurde zwar mit einer verstärkten *UAS-GAL4*; *UAS-DsRed*; *daGAL4*-Spenderlinie gearbeitet, doch führte deren Verwendung weder zu einer Intensivierung des DsRed-Signals noch zu einer Erhöhung der larvalen oder imaginalen Klonraten (siehe Kapitel 3.4). Somit können auch die Ergebnisse dieser Serie für die Gesamtauswertung herangezogen werden. Die Vergleichbarkeit der Transplantationsserien F bis I zeigt sich auch bei der Häufigkeit der beobachteten Gewebe-Markierungen: So kann der cell-lineage-Marker DsRed bei allen Serien hauptsächlich in der larvalen somatischen Muskulatur und dem Fettkörper detektiert werden, während dessen Nachweis im Dorsalgefäß nur selten möglich war.

Insgesamt wurden im Rumpfmesoderm bei 44 bis 23% EL 1557 Einzelzelltransplantationen durchgeführt, wobei die Anzahl der Transplantationen entlang der anterior-posterioren Achse variierte (Transplantationsdaten siehe Tabelle 5). Mit einem Anteil von 61% erfolgten die meisten Transplantationen zwischen 25 und 30% EL und somit im Anlagenbereich des Gonadenmesoderms (KLAPPER et al., 1998). Bei den nachträglichen VD-Kontrollen stellte sich außerdem heraus, dass ein Großteil der Transplantationen (64%) zwischen 10 und 20% VD durchgeführt worden waren. Von den 1557 Empfängerembryonen überlebten 933 (=60%) bis zum Wanderlarvenstadium. In 701 dieser Larven

konnte ein cell-lineage-Klon (=75%) und in 559 eine syncytiale Markierung (=60%) nachgewiesen werden.

Innerhalb der Transplantationsklone waren stets nur die Derivate eines Keimblatts markiert. Dabei waren die Markierungen meist auf ein Gewebe beschränkt (=52%), sie konnten jedoch auch zwischen zwei (=42%), drei (=3%) oder sogar vier Geweben (=1%) überlappen. Aufgrund der zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Gewebemarkierungen sind in der Tabelle 15 nur deren individuelle Häufigkeiten aufgelistet. Traten bestimmte Markierungen nur in Kombination mit anderen Markierungen auf, so wird auf diese Besonderheit in den nachfolgenden Kapiteln hingewiesen. Auffallend war, dass an keiner Transplantationsposition exklusive Markierungen in einem bestimmten Gewebe detektiert werden konnten.

Tabelle 15: Markierungsverteilung nach Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm mit der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode

Markiertes Gewebe (Larve)	cell-lineage-Markierungen	Syncytien-Markierungen
SM	536 (62*)	541 (64*)
FK	122 (11*)	13
long. VM	27 (1*)	7 (1*)
circ. VM	34 (1*)	23
IM	59 (9*)	2 (1*)
Glia (mesodermal)	44 (5*)	1 (1*)
Dorsalgefäß	12 (2*)	5 (2*)
Gonadenmesoderm	17	2
ZNS	101 (9*)	1
PNS	22 (1*)	1
Epidermis	8 (2*)	—
unbekannte Struktur	35 (3*)	23 (2*)
Summe	1017 (106*)	619 (71*)

SM: Somatische Muskulatur; FK: Fettkörper; long. VM: longitudinale viscerale Muskulatur; circ. VM: circuläre viscerale Muskulatur; IM: Imaginaler Muskelvorläufer; ZNS: Zentrales Nervensystem; PNS: Peripheres Nervensystem

—: keine Markierung detektiert

alle mit * gekennzeichneten Klone stammen aus heterotopen Transplantationen

Ein Großteil der 1017 cell-lineage-Markierungen (87%) betraf mesodermale Derivate wie die larvale somatische Muskulatur (n=536), den Fettkörper (n=122), die viscerale Muskulatur des Mitteldarms (n=61) oder die imaginalen Muskelvorläufer des Abdomens (n=59). Mit deutlich geringerer Häufigkeit wurden mesodermale cell-lineage-

Markierungen im Gonadenmesoderm (n=17) und im Dorsalgefäß (n=2) gefunden. Da die Keimblätter bereits zum Transplantationszeitpunkt determiniert sind (BEER et al., 1987; MEISE und JANNING, 1993; HOLZ et al., 1997), konnte aufgrund der klonspezifischen Gewebeüberlappungen auch auf die mesodermale Keimblattzugehörigkeit aller detektierten Glia-Markierungen (n=44) und der meisten Markierungen in den unbekanntem Strukturen (n=32) geschlossen werden. Die 131 cell-lineage-Markierungen in ektodermalen Derivaten betrafen das zentrale (n=101) und das periphere Nervensystem (n=22) sowie die Epidermis (n=8). Eine genauere Auswertung der Markierungshäufigkeiten, -größen und -morphologien erfolgt in den Kapiteln 3.7.1 bis 3.7.10. Dort werden auch die cell-lineage-Markierungen den syncytialen Markierungen gegenübergestellt.

Es stellte sich heraus, dass 106 cell-lineage- und 71 Syncytien-Markierungen aus heterotopen Transplantationen entlang der dorsoventralen Achse hervorgingen. Diese lassen, ebenso wie die Markierungen aus homotopen Transplantationen, Rückschlüsse auf die Selektivität des GAL4/UAS-Transplantationssystems zu. In wie weit sie für die Anlagenkartierung der verschiedenen Gewebe berücksichtigt werden können, wird an entsprechender Stelle erörtert.

Die 933 untersuchten Wanderlarven sollten als Imagines erneut ausgewertet werden. Von diesen Empfängern überlebten 371 Tiere die Metamorphose (=40%). In 105 dieser Imagines (=28%) konnte ein cell-lineage-Klon und in 37 (=10%) eine syncytiale Markierung detektiert werden. Die Klone im Adultstadium waren meist auf ein Gewebe beschränkt (=81%), sie konnten jedoch auch zwischen zwei (=18%) oder drei (=1%) Geweben überlappen. Innerhalb der Transplantationsklone waren stets nur die Derivate eines Keimblatts markiert. Die individuellen Häufigkeiten der verschiedenen Gewebemarkierungen sind in der nachfolgenden Tabelle 16 aufgelistet:

Tabelle 16: Markierungsverteilung nach Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm mit der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode

cell-lineage-Markierung (Imago)	Anzahl	korrespondierende Syncytien-Markierung	Anzahl
SM	27 (7*)	SM SM (teilweise)	11 (3*) 12 (3*)
FK FK-Fragmente	19 18 (3*)	— —	— —
long. VM	20 (2*)	long. VM long. VM (teilweise)	4 3
circ. VM	10	circ. VM circ. VM (teilweise)	4 2
Dorsalgefäß	4 (1*)	Dorsalgefäß	2
Ovidukt Muskulatur	6 (1*)	Ovidukt Muskulatur Ovidukt Muskulatur (teilweise)	1 5 (1*)
Hodenhüllgewebe	4	Hodenhüllgewebe	1
Glia (mesodermal)	2 (1*)	—	—
Nerven	16 (1*)	—	—
Summe	126 (16*)	Summe	45 (7*)

SM: Somatische Muskulatur; FK: Fettkörper; long. VM: longitudinale viscerale Muskulatur; circ. VM: circuläre viscerale Muskulatur
 —: keine Markierung detektiert
 teilweise: Der Syncytien-Marker GFP konnte nur in einem Teil der DsRed-markierten Muskeln nachgewiesen werden
 alle mit * gekennzeichneten Klone stammen aus heterotopen Transplantationen

Bei den 126 detektierten cell-lineage-Markierungen handelte es sich in 110 Fällen um mesodermale Derivate wie den Fettkörper (n=37), die imaginale somatische Muskulatur (n=37) und die viscerale Muskulatur des Mitteldarms (n=30). Seltener wurden mesodermale cell-lineage-Markierungen in der Ovidukt Muskulatur (n=6), dem Dorsalgefäß (n=4), dem Hodenhüllgewebe (n=4) und der mesodermalen Glia (n=2) gefunden. Die 16 cell-lineage-Markierungen ektodermalen Ursprungs betrafen allesamt das Nervensystem.

Bei allen untersuchten Markierungen überschritt die Expression des Syncytien-Markers *GFP* niemals die des cell-lineage-Markers *DsRed*. Somit war die syncytiale Markierung stets auf eine Subpopulation der cell-lineage-Markierung beschränkt oder sie war mit dieser identisch, was erneut die Selektivität des GAL4/UAS-Transplantationssystems bestätigt. Eine genauere Analyse der imaginalen Markierungen und deren Vergleich mit den korrespondierenden Markierungen im Wanderlarvenstadium erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln 3.7.1 bis 3.7.10.

3.7.1 Klone in der larvalen somatischen Muskulatur

Bei der larvalen somatischen Muskulatur handelt es sich um ein multinucleäres Gewebe mit einem großen Cytoplasma, in dem relativ weite Diffusionsstrecken zwischen den einzelnen Kernen liegen (siehe Kapitel 1.2). Da bei den Transplantationsexperimenten der vorliegenden Arbeit mit zwei genetischen Markern gearbeitet wurde, deren Expression von der Interaktion des *GAL4*-Transkriptionsfaktors mit dem jeweiligen *UAS*-Reportergen-Konstrukt abhängt, konkurrieren die Spender- und Empfängerkerne innerhalb der resultierenden Muskelklone um den diffusiblen Transkriptionsfaktor. Befinden sich in einem solchen Muskelklon nur wenige Spenderkerne, so wird der cell-lineage-Marker *DsRed* in einer verhältnismäßig niedrigen Konzentration exprimiert, dünnt aufgrund seiner cytoplasmatischen Lokalisation weiter aus und kann unter Umständen nicht mehr fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Genau dieses Phänomen konnte bei 215 Muskelklonen beobachtet werden, bei denen der Syncytien-Marker GFP mehr Muskeln als der cell-lineage-Marker *DsRed* markierte (siehe Abbildung 28). Aus diesem Grund konnten insgesamt auch mehr Syncytien- als cell-lineage-Markierungen in diesem Gewebe detektiert werden (siehe Tabelle 15). Für die nun folgende detaillierte Auswertung der Klone in der larvalen somatischen Muskulatur wurde für jeden einzelnen Klon die jeweils größere Markierung berücksichtigt. Dabei ist zu beachten, dass die räumliche Anordnung der Muskelklone erst im Laufe der Transplantationsserie F ausführlich dokumentiert wurde.

Insgesamt war in 541 der 582 mesodermalen cell-lineage-Klone die larvale somatische Muskulatur markiert (=93%). Dabei handelte es sich in 290 Fällen um reine und in 251 Fällen um überlappende Muskelklone, die wiederum in den meisten Fällen (=46%) mit Markierungen im Fettkörper gekoppelt waren.

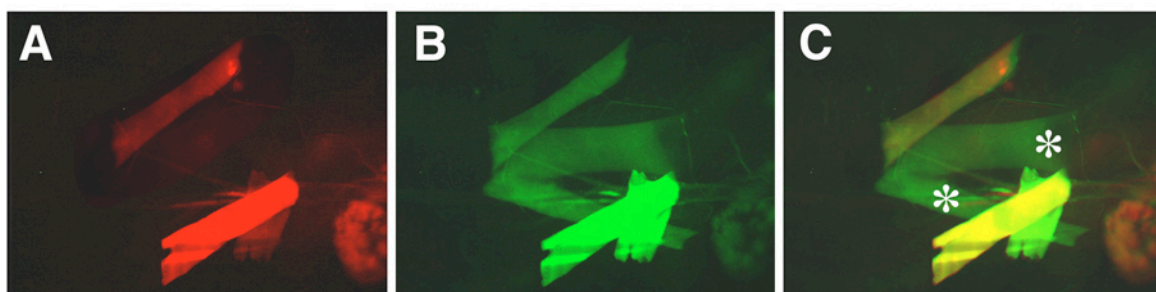


Abbildung 28: Klon in der larvalen somatischen Muskulatur.

Beim Vergleich der cell-lineage- (A) und der Syncytien-Markierung (B) fällt auf, dass in zwei der fünf markierten Muskeln nur der Syncytien- und nicht der cell-lineage-Marker exprimiert wird (* in Überlagerungsbild C). Außerdem schwankt die Expressionsstärke der beiden Marker zwischen den einzelnen markierten Muskeln.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass VD-heterotop Transplantationen innerhalb des Rumpfmesoderms (KLAPPER, 1997) sowie heterotop Transplantationen aus dem Rumpfmesoderm in das prospektive Neuroektoderm (HEUSER, 1999) keinen Einfluss auf die Morphologie, die Größe und die intersegmentale Ausdehnung von Muskelklonen haben. Daher wurden alle erzielten Markierungen ungeachtet ihrer dorsoventralen Transplantationsposition gemeinsam ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass in den Muskelklonen ein bis 14 Muskeln markiert sein konnten, die sich über maximal drei benachbarte Abdominalsegmente erstreckten. Die durchschnittliche Klongröße lag bei den reinen Muskelklonen bei 5,2 markierten Muskeln pro Klon. Alle Klone mit mehr als acht markierten Muskeln zeigen, dass in der larvalen somatischen Muskulatur bis zu vier postblastodermale Mitosen möglich sind. Häufig waren neben- oder übereinanderliegende Muskeln markiert, wobei die Intensität der beiden Markerproteine zwischen den einzelnen Muskeln variieren konnte (siehe Abbildung 28).

Um die Anlage der larvalen somatischen Muskulatur zu kartieren, wurde für alle diesbezüglich auswertbaren Muskelklone ($n=308$) ermittelt, in welchem Segment, beziehungsweise in welchen Segmenten der Klon lokalisiert ist. Da aus heterotopen Transplantationen bezüglich der anterior-posterioren Achse bekannt war, dass sich transplantierte Zellen innerhalb der abdominalen somatischen Muskulatur ortsspezifisch differenzieren (KLAPPER, 1997), wurde die segmentale Zugehörigkeit der Muskelklone in Relation zur Integrationsposition der transplantierten Zellen gesetzt. Um eine bessere Überschaubarkeit zu erlangen, wurden die einzelnen Integrationseilängen in der nachfolgenden Tabelle 17 zu maximal 5% EL umfassenden Bereichen zusammengefasst:

Tabelle 17: Anterior-posteriore Klonverteilung in der larvalen somatischen Muskulatur

Markiertes Segment	Empfänger-Eilänge				
	44-41% EL	40-36% EL	35-31% EL	30-26% EL	25-23% EL
A2	12	4	—	—	—
A3	36	39	5	—	—
A4	13	43	42	21	—
A5	—	4	56	179	7
A6	—	1	11	229	33
A7	—	—	—	36	15
A8	—	—	—	—	1
Summe	61	91	114	465	56

Insgesamt konnten 508 Muskelklone bezüglich ihrer anterior-posterioren Lage ausgewertet werden. Dabei wurden die segmentüberlappenden Klone mehrfach gewertet. Die fettgedruckten Zahlen zeigen für jeden Eilängenbereich das am häufigsten markierte Abdominalsegment an. (A) Abdominalsegment; (—) In diesem Segment konnte kein Muskelklon detektiert werden.

Innerhalb des Transplantationsbereiches von 44 bis 23% EL erstreckten sich die Muskelklone auf die Abdominalsegmente 2 bis 8. Dabei wird deutlich, dass es zu einer Verschiebung der Markierungshäufigkeiten kommt: So wurde im anterioren Transplantationsbereich bei 44 bis 40% EL hauptsächlich das Segment A3 markiert, während im posterioren Transplantationsbereich bei 25 bis 23% EL vornehmlich das Segment A6 betroffen war. Tendenziell scheint eine konsekutive Abfolge der einzelnen Segmentanlagen in Übereinstimmung mit der anatomischen Abfolge der später ausgeprägten Segmente vorzuliegen.

Weiterhin wurde die hemisegmentale Klonverteilung für 450 diesbezüglich auswertbare Muskelklone verglichen. Dabei zeigte sich, dass der Anteil der unilateralen Klone mit 62% über dem der bilateralen Klone lag. Außerdem waren die lateralen und die ventralen Muskeln häufiger und die dorsalen Muskeln wesentlich seltener markiert, als aufgrund ihrer Anlagengröße postuliert werden konnte. Diese Beobachtungen stimmen mit den Befunden von KLAPPER (1997) und HEUSER (1999) überein.

3.7.2 Klone im Fettkörper

Der larvale Fettkörper wurde von RIZKI und RIZKI (1970) aufgrund morphologischer und physiologischer Kriterien in acht Bereiche unterteilt (siehe Abbildung 4). Da die Wanderlarven im Rahmen der vorliegenden Anlagenkartierung jedoch *in vivo* untersucht wurden, konnten die detektierten Fettkörper-Klone keinem definierten Bereich oder Hemisegment zugeordnet werden.

Insgesamt wurden in 122 Fällen cell-lineage-Markierungen im larvalen Fettkörper gefunden, von denen 111 Klone aus homotopen Transplantationen stammten. Für die weitere Auswertung wurden zunächst die Fettkörper-Markierungen aus den homotopen und den heterotopen Transplantationen miteinander verglichen. Da sich zeigte, dass beide Transplantationsarten zu vergleichbaren Klonmorphologien, -größen und -häufigkeiten führten, wurden im Weiteren alle erzielten Fettkörper-Klone gemeinsam ausgewertet.

Die Fettkörper-Markierungen hatten einen Anteil von 21% an allen mesodermalen Klonen. Sie überlappten zu einem großen Teil ($n=111$) mit weiteren mesodermalen Derivaten, und zwar hauptsächlich mit Markierungen in der larvalen somatischen Muskulatur ($n=106$). Der Anteil der reinen Fettkörper-Klone betrug nur 9%. Weiterhin besaßen die Fettkörper-Klone ein weites Variationsspektrum: Neben kleinen Klonen, die nur wenige dicht beieinander liegende Zellen betrafen (siehe Abbildung 29), wurden auch Klone gefunden, die weiter auseinanderliegende Fettkörperzellen umfassten.

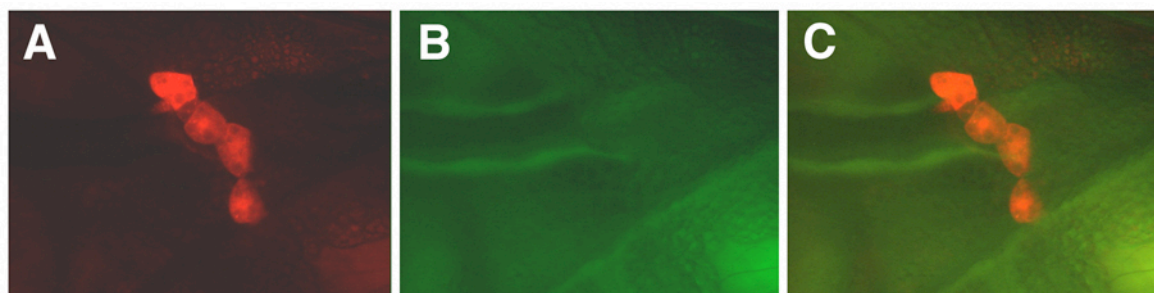


Abbildung 29: Klon im larvalen Fettkörper.

Der Vergleich der cell-lineage- (A) und der Syncytien-Markierung (B) bestätigt, dass der cell-lineage-Marker *DsRed* exklusiv in vier zusammenhängenden Fettkörperzellen exprimiert wird (siehe auch Überlagerungsbild C).

Alle reinen Fettkörper-Klone setzten sich aus zwei bis zwölf markierten Zellen zusammen, wobei die durchschnittliche Klongröße bei fünf markierten Zellen pro reinem Fettkörper-Klon lag. Der 12-Zell-Klon zeigt, dass im Fettkörper bis zu vier postblastodermale Mitosen stattfinden können (HOLZ et al., 1997). In den Gewebe-überlappenden Klonen waren eine bis elf Fettkörperzellen markiert. Die durchschnittliche Klongröße betrug in diesem Fall 3,2 markierte Zellen pro Klon und ist damit um fast zwei Zellen kleiner als die durchschnittliche Klongröße reiner Fettkörper-Klone. Beim Vergleich der Klongrößen in den reinen und den überlappenden Fettkörper-Klonen fiel auf, dass in beiden Fällen deutlich mehr Klone mit geradzahligen als mit ungeradzahligen Zellzahlen auftraten (jeweils mehr als 90%). Außerdem waren in beiden Fällen die Klonklassen am häufigsten, in denen zwei oder vier Fettkörperzellen markiert waren. Die Ergebnisse aller hier dargestellten Klongrößenvergleiche stimmen mit den Befunden von KLAPPER (1997) überein.

Um die Fettkörperanlage näher charakterisieren zu können, wurde für alle Fettkörper-Markierungen die anterior-posteriore und die dorsoventrale Zellentnahme- und Integrationsposition bestimmt und zur Summe der mesodermalen Markierungen in diesem Transplantationsbereich ins Verhältnis gesetzt. Dabei zeigte sich, dass im gesamten Untersuchungsbereich Fettkörpermarkierungen mit einer vergleichbaren Häufigkeit auftraten. Somit erstreckt sich die Fettkörperanlage offenbar homogen über nahezu die gesamte Länge der untersuchten Mesodermregion (43 bis 24% EL) sowie die ganze Breite des Mesoderms (0 bis 30% VD). Die zahlreichen Gewebe-überlappenden Klone belegen, dass die Anlage zum Transplantationszeitpunkt noch nicht determiniert ist.

Obwohl es sich beim larvalen Fettkörper um ein mononucleäres Mesodermderivat handelt (RIZKI, 1978b), konnte in den Fettkörper-Klonen der Wanderlarven in 13 Fällen (=11%) auch der Syncytien-Marker GFP nachgewiesen werden. Diese Doppelmarkierung betraf in

elf Fällen alle DsRed-markierten Fettkörperzellen, während sie in zwei Fällen auf einen Teil der cell-lineage-Markierung beschränkt war.

Mit der Untersuchung aller die Metamorphose überdauernden Empfänger (n=371) sollte geklärt werden, woher der adulte Fettkörper stammt. Bisher wurde postuliert, dass die tiefen Fettzellen, bei denen es sich um persistierende larvale Fettkörperzellen handelt (RIZKI, 1978b), in den ersten vier Tagen nach dem Schlupf kontinuierlich abgebaut werden (WIGGLESWORTH, 1949; BUTTERWORTH, 1972; POSTLETHWAIT und JONES, 1978). Im Gegensatz dazu sollen die segmental angeordneten peripheren Fettzellen, die den eigentlichen adulten Fettkörper bilden, *de novo* aus einer bisher unbekanntem Anlage hervorgehen (MILLER, 1950; RIZKI, 1978b).

Bei der Untersuchung der ein bis sieben Tage alten Imagines konnte in 37 Fällen eine reine cell-lineage Markierung im adulten Fettkörper (n=19), beziehungsweise in Fettkörper-Fragmenten (n=18) detektiert werden. In 34 dieser Tiere war bereits im Wanderlarvenstadium ein Fettkörper-Klon festgestellt worden.

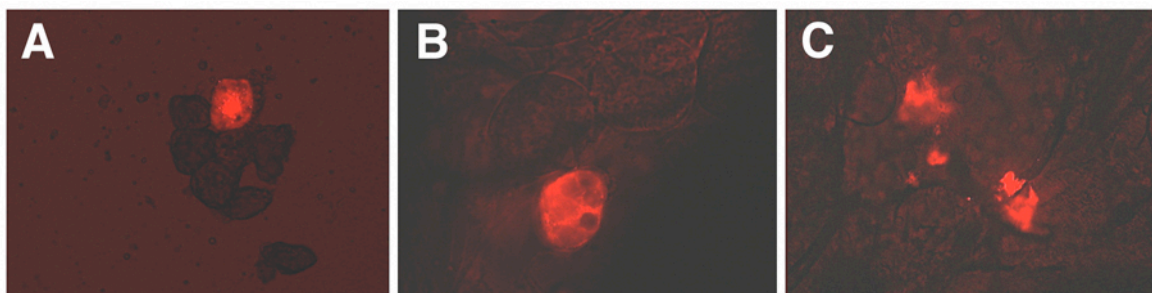


Abbildung 30: Erscheinungsformen adulter Fettkörper-Markierungen.

Der cell-lineage-Marker DsRed kann im Adultstadium in verschiedenen Zelltypen detektiert werden: Die Zellen des tiefen Fetts (A) weisen die Größe und Morphologie larvaler Fettkörperzellen auf und zirkulieren frei in der Hämolymphe. Auch die peripheren Fettzellen (B) haben eine granuläre Struktur; sie sind jedoch fest mit der Epidermis verbunden. Bei den Fettkörper-Fragmenten (C) hat die Histolyse des larvalen Fettkörpers bereits eingesetzt. Das DsRed kann in diesem Fall nur noch in Zellresten in der Karkasse detektiert werden.

Die zellulären Fettkörper-Klone können in zwei Klassen unterteilt werden: Zum einen gab es nicht-sessile Einzelzellen (n=1, siehe Abbildung 30A), die aufgrund ihrer Morphologie zum tiefen Fett gezählt werden konnten. Diese Zellen larvalen Ursprungs konnten in zwei bis sechs Tage alten Imagines identifiziert werden. Sie widerlegen andere Untersuchungen, denen zufolge der Abbau des larvalen Fettkörpers bereits vier Tage nach dem Schlupf der Imago abgeschlossen sein soll (WIGGLESWORTH, 1949; BUTTERWORTH, 1972; POSTLETHWAIT und JONES, 1978). Weiterhin wurden in 14 Fällen der Epidermis anhaftende Zellen detektiert, bei denen es sich dem Erscheinungsbild nach um periphere

Fettzellen handelte (siehe Abbildung 30B). Diese adulten Fettkörperzellen konnten bereits in einen Tag alten Imagines beobachtet werden. In zwei Fällen traten überlappende Klone zwischen tiefen und peripheren Fettzellen auf, aus denen auf die klonale Verwandtschaft beider Zelltypen geschlossen werden kann. Außerdem hatten zwölf der 14 Empfänger bereits eine Fettkörper-Markierung im Wanderlarvenstadium. Dies deutet darauf hin, dass das periphere Fett und somit der eigentliche adulte Fettkörper aus dem larvalen Fettkörper hervorgeht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das periphere Fett aus imaginalen Vorläuferzellen entsteht, die bei der Untersuchung im Wanderlarvenstadium übersehen wurden.

Bei den Fettkörper-Fragmenten handelte es sich um *DsRed*-exprimierende Zelltrümmer (siehe Abbildung 30C), die frei in der Hämolymphe schwammen. Diese Fettkörper-Abbauprodukte konnten nur in Imagines beobachtet werden, die bereits als Larve eine Fettkörper-Markierung aufwiesen und zwischen einem und sieben Tagen alt waren. In weiteren 16 Fällen konnten die larvalen Fettkörper-Markierungen in den ein bis sieben Tagen alten Imagines nicht redetektiert werden, was für eine vollständige Histolyse dieses Gewebes zum Untersuchungszeitpunkt spricht. Somit scheint der Abbau des larvalen Fettkörpers bereits während der Metamorphose einzusetzen und über die erste Lebenswoche anzudauern.

3.7.3 Klone in der visceralen Muskulatur des Mitteldarms

In der vorliegenden Arbeit wurden in 27 Wanderlarven Klone in der **longitudinalen visceralen Muskulatur** des Mitteldarms detektiert (siehe Abbildung 31). Dabei handelte es sich in einem Fall um eine rein syncytiale Markierung für die, wie schon für die larvale somatische Muskulatur beschrieben (siehe Kapitel 3.7.1), eine unter die Nachweisgrenze fallende Koexpression des cell-lineage-Markers *DsRed* postuliert werden muss. Während in sechs Fällen ausschließlich longitudinale Darmmuskeln markiert waren, überlappte diese Markierung in den übrigen 21 Klonen mit weiteren mesodermalen Derivaten wie der somatischen Muskulatur (n=14) und/oder der circulären visceralen Muskulatur (n=8). In den Transplantationsklonen waren ein bis vier parallel verlaufende Muskeln markiert, wobei die durchschnittliche Klongröße in den nicht-überlappenden Klonen bei 2,7 longitudinalen Muskeln pro Klon lag. Die Anzahl der betroffenen Zellkerne konnte in diesem filigranen Gewebe im Rahmen der Lebendbeobachtung nicht näher bestimmt werden. Der Syncytien-Marker GFP konnte nur in sieben Klonen nachgewiesen werden, wobei in fünf Fällen in einzelnen Muskeln exklusiv der cell-lineage-Marker exprimiert wurde.

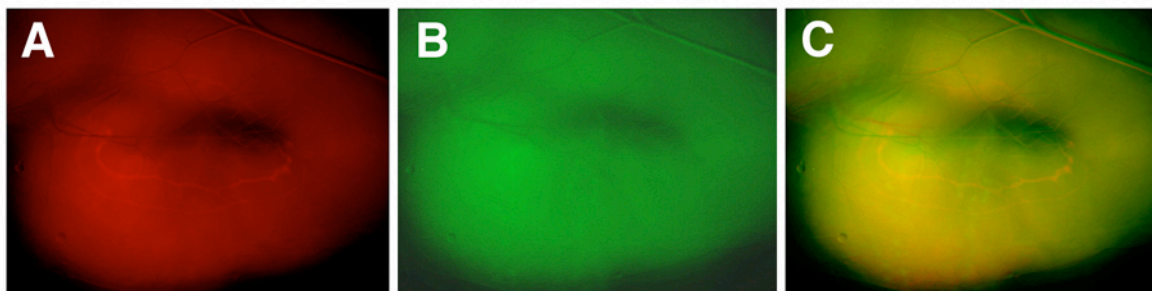


Abbildung 31: Klon in der longitudinalen visceralen Muskulatur des larvalen Mitteldarms.

Während in allen Nachkommen der transplantierten Zelle der cell-lineage-Marker DsRed nachgewiesen werden kann (A), ist die Expression des Syncytien-Markers *GFP* auf Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass in den zwei longitudinalen visceralen Muskeln ausschließlich der cell-lineage-Marker exprimiert wird.

In den 371 untersuchten Imagines konnten in 20 Fällen cell-lineage-Klone in der longitudinalen Mitteldarmmuskulatur detektiert werden (siehe Abbildung 32). Nur in sieben dieser Empfänger war bereits im Wanderlarvenstadium eine Markierung in diesem Gewebe nachgewiesen worden. Da die longitudinale viscerele Muskulatur die Metamorphose vollständig überdauert (KLAPPER, 2000), sind entsprechende Klone in den übrigen 13 Empfängern vermutlich übersehen worden. Die genauere Untersuchung der markierten Muskeln zeigte, dass die cell-lineage-Markierungen in drei Fällen größer ausfielen als im jeweiligen Wanderlarvenstadium. Außerdem konnten vier Syncytien-Markierungen detektiert werden, von denen drei zuvor in der Larve nicht nachgewiesen werden konnten. Die longitudinalen visceralen Muskeln besitzen ein sehr filigranes und lang gestrecktes Cytoplasma, in dem das GAL4-Protein vermutlich einer diffusionsbedingten Ausdünnung unterliegt. Da der larvale Darm bei gleicher Zellkernzahl die doppelte Länge des imaginalen Darms besitzt (KLAPPER, 2000), hat der Diffusionsgradient in diesem Untersuchungsstadium anscheinend einen größeren Einfluss auf die Aktivierung der beiden *UAS*-Reportergensequenzen. Dieses Phänomen wurde in vergleichbaren Transplantationsexperimenten von KLAPPER et al. (2001) bereits eingehend untersucht.

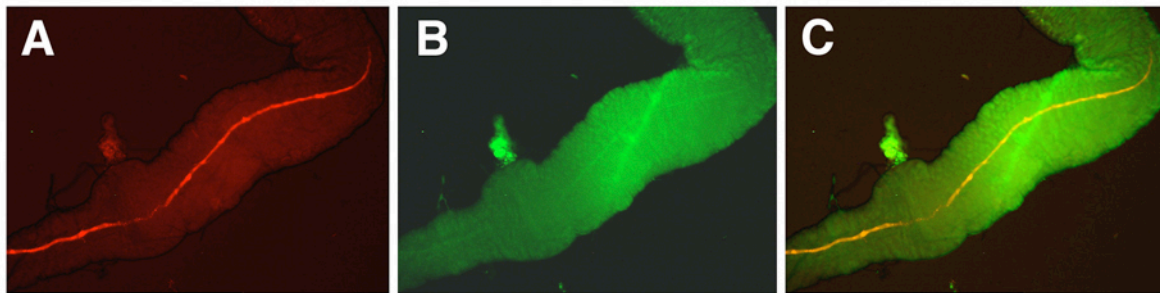


Abbildung 32: Klon in der longitudinalen viscerale Muskulatur eines präparierten imaginalen Mitteldarms.

Beim Vergleich der cell-lineage- (A) und der Syncytien-Markierung (B) fällt auf, dass in dem markierten longitudinalen viscerale Muskel beide Marker koexprimiert werden (siehe auch Überlagerungsbild C). Wegen der hohen Eigenfluoreszenz des Darms ist die Expression des Syncytien-Markers nur schwach zu erkennen.

In 34 Wanderlarven konnten Markierungen in der **circulären viscerale Muskulatur** des Mitteldarms detektiert werden, die in 29 Fällen mit weiteren mesodermalen Derivaten wie der somatischen Muskulatur (n=18) überlappten. Diese Markierungen betrafen ein bis zehn circuläre Darmmuskeln, die meist in direkter Nachbarschaft lagen. Die markierten Muskeln besaßen stets eine netzartige Struktur sowie zwei Zellkerne und waren immer auf eine Darmhalbseite beschränkt (siehe Abbildung 33). Die durchschnittliche Klongröße lag bei den reinen Muskelklonen bei 4,3 circulären Muskeln pro Klon. In 23 Klonen konnte eine Koexpression des Syncytien-Markers detektiert werden, die in vier Fällen kleiner als die des cell-lineage-Markers ausfiel. Somit scheint die Zellfusion in der circulären viscerale Muskulatur unabhängig von der klonalen Verwandtschaft der beteiligten Myoblasten möglich zu sein.

