

**Funktionelle Bedeutung attraktiver und repulsiver  
Signalwege für die Entwicklung des  
neuromuskulären Systems von *Drosophila  
melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Christine Paul**  
aus Dinslaken

Düsseldorf, September 2022





aus dem Institut für funktionelle Zellmorphologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Hermann Aberle
2. Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2023



## Zusammenfassung

Für eine präzise Ausführung koordinierter Bewegungen ist eine fehlerfreie Innervierung der somatischen Muskulatur essentiell. Während der Embryonalentwicklung leiten Wegfindungsmoleküle die auswachsenden Motoaxone zu ihren Zielmuskeln in der Peripherie des sich entwickelnden Körpers. Im neuromuskulären System von *Drosophila melanogaster* sind zu diesem Zeitpunkt unterschiedliche Wegfindungsmoleküle exprimiert, die anziehende und abstoßende Signale vermitteln und durch diverse Rezeptoren interpretiert werden. In dieser Arbeit wurde das Zusammenspiel des repulsiven Uncoordinated-5 (Unc-5)/Netrin und dem attraktiven Beaten path 1a (Beat)/Sidestep (Side) Signaltransduktionswegs genauer beleuchtet. Ebenso wie deren Bedeutungen für die axonale Wegfindung. So führt ein simultaner Verlust von Unc-5 und Beat zu gravierenden Wegfindungsdefekten des segmentalen Nervs im Embryo und in der Larve, welches auf einen additiven Phänotyp schließen lässt. *Unc-5* und *beat* doppelmutante Larven zeigen sowohl eine drastische Veränderung des Kriechverhaltens, als auch gravierende lokomotorische Störungen bei der Ausführung der Fluchtrolle, eine Rolle über die Körperlängsachse, welche als stereotypische Fluchtreaktion vor einem Schmerzreiz gezeigt wird. Sowohl eine Reduktion der neuromuskulären Verbindungen im lateralen Muskelfeld, als auch ein Verlust der lateralen Muskeln an sich reduziert eine Ausführung des Fluchtverhaltens und verdeutlicht die Notwendigkeit einer fehlerfreien Innervierung der lateralen Muskulatur durch den segmentalen Nerv. Geleitet werden die Unc-5 exprimierenden Motoaxone des segmentalen Nervs unter anderem durch die Expression von Netrin auf der ventralen Muskulatur, da eine ektopische Präsentation des Moleküls auf den lateralen Muskeln die Abstoßung der Axone bestätigt. Zusätzlich bewirkt die ektopische Expression von Unc-5 in ventral projizierenden Motoaxonen ebenfalls eine Abstoßung von den ventralen, Netrin-exprimierenden Muskeln, wodurch es zu einer deutlichen Reduktion an neuromuskulären Verbindungen kommt. Auch konnte in einem Zell-Zell-Aggregations-Assay keine Interaktion der beiden Moleküle gezeigt werden, welches auf ein synergistisches Zusammenspiel beider Signalwege für die Wegfindung des segmentalen Nervs schließen lässt. Zusammengefasst deckt diese Arbeit neue Erkenntnisse über das hochkomplexe Zusammenspiel unterschiedlicher axonaler Wegfindungsmoleküle in *Drosophila* auf und verdeutlicht die Auswirkungen auf die Entwicklung des neuromuskulären Systems, wenn diese Interaktionen gestört sind.



## Abstract

Precise innervation of somatic muscles is essential for execution of coordinated movements. Pathfinding molecules guide the outgrowing motor axons to their target muscles in the periphery. In the neuromuscular system of *Drosophila melanogaster*, different pathfinding molecules are expressed to mediate attractive and repulsive signals and are interpreted by various receptors.

In this work, the interaction of the repulsive Uncoordinated-5 (Unc-5)/Netrin and the attractive Beaten path Ia (Beat)/Sidestep (Side) signal transduction pathway was investigated and their importance for axonal pathfinding was elaborated.

Interestingly, simultaneous loss of Unc-5 and Beat leads to severe pathfinding defects of the segmental nerve in embryos and larvae, supporting an additive phenotype. Cell-cell aggregation assays showed no interaction of the molecules, suggesting a synergistic interaction of both signaling pathways for pathfinding of the segmental nerve.

*Unc-5* and *beat* double mutant larvae show a drastic change in crawling behavior and severe locomotor disturbances in the execution of the escape roll, a roll performed over the lateral body axis shown as a stereotypic escape response that is triggered by a painful stimulus. Both a reduction in neuromuscular junctions in the lateral muscle field and a loss of lateral muscles itself reduces an execution of the escape roll, highlighting the importance of a precise innervation of the lateral musculature by the segmental nerve.

Unc-5 expressing SNa motor axons are guided among others by Netrin positive ventral muscles, as an ectopic presentation of the molecule on the lateral muscles confirms the repulsion of the axons. In addition, ectopic expression of Unc-5 in ventrally projecting motor axons also causes repulsion from the ventral Netrin-expressing muscles resulting in a reduction of neuromuscular junctions.

In summary, this work uncovers new insights into the highly complex network of different axonal pathfinding molecules in *Drosophila* and illustrates the effects on the development of the neuromuscular system when these interactions are impaired.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Entwicklung des neuromuskulären Systems .....	1
1.2 Larvales Innervierungsmuster .....	3
1.3 Navigation des Wachstumskegels.....	4
1.4. Wegfindungsmoleküle .....	6
1.5 Wegfindung der dorsalen und ventralen Motoneuronen .....	8
1.6 Selektive Defaszikulation im ventralen Muskelfeld.....	9
1.7 Repulsion und Attraktion durch Netrin, Frazzled und Unc-5 .....	10
1.8 Axonale Wegfindung durch Sidestep und Beaten path Ia .....	12
1.9 Entwicklung und Markierung neuromuskulärer Endplatten .....	15
1.10 Das larvale Kriechen .....	16
1.11 Fluchtverhalten .....	17
1.12 Ziel dieser Arbeit.....	19
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
2.1. Starke Innervierungsdefekte in <i>unc-5</i> und <i>beat</i> Mutanten .....	21
2.2. Veränderte larvale Lokomotion in <i>unc-5</i> und <i>beat</i> Doppelmutanten .....	29
2.3 Partielle Rettung des <i>unc-5</i> und <i>beat</i> mutanten Phänotyps .....	36
2.4 Keine Sekretion von Beat path Ia .....	38
2.5 Unc-5 Expression auf SNa und peripheren Gliazellen .....	40
2.6 Unc-5 und Beat exprimierende S2 Zellen zeigen keine Interaktion.....	42
2.7 Ektopische Expression von Unc-5 und Beat erzeugt Muskeldefekte .....	43
2.8 Netrin wird auf der embryonalen Muskulatur und im ZNS exprimiert .....	48
2.9 Unc-5 exprimierende Axone werden von NetB abgestoßen .....	53
2.10 <i>Side</i> -Phänotyp Verstärkung durch den simultanen Verlust der Netrine .....	58
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>65</b>
3.1 Starke Innervierungsdefekte in <i>unc-5</i> und <i>beat</i> Doppelmutanten .....	65
3.2 Veränderte larvale Lokomotion in <i>unc-5</i> und <i>beat</i> Doppelmutanten .....	66
3.3 Partielle Rettung des <i>unc-5</i> und <i>beat</i> mutanten Phänotyps .....	68
3.4 Keine Sekretion von Beat path Ia .....	69
3.5 Unc-5 Expression auf SN und peripheren Gliazellen .....	69
3.6 Unc-5 und Beat exprimierende S2 Zellen zeigen keine Interaktion.....	71
3.7 Ektopische Expression von Unc-5 und Beat erzeugt Muskeldefekte .....	71
3.8 Netrin wird auf der embryonalen Muskulatur und im ZNS exprimiert .....	73

3.9 Unc-5 exprimierende Axone werden von Netrin B abgestoßen .....	74
3.10 <i>Side</i> -Phänotyp Verstärkung durch den simultanen Verlust der Netrine .....	76
3.11 Schlussfolgerung und Ausblick.....	77
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>79</b>
4.1 Material.....	79
4.1.1 Geräte .....	79
4.1.2 Chemikalien .....	79
4.1.3 Lösungen und Puffer.....	81
4.1.4 Fliegenstämme .....	83
4.1.5 <i>Leptopilina boulardi</i> Stämme .....	85
4.1.6 Primer .....	85
4.1.7 Plasmide .....	86
4.1.8 Primärantikörper .....	86
4.1.9 Sekundärantikörper.....	87
4.1.10 Kits .....	87
4.1.11 Software .....	88
4.2 Methoden.....	88
4.2.1 Tierhaltung .....	88
4.2.2 Fliegen-genetik.....	90
4.2.3 Biochemische Methoden.....	91
4.2.4 Molekularbiologische Methoden .....	97
4.2.5 Mikrobiologische Methoden .....	101
4.2.6 Zellkultur .....	103
4.2.7 Analyse der larvalen Lokomotion.....	104
4.2.8 Beiträge durch studentische Abschlussarbeiten .....	105
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>124</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>125</b>



# 1. Einleitung

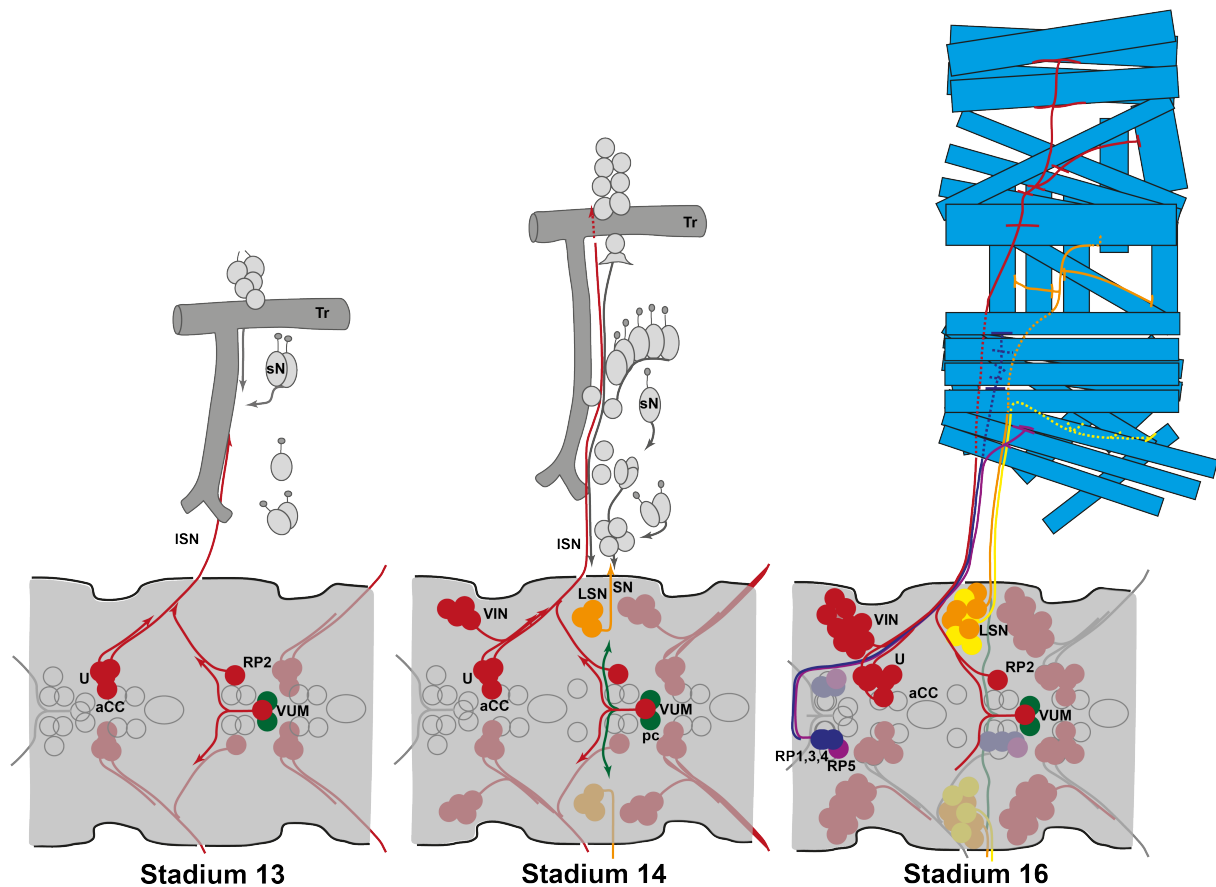
Die präzise Ausführung von koordinierten Bewegungen erfordert die korrekte Verschaltung von Nerven und Muskulatur. Unterschiedliche, teilweise hoch konservierte, Signalwege ermöglichen in Organismen die komplexe Wegfindung von auswachsenden Motoaxonen in der Peripherie zu ihrer Zielmuskulatur (zusammengefasst in: Jeong, 2021; Zarin and Labrador, 2019). Bedingt durch den simplen und stereotypischen Aufbau des neuromuskulären Systems von *Drosophila melanogaster* lässt sich dessen Entwicklung besonders gut analysieren und manipulieren. Manchmal überdauern embryonale Innervierungsdefekte bis in das larvale Entwicklungsstadium (Meyer and Aberle, 2006; Nose et al., 1994; Sink et al., 2001). Diese Defekte rufen in betroffenen Larven und adulten Tieren oftmals starke Bewegungsstörungen hervor (Kinold et al., 2018, 2021).

## 1.1 Entwicklung des neuromuskulären Systems

Für ein besseres Verständnis der Innervierungsdefekte sind Kenntnisse über die Lage und die Entwicklung der Motoneuronen essentiell. Die embryonale Entwicklung von *Drosophila melanogaster* kann in 17. Stadien unterteilt werden und wird durch das Schlüpfen der Larve beendet (Hartenstein, 1993). Zugehörig zu den holometabolen Insekten durchläuft die Fruchtfliege eine vollständige Metamorphose, von der Larve zur Imago, in welcher sich das adulte Nervensystem aus den embryonalen und larvalen Anlagen entwickelt. Die Entwicklung des Nervensystems beginnt zum Ende der Keimstreifausstreckung, indem Neuroblasten, in fünf Wellen, aus dem neuroektodermalen Epithel in das Innere des Embryos delaminieren (Doe, 1992; Hartenstein and Campos-Ortega, 1984). Dieser Vorgang bringt 30 Neuroblasten pro Hemisegment hervor, welche sich asymmetrisch teilen und somit eine Ganglienkörperzelle und einen weiteren Neuroblasten hervorbringen (Broadus et al., 1995; Doe, 1992). Die Ganglienkörperzelle teilt sich wiederum symmetrisch und bringt zwei postmitotische Neurone oder zwei Gliazellen hervor. Neuroblasten können anhand des Zeitpunktes ihrer Delamination, der Position im Neuroektoderm und der von ihnen exprimierten Gene bestimmt werden. Während des 13. embryonalen Entwicklungsstadiums beginnt das Auswachen der neuronalen Nervenzellfortsätze und Pionieraxone bahnen sich ihren Weg vom zentralen Nervensystem (ZNS) in die Peripherie (Abb.1.1). Das Axon des aCC Neurons ebnet, gefolgt von den Axonen der

## Einleitung

U Neurone, den intersegmentalen Nerv (ISN) und bildet die anteriore Nervenwurzel (Goodman et al., 1984). Die posteriore Nervenwurzel des ISNs wird hingegen durch die Axone der RP2 und einigen VUM Neuronen pioniert (Jacobs and Goodman, 1989). Eine zweite Klasse von Motoneuronen etabliert den segmentalen Nerv (SN), die begründet durch ihre Lage im ZNS als segmentale Neurone bezeichnet werden. Gegensätzlich zu dem aCC Motoneuron oder den U Neuronen, die im benachbarten Segment lokalisiert sind und als intersegmentale Neurone bezeichnet werden. Später folgen VUM Neurone und verlassen durch den segmentalen Nerv das Bauchmark (Sink and Whitington, 1991).



### Abbildung 1.1: Embryonale neuromuskuläre Entwicklung.

Pionieraxone der U, aCC, RP2 und VUM Neurone verlassen im 13. Entwicklungsstadium das ZNS und migrieren in die Peripherie. Zeitgleich wachsen Axone der sensorischen Neurone (sN, hellgrau) aus. Im 14. Stadium folgen Axone der VIN Neurone den Pionieraxonen des ISNs, während der segmentale Nerv (SN) von den LSN Neuronen etabliert wird. Zeitgleich mit der neuronalen Entwicklung ereignet sich die Entwicklung der Muskulatur, welche im 16. Stadium abgeschlossen ist. Die Motoneurone haben in diesem Entwicklungsstadium ihre Zielmuskulatur erreicht. Tracheen (Tr). Abbildung verändert nach Campos-Ortega and Hartenstein, 1997a.

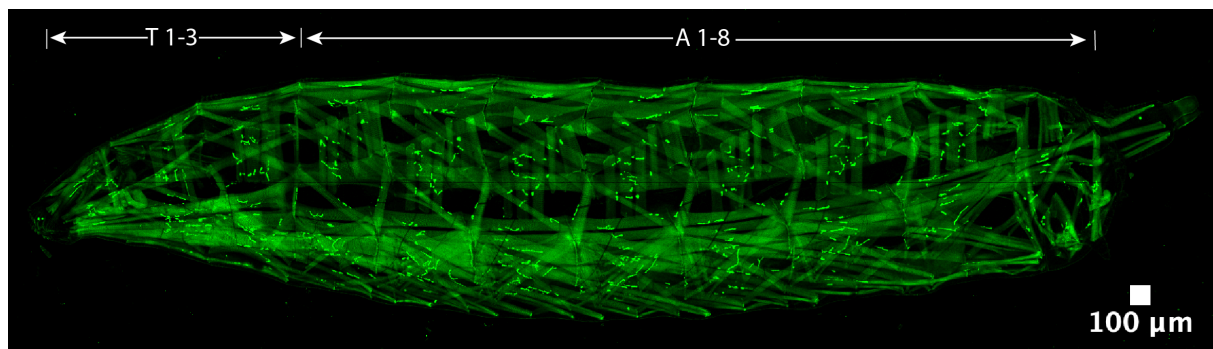
Beginnend im 13. Stadium vollzieht sich die Entwicklung der embryonalen Muskulatur zeitgleich mit der axonalen Wegfindung und ist im 16. Stadium vollendet (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997a). Schon während der Gastrulation invaginieren, *twist*

## Einleitung

(*twi*) und *snail* (*sna*) exprimierende, Mesoderm-bildende Zellen den Embryo und finden ihre Position als Einzelzellschicht an der inneren Seite des Ektoderm (Leptin and Grunewald, 1990; Thisse et al., 1988). Während des Keimstreifrückzuges nimmt die *twi* Expression ab und nur wenige *twi* exprimierende Zellen bleiben im Abdomen zurück (Bate et al., 1991). Zellen mit einer starken *twi* Konzentration entwickeln sich zu den Muskelvorläuferzellen der somatischen Muskulatur, die mit fusionskompetenten Myoblasten fusionieren und somit ein Synzytium bilden (Bate, 1990; Baylies and Bate, 1996). Somit entsteht während der Embryogenese pro abdominalen Hemisegment insgesamt 30 Muskeln, die bis zum Ende des larvalen Stadiums überdauern (Bate, 1990; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997b). Jedoch wächst vom ersten bis zum dritten larvalen Stadium die Länge longitudinaler Muskelfasern ohne eine weitere Fusion von Myoblasten von 50µm auf 500µm (Haas, 1950; Weitkunat and Schnorrer, 2014).

### 1.2 Larvales Innervierungsmuster

Eine *Drosophila* Larve besteht aus acht abdominalen (A1-A8) und drei thorakalen Segmenten (T1-T3). Die drei thorakalen Segmente (T1-T3) und Segment A1 und A8 zeigen einen leicht veränderten Aufbau, wogegen die Segmente A2-A7 ein hoch stereotypisches Muster von 30 Muskeln aufweisen (Bate, 1990) (Abb.1.2).

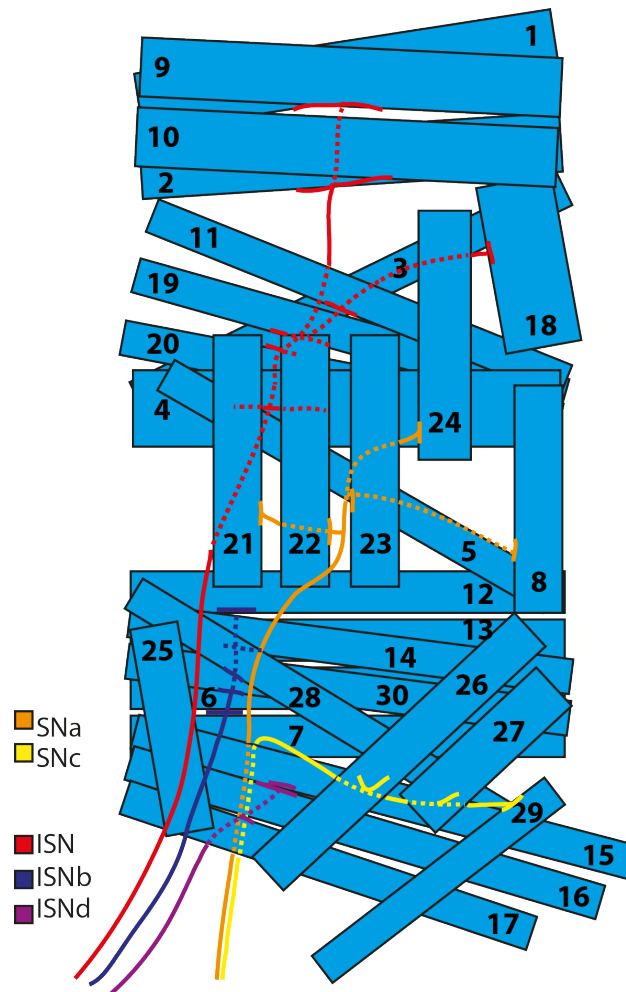


**Abbildung 1.2: Segmentale Gliederung einer *Drosophila* Larve.**

Konfokales Mikroskopiebild einer Larve im dritten Entwicklungsstadium. Markierung der Muskeln und neuromuskulären Verbindungen mithilfe von ShGFP. Die Anordnung der Muskeln erzeugt ein repetitives Muster, das in den abdominalen Segmenten A2-A7 identisch ist. Die thorakalen Segmente T1-T3 sowie die abdominalen Segmente A1 und A8 weisen leichte Veränderungen in der Anzahl und Anordnung der Muskeln auf.

## Einleitung

In zwei Hauptnervensträngen verlassen die Motoneurone das zentrale Nervensystem und verästeln sich in der Peripherie, bis insgesamt fünf Nervenfaserbündel die larvale Muskulatur innervieren (Abb.1.3). Vom ISN, der die dorsal lokalisierte Muskulatur innerviert, faszikuliert der ISNb und ISNd. Beide Nervenbündel projizieren in das ventrale Muskelfeld, sowie der SNa, der vom SNa defaszikuliert. Lateral lokalisierte Muskeln werden hingegen alleinig vom SNa innerviert (Van Vactor et al., 1993). Dieses neuromuskuläre Muster ist in den abdominalen Segmenten A2-A7 der Larve identisch.



**Abbildung 1.3: Innervierungsmuster der abdominalen Muskulatur einer *Drosophila* Larve.**

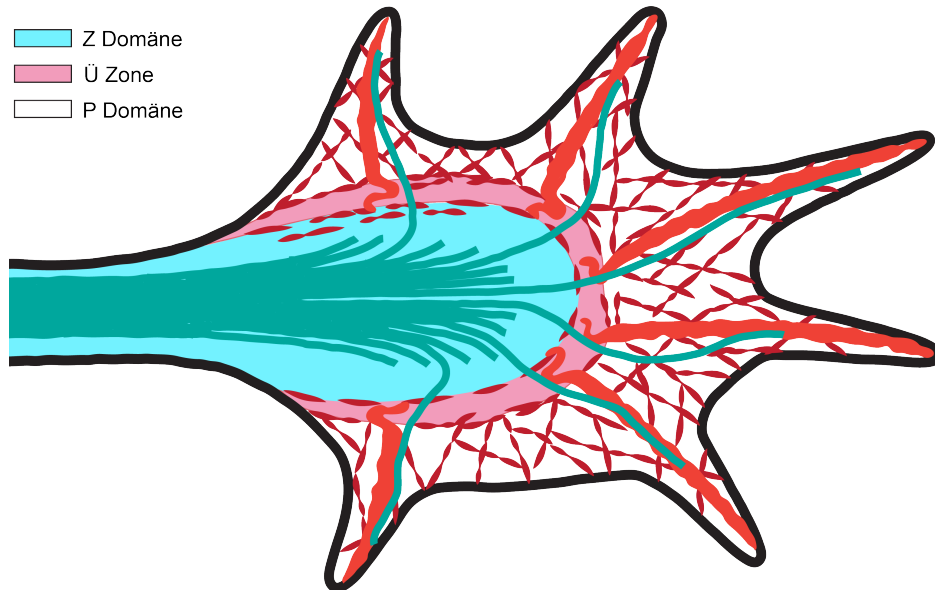
Schema zur Verdeutlichung der axonalen Projektion der 5 Nervenfaserbündel eines Muskelfeldes durch die Kutikula. Gestrichelte Linien deuten Projektionsrouten an, die durch Muskulatur verdeckt werden. Nervenstränge sind in unterschiedlichen Farben dargestellt und projizieren zu ihren Zielmuskefasern. Abbildung verändert nach (Beuchle et al., 2007).

### 1.3 Navigation des Wachstumskegels

Beim Einwachsen der Motoaxone in die Muskelfelder werden die Muskelfasern von den Wachstumskegeln der auswachsenden Motoaxone erkannt. Dieser

## Einleitung

Wachstumskegel befindet sich an der Spitze der migrierenden Axone und wird für das Streckenwachstum und die Aufnahme von Informationen aus der Umgebung benötigt, die wiederum zu Veränderungen des Zytoskeletts des Kegels führen und somit die Navigation ermöglichen (Dent et al., 2011; Lowery and Vactor, 2009). Die fächerförmige Struktur besteht aus Filopodien, die durch Lamellipodien miteinander verbunden und hoch mobil sind (Bray and Chapman, 1985). Der Wachstumskegel kann in drei unterschiedliche Zonen aufgeteilt werden (Abb.1.4).



**Abbildung 1.4: Der strukturelle Aufbau eines Wachstumskegels.**

Die Spitze der auswachsenden Axone kann in drei unterschiedlichen Zonen unterteilt werden: Die periphere Domäne (P Domäne) umschließt das netz- und bündel-artig angeordnete Aktin, welches die Lamellipodien und die Filopodien bildet. Einzelne Mikrotubuli, ausgehend von der zentralen Domäne, erkunden den peripheren Bereich. In der Übergangszone (Ü Zone) liegt das Aktin ringartig vor und verbindet die periphere Domäne mit der zentralen Domäne (Z Domäne). Die zentrale Domäne umschließt den Axonschaft mit den Mikrotubuli. Abbildung verändert nach Lowery and Vactor, 2009.

Die zentrale Domäne umschließt den Axonschaft mit den Mikrotubuli und die periphere Domäne umfasst den äußersten Bereich, der die netzartig angeordneten Aktin-Filamente beherbergt. Verbunden werden beide Domänen durch die Übergangszone, in welcher die Aktinbündel ringartig angelegt sind. Bedeutsam für die Mobilität des Wachstumskegels sind vor allem die Mikrotubuli und das Aktin, beides polarisierte Polymere mit einem Minus-Ende und einem distal ausgerichteten Plus-Ende. Ein stetiger Auf- und Abbau der Aktinfilamente und die Verlängerung der Mikrotubuli aus der zentralen Domäne in die periphere Domäne treibt das Axon voran (Suter and Forscher, 2000; Tanaka and Kirschner, 1991). Befindet sich der Auf- und Abbau der Aktinfilamente in einem Gleichgewicht pausiert das auswachsende Axon. Durch das

## Einleitung

Binden membranständiger Rezeptoren des Wachstumskegels an anziehenden Wegfindungsmolekülen wird das Aktin an das Substrat gebunden und die Depolymerisierung der Aktinfilamente verringert. Eine weitere Polymerisierung der Aktinfilamente am distalen Ende der Filopodien bewirkt eine Vorwölbung der Membran und somit ein Hervorstößen des Axons (Lin et al., 1994; Mitchison and Kirschner, 1988). Zusätzlich stoßen Mikrotubuli vermehrt in die periphere Domäne und ermöglichen eine Verstetigung der Wachstumsrichtung (Buck and Zheng, 2002; Lin and Forscher, 1993). Während des Auswachsens kann der Wachstumskegel aber auch pausieren, seine Ausrichtung korrigieren oder sich sogar aus einer Region zurückziehen (Lowery and Vactor, 2009). Auf seinem Weg durch die Peripherie kontaktiert der Wachstumskegel unterschiedliche Strukturen des sich entwickelnden Embryos. Hierzu zählen Muskeln, sensorische Neurone aber auch Gliazellen (Hartenstein, 1988; Landgraf et al., 1999a; Sepp et al., 2001). Diese Interaktionen werden vor allem durch Wegfindungsmoleküle beeinflusst, welche die Axonspitze durch den sich entwickelnden Embryo leiten.

### **1.4. Wegfindungsmoleküle**

Wegfindungsmoleküle werden während der embryonalen Entwicklung von unterschiedlichen Geweben exprimiert. Einige Moleküle wirken über eine kurze Distanz, gebunden an Zelloberflächen, und andere über eine größere Distanz, indem sie sekretiert werden (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Ihre Wirkung kann sowohl eine abstoßende als auch anziehende Reaktion des Wachstumskegels hervorrufen, welche durch Oberflächenrezeptoren ins Axon vermittelt wird. Wegfindungsmoleküle und ihre Rezeptoren sind oftmals Mitglieder konservierter Genfamilien, wie den Semaphorinen, Slits, Netrinen und Ephrinen (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). Semaphorine kommen sowohl als sekretierte, wie auch membranständige Wegfindungsmoleküle im neuromuskulären System von *Drosophila* vor und interagieren vor allem mit Rezeptoren der Plexin-Familie (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011; Kolodkin et al., 1993). Sie vermitteln über kurze und lange Distanzen sowohl Abstoßung als auch Anziehung. Sema-1a vermittelt zum Beispiel die Defaszikulation von Axonen in der Peripherie, die für die Wanderung der ISNb, ISNd und SNa Verzweigungen zu ihren jeweiligen Muskelfeldern von Bedeutung ist (Yu et al., 1998). Ebenfalls binden Semaphorine (Sema) an Co-Rezeptoren der

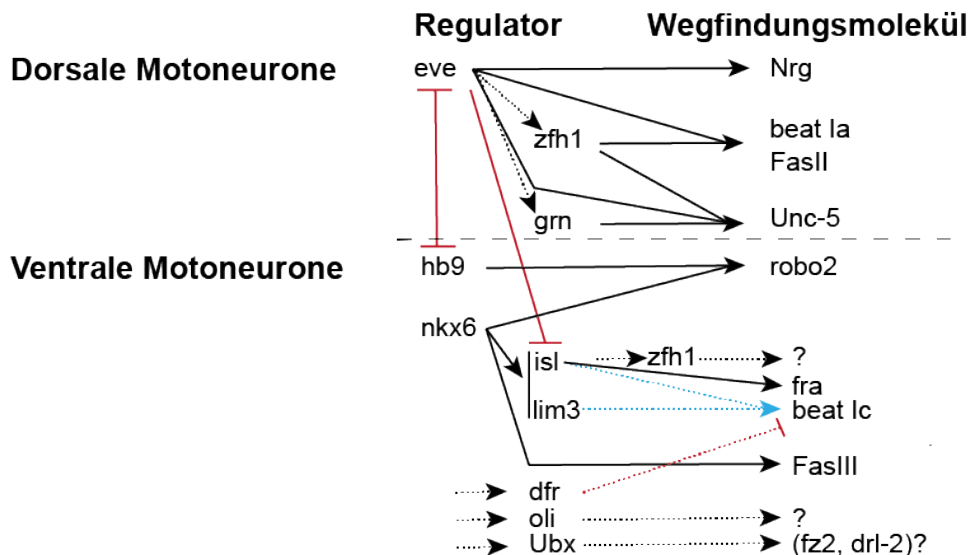
## Einleitung

Neuropilin-Familie und bilden, mit einem Plexin-Rezeptor, multimere Rezeptorkomplexe (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011; Yazdani and Terman, 2006). Im zentralen Nervensystem wird die Überkreuzung der Mittellinie durch Slit und Roundabout (Robo) vermittelt (Kidd et al., 1998, 1999). Ipsilaterale Neurone exprimieren Robo und werden von Gliazellen der Mittellinie abgestoßen, welche Slit sekretieren (Rothberg et al., 1990; Woods, 2004). In *slit* Mutanten fehlt ebenfalls die vermittelte Abstoßung, wodurch die Axone die Mittellinie nicht verlassen können, die Konnektive nicht gebildet werden und das ventrale Bauchmark kollabiert (Rothberg et al., 1988, 1990). Gegensätzlich zu Slit vermitteln Ephrine, Anziehung und Abstoßung auswachsender Axone, über eine kurze Distanz. Sie können in zwei Klassen unterteilt werden, A Ephrine, die mit einem GPI Anker an Zelloberflächen gebunden sind und B Ephrine, welche über eine transmembrane Domäne verfügen. Ephrine binden an, ihrer Bindungsaffinität entsprechende, A und B Ephrinrezeptoren, die zu den Rezeptortyrosinkinasen gehören (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). In der Maus bewirkt der Verlust von EphrinA4 oder EphrinB3 eine Störung der asynchronen Fortbewegung der Hinterbeine (Kullander et al., 2003). Dieser Phänotyp wird durch ein vermehrtes Überkreuzen der Mittellinie des Rückenmarks von Axonen herbeigeführt, die exprimiertes EphrinB3 der Mittellinie, durch den Verlust von EphrinA4, nicht mehr detektieren können und somit nicht abgestoßen werden (Kullander et al., 2003).

Zelladhäsionsmoleküle wie Fasciclin II (FasII) und Connectin (Con) verstärken unter anderem durch homophile Anziehung die selektive axonale Faszikulation im Nervensystem (Bellows et al., 1998; Gould and White, 1992; Grenningloh et al., 1991; Meadows et al., 1994; Nose et al., 1992). Sowohl *fasII*, als auch *con* Funktionsverlustmutanten zeigen nahezu keinen Phänotyp im peripheren Nervensystem, wogegen eine ektopische Überexpression eine Auswirkung auf das axonale Projektionsmuster zeigt (Lin and Goodman, 1994; Nose et al., 1994). Das *Drosophila* Down Syndrome Zell Adhäsion Molekül (DsCAM) kann durch alternatives Spleißen in mehr als 19.000 Isoformen (Schmucker et al., 2000) vorliegen und vermittelt durch homophile Bindung ein repulsives Signal, welches vor allem bei der axonalen und dendritischen Selbstvermeidung im ZNS von großer Bedeutung ist (Wang et al., 2002; Wojtowicz et al., 2007).

## 1.5 Wegfindung der dorsalen und ventralen Motoneuronen

Für das Einwandern der Motoneurone in ihre unterschiedlichen Muskelfelder ist die korrekte Expression von Oberflächenrezeptoren notwendig, für deren Regulation verschiedene Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind. ISN Neurone projizieren zu den dorsalsten Muskeln des Muskelfeldes und exprimieren Even-skipped (Eve), wodurch die Expression von Grain (Grn) und Zinkfinger 1 (Zfh1) in aCC Neuronen reguliert wird (Abb.1.5) (Garces and Thor, 2006). Eve wird für die Wegfindung der dorsalen Motoneurone benötigt, welche in *eve* Mutanten nicht über das dorsolaterale Muskelfeld hinauswachen (Landgraf et al., 1999b). Ebenfalls kontrollieren Eve, Grn und Zfh1 das Transkriptionslevel von *uncoordinated-5 (unc-5)*, *beaten path la (beat la)* und weiteren Wegfindungsmolekülen in aCC und RP2 Neuronen (Abb.1.5) (Zarin et al., 2012, 2014). Alleinig durch Eve wird die Expression von Neuroglian (Nrg) in dorsalen Neuronen kontrolliert (Abb.1.3) (Zarin et al., 2014). Das Zelladhäsionsmolekül Nrg wird im gesamten Nervensystem exprimiert und sein Verlust führt zu abweichenden Projektionen und Kontakten, mit der Muskulatur, der Axone des ISNs und ISNbs (Hall and Bieber, 1997). Ventral projizierende Motoneurone exprimieren je nach Nervenstrang spezifische, aber auch identische Transkriptionsfaktoren.



**Abbildung 1.5: Transkriptionelle Regulation von Wegfindungsmolekülen in dorsalen und ventralen Motoneuronen.**

Dorsale Motoneurone exprimieren Eve, wodurch Grn und Zf1 in aCC Neuronen reguliert werden. Eve, Grn und Zf1 werden für die Expression von Unc-5, Beat la und weiteren richtungsgebenden Proteinen in aCC und RP2 Neuronen benötigt. Das Transkriptionslevel von Nrg wird einzig durch Eve kontrolliert. In ventralen Motoneuronen sind Hb9 und Nkx6 für die Regulation von *isl*, *lim3*, *FasIII* und *robo2* bedeutend. Die Expression von Beat Ic wird gemeinsam durch Isl und Lim3 kontrolliert. Lim3 reguliert



## Einleitung

alleinig *fra* in ventralen Motoneurone. *Dfr*, *Oli* und *Ubx* sind ebenfalls in den ventralen Motoneuronen präsent, deren transkriptionellen Regulatoren und zu regulierenden Gene noch unbekannt sind. *Zf1* wird in allen Neuronen exprimiert. Abbildung verändert nach (Zarin and Labrador, 2019).

Für ihre Wegfindung ist *hb9* und *nkx6* von großer Bedeutung, wodurch die Expression von *Isl1* (*isl*) und *Lim3* reguliert wird, welche wiederum eine regulatorische Wirkung auf *beat 1a* ausüben (Abb.1.5) (Broihier et al., 2004; Certel and Thor, 2004). Wird HB9 ektopisch in allen Motoneuronen exprimiert kann Eve nicht in den dorsalen Motoaxonen detektiert werden, welches die Beschränkung der Eve Expression durch HB9 verdeutlicht (Odden et al., 2002). Für die Expression von *Frazzled* in ventralen Motoneuronen ist alleinig *Isl1* erforderlich, gegensätzlich zur Expression von *Robo2*, die sowohl durch *Nkx6* als auch *Hb9* kontrolliert wird (Abb.1.5) (Santiago and Bashaw, 2017; Santiago et al., 2014). Zusätzlich reguliert *Nkx6* die Expression von *FasIII* (Broihier et al., 2004). Das homophile Zelladhäsionsmolekül *FasIII* vermittelt die Anziehung zwischen *FasIII* exprimierenden Muskeln und des zu innervierenden Neurons (Halpern et al., 1991; Odden et al., 2002). Durch die ektopische Expression des Zelladhäsionsmolekül in lateral projizierenden Neuronen können ihre Wachstumskegel frühzeitig von *FasIII* positiven Muskeln angezogen werden. In den ventralen Motoneuronen sind des Weiteren *Drifter* (*Dfr*), *Olig Family* (*Oli*) und *Ultrabithorax* (*Ubx*) präsent, deren transkriptionelle Regulatoren und zu regulierenden Gene noch unbekannt sind (Abb.1.5) (Certel and Thor, 2004; Hessinger et al., 2017; Oyallon et al., 2012). Auch *Zfh1* wird in diesen Neuronen exprimiert und ist somit in allen Motoneuronen auffindbar (Layden et al., 2006). Dorsale und ventrale Regulatoren reprimieren sich allerdings auch gegenseitig und verhindern somit ein anderes Schicksal in den betreffenden Motoneuronen.

### 1.6 Selektive Defaszikulation im ventralen Muskelfeld

Im ventralen Muskelfeld lösen sich am ventralen Verzweigungspunkt (engl. choice point) definierte Axonbündel von den Hauptnerven ab, um in ihr Muskelfeld einzuwachsen. Für diesen als Defaszikulation bezeichneten Prozess sind sowohl die Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase (RPTP) *Drosophila* Leukocyte-antigen-related-like (*Dlar*), wie auch die Moleküle *Beaten path* (*Beat*), *Sidestep* (*Side*) und *Tolloid-related* (*Tlr*) von großer Bedeutung. *Dlar* gehört zu einer Familie von acht RPTPs von denen sechs einen Einfluss auf die axonale Wegfindung haben (Desai et al., 1997;

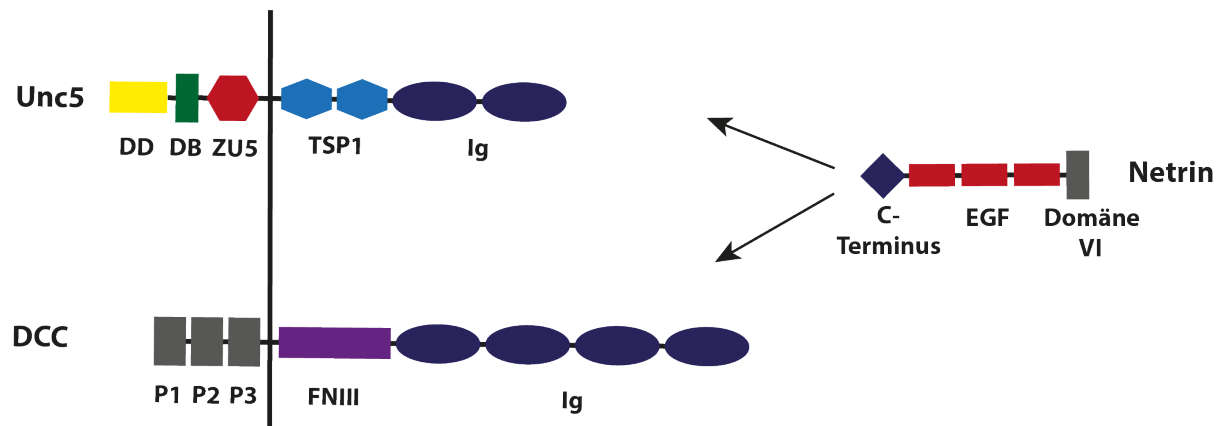
Hatzihristidis et al., 2015; Jeon et al., 2008; Schindelholz et al., 2001; Sun et al., 2001). Der Verlust von *Dlar* führt zu Innervierungsdefekten der ventralen Muskulatur, da die Defaszikulationen des ISNbs und des ISNds vom ISN scheitern (Desai et al., 1997; Krueger et al., 1996). Ebenfalls zeichnet sich der Phänotyp durch zusätzliche Innervierungen der lateralen und dorsalen Muskulatur aus, da der ISNb über sein zu innervierendes Muskelfeld wächst und höherliegende Muskeln innerviert (Krueger et al., 1996). Zusammen mit *Abl*, einer Tyrosinkinase und ihrem Phosphoprotein-Substrat *Enabled* (*Ena*) ist *Dlar* für die korrekte Projektion des ISNbs notwendig (Wills et al., 1999). Ebenfalls kooperiert *Dlar* bei der axonalen Wegfindung des ISNbs mit *Trio*, einem GTP-Austauschfaktor, bei der axonalen Wegfindung des ISNbs (Bateman et al., 2000). Einen ähnlichen Phänotyp erzeugt der Verlust von *Tlr*, eine sekretierte Metalloprotease, die während der axonalen Wegfindung muskelspezifisch exprimiert und in die Hämolymphe sekretiert wird (Parker et al., 2006; Serpe and O'Connor, 2006). In *tlr*- Mutanten scheitert die Defaszikulation ventraler Motoneurone von ihren Hauptnervensträngen und erzeugt Innervierungsdefekte, die bis in das larvale Entwicklungsstadium erhalten bleiben (Meyer and Aberle, 2006). Der Verlust von *side*, wie auch *beat* erzeugt Defaszikulationsdefekte ventral projizierender Motoaxone des ISNbs, ISNds und SNcs (Fambrough and Goodman, 1996; Sink et al., 2001; Van Vactor et al., 1993).