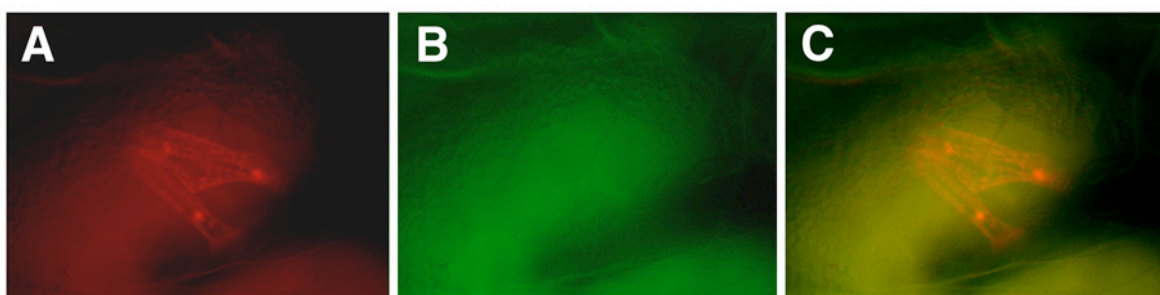


Abbildung 33: Klon in der circulären viscerale Muskulatur des larvalen Mitteldarms.

Während alle Nachkommen der transplantierten Zelle den cell-lineage-Marker *DsRed* exprimieren (A), ist die *GFP*-Expression auf miteinander fusionierte Zellen unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). Im Überlagerungsbild (C) ist deutlich zu erkennen, dass in den zwei circulären Darmmuskeln ausschließlich der cell-lineage-Marker nachgewiesen werden kann. Beide Muskeln besitzen eine netzförmige Struktur und bedecken nur eine Darmhalbseite. In einem Muskel sind deutlich die zwei Zellkerne des gemeinsamen Cytoplasmas zu erkennen.

Bei der Untersuchung der Imagines konnten zehn cell-lineage-Markierungen in der circulären Darmmuskulatur detektiert werden. Von diesen waren acht bereits im Wanderlarvenstadium nachgewiesen worden. Da es sich bei der circulären visceralen Muskulatur des Mitteldarms um ein die Metamorphose überdauerndes Gewebe handelt (KLAPPER et al., 2002), sind vermutlich zwei cell lineage-Markierungen bei der *in vivo*-Untersuchung im Larvenstadium übersehen worden.

In weiteren vier Empfängern, welche als Wanderlarven einen Klon in der circulären Darmmuskulatur aufgewiesen hatten, konnten diese ein bis sechs Muskeln umfassenden Markierungen im Adultstadium nicht mehr redetektiert werden. Außerdem waren bei drei persistierenden Muskelklonen die cell-lineage- und die Syncytien-Markierungen in den Imagines kleiner als im jeweiligen Wanderlarvenstadium. Somit scheint ein partieller Abbau der circulären visceralen Muskulatur des Mitteldarms während der Metamorphose möglich zu sein.

Die zehn cell-lineage-Markierungen umfassten ein bis sechs circuläre Darmmuskeln, die immer nur einer Darmhalbseite auflagen. Alle markierten Muskeln wiesen eine spangenförmige Morphologie auf, bei der die Zellkerne im stark kondensierten Cytoplasma nicht mehr explizit lokalisiert werden konnten (siehe Abbildung 34). In sechs Klonen konnte auch der Syncytien-Marker GFP detektiert werden, dessen Koexpression sich in zwei Fällen jedoch nur auf einzelne Muskeln beschränkte.

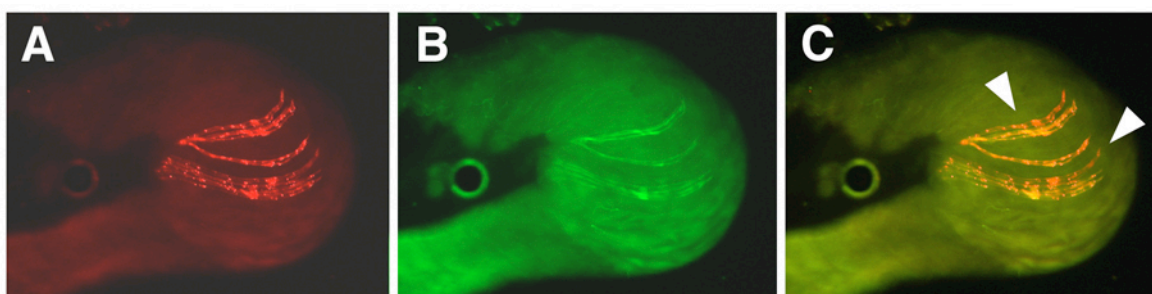


Abbildung 34: Klon in der circulären visceralen Muskulatur eines präparierten imaginalen Mitteldarms.

Der Vergleich der cell-lineage- (A) und der Syncytien-Markierung (B) enthüllt, dass in zwei der sechs markierten Muskeln ausschließlich der cell-lineage-Marker exprimiert wird (Pfeilspitzen in Überlagerungsbild C). Während das DsRed innerhalb des Cytoplasmas koaguliert, ist das GFP gleichmäßig verteilt. Alle Muskeln umziehen spangenförmig eine Darmhalbseite, wobei in ihrem kondensierten Cytoplasma keine Zellkerne zu erkennen sind.

Um die Anlagengröße der Mitteldarmmuskulatur besser abschätzen zu können, wurde für alle Markierungen in der longitudinalen und circulären visceralen Muskulatur die anterior-posteriore und die dorsoventrale Zellentnahme- und Integrationsposition bestimmt. Dabei zeigte sich, dass aus dem gesamten Untersuchungsbereich Klone in der visceralen Musku-

latur des Mitteldarms hervorgingen. Somit erstrecken sich die Anlage der circulären visceralen Muskulatur und die der fusionskompetenten Myoblasten der longitudinalen visceralen Muskulatur über fast die gesamte Länge der untersuchten Mesodermregion (44 bis 24% EL) sowie die ganze Mesoderm-Breite (0 bis 30% VD). Die zahlreichen Gewebeüberlappenden Klone zeigten außerdem, dass die beiden Anlagen zum Transplantationszeitpunkt noch nicht determiniert sind.

3.7.4 Klone in der imaginalen somatischen Muskulatur

Für die imaginale somatische Muskulatur des Abdomens ist bekannt, dass diese ausschließlich auf sechs adulte Muskelvorläuferzellen pro embryonalem abdominalem Hemisegment zurückzuführen ist, welche sich durch eine permanente *twist*-Expression auszeichnen (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991; BROADIE und BATE, 1991). Diese Vorläuferzellen proliferieren ab dem zweiten Larvenstadium und können in Form dreier dorsaler, zweier lateraler und eines ventralen imaginalen Muskelvorläufers im Wanderlarvenstadium morphologisch unterschieden werden.

Um Transplantationsklone in diesem Gewebe eindeutig identifizieren zu können, wurden zunächst X-Gal-Färbungen an Wanderlarven der Linie *twi-lacZ* durchgeführt. Bei der Auswertung von 20 angefärbten Hautmuskelschläuchen zeigte sich, dass die Lage und Größe der imaginalen Muskelvorläufer sowohl zwischen den verschiedenen Individuen als auch zwischen den einzelnen Hemisegmenten variieren konnte (siehe Abbildung 35). Die drei dorsalen Muskelvorläufer waren verhältnismäßig kurz und lagen eng beieinander. Eindeutig identifizierbar waren stets die beiden lateralen Muskelvorläufer, die an der anterioren und posterioren Segmentgrenze jeweils in engem Kontakt zum *segment border muscle* (= SBM) standen.

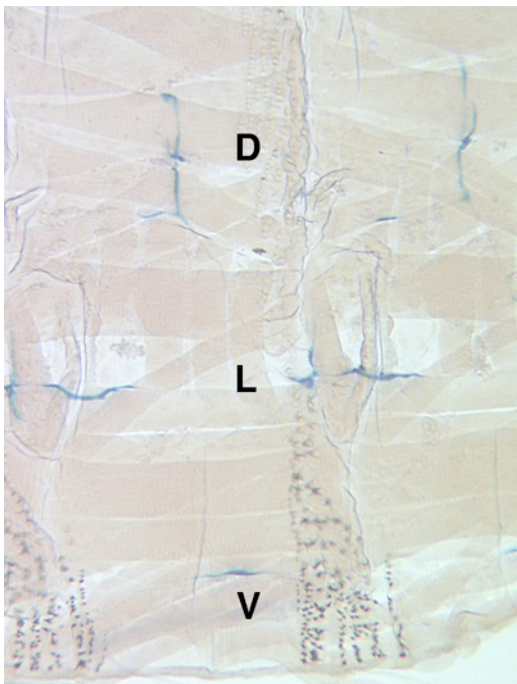


Abbildung 35: Identifizierung der imaginalen Muskelvorläufer im larvalen Abdomen.

Gezeigt ist das X-Gal-Färbemuster in zwei aufeinanderfolgenden abdominalen Hemisegmenten einer Wanderlarve der Linie *twi-lacZ*. Alle imaginalen Muskelvorläufer sind blau angefärbt. Anterior ist links, die ventrale Mittellinie befindet sich unten. (*D*) dorsal; (*L*) lateral; (*V*) ventral.

Im Rahmen der Transplantationsexperimente wurden in 59 Wanderlarven cell-lineage-Markierungen in **imaginalen Muskelvorläufern** gefunden. Obwohl die acht bis 16 imaginalen Myoblasten eines imaginalen Muskelvorläufers zum Untersuchungszeitpunkt unfusioniert und somit mononucleär vorliegen (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991), konnte in zwei Fällen zusätzlich der Syncytien-Marker GFP detektiert werden. Da diese Markierung jeweils den gesamten Muskelvorläufer betraf, kann eine Fusions- oder verletzungsbedingte Expression des *GFP* in einzelnen Myoblasten ausgeschlossen werden.

In 53 der 59 Klone war neben einem imaginalen Muskelvorläufer auch die larvale somatische Muskulatur des Abdomens markiert. Insgesamt konnten 47 dieser Klone näher auf die räumliche Orientierung ihrer larvalen und imaginalen Markierungen untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass in jedem einzelnen Klon die segmentale, hemisegmentale und dorsoventrale Position der markierten Gewebe übereinstimmte; konnte der cell-lineage-Marker beispielsweise in einem lateralen imaginalen Muskelvorläufer nachgewiesen werden, so waren in dem betroffenen Hemisegment immer auch einzelne laterale Muskeln markiert.

In den meisten Fällen konnte nur ein markierter imaginaler Muskelvorläufer pro Klon detektiert werden (n=45). Bei dem Großteil aller Klone war, unabhängig von der dorsoventralen Zellentnahme- oder Integrations-Position, ein lateraler Muskelvorläufer markiert (n=49). Wurden zwei Markierungen in diesem Gewebe gefunden, so handelte es sich in den meisten Fällen um laterale imaginale Muskelvorläufer in benachbarten Hemisegmenten (n=9).

Von den 59 Empfängern mit Markierungen in den imaginalen Muskelvorläufern überlebten 28 die Metamorphose. Bei deren erneuter Untersuchung im Adultstadium konnte in 23 Fällen eine cell-lineage-Markierung in der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens nachgewiesen werden. Zusätzlich besaßen vier weitere Imagines eine cell-lineage-Markierung in der imaginalen somatischen Muskulatur, bei denen zuvor in den imaginalen Muskelvorläufern keine Markergenexpression nachgewiesen werden konnte. Da die imaginale somatische Muskulatur des Abdomens allein auf die imaginalen Muskelvorläufer zurückzuführen ist (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991), wurden entsprechende Markierungen in diesem sehr filigranen Gewebe im Wanderlarvenstadium offenbar übersehen.

Die Verfolgung permanent *twist*-exprimierender Zellen (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991) sowie Ablationsexperimente an imaginalen Muskelvorläufern (BROADIE und BATE, 1991) führten zu der Theorie, dass alle adulten Muskelvorläuferzellen sowie die aus ihnen hervorgehenden imaginalen Muskelvorläufer auf die Ausbildung einer speziellen Gruppe adulter abdominaler Muskeln determiniert sind (siehe Abbildung 3). Dabei sollen, im Gegensatz zur larvalen Myogenese, nur klonal verwandte Myoblasten miteinander fusionieren können. Überträgt man diese Überlegungen auf die Transplantationsklone der vorliegenden Arbeit, so sollte sich beispielsweise ein lateraler imaginaler Muskelvorläufer ausschließlich zur Hälfte aller lateralen Muskeln des korrespondierenden imaginalen Hemisegments differenzieren können. In diesen Muskeln sollte außerdem nur der cell-lineage-Marker *DsRed* exprimiert werden. Für die 27 Klone in der **imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens** konnte diese strenge Restriktion jedoch nur in vier Fällen beobachtet werden. Bei allen anderen Klonen fiel die detektierte Markierung größer als nach der theoretischen Vorhersage aus, wobei in einem Großteil der markierten Muskeln zudem der Syncytien-Marker GFP nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 36 und Tabelle 18). Dies bedeutet, dass – entgegen der gängigen Lehrbuchmeinung – imaginale Myoblasten unterschiedlicher klonaler Herkunft miteinander fusioniert sein müssen.

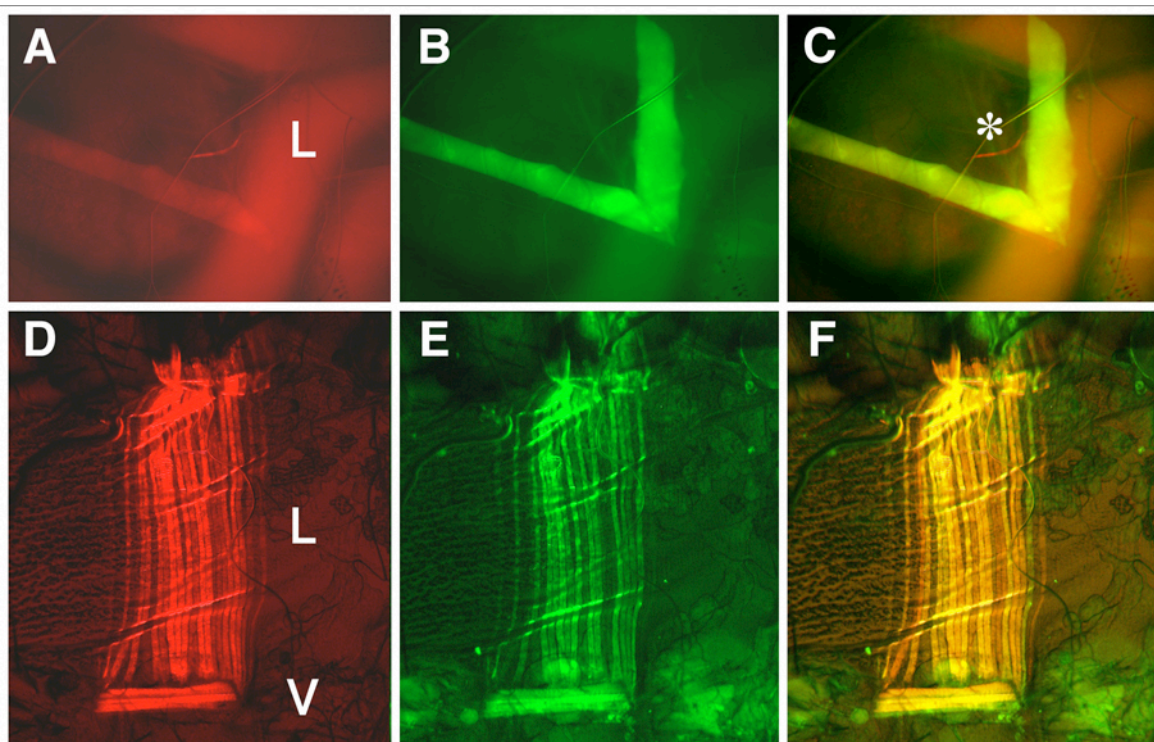


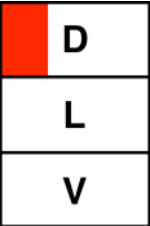
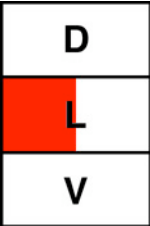


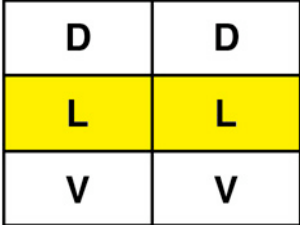
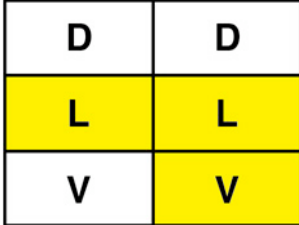
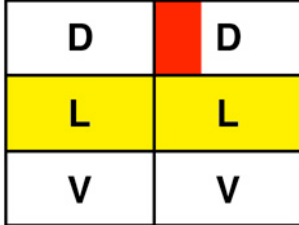
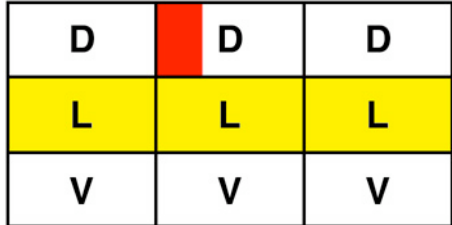

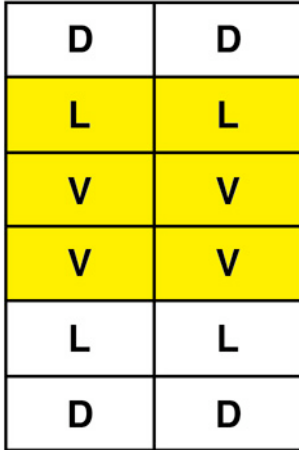
Abbildung 36: Klon in einem lateralen Muskelvorläufer (A bis C) und den daraus resultierenden imaginalen somatischen Muskeln (D bis F).

Im Wanderlarvenstadium (A bis C) überlappt der Transplantationsklon zwischen zwei larvalen somatischen Muskeln und einem lateralen Muskelvorläufer (*L*). Während der cell-lineage- (A) und der Syncytien-Marker (B) in den larvalen somatischen Muskeln unterschiedlich stark koexprimiert werden, wird der mononucleäre imaginale Muskelvorläufer ausschließlich durch den cell-lineage-Marker DsRed markiert (* in C).

Nach der Metamorphose (D bis F) werden der cell-lineage- (D) und der Syncytien-Marker (E) in nahezu allen lateralen (*L*) und ventralen (*V*) Muskeln des korrespondierenden Hemisegments exprimiert.

Die räumliche Ausdehnung der Klone in der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens konnte sehr unterschiedlich ausfallen (siehe Tabelle 18): Während in den meisten Fällen nur eine Körperhälfte markiert war, konnten in drei Imagines bilaterale Klone detektiert werden. Die Markierungen konnten den Großteil einer lateralen Muskelgruppe umfassen (n=21) oder zwischen der lateralen und dorsalen (n=2), beziehungsweise der lateralen und ventralen Muskelgruppe (n=0) eines Hemisegments überlappen. Außerdem dehnten sich die Markierungen in 14 Fällen über zwei und in einem Fall sogar über drei benachbarte Hemisegmente aus. Die Migration und Durchmischung der imaginalen Myoblasten scheint somit intra- und intersegmental möglich zu sein, wobei sie auf direkt benachbarte Nachkommen der imaginalen Muskelvorläufer beschränkt ist.

Tabelle 18: Markierungsverteilungen in der imaginalen somatischen Muskulatur

Markierungen in einem Hemisegment				
Markierte Muskelgruppen				
Anzahl	2	2	4	4
Davon mit IM-Markierung	1 (ein dorsaler IM)	1 (ein lateraler IM)	3 (zweimal ein lateraler IM und einmal 2 laterale IM in benachbarten Hemisegmenten)	4 (je ein lateraler IM)
Hemisegment-überlappende Markierungen				
Markierte Muskelgruppen				
Anzahl	5	5	1	
Davon mit IM-Markierung	5 (viermal ein lateraler IM und einmal 2 laterale IM in benachbarten Hemisegmenten)	5 (zweimal ein lateraler IM und dreimal 2 laterale IM in benachbarten Hemisegmenten)	–	
Markierte Muskelgruppen				
Anzahl	1	2	1	
Davon mit IM-Markierung	1 (ein lateraler IM)	2 (je ein ventraler IM)	1 (ein lateraler IM)	

Die imaginale somatische Muskulatur jedes abdominalen Hemisegments setzt sich aus drei Muskelgruppen zusammen, nämlich einer dorsalen (D), einer lateralen (L) und einer ventralen (V). Sowohl Muskelgruppen als auch Hemisegmente werden durch Kästchen symbolisiert. Dabei zeigt die gelbe Markierung, dass nahezu alle Muskeln einer definierten Gruppe den cell-lineage- und den Syncytien-Marker koexprimieren. Die rote Markierung besagt, dass in den Muskeln einer bestimmten Gruppe ausschließlich der cell-lineage-Marker nachgewiesen werden konnte. (IM) Imaginaler Muskelvorläufer.

Bei den 23 Klonen, in denen bereits im Wanderlarvenstadium eine Markierung in einem imaginalen Muskelvorläufer detektiert wurde, stimmten zumindest für einen Teil der markierten Muskeln das Abdominalsegment, die Körperhälfte und die dorsoventrale Position mit der Lage des zugehörigen imaginalen Muskelvorläufers überein. Für einen lateralen imaginalen Muskelvorläufer bedeutet das beispielsweise, dass im Adultstadium mindestens die Hälfte aller lateralen Muskeln des korrespondierenden Hemisegments markiert sind; meistens dehnt sich die Markierung jedoch noch auf eine direkt benachbarte Muskelgruppe oder das angrenzende Hemisegment aus.

Für die imaginale somatische Muskulatur des Abdomens konnte, wie bereits für die larvale somatische Muskulatur gezeigt (siehe Kapitel 3.7.1), eine konsekutive Abfolge der Markierungsmaxima entlang der anterior-posterioren Achse beobachtet werden. So wurden im anterioren Untersuchungsbereich bei 43 bis 36% EL hauptsächlich die Segmente A2 bis A5 markiert, während im posterioren Transplantationsbereich bei 30 bis 24% EL die Segmente A5 bis A8 betroffen waren. Tendenziell scheint also auch in diesem Gewebe eine konsekutive Abfolge der einzelnen Segmentanlagen in Übereinstimmung mit der anatomischen Abfolge der später ausgeprägten Segmente vorzuliegen. Weiterhin deutet das Auftreten segmentüberlappender Markierungen im Adultstadium darauf hin, dass – in Homologie zur larvalen Myogenese – auch die Primordien für die imaginale Muskulatur benachbarter Abdominalsegmente überlappen. Markierungen in den imaginalen Muskelvorläufern und der daraus resultierenden imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens konnten über die gesamte Mesoderm-Breite (0 bis 30% VD) erzielt werden.

Während der larvalen Myogenese werden durch das Zusammenspiel von lokalen Spezifikationsprozessen, lateraler Inhibition und asymmetrischer Zellteilung Muskelgründerzellen (*muscle founder cells*) determiniert, welche die erforderliche genetische Information zur Bildung eines individuellen larvalen Muskels besitzen. Diese spezielle Musterbildungsinformation wird durch das Zusammenspiel von Muskelidentitätsgenen wie *Krüppel* (*Kr*), *apterous* (*ap*), *slouch* (*S59*) und *ladybird* (*lb*) vermittelt und bei der Fusion der Muskelgründerzellen mit benachbarten fusionskompetenten Zellen (*fusion-competent cells*) an diese weitergegeben (Übersicht bei BAYLIES et al., 1998; siehe Kapitel 1.2). Die Transplantationsklone der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei der Differenzierung der imaginalen Muskulatur des Abdomens häufig eine inter- und intrasegmentale Durchmischung der imaginalen Myoblasten zu beobachten ist und die Fusion klonal nicht-verwandter Myoblasten der Regelfall zu sein scheint. Da die larvale Myogenese auf der Fusion genetisch unterschiedlicher Zellpopulationen – ungeachtet ihrer klonalen Herkunft – basiert, wäre die Reaktivierung ihrer genetischen Komponenten während der imaginalen Myogenese denkbar. Diese Hypothese wurde in neueren Studien bereits für die imaginale

Thorax-Muskulatur untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die erneute Expression des Gene *dumbfounded* (*duf*) (KOZOPAS und NUSSE, 2002) und *apterous* (*ap*) (GHAZI et al., 2000; BERNARD et al., 2003) während der frühen Pupalstadien essentiell für die Bildung der direkten Flugmuskulatur ist. Somit scheint die Determination von Muskelgründerzellen – zumindest für einen Teil der thorakalen Myoblasten – analog zur embryonalen Myogenese zu erfolgen.

Um diese Hypothese auch für die Determination und Fusion der abdominalen imaginalen Myoblasten zu untersuchen, wurden ebenfalls die Expressionsmuster der Gene *dumbfounded* (*duf*) und *apterous* (*ap*) analysiert. Dazu wurden die Reportergergen-tragenden Treiberlinien *rP298-GAL4* (laut NOSE et al. (1998) und RUIZ-GOMEZ et al. (2000) mit einem *duf*-spezifischen Expressionsmuster) und *ap-GAL4* mit der Effektorlinie *UAS-GFP* gekreuzt. Die Nachkommen beider Kreuzungen wurden zunächst im Embryonalstadium auf die Expression ihres *GFP*-Reportergergens kontrolliert. Es zeigte sich, dass die Muskulatur-spezifische Expression beider Gene mit den in der Literatur beschriebenen Expressionsmustern übereinstimmte (RUIZ-GOMEZ et al., 2000; BOURGOUIN et al., 1992). Nachdem die Nutzbarkeit der verwendeten Stämme auf diese Weise überprüft worden war, wurden die Nachkommen beider Kreuzungen zu Beginn ihrer Verpuppung abgesammelt und zu definierten Zeiten präpariert (siehe Kapitel 2.5).

Die Nachkommen der Kreuzung *rP298-GAL4* x *UAS-GFP* wurden von ihrer Verpuppung (=0 h APF (*After Puparium Formation*)) bis zum Ende der Metamorphose (=98,5 h APF) auf die Expression des *GFP*-Reportergergens untersucht. Dabei konnte in den überprüften Abdomina schon 17 h APF eine spezifische *rP298*-Expression in einer dorsolateral liegenden, segmental angeordneten Zellreihe detektiert werden. 24 h APF zeigten drei Nerven-assoziierte Zellgruppen pro abdominalem Hemisegment die Expression des Muskelgründerzell-Markers. Diese lagen an einer dorsolateralen, einer lateralen und einer ventrolateralen Position. Während die laterale Gruppe schon 27 h APF nicht mehr identifiziert werden konnte, streckten sich die markierten Zellen der dorso- und der ventrolateralen Gruppe zu diesem Zeitpunkt. Bereits 31,5 h APF wurde deutlich, dass es sich bei diesen beiden Zellgruppen um die sich bildenden dorsalen und ventralen Muskeln handelte. Die *rP298*-Expression blieb in den beiden Muskelgruppen länger als 65,5 h APF und somit über die eigentliche Myoblastenfusion hinaus erhalten. Zusätzlich konnte 54,5 h APF die *rP298*-Expression in den persistierenden dorsalen Muskeln und 65,5 h APF im persistierenden lateralen Muskel nachgewiesen werden. Eine Übersicht des räumlich-zeitlichen *rP298*-Expressionsmusters findet sich in der nachfolgenden Abbildung 37:

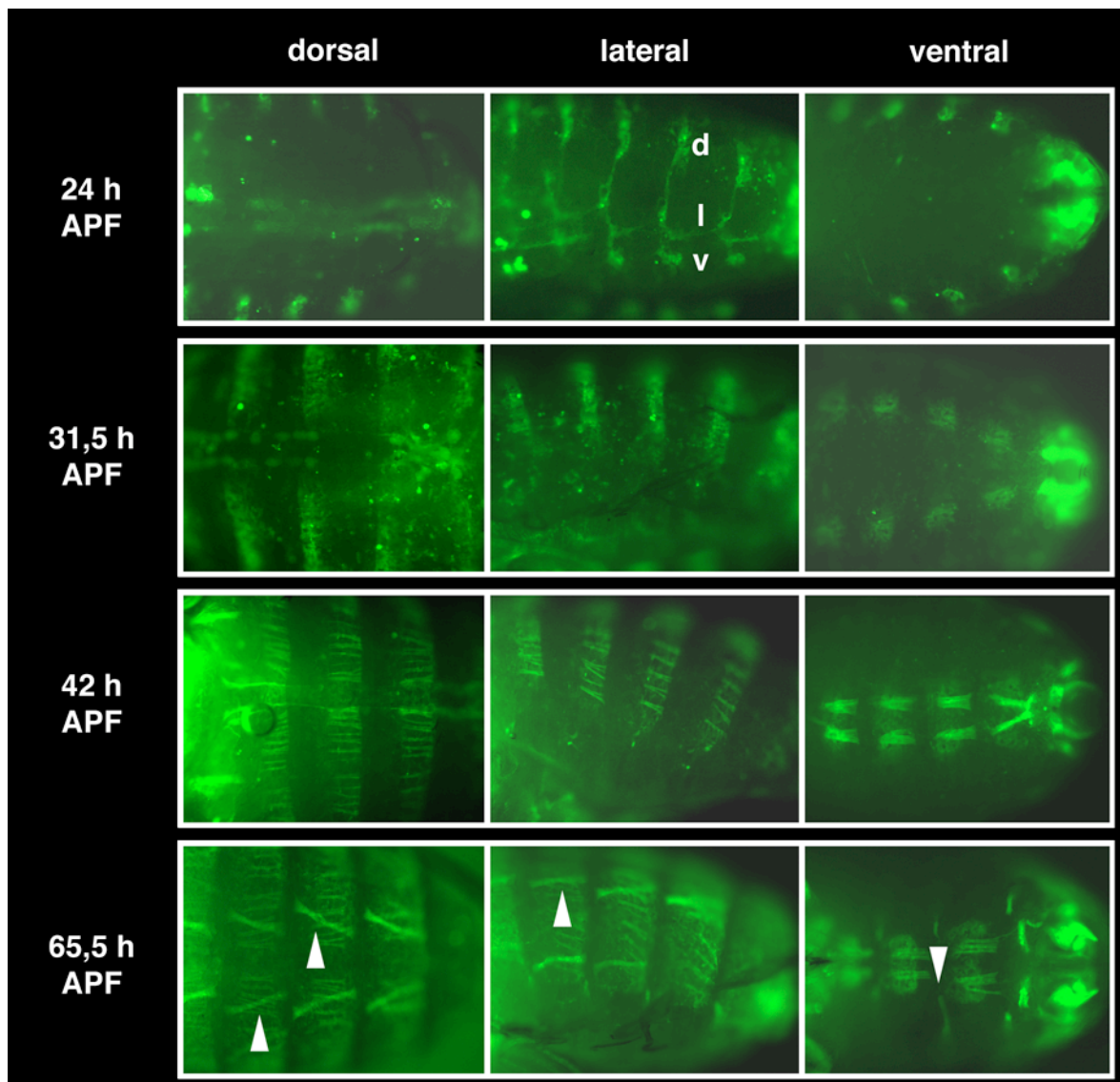


Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der *rP298*-Expression im pupalen Abdomen.

Die Abbildung zeigt unterschiedliche Metamorphosestadien aus einer dorsalen, einer lateralen und einer ventralen Perspektive. Während die Expression des *GFP*-Reportergens 24 h APF nur in drei Nerven-assoziierten Zellgruppen pro Hemisegment nachgewiesen werden kann (*d*, *l*, *v*), breitet sich diese in späteren Untersuchungsstadien über die sich bildenden dorsalen und ventralen Muskeln aus. Zusätzlich kann das GFP 65,5 h APF in persistierenden dorsalen und lateralen Muskeln detektiert werden (in einigen Hemisegmenten exemplarisch durch Pfeilspitzen markiert). (APF) After Puparium Formation; (*d*) dorsale Myoblasten; (*l*) laterale Myoblasten; (*v*) ventrale Myoblasten.

Bei den Nachkommen der Kreuzung *ap-GAL4* x *UAS-GFP* wurden nur die ersten 47 Stunden der Metamorphose untersucht, da bis zu diesem Zeitpunkt die imaginale Myogenese des Abdomens nahezu abgeschlossen sein sollte (CURRIE und BATE, 1991). Dabei konnte in keinem Untersuchungsstadium (0, 16, 19, 24, 26 und 47 Stunden APF) eine *apterous*-Expression im pupalen Abdomen detektiert werden.