### **1.7 Repulsion und Attraktion durch Netrin, Frazzled und Unc-5**

Anziehende und abstoßende Signale sind für die Zielfindung der auswachsenden Motoaxone bedeutend, da sie die Wachstumskegel zu den Zielmuskeln leiten. Die Netrine sind bifunktionale Wegfindungsmoleküle und vermitteln sowohl die Attraktion als auch die Repulsion auswachsender Axone im ZNS und peripheren Nervensystem (PNS) von *Drosophila melanogaster* (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996). Sie gehören zu den Laminin-ähnlichen Proteinen und zeigen Homologien im Aufbau des N-Terminus und der nachfolgenden EGF-Domänen (Epidermal Growth Factor). Die C-terminale Domäne weicht hingegen von der Laminin Struktur ab (Abb.1.4). Identifiziert wurde Netrin zuerst in Nematoden, dessen Verlust sich gleichermaßen auf die axonale Wegfindung und die Migration mesodermaler Zellen auswirkte (Hedgecock et al., 1990). Darüber hinaus ist Netrin auch für die axonale Regeneration und das Überleben von Zellen von Bedeutung (Dun and Parkinson, 2017; Mehlen and Furne, 2005). Erst

## Einleitung

kürzlich konnte eine Wirkung von Netrin auf die Migration von Entzündungszellen und deren Produktion von Chemokinen gezeigt werden (Xia et al., 2022). Ebenfalls konserviert sind Netrine beispielsweise in der Maus und im Huhn (Serafini et al., 1994; Shen et al., 2002; Wang et al., 1999). Die *Drosophila* Netrine, Netrin A (NetA) und Netrin B (NetB), zeigen ein ähnliches, jedoch nicht identisches Expressionsmuster.



**Abbildung 1.6: Proteinstrukturen von Netrin, Unc-5 und DCC.**

Das Netrin Molekül besteht aus einer N-terminalen VI-Domäne, drei EGF Domänen und einer Domäne am C-Terminus. Unc-5 umfasst zwei extrazelluläre Ig und TSP Typ 1- Domänen. Intrazellulär lokalisiert ist die ZU5- Domäne, das DB Motiv und die Todesdomäne. Frazzled/DCC besteht aus vier IG und sechs FNIII Domänen. Intrazellulär angeordnet sind die Domänen P1, P2 und P3. Abbildung verändert nach (Larrivée et al., 2009).

*NetA* wird im ZNS von Mittellinienzellen und einer Untergruppe von Neuronen exprimiert. Ebenfalls ist das Molekül in der Peripherie auf Muskel 1 und 2 sowie in epidermalen Feldern präsent (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996). *NetB* wird hingegen von wenigen Zellen der Mittellinien, allerdings verglichen mit *NetA* breiter im lateralen ZNS exprimiert. Die ventralen Muskeln 6 und 7 sowie der Muskel 2 sind ebenfalls *NetB* positiv (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Winberg et al., 1998). Der Verlust beider Netrine führt sowohl zu Wegfindungsdefekten im ZNS, als auch in der Peripherie (Mitchell et al., 1996). Eine Rettung der Projektionsdefekte kommissuraler Axone kann interessanterweise durch die alleinige Expression von *NetA* oder *NetB* hervorgerufen werden (Brankatschk and Dickson, 2006; Mitchell et al., 1996). Publiziert sind beide Netrine als sekretierte Wegfindungsmoleküle, die über kurze und lange Distanzen Signale vermitteln. Allerdings konnte mittlerweile durch eine Begrenzung der Sekretion von Maus *Netrin-1* gezeigt werden, dass eine Netrin-Wirkung auch auf kurze Distanz oder als haptotaktisches Signal auftreten kann (Dominici et al., 2017; Varadarajan et al., 2017). In der Maus ist allerdings für die korrekte Überkreuzen der Mittellinie von kommissuralen Axonen sowohl die Netrin

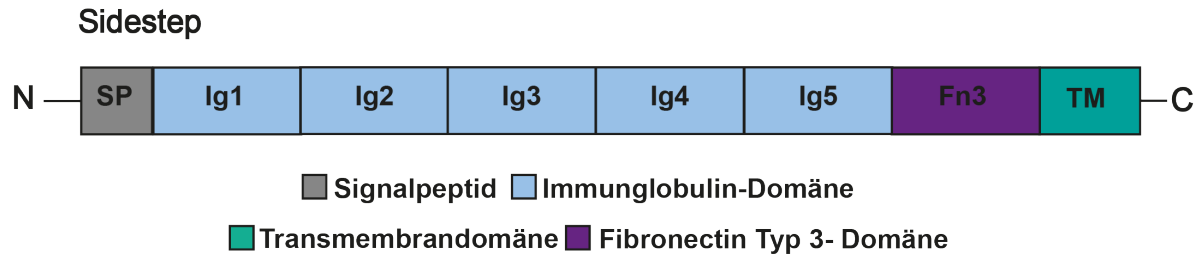
Expression der Bodenplatte, als auch die der ventrikulären Zone notwendig (Moreno-Bravo et al., 2019). Die Wirkung der Netrine wird durch die Expression von zwei unterschiedlichen Rezeptoren bestimmt. Zum einen durch den Unc-5 Rezeptor, welcher ein abstoßendes Signal vermittelt und zum anderen durch den Frazzled (Fra) Rezeptor, der Netrine als anziehende Signale interpretiert (Keleman and Dickson, 2001; Kolodziej et al., 1996). Unc-5 besteht aus zwei extrazellulären Immunglobulin- und Thrombospondin (TSP) Typ 1- Domänen. Intrazellulär befindet sich eine ZU5-Domäne, ein DB Motiv und eine C-terminale Todesdomäne (Abb.1.6). *Drosophila* Unc-5 wird spezifisch vom SN und einigen Axonen des ISNs (aCC und RP2) exprimiert (Keleman and Dickson, 2001; Labrador et al., 2005). Ebenfalls Unc-5 positiv sind die Ausgangs- und peripheren Gliazellen, die den ISN und SN umgeben (Keleman and Dickson, 2001; Labrador et al., 2005). Der Verlust von Unc-5 führt zu leichten Wegfindungsdefekten des SNs und ISNs und äußern sich durch fehlende Äste des segmentalen und Segmentüberschreitungen des intersegmentalen Nervs (Labrador et al., 2005). Gegensätzlich zu Unc-5 wird Frazzled von kommissuralen und longitudinalen Axonen des ZNS, den ventral projizierenden ISNb und ebenfalls von den aCC und RP2 Neuronen des ISNs exprimiert (Kolodziej et al., 1996; Labrador et al., 2005). Der Fra Rezeptor, gehört zur Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Familie, besteht aus vier extrazellulären Immunglobulin (Ig)- und sechs Fibronectin Typ 3-Domänen (FNIII). Zytoplasmatisch lokalisiert sind die Domänen P1, P2 und P3 (Abb.1.6). *Frazzled* Mutanten zeigen Projektionsfehler des ISNs, welcher Segmentgrenzen missachtet, sowie Wegfindungsdefekte des ISNbs und Projektionsdefekte kommissuraler Axone, die Netrin exprimierende Gliazellen nicht mehr detektieren können (Kolodziej et al., 1996).

### **1.8 Axonale Wegfindung durch Sidestep und Beaten path Ia**

Essentiell für die Wegfindung von Motoaxonen ist der Rezeptor Beaten path Ia (Beat) und sein Ligand Sidestep (Side). Beide Moleküle gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie. Das *Drosophila* Genom kodiert für 14 Mitglieder der Beat- und 8 Mitglieder der Side-Familie (Pipes et al., 2001; Zinn, 2009). Identifiziert wurde *side* mittels eines Mutagenese-Screens zur Ermittlung von Mutationen, die eine Auswirkung auf die axonale Wegfindung und neuromuskulärer Synaptogenese aufweisen (Aberle et al., 2002; Sink et al., 2001; Van Vactor et al., 1993). Side besteht

## Einleitung

aus einem Signalpeptid am N-Terminus, 5 Immunglobulin-Domänen, einer Fibronectin Typ 3- Domäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Ende (Abb.1.7) (Li et al., 2017; Sink et al., 2001).



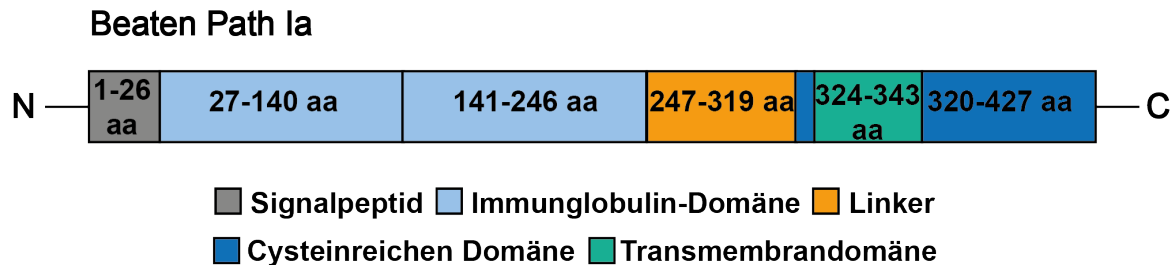
**Abbildung 1.7: Proteinstruktur des Wegfindungsmoleküls Sidestep.**

Das Molekül besteht aus einem Signalpeptid, 5 Immunoglobulin-Domänen, einer Fibronectin Typ 3- Domäne, einer transmembranen Domäne und einem zytoplasmatischen Ende.

Während der embryonalen Entwicklung wird Side in einem hochdynamischen Muster exprimiert. In frühen Entwicklungsstadien (9-12) ist es in Zellen des ZNS detektierbar (Siebert et al., 2009; Sink et al., 2001). Im nachfolgenden Stadium entsteht im ZNS ein keilförmiges Expressionsmuster, welches die auswachsenden Pionieraxone des ISNs in die Peripherie leitet (Siebert et al., 2009). Ebenfalls kann ab dem 13. Entwicklungsstadium Side in den sensorischen Neuronen nachgewiesen werden, dessen Expressionsstärke mit der fortschreitenden Entwicklung abnimmt und schlussendlich auf der somatischen Muskulatur zum Vorschein tritt (Sink et al., 2001). Der Verlust von Side erzeugt einen Bypass-Phänotyp, der zu gravierenden Innervierungsdefekten der ventralen Muskulatur führt und vor allem den ISNb, ISNd und Snc betrifft (Sink et al., 2001). Die Nervenstränge defaszikulieren nicht von den Hauptnervensträngen und erreichen somit nicht ihr zu innervierendes Muskelfeld (Sink et al., 2001). Detektiert wird Side durch den Rezeptor Beat, der in einem Screen zur Entdeckung von Genen, welche die neuromuskuläre Konnektivität beeinflussen, identifiziert wurde (Van Vactor et al., 1993). Beat wird während der Embryonalentwicklung in Motoneuronen exprimiert und in den Wachstumskegeln angereichert (Fambrough and Goodman, 1996; Siebert et al., 2009). Publiziert wurde Beat, anhand von Strukturvorhersagen und undeutlichen immunhistologischen Färbungen, als sekretiertes Molekül, welches für die Defaszikulation von Motoaxonen an Entscheidungspunkten von Bedeutung ist (Bazan and Goodman, 1997; Fambrough and Goodman, 1996; Pipes et al., 2001). In vivo- und in vitro- Experimente lassen mittlerweile vermuten, dass Beat über eine transmembrane Domäne in der

## Einleitung

Zellmembran verankert ist (Heymann, 2017; Siebert et al., 2009). Außerdem besteht der Rezeptor aus einem Signalpeptid am N-Terminus, zwei Immunglobulin-Domänen, einem umstrukturierten Linker und einer Cystein-reichen Domäne am C-Terminus (Abb.1.8) (Bazan and Goodman, 1997; Mushegian, 1997; Pipes et al., 2001).

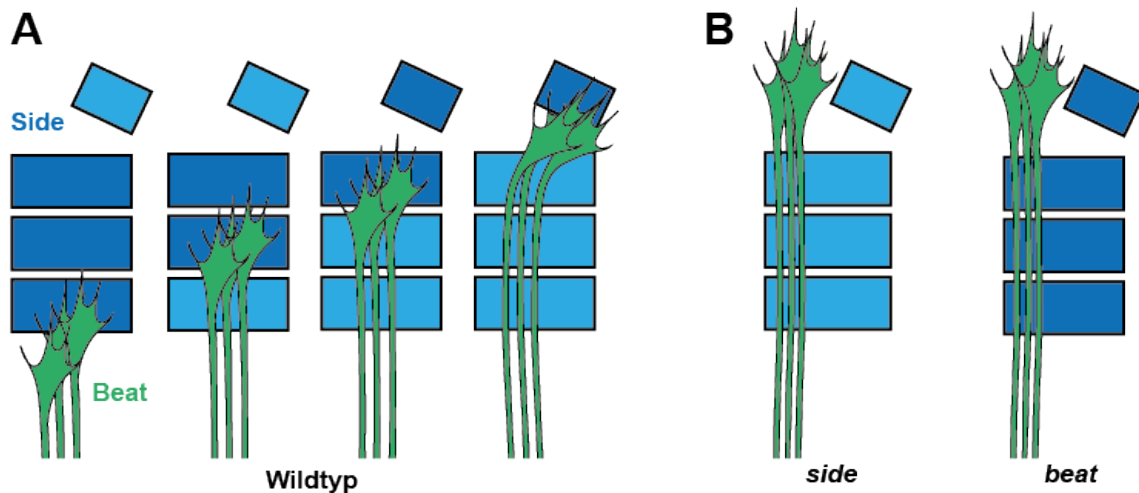


**Abbildung 1.8: Proteinstruktur des Wegfindungsmoleküls Beaten Path Ia.**

Das Protein besteht aus einem Signalpeptid, zwei Immunglobulin-Domänen, einer verbindenden Linker-Sequenz, einer Transmembran- und einer Cystein-reichen-Domäne.

Die Cystein-reiche Domäne wird vermutlich für die Bildung von Homo- und Heterodimeren benötigt (Bazan and Goodman, 1997; Mushegian, 1997). Exprimiert wird die mRNA des Rezeptors ab dem 12. Entwicklungsstadium in einem Teil von Zellen des ZNS, höchstwahrscheinlich neugeborene Motoneurone, welche anhand ihrer Position identifiziert wurden (Fambrough and Goodman, 1996; Siebert et al., 2009; Sink et al., 2001). Die Anzahl der Beat exprimierenden Zellen nimmt bis zum 13. Stadium, in welchem die auswachsenden Motoaxone das ZNS verlassen und in die Peripherie migrieren, weiter zu und bleibt konstant bis ins 14. Stadium. Während dieses Zeitraums bilden sich die Hauptnervenstränge in der Peripherie. Die Stärke der Beat-Expression nimmt danach ab und bleibt bis in das 17. Entwicklungsstadium erhalten. *Beat* Mutanten zeigen einen *side* ähnlichen Phänotyp, der sich vor allem auf das ventrale Muskelfeld auswirkt und durch die fehlende Defaszikulation der Nervenbündel von ihren Hauptnervensträngen erzeugt wird (Abb.1.9) (Fambrough and Goodman, 1996). Anhand der ähnlichen Phänotypen und der Tatsache, dass keine Verstärkung des Phänotyps in *side* und *beat* Doppelmutanten beobachtet werden konnte, wurde auf eine genetische Interaktion zwischen den beiden Molekülen geschlossen (Siebert et al., 2009). Ebenfalls konnte durch eine ektopische Expression von Sidestep auf Hämocyten, im *side* mutanten Hintergrund, eine Anziehung der Wachstumskegel erzeugt werden (Siebert et al., 2009).

## Einleitung



**Abbildung 1.9: Schema der Interaktion von Sidestep und Beat.**

Schema der Interaktion von Sidestep und Beat. Beat exprimierende Motoaxone folgen im Wildtyp einem Side markierten Pfad (dunkelblau) (A). Erreicht der Wachstumskegel Side exprimierendes Gewebe, wird die Expression reduziert (hellblau). In *side* Mutanten kann der Wachstumskegel kein Side detektieren und wächst an seinen Zielmuskeln vorbei (B). Side exprimierendes Gewebe wird in *beat* Mutanten ebenfalls nicht wahrgenommen und die Defaszikulation von Motoaxone scheitert. Zusätzlich erfolgt keine Reduktion der Side Expression. Abbildung verändert nach (Siebert et al., 2009).

## 1.9 Entwicklung und Markierung neuromuskulärer Endplatten

Nach dem Kontakt mit der Zielmuskulatur findet ein Umwandlungsprozess des Wachstumskegels zu einem präsynaptischen Terminal statt (Halpern et al., 1991; Johansen et al., 1989a; Keshishian et al., 1996). Diese neuromuskulären Endigungen (NMJs) bestehen aus synaptischen Verzweigungen mit jeweils mehreren Transmitter-Freisetzungsstellen, auch Boutons genannt, und beherbergen einzelne Synapsen. Während der Embryonalentwicklung ereignet sich das Wachstum einer NMJ durch Teilungen bereits bestehender presynaptischer Boutons oder einer de novo Bildung neuer Boutons an der NMJ (Zito et al., 1999). In den larvalen Stadien wächst die NMJ enorm vor allem durch die Bildung neuer Boutons (Davis et al., 1996). In *Drosophila* werden die Muskeln des Hautmuskelschlauchs durch unterschiedliche Typen von Motoneuronen co-innerviert, die anhand verschiedener Eigenschaften ihrer Boutons klassifiziert werden können. Typ I Boutons sind glutamaterg und werden nach ihrer Größe in Ib (big) und Is (small) unterteilt, wobei Ib-Boutons zusätzlich von einem ausgeprägten und Is-Boutons von einem weniger ausgeprägten subsynaptischen Retikulum umgeben sind (Hoang and Chiba, 2001; Johansen et al., 1989b). Typ II Boutons sind ebenfalls glutamaterg aber von kleinerem Durchmesser (1-2 $\mu$ m) (Hoang and Chiba, 2001; Monastirioti et al., 1995). Boutons des Typ III sind von mittlerer

Größe und verwenden Neuropeptide als Botenstoffe (Gorczyca et al., 1993). Sowohl die Lage auf der Muskelfaser als auch die Morphologie einer NMJ sind charakteristisch und können Rückschlüsse auf die Synapsenbildung und axonale Wegfindungsdefekte ermöglichen. Die Expression des chimären Fusionsproteins CD8-GFP-Shaker (ShGFP) ermöglicht eine Markierung der Typ I Boutons, durch eine Akkumulation von GFP an der Muskeloberfläche und des subsynaptischen Retikulums (Zito et al., 1997, 1999). Der Marker besteht aus der extrazellulären und transmembranen Domäne des menschlichen T-Lymphozyten-Proteins CD8, fusioniert mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und der C-terminalen Sequenz des Shaker-Kaliumkanals (Zito et al., 1999). Das PDZ Domänen-bindende Motiv des Shaker-Kaliumkanals interagiert spezifisch mit Discs large (Dlg), einem postsynaptisch lokalisierten Protein. Die Akkumulation von ShGFP ermöglicht somit eine Markierung von Typ I Boutons (Zito et al., 1997). Unter der Kontrolle des myosin heavy chain (MHC) Promoters erfolgt eine muskelspezifische Expression des Fusionsproteins (Wassenberg et al., 1987; Zito et al., 1999).

### **1.10 Das larvale Kriechen**

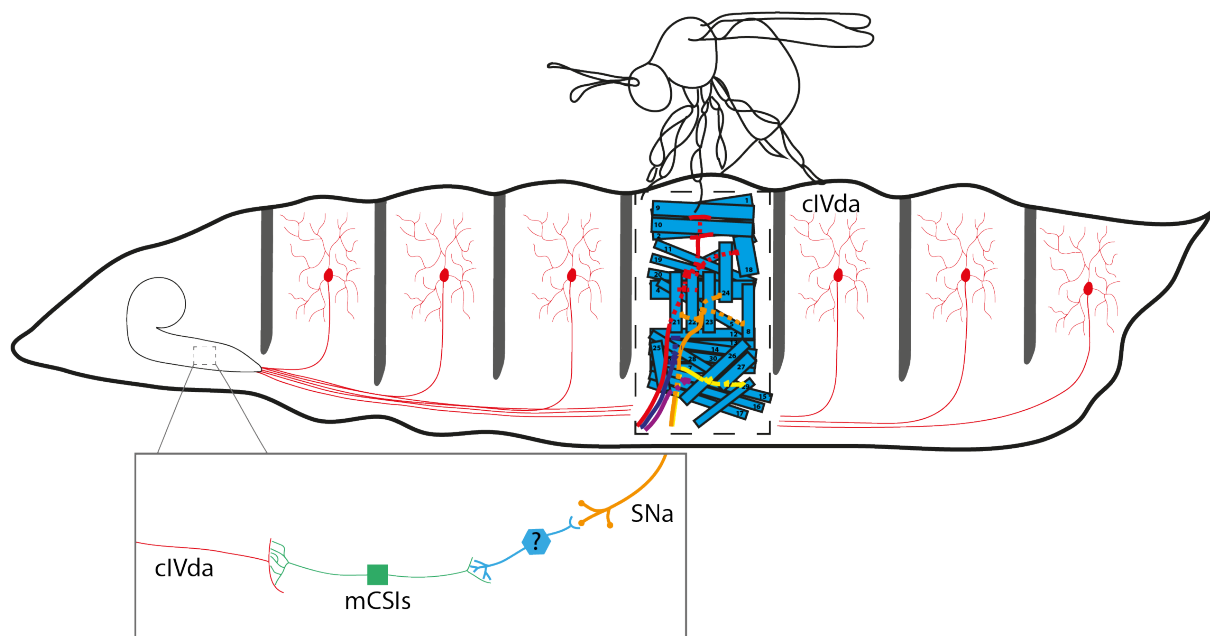
Das Kriechen ist für *Drosophila* Larven eine fundamentale Art der Fortbewegung, die für die Nahrungsbeschaffung und die Flucht vor einem Fressfeind essentiell ist. Larven verfügen über ein hydrostatisches Skelett, einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, der durch Druckeinwirkung die nötige Festigkeit erlangt. Beim Kriechen wird eine sich wiederholende peristaltische Welle ausgeführt, die über die gesamte Larve verläuft (Berrigan and Pepin, 1995; Heckscher et al., 2012). Ein Bewegungszyklus beginnt mit dem Anheben posterior gelegener Segmente, die weiter anterior wieder auf das Substrat gelegt werden, während das posteriore Ende weiterhin mit dem Untergrund in Kontakt bleibt (Heckscher et al., 2012). Das Anheben weniger Segmente setzt sich bis zu den Kopfsegmenten fort, gefolgt von dem Versetzen der Mundhaken und des posterioren Endes in Kriechrichtung, wodurch ein Bewegungszyklus abgeschlossen ist (Heckscher et al., 2012). Die Kriechgeschwindigkeit wird durch die Dauer einer peristaltischen Kontraktionswelle reguliert, die von posterior nach anterior über die Larve verläuft (Heckscher et al., 2012). Ein Bewegungsablauf kann in zwei Phasen unterteilt werden, die asynchron zueinander stattfinden. Der Darm wird während der



„visceral pistoning“-Phase durch Kontraktionen im Kopf und posterioren Ende bewegt, während sich in der „wave“-Phase eine peristaltische Welle über die Larve in Kriechrichtung fortsetzt (Heckscher et al., 2012).

### 1.11 Fluchtverhalten

Organismen haben unterschiedliche Verhaltensmuster entwickelt, welche eine Flucht aus einer Gefahrensituation erlauben. Diese koordinativen Bewegungsmuster sind oftmals hoch stereotypisch, überlebenswichtig und werden durch einen sensorischen Reiz ausgelöst, der neuronale Signalwege aktiviert (Abb.1.10).



**Abbildung 1.10: Induktion des Fluchtverhaltens bei *Drosophila melanogaster*.**

Schmerzhafte Reize (Angriff einer parasitoiden Wespe) werden durch cIVda Neurone detektiert, die sich mit ihren weit verzweigten Dendriten unter der Epidermis befinden und Schmerzen detektieren. Signale der cIVda Neurone werden im Gehirn über Interneurone an die SNa Neurone weitergeben, welche die Kontraktion der lateralen Muskulatur bewirken und somit die Ausführung eines spezifischen Fluchtverhaltens hervorrufen. Abbildung erstellt nach Vorlage von Beuchle et al., 2007; Chin and Tracey, 2017; Driskell et al., 2016; Ziegler et al., 2017.

Schmerzhafte Reize, wie hohe Temperaturen oder mechanischer Druck, lösen in *Drosophila* Larven ein stereotypisches Fluchtverhalten aus, bei dem sich die Larve um die laterale Körperachse rollt und somit der Schmerzquelle entkommen kann (Ohyama et al., 2013; Tracey et al., 2003). Dieses Bewegungsmuster ermöglicht den Larven auch die Abwehr von parasitoiden Wespen und verhindert somit die Eiablage der weiblichen Wespen in die Larve (Hwang et al., 2008; Robertson et al., 2013). Detektiert

## Einleitung

werden schmerzhafte Reize über die dendritischen Verzweigungen von Klasse IV Neuronen (cIVda), die die Epidermis einer Larve überspannen und in das ZNS projizieren (Grueber et al., 2002, 2007; Hwang et al., 2008). Im ZNS lokalisierte Interneurone (mCSIs) sind postsynaptisch mit den cIVda Neuronen verbunden und leiten den detektierten Reiz an Neurone des SNas weiter, der wiederum die Kontraktion der lateralen Muskeln bewirkt und so das laterale Rollen initiiert (Yoshino et al., 2017).

### 1.12 Ziel dieser Arbeit

Wegfindungsmoleküle sind essentiell für die fehlerfreie Innervierung der Muskulatur und die präzise Ausführung von Bewegungsabläufen, die das Überleben von Organismen gewährleisten. Anziehende und abstoßende Mechanismen leiten auswachsende Motoaxone durch den sich entwickelnden Embryo bis zur Zielmuskulatur und erzeugen oftmals, bei einem Funktionsverlust, Projektionsdefekte der zu leitenden Nervenstränge.

Innervierungsdefekte treten bei einem *beat* Verlust vor allem im ventralen Muskelfeld auf und eine Verstärkung des Phänotyps kann durch den zusätzlichen Verlust von *unc-5* im lateralen Bereich beobachtet werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps im Embryo und in der Larve, die sowohl die betroffenen Nervenstränge als auch die Projektionsrouten der verbliebenen Motoaxone umfasst. Eine Rettung des doppelmutanten Phänotyps soll mithilfe einer GAL4/UAS-System basierten Re-expression herbeigeführt werden und die Entstehung des mutanten Phänotyps erklären.

Zudem soll die larvale Lokomotion der *unc-5* und *beat* Doppelmutanten untersucht werden, da nicht innervierte Muskeln lokomotorische Bewegungsmuster unterbinden oder stark stören können. Das stereotypische Fluchtverhalten von *Drosophila melanogaster*, welches durch einen Schmerzreiz ausgelöst werden kann und die Ausführung einer Rolle über die Körperlängsachse stimuliert, wird mittels parasitierender Wespen und eines Hitzeplatten-Assays analysiert.

Des Weiteren soll eine mögliche genetische oder biochemische Interaktion zwischen dem Side/Beat und Netrin/Unc-5 Signalweg untersucht werden, da beide Signalwege bedeutend für eine fehlerfreie axonale Wegfindung sind und die simultane Störung weitere Einblicke in das Zusammenspiel der unterschiedlichen leitenden Mechanismen gewähren kann.

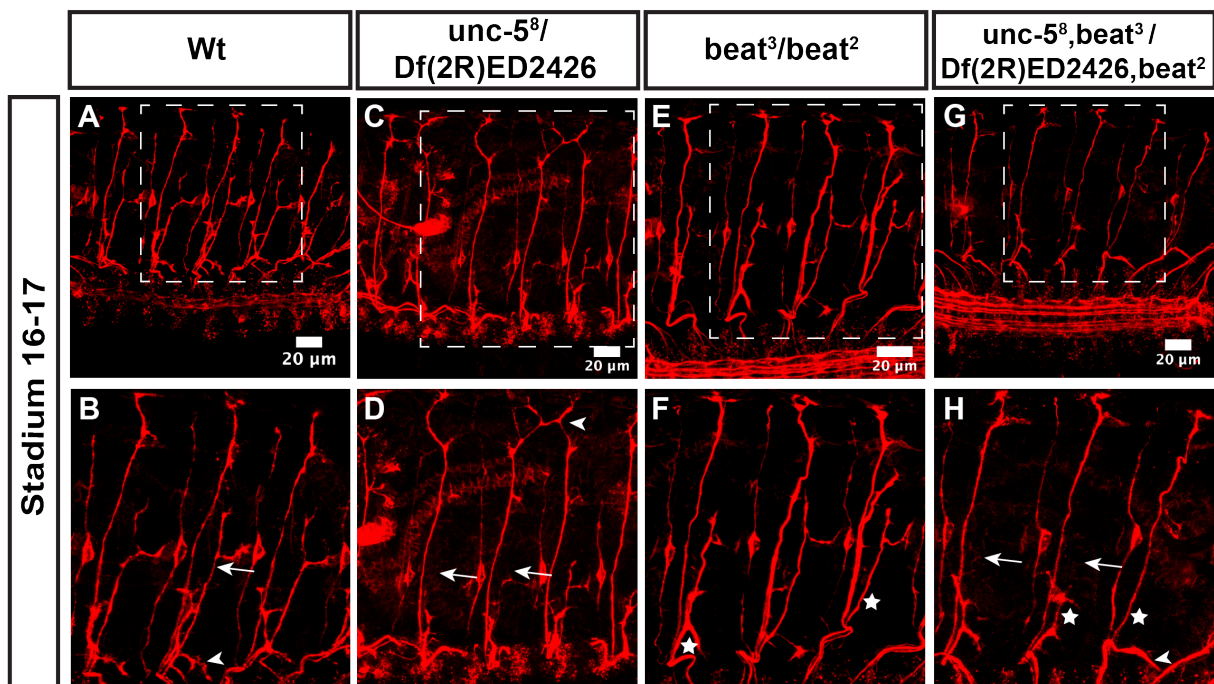
Zudem soll die funktionelle Bedeutung der peripheren Expression der Netrine untersucht werden, welche anhand einer Analyse der Expressionsmuster und muskelspezifischen Überexpressionen erfolgt. Wie auch neuronal ektopische Expressionen von Unc-5 einen tieferen Einblick in die Funktion des repulsiven Netrin/Unc-5 Signalweg ermöglichen sollen.

## Einleitung

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Starke Innervierungsdefekte in *unc-5* und *beat* Mutanten

Der Verlust von Wegfindungsmolekülen kann zu Projektionsfehlern, sowohl im Embryo als auch in der Larve führen. Zwei der wichtigsten axonalen Wegfindungsmoleküle für Motoaxone sind Sidestep und sein Rezeptor Beaten path. Die Verlust-Phänotypen zeigen, dass bis zu 30% der embryonalen Muskelfasern nicht innerviert sind (Fambrough and Goodman, 1996; Sink et al., 2001). Die Innervierung der restlichen 70% können durch redundante Funktionen von Familienmitgliedern oder anderen Signalwegen erreicht werden. Demzufolge ist für die korrekte Innervierung der Muskulatur ein Zusammenspiel von unterschiedlichen leitenden Mechanismen notwendig, die die Axone zu ihren Zielen leiten (Winberg et al., 1998; Zarin et al., 2014). Allerdings ist das funktionelle Zusammenspiel anderer Moleküle und Rezeptoren mit dem Beat Rezeptor und seinem Liganden Side noch unbekannt. Deshalb soll in dieser Arbeit der simultane Verlust von Unc-5 und Beat untersucht werden. Doppelmutante Embryonen mit einer milden Ausprägung zeigen starke Wegfindungsdefekte des SNas und Projektionsfehler des ISNbs, ISNs und SNcs (Abb.2.1). Prägt sich der Phänotyp stark aus projiziert alleinig der ISN in sein dorsales Muskelfeld, während alle anderen Verzweigungen verloren gehen.



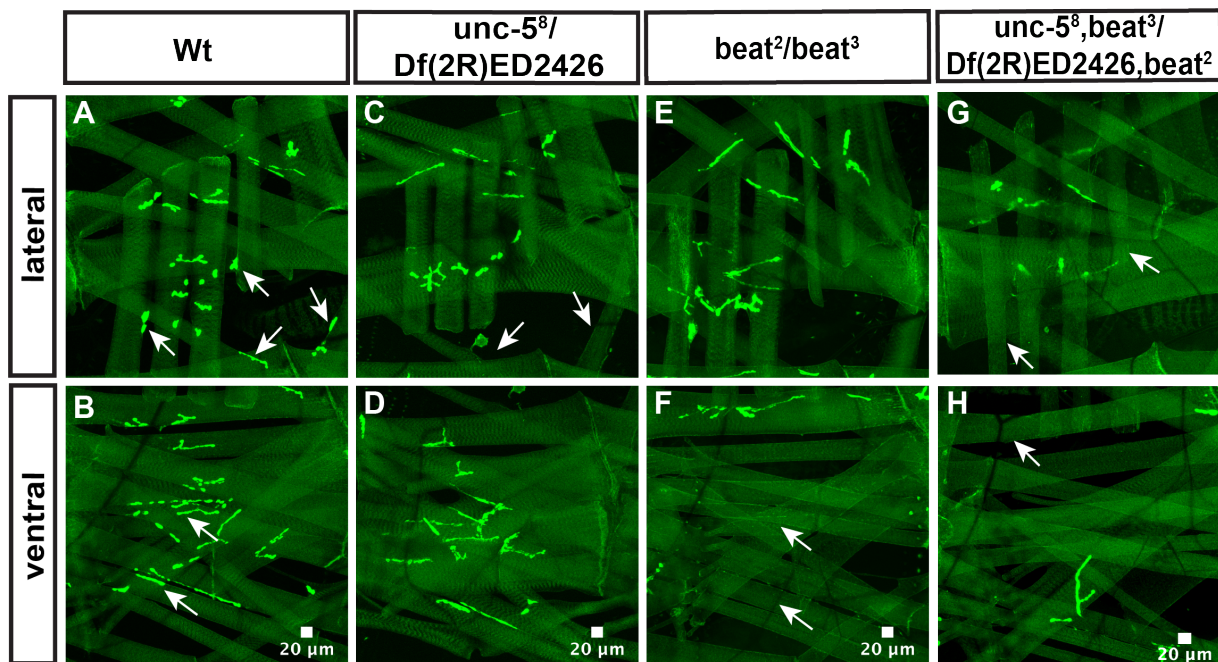
**Abbildung 2.1: Verlust von Unc-5 und Beat führt im Embryo zu starken Wegfindungsdefekten des SNas.**

(A-F) Konfokale Aufnahmen von Embryonen im Stadium 16-17. FasII-Färbung visualisiert axonale Projektion. Der Pfeil deutet auf den SNa und der Pfeilkopf markiert den SNc. ISNb wird durch den Stern

## Ergebnisse

hervorgehoben. (A-B) Wildtypischer Embryo. (C-D) *Unc-5* Einzelmutanten zeigen leichte Projektionsdefekte des SNAs und benachbarte ISN Faszikel überschreiten die Segmentgrenze. (E-F) *Beat* Einzelmutanten zeigen abweichende axonale Projektionen im ventralen Muskelfeld. (G-H) Simultaner Verlust von *Unc-5* und *Beat* führt zu einer Verstärkung der einzelnen Phänotypen. Der segmentale Nerv ist dünner oder fehlt komplett. Projektionsfehler des ISNs und SNcs sind detektierbar.

Embryonale Innervierungsdefekte bestehen oftmals bis in das larvale Stadium und können anhand fehlender neuromuskulärer Endplatten (NMJ's) identifiziert werden (Meyer and Aberle, 2006; Nose et al., 1994; Sink et al., 2001). Diese Verbindungen können durch die Verwendung des postsynaptischen Fusionsprotein ShGFP detektiert werden, der Typ I Boutons markiert (Zito et al., 1999). Erreicht ein Nerv nicht seinen zu innervierenden Muskel, wird keine NMJ ausgebildet, die durch die Expression von ShGFP markiert werden kann. Zusätzlich können Innervierungen detektiert werden, die zusätzlich oder an einer abweichenden Position gebildet wurden. In *unc-5* einzelmutanten Larven prägen sich die Wegfindungsdefekte vor allem im lateralen Muskelfeld aus (Abb. 2.2). Muskel 5, 8 und 21 sind häufig betroffen und zeigen fehlende neuromuskuläre Verbindungen. Der *beat* mutante Phänotyp ist auffälliger, betrifft das ventrale Muskelfeld und variiert in der Stärke seiner Ausprägung.

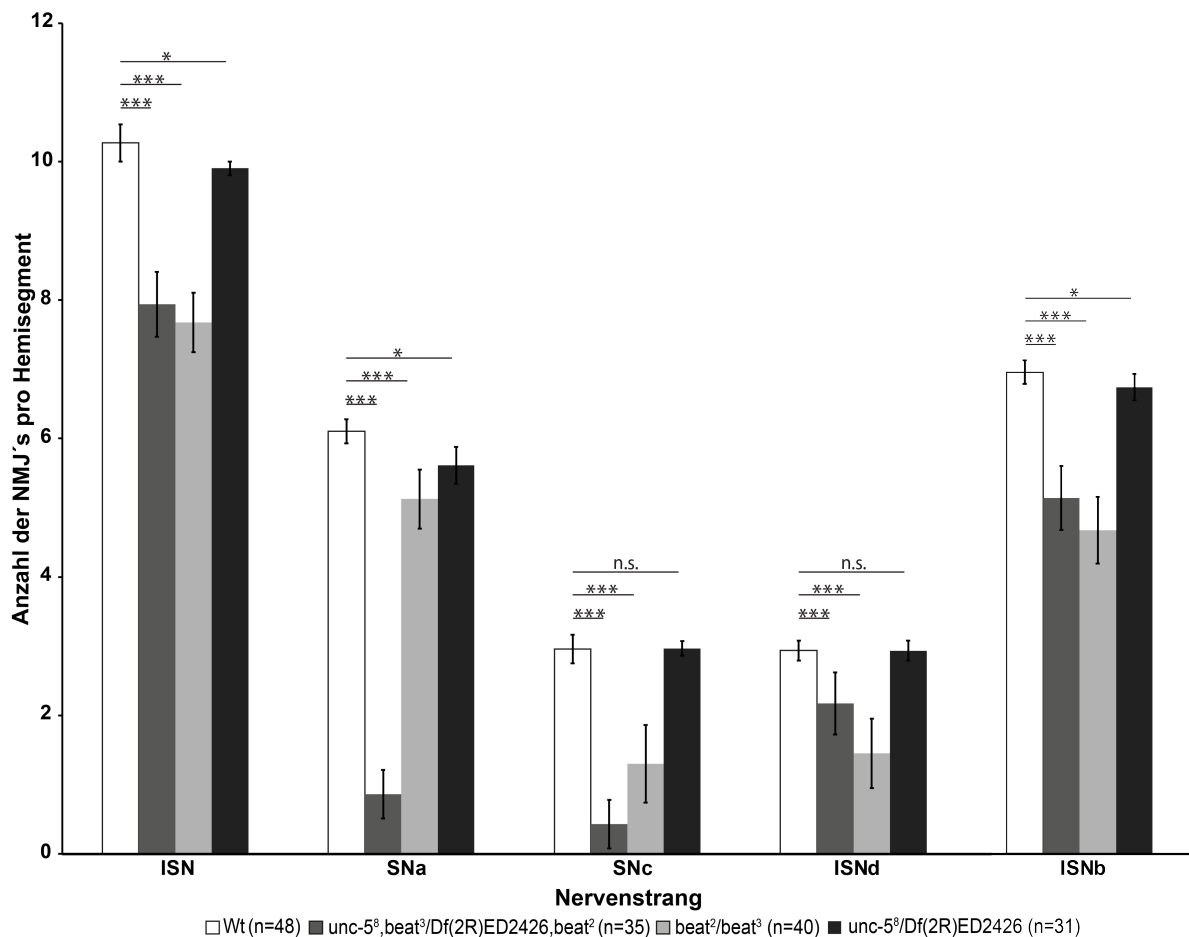


**Abbildung 2.2: Starke laterale und ventrale Projektionsfehler in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten.** Konfokale Aufnahmen abdominaler Muskelfelder. Aufteilung in dorsal, lateral und ventral. Pfeile deuten auf fehlende NMJ's. (A-B) ShGFP Larve spiegelt die wildtypische Anordnung der NMJ's wider. (C-D) *unc-5* Einzelmutante zeigt leichte Defekte im lateralen Bereich. (E-F) Verlust von *beat* führt zu starken Wegfindungsdefekten im ventralen Muskelfeld. (G-H) *Unc-5* und *beat* doppelmutante Larve zeigt eine Reduktion von NMJ's im lateralen und ventralen Muskelfeld. Der Bildstapel im lateralen Bereich wurde auf die laterale Muskulatur beschränkt, um die Innervierungsdefekte der Muskeln 21-24 hervorzuheben.

## Ergebnisse

Bei der stärksten Ausprägung können keine NMJ's im ventralen Muskelfeld verzeichnet werden. Leichte Defekte sind auch im lateralen Muskelfeld erkennbar und betreffen oftmals Muskel 24. Die gravierendsten Innervierungsdefekte sind in *unc-5* und *beat* doppelmutanten Larven präsent und sind im ventralen und lateralen Muskelfeld vorzufinden. Laterale Innervierungsdefekte betreffen Muskel 21- 24, 5 und 8 können in nahezu jedem Segment und jeder Larve identifiziert werden. Zusätzlich zeigen die ventralen Bereiche einen *beat* ähnlichen Phänotyp.

Diese Beobachtungen lassen sich mit Hilfe einer statistischen Analyse der NMJ's verifizieren. Diese sollte Aussagen über die Wegfindungsdefekte der unterschiedlichen Nervenstränge ermöglichen (Abb. 2.3).



**Abbildung 2.3: *Unc-5* und *Beat* Verlust führt zu Wegfindungsdefekten des SNas und SNcs.**

Quantitative Zählung der NMJ's pro Hemisegment und Nervenstrang. *unc-5* Einzelmutanten zeigen eine leichte Reduktion der NMJ's, die vom SNa gebildet werden. Der *Beat* Verlust wirkt sich vor allem auf die NMJ's des SNcs, ISNds und ISNbs aus. Doppelmutante *unc-5* und *beat* Larven zeigen starke Wegfindungsdefekte des SNas und SNcs und leichtere Defekte des ISNds und ISNbs. Mann-Whitney U Test; \* $p < 0,005$ .

Hierfür wurden pro Hemisegment NMJ's von 29 Muskeln quantifiziert und spezifisch, je nach Nervenstrang, ausgewertet. Das wildtypische Muskelfeld umfasst eine

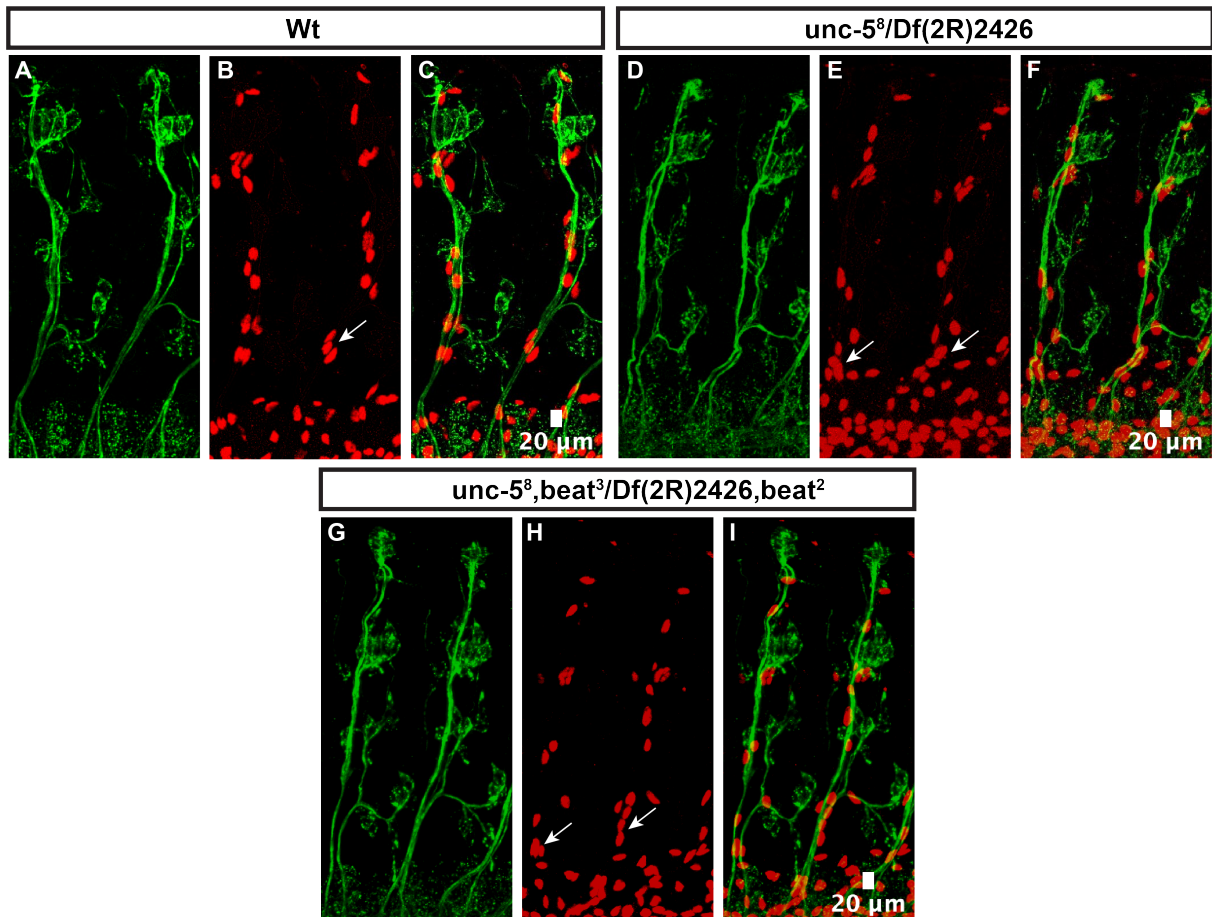
## Ergebnisse

Gesamtanzahl von 30 Muskeln, allerdings wurde Muskel 25 bedingt durch seine Position und Innervierung durch einen eigenen Nervenstrang (TN) von der Auswertung ausgeschlossen. Sowohl für den SNa, als auch für den SNc konnte in der *unc-5* und *beat* Doppelmutante eine gravierende Reduktion an neuromuskulären Verbindungen festgestellt werden [SNa:  $0,86 \pm 0,35$  und SNc:  $0,43 \pm 0,35$  NMJ's pro Hemisegment verglichen mit SNa:  $6,10 \pm 0,18$  und SNc:  $2,96 \pm 0,20$  für den Wildtyp]. Dieser Rückgang an NMJ's konnte weder für die *unc-5* [SNa:  $5,61 \pm 0,27$  und SNc:  $2,97 \pm 0,10$ ], noch für die *beat* Einzelmutante [SNa:  $5,12 \pm 0,43$  und SNc:  $1,30 \pm 0,56$ ] gezeigt werden. Eine signifikante Verminderung an ausgebildeten Endplatten zeigte der alleinige Verlust von *unc-5* [SNa:  $5,61 \pm 0,27$  verglichen mit dem Wildtyp SNa:  $6,10 \pm 0,18$ ] im lateralen Muskelfeld (SNa) und *beat* Mutanten im ventralen Muskelfeld [ISNb:  $4,68 \pm 0,48$ , ISNd:  $1,45 \pm 0,50$  und SNc:  $1,30 \pm 0,56$  verglichen mit dem Wildtyp ISNb:  $6,96 \pm 0,172$ , ISNd:  $2,94 \pm 0,14$  und SNc:  $2,96 \pm 0,20$ ].

Der larvale *unc-5* und *beat* doppelmutante Phänotyp entsteht bereits während der embryonalen Entwicklung, bleibt bis in das larvale Stadium erhalten (Abb. 2.1 und Abb. 2.2) und wirft Fragen nach der Entstehungsursache auf. Auswachsene Axone erhalten in der Peripherie von unterschiedlichen Geweben wegweisende Informationen, wie der Muskulatur oder den sensorischen Neuronen (Hartenstein, 1988; Landgraf et al., 1999a). In *unc-5* mutanten Embryonen sind neben den Projektionsdefekten ebenfalls Migrationsdefekte der Gliazellen erkennbar, welche im ZNS geboren werden und während der embryonalen Entwicklung entlang der entstehenden motorischen Nerven in die Peripherie migrieren (Abb. 2.4) (Von Hilchen et al., 2010). Der Verlust von Unc-5 bewirkt ein Verweilen der Gliazellen in der Nähe des ZNS und führt somit zu einer verringerten Anzahl an glialen Zellen in der Peripherie. Einen ähnlichen Phänotyp konnte auch für den simultanen Verlust der Netrine (A und B) gezeigt werden, die durch den Unc-5 Rezeptor als abstoßendes Signal interpretiert werden (Von Hilchen et al., 2010). Diese Defekte werden durch den simultanen Verlust von *unc-5* und *beat* nicht verstärkt und können somit nicht die Ursache für die fehlerhafte axonale Wegfindung sein (Abb.2.4).



## Ergebnisse

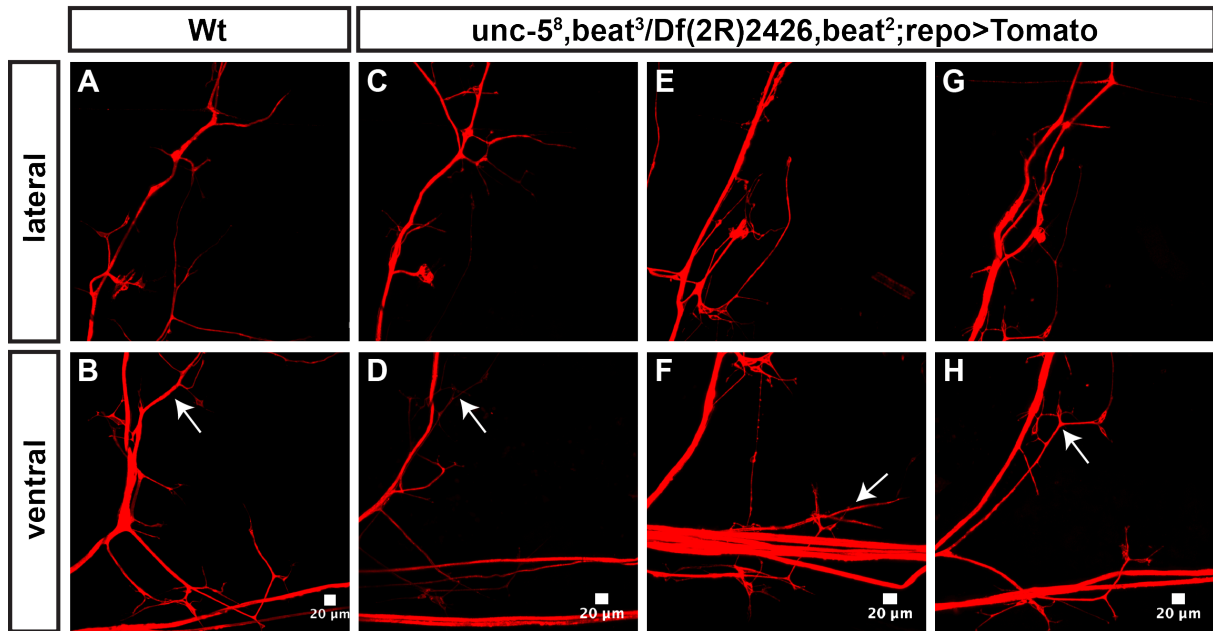


**Abbildung 2.4: Keine Verstärkung des *unc-5* mutanten Gliazellen Migrationsphänotyps in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten.**

Visualisierung der glialen Zellen mittels einer Antikörperfärbung gegen Reversed polarity (*repo*) (rot) und Markierung der sensorischen Neurone mithilfe einer Färbung gegen Ankyrin 2 (*ank2*) (grün). (A-C) Konfokale Bilder der wildtypischen Anordnung von Gliazellen und Projektion sensorischer Neurone. (D-F) Beeinträchtigte Migration der glialen Zellen in *unc-5* mutanten Embryonen. Gliazellen erreichen nicht ihre stereotypische Position in der Peripherie. (G-I) *Unc-5* und *beat* Doppelmutanten zeigen keine Verstärkung des *unc-5* mutanten Gliazellen Migrationsphänotyps.

Eine Expression des Fluoreszenzproteins CD4tdTomato in Gliazellen sollte indirekt eine Markierung des segmentalen Nervs ermöglichen und somit seine larvale Projektionsroute in den Doppelmutanten offenbaren. Im Wildtyp trennt sich der SNa im ventralen Muskelfeld vom ISN und projiziert zu den lateralen Muskeln, während der ISN seinen Weg zum dorsalen Muskelfeld fortsetzt (Abb.2.5 B). Die Verlustmutanten hingegen zeigen oftmals keine wildtypische und vor allem einheitliche Projektion dieses Nervs (Abb. 2.5 C-H). Häufig wird der SNa nicht richtig ausgebildet oder befindet sich im falschen Muskelfeld. Dies führt zu einer uneinheitlichen axonalen Projektion in den larvalen abdominalen Hemisegmenten und veranschaulicht die Fehlleitung des segmentalen Nervs.

## Ergebnisse

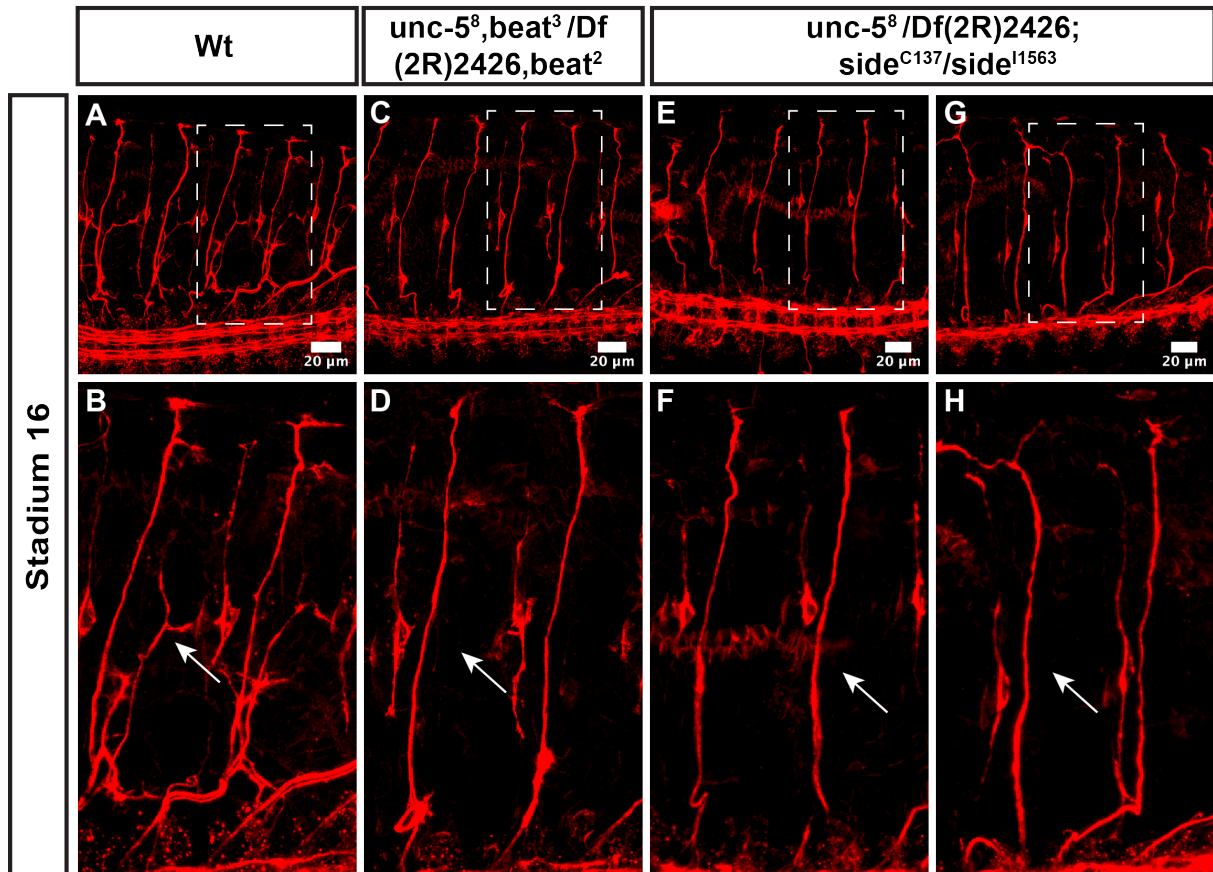


**Abbildung 2.5: *Unc-5* und *beat* doppelmutante Larven zeigen starke Projektionsfehler des SNAs.** Gliazspezifische Expression von CD4tdTomato mit *repo*-Gal4 ermöglicht eine indirekte Markierung der axonalen Projektionsrouten in der Larve. Darstellung der ventralen und lateralen Bereiche abdominalen Hemisegmente von Ganzkörperlarven. Pfeile deuten auf den SNAs. (A-B) Nervenverlauf im Wildtyp. (C-H) Irreguläre SNA Projektionen in der *unc-5* und *beat* mutanten Larven. Der SNA ist kaum ausgebildet, oder zeigt starke Projektionsdefekte.

Die SNA spezifischen Wegfindungsdefekte in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten werden vermutlich durch die simultane Hemmung des anziehenden *Beat* path Ia/Sidestep und des abstoßenden *Unc-5*/Netrin Signalweges hervorgerufen.

Um diese These zu überprüfen erfolgte eine Analyse von *unc-5* und *side* Doppelmutanten. Da *beat* und *side* Mutanten einen ähnlichen Phänotyp zeigen, sollten *unc-5* und *side* Doppelmutanten auf übereinstimmende Innervierungsdefekte überprüft und mit denen der *unc-5* und *beat* Mutanten verglichen werden (Fambrough and Goodman, 1996). Eine Markierung der axonalen Projektionen in Embryonen zeigt einen Phänotyp, welcher dem *unc-5* und *beat* doppelmutanten Phänotyp entspricht. Es sind Wegfindungsdefekte des SNAs und aller ventralen Nervenstränge im Embryo nachweisbar (Abb. 2.6). Ebenfalls zeigen die Embryonen einen variablen Phänotyp, welcher, bei einer milden Ausprägung, verkürzte und stark reduzierte Projektionen im ventralen Muskelfeld erkennen lässt. Jedoch projiziert der ISN selbst bei einer starken Ausprägung allein in die Peripherie.

## Ergebnisse

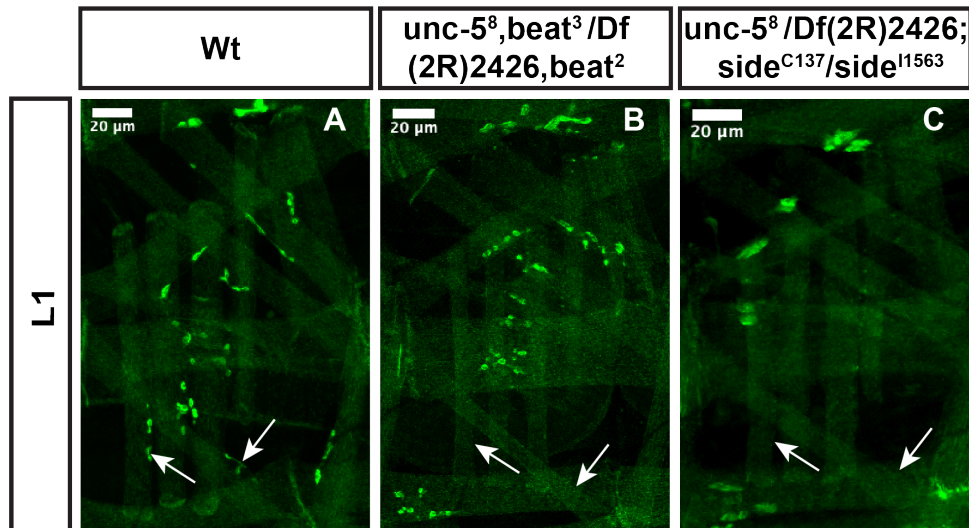


**Abbildung 2.6: Simultaner Verlust von *unc-5* und *side* entspricht dem *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyp.**

Embryonen im 16. Entwicklungsstadium. Visualisierung der axonalen Projektion mittels einer Fluoreszenzmarkierung von FasII. Pfeile deuten auf die Projektion des segmentalen Nervs a. (A-B) Wildtypische axonale Projektion. Axone des segmentalen Nervs bilden einen 90° Winkel im lateralen Muskelfeld. (C-D) Simultaner Verlust von *Unc-5* und *Beat* bewirkt Projektionsdefekte des SNas und aller ventralen Nervenstränge. (E-H) Starke Projektionsdefekte im lateralen und ventralen Muskelfeld in *unc-5* und *side* Doppelmutanten.

Die embryonalen Innervierungsdefekte in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten überdauern bis in das larvale Stadium und wurden ebenfalls in den *unc-5* und *side* doppelmutanten Larven analysiert und sollten Aufschlüsse über die Ausprägung des Phänotyps ermöglichen. Bedingt durch die Letalität der Larven in späteren larvalen Entwicklungsstadien war im Gegensatz zu den *unc-5* und *beat* Doppelmutanten nur eine Analyse des Innervierungsmuster im ersten Larvenstadium (L1) möglich. Jedoch zeigen die *unc-5* und *side* mutanten Larven Innervierungsdefekte im lateralen und ventralen (Muskelfeld nicht gezeigt) Bereich, die dem Phänotyp der *unc-5* und *beat* mutanten Larven entsprechen (Abb. 2.7). Auch hier können die SNa spezifischen Wegfindungsdefekte detektiert werden, welche die Muskeln 21-24, 5 und 8 betreffen.

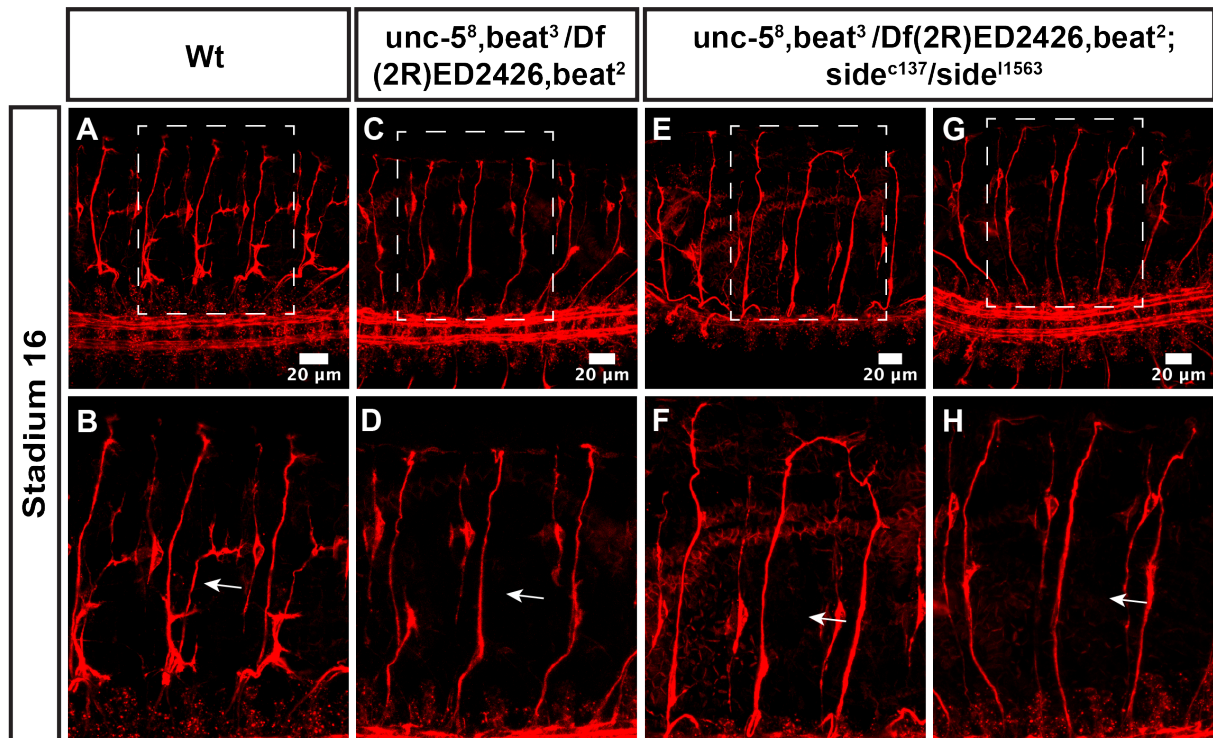
## Ergebnisse



**Abbildung 2.7: Starke laterale Innervierungsdefekte in *unc-5* und *side* mutanten L1 Larven.**

Mikroskopie Aufnahmen von intakten Larven im ersten Larvenstadium. Markierung der neuromuskulären Verbindungen und Muskulatur mittels ShGFP. NMJs in hellgrün und Muskeln in dunkelgrün. Pfeile deuten auf Muskel 21 und 5. (A) Wildtypisches Innervierungsmuster der Larvalen, lateralen Muskulatur. (B) Fehlennervierungen der lateralen Muskeln in *unc-5* und *beat* mutanten Larven. (C) Laterale Muskeln zeigen fehlende neuromuskuläre Verbindungen in *unc-5* und *side* Mutanten. Der larvale Phänotyp entspricht dem *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyp.

Zusätzlich erfolgte eine Analyse des embryonalen Innervierungsmusters in *unc-5*, *beat* und *side* Dreifach-Mutanten, deren Phänotyp keine Verstärkung im Vergleich zu den jeweiligen Doppelmутanten zeigt (Abb.2.8).



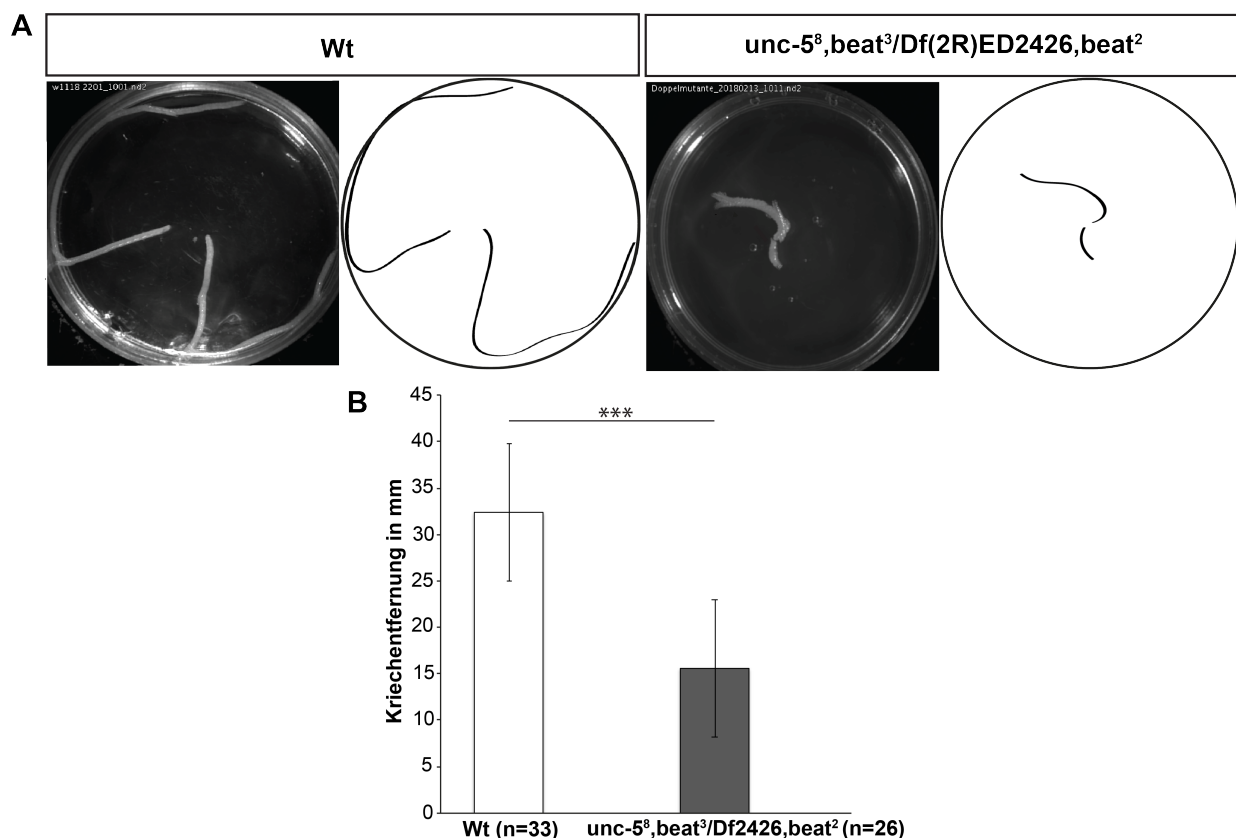
**Abbildung 2.8: *Unc-5*, *beat* und *side* Dreifach-Mutanten zeigen keine Verstärkung des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps.**

Markierung der axonalen Projektion anhand einer FasII-Antikörperfärbung. Pfeile deuten auf den SNa. (A-B) Wildtypisches Innervierungsmuster. (C-D) Verlust der SNa Projektion in *unc-5* und *beat* Doppelmутanten. (E-H) Dreifach-Mutanten zeigen keine Verstärkung des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps.



## 2.2. Veränderte larvale Lokomotion in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten

Fehlinnervierungen der somatischen Muskulatur können zu Fehlern im Bewegungsablauf von Larven und der adulten Tiere führen (Kinold et al., 2018, 2021). Der simultane Verlust von *Unc-5* und *Beat* erzeugt starke Innervierungsdefekte der lateralen und ventralen Muskulatur. Um zu prüfen, ob der Verlust der Endplatten an der lateralen Muskulatur ebenfalls zu Bewegungsdefekten führt, wurde zunächst mittels eines Kriech-Assays überprüft. Für den Assay wurden zwei Larven des dritten Entwicklungsstadiums in die Mitte einer Agarplatte platziert und für drei Minuten gefilmt. Die zurückgelegte Strecke konnte mithilfe der Fiji Software analysiert werden (Abb. 2.9A). Innerhalb einer Minute legte eine wildtypische Larve im Durchschnitt eine Strecke von  $32,37 \pm 7,45$  mm zurück (Abb. 2.9 B). Im Gegensatz dazu erreichten *unc-5* und *beat* doppelmutante Larve nur eine Wegstrecke von  $15,58 \pm 7,44$  mm (Abb. 2.9B).

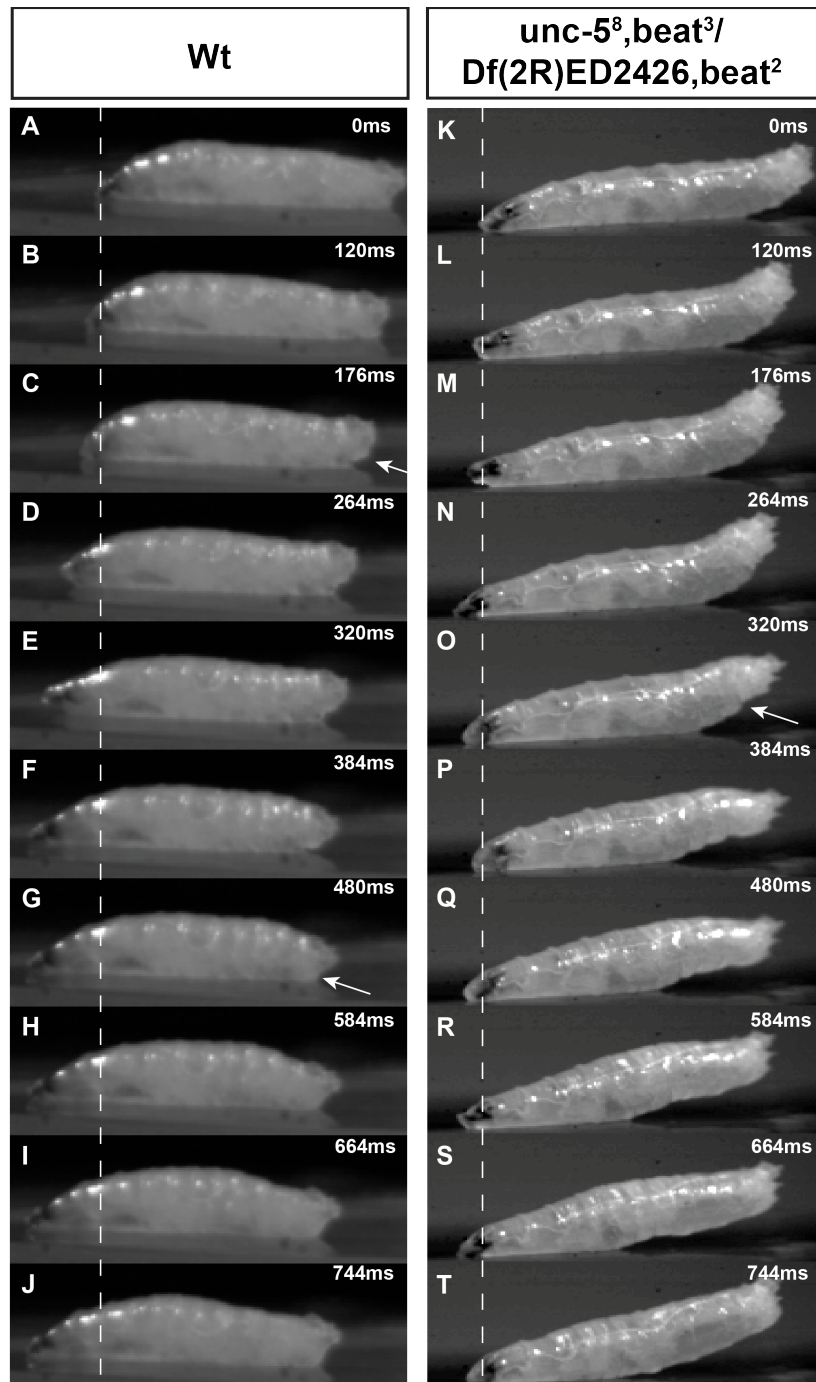


### Abbildung 2.9: *Unc-5* und *beat* mutante Larven kriechen mit reduzierter Geschwindigkeit.

(A-B) Zurückgelegte Wegstrecke der wildtypischen und *unc-5* und *beat* doppelmutanten Larven. Links: Strecke auf der Agarplatte. Rechts: Nachgezeichnete Wegstrecke der Larven. (C) Krabbelndistanz wildtypischer und *unc-5* und *beat* mutanter Larven in mm. Doppelmutanten legen in der gleichen Zeit eine geringere Strecke zurück als der Wildtyp. Signifikanz wurde mit dem T-Test ermittelt: \* $p < 0,05$  n = Anzahl der getesteten Larven. wildtypischer und *unc-5* und *beat* mutanter Larven in mm. Doppelmutanten legen in der gleichen Zeit eine geringere Strecke zurück als der Wildtyp. Signifikanz wurde mit dem T-Test ermittelt: \* $p < 0,05$  n = Anzahl der getesteten Larven.

## Ergebnisse

Mithilfe von einer Hochgeschwindigkeits-Kamera konnten Larven während ihrer Kriechbewegung gefilmt und anschließend analysiert werden, um einen detaillierten Einblick in den Bewegungsablauf zu erhalten (Abb. 2.10).



**Abbildung 2.10: *Unc-5* und *beat* doppelmutante Larven zeigen ein verändertes Kriechverhalten.** Montagen der Highspeed-Movies visualisieren die Lokomotion des Wildtyps und der Doppelmutante. (A-J) Wildtypische Larve hebt die hintersten Segmente an und schiebt den Kopf nach vorne. Das Aufdrücken des posterioren Endes startet die peristaltische Welle von posterior nach anterior. Pfeile markieren das Anheben und Aufsetzen des posterioren Endes. (K-T) Doppelmutante Larve hebt die posterioren Segmente stark an und verliert den Kontakt zu Substrat.

## Ergebnisse

Während des Kriechens wandern peristaltische Kontraktionswellen von posterior nach anterior über die Larve (Berrigan and Pepin, 1995). Eine Welle beginnt mit dem Anheben posterior gelegener Segmente, die weiter anterior wieder abgelegt werden. Währenddessen bleibt das posteriore Ende weiterhin mit dem Substrat in Kontakt. Das Anheben der Segmente setzt sich bis zu den Kopfsegmenten fort, auf dessen das Versetzen der Mundhaken und des posterioren Endes in Kriechrichtung folgt. Dieser Bewegungsablauf wird ständig wiederholt und ermöglicht der Larve, in Kombination mit der segmentalen Kontraktion, ein Gleiten über das Substrat (Abb. 2.10). Das Kriechverhalten der *unc-5* und *beat* doppelmutanten Larven unterscheidet sich auffallend von der Lokomotion des Wildtyps. Während der Fortbewegung werden die posterioren Segmente stark angehoben und verlieren den Kontakt zum Substrat. Eine peristaltische Welle konnte allerdings trotzdem beobachtet werden und ermöglichte so vermutlich ein sehr langsames Vorankommen.

Durch die Beobachtung des veränderten Kriechverhaltens von *unc-5* und *beat* Doppelmutanten stellt sich die Frage, ob noch weitere Bewegungsabläufe durch die Fehlinnervierungen der Muskulatur beeinträchtigt werden. Analysiert wurde das larvale Fluchtverhalten, ein überlebenswichtiges und oftmals stereotypisches Verhaltensmuster.

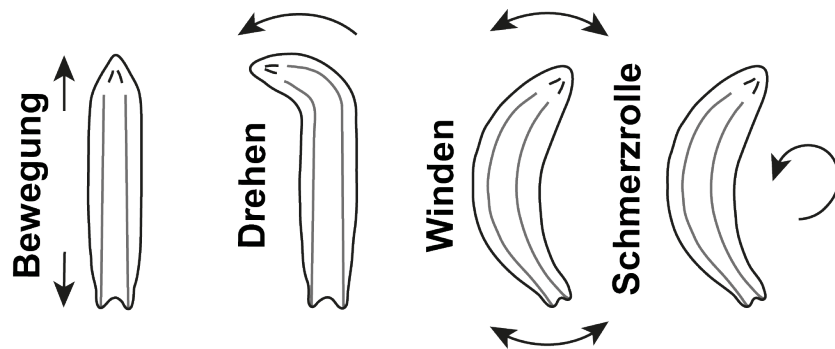
Damit eine *Drosophila* Larve einer Hitzequelle, lokalen mechanischen Druck oder einem bedrohlichen Angriff (z.B. durch eine Schlupfwespe) entkommen kann, vollziehen sie eine laterale Drehung um ihre Körperlängsachse (Tracey et al., 2003). Innervierungsdefekte im lateralen Muskelfeld könnten die Ausführung einer solchen Fluchrolle beeinträchtigen, da Signale, nach der Detektion durch die *c1Vda* Neurone und nachgeschalteten Interneurone, zumindest teilweise über die *SNa* Neurone transduziert werden (Yoshino et al., 2017).

Um die Bedeutung einer uneingeschränkten Funktionalität der lateralen Muskulatur für das Fluchtverhalten zu untersuchen, wurde ein Experiment mit parasitoiden Wespen durchgeführt. Das Überleben in freier Wildbahn von *Drosophila* Larven wird häufig von parasitoiden Wespen bedroht (Carton et al., 1986).

Mithilfe eines Ovipositors injizieren sie ihre Eier, durch die Kutikula, in die Körperhöhle sich entwickelnder Larven. Die Wespe wächst im Inneren heran und ernährt sich von

## Ergebnisse

der Larve. Nach der Verpuppung schlüpft an Stelle der Fliege die *Leptopilina* Wespe. Für den Versuch wurden jeweils 5 Larven des 3. Larvalstadiums eines Genotyps auf eine Agarplatte platziert und 3 befruchteten Wespen Weibchen ausgesetzt. Während einer Attacke von *Leptopilina boulandi* zeigen *Drosophila* Larven unterschiedliche Verhaltensreaktionen, die häufig miteinander kombiniert werden und die Eiablage des Parasitoids verhindern sollen (Robertson et al., 2013) (Abb. 2.11). Die Wespenattacken wurden aus dorsaler Perspektive mit einer Videokamera aufgenommen und ermöglichte die Auswertung der larvalen Verhaltensreaktionen mit Hilfe der Fiji-Software am PC.



**Abbildung 2.11: Verhaltensreaktionen von *Drosophila* Larven auf Wespenattacken.**

Larven reagieren auf Attacken mit unterschiedlichen Verhaltensreaktionen. Vor- und Rückwärtsbewegung, sowie das Drehen des Kopfes kann die angreifende Wespe abwehren. Auch ist das Winden, unter dem man schnelle Bewegungen der Kopf- und Schwanzsegmente versteht, eine effektive Methode der Verteidigung, sowie die Schmerzrolle. Abbildung verändert nach (Robertson et al., 2013).

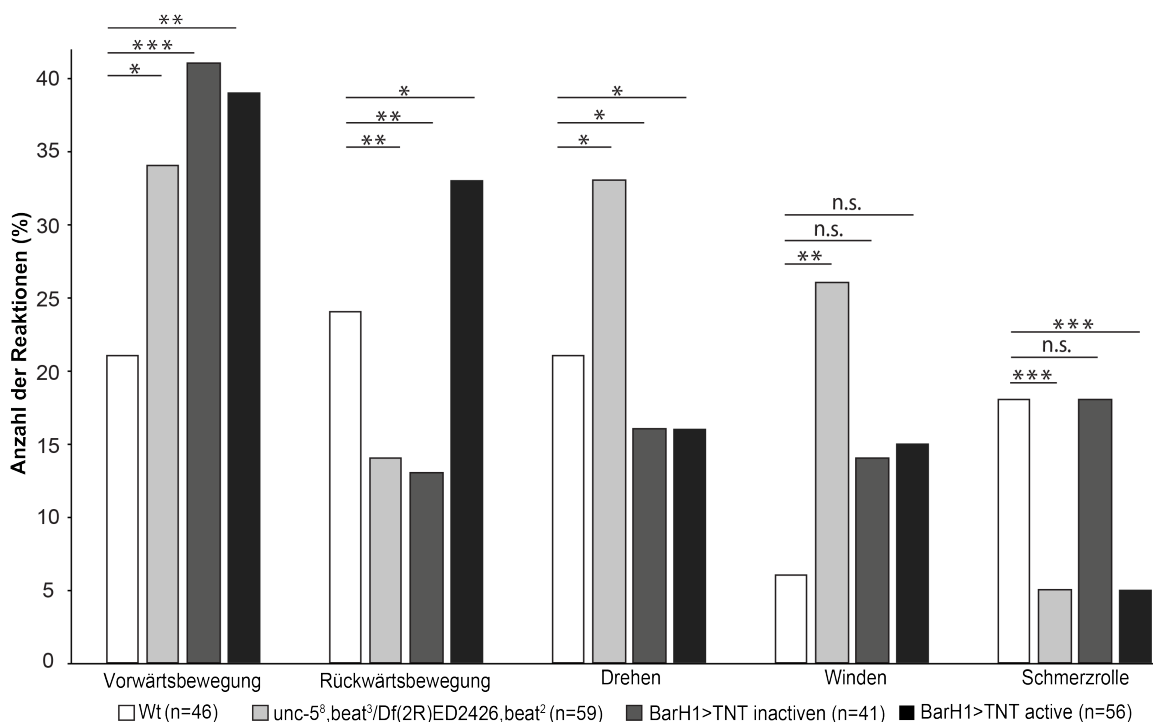
Die Verhaltensreaktionen auf die Wespenattacken von *unc-5* und *beat* Mutanten wurden mit denen des Wildtyps verglichen (Abb. 2.12). Zusätzlich umfasste die Analyse Larven, welche in SNa Motoneuronen spezifisch das Nervengift Tetanustoxin (TNT) exprimierten. Dieser Inhibitor spaltet Synaptobrevin und verhindert so die Transmitterausschüttung, wodurch die Kontraktion in den verbundenen Muskeln unterbunden wird (Sweeney et al., 1995).

Eine Larve wehrt die Attacken von *Leptopilina boulandi* primär durch Vor- und Rückwärtsbewegung ab [40%] (Robertson et al., 2013). Gefolgt von dem Winden [22%] und zu gleichen Anteilen durch das Drehen der Kopfsegmente [19%] und der Schmerzrolle [19%] (Robertson et al., 2013). Unter unseren Bedingungen wehrte der Wildtyp die Attacken der Wespen ebenfalls vor allem durch die Vor- und Rückwärtsbewegung [23% und 26,66%, gesamt: 49,66%] ab. Gefolgt von dem Drehen der Kopfsegmente [23,33%] und der Schmerzrolle [18%] (Abb. 2.12). Am



## Ergebnisse

seltensten war das Winden beobachtbar [9%]. *Unc-5* und *beat* Doppelmutanten hingegen zeigten eine starke Reduktion der Schmerzrolle [4,46%] und versuchten der Wespe vor allem durch die Vorwärtsbewegung [30,36%] und dem Drehen [29,46%] und Winden [23,21% verglichen mit dem Wildtyp 9%] zu entkommen. Ebenso führte die SNa spezifische Expression von TNT zu einer signifikanten Reduktion der Schmerzrolle [4,63%]. Auch diese Larven versuchten die Bewegungseinschränkung durch die TNT Expression zu kompensieren und entkamen den Wespen vor allem durch Vor- und Rückwärtsbewegungen [36,11% und 30,56%]. Wurde die inaktive Variante von TNT exprimiert, zeigten die Larven eine ähnliche Häufigkeit an Schmerzrollen wie der Wildtyp [17,65%]. Interessanterweise konnte vermehrt das vorwärtsgerichtete Kriechen als Verhaltensreaktion [36,11%] auf die Wespenattacke beobachtet werden. Insgesamt wirkte sich sowohl die Lähmung der lateralen Muskulatur, durch die Expression von TNT, als auch der Verlust der lateralen Innervierungen negativ auf die Ausführung der schmerzinduzierten lateralen Rolle aus.



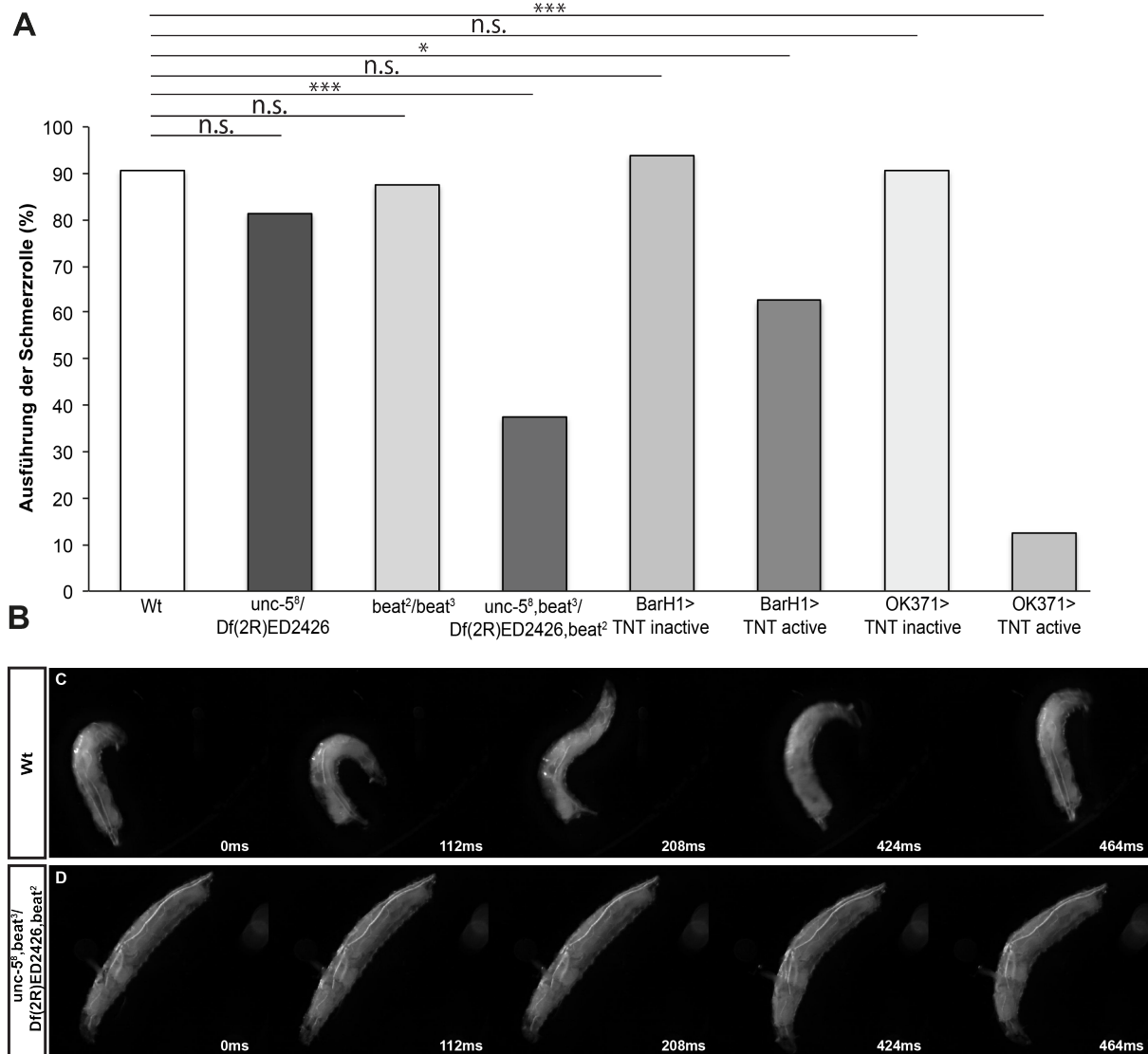
### Abbildung 2.12: Drastische Reduktion der Schmerzrolle beim Verlust von *Unc-5* und *Beat*.