3.7.5 Klone in der *transverse nerve exit glia*

Bei der Untersuchung der Wanderlarven wurden in 44 Empfängern cell-lineage-Markierungen detektiert, die aufgrund ihrer Morphologie und Position dem Gliagewebe zugeordnet werden konnten. Da diese Glia-Markierungen aus Einzelzelltransplantationen stammten, immer mit weiteren mesodermalen Derivaten überlappten und die Keimblätter bereits zum Transplantationszeitpunkt determiniert sind (BEER et al., 1987; MEISE und JANNING, 1993; HOLZ et al., 1997), muss die markierte Glia mesodermalen Ursprungs sein. Alle Glia-Klone entsprangen der Mittellinie des Ventralganglions und endeten bilateral auf der abdominalen somatischen Muskulatur (siehe Abbildung 38). Ihre Morphologie entspricht somit den Beschreibungen der *transverse nerve exit glia* (= *TN exit glia*; GORCZYCA et al., 1994), die auch als *dorsal median cells* (= *DM cells*) bezeichnet wird (CHIANG et al., 1994; LÜER et al., 1997) und für die bereits durch Transplantationsexperimente (BEER et al., 1987), die Untersuchung von *tinman*-Mutanten (GORCZYCA et al., 1994) und *DiI*-Einzelzellmarkierungen (LÜER et al., 1997) eine mesodermale Herkunft gezeigt werden konnte. Um die Lage und Ausdehnung dieses Gliazelltyps zu überprüfen und mit den Transplantationsklonen zu vergleichen, wurden X-Gal-Färbungen an Wanderlarven der Linie *P (btn 1.85-lacZ)* durchgeführt. Die Auswertung der Präparate bestätigte, dass die Morphologie der selektiv angefärbten *DM cells* mit dem Erscheinungsbild der Y-förmigen Gliaklone übereinstimmte. Alle Markierungen in der *TN exit glia* überlappten mit der somatischen Muskulatur, wobei in den 37 genauer auswertbaren Fällen hauptsächlich die ventrale Muskelgruppe (n=35) betroffen war. In einem Empfänger konnte der Syncytien-Marker GFP in der Glia detektiert werden. Bei acht Klonen war nur einer der beiden Glia-schenkel markiert.

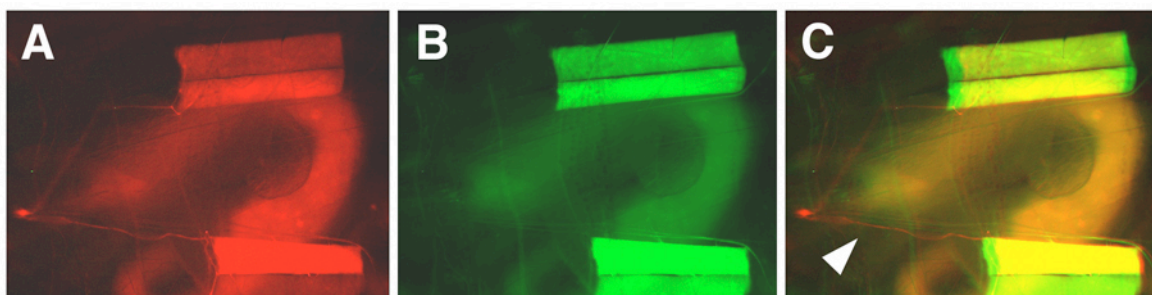


Abbildung 38: Überlappender Klon zwischen *TN exit glia* und larvaler somatischer Muskulatur.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle sind durch den cell-lineage-Marker DsRed rot markiert (A), während die heterogenen Syncytien GFP exprimieren (B). Da sich die Larve zwischen den Einzelaufnahmen leicht bewegt hat, sind diese nicht ganz deckungsgleich. Trotzdem wird in dem Überlagerungsbild (C) deutlich, dass der Syncytien-Marker GFP nicht in der Y-förmigen *TN exit glia* (Pfeilspitze) exprimiert wird. Im Gegensatz dazu sind die vier somatischen Muskeln doppelt markiert und repräsentieren somit Syncytien aus klonal nicht-verwandten Zellen. Da die Klone in der adulten Glia bei der Präparation zerstört wurden, können sie hier nicht zu Vergleichszwecken gezeigt werden.

Um Aussagen über die Anlage der *TN exit glia* treffen zu können, wurde für alle Markierungen die anterior-posteriore und die dorsoventrale Zellentnahme- und Integrationsposition bestimmt. Da aus dem gesamten Untersuchungsbereich Klone in diesem Gewebe hervorgingen, muss sich die Anlage der mesodermalen Glia über nahezu die gesamte Länge (42 bis 24% EL) und Breite (0 bis 30% VD) der untersuchten Mesodermregion erstrecken. Weil dieses Gewebe immer mit weiteren Mesodermderivaten überlappt, kann seine Anlagen zum Transplantationszeitpunkt noch nicht determiniert sein. Da in 35 von 37 Fällen eine Überlappung mit der ventralen Muskelgruppe der larvalen somatischen Muskulatur beobachtet werden konnte, scheinen beide Gewebe, wie bereits bei LÜER et al. (1997) beschrieben, aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervorzugehen.

Bei der Untersuchung der Imagines konnten in zwei Fällen abdominale cell-lineage-Markierungen detektiert werden, die eine Glia-ähnliche Morphologie aufwiesen. Bei diesen Empfängern war bereits im Wanderlarvenstadium eine Glia-Markierung beobachtet worden. In 19 weiteren Empfängern, die eine larvale Glia-Markierung besaßen und die Metamorphose überlebten, konnte der Klon im Adultstadium nicht redetektiert werden.

3.7.6 Klone im Dorsalgefäß

Bei der Untersuchung der Wanderlarven wurden in 12 Fällen cell-lineage-Markierungen im Dorsalgefäß gefunden. Diese Markierungen überlappten immer mit mindestens einem weiteren Mesodermderivat, wobei es sich in dem meisten Fällen um die larvale somatische Muskulatur handelte (n=10). Fast alle Dorsalgefäß-Markierungen konnten aufgrund ihrer Morphologie eindeutig einem von drei verschiedenen Gewebetypen zugeordnet werden, nämlich den Cardialzellen (n=7), den *alary muscles* (n=2) oder den Pericardialzellen (n=3).

Bei den sieben larvalen cell-lineage-Klonen in den **Cardialzellen** konnten zwei (n=6) oder vier (n=1) direkt benachbarte Zellen markiert sein. Diese Zellen lagen immer auf einer Seite des Dorsalgefäßes und besaßen jeweils einen Zellkern. Trotzdem konnte in drei Empfängern auch der Syncytien-Marker GFP in allen DsRed-markierten Cardialzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 39). Da die doppelmarkierten Zellen direkt nebeneinander lagen und keine klar getrennten Zellgrenzen zu erkennen waren, wäre der cytoplasmatische Zusammenschluss von Cardialzellen entlang der anterior-posterioren Grenze denkbar. Die Markierung in den Cardialzellen konnte nur in einem von zwei die Metamorphose überlebenden Empfängern redetektiert werden.

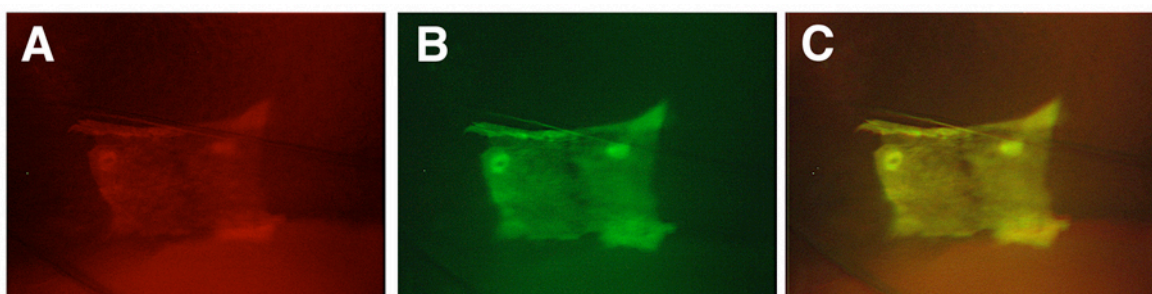


Abbildung 39: Klon in zwei Cardialzellen im Wanderlarvenstadium.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle sind durch den cell-lineage-Marker DsRed rot markiert (A), während die syncytialen Gewebe unterschiedlicher klonaler Herkunft zusätzlich *GFP* exprimieren (B). In dem Überlagerungsbild (C) ist die Koexpression beider Marker in zwei Cardialzellen sichtbar. Es ist deutlich zu erkennen, dass diese auf der gleichen Dorsalgefäß-Halbseite liegen und jeweils einen Zellkern besitzen. Da die korrespondierende adulte Markierung bei der Präparation zerstört wurde, kann sie hier nicht zu Vergleichszwecken gezeigt werden.

Die Markierung der *alary muscles* konnte in zwei larvalen Dorsalgefäß-Klonen beobachtet werden. In beiden Fällen erstreckte sich ein markierter Muskel vom Dorsalgefäß bis zur dorsolateralen Körperwand, wobei in seinem kondensierten Cytoplasma keine Zellkerne identifiziert werden konnten. Bei einem dieser Klone konnte auch der Syncytien-Marker GFP über die gesamte Muskellänge nachgewiesen werden (siehe Abbildung 40A bis C).

Dieser Empfänger überlebte die Metamorphose und wurde erneut im Adultstadium untersucht. Dabei konnte der doppelmarkierte *alary muscle* in filigraner Form redetektiert werden (siehe Abbildung 40D bis F).

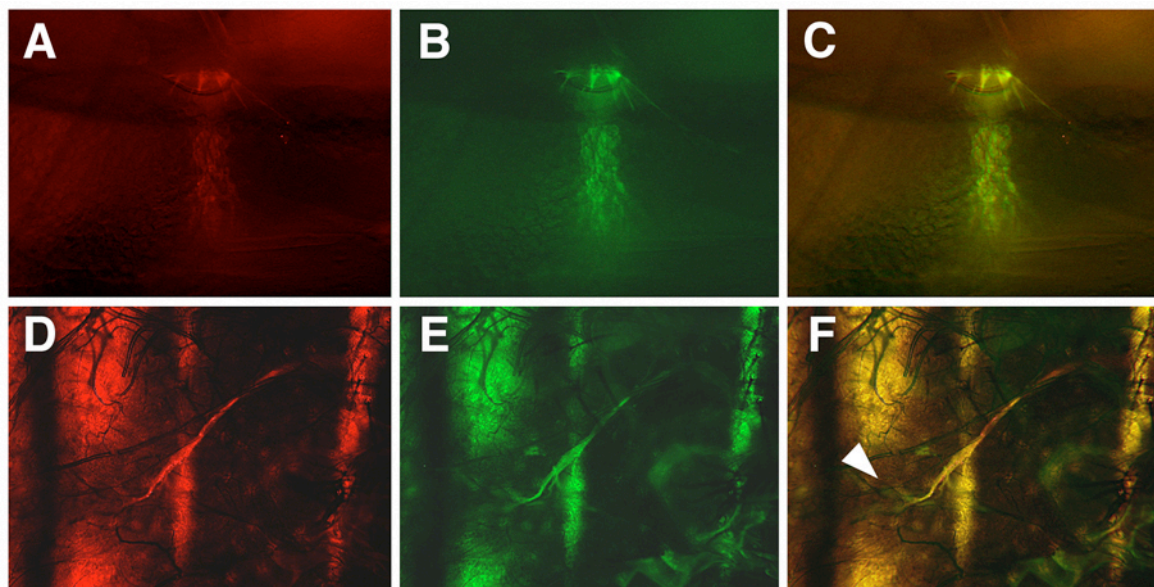


Abbildung 40: Klon in einem *alary muscle* in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien.

In der lebenden Wanderlarve (A bis C) werden der cell-lineage- (A) und der Syncytien-Marker (B) in einem *alary muscle* koexprimiert (C). Dieser umschließt fächerförmig das Dorsalgefäß und zieht zum Hautmuskelschlauch. Bei dem Überlagerungsbild ist zu beachten, dass sich die Larve während der Untersuchung minimal bewegt hat und die resultierenden Fluoreszenzaufnahmen somit nicht ganz deckungsgleichen sind.

Wird derselbe Empfänger im Adultstadium präpariert (D bis F), so kann der *alary muscle* in der Karkasse redetektiert werden. Dieser nun grazilere Muskel umfasst immer noch fächerförmig das Dorsalgefäß (Pfeilspitze) und exprimiert beide Marker (F).

Drei der larvalen Dorsalgefäß-Klone wiesen eine reine cell-lineage-Markierung in den **Pericardialzellen** auf. Dabei waren in zwei Fällen zwei hintereinander liegende Pericardialzellen markiert (siehe Abbildung 41A bis C). Bei einem Klon überlappte die Markierung zwischen einer einzelnen Pericardialzelle sowie zwei Cardialzellen, was auf eine gemeinsame cell-lineage beider Gewebe hindeutet. WARD und SKEATH (2000) konnten bereits zeigen, dass bestimmte Cardialzellen und Pericardialzellen aus der asymmetrischen Teilung einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervorgehen.

Einer der drei Empfänger überlebte die Metamorphose und konnte erneut im Adultstadium untersucht werden. Während bei diesem Tier im Wanderlarvenstadium nur zwei Pericardialzellen markiert waren, erstreckte sich die *DsRed*-Expression in der Imago auf drei Zellen (siehe Abbildung 41D bis F). Da Pericardialzellen im Laufe der Larvalentwicklung polytänisieren (RIZKI, 1978b) und eine Teilung während der Metamorphose somit

unwahrscheinlich ist, wurde bei der ersten Untersuchung vermutlich eine dieser Zellen übersehen.

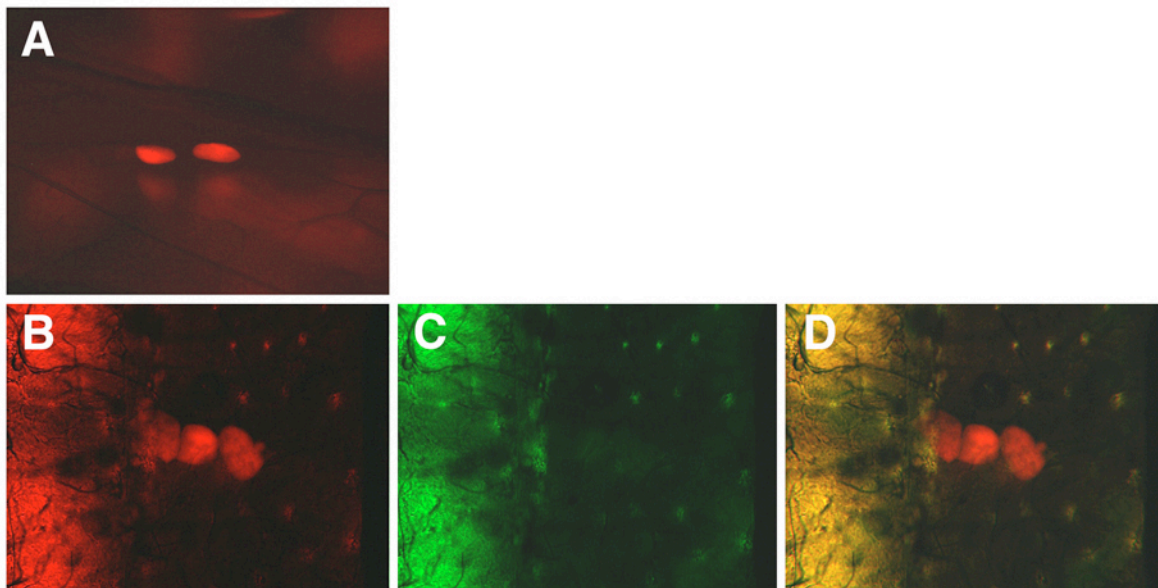


Abbildung 41: Klon in den Pericardialzellen in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien.

In der lebenden Wanderlarve wird der cell-lineage-Marker (A) in zwei Pericardialzellen exprimiert. Der Syncytien-Marker *GFP* wurde in diesem Untersuchungsstadium nicht exprimiert, wovon allerdings keine Fluoreszenzaufnahme existiert.

Bei der erneuten Untersuchung im Adultstadium kann innerhalb der präparierten Karkasse ausschließlich der cell-lineage-Marker in drei Pericardialzellen identifiziert werden (B bis D).

Bei einer Wanderlarve konnten der cell-lineage- und der Syncytien-Marker in einem Dorsalgefäß-assoziierten Gewebe detektiert werden. Dabei handelte es sich um eine netzartige kontraktile Struktur, die aus einzelnen Filamenten bestand und dem Dorsalgefäß aufgelagert war (siehe Abbildung 42A bis C). Die Lage und Morphologie dieses Gewebes stimmt mit den knappen Beschreibungen der **elastischen Filamente** überein (RIZKI, 1978a). Die erneute Untersuchung dieses Empfängers im Adultstadium ergab, dass die Markierung die Metamorphose unverändert überdauert hatte (siehe Abbildung 42D bis F).

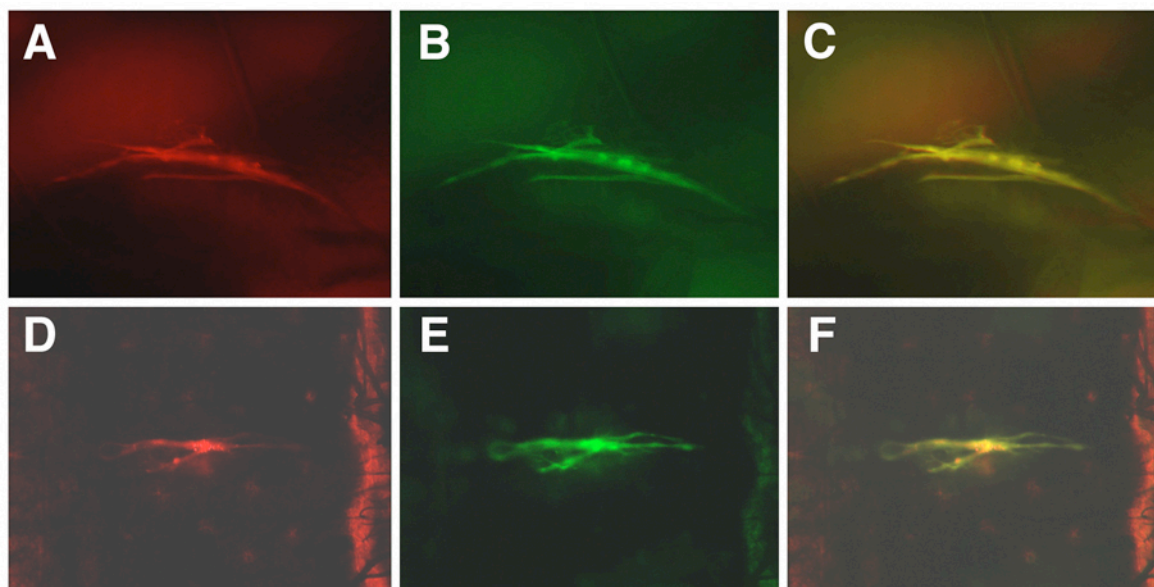


Abbildung 42: Klon in den elastischen Filamenten in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien.

In der lebenden Wanderlarve (A bis C) kann die Koexpression des cell-lineage- (A) und des Syncytien-Marker (B) in einem Bündel elastischer Filamente beobachtet werden.

Derselbe Klon kann in der präparierten Karkasse des adulten Tiers (D bis F) redetektiert werden. Auch in diesem Untersuchungsstadium werden beide Marker koexprimiert (F).

Insgesamt wurde bei der erneuten Untersuchung der fünf die Metamorphose überlebenden Empfänger mit einem Dorsalgefäß-Klon in vier Fällen die larvale Markierung redetektiert. In allen weiteren untersuchten Imagines ($n=66$) wurden keine Dorsalgefäß-Markierungen beobachtet.

Alle Dorsalgefäß-Klone entstammten Transplantationen zwischen 40 und 27% EL. Dabei wurden die transplantierten Zellen in neun Fällen in das dorsale Mesoderm (bei 15 bis 30% VD) und in zwei Fällen in das benachbarte Ektoderm (bei 35% VD) entlassen. Um zu überprüfen, ob die dorsale Transplantationsposition für die Differenzierung dieses Gewebes notwendig ist oder ob die wenigen Markierungen zufällig diesem Bereich entstammen, wurden die Dorsalgefäß-Klone mit der Summe aller mesodermalen Klone aus einem definierten VD-Bereich verglichen. Im Vierfelder- χ^2 -Test wurde die Hypothese, dass die Klone im Dorsalgefäß zufällig dem dorsalen Mesodermbereich entstammen, mit $P=0,4$ angenommen. Somit sind Markierungen in diesem Gewebe auch nach Transplantationen im ventralen und lateralen Mesodermbereich zu erwarten.

3.7.7 Klone im Gonadenmesoderm

Bei der Untersuchung der Wanderlarven konnte in 17 Fällen eine cell-lineage-Markierung in einem Teil des **Gonadenmesoderms** detektiert werden (siehe Abbildung 43A). Da die markierten Zellen verhältnismäßig klein und unregelmäßig geformt waren und den untersuchten Gonaden oft nicht plan auflagen, konnte ihre Anzahl nicht näher bestimmt werden. Bei den Empfängern handelte es sich in drei Fällen um Weibchen und in 14 Fällen um Männchen. Der Syncytien-Marker konnte im Gonadenmesoderm zweier männlicher Empfänger nachgewiesen werden.

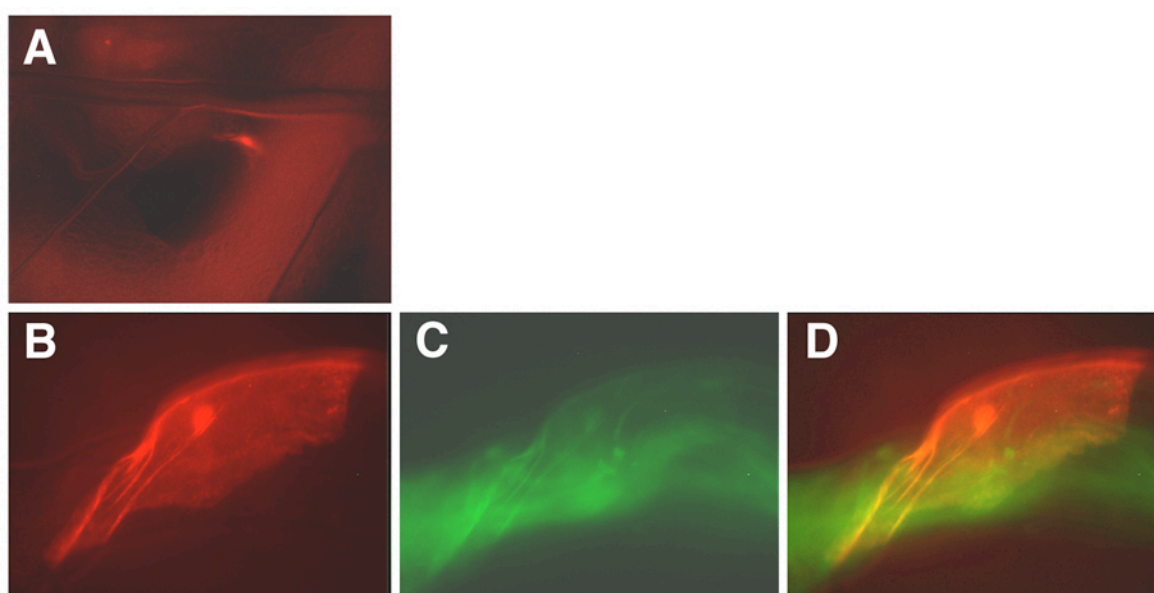


Abbildung 43: Klon im Gonadenmesoderm eines Männchens in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien.

In der lebenden Wanderlarve wird der cell-lineage-Marker (A) in einer unbestimmten Anzahl von Zellen am posterioren Pol eines Hodens exprimiert. In diesen konnte keine *GFP*-Expression beobachtet werden, was allerdings nicht dokumentiert wurde.

Bei der erneuten Untersuchung dieses Empfängers im Adultstadium kann der cell-lineage-Marker in einer Pigmentzelle redetektiert werden (B bis D). Diese Pigmentzelle umspannt die Halbseite eines Hodens und besitzt einen sehr großen Zellkern.

Insgesamt überlappten 14 Klone im Gonadenmesoderm mit weiteren Mesodermderivaten wie der larvalen somatischen Muskulatur (nE18) und dem Fettkörper (nE17), was die mesodermale Herkunft dieses Gewebes bestätigt (KLAPPER, 1997). Die Überlappungen belegen weiterhin, dass die Anlage des Gonadenmesoderms zum Transplantationszeitpunkt noch nicht determiniert sein kann. In den acht Fällen, in denen der Anteil in der somatischen Muskulatur genauer analysiert wurde, waren Muskeln vom vierten bis zum sechsten Abdominalsegment betroffen. Einer der gefundenen Klone erstreckte sich bilateral auf das Gonadenmesoderm beider Körperhalbseiten. Dies bedeutet, dass in diesem

Mesodermderivat die Festlegung auf eine Körperhalbseite, ebenso wie bei der larvalen somatischen Muskulatur (siehe Kapitel 3.7.1) und den imaginalen Muskelvorläufern (siehe Kapitel 3.7.4), zum Transplantationszeitpunkt noch nicht stattgefunden hat.

Um die Anlage des Gonadenmesoderms näher zu charakterisieren, wurden für alle larvalen Markierungen die anterior-posteriore und die dorsoventrale Integrationsposition bestimmt. Dabei fiel auf, dass nur aus einem Bereich von 34 bis 26% EL Klone in diesem Gewebe hervorgingen. Weiterhin wurden die transplantierten Zellen in 13 Fällen in das dorsale Mesoderm (bei 15 bis 30% VD) und in drei Fällen in das benachbarte Ektoderm (bis 40% VD) entlassen. Der Vierfelder- χ^2 -Test ergab jedoch, dass die Markierungen im Gonadenmesoderm nur zufällig einer dorsalen Transplantationsposition entstammen ($P=0,065$).

Da bekannt ist, dass aus dem larvalen Gonadenmesoderm die Hüllgewebe der adulten Hoden, beziehungsweise Ovarien hervorgehen (siehe Kapitel 1.4), wurden die sieben die Metamorphose überlebenden Empfänger mit einer Gonadenmesoderm-Markierung gezielt auf das Vorhandensein entsprechender Klone untersucht. Während das einzige Weibchen keine entsprechende Markierung aufwies, konnte in vier der untersuchten Männchen eine cell-lineage-Markierung in den Pigmentzellen eines Hodens nachgewiesen werden (siehe Abbildung 43B bis D). Diese beschränkte sich in drei Fällen auf eine einzelne Zelle. Der Syncytien-Marker GFP konnte nur in einem Empfänger identifiziert werden, bei dem zwei benachbarte Pigmentzellen markiert waren und in dem bereits im Wanderlarvenstadium die Koexpression beider Marker im Gonadenmesoderm festgestellt werden konnte. Es konnten niemals Markierungen in einem imaginalen Hüllgewebe detektiert werden, wenn nicht schon zuvor ein Klon im Gonadenmesoderm nachgewiesen wurde. Dies spricht dafür, dass diese beiden Gewebetypen tatsächlich auseinander hervorgehen und dass keine larvalen Klone übersehen wurden.

3.7.8 Klone in der Ovidukt-muskulatur

Bei der Untersuchung der Imagines konnte in sechs Fällen eine cell-lineage-Markierung in der Ovidukt-muskulatur nachgewiesen werden. Dabei waren zwischen zwei und 13 Muskeln markiert, die einem der lateralen Ovidukte (*lateral oviduct*) und (in vier Fällen) dem gemeinsamen Ovidukt (*common median oviduct*) auflagen. Die markierten Muskeln umschlossen stets spangenförmig eine Halbseite des Ovidukts, wobei die Zellkerne im kondensierten Cytoplasma nicht eindeutig identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 44). In einem Fall konnte der Syncytien-Marker in allen DsRed-markierten Ovidukt-muskeln detektiert werden, während sich sein Nachweis in den restlichen Klonen auf einen

Teil dieser Muskeln beschränkte. Somit scheint die Ovidukt-muskulatur aus oligonucleären Syncytien zu bestehen, in denen nicht ausschließlich klonal verwandte Myoblasten miteinander fusioniert sind.

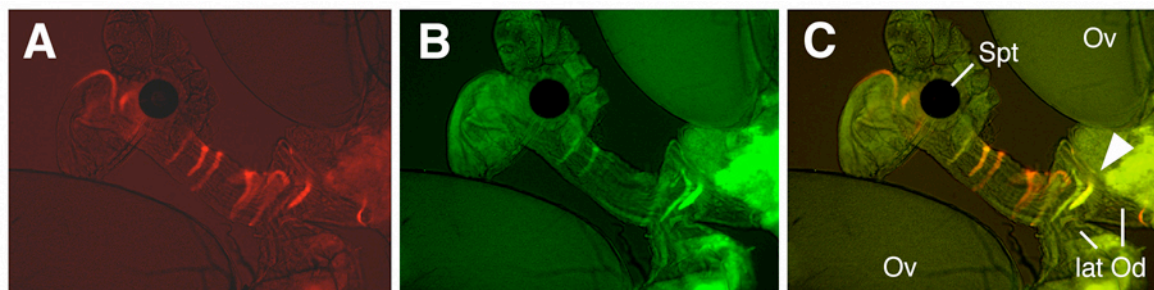


Abbildung 44: Klon in der Ovidukt-muskulatur.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle sind durch den cell-lineage-Marker DsRed rot markiert (A), während die syncytialen Gewebe unterschiedlicher klonaler Herkunft zusätzlich *GFP* exprimieren (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass in einem Muskel eines lateralen Ovidukts (Pfeilspitze) und in drei Muskeln des gemeinsamen Ovidukts beide Marker koexprimiert werden. In weiteren fünf Ovidukt-muskeln wird nur der cell-lineage-Marker exprimiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die markierten Muskeln jeweils spangenförmig eine Halbseite des Ovidukts umschließen. Bei der Präparation wurde der Uterus entfernt. (*Ov*) Ovar; (*lat Od*) lateraler Ovidukt; (*spt*) Spermatheca.

Da bekannt ist, dass sich die Muskeln der genitalen Ausführgänge aus adephelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe differenzieren (NEWBY, 1942; Übersicht bei LAUGE, 1982), sollten im Wanderlarvenstadium bereits entsprechende Markierungen in diesem Gewebe beobachtet worden sein. Bei allen sechs Empfängern war in diesem Untersuchungsstadium zwar die larvale somatische Muskulatur der Abdominalsegmente 5 bis 7 markiert, doch konnte der cell-lineage-Marker in keinem Fall im Bereich der Genital-Imaginalscheibe detektiert werden. Aufgrund der geringen Größe dieses Gewebes könnten entsprechende Markierungen bei der *in vivo*-Untersuchung jedoch übersehen worden sein. Die klonale Überlappung mit mesodermalen Derivaten wie der larvalen somatischen Muskulatur (n=10), imaginalen Muskelvorläufern (n=5) und der dem Fettkörper (n=1) belegt, dass die Vorläuferzellen der Ovidukt-muskulatur mesodermalen Ursprungs sind.

Bei allen sechs Klonen in der Ovidukt-muskulatur wurden die Zellen in den schmalen Bereich zwischen 29 und 26% EL entlassen. Die Tatsache, dass die Integration der transplantierten Zellen in allen Fällen in das dorsale Mesoderm (bei 15 bis 30% VD) erfolgte, erwies sich im Vierfelder- χ^2 -Test als zufälliges Ereignis ($P=0,11$). Die Anlage erstreckt sich somit vermutlich über die gesamte Mesoderm-Breite.

3.7.9 Klone in ektodermalen Derivaten

Nach Transplantationen im gesamten Untersuchungsbereich traten 116 ektodermale cell-lineage-Klone auf, die in keinem Fall mit Markierungen in mesodermalen Geweben überlappten. Dies entspricht einem Anteil von 17% an allen Klonen der Transplantationsserien F bis I. Der relativ hohe Anteil ektodermaler Klone ist dadurch zu erklären, dass versehentlich Zellen aus der dem Mesoderm benachbarten Ektodermanlage entnommen und zu Transplantationszwecken verwendet wurden (siehe Kapitel 3.4).

Insgesamt fanden sich 101 cell-lineage-Markierungen im **zentralen Nervensystem** (ZNS), bei denen das DsRed immer in einer unbestimmten Anzahl von Neuronen des Ventralganglions nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnten auch einzelne ins Abdomen ziehende Motoneurone (n Ξ 82; siehe Abbildung 45) oder Nervenzellen in einer der beiden Hemisphären (n Ξ 04) komarkiert sein. Der Syncytien-Marker GFP wurde in einem Klon detektiert. Bei der erneuten Untersuchung im Adultstadium konnte in 15 von 32 überlebenden Empfängern eine reine cell-lineage-Markierung im imaginalen Nervengewebe nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich vermutlich um einige der die Metamorphose überdauernden Motoneurone (TRUMAN, 1993; TISSOT et al., 1998, TISSOT und STOCKER, 2000).

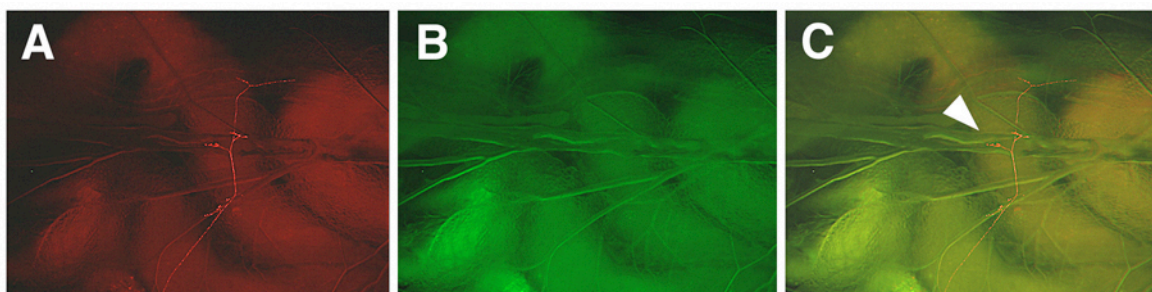


Abbildung 45: Klon in einem larvalen Motoneuron.

Alle Nachkommen der transplantierten Zelle sind durch den cell-lineage-Marker DsRed rot markiert (A), während der Marker *GFP* nur in syncytialen Geweben unterschiedlicher klonaler Herkunft exprimiert wird (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass einzig der cell-lineage-Marker in dem in das Abdomen projizierenden Motoneuron nachgewiesen werden kann. An der Innervierungsstelle sind deutlich einzelne Boutons zu erkennen (Pfeilspitze).