Quantitative Auswertung der Verhaltensreaktionen von *Drosophila* Larven auf Wespenattacken. Anzahl an durchgeführten Schmerzrollen von *unc-5* und *beat* Doppelmutanten ist stark reduziert. SNa spezifische Expression von TNT vermindert die Ausführung der Schmerzrolle ebenfalls. \* $p < 0,05$  (Fisher's Exakt Test).

Ebenfalls wurde ein Hitzeplatten-Assay durchgeführt, um die Einschränkung des Fluchtverhaltens zu bestätigen. Hierfür wurden die Larven in einem 38° warmen

## Ergebnisse

Wassertropfen auf eine Hitzeplatte platziert und für eine Minute getestet. Die Anzahl der ausgeführten Schmerzrollen wurde gezählt (Abb. 2.13).



**Abbildung 2.13: Reduziertes Fluchtverhalten von *unc-5* und *beat* mutanten Larven auf der Hitzeplatte.**

(A) Statistische Auswertung des Rollverhaltens von Larven unterschiedlichen Genotyps (n=32). Signifikant weniger Schmerzrollen wurden von *unc-5* und *beat* Doppelmutanten ausgeführt. Schwach reduziert ist das Rollverhalten von *unc-5* und *beat* Einzelmutanten. Expression von TNT SNA spezifisch vermindert das laterale Rollen ebenfalls, gegensätzlich zu Expression des Toxins in allen Motoneuronen, welches das seitliche Rollen fast vollständig vermindert. \* $p < 0,05$  (Fisher's Exakt Test) (B) Wildtypische Larve zeigt die Schmerzrolle auf der Hitzeplatte. Der Verlust von Unc-5 und Beat beeinträchtigt das Rollverhalten der Larven.

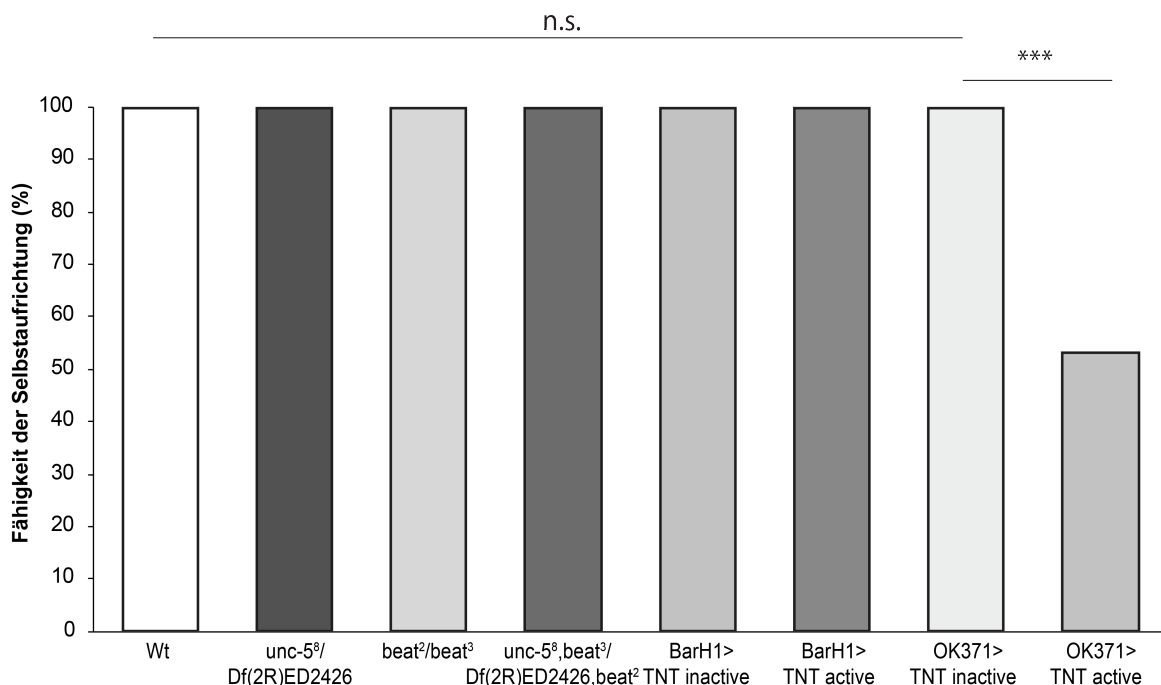
Eine Reduktion an vollzogenen Schmerzrollen zeigten die *unc-5* [81,3% verglichen mit 90,6% für den Wildtyp] und *beat* [87,5%] Einzelmutanten (Abb. 2. 13). Gegensätzlich zu den *unc-5* und *beat* Doppelmutanten, welche ein stark vermindertes Rollverhalten zeigten [37,5%]. Die Larven bewegten sich sehr aktiv im Wassertropfen und zeigten Versuche einer Fluchtrolle, welche allerdings nicht umgesetzt werden konnten.

## Ergebnisse

Ebenfalls führte die SNa spezifische Expression von TNT zu einer Reduktion des Fluchtverhaltens [62,5%], das noch weiter gesenkt werden konnte durch eine Expression des Nervengiftes in allen glutamatergen Neuronen mit OK371-Gal4 [12,5%]. Keine signifikante Reduktion an Schmerzrollen konnte für die Expression der inaktiven Variante von TNT verzeichnet werden [BarH1>TNT inaktiv: 93,8% und OK371>TNT inaktiv: 90,6%]. Diese Larven zeigten ein wildtypisches Verhalten auf der Hitzeplatte.

Zusätzlich wurde das Bewegungsverhalten der Doppelmutanten, welches nicht als Reaktion auf einen schmerzhaften Reiz gezeigt wird, getestet.

Wird eine *Drosophila* Larve invertiert, zeigt sie ein spezifisches Bewegungsmuster um zurück in die Kriechposition zu gelangen (Berrigan and Pepin, 1995). Die Bewegungsabfolge der Selbstaufrichtung beginnt mit dem Drehen des Kopfes, gefolgt von dem Vergraben des Mundhakens in das Substrat und schlussendlich ermöglicht eine laterale Rollbewegung, dass die ventrale Körperfläche wieder zurück auf den Untergrund gebracht wird. Allein die Expression von TNT in allen Motoneuronen minderte die Fähigkeit der Selbstaufrichtung (Abb. 2.14).



**Abbildung 2.14: Verlust von Unc-5 und Beat beeinträchtigt nicht die Fähigkeit der Selbstaufrichtung.**

Prozentzahlen der Selbstaufrichtung unterschiedlicher Genotypen. Expression von TNT in allen glutamatergen Neuronen reduziert die Fähigkeit der Larven zurück in die Kriechposition zu gelangen. n= 30 Larven pro Genotyp. Fisher's Exakt Test; \*p< 0,05.

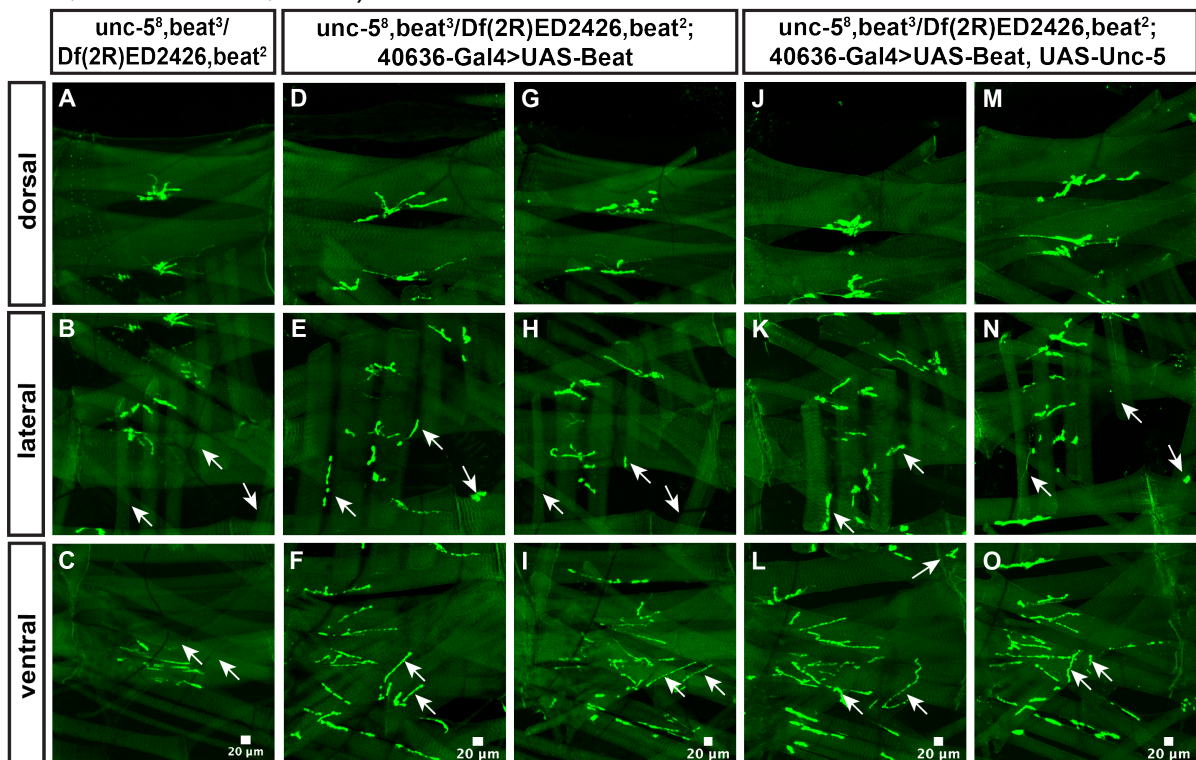
## Ergebnisse

Durch die Expression des Nervengiftes konnte eine 50%ige Reduktion dieser Fähigkeit festgestellt werden. Unvermindert ausgeführt wurde dieses Bewegungsmuster bei allen sonstigen getesteten Genotypen.

Die Reduktion der lateralen NMJ's, bedingt durch den Verlust von Unc-5 und Beat, wirkt sich somit auf die Ausführung der Schmerzrolle aus und verdeutlicht die Notwendigkeit einer fehlerfreien Innervierung der lateralen Muskeln durch den SNa.

### 2.3 Partielle Rettung des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps

Der Rezeptor Beaten path Ia wird während der embryonalen Entwicklung in Motoneuronen exprimiert (Fambrough and Goodman, 1996). Eine Rettung des *beat* mutanten Phänotyps konnte bereits in vorhergegangenen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe durch die Verwendung des pan-neuralen Treibers elav-Gal4 oder der motoneuron-spezifischen Enhancer Fragment Linie 40636 erzielt werden (Kinold, 2016; Siebert et al., 2009).



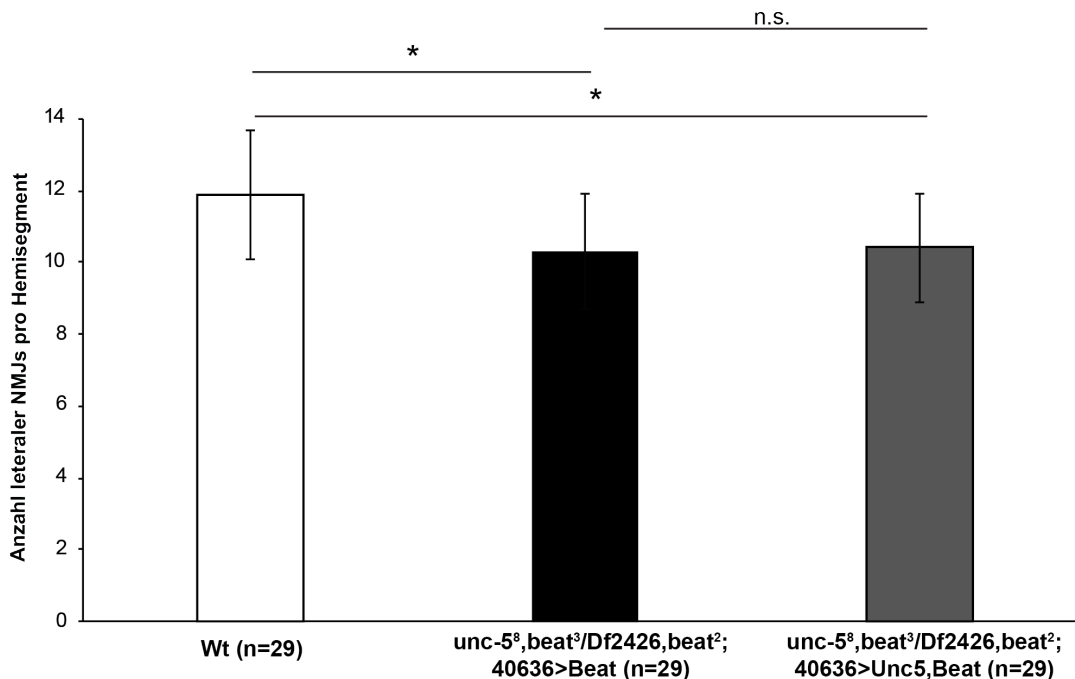
**Abbildung 2.15: Unvollständige Rettung des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps.**

Expression von wildtypischer Beat und Unc-5 cDNA mit Enhancer Fragment Linie 40636 im *unc-5* und *beat* doppelmutanten Hintergrund. Konfokale Aufnahmen abdominaler Muskelfelder. Aufteilung in dorsales, laterales und ventrales Muskelfeld. Pfeile zeigen auf NMJ's im lateralen und ventralen Bereich. (A-C) Wildtypisches Innervierungsmuster. (D-I) Beat Expression mit Treiberlinie 40636 rettet den doppelmutanten Phänotyp teilweise. (D-F) Segment zeigt eine wildtypische Anzahl und Positionierung der NMJ's. (G-H) Einige Segmente zeigen weiterhin fehlende Innervierungen auf lateralen Muskeln. (J-O) Simultane Unc-5 und Beat Expression mit Treiberlinie 40636 rettet den mutanten Phänotyp teilweise. Expression beider Rezeptoren bringt ebenfalls das wildtypische ventrale

## Ergebnisse

Innervierungsmuster zurück, leichte Wegfindungsdefekte bleiben im lateralen Bereich einiger Segmente erkennbar.

Die 40636-Gal4 Linie wurde in den *unc-5* und *beat* mutanten Hintergrund gekreuzt. Durch die Expression von wildtypischer Beat cDNA konnte eine unvollständige Rettung des doppelmutanten Phänotyps erzielt werden (Abb. 2.15 D-I). Die larvalen Innervierungsdefekte im ventralen Bereich können vollständig behoben werden, auch zeigen viele Segmente im lateralen Muskelfeld alle zugehörigen NMJs (Abb. 2.15 D-F). Allerdings bleiben leichte Innervierungsdefekte betreffend die lateralen Muskulatur in einigen Segmenten bestehen (Abb. 2.15 G-I). Eine partielle Rettung des doppelmutanten Phänotyps konnte allerdings nur in der Larve erzielt werden. Embryonen des identischen Genotyps zeigten weiterhin den *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyp (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine vollständige Rettung des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps konnte weder durch die alleinige Expression von Beat, noch durch die simultane Expression von Unc-5 und Beat, unter Verwendung der *beat* Enhancer Fragment Linie 40636, erzielt werden (Abb. 2.15 J-O). Auch diese Larven zeigen in einigen lateralen Hemisegmenten nicht die wildtypische Anzahl an neuromuskulären Endigungen. (Abb. 2.15 M-O). Eine statistische Auszählung der Anzahl an lateralen NMJ's konnte keinen signifikanten Unterschied, zwischen den beiden Rettungsversuchen, einer Rettung mit Beat [ $10,31 \pm 1,63$  verglichen mit dem Wildtyp  $11,9 \pm 1,80$ ] oder Beat und Unc-5, herausstellen [ $10,41 \pm 1,63$ ] (Abb. 2.16).



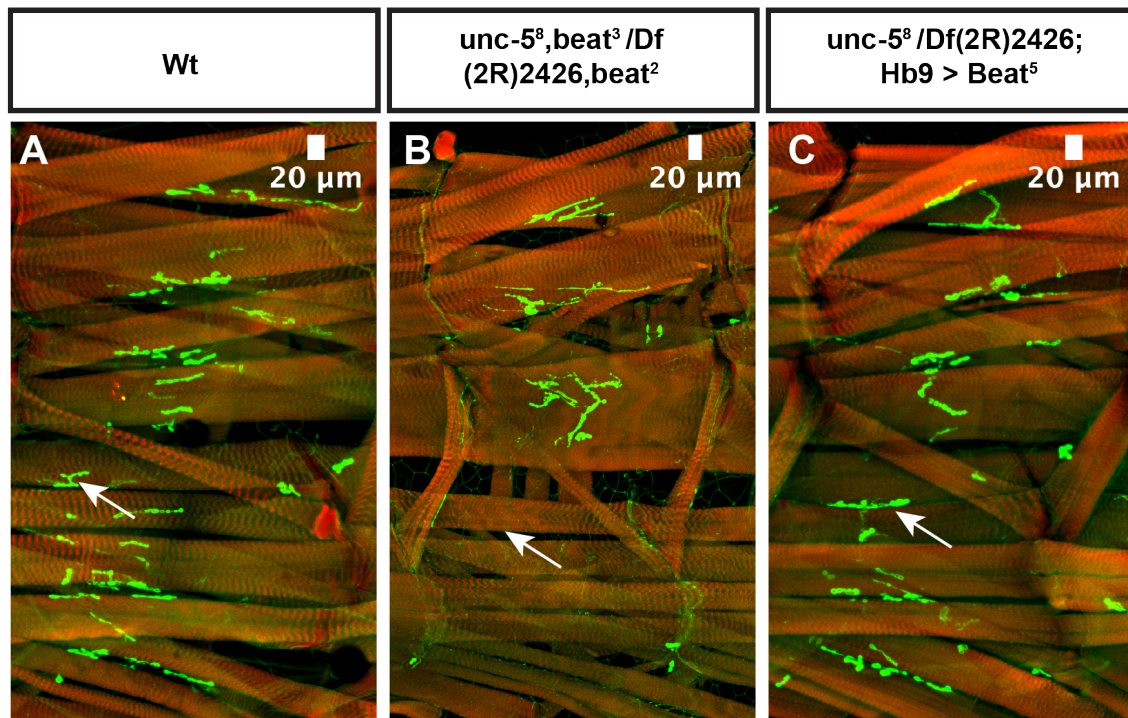
**Abbildung 2.16: Keine verstärkte Rettung des Phänotyps durch die simultane Expression von Unc-5 und Beat mit der *beat* Enhancer Fragment Linie 40636.**



## Ergebnisse

Anzahl der lateralen NMJ's des Wildtyps verglichen mit der Expression von Beat und der simultanen Expression von Unc-5 und Beat. Simultane Expression erzeugt keine Zunahme der NMJ's im lateralen Muskelfeld.  $P < 0,05$  (Mann-Whitney U Test).

Ebenso kann eine Teilrettung des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps durch eine Expression von Beat<sup>5</sup> mit der Treiberlinie Hb9 in ventral projizierenden Motoneuronen erzielt werden (Abb. 2.17). Auch hier können neuromuskuläre Verbindungen im ventralen Muskelfeld wiederhergestellt werden, allerdings bleibt das laterale Muskelfeld nur spärlich innerviert und die Stärke der Ausprägung entspricht weiterhin dem doppelmutanten Phänotyp.



**Abbildung 2.17: Teilrettung des doppelmutanten Phänotyps durch eine Beat Expression mit Hb9-Gal4.**

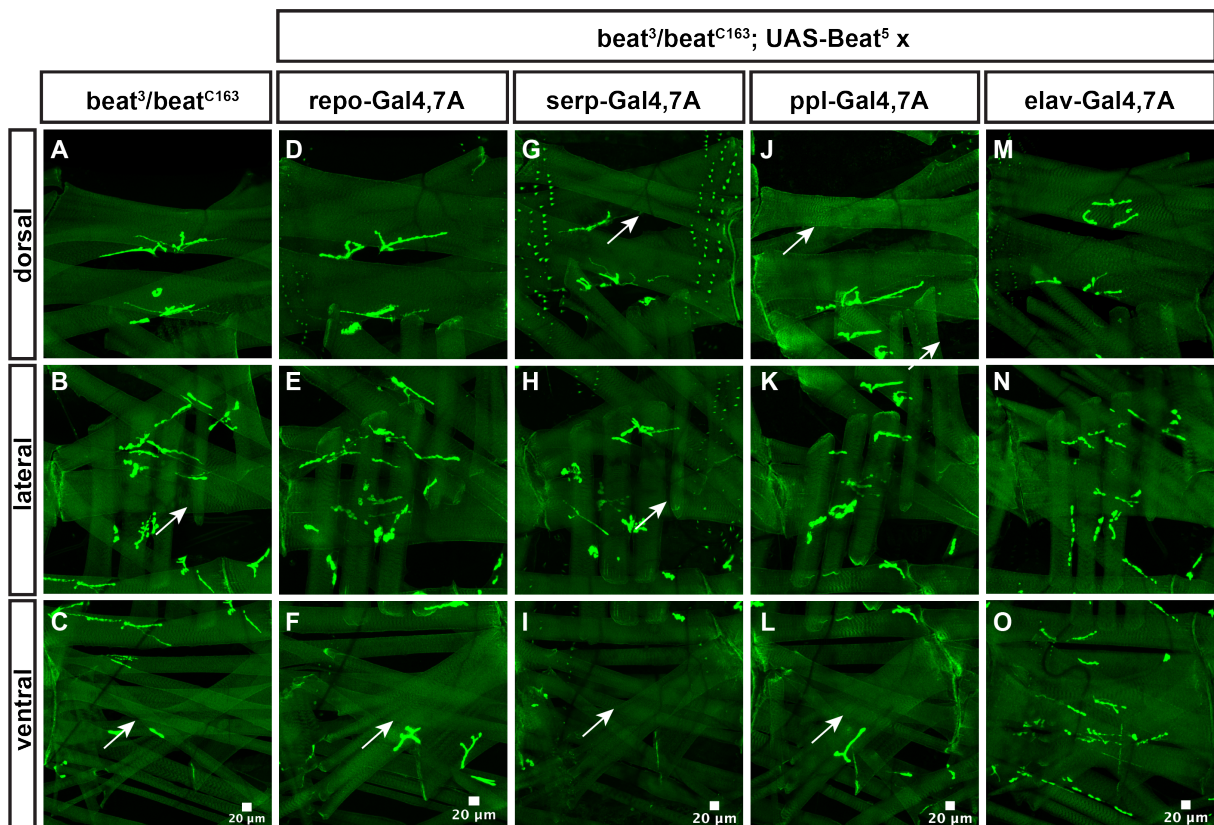
Konfokale Aufnahmen einer Fluoreszenzfärbung an Larven-Filets. Markierung der Muskulatur durch Phalloidin (rot) und der Postsynapsen durch Dlg (grün). Pfeile deuteten auf Muskel 12, der durch den ISNb innerviert wird. (A) Abdominales Hemisegment einer wildtypischen Larve zeigt das stereotypische Innervierungsmuster der Muskulatur. (B) Innervierungsdefekte der *unc-5* und *beat* mutanten Larven betreffen das laterale und ventrale Muskelfeld. (C) Reexpression von Beat mit Hb9-Gal4 bewirkt eine Wiederherstellung der Innervierungen im ventralen Bereich. Fehlende Innervierungen der lateralen Muskeln bleiben bestehen.

### 2.4 Keine Sekretion von Beat path Ia

Für die Rettung eines mutanten Phänotyps können Kenntnisse über die Funktion eines Proteins und dessen Wirkungsweise von großer Bedeutung sein. Das Wegfindungsmolekül Beaten path Ia wurde zu Beginn, bedingt durch unscharfe immunhistochemische Färbungen und seiner Strukturvorhersagen als sekretiertes

## Ergebnisse

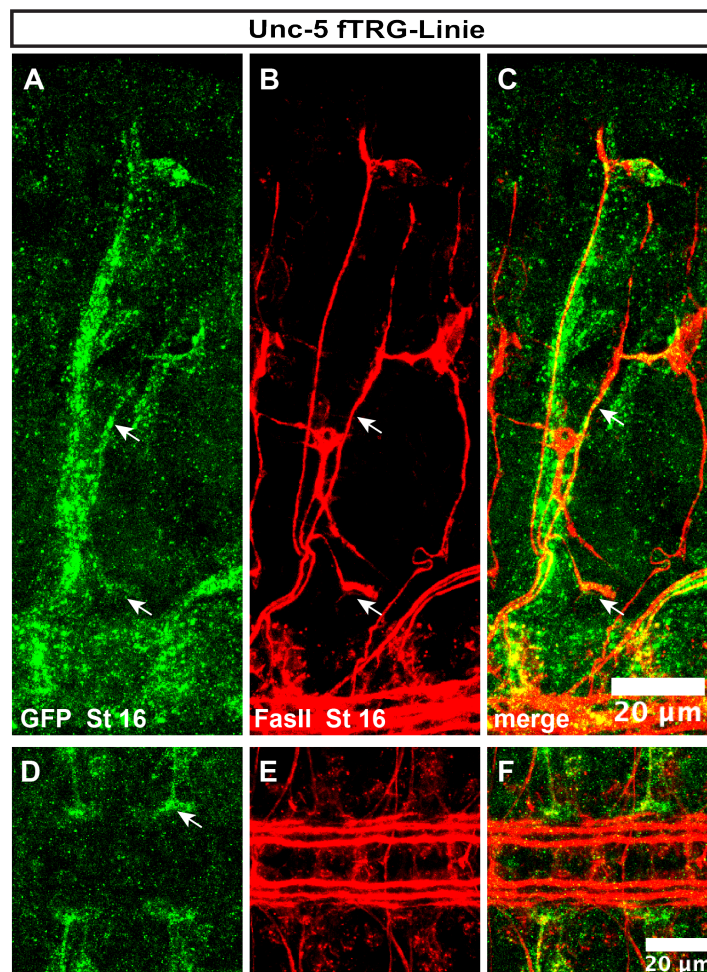
Protein publiziert (Bazan and Goodman, 1997; Fambrough and Goodman, 1996; Pipes et al., 2001). *Beat* Verlustmutanten zeigen starke Innervierungsdefekte im ventralen Muskelfeld, welche auf einen Bypass der ventralen Nervenstränge beruhen. Ebenfalls können leichtere Fehlprojektionen im lateralen und im dorsalen Muskelfeld erzeugt werden, die allerdings nur vereinzelte Muskeln betreffen. Der *beat* mutante Phänotyp kann alleinig durch eine pan-neuronale Expression von *Beat*<sup>5</sup> gerettet werden, welches gegen eine Sekretion des Wegfindungsmoleküls spricht (Abb. 2.18) (Siebert et al., 2009). Eine Expression des ungetaggtten *Beat*-Konstrukts UAS-*Beat*<sup>5</sup> in Gliazellen (*repo-Gal4*), Hämocyten (*serp-Gal4*) und den larvalen Fettkörpern (*ppl-Gal4*) führt im Gegensatz dazu keine Rettung des Phänotyps herbei. Diese neuen Ergebnisse unterstützen die bisherigen Annahmen, dass es sich bei *Beat* nicht um ein sekretiertes Molekül handelt.



**Abbildung 2.18: Rettung des *beat* mutanten Phänotyps durch pan-neuronale *Beat* Expression.** Konfokale Bilder von Ganzkörper Larven. Segmente geteilt in dorsales, laterales und ventrales Muskelfeld. Pfeile deuten auf fehlende Innervierungen der Muskeln 24, 30 und 9. (A-C) Innervierungsmuster in *beat* Mutanten. Fehlennervierungen betreffen das ventrale, laterale und dorsale Muskelfeld. Expression von *Beat*<sup>5</sup> in Gliazellen (D-E), Hämocyten (G-I) und Fettkörper (J-L) bewirkt keine Rettung des mutanten Phänotyps. (M-O) Pan-neuronale *Beat* Expression stellt das wildtypische Innervierungsmuster wieder her.

## 2.5 Unc-5 Expression auf SNa und peripheren Gliazellen

Das Expressionsmuster eines Proteins kann Informationen über die mögliche Funktion und Wirkungsort liefern. Analysiert wurde die embryonale Expression des Unc-5 Proteins mit einer Exon-Trap-Linie und die Transkripte mittels einer *in-situ*-Hybridisierung. Das Expressionsmuster wurde früher schon ermittelt aber zum Teil mit geringer räumlicher und zeitlicher Auflösung (Keleman and Dickson, 2001). Zusätzlich wurde eine transgene fly-TransgeneOme (fTRG) Linie analysiert, die mittels eines Fosmid Klons hergestellt wurde (Sarov et al., 2016). Für die Herstellung dieser Linien wurde eine Fosmid-Bibliothek verwendet, um Gene mit einer C-terminalen GFP Markierung zu versehen und wieder, als dritte Kopie, in die Fliege zu bringen (Sarov et al., 2016). Eindeutig detektiert werden konnte das Unc-5 Protein auf dem gesamten segmentalen Nerv (SNa und SNc) und den Gliazellen, welche den ISN umgeben (Abb.2.19).



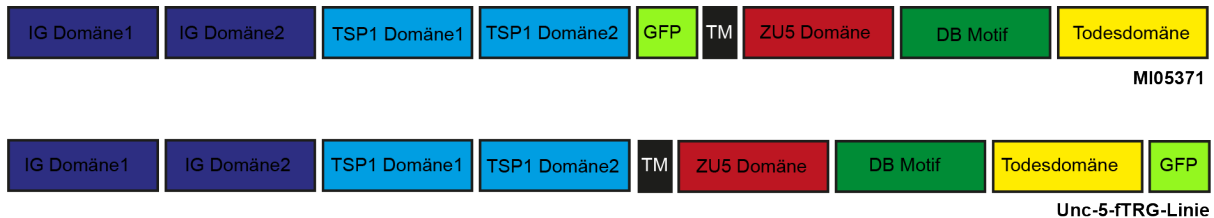
**Abbildung 2.19: Unc-5 wird vom gesamten segmentalen Nerv und den Gliazellen exprimiert, die den ISN umgeben.**

Konfokale Aufnahmen von *Drosophila* Embryonen der fTRG-Linie im späteren Entwicklungsstadium. Amplifizierung des GFP markierten Unc-5s mittels Antikörperfärbung. FasII-Färbung visualisiert die axonalen Projektionen. (A-C) Pfeile deuten auf den SNa und den SNc. (D-F) Vergrößerung des embryonalen zentralen Nervensystems. Pfeil deutet auf die Wurzel des SNas.



## Ergebnisse

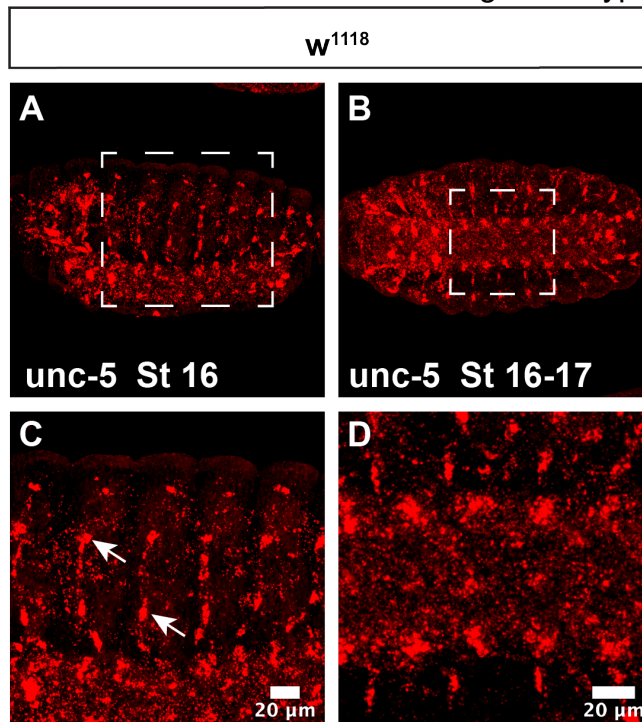
Die verwendeten Linien wurden charakterisiert und mittels einer mRNA-Sequenzierung erfolgte eine Überprüfung und Bestätigung der veröffentlichten Insertionsorte der GFP-Sequenzen (Ergebnisse nicht gezeigt). Für die Linie MI05371 konnte die Lokalisation des GFPs im extrazellulären Bereich hinter der Transmembrandomäne nachgewiesen werden (Abb.2.20).



**Abbildung 2.20: Insertion der GFP-Moleküle in der Unc-5 Exon-Trap- und fTRG-Linien.** Intrazelluläre und extrazelluläre Lokalisation des GFPs im Unc-5 Proteins der MI05371- und fTRG-Linie. Beide Linien spiegeln die Expression von Unc-5 wider.

Intrazellulär, anschließend an die Todesdomäne, konnte für die fTRG-Linie die Integration des GFP-Tags gezeigt werden. Somit visualisieren beiden Exon-Traps das wildtypische Expressionsmuster von Unc-5.

Ergänzend zur Analyse des Exon-Traps und der fTRG-Linie ermöglichte eine In-situ-Hybridisierung die Detektion der *unc-5* mRNA Verteilung in wildtypischen Embryonen.



**Abbildung 2.21: Unc-5 mRNA wird von Gliazellen in der Peripherie und Zellen des ZNS exprimiert.**

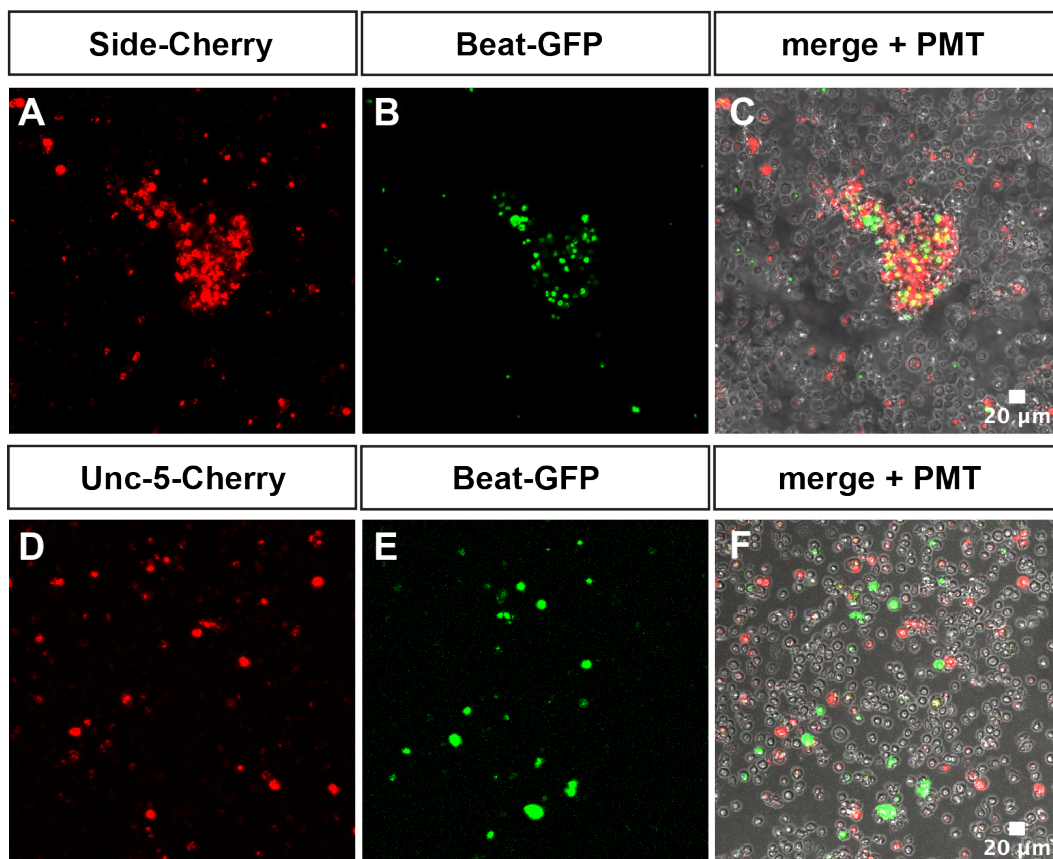
*In-situ*-Hybridisierung an wildtypischen Embryonen mit Tyramid-Signalverstärkung. Laterale (A, B) und ventrale (C, D) Aufsicht auf Embryonen in späteren Entwicklungsstadien (16-17). (A, B) Expression von Unc-5 auf peripheren Gliazellen, die den ISN umgeben. Pfeile deuten auf Gliazellen im ventralen und lateralen Muskelfeld. (C, D) Unc-5 wird von unterschiedlichen Zellgruppen im ZNS exprimiert.

## Ergebnisse

Wie bereits von Keleman und Dickson (2001) gezeigt, wird Unc-5 von Gliazellen in der Peripherie und unterschiedlichen Zellengruppen im ZNS exprimiert (Abb. 2.21). Stark exprimiert wird Unc-5 ebenfalls von den Exit-Gliazellen, welche auswachsende Motoaxone aus den ZNS in die Peripherie leiten. Die nervenspezifische Expression des repulsiven Rezeptors kann mittels *In-situ*-Hybridisierung und anschließender Tyramid-Signalverstärkung allerdings nicht nachgewiesen werden.

### 2.6 Unc-5 und Beat exprimierende S2 Zellen zeigen keine Interaktion

Ein simultaner Verlust von Unc-5 und Beat erzeugt gravierende Projektionsdefekte des segmentalen Nervs, der seine zu innervierende Muskulatur nicht erreicht. Da beide Wegfindungsmoleküle in unterschiedlichen Signalwegen interagieren, ist die Frage nach einer möglichen Interaktion zwischen Unc-5 und Beat, von großer Bedeutung.



**Abbildung 2.22: Unc-5 interagiert nicht mit Beat.**

Konfokale Aufnahmen. (A-C) Side-Cherry und Beat-GFP exprimierende Zellen bilden große Zellaggregate, die beide Zelltypen beinhalten. (D-F) Unc-5-Cherry und Beat-GFP transfizierte S2 Zellen formen keine Aggregate. Die Zellen liegen separiert vor und zeigen zusätzlich keinen Zusammenschluss von Zellen eines Zelltyps.

Eine Interaktion zwischen Beat und Side konnte von Siebert und Kollegen bereits gezeigt werden (Siebert et al., 2009).

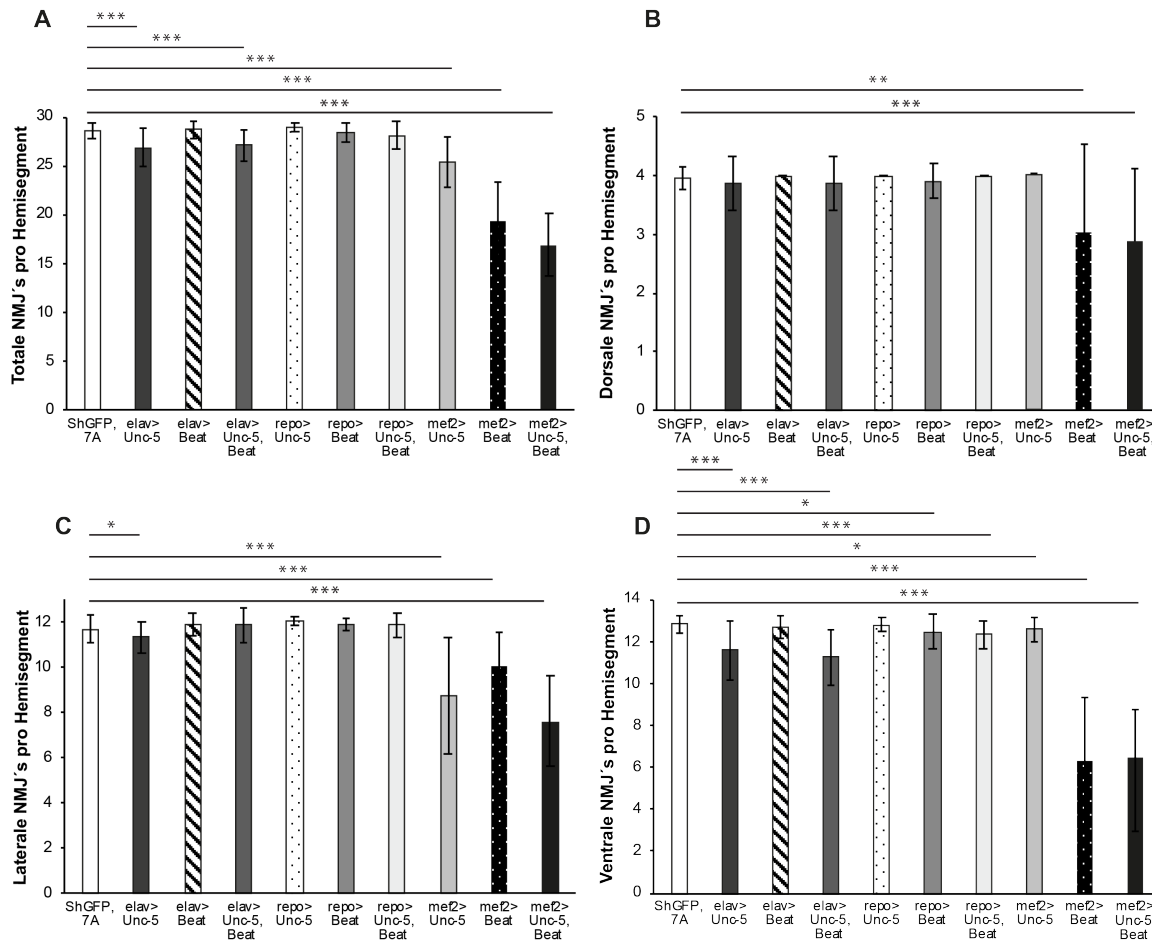
## Ergebnisse

Eben diese Interaktion diente im Zell-Aggregations-Assay als Positivkontrolle. S2 Zellen wurden mit Side-Cherry und mit Beat-GFP transfiziert und für den Aggregations-Assay verwendet. Wurden beide Zelltypen vermischt, konnten große Zellaggregate detektiert werden (Abb.2.22). Keine Aggregate konnten hingegen, durch das Vermischen von Unc-5-Cherry und Beat-GFP exprimierenden Zellen, beobachtet werden, welches gegen eine Interaktion der beiden Proteine schließen lässt. Auch eine homophile Interaktion der vier getesteten Proteine konnte ausgeschlossen werden, da keine Zellaggregate bestehend aus einem Zelltyp gebildet wurden.

### **2.7 Ektopische Expression von Unc-5 und Beat erzeugt Muskeldefekte**

Um die Funktion der Wegfindungsmoleküle Unc-5 und Beat besser verstehen zu können erfolgte eine ektopische Expression der beiden Rezeptoren mittels unterschiedlicher Treiberlinien. Eine Auszählung der vorhandenen neuromuskulären Verbindungen, angeordnet auf stereotypischen Positionen der larvalen Muskulatur, sollte Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der axonalen Wegfindung und ihres Schweregrades ermöglichen. Leichte Innervierungsdefekte konnten durch die pan-neuronale Überexpression von Unc-5 [ $11,67 \pm 0,70$  verglichen mit dem Wildtyp  $12,92 \pm 0,62$ ] und die simultane Expression von Unc-5 und Beat [ $11,33 \pm 1,31$ ] mit *elav-Gal4*, vor allem im ventralen Muskelfeld, beobachtet werden (Abb.2.23). Gravierendere Defekte erzeugte die alleinige muskelspezifische Expression von Unc-5 und Beat im lateralen [Unc-5:  $8,75 \pm 2,6$  und Beat:  $10,04 \pm 1,5$  verglichen mit dem Wildtyp  $11,71 \pm 0,62$ ] und ventralen [Unc-5:  $12,67 \pm 0,56$  und Beat:  $6,37 \pm 3,1$  verglichen mit dem Wildtyp  $12,92 \pm 0,41$ ] Bereich der abdominalen Segmente (Abb.2.23). Eine starke Reduktion an NMJs, die alle Bereiche der Muskulatur betraf, führte die simultane, muskelspezifische Expression von Unc-5 und Beat herbei [ $16,92 \pm 3,16$  im Vergleich zum Wildtyp  $28,58 \pm 0,83$ ] (Abb.2.23).

## Ergebnisse

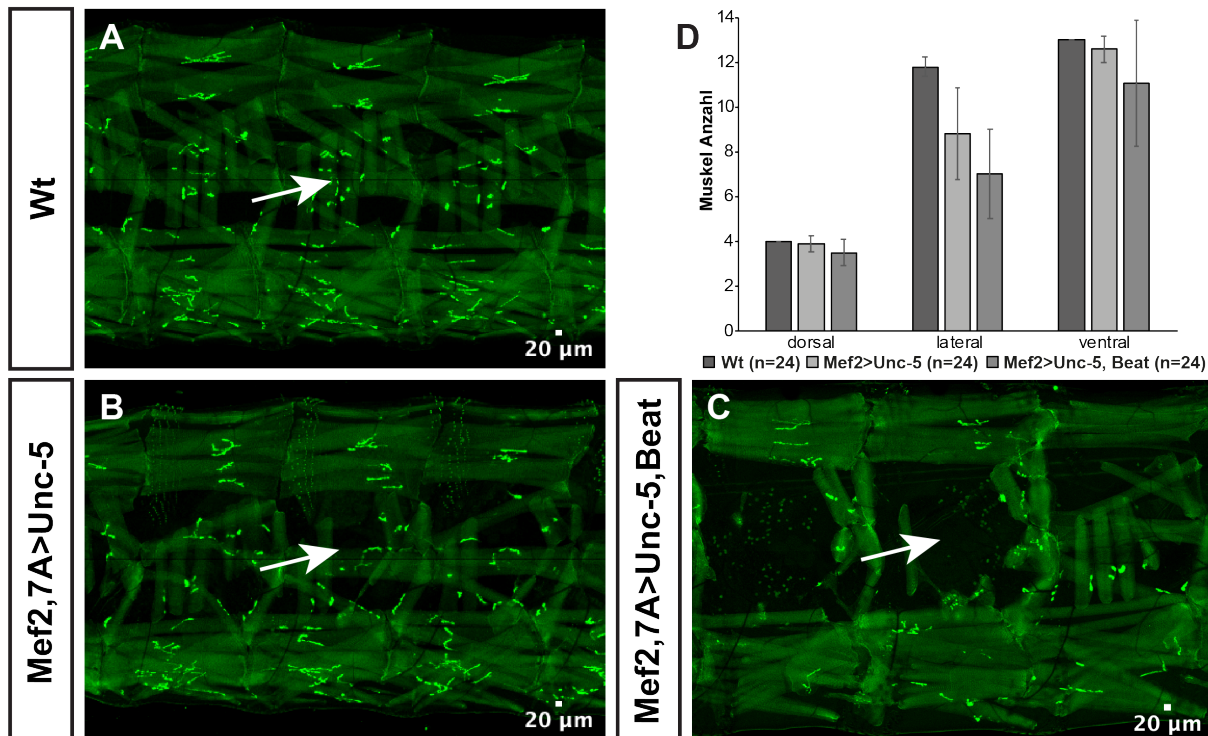


**Abbildung 2.23: Muskelspezifische Überexpression von Unc-5 und Beat führt zur Reduktion von NMJs in abdominalen Hemisegmenten.**

(A) Anzahl der totalen NMJ's pro Hemisegment ist stark reduziert durch die muskelspezifische Expression von Unc-5 und Beat. (B) Dorsale Muskulatur zeigt eine geringere Innervation bedingt durch die Expression von Beat und Unc-5 auf der Muskulatur. (C) Starke Reduktion der lateralen NMJ's durch die muskelspezifische Präsenz von Unc-5 und Beat. (D) Reduzierte Anzahl neuromuskulärer Verbindungen im ventralen Muskelfeld durch die Expression von Unc-5 und Beat, vor allem mit elav-Gal4 und Mef2-Gal4. Mann-Whitney U Test; \* $p < 0,05$ .

Die Reduktion an neuromuskulären Verbindungen in den Unc-5 und Unc-5 und Beat Überexpressions-Mutanten beruht größtenteils auf einer Degeneration der lateralen und dorsalen Muskulatur (Abb.2.24). Dieser Phänotyp ist variable und prägt sich mit unterschiedlicher Expressivität in den jeweiligen Hemisegmenten aus. Allerdings führt die simultane, muskelspezifische Überexpression von Unc-5 und Beat zu einer stärkeren Ausprägung des Phänotyps in Embryonen (Ergebnisse nicht gezeigt) und Larven, verglichen mit der alleinigen Überexpression von Unc-5. Diese Reduktion an lateralen Muskeln konnte zusätzlich durch eine statistische Auszählung der verbliebenen lateralen Muskeln belegt werden (Abb.2.24 D).

## Ergebnisse

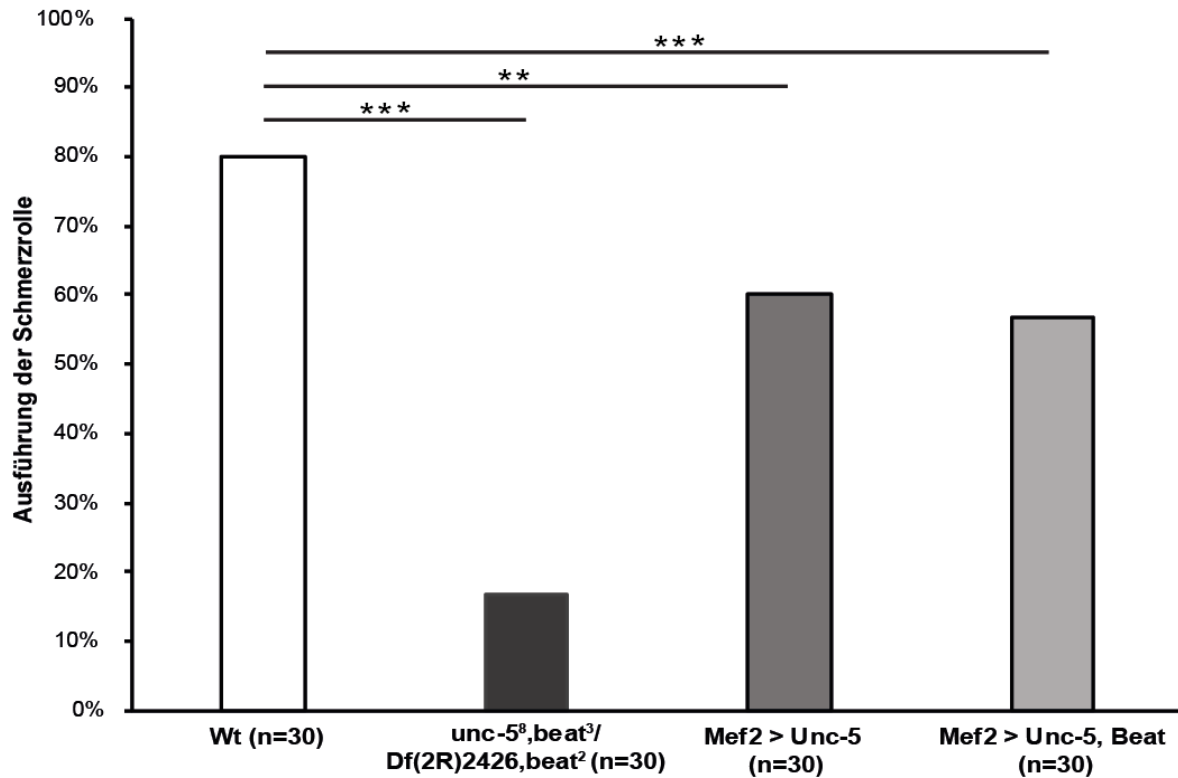


**Abbildung 2.24: Muskeldegeneration bedingt durch muskelspezifische Unc-5 Expression.**

Mikroskopische Aufnahmen intakter Larven. Pfeile deuten auf das laterale Muskelfeld. (A) Wildtypischer Aufbau des neuromuskulären Systems dreier abdominaler Segmente. (B) Muskelspezifische Expression von Unc-5 bewirkt eine Degeneration der Muskelfasern vor allem im lateralen Bereich. (C) Simultane muskelspezifische Expression von Unc-5 und Beat verstärkt den degenerativen Phänotyp der Muskeln. (D) Statistische Auszählung der verbliebenen Muskelfasern. \* $p < 0,05$  (Mann-Whitney U Test).

Innervierungsdefekte überdauern oftmals bis in das larvale Entwicklungsstadium oder die Imago und können, bedingt durch den Verlust von neuromuskulären Verbindungen, eine veränderte Lokomotion hervorrufen (Kinold et al., 2021). Auch in dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass fehlende neuromuskuläre Verbindungen im lateralen Muskelfeld eine Auswirkung auf das larvale Fluchtverhalten haben (Abb.2.12 und 2.13). Eine Reduktion der lateralen Muskelfasern wirkte sich ebenfalls negativ auf das, durch einen Schmerzreiz hervorgerufene, Rollverhalten aus und verringerte die Ausführung der Fluchtrolle auf der Hitzeplatte signifikant (Abb.2.25). Verglichen mit dem Wildtyp bewirkt die muskelspezifische Expression von Unc-5 eine Reduktion der Rollfähigkeit um ca. 20% (der Wildtyp rollt sich zu 80%) und bei einer simultanen Expression von Unc-5 und Beat um ca. 25%.

## Ergebnisse



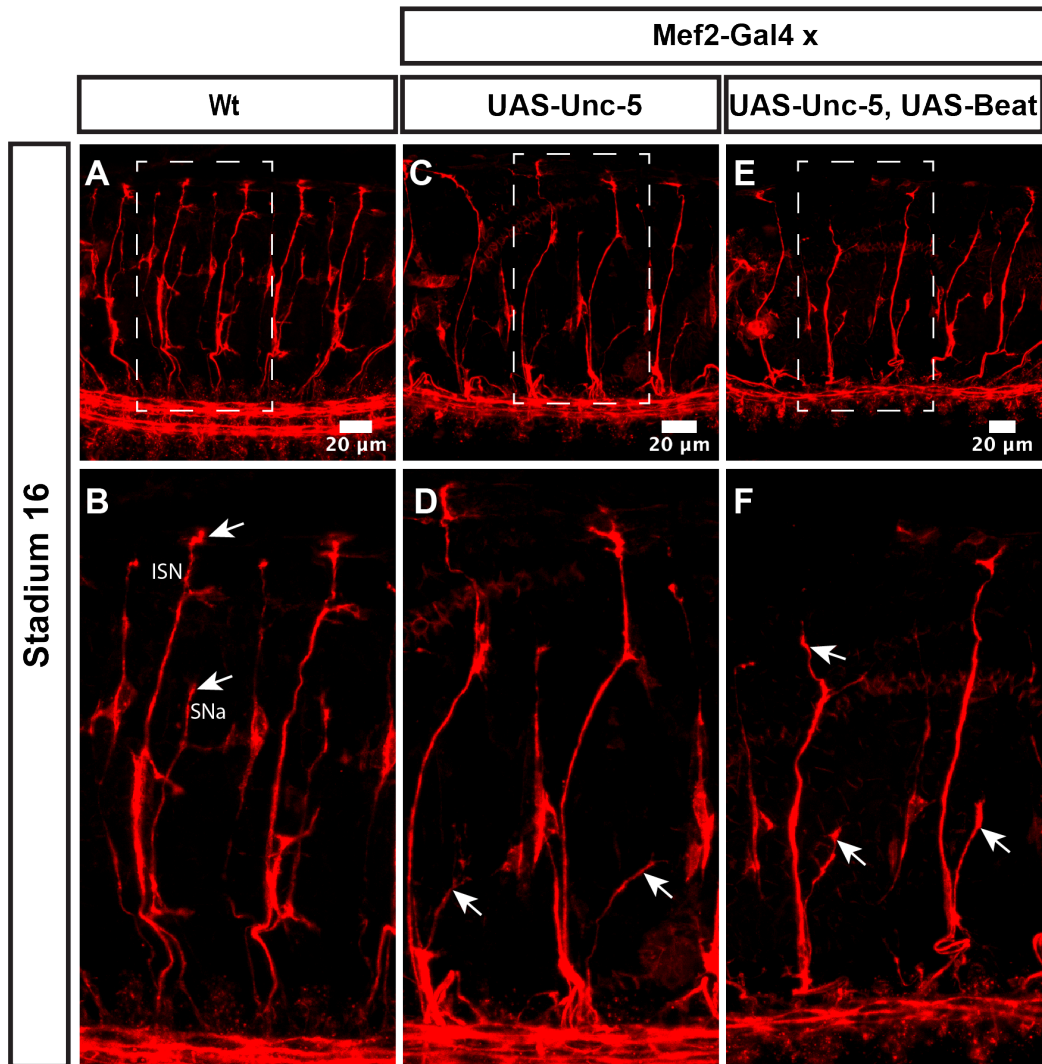
**Abbildung 2.25: Reduktion der lateralen Muskelfasern verringert die Ausführung der Fluchrolle.**

Verlust von lateralen und ventralen neuromuskulären Verbindungen reduziert das schmerzinduzierte Fluchtverhalten auf der Hitzeplatte drastisch. Muskuläre Expression von Unc-5 verringert signifikant das laterale Rollen. Verschlechterung des Rollverhaltens ebenfalls durch die simultane Expression von Unc-5 und Beat. \* $p < 0,05$  (Fisher's Exakt Test).

Die alleinige muskelspezifische Expression von Unc-5 oder die kombinierte Expression von Unc-5 und Beat erzeugt zu dem Verlust an Muskelfasern auch ein verändertes axonales Projektionsmuster in Embryonen (Abb.2.26). Diese Fehlprojektionen betreffen, bei einer muskulären Expression von Unc-5, vor allem den SNa, dessen Projektion verkürzt erscheint und nicht den charakteristischen 90° Winkel bildet. Verstärkt werden diese Projektionsdefekte durch die simultane Expression von Unc-5 und Beat. Durch die gleichzeitige Präsenz beider Rezeptoren konnten ebenfalls Projektionsdefekte des ISNs detektiert werden, der in einigen Segmenten seine Zielmuskulatur nicht erreichte.



## Ergebnisse

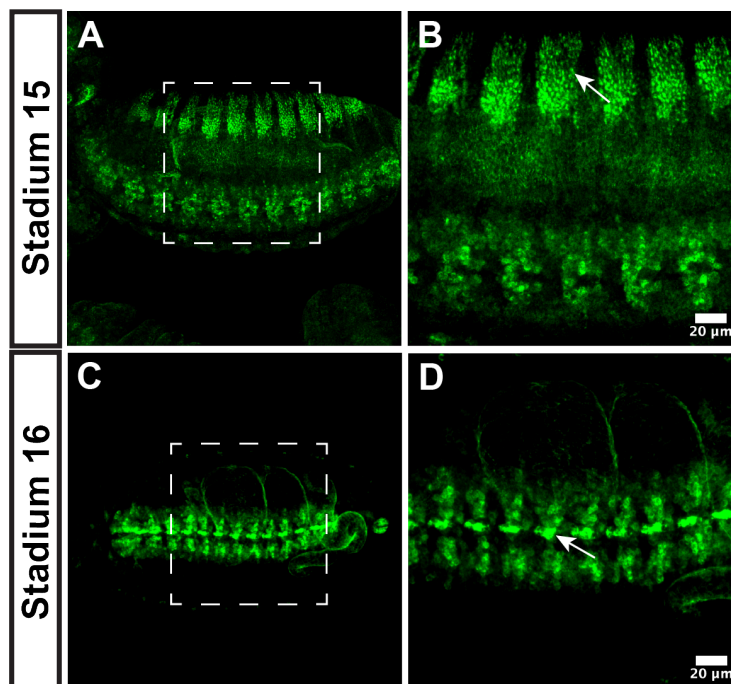


**Abbildung 2.26: Starke Projektionsdefekte durch muskuläre Expression von Unc-5 und Beat.**

Konfokale Aufnahmen von *Drosophila* Embryonen im 16. Entwicklungsstadium. Antikörperfärbung gerichtet gegen FasII visualisiert die axonale Projektion. Pfeile deuten auf ISN und SNa. (A-B) Wildtypische Projektionsrouten in der Peripherie. ISN und SNa erreichen die Zielmuskulatur. (C-D) Alleinige muskelspezifische Expression von Unc-5 mit Mef2-Gal4 erzeugt Wegfindungsdefekte des SNas, dessen Projektion frühzeitig abbricht. Der charakteristische 90° Winkel wird nicht ausgebildet. (E-F) Simultane Expression von Unc-5 und Beat mit Mef2-Gal4 erzeugt zusätzliche Projektionsdefekte des ISNs. Dorsale Muskeln werden in einigen Hemisegmenten nicht erreicht.

## 2.8 Netrin wird auf der embryonalen Muskulatur und im ZNS exprimiert

Die Netrine sind bifunktionale Wegfindungsmoleküle und vermitteln sowohl die Attraktion als auch die Repulsion auswachsender Axone im ZNS und peripheren Nervensystem von *Drosophila melanogaster* (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996). Mittels des Rezeptors Unc-5 wird Netrin als abstoßendes Signal wahrgenommen und erzeugt eine Vermeidung von Netrin exprimierenden Geweben (Keleman and Dickson, 2001). Eine Analyse der Expressionsmuster erfolgte anhand von unterschiedlichen Exon-Trap-Linien, welche zur Signalverstärkung einer Antikörperfärbung gegen GFP unterzogen wurden und sollten weitere Aufschlüsse über die Funktionen der Proteine ermöglichen. Netrin A wird embryonal stark von Zellen der Mittellinien und epidermalen Feldern exprimiert (Abb. 2.27). Ebenfalls wird das Protein von einigen Zellen des ZNS exprimiert.



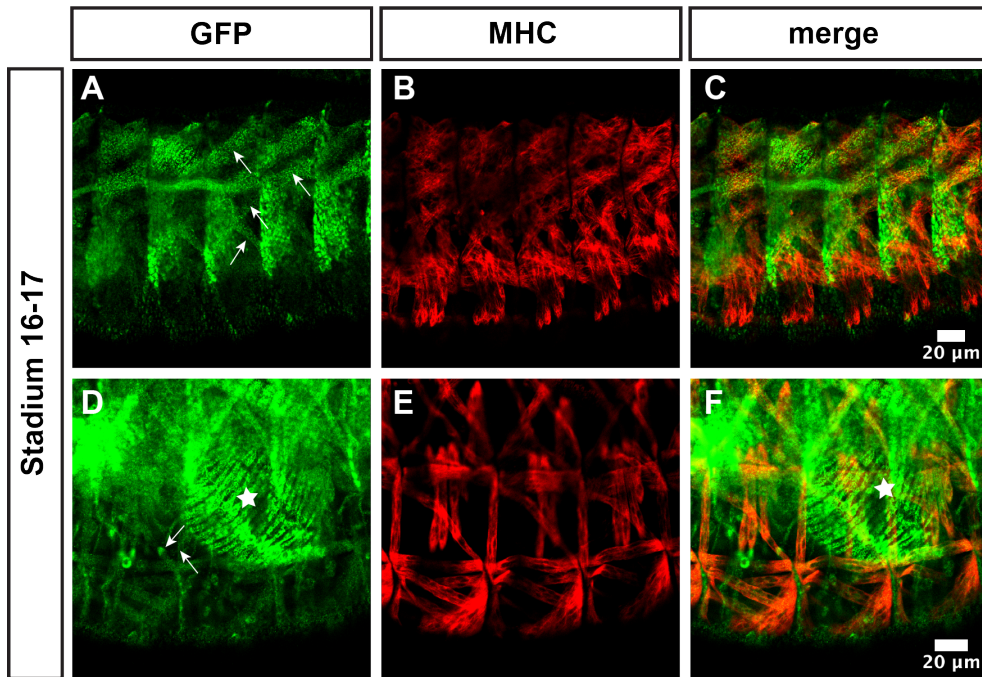
**Abbildung 2.27: NetA Expression in epidermalen Feldern und dem ZNS.**

Konfokale Bilder von *Drosophila* Embryonen. Antikörperfärbung gegen GFP visualisiert das Expressionsmuster von NetA. (A-B) Embryo im Stadium 15. Expression in epidermalen Feldern und dem ZNS. Pfeil deutet auf NetA positive Zellen der Epidermis. (C-D) Ventrale Sicht auf das ZNS eines Embryos im Stadium 16. Expression durch unterschiedliche Zelle im ZNS. Pfeil deutet auf eine Gliazelle der Mittellinie.

Zusätzlich wird NetA auf unterschiedlichen Muskeln in der Peripherie exprimiert. Eine starke Expression des Proteins ist auf den dorsalen Muskeln 1 und 2, sowie den dorsolateralen Muskeln 5 und 8 erkennbar (Abb.2.28).



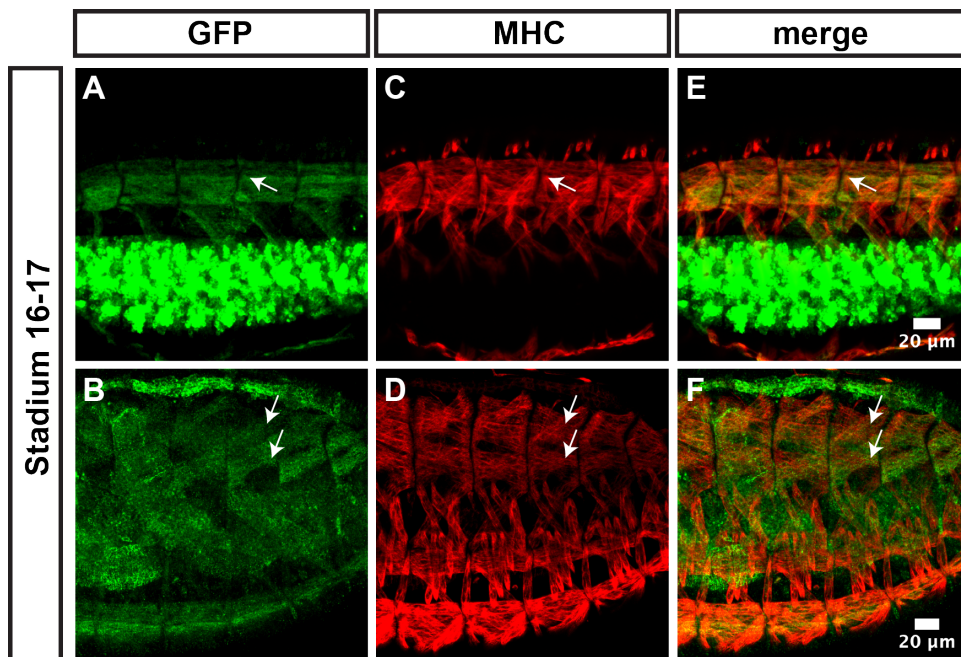
## Ergebnisse



**Abbildung 2.28: Starke NetA Expression auf einigen dorsalen und dorsolateralen Muskeln.**

Antikörperfärbung an Embryonen der NetA Exon-Trap-Linie. GFP-Färbung amplifiziert die NetA Expression. Co-Färbung mit MHC-Antikörper visualisiert die embryonale Muskulatur. Pfeile deuten auf NetA exprimierende Muskeln. (A-C) Starke NetA Expression auf dorsale Muskeln 1 und 2 sowie dorsolaterale Muskeln 5 und 8. (D-F) Laterale und ventrale Muskeln zeigen ein schwaches GFP-Signal. Longitudinale Muskeln des Darms exprimieren NetA ebenfalls stark (Stern).

Auf der restlichen Muskulatur ist NetA kaum oder nur sehr schwach detektierbar. Netrin B hingegen wird ebenfalls von den Mittellinien Gliazellen und von deutlich mehr Zellen des ZNS exprimiert. Zusätzlich ist das Protein auf der gesamten ventralen Muskulatur und den dorsalen Muskeln 1 und 2 erkennbar (Abb. 2.29).



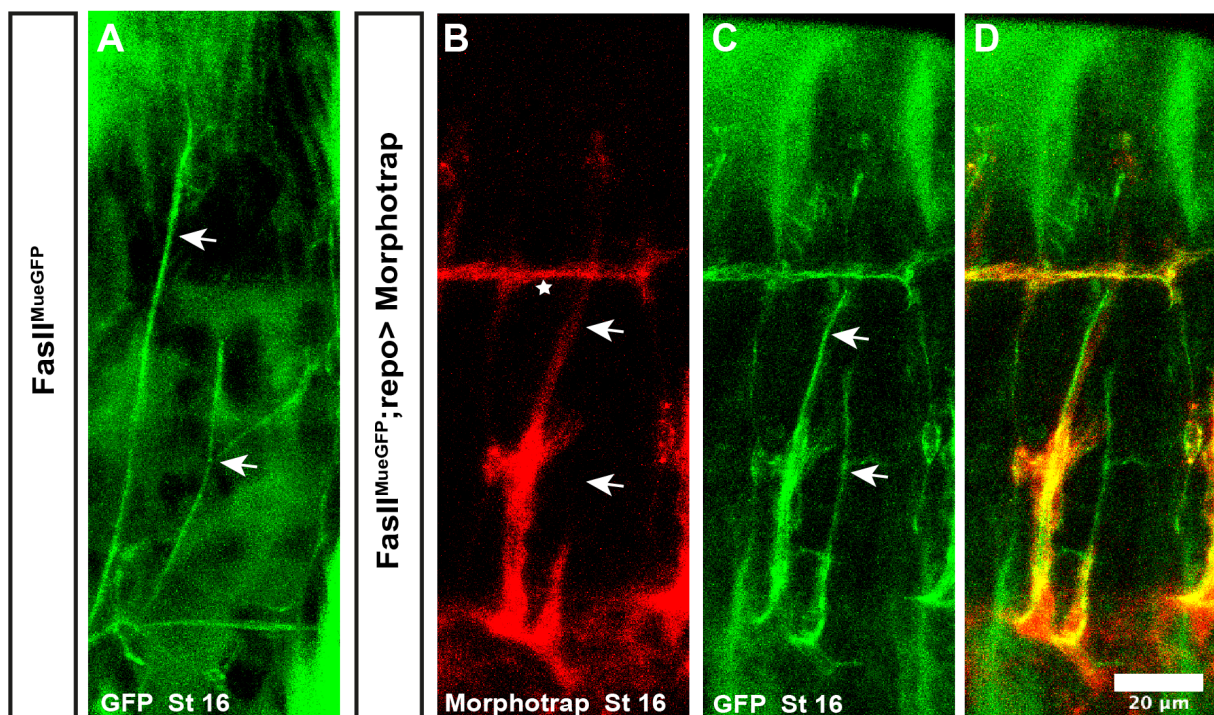
**Abbildung 2.29: NetB Expression im ZNS, der ventralen Muskulatur und Muskel 1 und 2.**

Co-Färbung an Embryonen mit GFP- und MHC-Antikörper. (A-F) Konfokale Aufnahmen von Embryonen im Stadium 16-17. Pfeile deuten auf die laterale Muskulatur und dorsalen Muskeln 1 und 2. (A-B) GFP-

## Ergebnisse

Färbung markiert die Expression von NetB im ZNS, aller ventralen Muskeln und Muskel 1 und 2. (C-D) MHC-Färbung visualisiert die embryonale Muskulatur. (E-F) Überlagerung beider Färbungen verdeutlicht die Expression von NetB auf der Muskulatur.

Publiziert wurden die Netrine als Moleküle, die von Zellen der Mittellinie sekretiert werden (Mitchell et al., 1996). In Invertebraten konnte mittlerweile gezeigt werden, dass Netrin-1 sowohl sekretiert wird, als auch als haptotaktischer Lockstoff auf Zelloberflächen exprimiert wird (Dominici et al., 2017; Kennedy et al., 1994, 2006; Varadarajan et al., 2017). Ein Nachweis von sekretierten Molekülen kann mithilfe eines Morphotrapns gelingen, welcher gewebespezifisch exprimiert wird und freibewegliche Moleküle bindet (Harmansa et al., 2015). Als Positivkontrolle wurde das sekretierte Zelladhäsionsmolekül Fasciclin II mit dem Morphotrap, durch die Expression des Fusionsmolekül mit einem Gliazellen-spezifischen Treiber (repo-Gal4), auf den exprimierenden Strukturen gebunden (Abb. 2.30). Das Zelladhäsionsmolekül wurde sowohl an Gliazellen in der Peripherie, als auch an den dorsalen longitudinalen Nerv gebunden (Abb. 2.30).

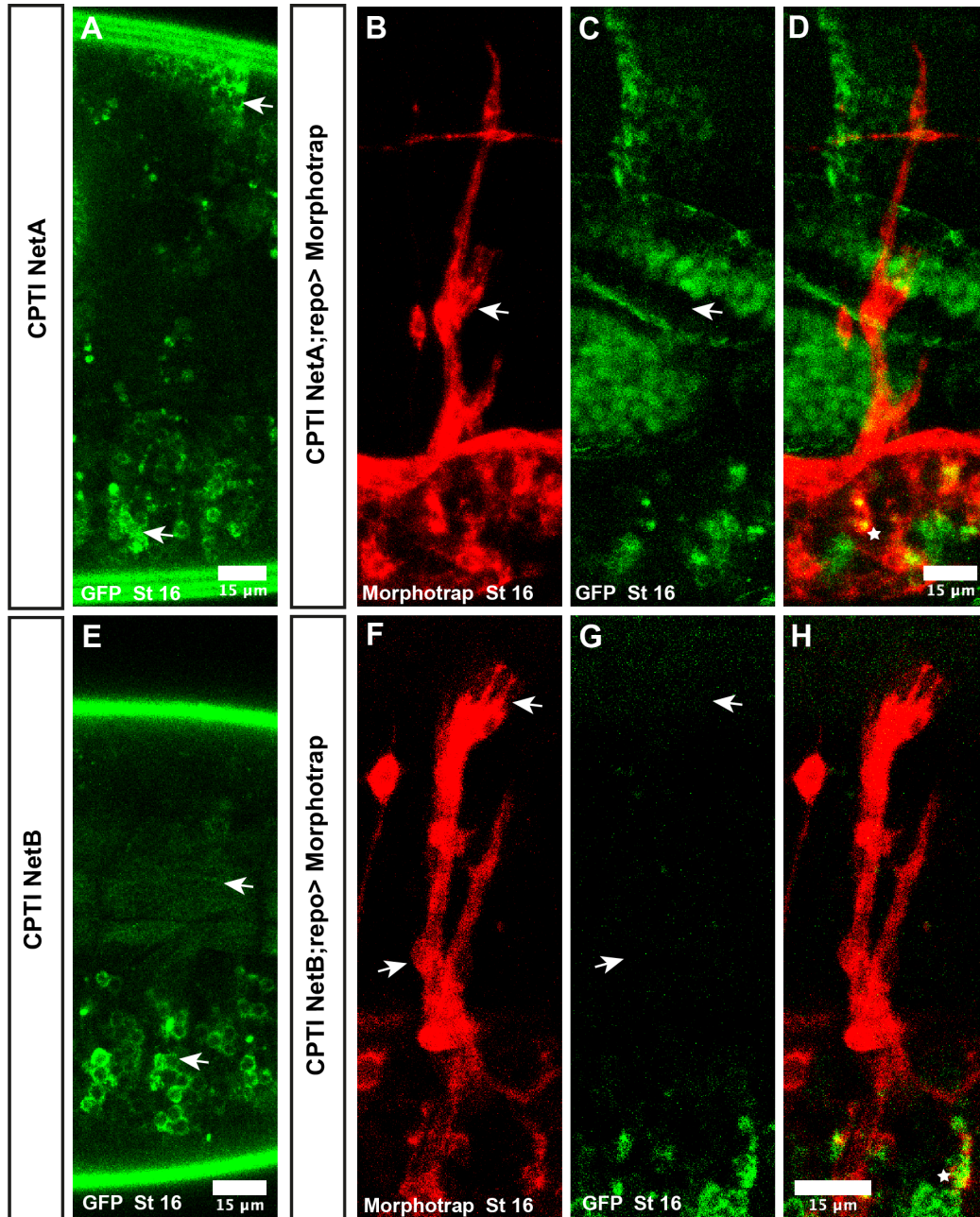


### Abbildung 2.30: FasII Morphotrapping.

Konfokales Live-imaging von *Drosophila* Embryonen. Pfeile zeigen auf den ISN und den SNa. Stern markiert den dorsalen longitudinalen Nerv. (A) Wildtypische FasII-Expression auf Motoaxone. (B) Expression des Morphotrapns auf Gliazellen in der Peripherie. (C-D) Sekretiertes FasII kann mittels Morphotrapns auf den Gliazellen und den dorsalen longitudinalen Nerv gebunden werden.

## Ergebnisse

Eine Expression des Morphotrap im Hintergrund des NetA und NetB Exon-Traps konnte kein YFP markiertes Protein in der Peripherie an Gliazellen oder den dorsalen longitudinalen Nerv binden (Abb. 2.31). Einige gliale Zellen des ZNS internalisierten allerdings sowohl NetA als auch NetB.



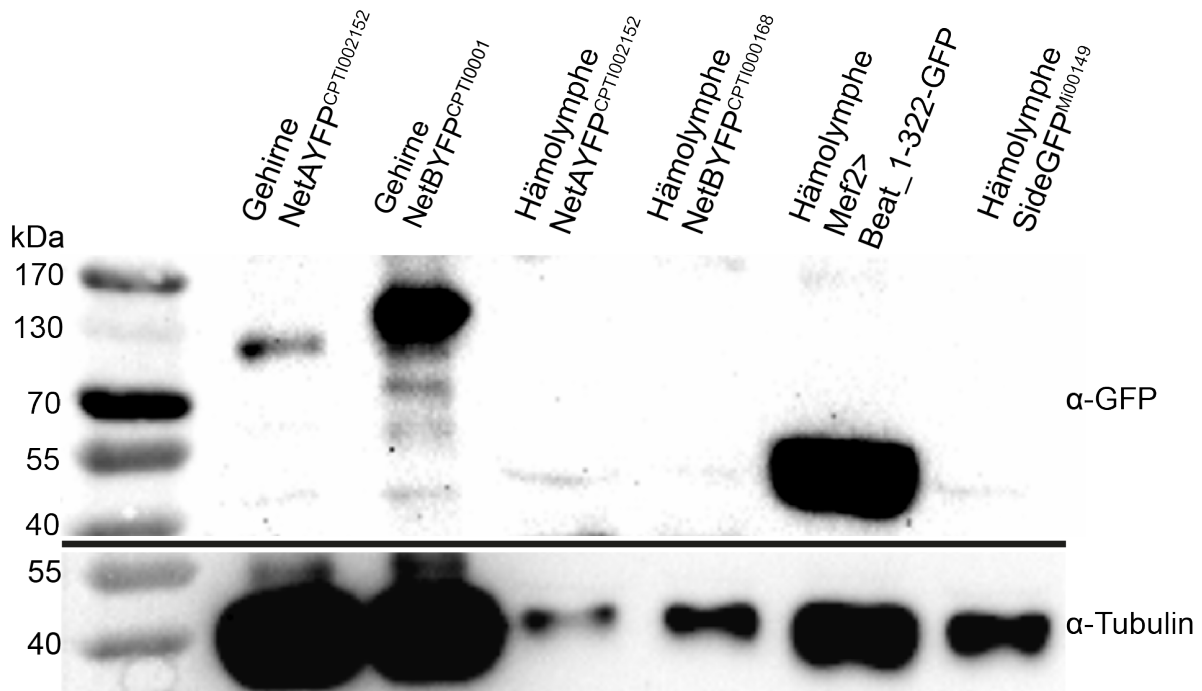
**Abbildung 2.31: Keine Sekretion der Netrine im Embryo.**

Konfokales Live-imaging von Embryonen im späten Entwicklungsstadium (16). (A,E) Wildtypische Expression von Netrin A und Netrin B. (A) Netrin A wird von Zellen des ZNS und epidermalen Felder exprimiert. (E) Netrin B Expression auf der ventralen Muskulatur und im ZNS. (B-D,F-H) Kein GFP-getaggetes Protein kann durch den Morphotrap in der Peripherie gebunden werden. (D,H) Internalisiertes NetA und NetB in Morphotrap exprimierenden Zellen des ZNS.



## Ergebnisse

Ergänzend zur Überprüfung der Netrin Sekretion im Embryo wurde auch eine eventuelle Sekretion in der Larve untersucht. Hierfür erfolgte eine Analyse von larvaler Hämolymphe unterschiedlicher Exon-Traps, um sekretierte YFP/GFP markierte Moleküle zu detektieren. Als Positivkontrolle dienten präparierte und homogenisierte Gehirne, entnommen aus L3 Larven der NetA und NetB Exon-Trap Linien.



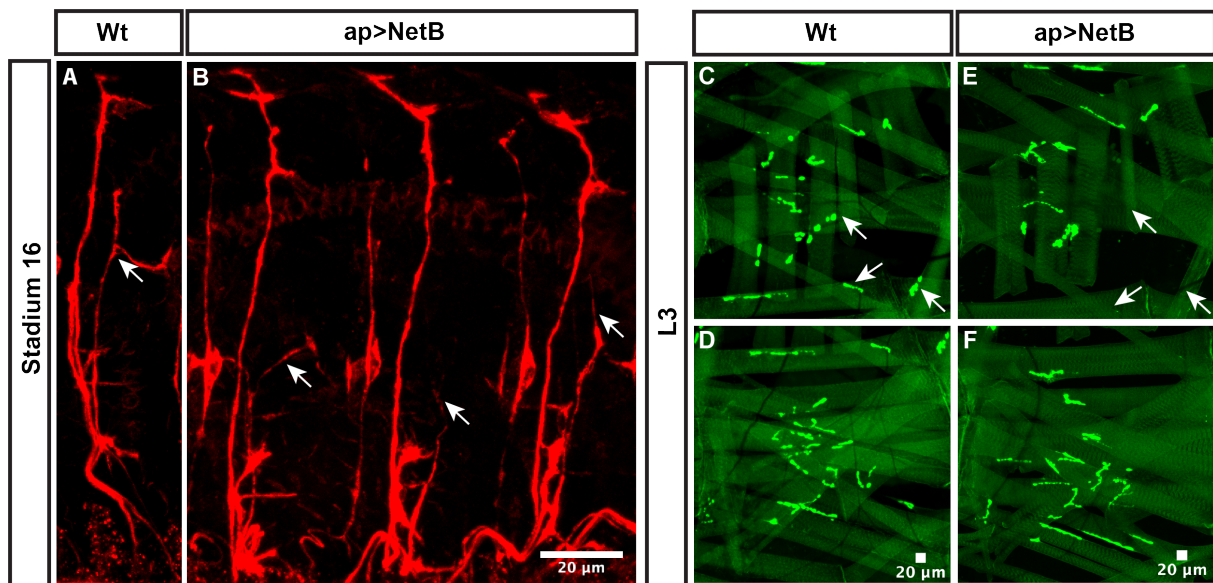
**Abbildung 2.32: Netrine werden nicht in die larvale Hämolymphe sekretiert.**

Western-Blot mit anschließender GFP- und Tubulin-Färbung. NetA und NetB, aus larvalen Gehirnen isoliert, mit einer Größe von 109 kDa und 173 kDa. Kein sekretiertes NetA, NetB oder Sidestep konnte in der Hämolymphe detektiert werden. Muskulär exprimiertes und sekretiertes Beat\_1-322-GFP konnte nachgewiesen werden.

Die Insertion des fluoreszierenden Moleküls führt bei den Netrinen zu einer Addition von ca. 28 kDa, womit NetA bei einer Größe von 109 kDa und NetB bei 173 kDa zu detektieren sein sollten. NetB wurde allerdings bei einer geringeren Größe nachgewiesen, als vorhergesagt. In der Hämolymphe konnte weder NetA, NetB noch Sidestep nachgewiesen werden (Abb.2.32). Sidestep wird in der Larve nicht sekretiert und diente als Negativkontrolle. Das C-terminale Deletionskonstrukt Beat\_1-322-GFP hingegen wird sekretiert und konnte in der Hämolymphe detektiert werden.

## 2.9 Unc-5 exprimierende Axone werden von NetB abgestoßen

Axone, die den Rezeptor Unc-5 exprimieren, interpretieren NetB als ein abstoßendes Signal (Keleman and Dickson, 2001). Das trifft vor allem auf Neurone des SNas zu und ist bedeutend für die korrekte Wegfindung des Nervenstrangs, da so vermutlich die Abstoßung von der ventralen Muskulatur erzeugt werden kann. Die lateralen Muskeln hingegen exprimieren kein NetB und können somit SNa spezifisch innerviert werden. Diese Annahme sollte durch eine ektopische Expression von NetB auf der lateralen Muskulatur überprüft werden und erzeugt im Embryo starke Abweichungen von der wildtypischen Projektionsroute des SNas, dessen Projektion abbricht oder nicht vollständig ausgebildet wird (Abb.2.33). Dies Wegfindungsdefekte bleiben selbst noch im larvalen Entwicklungsstadium erhalten und ähneln dem Phänotyp der *unc-5* Einzelmutante.



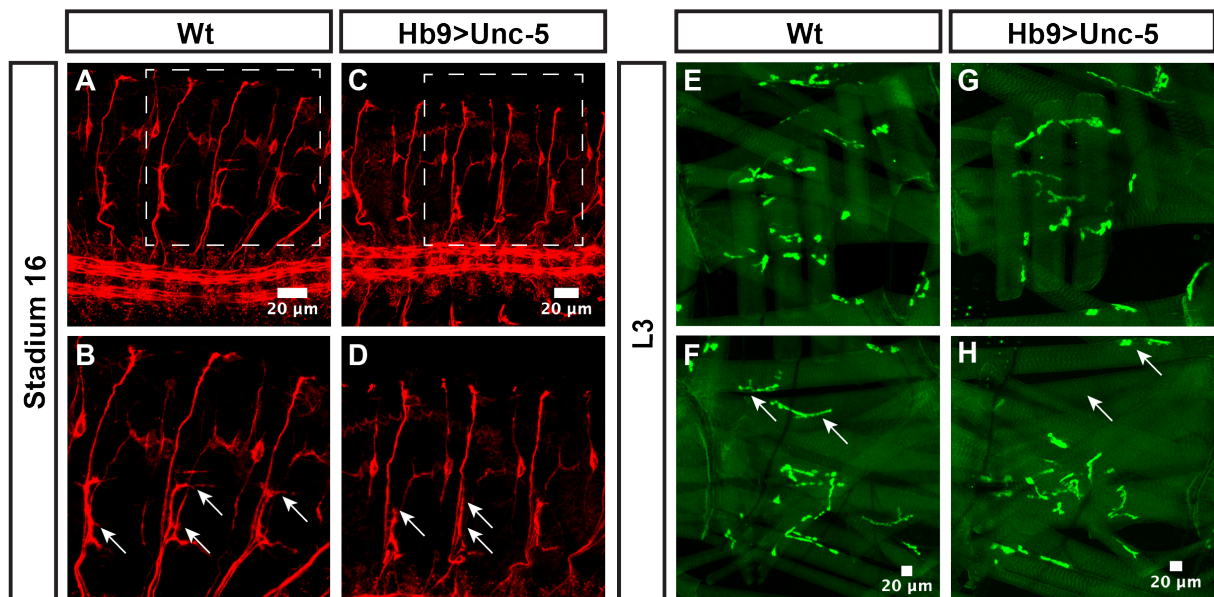
**Abbildung 2.33: NetB exprimierende Muskeln stoßen Unc-5 positive Motoaxone ab.**

Mikroskopie-Aufnahmen von Embryonen und intakten Larven. (A-B) SNa Projektion im Wildtyp und in der Überexpressions-Mutante. Pfeile deuten auf den SNa. NetB Expression mit *ap-Gal4* auf den lateralen Muskeln bewirkt die Projektionsdefekte der SNa Motoneurone. (C-F) Laterale und ventrale Muskelfelder intakter Larven. Pfeile deuten auf laterale Muskeln, die durch die SNa Neurone innerviert werden. Expression von NetB auf lateralen Muskeln führt zu einem Verlust von NMJ's im lateralen Muskelfeld.