In 22 Empfängern konnte eine cell-lineage-Markierung im **peripheren Nervensystem** (PNS) detektiert werden, die in 15 Fällen mit einer Markierung im zentralen Nervensystem überlappte. Die markierten Nervenzellen konnten aufgrund ihrer Morphologie entweder als *multiple dendritic neurons* (n Ξ 07, siehe Abbildung 46) oder als *external sensory organs* (n Ξ 03, siehe Abbildung 47) angesprochen werden. Der Syncytien-Marker GFP konnte nur in einem *multiple dendritic neuron* detektiert werden. Bei der Überprüfung der fünf die

Metamorphose überdauernden Empfänger konnte in vier Fällen eine reine cell-lineage-Markierung im imaginalen Nervengewebe des Abdomens nachgewiesen werden. Bei dreien dieser Empfänger war im Wanderlarvenstadium zusätzlich das zentrale Nervensystem markiert, weshalb nicht entschieden werden konnte, ob die persistierenden Nerven dem zentralen oder peripheren Nervensystem angehörten. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die adulten Neurone aus imaginalen Neuroblasten hervorgegangen sind.

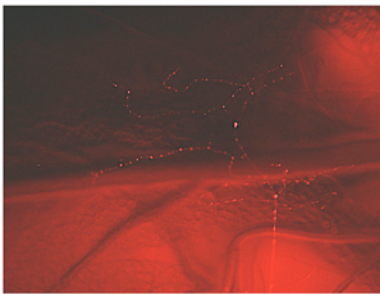


Abbildung 46: Klon in einem larvalen *multiple dendritic neuron*.

In der lebenden Wanderlarve wird der cell-lineage-Marker *DsRed* in einem stark verzweigten Neuron exprimiert, das direkt unterhalb der Epidermis liegt und dessen Zellkörper nicht eindeutig identifiziert werden kann. Der Syncytien-Marker konnte in diesem Klon nicht nachgewiesen werden, was jedoch nicht durch eine Fluoreszenzaufnahme dokumentiert wurde.

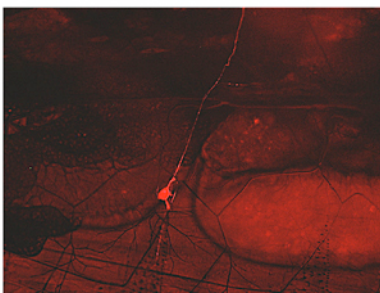


Abbildung 47: Klon in einem larvalen *external sensory organ*.

In der lebenden Wanderlarve kann ausschließlich der cell-lineage-Marker in einem Neuron nachgewiesen werden kann, welches ein *external sensory organ* innerviert. Da sich die Wanderlarve bei der Untersuchung bewegte, konnte keine deckungsgleiche Fluoreszenzaufnahme unter GFP-Filterbedingungen gemacht werden.

In der **Epidermis** konnten in acht Empfängern reine cell-lineage-Markierungen detektiert werden, die zwei bis acht Zellen umfassten und nie mit anderen Geweben überlappten. Nach der Metamorphose konnten diese Klone in den drei überlebenden Empfängern erwartungsgemäß nicht redetektiert werden. Da in den Kapiteln 3.6.1 und 3.6.2 bereits Fotos von Epidermis-Klonen gezeigt wurden, wird an dieser Stelle darauf verzichtet.

3.7.10 Klone in unbekannten Strukturen

Bei der Untersuchung der Empfänger im Wanderlarvenstadium wurden in 35 Fällen cell-lineage-Markierungen gefunden, die aufgrund ihrer Größe und Position keinem bekannten Gewebe zugeordnet werden konnten. Durch die Überlappung mit mesodermalen Derivaten wie der somatischen Muskulatur (nE31) und ~~der~~ dem Fettkörper (nE11) konnte für 32 dieser Klone ein mesodermaler Ursprung postuliert werden. In 21 Fällen konnte auch der Syncytien-Marker GFP detektiert werden, wobei das doppelmarkierte Gewebe meist eine oligonucleäre, Muskel-ähnliche Morphologie aufwies (siehe Abbildung 48).

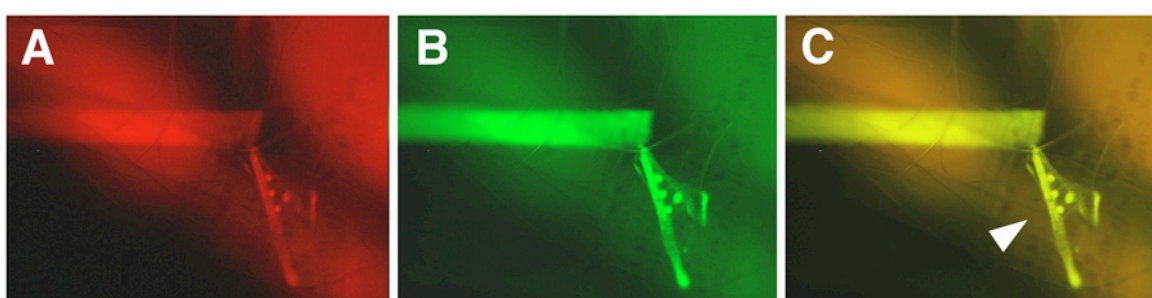


Abbildung 48: Überlappender Klon zwischen larvaler somatischer Muskulatur und einer unbekanntem Struktur.

Während in allen Nachkommen der transplantierten Zelle der cell-lineage-Marker DsRed nachgewiesen werden kann (A), ist die Expression des Syncytien-Markers *GFP* auf Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft beschränkt (B). In dem Überlagerungsbild (C) wird deutlich, dass beide Marker in einem larvalen somatischen Muskel sowie einer „muskelähnlichen“ unbekanntem Struktur (Pfeilspitze) koexprimiert werden. Im Cytoplasma der unbekanntem Struktur können mindestens vier Zellkerne identifiziert werden.

Drei der unbekanntem Klone überlappten nicht mit weiteren Geweben, weshalb keine Aussagen zu ihrer Keimblattzugehörigkeit getroffen werden konnten. In zweien dieser Klone konnte auch der Syncytien-Marker GFP nachgewiesen werden.

3.7.11 Blastoderm-Anlagenplan für das posteriore Mesoderm zwischen 44 und 23% Eilänge

Mit den zusammengefassten Daten der Transplantationsserien F bis I war es möglich, einen Anlagenplan für das abdominale Mesoderm bei 44 bis 23% Eilänge zu erstellen (siehe Abbildung 49). Für diesen wurden neben den Klonen aus homotopen Transplantationen auch die Markierungen aus heterotopen Transplantationen innerhalb des Mesoderms berücksichtigt, da KLAPPER (1997) für diesen Bereich zeigen konnte, dass einzig die Integrationsposition der transplantierten Zelle entscheidend für deren Entwicklung ist.

Insgesamt wurden 59 Klone des Wanderlarven- und 13 Klone des Adultstadiums nicht mit ausgewertet, da in diesen Fällen die Zelle in das Ektoderm entlassen wurde.

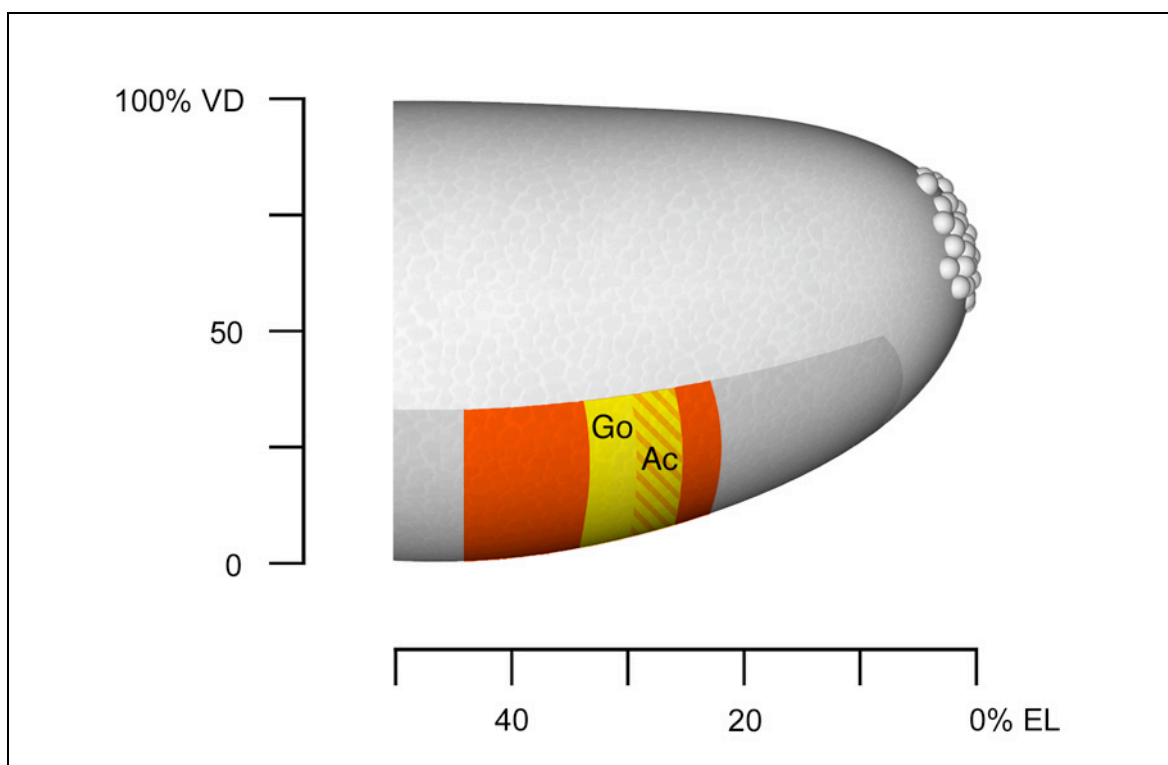


Abbildung 49: Schematischer Blastoderm-Anlagenplan für das abdominale Mesoderm zwischen 44 und 23% EL.

Die Abbildung zeigt schematisch die posteriore Hälfte eines *Drosophila*-Embryos im zellulären Blastodermstadium. Der grau unterlegte Bereich zeigt dabei das Expressionsmuster des Gens *snail* (*sna*), welches die laterale Ausdehnung der Mesodermanlage widerspiegelt (MAGGERT et al., 1995). Die meisten Mesodermderivate entstammten Transplantationen im gesamten Untersuchungsbereich (rot dargestellt; überlagert von weiteren Anlagen). Einzig die Anlagen des Gonadenmesoderms (*Go*; gelb markiert) und der adepthelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe (*Ac*; symbolisiert durch orangefarbene Streifen) besitzen eine eingeschränkte anterior-posteriore Ausdehnung.

Die Anlagen der larvalen und imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens, des Fettkörpers, der fusionskompetenten Myoblasten der longitudinalen visceralen Muskulatur, der circulären visceralen Muskulatur, des Dorsalgefäßes und der *transverse nerve exit glia* erstrecken sich über den gesamten Untersuchungsbereich von 44 bis 23% EL und 0 bis 30% VD. Das Gonadenmesoderm und die adepthelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe entspringen einem definierten Blastodermbereich; dabei konnte die Anlage des Gonadenmesoderms zwischen 34 und 26% EL und die der adepthelialen Zellen bei 29 bis 26% EL kartiert werden.

Da bei den Transplantationen nie exklusive Markierungen in einem Gewebe gefunden wurden, scheinen die untersuchten Mesodermderivate eine gemeinsame cell-lineage zu besitzen und zum Transplantationszeitpunkt noch nicht endgültig determiniert zu sein. Aus den 40 Klonen, bei denen mehr als zwei Gewebe markiert waren, kann auf eine gewebe-spezifische Determination nach der zweiten postblastodermalen Mitose geschlossen werden.

4. Diskussion

Die Diskussion ist in sechs verschiedene Themenkomplexe gegliedert: Zunächst werden die Methode der Einzelzelltransplantation und ihre Weiterentwicklung erörtert (Kapitel 4.1 und 4.2). Anschließend werden die verschiedenen Transplantationsarten, Doppelmarkierungssysteme und Untersuchungsstadien miteinander verglichen (Kapitel 4.3 bis 4.5). Es folgt die Diskussion der gewebespezifischen Ergebnisse, wobei zunächst die Detektion bisher unbekannter Syncytien und die Persistenz verschiedener larvaler Gewebe begutachtet werden (Kapitel 4.6 bis 4.7.2). Dann werden die Determination und Differenzierung der imaginalen somatischen Muskulatur und die Herkunft des adulten Fettkörpers erörtert (Kapitel 4.8 bis 4.9). Nach der Diskussion zur Bildung der adulten inneren Genitalien sowie zur Organisation verschiedener larvaler Gewebe (Kapitel 4.10 bis 4.12.3) wird der erstellte Anlagenplan abschließend mit den Befunden anderer Arbeiten verglichen (Kapitel 4.13).

4.1 Die Methode der Einzelzelltransplantation

Einzelzelltransplantationen wurden bisher zur Analyse des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens von Zellen und der Kartierung von Anlagen eingesetzt (TECHNAU, 1986, 1987; TECHNAU und CAMPOS-ORTEGA, 1986 a/b; BEER et al., 1987; PROKOP und TECHNAU, 1991; MEISE und JANNING, 1993, 1994; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997, 2003; KLAPPER, 2000; KLAPPER et al., 1998, 2001, 2002). Durch die Verwendung enzymatisch, beziehungsweise genetisch markierter Spenderembryonen konnte dabei das klonale Schicksal der transplantierten Einzelzellen verfolgt werden. Außerdem haben die genetischen Marker den Vorteil, dass sie auch in stark proliferierenden imaginalen Gewebe nachgewiesen werden können (MEISE und JANNING, 1993, 1994; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997, 2003; KLAPPER et al., 1998, 2001, 2002; KLAPPER, 2000) und keine Ausdünnungseffekte wie bei Enzyminjektionen (TECHNAU, 1986; TIX et al., 1989) zu beobachten sind. Die aus homotopen Transplantationen genetisch markierter Einzelzellen resultierenden Klone eignen sich somit zur Erstellung von Anlagenplänen für larvale und imaginale Gewebe. Darüber hinaus spiegelt jeder einzelne Klon das Entwicklungsschicksal einer individuellen Zelle wider. Aus der Gesamtheit der in den Klonen gefundenen Gewebeüberlappungen lassen sich deshalb Rückschlüsse auf die cell-lineage-Beziehungen und den Determinationszustand der Zellen zum Transplantationszeitpunkt ableiten.

Dabei muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei allen Transplantationsexperimenten um präparative Eingriffe handelt: Die damit verbundenen Ereignisse, wie die Isolierung einzelner Zellen aus dem natürlichen Gewebeverband und die mitunter starke mechanische Beanspruchung, können möglicherweise deren Vitalität und Differenzierung beeinträchtigen. Der Vergleich von Daten nach homotopen Einzelzelltransplantationen mit bereits bekannten morphologischen Befunden und den Ergebnissen von anderen cell-lineage-Untersuchungen, bei denen einzelne Zellen oder Zellgruppen chemisch markiert wurden, hat jedoch ergeben, dass sich die transplantierten Zellen in der Regel normal entwickeln (TECHNAU, 1986; TECHNAU und CAMPOS-ORTEGA, 1986a/b; MEISE und JANNING, 1993; HARBECKE et al., 1996; KLAPPER et al. 1997).

Es existiert aber auch ein Indiz für eine methodisch bedingte Störung der Zellentwicklung: Nach Transplantationen im Rumpfmesoderm wurden unverhältnismäßig viele Klone in ventralen und lateralen somatischen Muskeln der Larve gefunden, wohingegen sie in der dorsalen Muskulatur stark unterrepräsentiert waren (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.7.1). Außerdem wurden nur verhältnismäßig wenige Klone in dorsalen Mesodermderivaten wie der visceralen Muskulatur und dem Dorsalgefäß gefunden (siehe Kapitel 3.7.3 und 3.7.6). Die gleichen Beobachtungen wurde auch nach homotopen Einzelzelltransplantationen von HOLZ (1997) und KLAPPER (1997) gemacht. Da die verwendeten cell-lineage-Marker in allen Geweben gleich stark exprimiert werden und die gesamte Mesodermanlage intensiv analysiert wurde, kann es sich möglicherweise um ein methodisch bedingtes Artefakt handeln. So wäre es vorstellbar, dass bei der Zellvereinzlung in der Hämolympfersatzlösung an die Zelloberfläche gebundene Signalproteine abgelöst werden, die für die Spezifizierung dorsaler Entwicklungsschicksale von entscheidender Bedeutung sein könnten. Die Beobachtung, dass nach Einzelzelltransplantationen relativ selten dorsale Mesodermderivate gefunden werden, deutet auf eine Einschränkung, beziehungsweise Veränderung des normalen Entwicklungsschicksals der transplantierten Zellen hin. Somit kann die Entwicklung einer beliebigen Zelle mit der hier angewandten Methode zwar grundsätzlich verfolgt werden, die eigentliche Entwicklungspotenz könnte in bestimmten Zellen aber durch die Methode selbst verändert werden.

Weiterhin muss der Umstand berücksichtigt werden, dass einem Spenderembryo zunächst mehrere Zellen entnommen werden. Bei der Entnahme von bis zu 10 Zellen können Positionsabweichungen zwischen Entnahme- und Transplantationsort entstehen, die je nach Transplantationsbereich bis etwa $\pm 10\%$ der Eilänge und $\pm 20\%$ der Dorsoventral-Achse ausmachen (MEISE und JANNING, 1993). Unter diesen Umständen ist es problematisch, kleinere Anlagen genau zu lokalisieren.

4.2 Das GAL4/UAS-Transplantationssystem

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (HEUSER, 1999) wurden erstmals die Einzelzelltransplantationstechnik und das GAL4-System miteinander kombiniert, um die Durchmischung verschiedener Zellstammbäume nachzuweisen und somit die klonale Abstammung syncytialer Gewebeverbände zu untersuchen. Bei dieser Methode werden im zellulären Blastodermstadium einzelne Zellen einer *GAL4*-Treiberlinie in Empfänger einer *UAS*-Empfängerlinie oder *vice versa* transplantiert. Somit werden genetische Mosaikere erzeugt, die im zellulären Blastodermstadium neben den circa 6000 Zellen des Empfängers (POULSON, 1950; MAHOWALD, 1963a/b) auch eine Zelle des Spenders enthalten. Die Zellen unterschiedlichen Genotyps proliferieren bis zum Untersuchungszeitpunkt, so dass ein Zellklon der Spenderzelle entsteht.

Für das GAL4-System ist bekannt, dass die Induktion der Zielgen-Expression die Lokalisation des *GAL4*-Transkriptionsfaktors und des *UAS*-Reportergen-Konstrukts in einer gemeinsamen Zelle erfordert (BRAND und PERRIMON, 1993; PHELPS und BRAND, 1998). Aufgrund des zellspezifischen Expressionsmusters vieler *GAL4*-Linien und der Charakteristika des *GAL4*-Proteins (881 Aminosäuren lang (LAUGHON und GESTLAND, 1984) und eine Masse von 99 kDa (PARTHUN und JAEHNING, 1990)) kann eine zellautonome Restriktion des *GAL4*-Transkriptionsfaktors postuliert werden. Bei *Drosophila melanogaster* sind zahlreiche Formen von *cellular junctions* nachgewiesen worden (TEPASS und HARTENSTEIN, 1994). Die größte Zell-Zell-Verbindung stellen dabei die *gap junctions* dar, welche die passive Diffusion von kleinen Molekülen bis zu einem relativen Molekulargewicht von 1500, respektive 1 kDa, erlauben (SIMPSON et al., 1977; KUMAR und GILULA, 1996). Somit kann der interzelluläre Austausch der *lacZ*-, *GFP*- und *DsRed*-Reportergenprodukte aufgrund ihres Proteingewichts ausgeschlossen werden (β -Galaktosidase \approx 16 kDa pro Monomer (FOWLER und ZABIN, 1978; JACOBSON et al., 1994), *GFP* \approx 26,9 kDa pro Monomer (PRASHER et al., 1992; ORMÖ et al., 1996) und *DsRed* \approx 28 kDa pro Monomer (BAIRD et al., 2000)). Die Induktion der Zielgen-Expression ist also innerhalb der genetischen Mosaikere für mononucleäre Gewebe und homogene Syncytien eines Genotyps unwahrscheinlich. Nur in heterogenen Syncytien, welche sowohl Tochterkerne der Spender- als auch der Empfängerlinie aufweisen, ist eine Expression des Reportergens zu erwarten.

Tatsächlich beschränkte sich der Klonnachweis im Rahmen meiner Diplomarbeit (HEUSER, 1999) auf syncytiale Gewebe, wobei die gefundenen Gewebeüberlappungen Rückschlüsse auf die cell-lineage-Beziehungen und den Determinationszustand der Zellen zum Transplantationszeitpunkt zuließen. Diese Untersuchungen ergaben, dass die somatische

Muskulatur sowie die longitudinale und circuläre viscerale Muskulatur im Wanderlarven- und Adultstadium aus miteinander fusionierten Zellen unterschiedlicher klonaler Herkunft aufgebaut sind. Weiterhin bestätigten Klone, welche zwischen drei mesodermalen Derivaten überlappten, dass eine gewebespezifische Determination des Mesoderms zum Transplantationszeitpunkt noch nicht stattgefunden hat (BEER et al., 1987; HOLZ et al., 1997; KLAPPER et al., 1998) und dieser Determinationsschritt vermutlich nicht vor der zweiten postblastodermalen Mitose erfolgt (HOLZ et al., 1997; KLAPPER et al., 1998). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei allen detektierten syncytialen Klonen zusätzlich Überlappungen mit mononucleären Derivaten auftraten, welche nicht nachgewiesen werden konnten. Somit waren keine Aussagen über das Differenzierungsverhalten der transplantierten Zelle möglich. Weiterhin wurde die Zuverlässigkeit dieser Technik nur durch die fehlende Markierung mononucleärer Derivate und den Vergleich der Markierungen mit den Transplantationsklonen vergleichbarer Arbeiten (BEER et al., 1987; KLAPPER et al., 1998) bestätigt.

Um die Selektivität des Syncytien-Nachweises in jedem einzelnen Transplantationsklon zu verifizieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich die cell-lineage der transplantierten Zellen markiert. Diese Markierung erfolgte entweder durch Farbstoffinjektion (2000S RITC-Dextran) oder genetisch (*GFP* oder *DsRed*) und ermöglichte zusätzliche Aussagen zum Differenzierungsverhalten der transplantierten Zelle sowie die Kartierung larvaler und imaginaler Anlagen ungeachtet ihrer zellulären Organisation.

Bei der Auswertung der verschiedenen Transplantationsserien zeigte sich, dass – unabhängig vom Untersuchungsstadium – immer mehr cell-lineage- als Syncytien-Klone nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 3.4). Innerhalb der detektierten Klone war die syncytiale Markierung außerdem niemals größer als die cell-lineage-Markierung, was die Selektivität der GAL4/UAS-Transplantationsmethode bestätigt. Davon ausgenommen waren allerdings 223 Klone in der larvalen somatischen Muskulatur, bei denen die syncytiale Markierung die cell-lineage-Markierung überstieg (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.7.1). Dieses Phänomen konnte nur für Transplantationen beobachtet werden, bei denen mit einer *DsRed*-Spender- und einer *UAS-GFP*-Empfängerlinie gearbeitet wurde (Transplantationsserien C bis I). Da die Aktivierung des Syncytien-Markers nur durch die räumliche Kolokalisation von Spender- und Empfängerkerne im gemeinsamen Cytoplasma realisiert werden kann, muss in GFP-markierten Muskeln auch der cell-lineage-Marker *DsRed* exprimiert werden. Weist ein Muskelklon allerdings nur wenige *UAS-DsRed*; *daGAL4*-Spenderzellkerne auf, so konkurrieren diese mit zahlreichen *UAS-GFP*-Zellkernen um den *GAL4*-Transkriptionsfaktor. Als Folge könnte nur verhältnismäßig wenig *DsRed* gebildet

werden, welches durch Diffusionsprozesse innerhalb des Muskels so stark ausdünn, dass es aufgrund seiner schwachen Fluoreszenz unter die Nachweisgrenze fällt.

Überraschenderweise konnte der Syncytien-Marker – ebenfalls ausschließlich beim Gebrauch der oben genannten Linien – in seltenen Fällen auch in mononucleären Geweben wie dem Fettkörper (in 16 von 184 Markierungen), imaginalen Muskelvorläufern (in zwei von 67 Markierungen), der *transverse nerve exit glia* (in einer von 48 Markierungen) oder dem Nervensystem (in drei von 211 Markierungen) detektiert werden (siehe Kapitel 3.6.1 bis 3.7.9). Für die Entstehung dieser Markierungen kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht: Zunächst wäre es möglich, dass in diesen als mononucleär beschriebenen Geweben tatsächlich einzelne Zellen miteinander fusionieren können. Weiterhin könnte die Induktion der *GFP*-Expression auf die Verletzung einzelner Zellen und den damit verbundenen Austausch des *GAL4*-Transkriptionsfaktors verbunden sein. Zumindest für den Fettkörper ist bekannt, dass dieser während der Larvalentwicklung kontinuierlich extrazelluläre Proteine, Lipide und Glycogen aus der Hämolymphe aufnimmt und in verschiedenen Granula speichert (VON GAUDECKER, 1963; BUTTERWORTH et al., 1965; THOMASSON und MITCHELL, 1972). Auf diesem Wege könnte das *GAL4*-Protein apoptotischer Spenderzellen inkorporiert und damit die *UAS-GFP*-Sequenz aktiviert werden. Da die Fettkörperzellen auch mit lytischen Enzymen ausgestattet sind (BUTTERWORTH und LATENDRESSE, 1973; RIZKI, 1978b), wäre zudem unter bestimmten Bedingungen eine fortschreitende Degradation des cell-lineage-Markers DsRed denkbar. Da sowohl das unreife als auch das degradierte DsRed die gleichen Fluoreszenzeigenschaften wie der Syncytien-Marker GFP besitzen (BAIRD et al., 2000), könnte es sich bei der detektierten grünen Fluoreszenz folglich um die des cell-lineage-Markers handeln.

Die Analyse der zahlreichen cell-lineage-Klone aus den Einzelzelltransplantationen der Transplantationsserien A, B, F, G, H und I erlaubte Rückschlüsse auf die Differenzierung von Zellen. So wurden in seltenen Fällen Klone detektiert, die zwischen vier mesodermalen oder drei ektodermalen Keimblattderivaten überlappten. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein, die ebenfalls eine gewebespezifische Determination des Mesoderms und Ektoderms nach der zweiten postblastodermalen Mitose zeigen konnten (MEISE und JANNING, 1993; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997; LÜER et al., 1997; KLAPPER et al., 1998). Da der Klonanteil in den überlappenden Geweben variabel sein konnte, scheint die gewebespezifische Determination nicht nach einem starren, mitoseabhängigen Muster verlaufen. Vielmehr ist die Differenzierung der Keimblätter von spezifischen Positionsinformationen abhängig (BAYLIES et al., 1998; CARMENA et al., 1998; SKEATH, 1999).

4.3 Der Vergleich von Einzelzell- und Mehrzelltransplantationen

Nach der Transplantation von mehr als einer Zelle können aus dem resultierenden cell-lineage-Klon keine Rückschlüsse auf die Verwandtschaft einzelner Zellen gezogen werden, da nicht unterschieden werden kann, ob die markierten Gewebe gleicher klonaler Herkunft sind oder von verschiedenen Spenderzellen abstammen. Weiterhin ist zu beachten, dass den Spenderembryonen für die Mehrzelltransplantationen bis zu 20 Zellen entnommen wurden, wodurch eine genaue Lokalisation des Entnahmeortes nicht mehr möglich war und die Homotopiekriterien nicht mehr eingehalten werden konnten.

Um jedoch die Klonhäufigkeit in mesodermalen und ektodermalen Derivaten zu erhöhen und größere Transplantationsklone auf ihr Verhältnis von cell-lineage- und Syncytien-Marker analysieren zu können, wurden Mehrzelltransplantationen durchgeführt (Transplantationsserien C, D und E). Dabei zeigte sich, dass die beiden Klonraten_{Larval} nach der Transplantation mehrerer Zellen tatsächlich deutlich erhöht waren: So konnten im Rahmen der Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien C und D) insgesamt 17% mehr cell-lineage-Klone als nach vergleichbaren Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, F, G, H und I) detektiert werden (siehe Kapitel 3.4). Diese Klonratenerhöhung spiegelt die höhere Wahrscheinlichkeit der Integration und Weiterentwicklung mindestens einer der transplantierten Zellen wider.

Weiterhin fiel auf, dass die cell-lineage-Klonrate_{Larval} bereits nach den Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, F, G, H und I) mit 75% deutlich höher lag als nach vergleichbaren Transplantationen (HOLZ, 1997: 41%; KLAPPER, 1997: 46%; BOSSINGER, 2000: 35%; STRASSER, 2000: 50%). Dieser Trend konnte auch für die durchschnittliche cell-lineage-Klonrate_{Larval} nach Mehrzelltransplantationen (=92%) beobachtet werden (BOSSINGER, 2000: 80%; STRASSER, 2000: 78%). Außerdem fiel die Klonrate_{Larval} im syncytialen Klonanteil mit 60% deutlich höher aus als nach vergleichbaren Transplantationen (HEUSER, 1999: 44%). Die Differenz der Klonraten ist zum einen auf die Arbeit mit unterschiedlichen Fliegenstämmen zurückzuführen: In einem Großteil der Vergleichsstudien (HOLZ, 1997; KLAPPER, 1997; BOSSINGER, 2002; STRASSER, 2002) wurde mit nucleär *lacZ*-exprimierenden Spenderembryonen der Linie *ah92* gearbeitet, welche sich zum Beispiel durch eine relativ schwache Expression in der longitudinalen visceralen Muskulatur auszeichnen. Bei der Verwendung von *UAS-lacZ*- (HEUSER, 1999) und *UAS-lacZ x daGAL4*-Spenderembryonen (BOSSINGER, 2002) variierte die β -Galaktosidase-Konzentration zwischen verschiedenen Geweben. Der Klonnachweis erfolgte bei der Arbeit mit *lacZ*-markierten Spenderembryonen grundsätzlich präparativ mit Hilfe der X-Gal-Färbung. Dabei wurden die Nachweisreaktionen möglicherweise abgebrochen, bevor

der Marker auch in filigranen Geweben hinreichend stark exprimiert werden konnte. Mit der Verwendung von cytoplasmatisch *GFP*-exprimierenden Spenderembryonen und dem damit verbundenen *in vivo*-Klonnachweis konnte ein signifikanter Anstieg der Klonrate_{Larval} von 34 auf 45% nachgewiesen werden (BOSSINGER, 2002). Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit cytoplasmatischen *in vivo*-Markern gearbeitet wurde, war eine Erhöhung der cell-lineage-Klonrate somit zu erwarten. Weiterhin wurden alle Empfänger an einem speziell ausgerüsteten Inversen Fluoreszenzmikroskop untersucht, mit dem auch schwächere Markierungen detektiert werden konnten.

Bei den Mehrzelltransplantationen konnte allerdings nicht in jedem untersuchten Empfänger ein Klon nachgewiesen werden und in den Empfängern mit Klon verhielten sich die Klongrößen nicht proportional zu der Anzahl der transplantierten Zellen (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.6.2). Dies entspricht den Befunden von BOSSINGER (2002) und STRASSER (2002) und deutet darauf hin, dass sich die transplantierte Zellgruppe im Empfänger bis zu einem gewissen Grad autonom verhält. Dabei wird vermutlich durch Zelladhäsionskräfte zwischen den zusammen transplantierten Zellen die Integration einzelner von ihnen verhindert, so dass sich der gesamte Zellhaufen entweder gemeinsam differenziert oder abgebaut wird. Hinweise auf ein autonomes Verhalten von Zellen nach Mehrzelltransplantationen fanden auch STÜTTEM und CAMPOS-ORTEGA (1991), die heterotope Einzelzell- und Mehrzelltransplantationen miteinander verglichen. Ihre Untersuchungen ergaben, dass einzeln transplantierte Zellen auf Einflüsse aus ihrer Umgebung reagierten, während transplantierte Zellgruppen für den neuronalen Einfluss ihrer Nachbarzellen nicht zugänglich waren und sich daher herkunftsgemäß entwickelten.

Da nach der Transplantation mehrerer Zellen häufig größere Klone nachgewiesen werden konnten als nach Einzelzelltransplantationen im gleichen Untersuchungsbereich, gestaltete sich die Untersuchung der Empfänger viel schwieriger: Bei der Fluoreszenzanalyse der abgetöteten Larven und Imagines mussten alle Markierungen möglichst schnell detektiert, notiert und fotografiert werden, da ein fortschreitendes Ausbleichen der Fluoreszenzmarker deren Nachweis erschwerte. Wurden hingegen lebende Wanderlarven untersucht, so beeinträchtigte deren Beweglichkeit die präzise Dokumentation der Markierungen. Außerdem mussten diese Tiere zügig untersucht werden, damit die lange Bestrahlungsdauer nicht zu einer pupalen Letalitätserhöhung führte.

Bei den Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien C und D) konnten in 29% aller cell-lineage-Klone Keimblatt-Überlappungen zwischen mesodermalen und ektodermalen Derivaten detektiert werden (siehe Kapitel 3.4). Dieses Phänomen wurde nach den Einzelzelltransplantationen niemals beobachtet, da die Keimblätter und

somit auch die transplantierte Zelle bereits zum Transplantationszeitpunkt, also im zellulären Blastodermstadium, determiniert sind (BEER et al., 1987; MEISE und JANNING, 1993; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997). Somit spiegeln die Keimblatt-überlappenden Klone aus Mehrzelltransplantationen die Entwicklung klonal nicht-verwandter Zellen aus einer mesodermalen Grenzposition wider. Ihr verhältnismäßig geringer Anteil an den Klonen aus Mehrzelltransplantationen in der Ektodermanlage (Transplantationsserie E mit 6%) ist auf die dorsoventrale Zellentnahmeposition von durchschnittlich 50% VD zurückzuführen, welche nur in seltenen Fällen zu der Entnahme mesodermaler Zellen führte.

Der Vergleich von Einzelzell- und Mehrzelltransplantationen ergab, dass nach der Transplantation mehrerer Zellen die Schlupfrate und die Überlebensrate_{Larval} signifikant erniedrigt waren, während die Letalitätsrate_{Larval} eindeutig erhöht war. Diese erhöhte embryonale und larvale Sterblichkeit steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von BOSSINGER (2002) und STRASSER (2002), bei denen kein Zusammenhang zwischen der Überlebensrate_{Larval} und der Anzahl der transplantierten Zellen gezeigt werden konnte. Da die Überlebensrate_{Larval} nach den Einzelzelltransplantationen mit durchschnittlich 60% an die Werte vergleichbarer Arbeiten heranreicht (HOLZ, 1997; 64%; KLAPPER, 1997: 60%; BOSSINGER 2002: 63%; STRASSER, 2002: 71%), kann die Letalitätserhöhung nach den Mehrzelltransplantationen der vorliegenden Arbeit nicht auf eine verringerte Vitalität der verwendeten Empfängerlinien zurückgeführt werden. Somit ist der Grund für die erhöhte präpupale Sterblichkeit bei der Durchführung der Transplantationen und dem Umgang mit den transplantierten Empfängern zu suchen.

4.4 Der Vergleich der verschiedenen Doppelmarkierungsmethoden

Um den gesamten cell-lineage-Klon sowie den syncytialen Klonanteil im gleichen Empfängertier untersuchen zu können, wurde mit drei verschiedenen Doppelmarkierungsmethoden experimentiert. Da mit allen Markerkombinationen Einzelzelltransplantationen bei 40% EL und 0 bis 30% VD durchgeführt wurden (Transplantationsserien A, B und F), können die Ergebnisse der verschiedenen Methoden direkt miteinander verglichen werden. Es zeigte sich, dass mit der GFP/lacZ- und der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode ähnliche cell-lineage- (Serie A (GFP/lacZ): 68%; Serie F (DsRed/GFP): 78%) und Syncytien-Klonraten (Serie A (GFP/lacZ): 50%; Serie F (DsRed/GFP): 59%) erzielt werden konnten. Im Gegensatz dazu wichen die Klonraten der RITC-Dextran/GFP-Doppelmarkierungsmethode (Serie B (RITC-Dextran/GFP): cell-lineage-Klonrate 46%; Syncytien-Klonrate 39%) signifikant von den Ergebnissen der Transplantationsserie F (DsRed/GFP) ab. Die niedrigen Klonraten der RITC-Dextran/GFP-Methode sind vermut-

lich darauf zurückzuführen, dass der Klonnachweis nur im späten Embryonalstadium erfolgte, in dem kleinere Markierungen vermutlich übersehen wurden.

Bei der GFP/lacZ-Methode (Transplantationsserie A, siehe Kapitel 3.5.1) erfolgte der β -Galaktosidase-Nachweis präparativ, sodass die Auswertung der Empfänger auf ein Untersuchungsstadium beschränkt war. Anschließend musste die Kolo-kalisation der Markierungen rekonstruiert werden, was durch den unterschiedlichen Habitus der lebenden und der präparierten Larven erschwert wurde. Weiterhin konnten auch präparationsbedingte Gewebeverluste nie ausgeschlossen werden.

Im Falle der RITC-Dextran/GFP-Methode (Transplantationsserie B, siehe Kapitel 3.5.2) wurde der Fluoreszenzfarbstoff 2000S RITC-Dextran bereits im Präblastodermstadium in die Spenderembryonen injiziert, wobei die Injektionsposition exakt der späteren Zellentnahmeposition entsprechen musste. Da sich bei Voruntersuchungen herausgestellt hatte, dass dieser Farbstoff während der Larvalentwicklung vollständig abgebaut oder ausgedünnt wurde, war die Untersuchung der Transplantationsklone auf späte Embryonalstadien beschränkt. Es konnten aber – im Gegensatz zum niedermolekularen 70S RITC-Dextran (HOLZ, 1997) – keine Ausdünnungseffekte während der Embryonalentwicklung beobachtet werden. Weil für die konfokale Klonanalyse alle verwendeten Empfänger zeitgleich abgetötet und nacheinander untersucht wurden, variierten die zu untersuchenden Embryonalstadien sowie die Fluoreszenzintensität der beiden Marker. Daher können Fehlinterpretationen bei der Klonauswertung nicht ganz ausgeschlossen werden.

Mit Einführung der DsRed/GFP-Methode (Transplantationsserien C bis I, siehe Kapitel 3.6.1 bis 3.7) war der Klonnachweis nicht mehr auf ein Untersuchungsstadium beschränkt, sondern konnte zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten erfolgen. Wegen der 48-stündigen Reifung des DsRed (BAIRD et al., 2000) konnten die Empfänger jedoch nicht als Embryonen ausgewertet werden. Prinzipiell war die Koexpression von *DsRed* und *GFP* problemlos möglich, wobei die Emissionsspektren beider Proteine durch die Verwendung eines speziellen Filtersets eindeutig gegeneinander abgegrenzt werden konnten. Dabei fiel die Expression des *DsRed* stets schwächer aus als die des modifizierten S65T-GFP (HEIM et al., 1995; ORMÖ et al., 1996), was die Klonauswertung in großen syncytialen Geweben wie der larvalen somatischen Muskulatur erschwerte (siehe Kapitel 3.7.1 und 4.2). Bei der Untersuchung im Adultstadium konnten die beiden Marker-Proteine in den meisten Geweben erst nach der Präparation des Empfängers detektiert werden, wobei Gewebeverluste nicht auszuschließen waren. Da sich die gründliche Präparation und die Dokumentation der Markierungen sehr zeitaufwendig gestalteten, sank die Intensität beider Marker während der Präparation zunehmend, während die Eigenfluoreszenz der präparier-

ten Gewebe anstieg. Außerdem lag das DsRed häufig in granulärer Form vor und war nicht mehr gleichmäßig über das gesamte Cytoplasma verteilt.

Für die modifizierte *UAS-GAL4; UAS-DsRed; daGAL4*-Spenderlinie wurde aufgrund der erhöhten GAL4-Proteinkonzentration eine verstärkte Reporterexpression postuliert (HASSAN et al., 2000). Dies konnte zwar in den Individuen dieser Linie (siehe Kapitel 3.2.1), jedoch nicht in den resultierenden Transplantationsklonen beobachtet werden (siehe Kapitel 3.7). Mittlerweile wurden für *Drosophila melanogaster* (VERKUSHA et al., 2001) sowie verschiedene andere Organismen (wie beispielsweise *Pseudomonas fluorescens* (BLOEMBERG et al., 2000), verschiedene Ascomyceten (MIKKELSEN et al., 2003), *Caenorhabditis elegans* (YAU et al., 2003), *Xenopus laevis* (MATZ et al., 1999), *Danio rerio* (FINLEY et al., 2001; GONG et al., 2003; DAVIDSON et al., 2003) sowie humane Zellkulturlinien (MATZ et al., 1999; MIZUNO et al., 2001; LAIRD et al., 2001; LAUF et al., 2001)) zahlreiche DsRed/GFP-Doppelmarkierungsexperimente auf molekularer und zellulärer Ebene beschrieben.

Generell stellt die Verwendung genetischer *in vivo*-Marker das Mittel der Wahl dar, um Transplantationsklone in verschiedenen Entwicklungsstadien vollständig untersuchen zu können. Weil die GFP- oder DsRed-Fluoreszenz auf lebende Zellen beschränkt ist, können von den Klonen allerdings keine Dauerpräparate angefertigt werden. Daher müssen diese umfangreich dokumentiert werden, um die Beobachtungen zu belegen und später aufkommende Fragen anhand des Bildmaterials retrospektiv beantworten zu können. Dazu wurden die Signale der beiden Fluoreszenzmarker getrennt aufgezeichnet und später mit digitaler Bildbearbeitungssoftware zu Überlagerungsbildern zusammengesetzt. Bei der Untersuchung lebender Larven (Transplantationsserien C bis I) bewegten sich die Tiere zwischen der Aufnahme der beiden Fluoreszenz-Einzelbilder häufig, sodass von vielen der aufgezeichneten Klone im Nachhinein keine eindeutigen Überlagerungsbilder hergestellt werden konnten.

4.5 Die Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien

Die Klonhäufigkeiten in larvalen und imaginalen Geweben können nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden, da für beide Zelltypen unterschiedliche Voraussetzungen gegeben sind: Während der Embryogenese nehmen die meisten Zellen ein larvales Schicksal ein, während nur wenige als imaginale Vorläuferzellen aussortiert werden (NÖTHIGER, 1972). Diese Vorläuferzellen sind meist in Form von Imaginalscheiben organisiert und beginnen erst im Laufe der Larvalentwicklung mit der Proliferation. Daher

werden bei der Untersuchung von Transplantationsklonen im Wanderlarvenstadium hauptsächlich Markierungen in larvalen Geweben detektiert, während – je nach Transplantationsbereich – imaginale Vorläuferzellen eher selten markiert sind (MEISE und JANNING, 1993, 1994; HARBECKE et al., 1996; HOLZ et al., 1997; KLAPPER et al., 1998). Im Laufe der Metamorphose werden die meisten larvalen Gewebe jedoch histolysiert und nur die Gonaden (BODENSTEIN, 1950), die Malpighischen Gefäße (MORGAN, 1930; BODENSTEIN, 1950; MEISE, 1987), die indirekte Flugmuskulatur (ROBERTSON, 1936; CROSSLEY, 1978; COSTELLO und WHYMAN, 1986), die viscerale Muskulatur (KLAPPER, 2000; KLAPPER et al., 2001, 2002), Teile des Dorsalgefäßes (RIZKI, 1978a; CURTIS et al., 1999; MOLINA und CRIPPS, 2001), die Hämocyten (HOLZ et al., 2003) und Teile des Nervensystems (Übersichten bei TRUMAN et al., 1993 und TISSOT und STOCKER, 2000) überdauern diesen Entwicklungsschritt. Alle anderen Gewebe werden *de novo* aus den verschiedenen imaginalen Vorläuferzellen gebildet. Da Transplantationsklone in imaginalen Vorläuferzellen jedoch selten erzeugt werden, sind bei der Untersuchung im Adultstadium auch nur verhältnismäßig wenige Klone zu erwarten.

Diese Vorhersagen zur Häufigkeit larvaler und imaginaler Klone deckten sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation: Während nach den Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, F, G, H und I) in 724 Wanderlarven cell-lineage-Markierungen in larvalen Geweben detektiert werden konnte, überlappten diese Markierungen nur in 78 Fällen (=11%) mit imaginalen Vorläuferzellen. Auch bei den Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserien C, D und E) waren nur in acht von 165 cell-lineage-Klonen (=5%) imaginale Vorläuferzellen markiert. Der Vergleich der larvalen und imaginalen cell-lineage-Klonraten zeigte außerdem, dass die Klonraten im Wanderlarvenstadium (mit 75% für die Einzelzell- und 93% für die Mehrzelltransplantationen) deutlich höher lagen als im Adultstadium (mit 29% für die Einzelzell- und 63% für die Mehrzelltransplantationen).

Weiterhin war der Anteil der syncytialen Markierungen an den detektierten cell-lineage-Klonen abhängig vom Untersuchungsstadium: Im Falle der Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien F, G, H und I) lag dieser Quotient bei 80% für die untersuchten Larven und bei 35% für die zugehörigen Imagines. Diese nicht-zufällige Abweichung basiert darauf, dass der Nachweis syncytialer Markierungen in Imagines nur möglich ist, wenn imaginale Vorläuferzellen unterschiedlicher klonaler Herkunft miteinander fusionieren oder persistierende syncytiale Klone in der Imago redetektiert werden können. Da in der vorliegenden Arbeit die Durchmischung und Fusion imaginaler Vorläuferzellen jedoch nur für die somatische Muskulatur und die Ovidukt-muskulatur nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.6.1, 3.7.1 und 3.7.8) und sich die Persistenz syncytialer Mesoderm-derivate auf die viscerale Muskulatur und Teile des Dorsalgefäßes beschränkte (siehe

Kapitel 3.7.3 und 3.7.6), ist die Wahrscheinlichkeit für Syncytien-Klone in der Imago gering.

4.6 Die Detektion syncytialer Zellverbände

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zahlreiche syncytiale Gewebe unterschiedlicher klonaler Herkunft detektiert werden. Für einige dieser Gewebe, nämlich die larvale und imaginale somatische Muskulatur des Abdomens sowie die longitudinale und circuläre viscerale Muskulatur des Mitteldarms, konnte die Durchmischung und Fusion nicht-verwandter Zellen bereits gezeigt werden (HEUSER, 1999). Durch die simultane Markierung der cell-lineage konnte in den vorliegenden Transplantationsexperimenten jedoch zusätzlich untersucht werden, ob in diesen Geweben auch die exklusive Fusion von Spenderzellnachkommen möglich ist. Daher werden im Folgenden zunächst kurz die wichtigsten Befunde zu diesen bereits bekannten Syncytien erörtert, wobei die Differenzierung der imaginalen somatischen Muskulatur erst im Kapitel 4.8 diskutiert wird.

Im Falle der **larvalen somatischen Muskulatur** stimmt das räumliche Verteilungsmuster der markierten Muskeln (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.7.1) mit den Klonen nach vergleichbaren Einzelzelltransplantationen überein (BEER et al., 1987; HOLZ, 1997; KLAPPER, 1997; HEUSER, 1999). Dabei kann aus der segmentalen Überlappung der markierten Muskeln auf die intersegmentale Rekrutierung der fusionskompetenten Myoblasten geschlossen werden. Da die Fusion zwischen räumlich benachbarten Muskelgründerzellen und fusionskompetenten Myoblasten stattfindet (Übersicht bei BAYLIES et al. 1997), sind innerhalb der Muskelklone häufig neben- oder übereinanderliegende Muskeln markiert. In 18 von 541 Muskelklonen der Transplantationsserien F bis I wurde in einzelnen Muskeln ausschließlich der cell-lineage-Marker detektiert, während in allen anderen markierten Muskeln die Koexpression beider Marker nachgewiesen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass nur in wenigen Muskeln die Myoblasten einer gemeinsamen cell-lineage miteinander fusioniert sind. Somit scheint die Durchmischung verschiedener cell-lineages während der larvalen Myogenese der Regelfall zu sein (KLAPPER et al., 2001).

Bei der Auswertung der Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) wurde auch die durchschnittliche Klongröße reiner Muskelklone ermittelt (siehe Kapitel 3.5.1, 3.5.2 und 3.7.1). Diese lag bei der GFP/lacZ- und der RITC-Dextran/GFP-Doppelmarkierungsmethode bei 3,3, beziehungsweise 3,7 markierten Muskeln pro Klon. Mit der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode stieg die durchschnittliche Klongröße auf 5,2 markierte Muskeln pro Klon. Dieser Wert liegt höher als nach den Vergleichsstudien

von BEER et al. (1987) mit $3,5 \pm 2,5$ Muskeln und KLAPPER et al. (1998) mit 4 Muskeln pro Klon. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die im Cytoplasma lokalisierten *in vivo*-Marker der vorliegenden Arbeit leichter und eindeutiger zu detektieren sind als die Meerrettichperoxidase oder die β -Galaktosidase der Vergleichsstudien. Weil mit allen Transplantationsarten vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, scheint die GAL4/UAS-Transplantationsmethode keinen Einfluss auf die Proliferation der Spenderzelle zu haben. Da die maximale Klongröße in der larvalen somatischen Muskulatur bei 14 markierten Muskeln pro Klon lag und jeder dieser Muskeln mindestens einen Nachkommen der transplantierten Zelle aufweisen muss, müssen im Mesoderm teilweise mehr als drei postblastodermale Mitosen möglich sein. Diese Vorstellung einer vierten Mitosewelle wird durch Transplantationsklone anderer Arbeiten unterstützt (BEER et al., 1987; KLAPPER et al., 1998; HEUSER, 1999).

Die Analyse der anterior-posterioren Klonverteilung ergab, dass sich die Markierungen innerhalb des Transplantationsbereiches von 44 bis 23% EL auf die Abdominalsegmente 2 bis 8 erstrecken können (siehe Kapitel 3.7.1). Da in 51% der Muskelklone mindestens zwei benachbarte Abdominalsegmente markiert waren, scheinen die Primordien für die larvale somatische Muskulatur benachbarter Segmente zu überlappen. Weiterhin korrespondierte die Segmentzugehörigkeit der markierten Muskeln tendenziell mit der Transplantationsposition. Somit stimmt die konsekutive Abfolge der einzelnen Segmentanlagen, wie schon bei KLAPPER et al. (1998) beschrieben, mit der anatomischen Abfolge der später ausgeprägten Segmente überein.

Nach den Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) konnten im Wanderlarvenstadium in 29 von 633 mesodermalen Klonen (=4%) cell-lineage-Markierungen in der **longitudinalen visceralen Muskulatur** detektiert werden (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.7.3). Im Gegensatz dazu lag die Markierungshäufigkeit in der visceralen Muskulatur des Mitteldarms nach herkömmlichen homotopen Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm nur bei 3% (BEER et al., 1987), beziehungsweise 2% (KLAPPER, 1997). Dabei muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass in beiden Vergleichsstudien nicht zwischen Markierungen in der longitudinalen und der circulären visceralen Muskulatur unterschieden wurde. Untersuchungen von BOSSINGER (2002) zeigten, dass der cell-lineage-Marker in der von KLAPPER (1997) verwendeten Spenderlinie nur sehr schwach in der visceralen Muskulatur exprimiert wurde, was den Nachweis potentieller Klone in diesem Gewebe erschwert. Daher ist die erhöhte Markierungshäufigkeit der vorliegenden Arbeit vermutlich auf die Verwendung stärker exprimierender Linien zurückzuführen. Die Ausdehnung und Anordnung der markierten Muskeln stimmt

mit den Markierungen nach vergleichbaren Einzelzelltransplantationen überein (HEUSER, 1999; KLAPPER et al., 2001).

Für die longitudinale viscerale Muskulatur konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie zwei Primordien besitzt: Während ihre Muskelgründerzellen aus einer bereits im zellulären Blastodermstadium determinierten Region an der posterioren Mesodermspitze entstammen, gehen ihre fusionskompetenten Myoblasten auf das Rumpfmesoderm zurück (SAN MARTIN et al., 2001; KLAPPER et al., 2002). Somit stellen alle longitudinalen Muskeln heterogene Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft dar. Daher sollte bei der Verwendung der GAL4/UAS-Transplantationstechnik in allen Klonen in diesem Gewebe auch immer der Syncytien-Marker exprimiert werden. Dieser konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur in zwölf von 51 Klonen im Wanderlarven- und in sieben von 20 Klonen im Adultstadium beobachtet werden. Da die longitudinalen Darmmuskeln sehr lang und filigran sind, kann eine diffusionsbedingte Ausdünnung des GAL4-Transkriptionsfaktors im Cytoplasma postuliert werden. Erreicht dieses Protein nicht die Empfängerkerne, so unterbleibt die Expression des Syncytien-Markers. Die erhöhte Expression des Syncytien-Markers im Adultstadium könnte auf die Verkürzung der longitudinalen visceralen Muskulatur während der Metamorphose und die damit verbundene Reduzierung der Diffusionsstrecke zurückzuführen sein (KLAPPER et al., 2001).

Auch in der **circulären visceralen Muskulatur** des Mitteldarms konnten nach den Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) mit 36 von 633 mesodermalen Klonen (=5,7%) im Vergleich zu BEER et al. (1987) und KLAPPER (1997) viele Markierungen detektiert werden (siehe Kapitel 3.5.2 und 3.7.3). Diese erhöhte Markierungsrate kann – wie auch schon bei den Klonen in der longitudinalen visceralen Muskulatur – auf die Verwendung stärker exprimierender Spenderlinien zurückgeführt werden. Alle markierten Muskeln entsprachen in ihrer Morphologie den Beschreibungen von HEUSER (1999), OVERESCH (1999), KLAPPER et al. (2001) und SAN MARTIN et al. (2001): Stets umspannen die dinucleären Muskeln eine Darmhalbseite, wobei ihr Cytoplasma im Wanderlarvenstadium netzartig aufgefasert und im Adultstadium spangenartig kondensiert vorliegt.

Die Expression des Syncytien-Markers beschränkte sich nach allen Transplantationsserien auf 34 von 46 Klonen in der circulären visceralen Muskulatur, wobei in acht der 34 Fälle nur einzelne Darmmuskeln beide Marker koexprimierten. Somit ist in diesem Gewebe die Fusion klonal verwandter und nicht-verwandter Myoblasten mit annähernd der gleichen Wahrscheinlichkeit möglich. Über die Myogenese der circulären visceralen Muskulatur ist bekannt, dass die Muskelgründerzellen einzelne fusionskompetente Myoblasten rekrutieren

und in dorsoventraler Richtung mit diesen fusionieren (SAN MARTIN et al., 2001; KLAPPER et al., 2002). Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse kann postuliert werden, dass die Fusionspartner, wie bei der Myogenese der larvalen somatischen Muskulatur (BAYLIES et al. 1997; KLAPPER et al., 1998), aufgrund ihrer räumlichen Nähe und nicht aufgrund klonaler Verwandtschaften ausgewählt werden.

4.6.1 Die Detektion bisher unbekannter syncytialer Zellverbände mesodermaler Herkunft

Im Rahmen der Anlagenkartierung (Transplantationsserien F bis I) konnte in zwölf der 582 mesodermalen Klone (=2%) eine cell-lineage-Markierung im **Dorsalgefäß** beobachtet werden (siehe Kapitel 3.7.6). Diese niedrige Markierungswahrscheinlichkeit konnte auch nach vergleichbaren Transplantationen beobachtet werden (bei KLAPPER (1997) mit 0,5%) und scheint typisch für dorsale Mesodermderivate zu sein (HOLZ, 1997; KLAPPER, 1997).

Bei der Anlagenkartierung konnte in drei von sieben Klonen in den **Cardialzellen** auch der Syncytien-Marker GFP in allen DsRed-markierten Zellen nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich immer um zwei direkt benachbarte Cardialzellen, die stets auf derselben Halbseite des Dorsalgefäßes lagen und jeweils nur einen Zellkern aufwiesen. Da die Induktion der GFP-Expression die räumliche Kolokalisation von Spender- und Empfängerzellkernen in einem gemeinsamen Cytoplasma erfordert, wäre ein bisher unbekannter cytoplasmatischer Zusammenschluss von Cardialzellen entlang der anterior-posterioren Grenze denkbar. Diese Überlegung widerspricht allerdings den Befunden von RUGENDORFF et al. (1994), die ultrastrukturelle Untersuchungen an embryonalen Dorsalgefäßen durchführten und beschrieben, dass die Cardialzellen ein kontraktiles Endothel aus unfusionierten Zellen bilden. Dabei ist zu beachten, dass auch für die longitudinale und circuläre viscerale Muskulatur aufgrund von Ultrastrukturanalysen zunächst ein mononucleärer Aufbau postuliert worden war (GOLDSTEIN und BURDETTE, 1971; ELDER, 1975; TEPASS und HARTENSTEIN, 1994). Mit Hilfe klonaler Analysen (HEUSER, 1999, OVERESCH, 1999; KLAPPER, 2000; KLAPPER et al., 2001, 2002) und Farbstoffinjektions-Experimenten (SAN MARTIN et al., 2001) konnte dieser Befund jedoch widerlegt und der syncytiale Aufbau der Darmmuskulatur gezeigt werden.

Weiterhin konnte der Syncytien-Marker in einer von zwei Markierungen in den **alary muscles** nachgewiesen werden, was auf die Fusion klonal nicht-verwandter Myoblasten zurückzuführen ist. Die syncytiale Organisation dieses Gewebes wurde bereits von RUGENDORFF et al. (1994) beschrieben; diese konnten jedoch keine Aussagen über die klonale Zusammensetzung treffen.

Der Syncytien-Marker wurde auch in einem Klon in den **elastischen Filamenten** detektiert. Da dieses Gewebe kontraktile ist und ein großes Cytoplasma aufweist, wäre die Fusion von klonal nicht-verwandten Zellen denkbar. In der Literatur finden sich jedoch keine Angaben zur Ultrastruktur dieses Gewebes.

Im Zuge der Anlagenkartierung (Transplantationsserien F bis I) wurden in 17 der 582 mesodermalen Klone (=3%) cell-lineage-Markierungen im **Gonadenmesoderm** detektiert (siehe Kapitel 3.7.7). Auch in diesem Fall stimmt die geringe Markierungshäufigkeit mit den Beobachtungen von KLAPPER (1997) überein, der diese Markierungen nach homotopen Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm in 2% aller mesodermalen Klone beobachtete. In zwei männlichen Empfängern konnte der Syncytien-Marker im larvalen Gonadenmesoderm nachgewiesen werden. Da aus den wenigen Zellen des Gonadenmesoderms die diversen Hüllgewebe der adulten Gonaden hervorgehen (siehe Kapitel 1.4), sollten diese im Wanderlarvenstadium noch im undifferenzierten diploiden Zustand vorliegen. Zellfusionen wären somit zwar nicht zu erwarten, doch können sie für eine Subpopulation der Gonadenmesodermzellen auch nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass in dem einen die Metamorphose überlebenden doppelmarkierten Empfänger auch beide Marker im korrespondierenden **Hodenhüllgewebe** redetektiert werden konnten, spricht für die larvale Fusion einzelner Vorläuferzellen. Die Diskussion über geschlechtsspezifische Unterschiede und die Anlage dieses Gewebes findet sich in Kapitel 4.10.

Die Untersuchung der Empfänger im Adultstadium (Transplantationsserien D, F, G, H und I) enthüllte in sechs Fällen cell-lineage-Markierungen in der **Oviduktmuskulatur** (siehe Kapitel 3.7.8). Während der Nachweis des Syncytien-Markers in fünf Fällen nur in einzelnen dieser Muskeln möglich war, waren in einem Empfänger alle Muskeln doppelmarkiert. Aus den histologischen Untersuchungen von MILLER (1950) ist bekannt, dass die Oviduktmuskeln dem tubulären Muskeltyp zuzurechnen sind und jeweils einen isolierten Nucleus aufweisen. In den Transplantationsklonen der vorliegenden Arbeit konnten zwar keine Zellkerne identifiziert werden, doch belegt die Expression des Syncytien-Markers, dass sich im Cytoplasma der Oviduktmuskeln mindestens zwei Nuclei befinden müssen; diese können unterschiedlicher oder gleicher klonaler Herkunft sein.

Nach den Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) traten in 36 Empfängern cell-lineage-Markierungen in bisher **unbekannten Strukturen** auf, die mit Markierungen in weiteren Mesodermderivaten überlappten (siehe Kapitel 3.5.1, 3.5.2 und 3.7.10). In 22 Fällen konnte in diesen Geweben auch der Syncytien-Marker nachgewiesen werden, wobei die markierten Strukturen meist eine muskelähnliche Morphologie und ein deutlich mehrkerniges Cytoplasma besaßen (siehe Abbildung 20 und 48). Unter

Umständen wurden hier tatsächlich bislang unbeschriebene Zellstrukturen entdeckt; wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich um transplantationsbedingte Artefakte. Diese entstehen möglicherweise, wenn einige Nachkommen der transplantierten Zelle aus ungeklärten Gründen von der normalen Zelldifferenzierung ausgeschlossen werden und sich außerhalb der bekannten Gewebe organisieren. Dabei wäre es denkbar, dass einige dieser Zellen aufgrund ihrer Positionsinformationen die Muskelgründerzell-Determinante *dumbfounded (duf)* exprimieren und – in Konkurrenz zu den zahlreichen somatischen und visceralen Muskelgründerzellen – umliegende fusionskompetente Myoblasten rekrutieren. Nach der Fusion können sich diese Syncytien nicht weiter differenzieren und verharren unterhalb des Hautmuskelschlauchs.

4.6.2 Die Detektion bisher unbekannter syncytialer Zellverbände ektodermaler Herkunft

Die Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien C und D) und in der Ektodermanlage (Transplantationsserie E) führten in 70 Empfängern zu cell-lineage-Klonen in der Epidermis (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.6.2). In elf dieser Tiere konnte der Syncytien-Marker GFP zumindest in einem Teil der DsRed-markierten Epidermiszellen nachgewiesen werden, weshalb die Fusion einzelner Epidermiszellen möglich zu sein scheint. Dabei könnte es sich um spezialisierte Zellen handeln, deren Morphologie noch nicht hinreichend beschrieben ist. Dieser Befund bestätigt die Beobachtung früherer Untersuchungen (HEUSER, 1999), in denen der Syncytien-Marker bereits in drei Epidermis-Klonen detektiert werden konnte. Die larvale Epidermis wurde aufgrund ihrer zahlreichen *gap junctions* bereits von CAVENEY (1976) als funktionales Syncytium beschrieben. Aufgrund des geringen Durchmessers ihrer Zell-Zell-Kontakte von 2 bis 3 nm sollte der interzelluläre Austausch jedoch auf Ionen und kleine Signalmoleküle beschränkt sein (Übersicht bei POODRY, 1980). Da die Komponenten des GAL4/UAS-Transplantations-systems größer als 25 kDa sind (siehe Kapitel 4.2), ist für ihren Austausch die Fusion einzelner Zellen nötig.

Um die Fusion einzelner Epidermiszellen belegen zu können, wurden mit Hilfe der *FLP-out*-Technik (STRUHL und BASLER, 1993) cytoplasmatisch *GFP*-exprimierende Klone in der Epidermis induziert (siehe Kapitel 3.6.2). Da der Hitzeschock erst nach Abschluss der postblastodermalen Mitosen erfolgte, sollte die Markierung zweier benachbarter Epidermiszellen nicht durch Zellteilung, sondern durch die Fusion dieser Zellen hervorgerufen werden. Dieses Experiment verlief erfolglos, da die Klonfrequenz aus unbekanntem Gründen auch nach den unterschiedlichsten Versuchsbedingungen nicht auf ein Minimum gesenkt werden konnte und die Größe und Anzahl der Klone nicht mit der Hitzeschock-

Dauer korrelierte. Außerdem traten in den unbehandelten Referenzlarven Spontanklone unterschiedlichen Ausmaßes auf, welche vermutlich auf die von BRAND und PERRIMON (1994) beschriebene erhöhte Grundaktivität des Hitzeschock-Promotors zurückgeführt werden können.

Bei den Transplantationsklonen in der larvalen Epidermis fielen besonders die unregelmäßige Form und die unterschiedliche Größe der markierten Zellen auf. Diese Variabilität der Epidermiszellen konnte ebenfalls in anderen Untersuchungen bestätigt werden, beispielsweise in den intrazellulären *Lucifer yellow*-Injektionsexperimenten von RUANGVORAVAT und LO (1992), den Hitzeschock-Versuchen von OVERESCH (1999) und den Transplantationsexperimenten von BOSSINGER (2002). Auch nach den Hitzeschock-Experimenten der vorliegenden Arbeit variierte die Morphologie der larvalen Epidermiszellen (siehe Abbildung 27).

4.6.3 Die Detektion bisher unbekannter syncytialer Zellverbände ungeklärter Herkunft

Nach den Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) traten in drei Empfängern reine cell-lineage-Markierungen in bisher unbekannten Strukturen auf, deren Keimblattzugehörigkeit nicht bestimmt werden konnte. Dabei konnte in zwei Fällen in diesen Geweben auch der Syncytien-Marker nachgewiesen werden. Außerdem gingen aus den Mehrzelltransplantationen (Transplantationsserien C, D und E) zwölf bisher nicht bekannte cell-lineage-Markierungen unbekannter Herkunft hervor, in denen in neun Fällen zusätzlich der Syncytien-Marker exprimiert wurde. Auch bei diesen Klonen wiesen die markierten Strukturen, wie die unbekanntes Strukturen mesodermaler Herkunft (siehe Kapitel 4.6.1), meist eine muskelähnliche Morphologie und ein mehrkerniges Cytoplasma auf. Daher ist auch hier anzunehmen, dass es sich eher um transplantationsbedingte Artefakte als um bislang unbeschriebene syncytiale Gewebe handelt.

4.7 Zahlreiche Gewebe überdauern scheinbar unverändert die Metamorphose

Bis vor wenigen Jahren wurde – basierend auf den Untersuchungen von ROBERTSON (1936) – die Histolyse nahezu aller larvalen Gewebe während der Metamorphose postuliert. Durch die gezielte Markierung und Verfolgung einzelner Gewebe sowie die Weiterentwicklung optischer Untersuchungsmethoden ist es inzwischen möglich, das Schicksal larvaler Gewebe während der Metamorphose genauer zu untersuchen. Von dieser Möglichkeit wurde in den Transplantationsserien D, F, G, H und I Gebrauch gemacht, indem Transplantationsklone des Wanderlarvenstadiums mit den korrespondierenden Markierungen des Adultstadiums verglichen wurden. Die dabei gemachten Entdeckungen werden in den nachfolgenden Unterkapiteln diskutiert.

4.7.1 Persistierende mesodermale Gewebe

Aufgrund von Klonvergleichen nach Hitzeschock-Experimenten (OVERESCH, 1999) wurde bereits die Persistenz der visceralen Muskulatur des Mitteldarms diskutiert. Diese konnte nun mit verschiedenen Methoden tatsächlich belegt werden: Durch Kernzählungen an einer *enhancer trap*-Linie und die Präparation verschiedener Metamorphosestadien konnte KLAPPER (2000) zeigen, dass die gesamte longitudinale viscerele Muskulatur die Metamorphose überdauert und dass keine weiteren imaginalen Vorläufer für das adulte Gewebe existieren. Mit Hilfe des GAL4/UAS-Transplantationssystems erzeugten KLAPPER et al. (2001, 2002) GFP-Markierungen in der longitudinalen und circulären visceralen Muskulatur des Mitteldarms und untersuchten diese im Embryonal-, Wanderlarven- und Adultstadium. Durch den Klongrößenvergleich konnten sie auf die syncytiale Organisation und die vollständige Persistenz beider Gewebe schließen.