Ergänzend dazu wurde der repulsive Unc-5 Rezeptor ektopisch von Motoneuronen (RP1/3/4/5) exprimiert die NetB positive Muskeln innervieren, welches zu embryonalen und larvalen Projektionsfehlern des ISNbs und ISNds führt, die ihre ventrale Zielmuskulatur nicht mehr erreichten (Abb.2.34). Im Embryo offenbart die FasII-Färbung, dass der ISNb nicht richtig ausgebildet wird, da er im Wildtyp eine T-förmige

## Ergebnisse

Struktur aufweist, die durch die Expression von Unc-5 mit Hb9-Gal4 nicht mehr in jedem Hemisegment detektiert werden kann. Die Projektionen brechen ab oder wachsen an ihrer eigentlichen Zielmuskulatur vorbei. Gegensätzlich dazu erreichen die übrigen Nervenbündel ihre zu innervierenden Muskeln und weisen ein wildtypisches Projektionsmuster auf (Abb. 2.34D). Ergänzend dazu wurde ebenfalls Frazzled mit Hb9-Gal4 exprimiert, welches zu keinem erkennbaren Phänotyp führte (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 2.34: Expression von Unc-5 in ventral projizierenden Neuronen führt zu embryonalen und larvalen Innervierungsdefekten.**

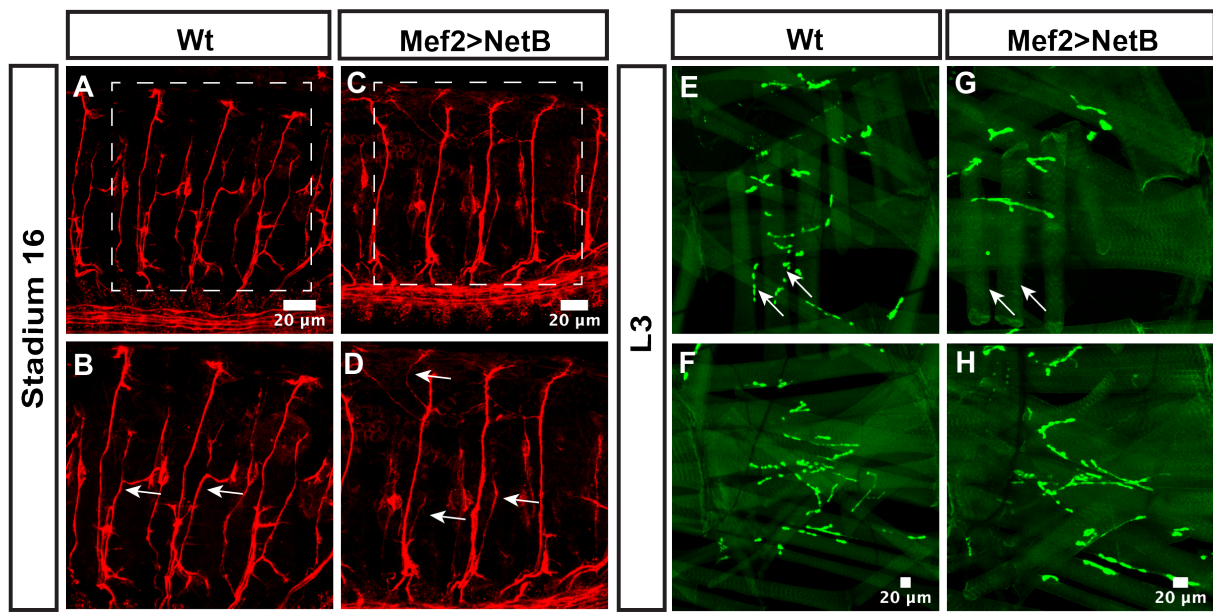
Konfokale Aufnahme von Embryonen und Ganzkörper Larven. (A-D) Ektopische Expression von Unc-5 mit Hb9-Gal4 führt im Embryo zu Projektionsfehler des ISNbs und ISNds. Pfeile deuten auf den ISNb. Pfeilkopf zeigt auf den ISNd. (E-H) Larvale ventrale und laterale Muskelfelder. Unc-5 Expression mit Hb9-Gal4 führt zu fehlenden Innervierungen im ventralen Bereich. Pfeile zeigen auf Muskel 12 und 13, die im Wildtyp vom ISNb innerviert werden.

Diese Wegfindungsdefekte bleiben bis in das larvale Stadium erhalten und äußern sich anhand von fehlenden neuromuskulären Verbindungen im ventralen Muskelfeld (Abb. 2.34). Vor allem die Muskeln 12 und 13, die an das laterale Muskelfeld grenzen, werden oftmals nicht oder an einer falschen Position innerviert. Die übrigen Muskelfelder zeigen eine wildtypische Anzahl und Positionierung der durch ShGFP markierten Innervierungen.

Die Expression von NetB auf der gesamten Muskulatur erzeugt hingegen stärkere Projektions- und Innervierungsdefekte im Embryo und in der Larve (Abb.2.35). Diese Defekte betreffen im Embryo alle Bereiche des Muskelfeldes, besonders stark ist jedoch das laterale Meskelfeld betroffen, welches im Wildtyp kein NetB exprimiert. Die

## Ergebnisse

Projektion des SNas erscheint häufig dünner, bricht ab und erreicht somit die laterale Muskulatur nicht. Auch ist der charakteristische 90° Winkel, der von den Motoaxonen im Wildtyp gebildet wird, häufig nicht erkennbar. Bis in das larvale Stadium bleiben die lateralen Projektionsdefekte erhalten, die anhand der fehlenden neuromuskulären Verbindungen auf den Muskeln erkennbar sind (Abb. 2.35G).



**Abbildung 2.35: NetB Expression auf der gesamten Muskulatur erzeugt starke larvale Innervierungsdefekte der lateralen Muskulatur.**

Mikroskopie-Aufnahmen von Embryonen und intakten Larven. (A-B) Wildtypische axonale Projektion in Embryonen. Pfeile deuten auf den charakteristischen 90° Winkel des SNas im lateralen Muskelfeld. (C-D) Muskelspezifische Expression von NetB auf der gesamten Muskulatur erzeugt starke Projektionsdefekte des SNas und des ISNs. (E-F) Innervierungsmuster in wildtypischen Larven. Pfeile deuten auf die lateralen, innervierten Muskeln. (G-H) Laterale Innervierungsdefekte in Überexpressionsmutanten zeigen sich vor allem im lateralem Muskelfeld. Pfeile deuten auf fehlende NMJ's der lateralen Muskeln.

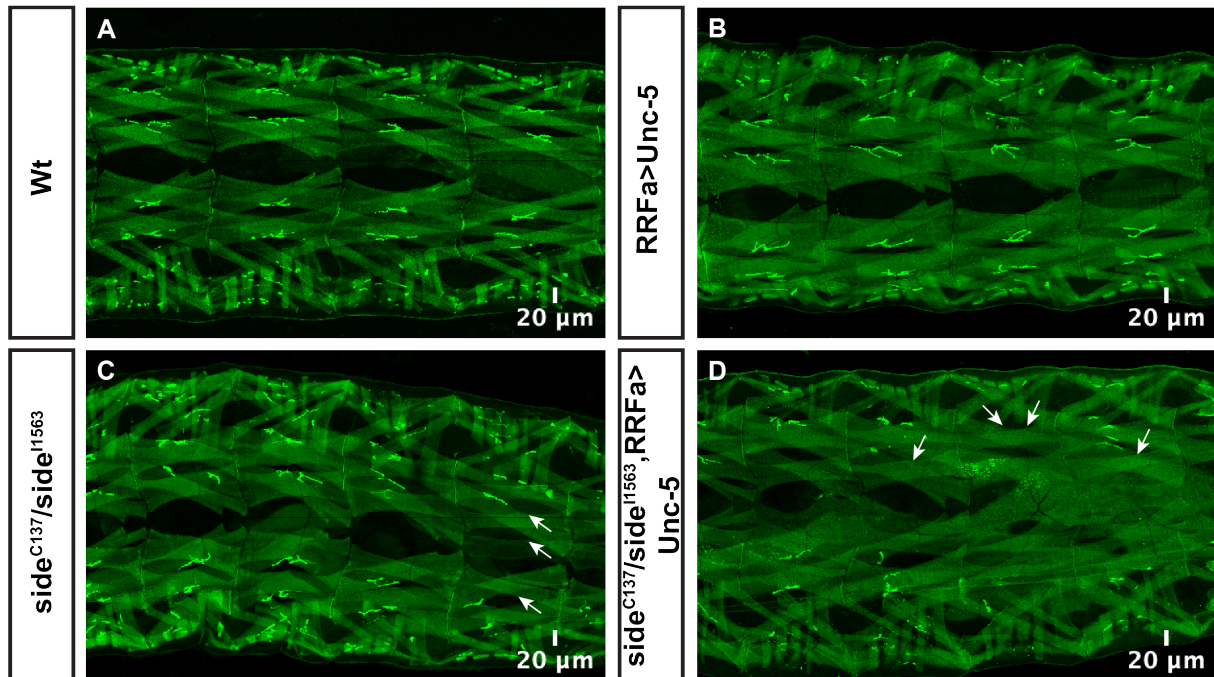
NetB wird im Wildtyp auf einigen der dorsalsten Muskeln exprimiert (Mitchell et al., 1996). Durch eine ektopische Expression des Unc-5 Rezeptors in Motoneuronen, die zu diesen Muskeln projizieren, sollte die Abstoßung im dorsalen Bereich getestet werden. Eine alleinige Expression von Unc-5 in diesen Motoneuronen, unter Verwendung des RRfa-Gal4 Treibers, erzeugte keine Fehlprojektionen der Motoaxone im dorsalen Muskelfeld (Abb.2.36).

Allerdings bewirkt eine Reduktion der muskulären Attraktion, durch den Verlust von Side, Innervierungsdefekte der dorsalsten Muskeln 1,2,9 und 10, in einigen larvalen Hemisegmenten (Kinold et al., 2018). Dieser Phänotyp kann durch die zusätzliche



## Ergebnisse

Expression von Unc-5, mittels des RRFa-Treibers, drastisch verstärkt werden und führt zu einer starken Zunahme an nicht innervierten dorsalen Muskeln (Abb.2.36D).



**Abbildung 2.36: Verstärkung des dorsalen *side*-Phänotyps durch die Expression von Unc-5 in dorsal projizierenden Motoneurone.**

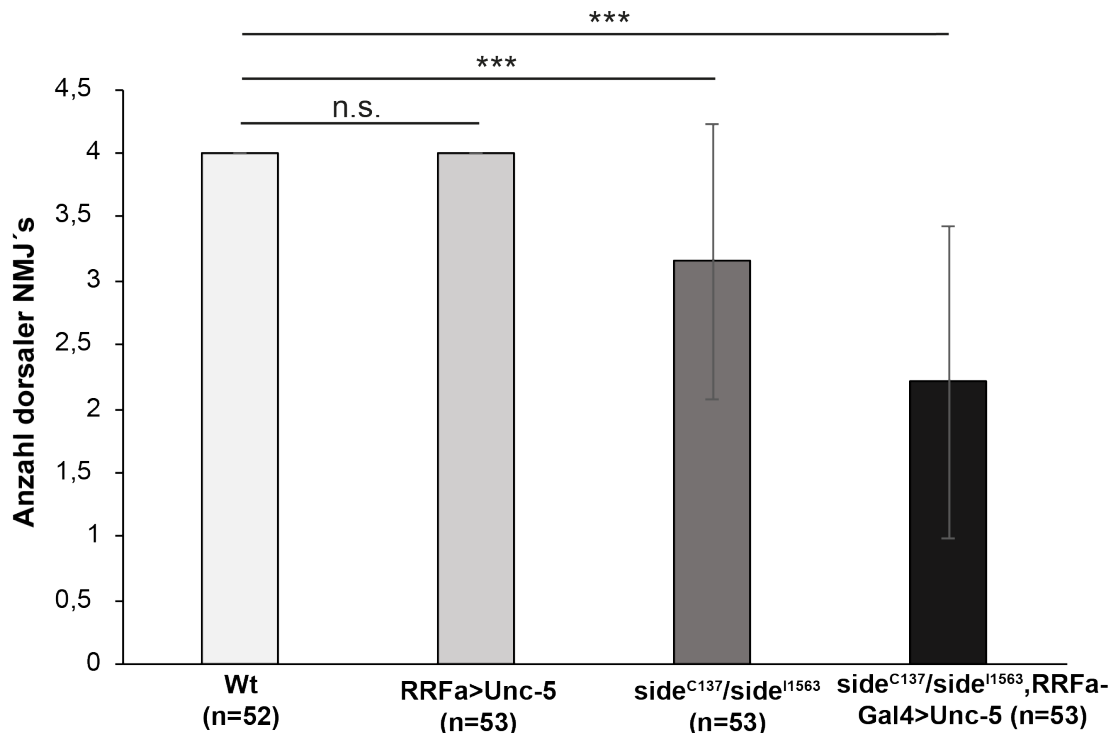
Dorsale Aufsicht auf Ganzkörper Larven. Pfeile deuten auf fehlende Innervierungen in dorsalen Muskelfeldern. (A) Wildtypisches Innervierungsmuster. (B) Unc-5 Expression in dorsal projizierenden Motoneuronen bewirkt keine Fehlprojektionen. (C) *Side* Mutante zeigt Innervierungsdefekte in einigen dorsalen Muskelfeldern. (D) Verstärkung des dorsalen *side*-Phänotyps durch die Expression von Unc-5 mit RRFa-Gal4.

Eine statistische Auszählung der innervierten Muskeln in dorsalen Muskelfeldern zeigt eine gravierende Reduktion an neuromuskulären Verbindungen, bedingt durch die Überexpression von Unc-5 in dorsal projizierenden Motoneuronen, im *side* mutanten Hintergrund [2,21±1,21 verglichen mit dem Wildtyp 4±0] (Abb.2.37).

Ein ähnlicher Phänotyp wird ebenfalls im *beat* mutanten Hintergrund erzeugt (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch diese Larven zeigen eine Verstärkung des dorsalen Phänotyps, durch eine starke Zunahme an nicht innervierten Muskeln im dorsalen Muskelfeld. Keinerlei Auswirkungen, auf die Anzahl der ausgebildeten neuromuskulären Verbindungen, hat die alleinige Expression von *unc-5*, getrieben durch RRFa-Gal4, im wildtypischen Hintergrund.



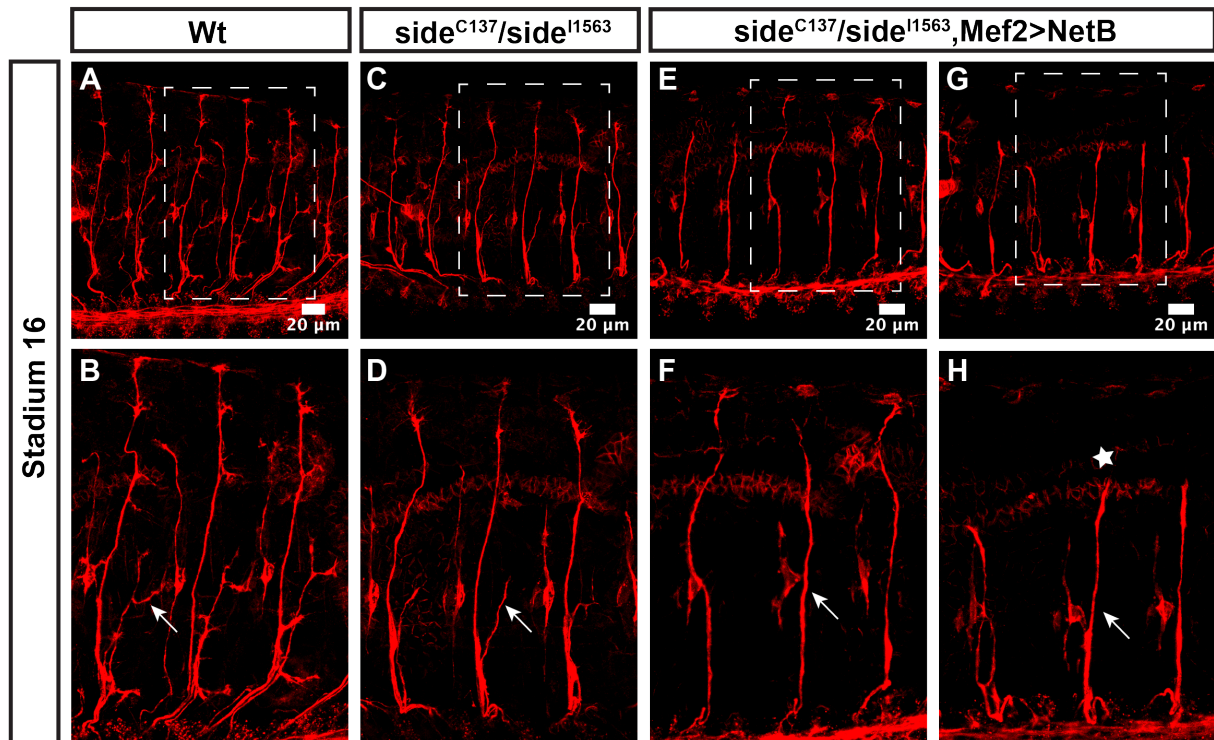
## Ergebnisse



**Abbildung 2.37: Verstärkung dorsaler Innervierungsdefekte durch NetB Expression in dorsal projizierende Motoneurone, im *side* mutanten Hintergrund.**

Dorsale Innervierungsdefekte in *side* Mutanten können durch die zusätzliche Expression von Unc-5, in den dorsal projizierenden Motoneuronen, drastisch verstärkt werden. Die Expression von Unc-5 im wildtypischen Hintergrund mit RRFa-Gal4 führt zu keinen Projektionsdefekten. \* $p < 0,05$  (Mann-Whitney U Test).

Eine Reduktion der muskulären Attraktion durch den zusätzlichen Verlust von Side zeigte für die Abstoßung im dorsalen Muskelfeld, durch die Expression von Unc-5 in Motoneuronen, eine gravierende Verstärkung des *side* mutanten Phänotyps (Abb.2.37). Die Auswirkungen auf eine Repulsion von der gesamte Musulatur, beding durch eine NetB Überexpression, wurde mit Mef2-Gal4 im *side* mutanten Hintergrund durchgeführt. Eine uniforme muskuläre Expression von NetB führt zu Innervierungsdefekten des ISNs, welcher Segmentgrenzen überschreitet und verkürzte Projektionen aufweist (Abb.2.35). Ebenfalls ist die Wegfindung des SNas betroffen und der Nervenstrang wird häufig nicht korrekt ausgebildet. Im *side* mutanten Hintergrund wird dieser Phänotyp noch verstärkt (Abb.2.38). Alle Nervenstränge des ventralen Muskelfelds sind betroffen (ISNb, ISNd, SNC und SND), zeigen massive Wegfindungsdefekte oder fehlen vollständig. Gravierend ausgeprägt sind ebenfalls die Veränderung der SNa Projektion, die in nahezu allen der untersuchten Embryonen nicht vorhanden ist. Auch eine Verstärkung der ISN Inervierungsdefekte ist erkennbar, dessen Projektion oftmals nicht die dorsalen Muskeln erreicht und das laterale Muskelfeld nicht überschreitet.



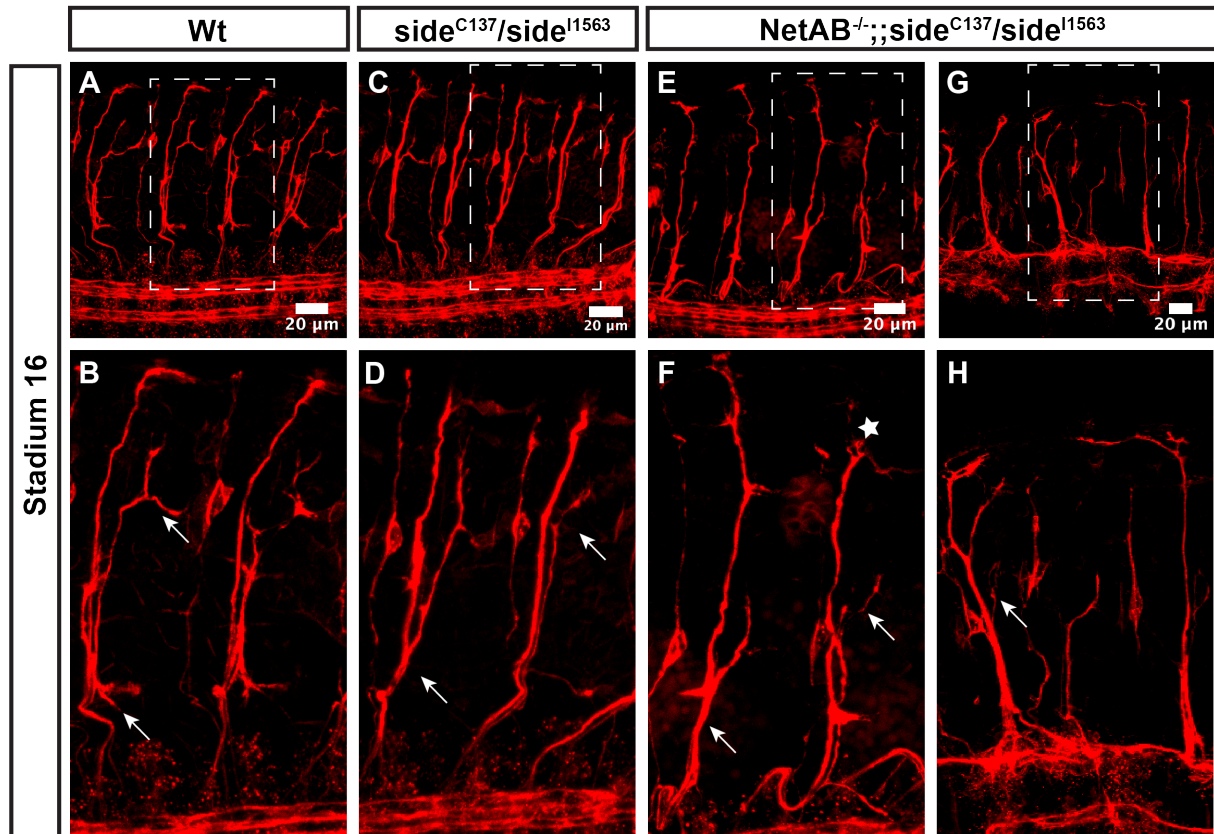
**Abbildung 2.38: Muskelspezifische Expression von NetB im *side* mutanten Hintergrund verstärkt den *side*-Phänotyp gravierend.**

FasII-Antikörperfärbung an Embryonen im Stadium 16-17 visualisiert axonale Projektion. (A-B) Wildtypisches Projektionsmuster. (C-D) *Side*- Mutante zeigt Wegfindungsdefekte im ventralen Bereich, die den ISNb, ISNd, SNc und SNd betreffen. Der SNa wird nicht in allen Segmenten korrekt ausgebildet (Pfeil). (E-H) Muskelspezifische Expression von NetB im *side* mutanten Hintergrund unterbindet die Zielfindung des SNas vollständig. Keinerlei axonale Projektionen sind im ventralen Muskelfeld erkennbar. Ebenfalls ist die Projektion des ISNs betroffen, welche oftmals frühzeitig abbricht und die dorsalen Muskeln nicht erreicht.

## 2.10 *Side*-Phänotyp Verstärkung durch den simultanen Verlust der Netrine

Ein Zusammenspiel unterschiedlichster Signalwege ist für die Entwicklung des neuromuskulären Systems notwendig und für die Wegfindung einzelner Nervenstränge essentiell (Winberg et al., 1998; Zarin et al., 2014). Bedingt durch den starken Phänotyp, der durch die muskelspezifische Expression von NetB im *side* mutanten Hintergrund hervorgerufen wird, stellte sich die Frage nach dem Phänotyp der *NetAB* und *side* Dreifach-Mutanten. Der Verlust der Netrine, kombiniert mit der *sidestep* Mutation führt zu einem starken embryonalen Phänotyp welcher alle Bereiche des Muskelfeldes betrifft (Abb.2.39 F und H).

## Ergebnisse



**Abbildung 2.39: Verstärkung des *side* mutanten Phänotyps durch den zusätzlichen Verlust der Netrine.**

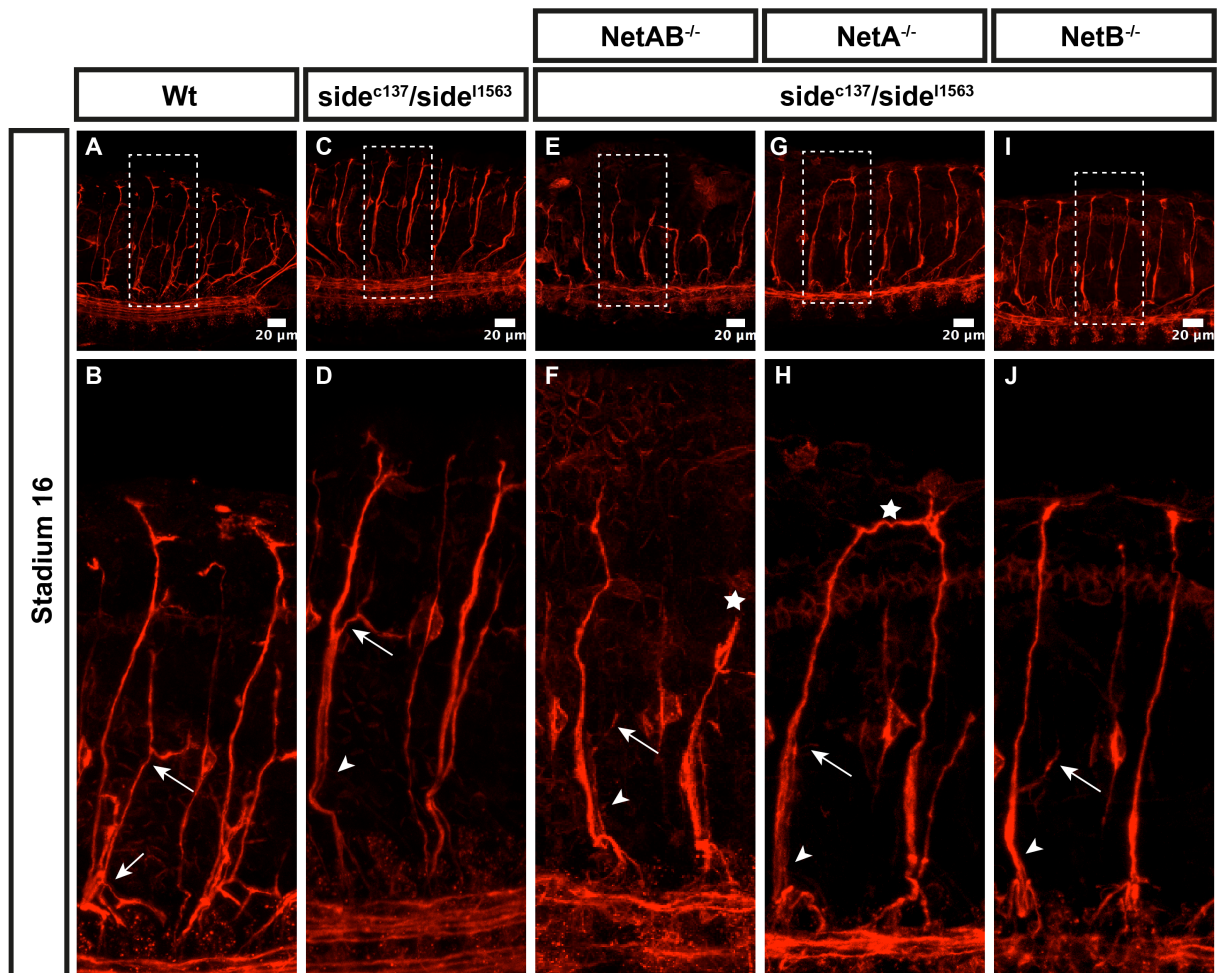
Konfokale Aufnahmen von *Drosophila* Embryonen im 16. Stadium. Markierung der peripheren Motoaxone mittels FasII-Antikörperfärbung. Obere Pfeile deuten auf die Projektion des SNa. Untere Pfeile zeigen auf den SNaC und ISNd. (A-B) Wildtypisches Innervierungsmuster. Abzweigungen des SNa bilden einen 90° Winkel. (C-D) Axonale Projektion in *side* Mutanten zeigt starke Abweichungen der Projektionen im ventralen und leichtere im lateralen Muskelfeld. (E-H) Verstärkung des *side* mutanten Phänotyps durch den zusätzlichen Verlust von NetA und NetB. Unterschiedlich starke Ausprägung des Phänotyps. Projektionsdefekte betreffen alle Nervenstränge, welche an ihren Zielmuskeln vorbeiwachsen, oder deren Projektion vor ihren Zielmuskeln abbricht. Stern deutet auf eine verkürzte ISN Projektion.

Verglichen mit der *side* Einzelmutante wirkt sich der zusätzliche Verlust der Netrine verstärkend auf den *side* mutanten Phänotyp aus (Abb.2.39). Die Projektionen des ISNs erreichen häufig nicht ihre dorsale Zielmuskulatur, ebenso konnte eine Verstärkung der Projektionsdefekte, die den SNa betrifft, festgestellt werden. Eine Variation in der Stärke der Ausprägung des Phänotyps konnte auch bei diesem Genotyp festgestellt werden. Als auffällig niedrig stellte sich zusätzlich die Überlebensrate dieser Embryonen heraus, welche nur spärlich auffindbar waren.

Um herauszustellen, ob ein Verlust von Netrin A oder Netrin B zu der Verstärkung des *side*-Phänotyps führt, wurden die jeweiligen Doppelmutanten erzeugt und sowohl embryonal als auch larval analysiert (Abb.2.40 und Abb.2.41).

## Ergebnisse

In *side* mutanten Embryonen ist vor allem das ventrale Muskelfeld betroffen und zeigt, bei einer starken Ausprägung, keine axonalen Projektionen. Ebenso können leichte Projektionsfehler des SNas beobachtet werden. Der stärkste Phänotyp wird hingegen durch den Verlust beider Netrine in Kombination mit der *side* Mutation erzeugt (Abb.2.40). Neben den fehlenden ventralen Projektionsrouten können auch starke Wegfindungsdefekte des SNas festgestellt werden und seltener stoppt der Auswuchs des ISNs, ohne die dorsalen Muskeln zu erreichen. Der Verlust von NetA und Side führt, wie in *side* Mutanten, zu Defekten im lateralen und ventralen Bereich. Allerdings konnten Segmentüberschreitungen benachbarter intersegmentaler Nerven verzeichnet werden und selten faszikuliert der SNa mit dem ISN. In *NetB* und *side* Doppelmutanten konnte ähnliche Defekte festgestellt werden, wie in den zuvor beschriebenen *NetA/side* mutanten Embryonen. Allerdings fehlen hier die Segmentüberschreitungen der intersegmentalen Nerven und die SNa Defekte waren gravierender.



**Abbildung 2.40: Verstärkung des embryonalen *side*-Phänotyps durch den Verlust von NetA oder NetB.**

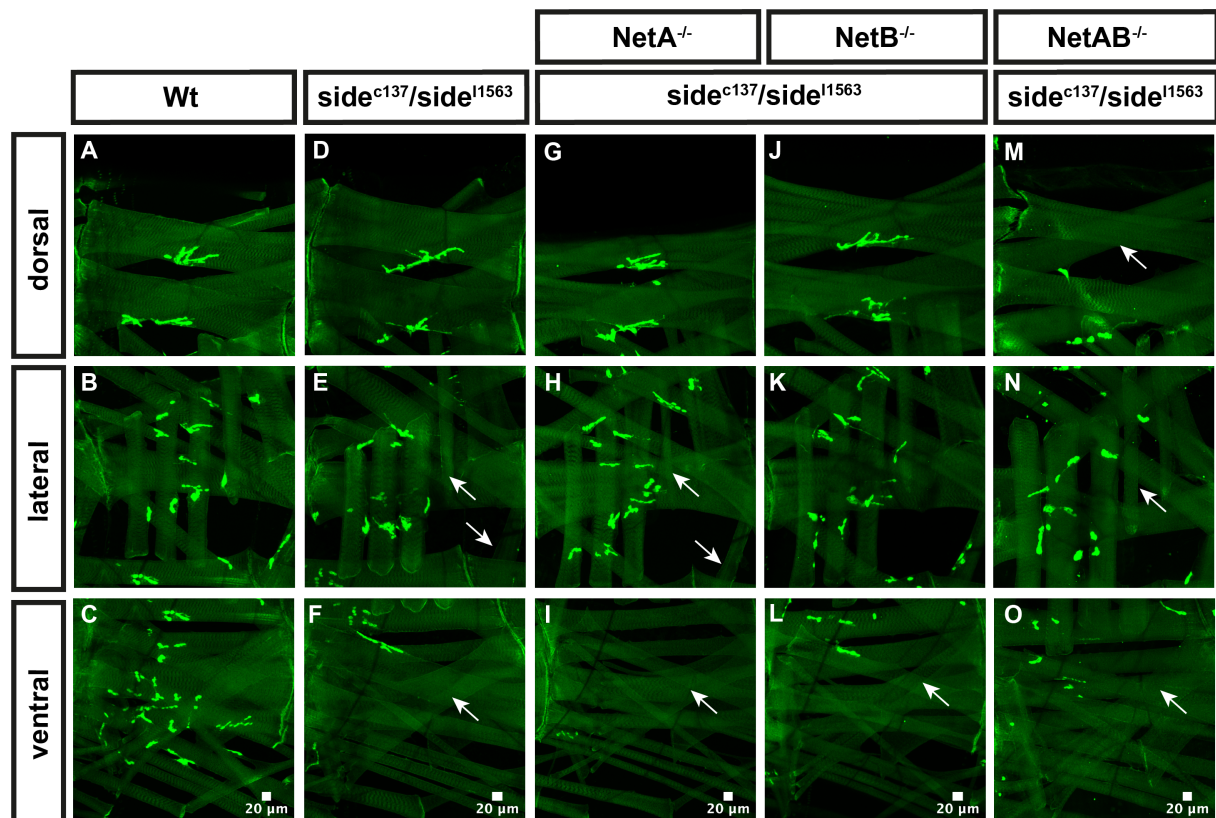
Konfokale Aufnahmen FasII gefärbter Embryonen im Stadium 16-17. (A-B) Wildtypische axonale Projektion. (C-D) *side*-Mutante. Starke Innervierungsdefekte im ventralen Bereich. Pfeil deutet auf die



## Ergebnisse

fehlenden Projektionen. Leichte SNa Defekte. Pfeilkopf deutet auf den SNa, der mit dem ISN teilweise faszikuliert. (E-F) *NetAB* und *side* Doppelmutanten. Defekte im ventralen, lateralen und dorsalen Muskelfeld. SNa Projektionsdefekte und fehlende axonale Verzweigungen im ventralen Bereich. Abbruch der ISN Protektion. Bild zeigt die starke Ausprägung des Phänotyps. (G-H) *NetA* Verlust im *side* mutanten Hintergrund. Innervierungsdefekte im ventralen und lateralen Bereich. SNa faszikuliert mit dem ISN. Segmentüberschreitung des ISNs. (I-J) Simultaner Verlust von *NetB* und *Side* erzeugt schwere Defekte im ventralen und lateralen Muskelfeld. Starke SNa Projektionsfehler sind erkennbar.

Die Analyse der unterschiedlichen Genotypen im larvalen Stadium offenbarte hauptsächlich den *side* mutanten Phänotyp (Abb.2.41). Allerdings konnten für die *NetA* und *side* doppelmutanten Larven zusätzlich leichte Innervierungsdefekte der dorsalen und lateralen Muskulatur festgestellt werden.



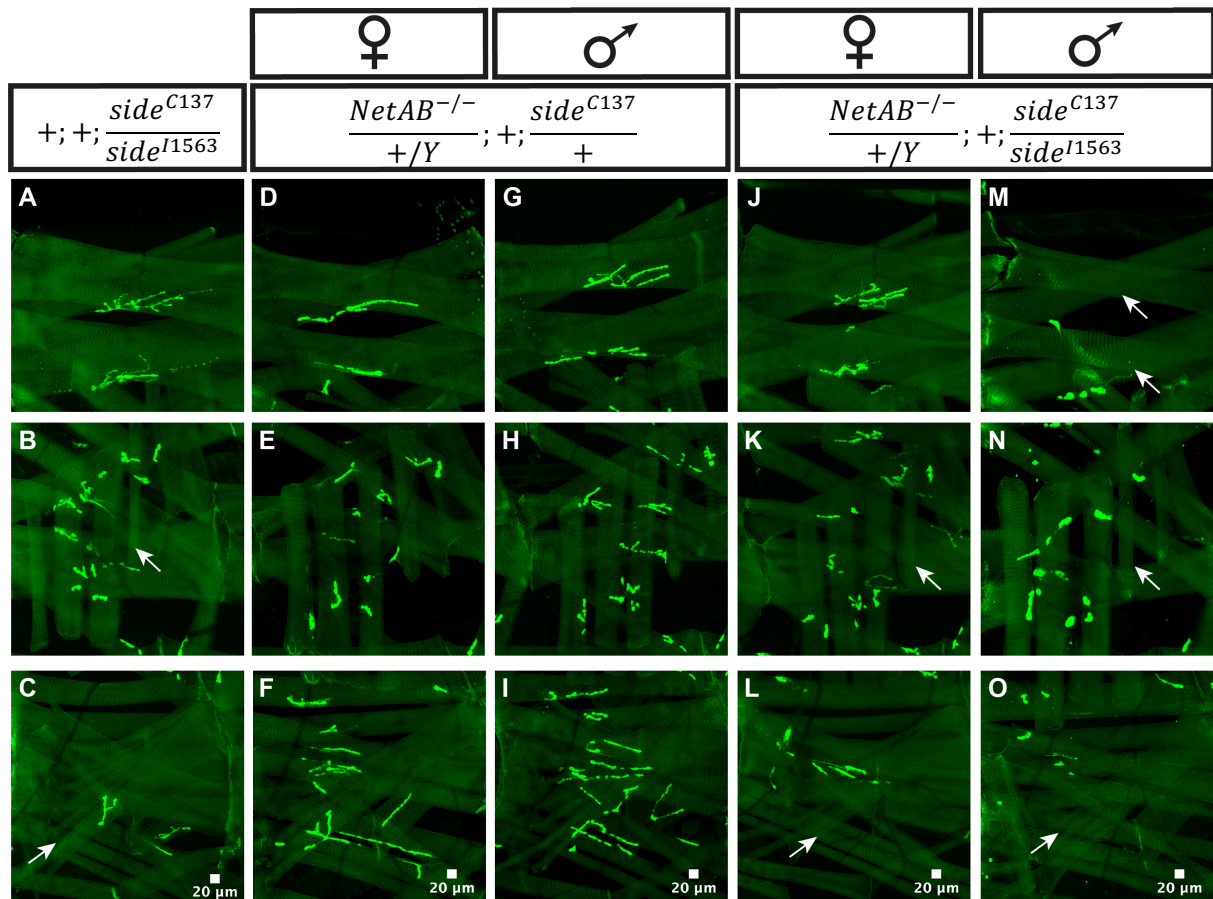
**Abbildung 2.41: *NetA/NetB* und *side* Doppelmutanten zeigen keine Verstärkung des larvalen Phänotyps.**

Konfokale Mikroskop Aufnahmen intakter Larven. Markierung der Muskeln und NMJ's durch ShGFP. (A-C) Wildtypisches Muskelfeld. (D-F) *Side* mutante Larve zeigt leichte Innervierungsdefekte im lateralen Muskelfeld und starke Defekte im ventralen Bereich. Pfeile deuten auf die betroffene Muskulatur. (G-I) Zusätzlicher *NetA* Verlust im *side* mutanten Hintergrund erzeugt keine Verstärkung des Phänotyps. (J-L) *NetB* und *side* Doppelmutanten zeigen den *side*-Phänotyp. (M-O) *NetAB* und *side* Dreifach-Mutanten zeigen eine Verstärkung des *side*-Phänotyps. Pfeil im dorsalen Muskelfeld deutet auf ein zusätzliches Fehlen von dortigen Innervierungen.

Eine Epistasie-Analyse sollte eine mögliche genetische Interaktion zwischen den beiden *Netrinen* und *side* herausstellen. Liegt eine Epistasie vor kann der Phänotyp

## Ergebnisse

einer Verlustmutation durch den Phänotyp einer zweiten Verlustmutation überdeckt werden. Für die Überprüfung ist die Verwendung von Nullmutanten notwendig, da anderenfalls kein vollständiger Funktionsverlust erwartet werden kann. Hierfür erfolgte eine Überprüfung des neuromuskulären Musters in larvalen abdominalen Hemisegmenten. Verwendet wurden Larven, welche die *Netrin AB* Defizienz und *side* Mutationen zum einen heterozygot und zum anderen hemi-/homozygot trugen. Lag *side* im heterozygoten Zustand vor konnte, sowohl im *Netrin AB* heterozygoten wie auch hemi-/homozygot Hintergrund, keine Abweichungen des neuromuskulären Innervierungsmusters im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb.2.42 D-L). Alleinig *NetAB* und *side* in Homozygose erzeugte eine Verstärkung des *side*-Phänotyps (Abb.2.42 M-O).



**Abbildung 2.42: Verstärkung des *side*-Phänotyps durch den simultanen Verlust von *NetAB*.**

Mikroskopie-Aufnahmen larvaler abdominalen Hemisegmente. Pfeile deuten auf nicht innervierte Muskeln. (A-C) *Side* Mutanten zeigen starke Innervierungsdefekte im ventralen Muskelfeld. Leichte Defekte sind im lateralen Bereich erkennbar. (D-L) *NetAB* in Hetero- und Homozygose erzeugt mit *side*<sup>C137</sup> heterozygot einen wildtypischen Phänotyp. (J-O) *Side* mutanter Phänotyp durch den Verlust einer Kopie *NetAB*, im homozygoten *side*<sup>C137</sup>/*side*<sup>1563</sup> Hintergrund. *NetAB* und *side* in Homozygose verstärkt den *side*-Phänotyp, durch den zusätzlichen Verlust dorsaler Innervierungen.

## Ergebnisse

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass nur der simultane Verlust beider Netrine in Kombination mit *side* zu einer Verstärkung des larvalen Phänotyps führt, der alle Bereiche des Muskelfeldes betreffen kann.

## Ergebnisse



### 3. Diskussion

#### 3.1 Starke Innervierungsdefekte in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten

Unterschiedliche Wegfindungsmoleküle sind von essentieller Bedeutung für die Navigation auswachender Motoaxone in der Peripherie des sich entwickelnden Embryos. An verschiedenen Verzweigungspunkten sind leitende Moleküle notwendig um die Neurone zu ihren Zielmuskeln zu führen und wirken oftmals synergistisch (Winberg et al., 1998; Zarin et al., 2014). Eine Kombination von unterschiedlichen Verlustmutationen kann somit eine Verstärkung der einzelnen Phänotypen hervorrufen (Abrell and Jäckle, 2001; Desai et al., 1996; Elkins et al., 1990).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust des Unc-5 Rezeptors schwache Defekte im lateralen und dorsalen Muskelfeld erzeugt, welche sich durch faszikulierende dorsale Motoaxone und Projektionsdefekte des SNas auszeichnen (Abb. 2.1) (Labrador et al., 2005). Gegensätzlich dazu können in *beat* Verlustmutanten schwerwiegendere Innervierungsdefekte im gesamten ventralen Muskelfeld detektiert werden (Abb. 2.1) (Fambrough and Goodman, 1996). Interessanterweise erzeugt eine simultane Hemmung des anziehenden Beaten path Ia (Beat)/Sidestep (Side) und des abstoßenden Unc-5/Netrin Signalweges gravierende embryonale und larvale Innervierungsdefekte, die das ventrale und laterale Muskelfeld betreffen (Abb. 2.1 und Abb. 2.2). Hierbei wird der Phänotyp im lateralen Muskelfeld allerdings überproportional verstärkt und kann mit einer hohen Penetranz beobachtet werden (Abb. 2.3). Der simultane Verlust von *unc-5* und *side* führt zu einem ähnlichen Phänotyp im Embryo und in der Larve, verglichen mit dem *unc-5* und *beat* doppelmutanten Phänotyp (Abb. 2.6 und Abb. 2.7). Sowohl *unc-5* und *side* mutante Embryonen als auch doppelmutante Larven zeigen Innervierungsdefekte im ventralen und lateralen Bereich, welches die Relevanz des anziehenden Beat/Side und des abstoßenden Unc-5/Netrin Signalweges hervorhebt. *unc-5*, *beat* und *side* Dreifach-Mutanten, welche keine Verstärkung des embryonalen *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps zeigen, belegen eine Beschränkung der Signalstörung auf die beiden zuvor genannten Signalwege (Abb. 2.8).

Innervierungsdefekte können in *unc-5* und *beat* mutanten Larven vor allem im lateralen und ventralen Muskelfeld detektiert werden (Abb. 2.2). Eine Auszählung der larvalen neuromuskulären Verbindungen für die einzelnen Nervenstränge zeigte eine

gravierende Reduktion an NMJ's, die vom SNa und SNc gebildet werden (Abb. 2.3), welche auf eine essentielle Bedeutung von *Unc-5* und *Beat* für die Wegfindung des gesamten segmentalen Nervs schließen lässt. Durch diese Beobachtung stellte sich die Frage nach der Projektionsroute des SNa's in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten. Eine Fehlmigration der Gliazellen in der Peripherie konnte bereits in *Netrin AB* Mutanten und *unc-5* Einzelmutanten gezeigt werden, welche zu einer abweichenden Anordnung der peripheren glialen Zellen führt (Von Hilchen et al., 2010). Da ebenfalls eine Gliazelle zwischen dem SNa und ISN positioniert ist, könnte eine Fehlmigration des Nervs bedingt durch den Verlust dieser Gliazelle begünstigt werden.

Eine Verstärkung des Phänotyps in Bezug auf die Migration der glialen Zellen, konnte für die *unc-5* und *beat* Doppelmutanten allerdings nicht gezeigt werden (Abb. 2.4). Auch kann der Verlust an Innervierungen im lateralen Muskelfeld nicht durch eine Reduktion an SNa Neurone erklärt werden, da eine Markierung der zugehörigen Zellkerne im ZNS keine verminderte Anzahl erkennen ließ (Paul, 2016). Eine indirekte Markierung der axonalen Projektion, anhand einer Markierung der Gliazellen in der Larve, offenbart allerdings eine variable Projektionsroute des SNas, dessen Projektion abbricht oder verfrüht im ventralen Muskelfeld endet und somit seine lateralen Zielmuskeln nicht erreicht (Abb. 2.5).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Signale von *Beat/Side* und *Unc-5/Netrin* zwar bei der Ausbildung des SNas kollaborieren, aber nicht bei der Migration der peripheren Gliazellen.

### **3.2 Veränderte larvale Lokomotion in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten**

Embryonale Projektionsdefekte können bei hochpenetranten Phänotypen nicht nachträglich korrigiert werden und begünstigen die Ausbildung nicht- oder fehlinnervierter Muskeln in der Larve, welche die Ausführung unterschiedlicher Bewegungsabläufe beeinflussen oder sogar vollständig unterbinden. Der Verlust von *side* erschwert beispielsweise das Putzverhalten der *Drosophila* Imago erheblich oder führt zu einem abweichenden Kriechverhalten der *side* mutanten Larven (Kinold et al., 2018, 2021).

Eine Analyse des Kriechverhaltens der *unc-5* und *beat* doppelmutanten Larven zeigte einen stark veränderten Bewegungsablauf, welcher vermutlich die Reduktion der

## Diskussion

Kriechgeschwindigkeit um bis zu 50% hervorruft (Abb. 2.9). Bei einer starken Ausprägung des Phänotyps verliert das posteriore Ende den Kontakt zum Substrat und erschwert einen flüssigen und zügigen Bewegungsablauf (Abb. 2.10). Für die Flucht vor einem Fressfeind ist das Vorwärtskriechen, von in einer Frucht eingegrabenen Larven, vermutlich ein überlebenswichtiger Bewegungsablauf, welcher in *unc-5* und *beat* Doppelmutanten deutlich gehemmt wird. Eine Reduktion der Kriechgeschwindigkeit konnte bereits für *side* mutante Larven gezeigt werden (Kinold et al., 2018), die einen Phänotyp im ventralen Muskelfeld zeigen, der mit dem *beat* Phänotyp vergleichbar ist (Fambrough and Goodman, 1996). Diese Ergebnisse lassen auf eine größere Bedeutung der ventralen Muskulatur, im Vergleich zur lateralen, für das Kriechen schließen.

Es stellte sich jedoch zusätzlich die Frage, ob noch weitere essentielle Bewegungsabläufe und deren Ausführung durch den Verlust von lateralen und ventralen Innervierungen erschwert werden, da in den Doppelmutanten fast jedes Segment betroffen ist. Dafür wurde die Ausführung der Fluchtrolle getestet, eine Rolle um die laterale Körperlängsachse, welche als stereotypische Fluchtreaktion vor einem Schmerzreiz oder der Attacke einer parasitoiden Wespe gezeigt wird (Hwang et al., 2008; Tracey et al., 2003). Eine Analyse der Reaktionen auf die Attacken von *Leptopilina boulardi*, eine auf *Drosophila* spezialisierte parasitoiden Wespe, zeigte eine stark reduzierte Ausführung der Schmerzrolle, welche durch vermehrtes Drehen der Kopfsegmente und lediglich angedeutete Drehungen vermutlich kompensiert wurde (Abb. 2.12). In einem Hitzeplatten-Assay konnte ebenfalls eine gravierende Reduktion der Schmerzrolle für *unc-5* und *beat* doppelmutante Larven gezeigt werden, welche nur die halbierte Anzahl an Fluchrollen pro Minute, verglichen mit dem Wildtyp, zeigten (Abb. 2.13). Erklärt werden kann dieses Ergebnis durch fehlende Innervierungen im lateralen Muskelfeld und bestätigt bereits publizierte Ergebnisse, dass das schmerzinduzierte Rollverhalten partiell durch SNa Neurone hervorgerufen wird (Yoshino et al., 2017). Wurde das Nervengift Tetanustoxin in SNa Neuronen exprimiert, konnte ebenfalls eine Reduktion an Fluchrollen beobachtet werden, welches die Bedeutsamkeit der lateralen Muskulatur für die Ausführung des Fluchtverhaltens bestätigte. Interessanterweise konnten im Selbstaufrichtungs-Assay keinerlei Abweichungen, in der Fähigkeit sich von einer „Rückenlage“ zurück in Kriechposition zu drehen, festgestellt werden (Abb. 2.14). Das Selbstaufrichten wird allerdings nicht durch einen Schmerzreiz induziert, welcher über C4 da Neurone

detektiert wird und an die Neurone des SNas weitergeleitet wird. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass noch weitere Muskelgruppen, wie auch die Mundhaken, an dieser komplexen Bewegung der Selbstaufrichtung involviert sind und deren Ausführung ermöglichen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer präzisen Innervierung der somatischen Muskulatur für die Ausführung von koordinierten Bewegungen. Für das larvale Kriechen scheint die ventrale Muskulatur von größerer Bedeutung zu sein, im Gegensatz zum schmerzinduzierten lateralen Rollen, für welches die laterale Muskulatur im Vordergrund zu stehen scheint.

### 3.3 Partielle Rettung des *unc-5* und *beat* mutanten Phänotyps

Beat wird während der embryonalen Entwicklung von allen Motoneuronen exprimiert und eine pan-neuronale oder motoneuronale Beat Expression kann den wildtypischen Zustand wiederherstellen (Heymann, 2017; Siebert et al., 2009). Ebenso erfolgreich ist eine Rettung mit der Beat-Promotorlinie 40636, welche auch den *unc-5* und *beat* doppelmutanten Phänotyp teilweise rettet (Abb. 2.15) (Kinold, 2016). Zurückbleiben leichtere Defekte im lateralen Muskelfeld der Larven, welche dem *unc-5* einzelmutanten Phänotyp entsprechen (Abb. 2.15).

Eine ähnliche Qualität der Rettung wird durch die Verwendung von Hb9-Gal4 erzielt. Hb9 wird ISNb spezifisch und in einigen wenigen Interneuronen exprimiert (Odden et al., 2002). Auch hier bleiben leichtere Innervierungsdefekte der lateralen Muskulatur erhalten (Abb. 2.17). Zudem führt die simultane Expression von Unc-5 und Beat zu keiner signifikanten Steigerung der Rettungsqualität, getrieben durch die Beat-Promotorlinie 40636, deutend auf eine bedeutendere Rolle von Beat für die Wegfindung von ventral projizierenden Motoneuronen (Abb. 2.16).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die hier verwendeten Treiberlinie zwar das Expressionsmuster von Beat widerspiegeln, aber nicht das von Unc-5. Eine Rettung der lateralen Innervierungsdefekte kann somit vermutlich nur mittels der Verwendung einer geeigneten Unc-5 Treiberlinie gelingen, die eine wildtypische Expression des Rezeptors in den SNa Neuronen, einigen ISN Neuronen und den ISN umgebenden Gliazellen zum passenden Zeitpunkt ermöglicht. Dazu könnten ähnlich wie bei Beat verschiedene Enhancer Fragmente auf ihr Expressionsmuster analysiert werden (Kinold, 2016).

### 3.4 Keine Sekretion von Beat path Ia

Wegfindungsmoleküle werden von unterschiedlichen Strukturen exprimiert, auf deren Oberfläche dargeboten und dienen der Navigation von Motoaxonen und Gliazellen. Richtungsweisende Informationen können allerdings auch von Zielzellen sekretiert werden, wodurch ein Gradient entsteht, der Positionsinformation für migrierende Wachstumskegel erzeugt.

Bedingt durch unscharfe immunhistochemische Färbungen und begründet durch Strukturvorhersagen wurde Beaten path Ia als sekretiertes Protein publiziert (Bazan and Goodman, 1997; Fambrough and Goodman, 1996; Pipes et al., 2001). Eine Rettung des *beat* mutanten Phänotyps kann durch eine pan neuronale (*elav-Gal4*) oder motoneuronale (*FasII-Gal4*) Expression von Beat herbeigeführt werden (Heymann, 2017; Siebert et al., 2009).

Weder eine Expression in Gliazellen (*repo-Gal4*), Hämocyten (*serp-Gal4*) noch Fettkörper (*ppl-Gal4*) vermag eine Wiederherstellung des wildtypischen Innervierungsmusters in der Larve zu gewährleisten (Abb. 2.18).

Eine Sekretion des Rezeptors würde allerdings unabhängig von der gewählten Treiberlinie die Rettung des mutanten Phänotyps herbeiführen und untermauert die Annahme eines nicht sekretierten, zellautonomen Proteins. So kann im Kontrast dazu beispielsweise der *tolloid-related 1* (*tlr1*) Phänotyp durch eine Expression des sekretierten Proteins mittels unterschiedlicher Treiberlinien vollständig gerettet werden (Meyer and Aberle, 2006; Serpe and O'Connor, 2006). Für die *unc-5* und *beat* Doppelmutanten bedeutet diese Erkenntnis, dass die beiden Rezeptoren in den exprimierten Geweben nur in cis miteinander interagieren können.

Die Expression von Beat in unterschiedlichen Geweben demonstrierte, dass der Rezeptor nicht frei sekretiert und infolgedessen den *beat* mutanten Phänotyp nur zellautonom retten kann.

### 3.5 Unc-5 Expression auf SN und peripheren Gliazellen

Das Expressionsmuster eines Proteins kann Aufschlüsse über dessen funktionelle Bedeutung ermöglichen. *Unc-5*, ein repulsiver Netrin Rezeptor, wird nach Färbungen mit spezifischen Antikörpern und Markierung der mRNA Verteilung im gesamten segmentalen Nerv exprimiert und kann in frühen embryonalen Stadien in einigen

## Diskussion

Neuronen des ISNs detektiert werden (Keleman and Dickson, 2001; Labrador et al., 2005; Zarin et al., 2012). Ebenfalls ist der Rezeptor auf den Ausgangs (Exit)- und peripheren Gliazellen, die den ISN und SN umgeben exprimiert (Keleman and Dickson, 2001).

Eine Analyse einer *Unc-5* Exon-Trap- und *Unc-5*-fTRG-Linie visualisierte ein Expressionsmuster, welches mit den bereits publizierten Beobachtungen übereinstimmt (Abb. 2.19). Beide Linien visualisieren das wildtypische Expressionsmuster von *unc-5*, wobei das GFP in der Exon-Trap Linie extrazellulär und in der fTRG-Linie intrazellulär lokalisiert ist (Abb. 2.20). Publiziert ist ebenfalls eine Expression von *Unc-5* in RP2 und aCC Neuronen, welche allerdings nur in frühen Entwicklungsstadien detektiert werden kann und später herunterreguliert wird (Zarin et al., 2012). In späteren Entwicklungsstadien konnten auch Keleman und Dickson, anhand einer immunhistologischen Färbung, keine Expression des Rezeptors auf den dorsalen Neuronen identifizieren. Um die Expression von *Unc-5* dort nachzuweisen könnte eine *In-situ*-Hybridisierung mit einer Antikörperfärbung kombiniert werden, um eine doppelte Markierung der RP2 und aCC Neurone in den früheren embryonalen Stadien zu erzielen. Eine Expression des Proteins konnte ebenfalls in unterschiedlichen Zellgruppen des ZNS und der Wurzel des segmentalen Nervs detektiert werden (Abb.2.19) (Keleman and Dickson, 2001). Die Expression des repulsiven Rezeptors durch Motoneurone des SNAs belegt die Hypothese, dass die laterale Muskulatur kein NetB exprimiert und somit von *Unc-5* positiven Motoaxone innerviert wird. Diese Axone werden auf dem Weg zu ihren lateralen Muskeln von den ventralen, NetB exprimierenden, Muskeln abgestoßen und gelangen so zu ihrer Zielmuskulatur.

Die *unc-5* mRNA war eindeutig detektierbar in verschiedenen Zellclustern des ZNS, verglichen mit der Exon-Trap- und der fTRG-Linie. Ebenfalls exprimieren die Ausgangs- und Gliazellen in der Peripherie den repulsiven Rezeptor (2.21).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die in den *unc-5* und *beat* doppelmutanten Embryonen und Larven untersuchten Wegfindungsdefekte des SNAs durch den Verlust beider Rezeptoren (*Unc-5* und *Beat*) erzeugt werden und *Unc-5* für die Interpretation der muskulären Netrin Expression bedeutsam ist.

### **3.6 Unc-5 und Beat exprimierende S2 Zellen zeigen keine Interaktion**

Sowohl Unc-5 als auch Beat werden auf Motoneurone des segmentalen Nervs exprimiert, welches die Frage nach einer möglichen cis-Interaktion aufwirft. Interagieren Proteine miteinander, kann diese Wechselwirkung häufig mit einem Zell-Zell-Aggregations-Assay belegt werden.

So konnte bereits gezeigt werden, dass die Wegfindungsmoleküle Side und Beat miteinander interagieren (Siebert et al., 2009). Ebenfalls konnte so der Nachweise für das homophile Zelladhäsionsmoleküle Neuroglian geführt werden (Hortsch et al., 1998). Der simultane Verlust von Unc-5 und Beat erzeugt starke Innervierungsdefekte im Embryo und wirft die Frage nach einer möglichen Wechselwirkung zwischen den zwei Rezeptoren auf.

Die bereits publizierte Interaktion zwischen Side und Beat diente als Kontrolle im Zell-Aggregations-Assay, die, nach der Vermischung der getrennt transfizierten Zellen, eine deutliche Bildung von Zell-Zell-Aggregaten zeigte (Siebert et al., 2009) (Abb. 2.22). Keine Bildung von Aggregaten konnte nach dem Vermischen von Unc-5-Cherry und Beat-GFP exprimierenden Zellen beobachtet werden, welches eine Interaktion der beiden Rezeptoren über Zellmembranen hinweg unwahrscheinlicher macht (Abb. 2.22). Diese Beobachtung kann durch die Verstärkung des *beat* mutanten Phänotyps, durch den zusätzlichen Verlust von *unc-5*, bestärkt werden, da eine Verstärkung vor allem mit der Inhibition eines weiteren Signalweges einhergeht.

Somit demonstrieren diese Ergebnisse, dass die beiden Rezeptoren Unc-5 und Beat nicht miteinander interagieren. Jedoch, bei simultaner Störung, die Wegfindung des SNas beeinträchtigen.

### **3.7 Ektopische Expression von Unc-5 und Beat erzeugt Muskeldefekte**

Eine ektopische Expression von Wegfindungsmolekülen kann Informationen über die Funktion eines Proteins erlauben, welches normalerweise in einem bestimmten Gewebe exprimiert wird.

Die Überexpression auf allen somatischen Muskeln (Mef2-Gal4) von Unc-5 führt zu einem deutlichen Verlust an NMJ's, besonders im lateralen Muskelfeld (Abb. 2.23 und 2.24). Verstärkt wird dieser Phänotyp durch eine simultane muskelspezifische



## Diskussion

Expression von Unc-5 und Beat. Sowohl der Phänotyp der simultanen, als auch der der alleinigen Expression von Unc-5 beruht interessanterweise auf einen Verlust an Muskelfaser (Abb.2.24). Gegensätzlich beispielsweise zur muskelspezifischen Überexpression von Side, welches zu einem Verlust an Innervierungen durch Fehlprojektionen führt (Kinold et al., 2018). Bereits für die Migration der glialen Zellen konnte eine Bedeutung von Unc-5 gezeigt werden, da dessen Verlust eine fehlerhafte Anordnung der peripheren Gliazellen herbeiführt, welche, begründet durch die verminderte Detektion des abstoßenden Netrin-Signals der Mittellinie, nicht weit genug in die Peripherie gelangen (Von Hilchen et al., 2010). Ebenfalls führt eine Gliazellen-spezifische Überexpression von Unc-5 zu einer ektopischen Lokalisation longitudinaler Gliazellen in der Peripherie (Von Hilchen et al., 2010). Eine fehlerhafte Migration der Muskelgründerzellen oder der Myotube scheint unwahrscheinlich als Erklärung für den Phänotyp, da für diesen Prozess keine Funktion von Netrin bekannt ist, welches ein abstoßendes Signal erzeugen könnte (zusammengefasst in: Schnorrer and Dickson, 2004). Ebenfalls sind sowohl Muskeln mit direkten (z.B. Muskel 4), als auch indirekten (z.B. Muskel 21,22 und 23) Ansatzstellen betroffen, welches auf eine Degeneration der Muskelfasern schließen lässt, welche vorrangig den lateralen Bereich betrifft. Ebenfalls können gelöste Muskeln detektiert werden, die den Kontakt über die Ansatzstelle/n mit der Epidermis oder zu anderen Muskeln verloren haben. Die ektopische Expression des Unc-5 Rezeptor wirkt sich somit scheinbar negativ auf die Differenzierung und die Instandhaltung der lateralen Muskulatur aus. Der dorsale Verlust von Muskeln wird hingegen verstärkt durch die gleichzeitige Expression von Unc-5 und Beat. Bereits im embryonalen Entwicklungsstadium ist dieser Phänotyp erkennbar und bewirkt Projektionsdefekte der peripheren Motoaxone (Abb. 2.26). Interessanterweise sind NetB negative Muskeln besonders stark betroffen, welches durch eine Blockierung oder Bindung von Unc-5, durch NetB auf der Muskulatur, erzeugt werden könnte. In der Maus konnte gezeigt werden, dass die neuronale Expression von Unc5H in Netrin-Verlustmutanten zu einem massiven Absterben der Unc5H exprimierenden Neuronen führt, erzeugt durch das Abspalten der Todesdomäne (Llambi et al., 2001). Ist Netrin präsent wird dieser Mechanismus unterbunden (Llambi et al., 2001). Allerdings führt die muskelspezifische Expression im *NetAB* mutanten Hintergrund zum gleichen Phänotyp, der vor allem eine Reduktion von Muskelfasern im lateralen Bereich zeigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Zu testen wäre, ob eine Erhöhung der NetB Konzentration, durch eine zusätzliche

muskelspezifische Expression auf der gesamten Muskulatur, die Apoptose durch NetB verhindern würde. Andernfalls würde die Degeneration der Muskelfaser, ausgelöst durch die muskuläre Expression von Unc-5, auf einen anderen Mechanismus in *Drosophila* schließen lassen, der nicht durch NetB blockiert werden kann.

Der Verlust der lateralen Muskulatur wirkt sich zusätzlich negativ auf die larvale Lokomotion aus und reduziert das, durch einen Schmerzreiz ausgelöste, laterale Rollen signifikant (Abb. 2.25). Auch hier wirkt sich die simultane Expression von Unc-5 und Beat stärker auf das Rollverhalten aus, als die Einzelexpression von Unc-5, welches durch die gravierende Reduktion an lateralen Muskeln begründet werden kann.

Diese Beobachtungen verdeutlichen erneut die bedeutende Rolle der lateralen Muskulatur und ihre korrekte Innervierung für das laterale Rollen.

### **3.8 Netrin wird auf der embryonalen Muskulatur und im ZNS exprimiert**

Um tiefere Einblicke in die Funktionsweise der, durch die Netrine vermittelte, Abstoßung zu erlangen, erfolgte eine Analyse der Expressionsmuster von NetA und NetB. Anhand von Exon-Trap-Linien konnten unterschiedliche Gewebe identifiziert werden, die Netrin exprimierten.

Die Analyse der NetA Exon-Trap-Linie veranschaulichte die Präsenz des Proteins in epidermalen Feldern und einigen Zellen des zentralen Nervensystems, ebenso auf den Mittellinien-Gliazellen (Abb. 2.27). Stark muskulär exprimiert wird NetA von den dorsalen Muskeln 1 und 2, sowie von den lateralen Muskeln 5 und 8. Auf den restlichen Muskeln konnte NetA kaum oder nur sehr schwach detektiert werden (Abb. 2.28). Verglichen mit den publizierten Daten von Mitchell und Kollegen (Mitchell et al., 1996) konnte eine zusätzliche Expression von NetA auf den lateralen Muskeln 5 und 8 detektiert werden.

Außerdem erfolgte eine Analyse von NetB Exon-Trap-Linien, welche eine Expression des Moleküls auf der gesamten ventralen Muskulatur und einigen dorsalen Muskeln (Muskel 1 und 2) offenbarten (Abb. 2.29). Kein GFP getaggtetes NetB konnte hingegen auf den lateralen Muskeln detektiert werden. Im zentralen Nervensystem wird NetB, verglichen mit NetA, von mehr Zellen und ebenfalls von den Mittellinien-Gliazellen exprimiert. Ein ähnliches Expressionsmuster publizierten bereits Mitchell und Kollegen

(Mitchell et al., 1996), allerdings mit einer reduzierten Anzahl an NetB exprimierenden Muskeln im dorsalen und ventralen Muskelfeld.

Publiziert wurden die Netrine in *Drosophila* vor allem als sekretierte Proteine (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996). In bisherigen Publikationen bestehen teilweise widersprüchliche Befunde: Netrin-1 könnte sowohl sekretiert, als auch auf der Zelloberfläche, als haptotaktisches Signal dargeboten werden (Dominici et al., 2017; Harris et al., 1996; Kennedy et al., 2006; Mitchell et al., 1996; Varadarajan et al., 2017). Um die Fragestellung zu klären, ob die Netrine in peripheren Geweben von *Drosophila* abgesondert werden, erfolgte die Verwendung eines Morphotrap im Hintergrund der Netrin Exon-Trap-Linien.

Mittels eines Morphotrap können frei bewegliche, GFP-markierte, Proteine an beliebige Strukturen gebunden werden (Harmansa et al., 2015). Der Morphotrap besteht aus einem extrazellulären Einzeldomänenantikörper, welcher über eine CD8 Domäne in der Zellmembran verankert wird und mittels einem zytoplasmatischen Fluoreszenzmolekül detektiert werden kann (Harmansa et al., 2015). Eine Expression des Fusionsmoleküls kann GFP-gekoppelte Moleküle auf Zelloberflächen binden (Harmansa et al., 2015). Eine Bindung der sekretierten Isoformen des Zelladhäsionsmoleküls Fasciclin II an die peripheren Gliazellen, bestätigte die Funktionalität des Morphotrap (Abb. 2.30). Wurde der Morphotrap im Hintergrund der NetA oder NetB Exon-Trap-Linie exprimiert, konnte keines der beiden Netrine an die peripheren Gliazellen gebunden werden (2.31). Diese Beobachtung spricht gegen eine mögliche Sekretion der Netrine in *Drosophila*. Unterstützend dazu war eine Detektion von GFP-Signalen in larvaler Hämolymphe, entnommen aus Larven der NetA und NetB Exon-Trap-Linien, mittels eines Western Blots nicht möglich (2.32).

Dieses Ergebnis spricht ebenfalls gegen eine Sekretion der Netrine in *Drosophila* und lässt eine Darbietung der Moleküle auf der Zelloberfläche vermuten.

### **3.9 Unc-5 exprimierende Axone werden von Netrin B abgestoßen**

Der Unc-5 Rezeptor wird für die repulsive Interpretation von Netrin benötigt und bewirkt eine Abstoßung der Wachstumskegel von Netrin-markierte Zelloberflächen (Keleman and Dickson, 2001). Wird die NetB Expression konträr zur endogenen Expression in der ventralen und dorsalen Muskulatur in den lateralen Muskeln getrieben, können embryonale Innervierungsdefekte in diesem Bereich des Muskelfeldes festgestellt

## Diskussion

werden, welche bis zur L3 Larve persistieren (Abb. 2.33). Diese Fehlinnervierungen werden vermutlich durch die Unc-5 vermittelte Abstoßung von NetB induziert. Zusätzlich belegt diese Beobachtung, dass im Wildtyp laterale Muskeln kein NetB exprimieren. Interessanterweise können durch eine Expression von NetB auf der gesamten somatischen Muskulatur (Mef2-Gal4) ebenfalls starke Projektionsdefekte im Embryo, die das gesamte Muskelfeld betreffen, erzielt werden. Diese sind jedoch besonders stark im lateralen Bereich ausgeprägt und dort auch bis in das larvale Stadium überdauernd (Abb. 2.35).

Innervierungsdefekte können ebenfalls durch die nervenspezifische Expression des repulsiven Netrin Rezeptors Unc-5 erzeugt werden. Motoaxone des ISNbs projizieren zu den ventralen Muskeln und können durch die ektopische Expression von Unc-5, unter der Verwendung des ventralen Motoneuronen spezifischen Treibers Hb9-Gal4, von ihren Zielmuskeln, sowohl im Embryo als auch in der Larve, abgestoßen werden (Abb. 2.34). Die Expression von Frazzled mit Hb9-Gal4 erzeugte hingegen keinen erkennbaren Phänotyp und veranschaulicht die abstoßende Wirkung des Unc-5 Rezeptors (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der Expression in ventral projizierenden Motoneuronen ist die ektopische Expression von Unc-5 in den Motoneuronen (RRFa-Gal4), welche zu den dorsalsten Muskeln projizieren, nicht ausreichend stark genug, um eine Abstoßung im wildtypischen Hintergrund zu induzieren (Abb. 2.36). Dies lässt sich vermutlich durch die nur teilweise Expression von Netrin auf den dorsalen Muskeln (Muskel 1 und 2) erklären (Mitchell et al., 1996). Eine zusätzliche Erklärung könnte darin bestehen, dass sonstige wegweisende Signalwege eine fehlerfreie Innervierung der dorsalen Muskelfelder ermöglichen. Beispielsweise reduziert der Funktionsverlust des Muskel-Attraktans Side die Anziehung der Muskulatur und bewirkt in einigen dorsalen Segmenten Innervierungsdefekte (Kinold et al., 2018). Eine Wiederholung des Experimentes im *side* mutanten Hintergrund reduzierte die Attraktion der Muskulatur und offenbarte einen gravierenden Anstieg an fehlende NMJ's der Muskeln 1,2,9 und 10, verglichen mit der *side* Mutante (Abb. 2.36 und Abb. 2.37). Die Expression von Unc-5 mit RRFa-Gal4 erzeugt einen ähnlich stärkeren Phänotyp im *beat* mutanten Hintergrund (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bedingt durch die Verstärkung der Projektionsdefekte im *side* mutanten Hintergrund erfolgte eine Expression von NetB auf der gesamten embryonalen Muskulatur (Mef2-Gal4), in *side* Mutanten (Abb. 2.38). Wird NetB auf allen Muskeln präsentiert, können

die gravierendsten Innervierungsdefekte erzeugt werden, welche alle Bereiche des Muskelfeldes betreffen und sich zudem besonders stark im lateralen Muskelfeld ausprägen. Diese Verstärkung entsteht durch ausbleibende Defaszikulationen im ventralen Muskelfeld, bedingt durch den *side* Funktionsverlust und die Expression von NetB auf der gesamten Muskulatur, die vor allem Unc-5 positive Motoaxone vom lateralen Muskelfeld fernhält. Im dorsalen Bereich wird, infolge des *side* Verlustes, zusätzlich die Attraktivität der Muskeln reduziert und die abstoßende Wirkung der nun vollständig NetB positiven Muskeln verstärkt. Interessant wäre eine Markierung der embryonalen neuromuskulären Endplatten, da möglicherweise keine NMJ's gebildet werden können.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass für die Wegfindung des SNas Unc-5 und Beat eine bedeutende Rolle spielen, da die auswachsenden Motoaxone von NetB exprimierenden Muskeln im ventralen und dorsalen Bereich abgestoßen und in das laterale Muskelfeld geleitet werden. Zusätzlich erhöht die Detektion des muskulären Side die Anziehung der lateralen Muskeln und ermöglicht eine fehlerfreie Innervierung der medialen Muskulatur.

### **3.10 Side-Phänotyp Verstärkung durch den simultanen Verlust der Netrine**

Eine Störung unterschiedlicher Signalwege kann Projektionsdefekte und somit die Ausprägung des Phänotyps verstärken (Abrell and Jäckle, 2001; Desai et al., 1996; Elkins et al., 1990). *Side* Mutanten zeigen vor allem axonale Fehlprojektionen im ventralen Muskelfeld (Abb. 2.39), die durch eine ausbleibende Defaszikulation der Nervenstränge erzeugt werden (Sink et al., 2001).

Dieser Phänotyp kann durch einen zusätzlichen Verlust von beiden Netrinen (NetA und B) verstärkt werden (Abb. 2.39). Im Embryo sind die Defekte im gesamten Muskelfeld präsent, allerdings erreicht nur eine stark reduzierte Anzahl an Individuen die späten Entwicklungsstadien (Stadien 16-17).

Um zu zeigen, ob Netrin A oder Netrin B die Verstärkung des *side*-Phänotyps hervorruft, wurden die jeweiligen Doppelmutanten erzeugt und sowohl embryonal als auch larval analysiert. Eine leichte Verstärkung des *side*-Phänotyps wird im Embryo sowohl mit *NetA* als auch mit *NetB*, in Kombination mit *side*, hervorgerufen (Abb. 2.40). In der Larve bewirken nachfolgende Reparaturmechanismen häufig eine

Abschwächung der larvalen Phänotypen und lassen, für die jeweiligen analysierten Genotypen, nur noch den *side* mutanten Phänotyp erkennen (Abb. 2.41).

Eine Epistasie-Analyse zeigte keine genetische Interaktion zwischen beiden Netrinen und Sidestep (Abb. 2.42), welches jedoch auch auf die schwache Auswirkung des doppelten Netrin-Verlustes, der im Embryo nur leichte Innervierungsdefekte hervorbringt, zurückgeführt werden kann. Der Verlust beider Netrine erzeugt Projektionsdefekten des ISNs, ISNbs und SNas (Labrador et al., 2005; Mitchell et al., 1996; Winberg et al., 1998) und lässt bei einer nicht vorhandenen Epistasie keinen starken Phänotyp im peripheren axonalen Projektionsmuster erwarten. Interessanterweise konnten Brankatschk und Dickson zeigen, dass für die Wegfindung von kommissuralen Axonen eines der beiden Netrine ausreichend ist (Brankatschk and Dickson, 2006), wodurch auf eine redundante Funktion der beiden Proteine bei der Entwicklung des ZNS geschlossen werden kann. Dies redundante Funktion wäre auch für die Wegfindung von peripheren Motoaxone möglich und würde die schwache Ausprägung der Phänotypen erklären.

Die Verstärkung der Projektionsdefekte in *NetAB* und *side* Dreifach-Mutanten wird somit durch die gleichzeitige Inhibition zweier Signalwege hervorgerufen und verdeutlicht die Bedeutsamkeit eines Zusammenspiels unterschiedlicher Mechanismen für die axonale Wegfindung in *Drosophila melanogaster*.

### 3.11 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der segmentale Nerv durch eine synergistische Kooperation des repulsiven Uncoordinated-5 (Unc-5)/Netrin und dem attraktiven Beaten path Ia (Beat)/Sidestep (Side) Signaltransduktionsweg zu seinen Zielmuskeln geleitet wird. Auf dem Weg aus dem ZNS und in der Peripherie ist die repulsive Interpretation von NetB von Bedeutung, sowie die Anziehung der Muskulatur und dadurch induzierte Defaszikulation, vermittelt durch Sidestep und Beat. Eine Störung der einzelnen Signalwege erzeugt jeweils leichte bis mittelschwere Defekte, kann durch den simultanen Verlust allerdings um ein Vielfaches verstärkt werden, da die leitenden Signale fehlen. In diesem Zusammenhang wäre eine Identifizierung weiterer kooperativ lenkender Mechanismen interessant, die andere Nervenstränge des neuromuskulären Systems von *Drosophila melanogaster* zu ihren Zielmuskeln dirigieren. Da Netrin in vielen Organismen stark konserviert ist und eine lenkende Funktion auf die Migration von Neuronen ausübt, wäre eine Überprüfung auf eine

## Diskussion

ähnliche synergistische Kooperation in einem anderen Organismus ebenfalls interessant.



## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Tabelle 4.1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop Axiom Imager M2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Laser-Scanning-Mikroskop (LSM710)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Leica M165 FC Stereomikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Stereomikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Nikon SMZ25 Stereomikroskop	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
GFL-Paraffin-Streckbad 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasserbad Isotemp	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Rocking Platform Shaker	Avantor, Pennsylvania, USA
Pipetten Modell Pipetman neo P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
DS-Qi2 monochrome Mikroskop-Kamera	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Ceran 500 Hotplate	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Gel-Dokumentation ChemiDoc MP	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Hamilton Pipette	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
pH-Meter pH300	Hanna Instruments, Rhode Island, USA
Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Austerlitz Insect Pins Minutiens (∅ 0,10mm)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzetten (Dumont, #4)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinwaage SI-602	Denver Instrument, New York, USA
Sylgard Unterlage	Roland Vetter Laborbedarf OHG, Ammerbuch
Urinbecher	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturflasche, T-25, 25ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Vannas Spring Scissors	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

#### 4.1.2 Chemikalien

Tabelle 4.2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1kb DNA Marker	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

## Material und Methoden

Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, 37.5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Agarose low EEO	AppliChem GmbH, Darmstadt
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
APS (Ammoniumperoxodisulfat) ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cy3 Tyramide	AAT Bioquest, Kalifornien, USA
DanKlorix (2,8g Natriumhypochlorit per 100g)	Colgate-Palmolive, Hamburg
Denhardts-Lösung (50x)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DIG RNA Labeling Mix	Roche Holding AG, Basel
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_8$ )	Grüssing GmbH, Filsum
1,4-Dithiothreitol (DTT) ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol technisch	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Lippstadt
FBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Formaldehyd 37%	Merck KGaA, Darmstadt
Formamide p.A.	AppliChem, GmbH, Darmstadt
Glycerol	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heptan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Heparin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Immun-Blot PVDF Membran, 0.2 $\mu\text{m}$	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	AppliChem, GmbH, Darmstadt
Lachssperma DNA	Invitrogen, Massachusetts, USA
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Milchpulver (Fette $\leq 1,0$ %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SSC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid Plätzchen	AppliChem GmbH, Darmstadt
NGS (Normal Goat Serum)	Biozol Diagnostica GmbH, Eching
Oligo d(T) 18 mRNA Primer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Pen Strep Glutamine (100X)	Gibco™ von Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Phalloidin (aus Amanita Phalloides)	Invitrogen, Massachusetts, USA

## Material und Methoden

Verdünnung: 1:400, gekoppelt mit: Texas Red	
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
RNase Inhibitor, Murine	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Schneider's <i>Drosophila</i> -Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
SDS ultra pure (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Massachusetts, USA
T3 Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
T7 Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TritonX-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Clarity™ Western ECL Substrat Luminol/Enhancer Lösung	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Clarity™ Western ECL Substrat Peroxid Lösung	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Whatman™ chromatography paper 3mm chr	GE Healthcare, Chicago USA

### 4.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4.3: Lösungen und Puffer

Lösungen	Komponente
1% Agarose-Gel	1% (w/v) Agarose in TAE Puffer, 3,5µl SYBR Safe pro 100mL
Apfelagar	3L VE Wasser 1L Apfelsaft (klar) 100g Zucker 70g Agar
Ampicillin-Stammlösung	50mg/ml Ampicillin in H <sub>2</sub> O, aliquotiert und bei -20°C gelagert
Chloramphenicol-Stammlösung	34mg/ml Chloramphenicol in Ethanol, Lagerung bei -20°C
Pen Strep Glutamine (100X)	10,000 U/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin und 29,2 mg/ml L-Glutamine
Complete Medium	447,5ml Schneider's <i>Drosophila</i> Medium

## Material und Methoden

	50ml FBS (erhitzt) 2,5ml Pen Strep Glutamine (100X) → Penicillin (50U/ml)-Streptomycin (50µg/ml) und 0,146 mg/ml L-Glutamine
2% Chlorbleiche	60% DanKlorix in Milliporwasser
6x DNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 15% (w/v) Ficoll in 1x TAE
Fliegenfutter	10L VE Wasser 50g Agar 168g Trockenhefe 450g Malzextrakt 95g Sojamehl 712g Maisgrieß 400g Zuckerrübensirup 45ml Propionsäure 15g Nipagin
70% Glycerol in PBS	70ml Glycerol (100%) in 1xPBS ad 100ml
10x PBS	1,37M NaCl 27mM KCl 100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PTx	PBS mit 0,1% Triton X-100
PTx + NGS	PTx mit 5% NGS
LB Medium	10g NaCl 10g Tryptone 5g Hefeextrakt ad 1L H <sub>2</sub> O pH 7,0
LB Agar	10g NaCl 10g Tryptone 5g Hefeextrakt 20g Agar ad 1L H <sub>2</sub> O pH 7,0 Zugabe des benötigten Antibiotikums
50x TAE Puffer	2M Tris-Base 0,05M EDTA, pH 8,2
<b>Western Blot</b>	
4% Sammelgel	11,1ml ddH <sub>2</sub> O 6,4ml 30% Acrylamide 6ml 1,5M Tris pH 8,8 240µl 10% SDS 240µl 10% APS 24µl TEMED
8% Trenngel	5,9ml ddH <sub>2</sub> O 1,2ml 30% Acrylamide 2,5ml 0,5M Tris pH 6,8 100µl 10% SDS

## Material und Methoden

	100µl 10% APS 20µl TEMED
2x Probenpuffer	62,5mM Tris-HCL, pH 6,8 10mM DTT 2% (w/V) SDS 10% (v/v) Glycerol 0,02% Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25mM Tris, pH 8,3 192mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
10x TBST	0,1M Tris-HCl, pH 7,4 1,5M NaCl 1% (v/v) Tween 20
API-Puffer	300mM Tris, pH 9,4
APII-Puffer	30mM Tris, pH 9,4
KP-Puffer	30mM Tris, pH 9,4, 40mM Aminocaprinsäure 0,1% (w/v) SDS
<b><i>In-situ-Hybridisierung</i></b>	
Probenpuffer	50% deionisiertes Formamid 50% TE, pH7,5 0,1% Tween 20
AP Puffer	100mM Tris, pH 9,5 100mM NaCl 50mM MgCl <sub>2</sub> 0,1% Tween 20
Hybridisierungspuffer	50% deionisiertes Formamid 4x SSC 1x Dehnhardts 250µg/ml Lachssperma DNA 50µg/ml Heparin 0,1% Tween
Waschpuffer	50% deionisiertes Formamid 2x SSC 0,1% Tween 20
Tyramide Arbeitslösung	1µl Tyramide Stocklösung (5mM) in 1ml PBT mit 100µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 4.1.4 Fliegenstämme

Tabelle 4.4: Fliegenstämme

Genotyp	Quelle
<b>Generelle Fliegenlinien</b>	
<i>w<sup>1118</sup></i>	AG Aberle, Stocksammlung
<i>+</i> ; <i>Gla,wg<sup>lacZ</sup></i> <i>;CyO,actin::GFP</i> ; <i>+</i>	AG Aberle, Stocksammlung
<i>W</i> ; <i>+</i> ; <i>Dr</i> <i>;TM3,twist&gt;GFP,Sb,Ser</i>	Bloomington #6663

## Material und Methoden

$W; \frac{Gla, wg^{lacZ}}{CyO, actin::GFP}; \frac{Sp}{TM3, twist > GFP}$	AG Aberle, Stocksammlung
$W; \frac{CD8-GFP-Sh, 1A}{CD8-GFP-Sh, 1A}; +$	Insertion II. Chr. (Zito et al., 1999)
$W; +; \frac{CD8-GFP-Sh, 7A}{CD8-GFP-Sh, 7A}$	Insertion III. Chr. (Zito et al., 1999)
<b>Treiberlinien und Effektorlinien</b>	
w;+;BH1-Gal4	Bloomington #40119 (Llambi et al., 2001)
w;+;BH1-Gal4, ShGFP	In dieser Arbeit
w;+;Mef2-Gal4	Geschenk von C.S. Goodman, beschrieben in (Ranganayakulu et al., 1996)
w;Mef2-Gal4;+	Geschenk von C.S. Goodman
w;+;serp-Gal4	Geschenk von Rolf Reuter, Tübingen
+;ppl-Gal4;+	Geschenk von M.J. Pankratz, LIMES, Bonn
w;+;repo-Gal4	Bloomington #7415, beschrieben in (Sepp et al., 2001)
w;OK371-Gal4;+	(Mahr und Aberle, 2006)
w;OK371-Gal4, ShGFP1A;+	(Mahr und Aberle, 2006)
elav-Gal4	Geschenk von C.S. Goodman, UC Berkeley, USA
w;+;P{y[+t7.7]w[+mC]=GMR93A04-GAL4}attP2	Bloomington #40636
w;+;P{y[+t7.7]w[+mC]=GMR93A04-GAL4}attP2, ShGFP	In dieser Arbeit
+;+; $\frac{Hb9-Gal4}{TM3, Sb, KrGFP}$	Bloomington #32555
+;ap226-Gal4 #9;+	Geschenk von Gerd Vorbrüggen, Göttingen
w;+;RRFa-Gal4	Geschenk von Matthias Landgraf, MRC Cambridge
w;UAS-TNT aktiv;+	(Sweeney et al., 1995)
w;UAS-TNT inaktiv;+	(Sweeney et al., 1995)
w;+;UAS-Beat <sup>5</sup>	(Fambrough and Goodman, 1996)
UAS-Beat 1-322-GFP	(Heymann, 2017)
$W; +; \frac{UAS-CD4-td-Tomato}{TM6, Tb}$	Geschenk von Peter Soba, ZMNH Universität Hamburg
+;+;UAS-NetB	(Mitchell et al., 1996)
$W; +; \frac{UAS-HA-Unc5}{TM3, twist > GFP}$	Labrador Lab, Dublin (Keleman and Dickson, 2001)
$W; +; \frac{UAS-Unc5, UAS-Beat}{TM3, twist > GFP}$	Labrador Lab, Dublin

Genotyp	Quelle
$\frac{NetA^{\Delta}}{FM7, act.}; +; +$	(Brankatschk et al., 2006)
$\frac{NetB^{\Delta}}{FM7, act.}; +; +$	(Brankatschk et al., 2006)
$\frac{NetA+B^{\Delta}}{FM7, act.}; +; +$	(Brankatschk et al., 2006)

## Material und Methoden

W; +; $\frac{side^{c137}, ShGFP, 7A}{TM3, twi.}$	(Aberle et al., 2002)
W; +; $\frac{side^{I1563}, ShGFP7A}{TM3, twi.}$	(Aberle et al., 2002)
+; $\frac{Df(2R)2426}{CyO, act.GFP}$ ; +	Bloomington #9064
+; $\frac{unc5^8}{CyO, act.}$ ; +	Labrador Lab, Dublin
+; $\frac{Df(2R)2426, beat^2}{CyO, act.}$ ; +	In dieser Arbeit
+; $\frac{unc5^8, beat^3}{CyO, act.}$ ; +	Labrador Lab, Dublin
W; $\frac{beat^2}{CyO, twist > GFP}$ ; +	AG Aberle, Stocksammlung
W; $\frac{beat^{C163}}{CyO, twist > GFP}$ ; +	(Siebert et al., 2009)
W; $\frac{beat^3, ShGFP1A, FasIII^{E25}}{CyO, twist > GFP}$ ; +	(Siebert et al., 2009)
W; $\frac{beat^3, FasIII^{E25}}{CyO, twist > GFP}$ ; +	(Fambrough and Goodman, 1996)
y, w; Mi{y[+mDint2]=MIC}unc-5 <sup>MI05371</sup> ; +	Bloomington #42316
FlyFos318261 (unc-5)	VDRC # 318261
w, PBac{544.SVS1}NetA <sup>CPTI002152</sup> ; +; +	Kyoto # 002152
w, PBac{602.P.SVS1}NetB <sup>CPTI000168</sup> ; +; +	Kyoto # 000168
$\frac{FasII GFP^{Mue397}}{FM7, act.}$ ; +; +	(Rasse et al., 2005)
W; $\frac{lexAop-UAS-morphotrap.ext.mCh}{CyO}, \frac{TM3, Sb}{TM6B, Tb}$	Bloomington #68170
W; $\frac{Kr}{CyO}, \frac{lexAop-UAS-morphotrap.ext.mCh}{TM6B, Tb}$	Bloomington #68171
y, w; SideGFP <sup>MI00149</sup>	(Nagarkar-Jaiswal et al., 2015)