Im Rahmen der Anlagenkartierung der vorliegenden Arbeit (Transplantationsserien F bis I) konnten in 20 Imagines cell-lineage-Markierungen in der **longitudinalen visceralen Muskulatur** detektiert werden (siehe Kapitel 3.7.3). Von diesen waren bereits sieben im Wanderlarvenstadium nachgewiesen worden; die restlichen 13 Klone wurden zu diesem Zeitpunkt vermutlich übersehen. In allen Empfängern, die bereits im Wanderlarvenstadium eine Markierung in der longitudinalen visceralen Muskulatur aufgewiesen hatten und die Metamorphose überlebten, konnte diese Markierung im Adultstadium redetektiert werden. Dieser Befund bestätigt die Persistenz dieses Gewebes. Die adulten cell-lineage-Markierungen fielen in drei Fällen größer als die larvalen Markierungen aus und in drei Klonen wurde der Syncytien-Marker erstmals in der Imago nachgewiesen. Auch KLAPPER et al. (2001) beobachteten im Wanderlarvenstadium nur selten Markierungen in longitudinalen Darmmuskeln, obwohl sie diese im Embryonal- und Adultstadium identifizieren

konnten. Da sie die Nachweiswahrscheinlichkeit in diesem Untersuchungsstadium jedoch durch gleichartige Transplantationen mit einer *enhancer trap*-Linie signifikant erhöhen konnten, schlossen sie auf eine verhältnismäßig niedrige *GAL4*-Expression der *daGAL4*-Spenderlinie. Da der larvale Darm die doppelte Länge des imaginalen Darms aufweist, spielt im Wanderlarvenstadium möglicherweise die diffusionsbedingte Ausdünnung des *GAL4*-Transkriptionsfaktors eine Rolle.

Aus den Mehrzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserie D) gingen sechs Markierungen in der longitudinalen visceralen Muskulatur des larvalen Mitteldarms hervor, die im Adultstadium allesamt nicht redetektiert werden konnten (siehe Kapitel 3.6.1). Da die vollständige Persistenz dieses Gewebes gezeigt werden konnte (OVERESCH, 1999; KLAPPER, 2000; KLAPPER et al., 2001), gibt es für dieses Ergebnis zwei Erklärungsansätze: Entweder wurden für das Wanderlarvenstadium fälschlicherweise Markierungen in diesem Gewebe notiert oder entsprechende Markierungen wurden im Adultstadium übersehen. Wahrscheinlicher ist die zweite Überlegung, da in dieser Transplantationsserie die ersten Imagines ausgewertet wurden und zu diesem Zeitpunkt noch keine Erfahrungen mit dem fortschreitenden Ausbleichen der beiden Marker und der höheren Eigenfluoreszenz der Empfänger vorlagen.

Die Transplantationsserien F bis I führten auch zu zehn cell-lineage-Klonen in der **circulären visceralen Muskulatur** des imaginalen Mitteldarms (siehe Kapitel 3.7.3). Von diesen konnten acht bereits im Wanderlarvenstadium detektiert werden, wobei die Markierungen im Adultstadium in drei Fällen kleiner ausfielen als vor der Metamorphose. In vier weiteren Empfängern, die im Wanderlarvenstadium eine Markierung in der circulären visceralen Muskulatur aufgewiesen hatten und die Metamorphose überlebten, konnte die Markierung im Adultstadium nicht redetektiert werden. Diese Befunde bestätigen zwar die Persistenz dieses Gewebes, doch scheint auch der partielle Abbau einzelner circulärer Darmmuskeln möglich zu sein. Bisher wurde aufgrund von Klongrößenvergleichen nach Hitzeschock-Experimenten postuliert, dass die gesamte circuläre viscerele Muskulatur die Metamorphose unverändert überdauert (OVERESCH, 1999). Während nach den Mehrzelltransplantationen von KLAPPER et al. (2002) alle circulären Muskelklone ($n=9$) in der Imago redetektiert werden konnten, beschränkte sich die Redetektion bei den Transplantationsklonen von BOSSINGER (2002) auf ungefähr die Hälfte aller Klone in der longitudinalen und circulären visceralen Muskulatur. Somit könnte während der Metamorphose tatsächlich ein Teil der circulären visceralen Muskeln histolysiert werden.

Aus der Anlagenkartierung (Transplantationsserien F bis I) gingen auch vier Klone im Dorsalgefäß hervor, welche die Metamorphose scheinbar unverändert überdauert hatten

(siehe Kapitel 3.7.6). Dabei handelte es sich jeweils um eine Markierung in den **Cardialzellen**, einem *alary muscle*, **Pericardialzellen** und **elastischen Filamenten**. In einem fünften Empfänger, der die Metamorphose überlebt hatte, konnte die Markierung in den Cardialzellen nicht redetektiert werden. Durch den histologischen Vergleich früher Pupalstadien mit der adulten Morphologie schlossen CURTIS et al. (1999), dass das Dorsalgefäß während der Metamorphose nur geringfügigen Änderungen unterliegt. Die Verfolgung der larvalen, pupalen und imaginalen Expressionsmuster von *seven-up (svp)*, *tinman (tin)* und *Myocyte enhancing factor 2 (MEF-2)* ergab jedoch, dass das Dorsalgefäß posterior des Abdominalsegments 5 während der Metamorphose histolysiert wird und die adulten Ostia sowie ventrale longitudinale Muskelfasern neu gebildet werden (MILLER, 1950; MOLINA und CRIPPS, 2001). Somit stellt das adulte Dorsalgefäß eine Chimäre aus larvalen und imaginalen Zellen dar. Da die Segmentzugehörigkeit der markierten Cardialzellen in der vorliegenden Untersuchung nicht notiert wurde, wäre ihr Abbau denkbar.

Die genauere Betrachtung der persistierenden Dorsalgefäß-Klone ergab, dass der markierte *alary muscle* im Adultstadium ein grazileres Erscheinungsbild aufwies. Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen von ROBERTSON (1936) überein. Im Falle der Pericardialzellen war die imaginale Markierung um eine Zelle größer als der larvale Klon. Da die Pericardialzellen im Laufe der Larvalentwicklung polytänisieren (RIZKI, 1978a), ist eine pupale Zellteilung auszuschließen. Vermutlich wurde eine Pericardialzelle bei der Untersuchung im Wanderlarvenstadium übersehen. Zur Persistenz der elastischen Filamente liegen – wie zur Organisation dieses Gewebes – keine Untersuchungen vor.

Ebenfalls im Rahmen der Anlagenkartierung (Transplantationsserien F bis I) wurden zwei die Metamorphose überdauernde Markierungen in der *transverse nerve exit glia* gefunden (siehe Kapitel 3.7.5). In weiteren 19 Fällen fiel die Redetektion entsprechender Glia-Klone jedoch negativ aus, was gegen eine Persistenz dieses Gewebes spricht. Über die Herkunft der beobachteten Markierungen kann nur spekuliert werden; vermutlich wurde die erhöhte Eigenfluoreszenz der adulten Empfänger falsch bewertet.

4.7.2 Persistierende ektodermale Gewebe

Nach den im Rumpfmesoderm angestrebten Einzelzelltransplantationen (Transplantationsserien A, B, F, G, H und I) konnten 112 cell-lineage-Markierungen im larvalen Nervengewebe detektiert werden, die auf die Entnahme ektodermaler Zellen zurückzuführen waren. Bei der Untersuchung im Adultstadium beschränkte sich der Nachweis auf 16 Markierungen im Nervensystem. In diesen Empfängern waren im Wanderlarvenstadium bereits ausnahmslos Markierungen im Nervengewebe detektiert worden, und zwar

zwölfmal im Ventralganglion (mit abgehenden Motoneuronen), einmal in einem *multiple dendritic neuron* und dreimal simultan in beiden Geweben (siehe Kapitel 3.7.9). Für das Nervensystem ist bekannt, dass die meisten sensorischen Neurone während der Metamorphose degenerieren (TRUMAN, 1996; WILLIAMS und SHEPARD, 2002), während zahlreiche larvale Motoneurone zu adulten Motoneuronen remodelliert werden (TISSOT et al., 1998; TISSOT und STOCKER, 2000). Die Persistenz einzelner Neurone scheint durch die vorliegenden Transplantationsklone bestätigt zu werden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass larvale und imaginale Neuroblasten eine gemeinsame cell-lineage besitzen (PROKOP und TECHNAU, 1991) und bei der *in vivo*-Untersuchung der Wanderlarven nicht zwischen den beiden Zelltypen unterschieden werden kann. Es ist also durchaus möglich, dass ein Teil der adulten Nervenklone aus imaginalen Neuroblasten gebildet wurde.

4.8 Untersuchungen zur Bildung der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens

Aus der Rückverfolgung permanent *twist (twi)*-exprimierender Zellen ist bekannt, dass die imaginale somatische Muskulatur des Abdomens auf sechs adulte Vorläuferzellen pro embryonalem abdominalem Hemisegment zurückgeführt werden kann (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991). Diese proliferieren während der Larvalentwicklung und liegen im Wanderlarvenstadium in Form sechs räumlich getrennter Vorläufercluster vor, die jeweils aus acht bis 16 Zellen bestehen und als imaginale Muskelvorläufer bezeichnet werden. In den verschiedenen Transplantationsserien der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 67 cell-lineage-Klone in diesem Gewebe detektiert, die in 61 Fällen mit einer Markierungen in der larvalen somatischen Muskulatur überlappten (siehe Kapitel 3.5.1, 3.6.1 und 3.7.4). Es ist bekannt, dass die Vorläuferzellen der larvalen und imaginalen somatischen Muskulatur durch die asymmetrische Zellteilung einer gemeinsamen Muskelvorläuferzelle (*muscle progenitor cell*) entstehen (CARMENA et al., 1995; RUIZ-GOMEZ und BATE, 1997). Somit sollte immer eine Komarkierung beider Gewebe zu beobachten sein. Die sechs beobachteten Ausnahmefälle entstammten alle der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode und können unterschiedliche Ursachen haben: Entweder wurde fälschlicherweise eine Markierung in einem imaginalen Muskelvorläufer detektiert oder die Konzentration des cell-lineage-Markers lag im larvalen Klonanteil unter der Nachweisgrenze. Da alle betroffenen Empfänger während der Metamorphose verstarben, kann über die Entstehung dieser Markierungen nur spekuliert werden.

Die imaginalen Muskelvorläufer sind – im Gegensatz zu den larvalen Muskeln – äußerst klein und filigran. Außerdem zeigen X-Gal-Färbungen an *twist-lacZ*-exprimierenden

Wanderlarven, dass die räumliche Position der Muskelvorläufer variieren kann (siehe Kapitel 3.7.4). Diese Aspekte erschweren den *in vivo*-Nachweis und führen in einigen Fällen zu Fehlinterpretationen: So konnten in 34 Empfängern Klone in der imaginalen somatischen Muskulatur detektiert werden, obwohl nur in 25 Fällen auch eine korrespondierende Markierung im Wanderlarvenstadium beobachtet worden war. Das bedeutet, dass in mindestens neun Fällen Markierungen in imaginalen Muskelvorläufern übersehen wurden. Im Gegensatz dazu war in fünf die Metamorphose überlebenden Empfängern keine Redetektion der imaginalen Myoblasten möglich. Da während der Metamorphose die Proliferation dieser Zellen stattgefunden haben sollte, wurden also in mindestens fünf Fällen irrtümlich Markierungen in imaginalen Muskelvorläufern detektiert.

4.8.1 Die Aufklärung intra- und intersegmentaler Durchmischungsprozesse

Aufgrund der Verfolgung permanent *twist*-exprimierender Zellen (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991) und verschiedener Ablationsexperimenten (BROADIE und BATE, 1991; FARRELL und KESHISHIAN, 199) wurde postuliert, dass alle adulten Muskelvorläuferzellen respektive die aus ihnen hervorgehenden imaginalen Muskelvorläufer auf die Bildung einer speziellen Gruppe imaginaler abdominaler Muskeln determiniert sind. In jedem abdominalen Hemisegment soll also der ventrale Muskelvorläufer alle ventralen, jeder laterale Muskelvorläufer die Hälfte aller lateralen und jeder dorsale Muskelvorläufer ein Drittel aller dorsalen Muskeln bilden (siehe Abbildung 50A). Das bedeutet, dass nur klonal verwandte Myoblasten miteinander fusionieren können. Mit dem GAL4/UAS-Transplantationssystem induzierte imaginale Muskelklone sollten folglich nur den cell-lineage- und nie den Syncytien-Marker exprimieren.

Die 34 Klone in der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens beweisen jedoch das Gegenteil: Während nur in sieben Muskelklonen ausschließlich der cell-lineage-Marker nachgewiesen werden konnte, war in den restlichen Empfängern die partielle oder vollständige Koexpression beider Marker zu beobachten (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.7.4). Das bedeutet, dass die Fusion von klonal nicht verwandten Myoblasten nicht nur möglich ist, sondern sogar der Regelfall zu sein scheint. Die imaginale Myogenese der abdominalen somatischen Muskulatur gleicht somit dem Prozess der larvalen Myogenese, bei der die klonale Verwandtschaft der fusionierenden Myoblasten auch keine Rolle spielt (KLAPPER et al., 2001).

Im Falle der sieben reinen cell-lineage-Klone waren immer nur Teile der lateralen oder dorsalen Muskelgruppe des imaginalen Abdomens markiert. Im Gegensatz dazu konnte die Ausdehnung der doppelmarkierten Muskelklone stark variieren (siehe Tabelle 18): So gab

es zahlreiche Klone, bei denen fast alle Muskeln der lateralen Gruppe markiert waren (n=25). Außerdem waren häufig laterale und dorsale oder laterale und ventrale Muskeln eines Hemisegments komarkiert (n=12). Diese Beobachtungen sind auf die intrasegmentale Durchmischung der imaginalen Myoblasten zurückzuführen. Weiterhin gab es 13 Klone, in denen bis zu drei benachbarte Abdominalsegmente markiert waren. In diesen segmentüberlappenden Klonen waren immer homologe Muskelgruppen markiert, und zwar meist die lateralen Muskeln direkt benachbarter Hemisegmente. Zusätzlich zu der intersegmentalen Fusion konnte in acht Fällen auch eine intrasegmentale Durchmischung beobachtet werden; so waren zum Beispiel laterale Muskeln zweier benachbarter Hemisegmente und ventrale Muskeln eines dieser Hemisegmente markiert.

Bei der Untersuchung der imaginalen Muskelklone ergaben sich auch einige Besonderheiten: So wurden nie Klone beobachtet, die zwischen allen drei Muskelgruppen eines Hemisegments überlappten. Die Möglichkeit, dass alle drei Muskelgruppen eines Hemisegments markiert sein können, kann jedoch aufgrund der geringen Anzahl klonaler Markierungen (n=4) nicht ganz ausgeschlossen werden. Weiterhin war auffällig, dass in den vier Klonen in der dorsalen Muskulatur ausschließlich der cell-lineage-Marker detektiert werden konnte. Die ausschließliche Fusion klonal verwandter Myoblasten ist in diesen Fällen vermutlich ebenfalls rein zufällig. Bei vier Klonen waren imaginale Muskeln auf beiden Körperhalbseiten markiert, wobei es sich nur um ventrale und/oder laterale Muskeln handelte. Für deren Entstehung gibt es zwei Möglichkeiten: Unter Umständen können die imaginalen Myoblasten die ventrale Mittellinie überschreiten und sich somit auch bilateral intrasegmental durchmischen. Andererseits könnte die Markierung beider adlater Körperhälften auch auf die nicht registrierte Markierung zweier bilateral lokalisierter imaginaler Muskelvorläufer zurückgehen.

Die Durchmischung imaginaler Myoblasten scheint also ein Grundprinzip in der imaginalen Myogenese der abdominalen somatischen Muskulatur zu sein. Dabei können sich nur Myoblasten benachbarter imaginaler Muskelvorläufer vermischen und miteinander fusionieren – entweder innerhalb eines Hemisegments oder über die Segmentgrenze hinweg. Ähnliche Beobachtungen konnte ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit machen (HEUSER, 1999), doch waren dort aufgrund der fehlenden cell-lineage-Markierung keine Aussagen zur Durchmischungshäufigkeit der imaginalen Myoblasten möglich. In der nachfolgenden Abbildung 50 wird das aus den Daten der vorliegenden Arbeit entwickelte Modell zur imaginalen Myogenese der abdominalen somatischen Muskulatur dem bisherigen Modell gegenübergestellt:

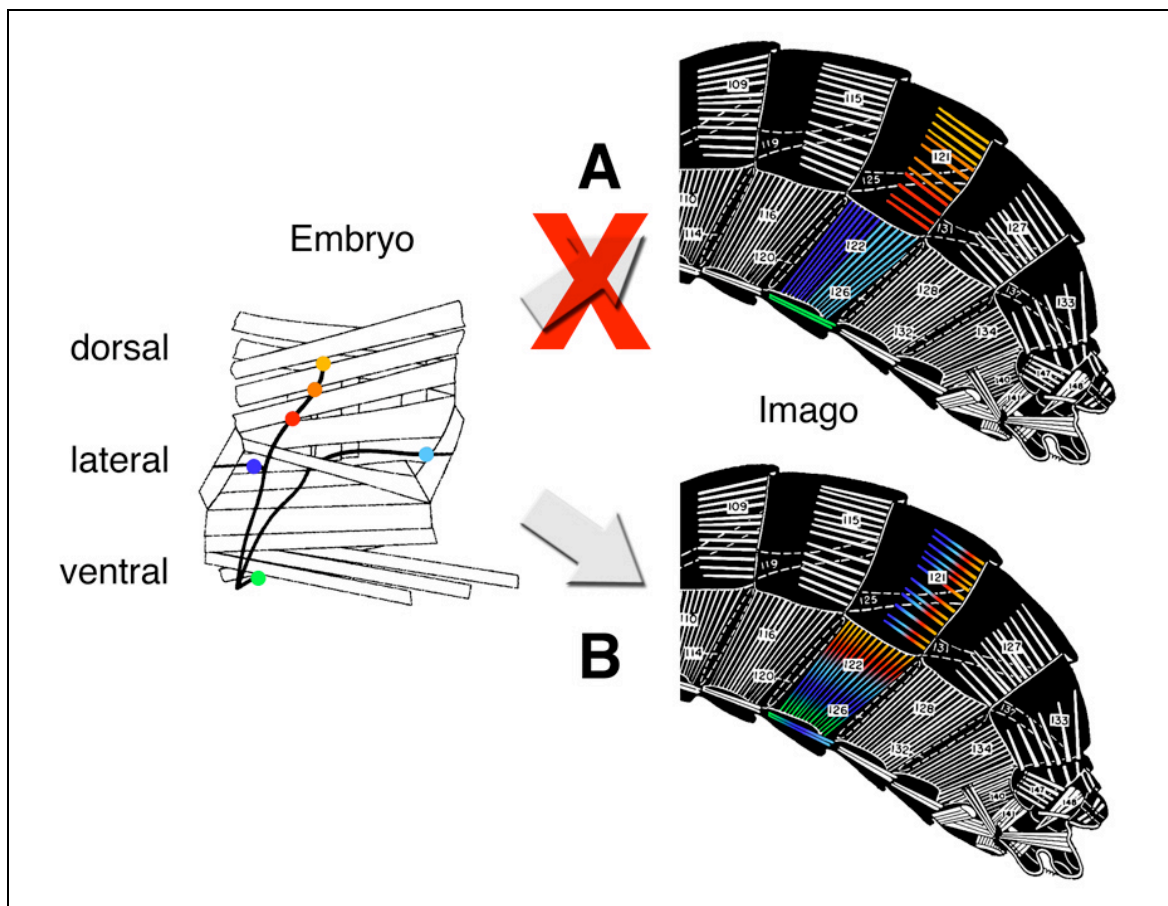


Abbildung 50: Modellvorstellungen zur Differenzierung der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens.

In der linken Teilabbildung ist ein embryonales Hemisegment dargestellt (verändert nach FARRELL und KESHISHIAN, 1999; anterior ist links, die ventrale Mittellinie befindet sich unten). Alle Zellen mit permanenter *twist*-Expression (PTCs) sind farbig dargestellt und mit peripheren Nerven (schwarze Linien) assoziiert. Die rechte Teilabbildung zeigt einen schematischen Sagittalschnitt durch das Abdomen einer weiblichen Imago mit dem Blick auf die rechte Körperhälfte (verändert nach MILLER, 1950). Die Zahlen benennen verschiedene Muskelgruppen (vergleiche Abbildung 3).

- A) Restriktionsmodell: Auf der Basis chemischer Ablationsexperimente wurde postuliert, dass jede adulte Muskelvorläuferzelle (PTC) zur Bildung spezieller Muskelfasern beiträgt (BROADIE und BATE, 1991): Aus der ventralen PTC (grün) gehen alle ventralen Muskeln, aus jedem lateralen PTC (hellblau/dunkelblau) jeweils die Hälfte der lateralen Muskeln und aus jedem dorsalen PTC (rot/orange/gelb) jeweils ein Drittel der dorsalen Muskeln des korrespondierenden imaginalen Hemisegments hervor.
- B) Durchmischungsmodell: Auf der Grundlage der vorliegenden Transplantationsergebnisse kann postuliert werden, dass imaginale Myoblasten unterschiedlichen klonalen Ursprungs miteinander fusionieren können. Dabei sind sie weder auf eine bestimmte Muskelgruppe noch auf ein einzelnes Hemisegment beschränkt (regenbogenförmiger Farbverlauf).

Wie können diese Abweichungen von der gängigen Theorie erklärt werden? Das Restriktionsmodell basiert auf den histologischen Untersuchungen von CURRIE und BATE (1991), welche die Migrationsbewegungen der imaginalen Myoblasten verfolgten. Dazu führten sie Antikörperfärbungen an präparierten Puppen durch, verglichen verschiedene Pupalstadien miteinander und beschrieben die Nerven-assoziierte Wanderung der proliferieren-

den Myoblasten in drei distinkten Gruppen, und zwar einem ventralen, einem lateralen und einem dorsalen Cluster. Aus diesen Momentaufnahmen rekonstruierten sie, dass die nachfolgenden Zellfusionen nur innerhalb der jeweiligen Gruppen möglich seien, wobei der seltene Austausch einzelner Myoblasten zwischen den verschiedenen Gruppen nicht ganz ausgeschlossen werden konnte. Bei diesen Überlegungen wurde nicht berücksichtigt, dass jeweils zwei laterale und drei dorsale Muskelvorläufer zur Bildung einzelner Myoblasten-Cluster beitragen, was bereits eine intrasegmentale Myoblasten-Durchmischung zur Folge haben könnte. Außerdem waren alle imaginalen Myoblasten gleichartig markiert, weshalb keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Zusammensetzung der Myoblasten-Cluster gezogen werden konnten.

Durch die Behandlung von Larven im ersten und zweiten Stadium mit dem DNA-Synthese-Inhibitor Hydroxyuridin konnten BROADIE und BATE (1991) zeigen, dass die Ablation der ventralen Muskeln nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip erfolgte, während in der lateralen und dorsalen Muskelgruppe häufiger partielle Ablationen möglich waren: In der lateralen Gruppe fehlte meistens die Hälfte aller Muskeln und in der dorsalen Gruppe waren häufig entweder ein oder zwei Drittel der Muskeln ablatiert. Daraus schlossen sie, dass für die Differenzierung der verschiedenen Muskelgruppen nur sechs diskrete Gruppen von Vorläuferzellen – eine ventrale, zwei laterale und drei dorsale – nötig sind, die nicht durch die Zellen einer anderen Gruppe ersetzt werden können. Diese Vorläuferzellen entsprechen den Nachkommen der von BATE et al. (1991) beschriebenen, sechs permanent *twist*-exprimierenden Zellen pro Hemisegment.

FARRELL und KESHISHIAN (1999) führten Laser-Ablationsexperimente im dritten Larvenstadium durch. Nach der *in situ*-Ablation einzelner lateraler und dorsaler imaginaler Muskelvorläufer traten nur in seltenen Fällen korrespondierende Defekte in der adulten somatischen Muskulatur des Abdomens auf, während in vielen Fällen die erwarteten Defekte ausblieben und das Muster „gerettet“ wurde. Diese Rettungen traten nur dann auf, wenn nicht gleichzeitig auch die homologen Muskelvorläufer der benachbarten Hemisegmente mit ablatiert worden waren. Aus diesen experimentellen Befunden schlossen sie, dass der intersegmentale Myoblastenaustausch zwischen homologen Gruppen zur Rettung des Defekts führte.

Somit liegen zwei sich zumindest teilweise widersprechende Ergebnisse zu den Bildungsmechanismen der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens vor. Beide angewendeten Methoden sind aber auch kritisch bezüglich der hieraus gezogenen Aussagen zu bewerten: Die chemische Ablation proliferierender Zellen birgt den Nachteil, dass nicht gezielt adulte Muskelvorläuferzellen ablatiert werden können und somit die

resultierenden Defekte nicht zwangsläufig auf das alleinige Fehlen dieser Vorläufer zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu können bei der Laser-Ablation der filigranen imaginalen Muskelvorläufer einerseits Zellen übersehen werden, andererseits können bei diesem späten Ablationszeitpunkt auch Regenerationseffekte nicht ausgeschlossen werden.

Gegen die Etablierung von Muskelidentitäten in der Embryonal- und Larvalentwicklung spricht auch eine weitere Untersuchung: So transplantierten LAWRENCE und BROWER (1982) Teile von enzymatisch markierten Flügel-Imaginalscheiben in den Abdominalbereich unmarkierter Empfängerlarven und kontrollierten die entstandenen Klone im Adultstadium. Der Nachweis des Markers in den imaginalen abdominalen Muskeln offenbarte, dass die adepthelialen Zellen der Flügel-Imaginalscheibe an der Bildung dieses Gewebes beteiligt waren. Die ortsspezifische Differenzierung der thorakalen Myoblasten deutet darauf hin, dass diese im Wanderlarvenstadium noch nicht auf die Bildung definierter Muskeln determiniert sind. Da sie von den abdominalen Myoblasten als Fusionspartner akzeptiert werden, scheint auch deren Determinationsprozess noch nicht abgeschlossen zu sein.

4.8.2 Die Analyse der Myoblasten-Determination

Nachdem mit Hilfe der GAL4/UAS-Transplantationstechnik gezeigt werden konnte, dass klonale Verwandtschaften bei der Fusion imaginaler abdominaler Myoblasten keine Rolle spielen (siehe Kapitel 4.8.1), sollten weitere Analogien zur larvalen Myogenese überprüft werden. Über die Differenzierung der larvalen somatischen Muskulatur ist bekannt, dass durch lokale Spezifikationsprozesse, laterale Inhibition und asymmetrische Zellteilungen Muskelgründerzellen (*muscle founder cells*) determiniert werden (Übersicht bei BAYLIES et al., 1998; siehe Kapitel 1.2). Diese besitzen die erforderliche genetische Information zur Bildung eines individuellen larvalen Muskels und zeichnen sich unter anderem durch ihre *dumbfounded* (*duf*)-Expression aus (RUIZ-GOMEZ et al., 2000). Für die imaginale Thoraxmuskulatur konnte gezeigt werden, dass in einigen adepthelialen Zellen der Flügel-Imaginalscheibe und somit in Vorläuferzellen der späteren direkten Flugmuskulatur eine pupale *dumbfounded*-Expression beobachtet werden kann (KOZOPAS und NUSSE, 2002). Weiterhin wurde von GHAZI et al. (2000) und BERNARD et al. (2003) nachgewiesen, dass das Muskelidentitätsgen *apterous* (*ap*) während der Metamorphose in bestimmten imaginalen Myoblasten exprimiert wird und essentiell für die Differenzierung der direkten Flugmuskulatur ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die genetische Determination von Muskelgründerzellen – zumindest für einen Teil der thorakalen Myoblasten – analog zur embryonalen Myogenese erfolgt.

Um zu überprüfen, ob auch während der imaginalen Myogenese der abdominalen somatischen Muskulatur wichtige Schlüsselgene der larvalen Myogenese reaktiviert werden, wurden entsprechende *GFP*-Reporterlinien während der Metamorphose untersucht (siehe Kapitel 3.7.4). In Anlehnung an die oben genannten Studien wurde die abdominale *ap*- und *rP298*-Expression in verschiedenen Pupalstadien überprüft. Für die *enhancer trap*-Linie *rP298-lacZ* konnte die *lacZ*-Expression unter anderem in den Muskelgründerzellen nachgewiesen werden (KLÄMBT et al., 1991; NOSE et al., 1998). Die von RUIZ-GOMEZ et al. (2000) durchgeführte Analyse der P-Element-Insertion ergab, dass das Expressionsmuster dieser Linie die Expression des Gens *dumbfounded* widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Nachkommen aus der Kreuzung *rP298-GAL4* x *UAS-GFP* untersucht; aufgrund der vorausgegangenen Überlegungen sollte die Expression des *GFP*-Reportergens der *dumbfounded*-Expression entsprechen.

Es zeigte sich, dass das Gen *apterous* zu keinem postembryonalen Zeitpunkt im Abdomen exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu erfolgte die *rP298*-Expression in einem sehr speziellen räumlich-zeitlichen Muster (siehe Abbildung 37): In älteren Puppen konnte das Genprodukt eindeutig in sich differenzierenden dorsalen und ventralen Muskeln nachgewiesen werden. Die Rückverfolgung dieses Musters ergab, dass das Reportergen *GFP* bereits 24 h APF in drei Nerven-assoziierten Zellgruppen pro abdominalen Hemisegment exprimiert wird. Diese konnten durch den Vergleich mit den Beschreibungen von CURRIE und BATE (1991) als dorsales, laterales und ventrales Myoblasten-Cluster identifiziert werden. Somit scheint das Gen *dumbfounded* auch während der imaginalen Myogenese der abdominalen somatischen Muskulatur in einem Teil der imaginalen Myoblasten reaktiviert zu werden. Während die kontinuierliche *rP298*-Expression in der sich bildenden dorsalen und ventralen Muskulatur auf dessen Notwendigkeit für die fortschreitenden Fusionsprozesse hindeutet, bleibt seine Funktion für die laterale Muskulatur unklar. In dieser Muskelgruppe kann nur eine initiale *rP298*-Expression in den unfusionierten Myoblasten detektiert werden; ob seine Expression in der weiteren Entwicklung stoppt oder das Genprodukt in den feinen Muskelfasern unter die Nachweisgrenze ausdünnert, konnte mit Hilfe der Fluoreszenz-Beobachtung nicht entschieden werden. Ungewöhnlich war zudem die Beobachtung, dass die *rP298*-Expression ab 54,5 h APF auch in den persistierenden larvalen Muskeln nachgewiesen werden kann. Untersuchungen von ROY und VIJAYRAGHAVAN (1999) zeigen, dass im Abdomen die Fusion einzelner imaginaler Myoblasten mit larvalen temporären Muskeln möglich ist. Daher wäre es denkbar, dass die larvalen Muskeln den verbliebenen imaginalen Myoblasten ihre Fusionsbereitschaft in Form einer *dumbfounded*-Expression zeigen.

4.9 Die Herkunft des adulten Fettkörpers

Während die Entstehung des larvalen Fettkörpers eingehend untersucht wurde (ABEL et al., 1993; SAM et al., 1996; siehe Kapitel 1.4), ist die Herkunft des adulten Fettkörpers bislang ungeklärt. Es ist nur bekannt, dass der adulte Fettkörper aus zwei verschiedenen Gewebetypen besteht (MILLER, 1950; RIZKI, 1978b): Während es sich bei den tiefen Fettzellen (*deep fat*) um kurzfristig persistierende larvale Fettkörperzellen handelt, sollen die peripheren Fettzellen (*peripheral fat masses*) *de novo* aus einer bisher unbekanntem Anlage entstehen. Untersuchungen von LAWRENCE und JOHNSTON (1986) an wenigen Tagen alten Mosaik-Imagines ergaben, dass der adulte Fettkörper einen mesodermalen Ursprung hat. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht unterschieden, ob es sich um Zellen des tiefen oder des peripheren Fetts – und somit um persistierende larvale oder neu gebildete adulte Fettkörperzellen – handelt.

Mit der Nutzung fluoreszenzmarkierter Spenderembryonen bestand die Möglichkeit, Transplantationsklone in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen (Transplantationsserien D, F, G, H und I). In der vorliegenden Arbeit sollten adulte Fettkörper-Klone mit ihren korrespondierenden larvalen Markierungen verglichen werden, um Aussagen über den Ursprung dieses Gewebes treffen zu können. Dabei zeigte sich, dass cell-lineage-Klone im eigentlichen adulten Fettkörper, nämlich den peripheren Fettzellen, nur in 14 von 371 untersuchten Imagines (=4%) nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 3.7.2). Im Wanderlarvenstadium hatten diese Empfänger eine Markierung in der larvalen somatischen Muskulatur (n=3), dem larvalen Fettkörper (n=2) und/oder dem Gonadenmesoderm (n=3). Die Überlappungen mit diesen mesodermalen Derivaten bekräftigen den Befund, dass auch der adulte Fettkörper mesodermalen Ursprungs ist. Außerdem widerlegen sie die Überlegung von KOCH (1945), wonach die peripheren Fettzellen aus den Oenocyten segregieren.

Da zwölf von 14 Empfängern eine larvale Fettkörper-Markierung aufwiesen, scheint der imaginale Fettkörper vom larvalen Fettkörper abzustammen. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von RIZKI (1978b), der durch die Verfolgung rot pigmentierter Granula auf die gelegentliche Inkorporation larvaler in adulte Fettkörperzellen schloss. Die zwei Klone, bei denen im Wanderlarvenstadium keine Fettkörper-Markierung zu beobachten war, können verschieden gedeutet werden: Entweder wurden sie bei der Larven-Untersuchung übersehen oder der adulte Fettkörper hat einen gänzlich anderen Ursprung.

Interessante Beobachtungen konnten auch zu den tiefen Fettzellen gemacht werden: Insgesamt wurden 25 cell-lineage-Markierungen in diesem Gewebe detektiert, von denen

18 in Form von histolysierten Fettkörper-Fragmenten vorlagen. Bei den restlichen sieben Fällen handelte es sich um nicht-sessile Fettkörperzellen, die aus zwei bis sechs Tage alten Imagines stammten. Somit wird der larvale Fettkörper nicht – wie von WIGGLESWORTH (1949), BUTTERWORTH (1972) und POSTLETHWAIT und JONES (1978) beschrieben – in den ersten vier Tagen nach dem Schlupf der Imago vollständig abgebaut, sondern kann partiell bis zum sechsten Tag des Adultstadiums erhalten bleiben. Dieses könnte jedoch mit der Aufzuchttemperatur der Imagines zusammenhängen und auf Einzelfälle beschränkt sein. Die Tatsache, dass zahlreiche larvale Fettkörper-Markierungen gar nicht oder nur in fragmentierter Form redetektiert werden konnten, entspricht den oben genannten Untersuchungen.

4.10 Die Differenzierung des Gonadenmesoderms

Der mesodermale Ursprung des Gonadenmesoderms konnte bereits durch die morphologische Rückverfolgung dieses Gewebes (SONNENBLICK, 1941), Gynanderanalysen (SZABAD und NÖTHIGER, 1992) und Transplantationsklone (KLAPPER et al., 1998) gezeigt werden. Auch nach den Einzelzelltransplantationen der vorliegenden Arbeit überlappten die Markierungen in diesem Gewebe meist mit weiteren mesodermalen Derivaten (siehe Kapitel 3.7.7). Dabei bestätigte die Überlappung mit larvalen somatischen Muskeln der Abdominalsegmente 4 bis 6 den multisegmentalen Ursprung des Gonadenmesoderms. Außerdem stimmt die ermittelte Ausdehnung der Gonadenmesoderm-Anlage mit der beschriebenen Primordien-Verteilung in den Parasegmenten 10 bis 13 – und damit zwischen den Abdominalsegmenten 4 bis 8 – überein (BROOKMAN et al., 1992; BOYLE und DiNARDO, 1995; BOYLE et al., 1997; BROIHIER et al., 1998; DEFALCO et al., 2003). Alle Gonadenmesoderm-Markierungen gingen aus der von KLAPPER et al. (1998) beschriebenen Anlage zwischen 36 und 24% EL hervor.

Die 17 cell-lineage-Markierungen im Gonadenmesoderm betrafen in 14 Fällen männliche Wanderlarven. Diese geschlechtsspezifische Ungleichverteilung kann zum einen auf die geringe Stichprobenmenge zurückgeführt werden. Weiterhin muss aber auch berücksichtigt werden, dass entsprechende Markierungen in weiblichen Wanderlarven aufgrund der geringen Ovar-Größe schwerer zu detektieren sind. Dabei kommt erschwerend hinzu, dass die Zellen des Gonadenmesoderms nicht nur auf der Oberfläche der Keimzellen liegen, sondern auch zwischen den einzelnen Keimzellen eingebettet sind (JENKINS et al., 2003). Zwei doppelmarkierte Transplantationsklone deuten auf eine bisher unbekannte präpupale Fusion einzelner Gonadenmesodermzellen hin (siehe Kapitel 4.6.1).

Da bekannt war, dass aus dem larvalen Gonadenmesoderm die imaginalen Hüllgewebe der Ovarien und Testis hervorgehen (MAHOWALD und KAMBYSELLIS, 1980; LINDSLEY und TOKUYASU, 1980; FULLER, 1993), wurden entsprechend markierte Empfänger intensiv erneut im Adultstadium untersucht. Dabei konnte eine korrespondierende Markierung nur in vier der Metamorphose überlebenden Männchen detektiert werden, während in zwei weiteren Männchen und einem Weibchen kein Klon in einem dieser Gewebe nachgewiesen werden konnte. Für diesen Befund gibt es verschiedene Interpretationen: Möglicherweise wurde die Markierung in der Larve falsch interpretiert oder in der Imago übersehen. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die markierten Zellen während der Metamorphose abgebaut wurden. Bei allen erfolgreichen Redetektionen waren stets einzelne Pigmentzellen markiert, die aufgrund ihres großen flachen Cytoplasmas (STERN, 1941) leicht entdeckt und identifiziert werden konnten. In einem Fall erstreckte sich die Markierung auf zwei benachbarte Pigmentzellen, wobei zusätzlich die Expression des Syncytien-Markers beobachtet werden konnte. Obwohl in den einzelnen Pigmentzellen jeweils nur ein Zellkern identifiziert werden konnte, kann ein bislang unbekannter cytoplasmatischer Zusammenschluss dieser Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Ziel der Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm war die Untersuchung der Ovar-Hüllgewebe: Da bereits bekannt war, dass die Epithelial- und Peritonealhülle aus einem gazeartigen Netzwerk aus Muskelfasern bestehen (MILLER, 1950; SANDBORN et al., 1967; KING, 1970), sollten mit Hilfe des GAL4/UAS-Transplantationsystems die zelluläre Organisation und die klonale Zusammensetzung beider Gewebe überprüft werden. Obwohl insgesamt 1167 Einzelzelltransplantationen zwischen 36 und 24% EL – und somit innerhalb der von KLAPPER et al. (1998) beschriebenen Gonadenmesoderm-Anlage – durchgeführt wurden, konnten nur drei Klone im weiblichen Gonadenmesoderm erzielt werden. Zudem verlief der Klonnachweis in der einzigen die Metamorphose überlebenden Empfängerin aus bisher unbekanntem Grund negativ. Somit scheint die Einzelzelltransplantationstechnik aufgrund ihrer geringen Markierungswahrscheinlichkeit nicht zur Untersuchung dieser Gewebe geeignet zu sein.

4.11 Die Herkunft der Ovidukt Muskulatur

Bei der Untersuchung der adulten Empfänger (Transplantationsserien D, F, G, H und I) wurden in sechs Fällen Markierungen in der circulären Ovidukt Muskulatur entdeckt (siehe Kapitel 3.7.8). NEWBY (1942) konnte für *Drosophila virilis* zeigen, dass sich die Muskeln der Ausführgänge und Anhangsdrüsen aus den adepthelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe differenzieren. Auch in der Genital-Imaginalscheibe von *Drosophila melanogaster*

konnten adeptitheliale Zellen identifiziert werden (URSPRUNG, 1972; LAUGE, 1982), für die aufgrund von *in vivo*-Kultur-Experimenten (NÖTHIGER und OBERLANDER, 1967) auf eine muskuläre Differenzierung geschlossen wurde. Außerdem befinden sich diese adeptithelialen Zellen in der anterioren Region der Imaginalscheibe, aus der im Zuge der pupalen Eversion die inneren Genitalien gebildet werden (DOBZHANSKY, 1930). Somit wären bei den vorliegenden Transplantationsklonen korrespondierende Markierungen in der Genital-Imaginalscheibe zu erwarten gewesen – diese konnten jedoch in keinem Fall beobachtet werden. Da sich die adeptithelialen Zellen nur auf einen kleinen Bereich der Genital-Imaginalscheibe beschränken, sind Markierungen in diesem Gewebe wahrscheinlich übersehen worden. In den korrespondierenden Wanderlarven ergab sich außerdem kein Hinweis auf einen anderen Ursprung der Ovidukt-muskulatur.

Die Klone in diesem Gewebe entstammten allesamt dem schmalen Transplantationsbereich zwischen 29 und 26% EL. Dabei kann aufgrund der geringen Klonhäufigkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Anlage in Wirklichkeit größer ausfällt; andererseits ist für die geringe Zahl der adeptithelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe auch nur eine kleine Anlage zu erwarten. Diese muss jedoch mehrere klonal nicht verwandte Zellen umfassen, da in vielen markierten Muskeln die Expression des Syncytien-Markers beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.6.1). Weil in den Empfängern mesodermale Derivate wie die larvale somatische Muskulatur, imaginale Muskelvorläufer und der Fettkörper markiert waren, kann die Anlage der adeptithelialen Zellen im zellulären Blastodermstadium noch nicht determiniert sein. Außerdem bestätigen diese Komarkierungen den mesodermalen Ursprung dieser Zellen. Auch für die adeptithelialen Zellen der Thorax-Imaginalscheiben konnte bereits die mesodermale Abstammung sowie die späte Determination nach der zweiten postblastodermalen Mitose gezeigt werden (HOLZ et al., 1997).

In der vorliegenden Untersuchung wurden nur Markierungen in Muskeln der weiblichen Genital-Ausführgänge gefunden; entsprechende Markierungen wären jedoch auch mit der gleichen Häufigkeit in männlichen Empfängern zu erwarten gewesen. Diese geschlechtsspezifische Ungleichverteilung liegt wahrscheinlich in der geringen Stichprobenmenge begründet.

4.12 Klone in weiteren Geweben

4.12.1 Klone in den Thorax-Imaginalscheiben

Für die Flügel-Imaginalscheiben wurden verschiedene cytoplasmatische Zellausläufer beschrieben, die dem Austausch von Positionsinformationen dienen sollen; bei diesen handelt es sich um Cytoneme (RAMIREZ-WEBER und KORNBURG, 1999) und *translumenal extensions* (GIBSON und SCHUBIGER, 2000). Um zu überprüfen, ob diese Zell-Zell-Kontakte auch die transitorische Fusion einzelner Zellen zur Folge haben, wurden 171 Mehrzelltransplantationen im Anlagenbereich der thorakalen Imaginalscheiben durchgeführt (Transplantationsserie E, siehe Kapitel 3.6.2). Aus diesen gingen 68 cell-lineage-Klone hervor, von denen nur zwei eine Markierung im Bereich der Imaginalscheiben aufwiesen. In einem Fall wurde dort zusätzlich der Syncytien-Marker koexprimiert. Die betroffenen Imaginalscheiben konnten im Rahmen der *in vivo*-Untersuchungen nicht näher identifiziert werden, da sie teilweise von umliegenden Geweben überdeckt wurden. Nach der Präparation verlief der Marker-Nachweis erfolglos, was vermutlich auf die fortschreitende Fluoreszenzabschwächung zurückzuführen ist.

Nach vergleichbaren Einzelzelltransplantationen fanden MEISE (1992) in 50 von 334 Klonen (=15%) und BOSSINGER (2002) in 13 von 50 Klonen (=26%) eine cell-lineage-Markierung in den Thorax-Imaginalscheiben. Da in den vorliegenden Untersuchungen mehrere Zellen transplantiert wurden, wäre eine noch höhere Markierungshäufigkeit zu erwarten gewesen. Allerdings wäre es denkbar, dass die Expression des cell-lineage-Markers DsRed gewebespezifisch variiert und in den kleinen diploiden Zellen der Imaginalscheiben meist unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Da in den meisten Fällen auf die Präparation der Wanderlarven verzichtet wurde, kann dieser Umstand im Nachhinein nicht mehr geklärt werden.

Die DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode scheint somit nicht für die Untersuchung von Imaginalscheiben und insbesondere nicht für den Nachweis transitorischer Zellfusionen geeignet zu sein.

4.12.2 Klone in der *transverse nerve exit glia*

Sowohl mit der lacZ/GFP- wie auch mit der DsRed/GFP-Doppelmarkierungsmethode (Transplantationsserien A, F, G, H und I) konnten reine cell-lineage-Markierungen in Gliazellen detektiert werden, die immer mit Markierungen in der somatischen Muskulatur

überlappten (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.7.5). Diese Glia-Klone erstreckten sich stets von der dorsalen Mittellinie des Ventralganglions bis zur abdominalen somatischen Muskulatur und konnten aufgrund ihrer Morphologie und ihrer mesodermalen Herkunft als *transverse nerve exit glia* (= *TN exit glia*; nach GORCZYCA et al., 1994) oder *dorsal-median cells* (= *DM cells*; nach CHIANG et al., 1994) identifiziert werden. Aus der klonalen Überlappung mit (meist ventralen) somatischen Muskeln kann geschlossen werden, dass beide Gewebe aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervorgehen. Die gemeinsame cell-lineage der *TN exit glia* und der ventralen somatischen Muskulatur konnte bereits durch DiI-Einzelzellmarkierungen von LÜER et al. (1997) bestätigt werden.

Bei den Einzelzelltransplantationen mit dem DsRed/GFP-Doppelmarkierungssystem (Transplantationsserien F bis I) konnte der cell-lineage-Marker in acht von 44 Glia-Klonen in nur einem der beiden bilateralen Gliaschenkel detektiert werden. Andere Untersuchungen, wie Genexpressionsstudien (LÜER et al., 1997), Einzelzelltransplantationen (BEER et al., 1987) und DiI-Einzelzellmarkierungen (LÜER et al., 1997), konnten jedoch zeigen, dass jedes segmentale Paar von *DM cells* aus einer gemeinsamen mesodermalen Vorläuferzelle hervorgeht. Daher sollte der cell-lineage-Marker in den Transplantationsklonen der vorliegenden Arbeit immer simultan in beiden *DM cells* und somit auch in beiden Gliaschenkeln nachzuweisen sein. Die beobachtete Beschränkung auf eine Zelle könnte zwei Ursachen haben: Entweder ist die *DsRed*-Expression in einer Tochterzelle aus bislang ungeklärten Gründen stark eingeschränkt oder diese Zelle ist nach der Teilung verloren gegangen. Gegen den Verlust einer Tochterzelle sprechen jedoch die Beobachtungen, dass sich die komplementäre *DM cell* ordnungsgemäß differenziert und die Larven keine sichtbaren Defekte aufweisen.

Nach den vergleichbaren Transplantationen von KLAPPER (1997) mit einer nucleär *lacZ*-exprimierenden Spenderlinie wurden nie Klone in der *TN exit glia* beschrieben. Es wäre jedoch möglich, dass Klone in diesem filigranen Gewebe bei der Präparation verloren gingen oder übersehen worden sind. Die relative Häufigkeit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Klone ist wahrscheinlich auf die Verwendung cytoplasmatisch exprimierter *in vivo*-Marker zurückzuführen und konnte in entsprechenden Transplantationsexperimenten von Elke Naffin (persönliche Mitteilung) bestätigt werden.

4.12.3 Klone in unbekanntem Strukturen

Sowohl nach den Einzelzell- als auch den Mehrzelltransplantationen konnten ausschließlich im Wanderlarvenstadium zahlreiche Klone in unbekanntem Strukturen detektiert werden (n=14; siehe Kapitel 3.5.1 bis 3.7). Diese konnten aufgrund von Gewebe-

überlappungen meist dem Mesoderm zugerechnet werden und exprimierten in 33 Fällen auch den Syncytien-Marker (siehe Kapitel 4.6.1 und 4.6.3). Aufgrund ihrer ungewöhnlichen und vielgestaltigen Morphologie konnten diese Klone keinem bekannten Gewebe zugeordnet werden. Es konnte auch nicht entschieden werden, ob es sich um bislang unbeschriebene Zellstrukturen oder transplantationsbedingte Artefakte handelt.

Nach vergleichbaren homotopen Einzelzelltransplantationen hing die Detektion unbekannter Strukturen von der verwendeten Spenderlinie ab: Wurde *lacZ* als cell-lineage-Marker verwendet, so konnten im Wanderlarvenstadium keine (HOLZ, 1997; KLAPPER, 1997) oder wenige (BOSSINGER (2002): einer von 77 Klonen (=1%); STRASSER (2002): vier von 721 Klonen (=0,5%)) nicht zuzuordnende Markierungen detektiert werden. Dabei wäre es denkbar, dass manche dieser unbekannt Klone bei der Präparation verloren gingen oder als Abfärbungen interpretiert wurden. Mit der Verwendung eines cytoplasmatisch exprimierten *GFP*-Markers (BOSSINGER, 2002) stieg der Anteil der nicht-identifizierten Gewebe bei der *in vivo*-Untersuchung der Wanderlarven: Nach Einzelzelltransplantationen konnten neun von 70 Markierungen (=13%) und nach Mehrzelltransplantationen sechs von 100 Markierungen (=6%) nicht eindeutig zugeordnet werden. Somit scheint die *in vivo*-Untersuchung fluoreszierender Spenderzellnachkommen generell häufiger zur Detektion unbekannter Strukturen zu führen.

4.13 Anlagenkartierung

Die Einzelzelltransplantationen im Rumpfmesoderm (Transplantationsserien F bis I) führten zu zahlreichen cell-lineage-Klonen in larvalen und imaginalen Geweben. Indem für alle markierten Gewebe retrospektiv der jeweilige Transplantationsbereich ermittelt wurde, konnte ein Anlagenplan für das Mesoderm bei 44 bis 23% EL und 0 bis 30% VD erstellt werden (siehe Abbildung 49). Da die larvalen Anlagen dieses Mesodermbereichs auch schon von KLAPPER et al. (1998) kartiert wurden, liegt ein Vergleich beider Anlagenpläne nahe. Dabei zeigte sich, dass in beiden Untersuchungen hauptsächlich Markierungen in der larvalen somatischen Muskulatur und dem Fettkörper detektiert werden konnten. Im Falle der Muskelklone konnten weiterhin die Überlappung benachbarter Muskel-Primordien sowie deren tendenziell konsekutive Abfolge gezeigt werden. Während die Anlage des Gonadenmesoderms in der Vergleichsstudie zwischen 32 und 22% EL kartiert wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit der Blastodermbereich zwischen 34 und 26% EL ermittelt werden. Diese geringfügigen Abweichungen können auf die geringen Markierungshäufigkeiten und somit auf die kleine Stichprobenmengen zurückgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten auch die Anlagen weiterer larvaler Gewebe kartiert werden: Dabei handelt es sich um die longitudinale und circuläre viscerale Muskulatur, die *TN exit glia* und verschiedene Gewebe des Dorsalgefäßes. In der Vergleichsstudie von KLAPPER et al. (1998) konnten nur wenige Markierungen in der visceralen Muskulatur und keine Klone in den anderen Geweben detektiert werden. Dieser Umstand ist vermutlich auf die ungleichmäßige Expression der von ihnen verwendeten *lacZ*-exprimierenden Spenderlinie und die Probleme des präparativen β -Galaktosidase-Nachweises zurückzuführen (siehe Kapitel 4.3).

Die genetische Fluoreszenz-Markierung der cell-lineage erleichterte nicht nur den Klonnachweis, sondern ermöglichte auch die Verfolgung der Transplantationsklone bis zum Adultstadium. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen konnten zusätzlich die Anlagen zweier imaginaler Gewebe, nämlich der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens und der adepithelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe, kartiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der eigentliche adulte Fettkörper, also das periphere Fett, vermutlich vom larvalen Fettkörper abstammt und somit dem gleichen Blastodermbereich entspringt.

5. Zusammenfassung

Um die klonale Zusammensetzung syncytialer Zellverbände untersuchen und simultan die Herkunft und Differenzierung larvaler und imaginaler Gewebe analysieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit homotope Einzelzell- und Mehrzelltransplantationen mit dem erweiterten GAL4/UAS-Transplantationssystem durchgeführt. Für diesen Ansatz war die zusätzliche Markierung der Spenderembryonen und somit der gesamten cell-lineage unabdingbar; diese erfolgte entweder über die Injektion des Farbstoffs 2000S RITC-Dextran oder genetisch. Durch die Etablierung einer *DsRed*-transgenen Spenderlinie konnten gleichzeitig die cell-lineage sowie die syncytiale Organisation *in vivo* und somit zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten untersucht werden. Auf diesem Wege waren Rückschlüsse auf die Metamorphose-Ereignisse und somit Aussagen zur Persistenz larvaler Gewebe und zur Differenzierung imaginaler Gewebe möglich.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal direkt gezeigt werden, dass mit Hilfe des GAL4/UAS-Transplantationssystems tatsächlich der selektive Nachweis von Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft möglich ist. Die Fusion von klonal nicht-verwandten Zellen wurde für die larvale und imaginale somatische Muskulatur, die longitudinale und circuläre viscerale Muskulatur, verschiedene Dorsalgefäß-Gewebe (und zwar Cardialzellen, *alary muscles* und elastische Filamente), Teile des Gonadenmesoderms, die Pigmentzellen der Hoden, die Ovidukt-muskulatur und muskel-ähnliche Strukturen nachgewiesen.

Durch die gleichzeitige Markierung von Syncytien unterschiedlicher klonaler Herkunft und aller Nachkommen der transplantierten Zelle konnte die Myogenese der imaginalen somatischen Muskulatur des Abdomens genauer untersucht werden. Dabei wurde von der Ausdehnung der imaginalen Muskel-Klone auf die regelmäßige inter- und intrasegmentale Durchmischung der imaginalen Myoblasten geschlossen und somit die gängige Restriktionstheorie (BATE et al., 1991; CURRIE und BATE, 1991; BROADIE und BATE, 1991) widerlegt. Weiterhin ergab die Untersuchung verschiedener Reporter-genkonstrukte, dass das Gen *dumbfounded* (*duf*) während der Metamorphose in einigen Myoblasten und den sich bildenden imaginalen Muskeln exprimiert wird. Neben der Fusion nicht-verwandter Myoblasten scheint also auch das Prinzip der genetischen Determination verschiedener

Myoblasten-Populationen analog (und was die genetische Identität der beteiligten Myoblasten betrifft, sogar homolog) zur larvalen Myogenese zu erfolgen.

Die wiederholte Untersuchung der Transplantationsklone im Wanderlarven- und Adultstadium ergab, dass die longitudinale und circuläre viscerale Muskulatur, verschiedene Dorsalgefäß-Gewebe (nämlich Cardialzellen, *alary muscles*, Pericardialzellen und elastische Filamente) und einige Neurone die Metamorphose nahezu unverändert überdauern. Weiterhin konnte durch diese Analysen darauf geschlossen werden, dass der adulte Fettkörper aus dem larvalen Fettkörper hervorgeht.

Aus den Transplantationsdaten der Einzelzelltransplantationen wurde ein Blastoderm-Anlagenplan für das Rumpfmesoderm von 44 bis 23% Eilänge erstellt. Dabei war es möglich, neben zahlreichen larvalen Geweben (wie der larvalen somatischen Muskulatur, dem Fettkörper, den fusionskompetenten Myoblasten der longitudinalen visceralen Muskulatur, der circulären visceralen Muskulatur, dem Dorsalgefäß und der *transverse nerve exit glia*) auch imaginale Strukturen (und zwar die imaginale somatische Muskulatur, das Gonadenmesoderm und die adepithelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe) zu kartieren. Es zeigte sich, dass ein Großteil der Mesodermderivate aus der gesamten Untersuchungsregion entstehen kann, während die Anlage des Gonadenmesoderms auf den Bereich von 34 bis 26% EL und die der adepithelialen Zellen der Genital-Imaginalscheibe auf die Region von 29 bis 26% EL beschränkt ist. Da nie exklusive Markierungen in einem Gewebe gefunden wurden, scheinen die untersuchten Mesodermderivate eine gemeinsame cell-lineage zu besitzen und im zellulären Blastodermstadium noch nicht gewebespezifisch determiniert zu sein.

6. Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APF	<i>After Puparium Formation</i>
aqua bidest.	aqua bidestilatum
bp	Basenpaare
c	Präfix centi-
°C	Grad Celsius
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
circ. VM	circuläre viscerale Muskulatur
<i>da</i>	Promoter des <i>daughterless</i> -Gens aus <i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsRed	<i>Red Fluorescent Protein</i> aus <i>Discosoma sp.</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EL	Eilänge
et al.	et alii
F ₁ / F ₂ / F ₃ / F ₄	Filialgeneration 1/2/3/4
FK	Fettkörper
g	Gramm
G ₀	Generation Null / Startgeneration
<i>GAL4</i>	Transkriptionsfaktor aus <i>S. cerevisiae</i> mit UAS-Zielsequenz
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> aus <i>Aequorea victoria</i>
h	Stunde(n)
IM	Imaginaler Muskelvorläufer
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K ₃ [Fe(CN ₆)]	Kaliumhexacyanoferrat
K ₄ [Fe(CN ₆)] · 3H ₂ O	Kaliumhexacyanoferrat-Trihydrat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat
l	Liter
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-codierendes Gen aus <i>Escherichia coli</i>

long. VM	longitudinale viscerale Muskulatur
M	Molarität
m	Meter; Präfix milli-
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
μ	Präfix mikro-
min	Minute
N	Normalität
n	Präfix nano-
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	negativer Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PNS	Peripheres Nervensystem
2000S RITC-Dextran	Rhodamin B Isothiocyanat-Dextran; Molekülgewicht: 2.000.000
RNase	Ribonuklease
SM	Somatische Muskulatur
<i>Sma</i> I	Restriktionsendonuclease
Sol A / B / C	<i>Solution</i> A, B oder C
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer; Laufpuffer für Agarose-Gelelektroph.
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i> aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UV	Ultraviolettes Licht
VD	dorsoventrale Ausrichtung
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
<i>Xba</i> I	Restriktionsendonuclease
xg	Beschleunigung am Normort (9,81 m/s ²)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-Galactosid
ZNS	Zentrales Nervensystem
%	Prozent
‰	Promille

7. Literaturverzeichnis

ABEL, T., MICHELSON, A.M., MANIATIS, T. (1993) A *Drosophila* GATA family member that binds to Adh regulatory sequences is expressed in the developing fat body. *Development* 119, 623-633.

ALVAREZ, A.D., SHI, W., WILSON, B.A., SHEATH, J.B. (2003) *Pannier* and *pointedP2* act sequentially to regulate *Drosophila* heart development. *Development* 130, 3015-3026.

ARTERO, R.D., CASTANON, I., BAYLIES, M.K. (2001) The immunoglobulin-like protein *Hibris* functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* 128, 4251-4264.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMANN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (eds) (1993) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.

AZPIAZU, N., FRASCH, M. (1993) *tinman* and *bagpipe* - two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev* 7, 1325-1340.

AZPIAZU, N., LAWRENCE, P.A., VINCENT, J.P., FRASCH, M. (1996) Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev* 10, 3183-3194.

BAINBRIDGE, S.P., BOWNES, M. (1981) Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morph* 66, 57-80.

BAIRD, G.S., ZACCHARIAS, D.A., TSIEN, R.Y. (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS* 97 (22), 11984-11989.

BATE, M. (1990) The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110, 791-804.

BATE, M., RUSHTON, E., CURRIE, D.A. (1991) Cells with persistent *twist* expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 113, 79-89.

BATE, M. (1993) The mesoderm and its derivatives. In: Bate, M, Martinez Arias, A. (eds.): *The Development of Drosophila melanogaster*. Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1013-1090.

BATE, M., BAYLIES, M. (1996) Intrinsic and extrinsic determinants of mesodermal differentiation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* 7, 103-111.

BAYLIES, M.K., MARTINEZ ARIAS, A., BATE, M. (1995) *wingless* is required for the formation of a subset of muscle founder cells during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 121, 3829-3837.

BAYLIES, M.K., BATE, M. (1996) *twist*: A myogenic switch in *Drosophila*. *Science* 272, 1481-1484.

BAYLIES, M.K., BATE, M., RUIZ-GOMEZ, M (1997) The specification of muscle in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* LXII, 385-393.

BAYLIES, M.K., BATE, M., GOMEZ, M.R. (1998) Myogenesis: A view from *Drosophila*. *Cell* 93, 921-927.

BEER, J., TECHNAU, G.M., CAMPOS-ORTEGA, J.A. (1987) Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. IV. Commitment and proliferative capabilities of mesodermal cells. *Roux's Arch Dev Biol* 196, 222-230.

BERNARD, F., LALOUETTE, A., GULLAUD, M., JEANTET, A.Y., COSSARD, R., ZIDER, A., FERVEUR, J.F., SILBER, J. (2003) Control of *apterous* by *vestigial* drives indirect flight muscle development in *Drosophila*. *Dev Biol* 260, 391-403.

BIRNBOIM, H.C., DOLLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

BLOEMBERG, G.V., WIJFJES, A.H.M., LAMERS, G.E.M., STURMAN, N., LUGTENBERG, B.J.J. (2000) Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *MPMI* 13 (11), 1170-1176.

BODENSTEIN, D. (1950) The postembryonic development of *Drosophila*. In: Demerec, M. (ed.): Biology of *Drosophila*. John Wiley & Sons, New York, pp. 275-367.

BODMER, R. (1993) The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 118, 719-729.

BOSSINGER, B. (2002) Untersuchung der Zellabstammung und Kartierung der Anlagen im Mesoderm von *Drosophila melanogaster* durch homotope und heterotope Zelltransplantationen. Dissertation an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

BOUR, B.A., CHAKRAVARTI, M., WEST, J.M., ABMAYR, S.A. (2000) *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* 14, 1498-1511.

BOURGOUIN, C., LUNDGREN, S.E., THOMAS, J.B. (1992) *apterous* is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9, 549-561.

BOYLE, M., DINARDO, S. (1995) Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad. *Development* 121, 1815-1825.

BOYLE, M., BONINI, N., DINARDO, S. (1997) Expression and function of *clift* in the development of somatic gonadal precursors within the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124, 971-982.

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

BRAND, A.H., PERRIMON, N. (1994) *Raf* acts downstream of the EGF receptor to determine dorsoventral polarity during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* 8, 629-639.

BROADIE, K.S., BATE, M. (1991) The development of adult muscles in *Drosophila*: ablation of identified muscle precursor cells. *Development* 113, 103-118.

BROIHER, H.T., MOORE, L.A., VAN DOREN, M., NEWMAN, S., LEHMANN, R. (1998) *zfh-1* is required for germ cell migration and gonadal mesoderm development in *Drosophila*. *Development* 125, 655-666.

BROOKMAN, J., TOOSY, A., SHASHIDHARA, L., WHITE, R. (1992) The 412 retrotransposon and the development of gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development* 116, 1185-1192.

BUTTERWORTH, F.M., BODENSTEIN, D., KING, R.C. (1965) Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*: an experimental study of larval fat body. *J Exp Zool* 158, 141-154.

BUTTERWORTH, F.M. (1972) Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. V. Genetic and experimental studies of an extrinsic influence on the rate of cell death in the larval fat body. *Devl Biol* 28, 311-325.

BUTTERWORTH, F.M., LATENDRESSE, B.L. (1973) Quantitative studies of cytochemical and cytological changes during cell death in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 19, 1487-1499.

CAMPOS-ORTEGA, J.A., HARTENSTEIN, V. (1985) The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1-227.

CAMPOS-ORTEGA, J.A., HARTENSTEIN, V. (1997) The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. 2nd ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1-405.

CARMENA, A., BATE, M., JIMENEZ, F. (1995) *Lethal of scute*, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 2373-2383.

CARMENA, A., GISSELBRECHT, S., HARRISON, J., JIMENEZ, F., MICHELSON, A.M. (1998) Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* 12, 3910-3922.

CARMENA, A., BUFF, E., HALFON, M.S., GISSELBRECHT, S., JIMENEZ, F., BAYLIES, M.K., MICHELSON, A.M. (2002) Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Biol* 244, 226-242.

CAVENEY, S. (1976) The insect epidermis: A functional syncytium. In: Hepburn, H.R. (ed.): The insect integument. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, pp. 259-274.

CHEN, E.H., OLSON, E.N. (2001) Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* 1, 705-715.

CHIANG, C., PATEL, N.H., YOUNG, K.E., BEACHY, P.A. (1994) The novel homeodomain gene *buttonless* specifies differentiation and axonal guidance functions of *Drosophila* dorsal median cells. *Development* 120, 3581-3593.

CHURCH, R.B., ROBERTSON, F.W. (1966) Biochemical analysis of genetic differences in the growth of *Drosophila*. *Genet Res* 7, 383-407.

COHEN, S.M. (1993) Imaginal disc development. In: Bate, M., Martinez Arias, A. (eds): *The Development of Drosophila melanogaster*. Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 747-842.

COSTELLO, W.J., WHYMAN, R.J. (1986) Development of an indirect flight muscle in a muscle-specific mutant of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 118, 247-258.

CRIPPS, R.M., OLSON, E.N. (2002) Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev Biol* 246, 14-28.

CROSSLEY, C. (1978) The morphology and development of the *Drosophila* muscular system. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (eds): *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2B, Academic Press, London, pp. 499-560.

CROUSE, J., AMORESE, D. (1987) Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *FOCUS* 9-2, 3-5.

CROZATIER, M., VINCENT, A. (1999) Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to Notch signalling. *Development* 126, 1495-1504.

CURRIE, D.A., BATE, M. (1991) The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express *twist* and are associated with nerves. *Development* 113, 91-102.

CURTIS, N.J., RINGO, J.M., DOWSE, H.B. (1999) Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 240, 225-235.

DAVIDSON, A.E., BALCIUNAS, D., MOHN, D., SHAFFER, J., HERMANSON, S., SIVASUBBU, S., CLIFF, M.P., HACKETT, P.B., EKKER, S.C. (2003) Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the *Sleeping Beauty* transposon. *Dev Biol* 263 (2), 191-202.

DEFALCO, T.J., VERNEY, G., JENKINS, A.B., MCCAFFERY, J.M., RUSSELL, S., VAN DOREN, M. (2003) Sex-specific apoptosis regulates sexual dimorphism in the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev Cell* 5, 205-216.

DOBERSTEIN, S.K., FETTER, R.D., MEHTA, A.Y., GOODMAN, C.S. (1997) Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol* 136 (6), 1249-1261.

DOBZHANSKY, TH. (1930) Studies on the intersexes and supersexes in *Drosophila melanogaster*. *Isv Bur Genet (Leningrad)* 8, 91-158.

DOHRMANN, C., AZPIAZU, N., FRASCH, M. (1990) A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev* 4, 2098-2111.

DUAN, H., SKEATH, J.B., NGUYEN, H.T. (2001) *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* 128, 4489-4500.

DUNIN BORKOWSKI, O.M., BROWN, N.H., BATE, M. (1995) Anterior-posterior subdivision and the diversification of the mesoderm in *Drosophila*. *Development* 121, 4183-4193.

DWORAK, H.A., CHARLES, M.A., PELLERANO, L.B., SINK, H. (2001) Characterization of *Drosophila hibris*, a gene related to human *nephrin*. *Development* 128, 4265-4276.

ELDER, H.Y. (1975) Muscle structure. In: Usherwood, P.N.R. (ed.): *Insect muscle*. Academic Press, New York, pp. 1-74.

FARRELL, E.R., KESHISHIAN, H. (1999) Laser ablation of persistent *twist* cells in *Drosophila*: muscle precursor fate is not segmentally restricted. *Development* 126, 273-280.

FERNANDES, J., BATE, M., VIJAYRAGHAVAN, K. (1991) Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* 113, 67-77.

FINLEY, K.R., DAVIDSON, A.E., EKKER, S.C. (2001) Three-color imaging using fluorescent proteins in living *Zebrafish* embryos. *BioTechniques* 31, 66-72.

FOE, V.A., ALBERTS, B.M. (1983) Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* 61, 31-70.

FOE, V.E. (1989) Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* 107, 1-22.

FOWLER, A.V., ZABIN, I. (1978) Amino acid sequence of beta-galactosidase. XI. Peptide ordering procedures and the complete sequence. *J Biol Chem* 253 (15), 5521-5525.

FRASCH, M., HOEY, T., RUSHLOW, C., DOYLE, H., LEVINE, M. (1987) Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *EMBO J* 6, 749-759.

FRASCH, M. (1995) Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal *Dpp* in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374, 464-467.

FRASCH, M. (1999) Intersecting signalling and transcriptional pathways in *Drosophila* heart specification. *Sem Cell Dev Biol* 10, 61-71.

FULLER, M.T. (1993) Spermatogenesis. In: Bate, M, Martinez Arias, A. (eds.): *The Development of Drosophila melanogaster*. Vol. I, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 71-147.

FURLONG, E.E., ANDERSEN, E.C., NULL, B., WHITE, K.P., SCOTT, M.P. (2001) Patterns of gene expression during *Drosophila* development. *Science* 293, 1629-1633.

GHAZI, A., ANANT, S., VIJAYRAGHAVAN, K. (2000) Apterous mediates development of direct flight muscles autonomously and indirect flight muscles through epidermal cues. *Development* 127, 5309-5318.

GIBSON, M.C., SCHUBIGER, G. (2000) Peripodial cells regulate proliferation and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 103, 343-350.

GOLDSTEIN, M.A., BURDETTE, W.J. (1971) Striated visceral muscle of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 134, 315-334.

GOLIC, K.G., LINDQUIST, S. (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59, 499-509.

GONG, Z., WAN, H., TAY, T.L., WANG, H., CHEN, M., YAN, T. (2003) Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 308 (1), 58-63.

GORCZYCA, M.G., PHILLIS, R.W., BUDNIK, V. (1994) The role of *tinman*, a mesodermal cell fate gene, in axon pathfinding during the development of the transverse nerve in *Drosophila*. *Development* 120, 2143-2152.

GROSS, L.A., BAIRD, G.S., HOFFMAN, R.C., BALDRIDGE, K.K., TSIEN, R.Y. (2000) The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS*, 97 (22), 11990-11995.

HALFON M.S., CARMENA, A., GISSELBRECHT, S., SACKERSON, C.M., JIMENEZ, F., BAYLIES, M.K., MICHELSON, A.M. (2000) Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* 103, 63-74.

HAN, Z., FUJIOKA, M, SU, M, LIU, M., JAYNES, J.B., BODMER, R. (2002) Transcriptional integration of competence modulated by mutual repression generates cell-type specificity within the cardiogenic mesoderm. *Dev Biol* 252, 225-240.

HAN, Z., BODMER, R. (2003) Myogenic cell fates are antagonized by Notch only in asymmetric lineages of the *Drosophila* heart, with or without cell division. *Development* 130, 3039-3051.

HARBECKE, R. (1985) Versuche zum Anlagenplan von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

HARBECKE, R., MEISE, M., HOLZ, A., KLAPPER, R., NAFFIN, E., NORDHOFF, V., JANNING, W. (1996) Larval and imaginal pathways in early development of *Drosophila*. *Int J Dev Biol* 40, 197-204.

HARTENSTEIN, V., TECHNAU, G.M., CAMPOS-ORTEGA, J.A. (1985) Fate-mapping in wild-type *Drosophila melanogaster*. III. A fate map of the blastoderm. *Roux's Arch Dev Biol* 194, 213-216.

HARTENSTEIN, V., JAN, Y.N. (1992) Studying *Drosophila* embryogenesis with P-*lacZ* enhancer trap lines. Roux's Arch Dev Biol 201, 194-220.

HASSAN, B.A., BERMINGHAM, N.A., HE, Y., SUN, Y., JAN, Y.N., ZOGHBI, H.Y., BELLEN, H.J. (2000) *atonal* regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. Neuron 25, 549-561.

HEIM, R., CUBITT, A.B., TSIEN, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. Nature 373, 663-664.

HERTWECK, H. (1931) Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* (Meigen). Z Wiss Zool 139, 559-663.

HEUSER, S. (1999) Transplantationen genetisch markierter Einzelzellen zur Analyse der klonalen Beziehungen mesodermaler Syncytien von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

HOLZ, A. (1997) Die Lokalisation der anterioren Mesodermanlagen und deren klonale Analyse im Blastodermstadium von *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

HOLZ, A., MEISE, M., JANNING, W. (1997) Aepithelial cells in *Drosophila melanogaster*: Origin and cell lineage. Mech Dev 62, 93-101.

HOLZ, A., BOSSINGER, B., STRASSER, T., JANNING, W., KLAPPER, R. (2003) The two origins of hemocytes in *Drosophila*. Development 130, 4955-4962.

HOOPER, J.E. (1986) Homeotic gene function in the muscles of *Drosophila* larvae. EMBO J 5, 2321-2329.

HOSHIZAKI, D.K., BLACKBURN, T., PRICE, C., GHOSH, M., MILES, K., RAGUCCI, M., SWEIS, R. (1994) Embryonic fat-cell lineage in *Drosophila melanogaster*. Development 120, 2489-2499.

HOTTA, Y., BENZER, S. (1972) Mapping of behaviour in *Drosophila* mosaics. Nature 240, 527-535.

ILLMENSEE, K. (1976) Nuclear and cytoplasmic transplantation in *Drosophila*. In: Lawrence, P.A. (ed.): Insect development, pp. 76-96.

JACOBSON, R.H., ZHANG, X.J., DUBOSE, R.F., MATTHEWS, B.W. (1994) Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. Nature 369 (6483), 761-766.

JAGLA, T., BELLARD, F., LUTZ, Y., DRETZEN, G., BELLARD, M., JAGLA, K. (1998) *ladybird* determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. Development 125, 3699-3708.

JAGLA, T., BIDET, Y., DA PONTE, J.P., DASTUGUE, B., JAGLA, J. (2002) Cross-repression interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in *Drosophila*. Development 129, 1037-1047.

JENKINS, A.B., MCCAFFERY, J.M., VAN DOREN, M. (2003) *Drosophila* E-cadherin is essential for proper germ cell-soma interaction during gonad morphogenesis. Development 130, 4417-4426.

KARESS, R.E., RUBIN, G.M. (1984) Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. Cell 38, 135-146.

KELLER, C.A., GRILL, M.A., ABMAYR, S.M. (1998) A role for nautilus in the differentiation of muscle precursors. Dev Biol 202, 157-171.

KIMURA, K.I., TRUMAN, J.W. (1990) Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. J Neurosci 10 (2), 403-411.

KING, R.C. (1970) Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, London, San Francisco, 1-227.

KLÄMBT, C., JACOBS, J.R., GOODMAN, C.S. (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.

KLAPPER, R. (1997) Einzelzelltransplantationen zur Erstellung eines Blastoderm-Anlagenplans für das abdominale Mesoderm und zur Analyse der klonalen Beziehungen mesodermaler Derivate von *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

KLAPPER, R., HOLZ, A., JANNING, W. (1998) Fate map and cell lineage relationships of thoracic and abdominal mesodermal anlagen in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* 71, 77-87.

KLAPPER, R. (2000) The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech Dev* 95, 47-54.

KLAPPER, R., HEUSER, S., STRASSER, T., JANNING, W. (2001) A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development* 128, 2517-2524.

KLAPPER, R., STUTE, C., SCHOMAKER, O., STRASSER, T., JANNING, W., RENKAWITZ-POHL, R., HOLZ, A. (2002) The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on *duf*, *sns* and *mbc*. *Mech Dev* 110, 85-96.

KLEMENZ, R., WEBER, U., GEHRING, W.J. (1987) The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 15 (10), 3947-3959.

KNIRR, S., AZPIAZU, N., FRASCH, M. (1999) The role of the NK-homeobox gene *slouch* (*S59*) in somatic muscle patterning. *Development* 126, 4525-4535.

KOCH, J. (1945) Die Oenocyten von *Drosophila melanogaster*. *Rev Suisse Zool* 52, 415-420.

KUMAR, N.M., GILULA, N.B. (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.

KUSCH, T., REUTER, R. (1999) Functions for *Drosophila brachyenteron* and *forkhead* in mesoderm specification and cell signalling. *Development* 126, 3991-4003.

LAIRD, D.W., JORDAN, K., THOMAS, T., QIN, H., FISTOURIS, P., SHAO, Q. (2001) Comparative analysis and application of fluorescent protein-tagged connexins. *Microsc Res Tech* 52, 263-272.

LANDGRAF, M., BAYLIES, M., BATE, M. (1999) Muscle founder cells regulate defasciculation and targeting of motor axons in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 9, 589-592.

LAUF, U., LOPEZ, P., FALK, M.M. (2001) Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins. *FEBS Letters* 498, 11-15.

LAUGE; G. (1982): Development of the genitalia and analia. In: Ransom, R. (ed): A handbook of *Drosophila* development. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 237-263.

LAUGHON, A., GESTELAND, R.F. (1984) Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene. *Mol Cell Biol* 4 (2), 260-267.

LAWRENCE, P.A., JOHNSTON, P. (1982) Cell lineage of the *Drosophila* abdomen: the epidermis, oenocytes and ventral muscles. *J Embryol Exp Morphol* 72, 197-208.

LAWRENCE, P.A., BROWER, D.L. (1982) Myoblasts from *Drosophila* wing discs can contribute to developing muscles throughout the fly. *Nature* 295, 55-57.

LAWRENCE, P.A., JOHNSTON, P. (1986) Observations on cell lineage of internal organs of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* 91, 251-266.

LAWRENCE, P.A., JOHNSTON, P. (1989) Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by *even-skipped* and *fushi tarazu*. *Development* 105, 761-767.

LAWRENCE, P.A. (1992) The making of a fly. The genetics of animal design. Blackwell Scientific Publications, London, 1-228.

LAWRENCE, P.A., BODMER, R., VINCENT, J.P. (1995) Segmental patterning of heart precursors in *Drosophila*. *Development* 121, 4303-4308.

LEPTIN, M., GRUNEWALD, B. (1990) Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.

LINDSLEY, D.L., TOKUYASU, K.T. (1980) Spermatogenesis. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (eds): The genetics and biology of *Drosophila*. Vol. 2D, Academic Press, London, pp. 225-294.

LINDSLEY, D.L., ZIMM, G.G. (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc., San Diego, 1-1133.

LOCKWOOD, W.K., BODMER, R. (2002) The patterns of *wingless*, *decapentaplegic* and *tinman* position the *Drosophila* heart. *Mech Dev* 114, 13-26.

LÜER, K., URBAN, J., KLÄMBT, C., TECHNAU, G.M. (1997) Induction of identified mesodermal cells by CNS midline progenitors in *Drosophila*. *Development* 124, 2681-2690.

MAGGERT, K., LEVINE, M., FRASCH, M. (1995) The somatic-visceral subdivision of the embryonic mesoderm is initiated by dorsal gradient thresholds in *Drosophila*. *Development* 121, 2107-2116.

MAHOWALD, A.P. (1963a) Electron microscopy of the formation of the cellular blastoderm in *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res* 32, 457-468.

MAHOWALD, A.P. (1963b) Ultrastructural differentiations during formation of the blastoderm in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Dev Biol* 8, 186-204.

MAHOWALD, A.P., KAMBYSELLIS, M.P. (1980) Oogenesis. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (eds): The genetics and biology of *Drosophila*. Vol. 2D, Academic Press, London, pp. 141-224.

MATZ, M.V., FRADKOV, A.F., LABAS, Y.A., SAVITSKY, A.P., ZARAIISKY, A.G., MARKELOV, M.L., LUKYANOV, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17, 969-973.

MEISE, M. (1987) Die Metamorphose der Malpighischen Gefäße von *Drosophila melanogaster*. Staatsexamensarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

MEISE, M. (1992) Cell-lineage ektodermaler Zellen und Lokalisation der Anlagen thorakaler Imaginalscheiben im frühen Embryo von *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

MEISE, M., JANNING, W. (1993) Cell lineage of larval and imaginal thoracic anlagen cells of *Drosophila melanogaster*, as revealed by single-cell transplantations. *Development* 118, 1107-1121.

- MEISE, M., JANNING, W. (1994) Localization of thoracic imaginal-disc precursor cells in the early embryo of *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* 48, 109-117.
- MENON, S.D., CHIA, W. (2001) *Drosophila* Rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell* 1, 691-703.
- MICHELSON, A.M., ABMAYR, S.M., BATE, M., MARTINEZ-ARIAS, A., MANIATIS, T. (1990) Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 4, 2086-2097.
- MIKKELSEN, L., SARROCCO, S., LUBECK, M., JENSEN, D.F. (2003) Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiol Lett* 223 (1), 135-139.
- MILLER, A. (1950) The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. In: Demerec, M. (ed.): *Biology of Drosophila*. John Wiley & Sons, New York, pp. 420-534.
- MIZUNO, H., SAWANO, A., ELI, P., HAMA, H., MIYAWAKI, A. (2001) Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* 40, 2502-2510.
- MOLINA, M.R., CRIPPS, R.M. (2001) Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells. *Mech Dev* 109, 51-59.
- MORGAN, T.H. (1930) The apparent inheritance of an acquired character and its explanation. *Am Nat*, Vol. 64, pp 97-114.
- NEWBY, W.W. (1942) VII. A study of intersexes produced by a dominant mutation in *Drosophila virilis*, Blanco stock. *Univ Texas Publ* 4228, 113-145.
- NÖTHIGER, R., OBERLANDER, H. (1967) Differentiation of pulsating regions in genital imaginal discs cultured *in vivo* (*Drosophila melanogaster*). *J Exp Zool* 164, 61-68.
- NÖTHIGER, R. (1972) The larval development of imaginal disks. In: Ursprung, H., Nöthiger, R. (eds): *The biology of imaginal disks*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1-34.

NOSE, A., ISSHIKI, T., TAKEICHI, M. (1998) Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development* 125, 215-223.

NÜSSELEIN-VOLHARD, C., WIESCHAUS, E., KLUDING, H. (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* 193, 267-282.

ORMÖ, M., CUBITT, A.B., KALLIO, K., GROSS, L.A., TSIEN, R.Y., REMINGTON, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.

OVERESCH, K. (1999) Vergleichende klonale Analyse der larvalen und imaginalen Darmmuskulatur bei *Drosophila melanogaster*. Staatsexamensarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

PARK, M., YAICH, L.E., BODMER, R. (1998) Mesodermal cell fate decisions in *Drosophila* are under the control of the lineage genes *numb*, *Notch* and *sanpodo*. *Mech Dev* 75, 117-126.

PARTHUN, M.R., JAEHNING, J.A. (1990) Purification and characterization of the yeast transcriptional activator GAL4. *J Biol Chem* 265 (1), 209-213.

PATEL, N.H., SNOW, P.M., GOODMAN, C.S. (1987) Characterization and cloning of Fascilin III: A glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975-988.

PATTERSON, G., DAY, R.N., PISTON, D. (2001) Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* 114 (5), 837-838.

PAULULAT, A., HOLZ, A., RENKAWITZ-POHL, R. (1999) Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev* 83, 17-26.

PHELPS, C.B., BRAND, A.H. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* 14, 367-379.

POODRY, C.A. (1980) Epidermis: Morphology and development. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (eds): *The genetics and biology of Drosophila*. Vol. 2D, Academic Press, London, pp. 443-488.

- POSTLETHWAIT, J.H., JONES, G.J. (1978) Endocrine control of larval fat body histolysis in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool* 203, 207-214.
- POULSON, D.F. (1950) Histogenesis, organogenesis, and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* Meigen. In: Demerec, M. (ed.): *Biology of Drosophila*. John Wiley & Sons, New York, pp. 168-274.
- PRASHER, D.C., ECKENRODE, V.K., WARD, W.W., PRENDERGAST, F.G., CORMIER, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- PROKOP, A., TECHNAU, G.M. (1991) The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development* 111, 79-88.
- RAMIREZ-WEBER, F.-A., KORNBERG, T.B. (1999) Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599-607.
- RAU, A., BUTTGEREIT, D., HOLZ, A., FETTER, R., DOBERSTEIN, S.K., PAULULAT, A., STAUDT, N., SKEATH, J., MICHELSON, A.M., RENKAWITZ-POHL, R. (2001) *rolling pebbles* (*rols*) is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development* 128, 5061-5073.
- REHORN, K.P., THELEN, H., MICHELSON, A.M., REUTER, R. (1996) A molecular aspect of hemotopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* 122, 4023-4031.
- RIECHMANN, V., IRION, U., WILSON, R., GROSSKORTENHAUS, R., LEPTIN, M. (1997) Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124, 2915-2922.
- RIECHMANN, V., REHORN, K.P., REUTER, R., LEPTIN, M. (1998) The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development* 125, 713-723.
- RIZKI, T.M. (1969) Genetics and evolution of a cell phenotype in *Drosophila*. *Jap J Genet* 44, Suppl. 1, 51-57.

RIZKI, T.M., RIZKI, R.M. (1970) The genetic basis of cell-pattern homology in *Drosophila* species. In: Hecht, M.K., Steere, W.C. (eds): Essays in evolution and genetics in honor of Theodosius Dobzhansky. pp. 289-298.

RIZKI, T.M., RIZKI, R.M. (1972) Developmental biology and genetics of adipose tissue of the *Drosophila* larva. Egypt J Genet Cytol 1, 173-188.

RIZKI, T.M. (1978a) The circulatory system and associated cells and tissues. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (eds): The Genetics and Biology of *Drosophila*. Vol. 2B, Academic Press, London, pp. 398-452.

RIZKI, T.M. (1978b) Fat body. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (eds): The Genetics and Biology of *Drosophila*. Vol. 2B, Academic Press, London, pp. 561-601.

ROBERTS, D.B. (1986) Basic *Drosophila* care and techniques. In: Roberts, D.B. (ed.): *Drosophila: a practical approach*. IRL Press Limited, Oxford, 1-38.

ROBERTSON, C.W. (1936) The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. J Morphol 59, 351-399.

ROY, S., VIJAYRAGHAVAN, K. (1999) Muscle pattern diversification in *Drosophila*: the story of imaginal myogenesis. BioEssays 21, 486-498.

RUANGVORAVAT, C.P., LO, C.W. (1992) Restrictions in gap junctional communication in the *Drosophila* larval epidermis. Dev Dyn 193, 70-82.

RUBIN, G.M., SPRADLING, A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. Science 218, 348-353.

RUGENDORFF, A., YOUNOSHI-HARTENSTEIN, A., HARTENSTEIN, V. (1994) Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. Roux's Arch Dev Biol 203, 266-280.

RUIZ-GOMEZ, M., ROMANI, S., HARTMANN, C., JÄCKLE, H., BATE, M. (1997) Specific muscle identities are regulated by *Krüppel* during *Drosophila* embryogenesis. Development 124, 3407-3414.

RUIZ-GOMEZ, M., BATE, M. (1997) Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires *numb*. Development 124, 4857-4866.

RUIZ-GOMEZ, M., COUTTS, N., PRICE, A., TAYLOR, M.V., BATE, M. (2000) *Drosophila* Dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102, 189-198.

RUIZ-GOMEZ, M., COUTTS, N., SUSTER, M.L., LANDGRAF, M., BATE, M. (2002) *myoblast incompetent* encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development* 129, 133-141.

SAM, S., LEISE, W., HOSHIZAKI, D.K. (1996) The *serpent* gene is necessary for progression through the early stages of fat-body development. *Mech Dev* 60, 197-205.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANDBORN, E.B., DUCLOS, S., MESSIER, P.E., ROBERGE, J.J. (1967) Atypical intestinal striated muscle in *Drosophila melanogaster*. *J Ultrastruct Res* 18, 695-702.

SAN MARTIN, B., RUIZ-GOMEZ, M., LANDGRAF, M., BATE, M. (2001) A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo. *Development* 128, 3331-3338.

SCHÄFERLING, A. (1982) Die Malpighischen Gefäße von *Drosophila melanogaster*: Klonanalyse nach röntgeninduzierter mitotischer Rekombination bei 3 bis 7 Stunden alten Embryonen. Staatsexamensarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

SCHULTE, B. (1982) Die Malpighischen Gefäße von *Drosophila melanogaster*: Analyse der Blastodermanlage durch *red/pink-peach*-Klone bei Variation der Bestrahlungsdosis. Staatsexamensarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

SIMON, J.A., SUTTON, C.A., LOBELL, R.B., GLASER, R.L., LIS, J.T. (1985) Determinants of heat-shock induced chromosome puffing. *Cell* 40, 805-817.

SIMPSON, I., ROSE, B., LOEWENSTEIN, W.R. (1977) Size limit of molecules permeating the junctional membrane channel. *Science* 195, 294-296.

SIMPSON, P. (1983) Maternal-zygotische Geneinteraktionen während der Bildung des dorsoventralen Musters in *Drosophila* Embryonen. *Genetics* 105, 615-632.

SKEATH, J.B. (1999) At the nexus between pattern formation and cell type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *BioEssays* 21, 922-931.

SMITH, H.K., ROBERTS, I.J.H., ALLEN, M.J., CONNOLLY, J.B., MOFFAT, K.G., O'KANE, C.J. (1996) Inducible ternary control of transgene expression and cell ablation in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 206, 14-24.

SONNENBLICK, B.P. (1941) Germ cell movements and sex differentiation of the gonads in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 26, 373-381.

SONNENBLICK, B.P. (1950) The early embryology of *Drosophila melanogaster*. In: Demerec, M. (ed.): *Biology of Drosophila*. John Wiley & Sons, New York, pp. 62-167.

STAEHLING-HAMPTON, K., HOFFMANN, F.M., BAYLIES, M.K., RUSHTON, E., BATE, M. (1994) *dpp* induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* 372, 783-786.

STRASBURGER, M. (1932) Bau, Funktion und Variabilität des Darmtractus von *Drosophila melanogaster* Meigen. *Z Wiss Zool* 140, 539-649.

STRASSER, T. (2002) Klonale Analyse der posterioren Blastodermanlagen von *Drosophila melanogaster* unter besonderer Berücksichtigung der Malpighischen Gefäße. Dissertation an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

STRÜNKELNBERG, M., BONENGL, B., MODA, L.M., HERTENSTEIN, A., DE COUET, H.G., RAMOS, R.G.P., FISCHBACH, K.F. (2001) *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128, 4229-4239.

STRUHL, G., BASLER, K. (1993) Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72, 527-540.

SZABAD, J., NÖTHIGER, R. (1992) Gynandromorphs of *Drosophila* suggest one common primordium for the somatic cells of the female and male gonads in the region of abdominal segments 4 and 5. *Development* 115, 527-533.

TAYLOR, M.V. (2000) Muscle development: Molecules of myoblast fusion. *Curr Biol* 10, R646-R648.

TAYLOR, M.V. (2002) Muscle differentiation: how to cells become one. *Curr Biol* 12, R224-R228.

TECHNAU, G.M. (1986) Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. I. The method. *Roux's Arch Dev Biol* 195, 389-398.

TECHNAU, G.M., CAMPOS-ORTEGA, J.A. (1986a) Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. II. Commitment and proliferative capabilities of neuronal and epidermal cell progenitors. *Roux's Arch Dev Biol* 195, 445-454.

TECHNAU, G.M., CAMPOS-ORTEGA, J.A. (1986b) Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. III. Commitment and proliferative capabilities of pole cells and midgut progenitors. *Roux's Arch Dev Biol* 195, 489-498.

TECHNAU, G.M. (1987) A single cell approach to problems of cell lineage and commitment during embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 100, 1-12.

TEPASS, U., HARTENSTEIN, V. (1994) The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 161, 563-596.

THISSE, B., STOETZEL, C., EL MESSAL, M., PERRIN-SCHMITT, F. (1987) Genes of the *Drosophila* maternal dorsal group control the specific expression of the zygotic gene *twist* in presumptive mesodermal cells. *Genes Dev* 1, 709-715.

THISSE, B., STOETZEL, C., GOROSTIZA-THISSE, C., PERRIN-SCHMITT, F. (1988) Sequence of the *twist* gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J* 7, 2175-2183.

THISSE, C., PERRIN-SCHMITT, F., STOETZEL, C., THISSE, B. (1991) Sequence-specific transactivation of the *Drosophila twist* gene by the *dorsal* gene product. *Cell* 65, 1191-1201.

THOMASSON, W.A., MITCHELL, H.K. (1972) Hormonal control of protein granule accumulation in fat bodies of *Drosophila melanogaster* larvae. *J Insect Physiol* 18, 1885-1899.

TISSOT, M., GENDRE, N., STOCKER, R.F. (1998) *Drosophila* P[Gal4] lines reveal that motor neurons involved in feeding persist through metamorphosis. *J Neurobiol* 37, 237-250.

TISSOT, M., STOCKER, R.F. (2000) Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: the fate of neurons throughout the stages. *Prog Neurobiol* 62, 89-111.

TIX, S., BATE, M., TECHNAU, G.M. (1989) Pre-existing neuronal pathways in the leg imaginal discs of *Drosophila*. *Development* 107, 855-862.

TREMML, G., BIENZ, M. (1989) Homeotic gene expression in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos. *EMBO J* 8, 2677-2685.

TRUMAN, J.W., TAYLOR, B.J., AWAD, T.A. (1993) Formation of the adult nervous system. In: Bate, M, Martinez Arias, A. (eds.): *The Development of Drosophila melanogaster*. Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1245-1275.

TRUMAN, J.W. (1996) Metamorphosis of the insect nervous system. In: Gilbert, L.I., Tata, J.R., Atkinson, B.G (eds.): *Metamorphosis: Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. Academic Press, San Diego, pp 283-320.

TURNER, F.R., MAHOWALD, A.P. (1976) Scanning electron microscopy of *Drosophila* embryogenesis. 1. The structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm. *Dev Biol* 50, 95-108.

URSPRUNG, H. (1972) The fine structure of imaginal disks. In: Ursprung, H., Nöthiger, R. (eds): *Results and problems in cell differentiation*. Vol. 5, Springer Verlag, Berlin, pp. 93-107.

VAN DOREN, M., MATHEWS, W.R., SAMUELS, M., MOORE, L.A., BROIHIER, H.T., LEHMANN, R. (2003) *fear of intimacy* encodes a novel transmembrane protein required for gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Development* 130, 2355-2364.

VERKHUSHA, V.V., OTSUNA, H., AWASAKI, T., ODA, H., TSUKITA, S., ITO, K. (2001) An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J Biol Chem* 276 (32), 29621-29624.

VON GAUDECKER, B. (1963) Über den Formwechsel einiger Zellorganelle bei der Bildung der Reservestoffe im Fettkörper von *Drosophila*-Larven. *Z Zellforsch* 61, 56-95.

WARD, E.J., SKEATH, J.B. (2000) Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo. *Development* 127, 4959-4969.

WERTH, C. (1984) Die Embryogenese von *Drosophila melanogaster* unter besonderer Berücksichtigung der Malpighischen Gefäße. Staatsexamensarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

WESSING, A., EICHELBERG, D. (1978) Malpighian tubules, rectal papillae and excretion. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (eds): *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2C, Academic Press, London, pp. 1-42.

WIGGLESWORTH, V.B. (1949) The utilization of reserve substances in *Drosophila* during flight. *J Exp Biol* 26, 150-163.

WILLIAMS, D.W., SHEPHERD, D. (2002) Persistent larval sensory neurons are required for the normal development of the adult sensory afferent projections in *Drosophila*. *Development* 129, 617-624.

WODARZ, A., HINZ, U., ENGELBERT, M., KNUST, E. (1995) Expression of *Crumbs* confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 82, 67-76.

WU, X., GOLDEN, K., BODMER, R. (1995) Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene wingless. *Dev Biol* 169, 619-628.

XU, X., YIN, Z., HUDSON, J.B., FERGUSON, E.L., FRASCH, M. (1998) Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the *Drosophila* mesoderm. *Gebnes Dev* 12, 2354-2370.

YAU, D.M., YOKOYAMA, N., GOSHIMA, Y., SIDDIQUI, Z.K., SIDDIQUI, S.S., KOZOSA, T. (2003) Identification and molecular characterization of the G alpha12-Rho guanine nucleotide exchange factor pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* 100 (25), 14748-14753.

ZALOKAR, M., ERK, I. (1976) Division and migration of nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Microscopie Biol Cell* 25, 97-106.

Hiermit danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Janning herzlich für die Überlassung des Themas, für seine engagierte Betreuung dieser Arbeit und für die Freiräume, die er mir stets zugestanden hat.

Bei Dr. Robert Klapper bedanke ich mich für seine zahlreichen Anregungen, die prompte Hilfe bei optischen, technischen und fachliterarischen Problemen, die kritische Korrektur des Manuskripts und die Zubereitung köstlicher Mahlzeiten.

Ich danke Prof. Dr. Christian Klämbt und seiner Arbeitsgruppe für die Nutzung des konfokalen Mikroskops und die kritischen wissenschaftlichen Anregungen.

Bei Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl sowie ihrer Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Kooperation bei der Etablierung DsRed-transgener Fliegen. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Anne Holz, die neben der praktischen molekularbiologischen Anleitung auch die Zeit für wissenschaftliche Diskussionen fand.

Weiterhin gilt mein Dank Elke Naffin, die mir bei allen menschlichen und technischen Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihre Geduld bei der Puppen-Präparation, ihre Kenntnisse der *Drosophila*-Morphologie sowie die unermüdliche Bereitschaft zur Ergebnisdiskussion waren mir stets eine große Hilfe.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe – also Elke, Robert, Babsi, Thomas, Frank, Rita, Olli, Kai, Klaus, Uli und Silke – danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und die ständige Diskussionsbereitschaft auf wissenschaftlicher und privater Ebene. Neben der guten Frühstücks- und Futterküchenatmosphäre möchte ich dabei auch die netten Rothenberge-Abende erwähnen. Babsi Bossinger danke ich besonders für die kompetente Korrektur des Manuskripts.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Freunden, Bekannten und Verwandten, die mich immer an die wesentlichen Dinge des Lebens erinnern haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Katrin, Natascha und Pröhli, die seit zwanzig Jahren ein offenes Ohr für mich haben. Außerdem möchte ich mich bei Kerstin bedanken, die mich über mein gesamtes Biologiestudium begleitet hat und mit der ich viele (Mensa-) Erfahrungen teile.

Meinem Vater Udo Heuser und meiner Schwester Mellanie Heuser danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen und die viele wertvolle Kritik. Birgit Renzing und Marliese Thomas waren mir mit ihrer offenen und herzlichen Art würdige Ersatz-Mütter.

Ich danke Udo Seack, der Liebe meines Lebens, für seine Geduld sowie seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft – ohne seine Unterstützung hätte ich es nicht soweit gebracht.

Lebenslauf

- Name:** Sandra Heuser
- geboren:** am 02. Januar 1974 in Heessen (jetzt Hamm)
- Familienstand:** ledig
- Eltern:** Udo Heuser
Brigitte Heuser, geb. Walczuch
- Schulbildung:** Grundschule: von 1980 bis 1984 in Hamm
Gymnasium: von 1984 bis 1993 in Hamm
- Hochschulreife:** am 03. Juni 1993 in Hamm
- Studium:** Diplom-Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
von Oktober 1993 bis Juli 1999
- Promotionsstudiengang:** Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Prüfungen:** Diplom im Fach Biologie am 12. Juli 1999 an der WWU Münster
- Tätigkeiten:** 01.09.1999 bis 31.10.1999 wiss. Hilfskraft an der WWU Münster
03.01.2000 bis 29.02.2000 wiss. Hilfskraft an der WWU Münster
01.03.2000 bis 31.05.2000 wiss. Hilfskraft an der WWU Münster
01.06.2000 bis 31.05.2002 Promotionsstipendium (Graduiertenförderungsgesetz Nordrhein-Westfalen –GrFG NW –); parallel dazu:
01.06.2000 bis 31.05.2001 wiss. Hilfskraft an der WWU Münster
01.06.2001 bis 30.11.2001 wiss. Hilfskraft an der WWU Münster
01.06.2002 bis 31.08.2002 wiss. Hilfskraft an der WWU Münster
01.09.2002 bis 31.12.2003 wiss. Mitarbeiterin an der WWU Münster
04.01.2004 bis 31.03.2004 wiss. Hilfskraft an der WWU Münster
- Beginn der Dissertation:** am 01. September 1999 im Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik bei Prof. Dr. W. Janning

Münster, im Juni 2004