### 4.1.5 *Leptopilina boulardi* Stämme

Tabelle 4.5: *Leptopilina boulardi* Stämme

Genotyp	Quelle
G486	Jean Luc Gatti, Côte d'Azur, Frankreich
G401	Nicht verwendet, Jean Luc Gatti, Côte d'Azur, Frankreich

### 4.1.6 Primer

Tabelle 4.6: Primer

Bezeichnung	Sequenz
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Unc-5 TOPO-Klonierung forward	CACCATGGCGGTGATTAATAAAG
Unc-5 Klonierung reverse	AATCCACAAAGGGCCTATGGTTT



## Material und Methoden

Charakterisierung MI05371 forward	GGAAGTGCCTGACTCAGGGCC
Charakterisierung MI05371 reverse	GGGCATATAATCCGCGTCCATTA
Charakterisierung FlyFos318261 forward	GCTGACGCTTAAGGAGATGGG
Charakterisierung FlyFos318261 reverse	CCATGAGCCTCACGCTGATTT

### 4.1.7 Plasmide

Tabelle 4.7: Plasmide

Vektor	Beschreibung	Resistenz	Quelle
pBS SK(-)_Unc-5	Unc-5 cDNA Klon	Ampicillin	DGRC #5049
pENTR/D -Topo	Leervektor	Kanamycin	Invitrogen, Massachusetts, USA
pUASTattB_rfA_mCherry	Gateway destination Vector	Chloramphenicol+ Ampicillin	R. Stephan, Münster
pENTR_Unc-5	Vollängen Unc-5	Kanamycin	In dieser Arbeit
pUASTattB_Unc-5_mCherry	Vollängen Unc-5 C-terminales mCherry-Tag	Ampicillin	In dieser Arbeit

### 4.1.8 Primärantikörper

Tabelle 4.8: Erstantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Quelle
Ankyrin-2XL	Kaninchen	1:1000	(Koch et al., 2008)
Dlg	Maus	1:400	DSHB
dsRed	Kaninchen	1:1000	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
Eve	Maus	1:40	DSHB
FasII	Kaninchen	1:50	DSHB
GFP	Kaninchen	1:1000	Acris Antibodys GmbH (Deutschland) (Klon TP401)
GFP	Maus	1:400	Roche (Klon 7.1 und 13.1)
MHC	Maus	1:100	DSHB (Klon FMM5C8)
Phospho-Mad	Kaninchen	1:100	Geschenk von Carl-Henrik Heldin
Repo	Maus	1:40	DSHB

## Material und Methoden

<b>Westernblot</b>			
GFP	Kaninchen	1:5000	Acris Antibodys GmbH, Herford (Klon TP401)
$\alpha$ -Tubulin	Maus	1:10000	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b><i>In-situ</i>-Hybridisierung</b>			
Digoxigenin-POD	Schaf	1:100-1:20	Roche Holding AG, Basel

### 4.1.9 Sekundärantikörper

Tabelle 4.9: Sekundärantikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Fluorophor</b>	<b>Quelle</b>
anti-Kaninchen	Ziege	1:500	Alexa488	Jackson Immuno Research (USA)
anti-Kaninchen	Ziege	1:500	Cy3	Jackson Immuno Research (USA)
anti-Maus	Ziege	1:500	Alexa488	Jackson Immuno Research (USA)
anti-Maus	Ziege	1:500	Cy3	Jackson Immuno Research (USA)
<b>Westernblot</b>				
anti-Kaninchen	Ziege	1:7500	HRP	Jackson Immuno Research (USA)
anti-Maus	Ziege	1:7500	HRP	Jackson Immuno Research (USA)

### 4.1.10 Kits

Tabelle 4.10: Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Effectene® Transfection Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden
Plasmid DNA Purification Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG, Düren
pENTR/D-TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Massachusetts, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Totally RNA Kit	Ambion

## 41.11 Software

Tabelle 4.11: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San Jose, California, USA
(Fiji is just) ImageJ	GNU General Public License
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
R	R Development Core Team
Image Lab Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
MacVector	MacVector Incorporated, Apex (USA)
Zen Blue	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

## 4.2 Methoden

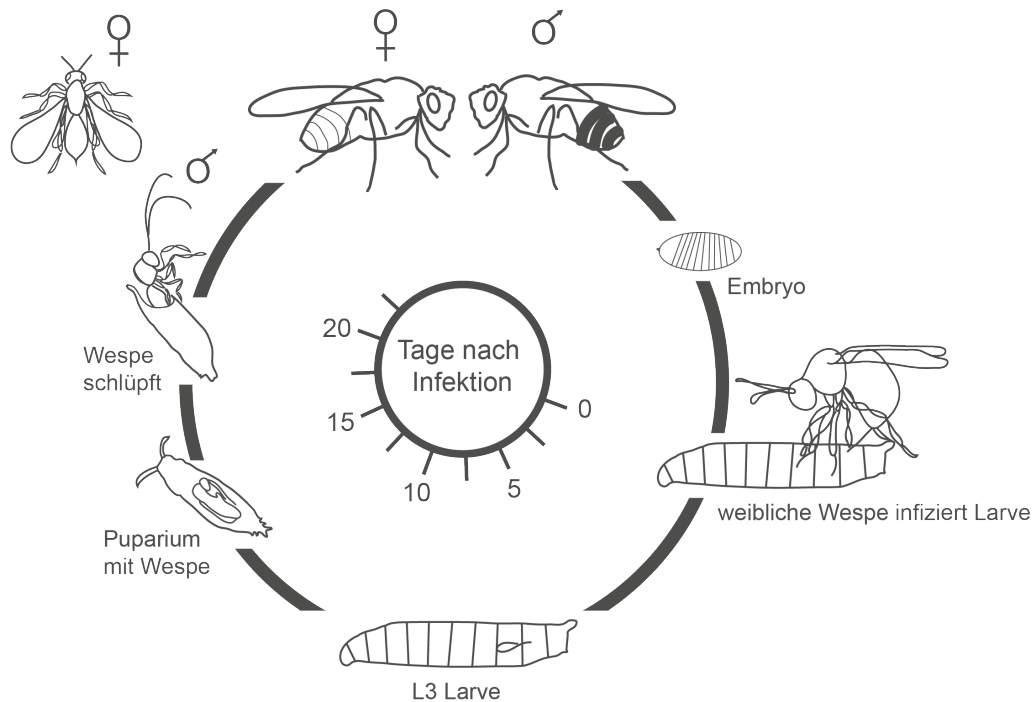
### 4.2.1 Tierhaltung

#### 4.2.1.1 Fliegenhaltung

Die Haltung der Fliegen erfolgte in Plastikröhrchen (Polystyrol 28,5x95mm), die daumenbreit (2-2,5cm) mit Fliegenfutter befüllt und mit einem Celluloseacetat Stopfen verschlossen wurden. Der Entwicklungszyklus von *Drosophila melanogaster* ist stark Temperatur abhängig und ermöglicht eine Einflussnahme auf die Entwicklungsdauer. Kreuzungen und Stocks, die zum Sammeln benötigt wurden, lagerten bei 25°C und wurden zwei- bis dreimal pro Woche auf neues Futter gesetzt. Fliegenstämme, welche nicht im regelmäßigen Gebrauch waren, wurden bei 18°C oder Raumtemperatur gehalten und ein Wechsel der Futterröhrchen ereignete sich alle drei bis vier Wochen. Für die Ablage der Embryonen waren perforierte Urinbecher im Gebrauch, dessen Deckel mit Apfelagar ausgegossen wurden und als Käfige dienten. Ein Klecks frische Hefe auf dem Agar stimulierte die Eiablage. Der Austausch der Agarplatten erfolgte spätestens nach 20 Stunden und ermöglichte die Fixierung aller embryonalen Entwicklungsstadien.

#### 4.2.1.2 Haltung und Vermehrung von *Leptopilina bouleardi*

Adulte Wespen wurden in *Drosophila*-Röhrchen mit Futterbrei bei Raumtemperatur gehalten. Ein Tropfen Blütenhonig befand sich auf dem Cellulose-Stopfen und ein regelmäßiger Austausch der Röhrchen fand statt. *Leptopilina bouleardi* Stämme infizieren jeden beliebigen *Drosophila melanogaster* Stock. Für die Vermehrung der Wespen wurde der wildtypische Stock  $w^{1118}$  verwendet. Zwei Tage legte die Fliegen bei 25°C Eier auf dem Futter ab. Die Infektion wurde mit 3-4 Tage alten Röhrchen durchgeführt, deren Futter von Larven aufgeraut war. Zugefügt wurden den Röhrchen ein Tropfen Honig (auf dem Stopfen), 8-10 befruchtete Wespen Weibchen und eine entsprechende Anzahl an Männchen. Die Haltung der Röhrchen erfolgte bei 25°C und nach 20-25 Tagen schlüpften die ersten Wespen.



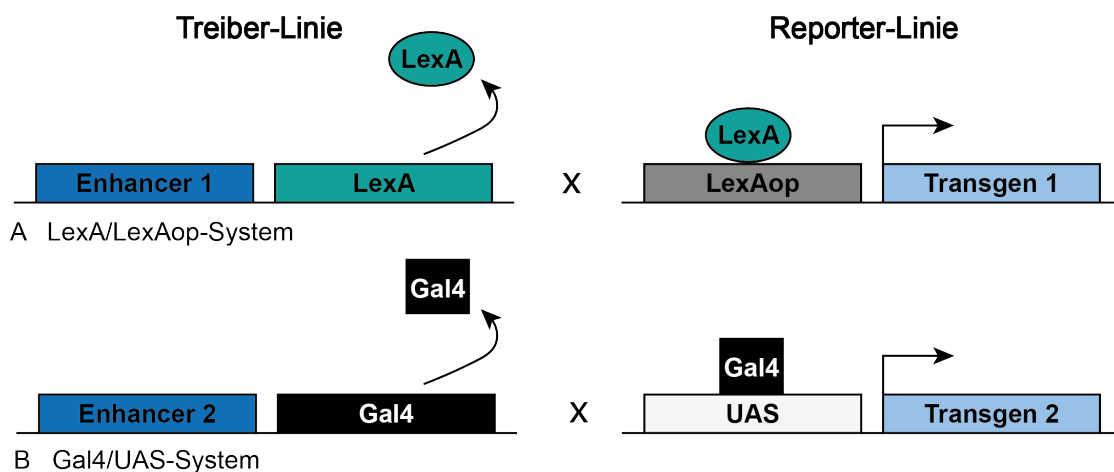
**Abbildung 4.1: Lebenszyklus von *Leptopilina bouleardi* und *Drosophila melanogaster*.**

Nach der Eiablage schlüpft eine Larve, welche von einer weiblichen Wespe infiziert wird. Ein spitzes Ovipositor ermöglicht die Injektion des Eis in die Larve. In der Larve entwickelt sich die Wespe, die sich von der lebendigen Larve ernährt und bereits durch das Puparium zu erkennen ist. Nach 20-25 Tagen schlüpft anstelle der Fliege eine Wespe (Abbildung verändert nach einer Vorlage von Jaqueline Kinold und (Abram et al., 2022; Driskell et al., 2016).

## 4.2.2 Fliegen-genetik

### 4.2.2.1 Gewebespezifische Genexpression

Eine zellspezifische Expression von beliebigen Genen kann mit unterschiedlichen Expressions-Systemen ermöglicht werden. Das aus der Hefe stammende Gal4/UAS-System und das auf bakterieller Information beruhende LexA-LexAop-System gehören zu den binären Expressionssystemen, deren Anwendung die Kombination einer Treiberlinie-Linie mit einer Reporter-Linie benötigt (Brand and Perrimon, 1993; Lai and Lee, 2006). In der Treiberlinie steht die Expression des Transkriptionsfaktors unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Enhancers. So initiiert das Binden des Gal4-Transkriptionsfaktors an die UAS-Sequenz, sowie die Interaktion des Transaktivatorproteins LexA mit dem LexA-DNA-Bindungsmotiv (LexAop), die Expression eines klonierten Gens in einem bestimmten Gewebe. Beide Systeme können in der Fliege kombiniert werden und unabhängig die Expression unterschiedlicher Konstrukte kontrollieren.



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung von Expressionssystemen.**

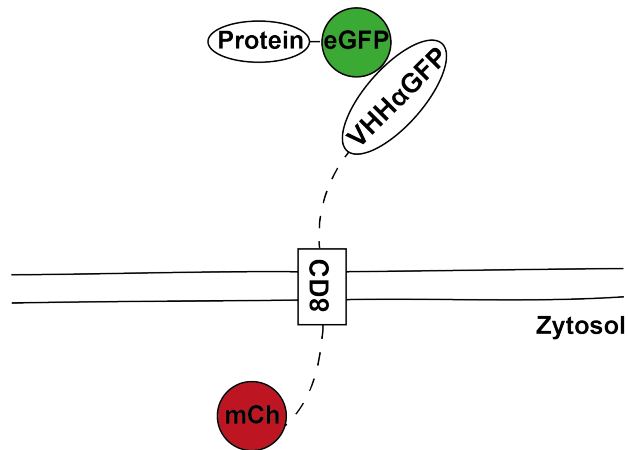
Binäre Expressionssysteme benötigen die Vereinigung einer Treiber- und Reporter-Linie in der Fliege. Die Expression eines Transkriptionsfaktors steht unter der Kontrolle eines Enhancer und ermöglicht eine gewebespezifische Expression. Durch das Binden der Transkriptionsfaktoren an die UAS oder dem LexA-DNA-Bindungsmotiv wird ein beliebiges Gen exprimiert. Der Transkriptionsstart wird mit dem Gal4/UAS-System über eine TATA-Box reguliert, eine Sequenz, die mit den fünf optimierten Gal4-Bindestellen kombiniert wurde (Brand and Perrimon, 1993).

### 4.2.2.2 Morphotrap

Sekretierte, GFP markierte, Proteine können mithilfe eines Morphotraps auf Zelloberflächen gebunden werden (Harmansa et al., 2015). Mittels dem LexA/LexAop- oder dem Gal4/UAS- System kann das Fusionsmolekül gewebespezifisch exprimiert

## Material und Methoden

und bedingt durch die, aus der Maus stammende, CD8 Domäne in der Zellmembran verankert werden. Extrazellulär ermöglicht ein Einzeldomänenantikörper, ein Nanobody aus Kameliden, das Binden von GFP markierten Proteinen (Saerens et al., 2005). Ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmolekül (mCherry) markiert Morphotrap-exprimierende Zellen oder Gewebe.



**Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Morphotraps.**

Ein Fusionsmolekül, bestehend aus einem extrazellulären Einzeldomänenantikörper (VHHαGFP), einer transmembranen Domäne (CD8) und einem zytoplasmatischen Fluoreszenzmolekül (mCherry), bindet sekretierte, eGFP markierte Proteine. Abbildung verändert nach (Harmansa et al., 2015).

### 4.2.3 Biochemische Methoden

#### 4.2.3.1 Fixierung von *Drosophila* Embryonen

Die Embryonen wurden mithilfe eines Pinsels und 1x PBS von der Apfelagar-Platte gesammelt und in ein Siebchen übertragen. Gründliches Spülen erfolgte mit einer Spritzflasche und entfernte rückständigen Hefereste. Dechorionisiert wurden die Embryonen im Siebchen mit einer 2%igen Chlorbleiche für 3-5 Minuten. Anschließend entfernte ein sorgsames Abspülen mit 1x PBS die restliche Chlorbleiche und die Embryonen wurden mit einem angefeuchteten Pinsel in ein 1,5ml Reaktionsgefäß übertragen. Die Fixierung erfolgte in 600 µl Heptan und 600µl 3.7% Formaldehyd in 1xPBS für 20 Minuten auf dem Taumler. Nachfolgend wurde die untere wässrige Phase mit einer Pipette entnommen und durch das gleiche Volumen an Methanol ersetzt. Kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes für eine Minute bewirkte das Aufplatzen der Vitellinmembran und das Absinken der Embryonen. Die gesamte wässrige Phase wurde entfernt und es erfolgten drei Waschriffe für fünf Minuten mit

Methanol, um das rückständige Heptan zu entfernen. Die Embryonen können an diesem Punkt für mehrere Wochen bei -20°C eingefroren werden.

### **4.2.3.2 Antikörperfärbung an Embryonen**

Für eine Färbung wurden ca. 40µl Embryonen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß übertagen und ein Austausch des Methanols gegen 500µl PTX folgte. Die Embryonen wurden dreimal für 10 Minuten unter sanftem Schütteln gewaschen und anschließend für 30 Minuten in 400µl PTX+NGS inkubiert. Die Hinzugabe des Erstantikörpers und dessen Inkubation über Nacht bei 4°C folgte. Vier weitere 10-minütige Waschschrte mit 500µl PTX entfernen den überschüssigen Erstantikörper. Anschließend wurde der Zweitantikörper in 400µl PTX+NGS hinzupipettiert und inkubiert für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der ungebundene Zweitantikörper wurde durch vier-maliges Waschen mit 500µl PTX für 10 Minuten entfernt. Ein einminütiger Waschschrte mit 500µl PBS folgte und entfernte die zurückgebliebene Detergens. Das PBS wurde entfernt und die Embryonen sanken für 2-4 Stunden in 400µl 70% Glycerol in PBS ab.

### **4.2.3.3 Präparation von L3 Larven und Antikörperfärbung an Filets**

Larven im dritten Entwicklungsstadium wurden aus den Futterröhrchen entnommen und in einem PBS befüllten, eisgekühlten, Uhrglasschälchen überführt. Auf einer Sylgardplatte erfolgte die Fixierung der Larven, in einem PBS Tropfen, durch Insektennadeln im Kopfbereich und am posterioren Ende. Ein vertikaler Schnitt durchtrennte die beiden Haupttracheen, ohne die Larve ventral zu zerteilen. Ausgehend von der vertikalen Öffnung wurde die Larve dorsal zwischen den Haupttracheen bis zu den Mundhaken geöffnet, freiliegende Organe wurden entfernt, wobei das Gehirn und die muskelinnervierenden Nerven in der Larve verblieben. Möglichst straff aufgespannt wurde die Kutikula mit vier weiteren Insektennadeln. Drei Waschschrte mit PBS entfernten zurückgebliebene Gewebereste. Die Fixierung des Präparates erfolgte durch zwei 30-sekündige Fixierschrte, gefolgt durch eine 15-minütige Inkubation in 3,7%igen Formaldehyd in PBS. Entfernt wurde die Fixierlösung durch dreimaliges Waschen mit PBS. Die fixierten Filets wurden in ein PTX befülltes Reaktionsgefäße übertragen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Viermalige Waschschrte für 15 Minuten mit PTX erfolgten. Anschließend inkubierten die



Hautmuskelschläuche für 60 Minuten in PTX + 5% NGS. Eine Zugabe der Primärantikörper erfolgte ebenfalls in PTX + 5% NGS, welches für eine Stunde oder über Nacht bei vier Grad inkubierte. Es folgten vier 15-minütige Waschschriffe mit PTX und die Inkubation des Sekundärantikörpers in PTX + 5% NGS für 1-2 Stunden, bei RT. Vier Waschschriffe mit PTX für 15 Minuten entfernten den Sekundärantikörper. Ein einminütiger Waschschriff mit PBS und die Zugabe von 70%igen Glycerol in PBS folgte. Nach dem Absinken der Larven Filets konnten Mundhaken und Filzkörper entfernt und die Präparate auf einen Objektträger mit 70%igen Glycerol übertragen werden. Durchsichtiger Nagellack versiegelte die Kanten des aufgelegten Deckglases.

### **4.2.3.4 Vorbereitung von Embryonen und Larven für die Mikroskopie**

Für die Mikroskopie wurden ca. 28,5µl der gefärbten Embryonen auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Mittels durchsichtigen Nagellacks erfolgte der Verschluss der Ränder und verhinderte somit das Austrocknen des Präparates. Die vorbereiteten Objektträger konnten bei 4°C bis zur Mikroskopie aufbewahrt werden.

Das Vorbereiten der Larven umfasste das vorherige Waschen der Larven in Wasser und das Töten der Larven im 60°C heißem Wasserbad. Der Hitzeschock im Wasserbad bewirkte die Streckung der Larven, welche anschließend auf einen Objektträger mit 30µl 70% Glycerol in PBS eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt wurden. Zeitnah erfolgte die Mikroskopie der Larven.

### **4.2.3.5 Analyse der larvalen Innervierungsdefekten**

Die Auszählung der NMJ`s wurde mithilfe des Programmes „Fiji“ durchgeführt und eine Aufteilung des Muskelfeldes in drei unterschiedliche Bereiche erfolgte. Der dorsale Bereich umfasste die Muskeln 1,2,9,10 und 18. Hingegen beinhaltete der laterale Bereich die Muskeln 3-5,8,11,19-24 und der ventrale Bereich umfasste die Muskeln 6,7,12-17,25-30. Muskel 25 konnte, bedingt durch seine Position, nur mit Schwierigkeit identifiziert werden und wurde infolgedessen von der Auswertung ausgeschlossen.

### **4.2.3.3 Western Blot**

#### **4.2.3.3.1 Vorbereitung der Proben**

Für die Gewinnung der larvalen Hämolymphe wurden L3 Larven auf Eis gekühlt und auf eine Präparierunterlage übertragen. Ein Schnitt mit einer feinen Schere, zwischen den dorsalen Haupttracheen, öffnete die Kutikula und ermöglichte den Austritt der Hämolymphe. Mit einer Pipette erfolgte die Aufnahme der Flüssigkeit und die Übertragung in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit Probenpuffer. Verwendet wurde die gewonnene Hämolymphe von 12 Larven und ein Puffervolumen von 15µl. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und mit 15000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und konnte bei -20°C gelagert oder direkt auf das Gel aufgetragen werden.

#### **4.2.3.3.2 SDS-Page**

Die Taschen der vorbereiteten Gele wurde mit einer Hamilton Pipette und SDS haltigen Laufpuffer gespült und mit 13µl der Proben befüllt. Zuvor eingefrorene Reaktionsgefäße wurden ein weiteres Mal bei 95°C gekocht und für wenige Sekunden zentrifugiert. Leere Taschen wurden mit Probenpuffer befüllt und 10µl des Markers wurde aufgetragen. Die Proben liefen bei einer Spannung von 80V für 20 Minuten in das Sammelgel und für weitere 60 Minuten bei 120V in das Trenngel.

#### **4.2.3.3.3 Semi-Dry Blot**

Für die Übertragung der Proteine auf eine Membran erfolgte die Schichtung eines API-Puffer getränkten Filterpapiers auf die Anode, gefolgt von einem weiteren Filterpapier, getränkt in APII-Puffer. Eine, zuvor in Methanol, aktivierte und APII-Puffer getränkte PVDF-Membran folgte, auf welche das SDS-Gel aufgelegt wurde. Drei KP-Puffer befeuchtete Filterpapiere und die Kathode komplettierten den Semi-Dry Blot. Transferiert wurde für 30 Minuten bei 15V. Die Membran wurde anschließend mit TBST dreimalig für 10 Minuten gewaschen und für eine Stunde in TBST mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur blockiert. Über Nacht inkubierte der Primärantikörper bei 4°C. Dreimaliges Waschen mit TBST für jeweils 10 Minuten entfernte den ersten Antikörper. Der Sekundärantikörper wurde in TBST mit 5% Milchpulver hinzugegeben und inkubierte bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Drei Waschschritte für 10

Minuten mit TBST entfernten den überschüssigen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper.

#### 4.2.3.3.4 Entwicklung der Membran

Die Membran wurde zwischen zwei Overheadprojektor Folien platziert und die Entwicklungslösung, welche aus einer 1:1 Mischung Clarity™ Western ECL Substrate Peroxid Lösung und Clarity™ Western ECL Substrate Luminol/enhancer Lösung bestand, wurde hinzugegeben. Nach einer einminütigen Inkubation im Dunklen konnte die überschüssige Entwicklungslösung mit einem Tuch ausgestrichen und die Membran wurde für die Detektion in den BioRad ChemiDoc platziert werden.

#### 4.2.3.4 *In-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von einer beliebigen mRNA im *Drosophila* Embryo.

##### 4.2.3.4.1 Herstellung des PCR Templates zur mRNA Sonde

Mittels der PCR (s. 4.2.4.3) konnte die gewünschte DNA-Sequenz, welche unter der Kontrolle von T3- und T7-Promotoren stand, vervielfältigt werden. Eine Aufreinigung der PCR-Produkte folgte mit dem QIAquick PCR Aufreinigungs-Kit von Qiagen, sowie eine *In-vitro*-Transkription.

##### 4.2.3.4.2 *In-vitro*-Transkription

Die *In-vitro*-Transkription ermöglicht die Herstellung beliebiger RNA-Transkripte basierend auf DNA-Sequenzen. Für eine spätere Detektion der Sonde wurden Digoxigenin markierte Nukleotide verwendet, welche eine immunchemische Markierung zulassen.

Tabelle 4.12: *In-vitro*-Transkription

Bestandteile	Volumen
PCR Produkt	10µl
5x Puffer	4µl
DIG-Nukleotide	2µl

## Material und Methoden

RNase-Inhibitor	1µl
RNA-Polymerase	2µl
dH <sub>2</sub> O	1µl

Der Reaktionsansatz inkubierte bei 37°C für vier Stunden. Gefällt wurde die Sonde über Nacht bei -20°C, durch die Zugabe von 30µl dH<sub>2</sub>O, 20µl 7,5M Ammoniumacetat und 75µl 96% Ethanol. Eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000rpm folgte. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet konnte in 30µl Probenpuffer resuspendiert werden.

### 4.2.3.4.3 Hybridisierung

Für die Detektion der mRNA wurden zuvor fixierte Embryonen verwendet (s. 4.2.3.1) welche, nach einer Lagerung in Methanol bei -20°C, zu Beginn eine Rehydrierung durchliefen. Das Methanol wurde entfernt und gegen eine 3:1 Mischung aus Methanol und 3,7%igen Formaldehyd in PBS ersetzt. Eine zweiminütige Inkubation auf dem Schüttler bei RT folgte. Die Flüssigkeit wurde entfernt und gegen eine 1:3 Mischung aus Methanol und 3,7%igen Formaldehyd in PBS ersetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf dem Schüttler erfolgte eine erneute Fixierung mit 3,7%igen Formaldehyd in PBS für 10 Minuten. Anschließend wurden die Embryonen dreimalig für 10 Minuten auf dem Schüttler mit PBT gewaschen. Eine 30-minütige Vorhybridisierung der Proben in einem 52°C warmen Wasserbad, mit Umwälzung, in Hybridisierungspuffer folgte und reduzierte unspezifische Bindungen. 1-2µl der Sonde (ca. 0,25ng/µl) wurde hinzugegeben und anschließend inkubierten die Proben über Nacht in dem 52°C warmen Wasserbad. Am nächsten Tag wurden vier Waschschrte mit 500µl vorgewärmten Waschpuffer über den Tag verteilt durchgeführt. Die Proben wurden am dritten Tag zweimalig mit PBT gespült und für 30 Minuten mit PBT auf dem Schüttler gewaschen. Das PBT wurde verworfen und die mit einer alkalinen Phosphatase konjugierten anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente wurden in 500µl PBT mit 5% NGS hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße inkubierten bei RT für 1-2 Stunden und wurden anschließend mit 500µl PBT gespült. Drei Waschschrte mit PBT für 5 Minuten auf dem Schüttler folgten. 100µl Tyramide-Arbeitslösung wurden auf die zu färbenden Embryonen gegeben. Die Proben inkubierten für 10 Minuten bei RT auf dem Schüttler. Einmaliges Spülen mit PBT und zwei fünfminütige Waschschrte mit 500µl PBT

erfolgten. In 300µl 70%igen Glycerol in PBS sanken die Embryonen ab und konnten für die Mikroskopie vorbereitet werden.

### **4.2.4 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.4.1 RNA Isolation**

Die Isolation der embryonalen RNA wurde mit dem ToTALLY RNA Kit durchgeführt. Embryonen eines Genotyps wurden in einem Sieb gesammelt, mit PBS gespült und mit Chlorbleiche dechorionisiert. Mittels eines Pinsels erfolgte die Übertragung in ein Reaktionsgefäß mit 50µl Denaturierungspuffer, in welchem die Embryonen anschließend gemörsert wurden. Weitere 500µl Denaturierungspuffer wurden hinzugegeben und mit einer 25 gauge Nadel konnte die Flüssigkeit ca. 20-mal auf- und abgezogen werden. Nach der Bestimmung des Startvolumens folgte die Zugabe des gleichen Volumens an Phenol-Chloroform-IAA, einminütiges Vortexen und eine Inkubation von fünf Minuten auf Eis. Zentrifugiert wurden die Proben für fünf Minuten bei 4°C und 12.000xg. Anschließend konnte die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und 1/10 des Volumens an Natrium-Acetat-Lösung hinzugegeben werden. Eine Vermischung erfolgte durch 10 Sekunden Schütteln, dem eine Zugabe des gleichen Volumens an Phenol-Chloroform, einminütiges Vortexen und eine Inkubation von fünf Minuten auf Eis folgte. Die Proben wurde für fünf Minuten bei 4°C und 12.000xg zentrifugiert. Überführt wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol vermischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Eine 15-minütige Zentrifugation der Präzipitate erfolgte bei 4°C und 12.000xg. Verworfen wurde der Überstand, der durch 300µl 70%igen Ethanol ersetzt wurde. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 4°C und 3.000xg zentrifugiert, nachdem das Verwerfen des Ethanols und die Resuspension des Pellets in der Elutionslösung folgte.

#### **4.2.4.2 cDNA Synthese**

RNA kann mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und für weitere Verfahren eingesetzt werden. Die Ansätze (Tabelle 12) enthielten eine Konzentration von 10ng-5µg RNA pro 20µl. Für die Synthese wurde das Wasser, die RNA, dNTP`s und Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer für fünf Minuten bei 65°C im Heizblock inkubiert.

## Material und Methoden

Eine kurze Zentrifugation und die Zugabe des First-Strand Buffer, DTT, RNase Inhibitor und der Super Script III reverse Transkriptase folgten. Die Ansätze inkubierten für 50 Minuten bei 50°C und anschließend für 15 Minuten bei 72°C. Eine Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

**Tabelle 4.13: cDNA Synthese**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
Oligo(dT) <sub>18</sub> -Primer	0,8µl
10mM dNTP`s	1µl
RNA (10ng-5µg in 20µl)	0,5µl
dH <sub>2</sub> O	10,7µl
5x First-Strand Buffer	4µl
0,1M DTT	1µl
RNase Inhibitor, Murine (40 U/µl)	1µl
Super Script III RT (200 U/µl)	1µl

### 4.2.4.3 PCR

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion kann ein beliebiges DNA-Template vervielfältigt werden. Für die Ansätze wurde eine Konzentration von 10ng DNA pro 50µl gewählt. Die Bestandteile wurde auf Eis zusammenpipetiert und eine Lagerung der amplifizierten Produkte war bei -20°C möglich.

**Tabelle 4.14: PCR-Reaktionsansatz**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
Q5-Reaktionspuffer	10µl
10mM dNTP`s (10mM)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	32,5µl
Vorwärts Primer (10 µM)	2,5µl
Rückwärts Primer (10 µM)	2,5µl
DNA-Template (1 ng/µl)	1µl

## Material und Methoden

Q5-DNA Polymerase	0,5µl
-------------------	-------

Die PCR wurde unter folgenden Einstellungen des Thermocyclers durchgeführt:

**Tabelle 4.15: Thermocycler-Einstellungen**

Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholung
	98°C	30s	
Denaturierung	98°C	10s	35 Zyklen
Anlagerung der Primer	61°C	30s	
Amplifikation	72°C	(20-30s pro kb)	
finale Verlängerung	72°C	2min	
∞	15°C		

### 4.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Nukleinsäuren wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Durch die angelegte Spannung wandern die negativ geladenen DNA- und RNA-Stränge zum positiven Pol, durch das Agarose-Gel, wodurch die unterschiedlichen Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt wurden. Die aufgetragenen Proben wurde zuvor mit 6xLadepuffer versetzt und mit einem 1kb Größenmarker zusammen auf das Gel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit dem ChemiDoc™ von Bio-Rad.

### 4.2.4.5 PCR-Produkt Aufreinigung

Um amplifizierte PCR-Fragmente von Primern und Reaktions-Mix Überresten zu befreien wurde eine PCR-Produkt Aufreinigung, mit dem QIAquick PCR purification Kit von Qiagen, durchgeführt. Zu einem Teil Reaktionsansatz wurden 5 Teile PB Puffer zugefügt, vermischt und auf die Säule aufgetragen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei RT und 13000rpm wurde der Durchfluss verworfen und die Membran mit 750µl PE Waschpuffer gereinigt. Verworfen wurde der Durchfluss und eine weitere Zentrifugation der Probe entfernte Rückstände des PE Waschpuffers. Eluiert wurden die, an die Membran gebundenen, PCR Fragmente durch die Zugabe von 30µl Wasser. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT folgte eine einminütige



Zentrifugation bei RT und 13000rpm. Die Konzentration der Probe wurde mit dem Photometer festgestellt und eine Lagerung jener erfolgte bei -20°C.

### **4.2.4.6 Gelextraktion**

Entstehen bei einer PCR Nebenprodukte verschiedener Bandengröße kann das gewünschte Produkt, nach einer Gelelektrophorese, ausgeschnitten und isoliert aufgereinigt werden. Die Gelextraktion wurde mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen durchgeführt. Das Volumen/Gewicht des ausgeschnittenen Gelfragments wurde mittels einer Feinwaage bestimmt. Das Gelfragment wurde mit dem dreifachen Volumen an QG Puffer versetzt und inkubiert für 10 Minuten in einem 50°C warmen Heizblock, bis zur vollständigen Auflösung. Ein Gel-Volumen Isopropanol wurde zugefügt, vermischt, wonach die Probe auf ein Säulchen übertragen wurde. Durch eine einminütige Zentrifugation bei RT und 13000rpm erfolgte die Bindung der DNA an die Membran. 500µl QG Puffer wurden zugegeben und eine weitere einminütige Zentrifugation bei RT und 13000rpm folgte. 750µl PE Waschpuffer und eine erneute Zentrifugation säuberten das PCR-Produkt. Anschließend wurde die Membran trocken zentrifugiert und die DNA konnte durch eine Zugabe von 30µl 10mM Tris Puffer (pH 8,0-8,5), einer fünfminütigen Inkubation bei RT und einer finalen einminütigen Zentrifugation bei RT und 13000rpm eluiert werden. Die Konzentration wurde mithilfe des Photometers bestimmt.

### **4.2.4.7 TOPO-Klonierung**

Die TOPO-Klonierung ermöglicht eine gerichtete Insertion eines PCR-Produktes, mit stumpfem Ende, in einen Zielvektor. Richtungsgebend ist der Vorwärtsprimer, der die CACC-Sequenz enthält, welche, induziert durch die Topoisomerase I, mit dem GTGG Überhang des Vektors ligiert wird. Für die TOPO-Klonierung wurde das pENTR/D-TOPO Kit von Invitrogen benutzt. Die Bestandteile wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und inkubierten für 30 Minuten bei Raumtemperatur. PCR-Produkt und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 2:1 eingesetzt.

**Tabelle 4.16: TOPO-Klonierung**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen</b>
TOPO Vektor (15-20ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Salzlösung	1 $\mu$ l
PCR-Produkt (5-10ng)	1,3 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	2,7 $\mu$ l

Anschließend wurde eine Transformation in One Shot TOP 10 *E. coli* Zellen durchgeführt.

### **4.2.5 Mikrobiologische Methoden**

#### **4.2.5.1 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen**

Eine Transformation ermöglicht die Aufnahme und Vervielfältigung von genetischen Informationen in kompetenten Zellen. Übertragen werden vorwiegend Plasmide mit einem bakteriellen Replikationsursprung (ORI) und einem Resistenzgen, das eine spätere Selektion der Bakterienkolonien gewährt. Zu einem Reaktionsansatz wurden 50-75 $\mu$ l Bakterienzellen gegeben und anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Für die Transformation wurden One Shot Top 10 Zellen (Invitrogen) oder XL1 blue Zellen verwendet. Ein Hitzeschock von 30 Sekunden, in einem 42°C warmen Wasserbad, folgte, nach welchem das Reaktionsgefäß sofort zurück auf Eis gestellt wurde. 250 $\mu$ l SOC Medium wurde hinzugegeben und die Zellen inkubierten bei 37°C und 300rpm für eine Stunde im Schüttler. Anschließend wurden 50 $\mu$ l und 200 $\mu$ l der transformierten Zellen auf mit dem passenden Antibiotikum versehenen Agarplatten ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurden 5-10 individuelle Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in ein Falcon-Röhrchen mit 6ml LB-Medium, versetzt mit Antibiotika, übertragen. Die Flüssigkultur inkubierte einen Tag bei 37°C und wurde dann für die Minipräparation verwendet.

#### **4.2.5.2 Quick and Dirty Minipräparation**

Um Testverdaue der bakteriell vervielfältigten Plasmide durchführen zu können, erfolgte die Extraktion der Vektoren mit einer Quick and Dirty Minipräparation. Für die

## Material und Methoden

Pelletierung wurden 2ml Bakterien in Flüssigkultur in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei Raumtemperatur und 14.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl Puffer1, durch vortexen, resuspendiert. 200µl Puffer2 wurde hinzupipetiert und durch invertieren gemischt. Einer fünfminütigen Inkubation folgte die Zugabe von 150µl, auf Eis gekühlten, Puffer3. Invertieren vermischte die Flüssigkeiten. Es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis und eine zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000rpm. Der Überstand wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und leicht gevortext. Einer zehnminütigen Zentrifugation bei 4°C und 12.000rpm folgte das Verwerfen des Überstandes. Dem Pellet wurden 750µl 70%iges Ethanol zugegeben, welches sofortig verworfen und gegen 750µl absoluten Ethanol ersetzt wurde. Das Pellet wurde erneut gevortext und für zwei Minuten bei 4°C und 12.000rpm zentrifugiert. Folgend konnte der Überstand verworfen und verbleibende Reste mit der Pipette abgenommen werden. Es folgte eine Trocknung der Pellets bei Raumtemperatur für 20 Minuten und eine Resuspension in 25µl TE Puffer.

### 4.2.5.3 Minipräparation

Die Plasmid Aufreinigung mit einem höheren Reinheitsgrad wurde mit einem Aufreinigungskit von Macherey-Nagel durchgeführt. In einem 2ml Reaktionsgefäß erfolgte die Übertragung der bakteriellen Flüssigkultur, die im Anschluss mit einer einminütigen Zentrifugation bei RT und 11.000xg pelletiert wurde. Der Überstand wurde verworfen. Bei Bedarf wurden weitere 2ml Flüssigkultur übertragen und zentrifugiert. Vortexen resuspendierte das Pellet in 250µl Puffer A1. 250µl Puffer A2 wurde hinzugegeben und durch invertiert vermischt. Die Proben inkubierten für fünf Minuten bei RT. Zum Neutralisieren erfolgte die Zugabe von 300µl Puffer A3. Invertiert wurden die Proben, bis sich der blaue Farbumschlag verflüchtigte. Eine zehnminütige Zentrifugation bei RT und 11.000xg folgte. Die Übertragung des Überstandes in ein 2ml Reaktionsgefäß mit Säulchen und eine anschließende einminütige Zentrifugation bei RT und 11.000xg erfolgte. Bei Bedarf wurde der Zentrifugationsschritt ein weiteres Mal wiederholt, damit der gesamte Überstand aufgetragen werden konnte. Der Durchfluss wurde verworfen. 600µl Puffer A4 reinigte die Membran, welcher nach einer einminütigen Zentrifugation bei RT und 11.000xg wieder verworfen wurde. Die Membran wurde bei 11.000xg für zwei Minuten trocken zentrifugiert. Das Säulchen

## Material und Methoden

wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß platziert und 30-50µl Wasser eluierten nach einer einminütigen Inkubation bei RT die DNA. Die Proben wurden für eine Minute bei RT und 11.000xg zentrifugiert und konnten bei -20°C gelagert werden.

### 4.2.5.4 Restriktionsverdau

Ein analytischer Restriktionsverdau bestätigte eine erfolgreiche Klonierung der gewünschten Sequenz in den Vektor. Hierfür erfolgte ein Verdau der, mittels Quick and Dirty Minipräparation isolierten, DNA. Verwendet wurden hierfür Restriktionsenzyme von New England Biolabs. In einem 25µl Reaktionsvolumen wurde 1µl DNA verdaut. Der Reaktionsansatz inkubierte für 15 Minuten bei 37°C.

**Tabelle 4.17: Restriktionsverdau**

Bestandteile	Volumen
DNA	1µl
Reaktionspuffer	2,5µl
Enzym	0,5µl
Destilliertes Wasser	ad. 25 µl

Die verdaute DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem ChemiDoc™ von Bio-Rad ausgewertet. Die detektierten Banden ergaben einen Aufschluss über den Vektor und dessen Sequenz.

### 4.2.6 Zellkultur

Gehalten wurden die S2-Zellen in Kulturflaschen (25ml) mit Complete Medium bei 28°C. Nach drei bis vier Tagen konnten die Zellen, bei ausreichender Wachstumsdichte, gesplittet werden, um eine Konzentration von 2-4 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml zu erreichen. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:2-1:10 gesplittet und in frisches Complete Medium überführt.

#### 4.2.6.1 Transfektion von S2-Zellen

Die Zellen wurden gezählt und verdünnt, um eine Zelldichte von 8 x10<sup>5</sup> oder 1 x10<sup>6</sup> Zellen/ml zu erzielen. Es erfolgte eine Übertragung von 1,6ml der S2-Zellen in ein Well

einer 6-Well Platte. Der Caspr-Vektor und der Expressions-Vektor wurden zu 100ng/ $\mu$ l verdünnt. In einem autoklavierten Reaktionsgefäß wurden 90 $\mu$ l EC-Puffer, 5 $\mu$ l des Caspr- und des Expressions-Vektors und 8 $\mu$ l Enhancer pipettiert. Kurzes Vortexen vermischte die Bestandteile. Eine fünfminütige Inkubation bei RT folgte, nach welcher 10 $\mu$ l Effectene zugefügt wurden. Ein 10-sekündiges Vortexen vermengte den Reaktionsansatz. Der Transfektionsansatz wurde dann bei RT für 15 Minuten inkubiert. 600 $\mu$ l Schneider's *Drosophila*-Medium wurden hinzugegeben, zweimalig hoch und runter pipettiert und tröpfchenweise zu den Zellen auf der 6-Well Platte gegeben. Leichtes Schwenken ermöglichte eine gleichmäßige Vermischung des Transfektionskomplexes. Die Zellen inkubierten bei 28°C für zwei Tage.

### **4.2.6.2 Zell-Aggregations-Assay**

Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurde die Expression der Proteine kontrolliert. 2-3-maliges Auf- und Abpipettieren separierte die Zellen. 300 $\mu$ l zweier verschiedener Zellsuspensionen wurden, von der 6-Well Platte, in eine Imaging-Kammer überführt. Eine zwei-stündige Inkubation der Imaging-Kammern im Dunklen und auf einem Wippschüttler bei RT und 100rpm folgten, welches das Aufeinandertreffen der Zellen ermöglichte. Anschließend an die Inkubation erfolgte eine Analyse der Zellsuspensionen auf potentielle Zellaggregate unter dem LSM710.

### **4.2.7 Analyse der larvalen Lokomotion**

#### **4.2.7.1 Hitzeplatten-Assay**

Folgen der Innervierungsdefekte auf das Bewegungsverhalten der Larven wurden mittels eines Hitzeplatten-Assays untersucht (Chattopadhyay et al., 2012). Die Analyse erfolgte anhand einer Zählung der lateralen Rollen pro Minute, welche die Larven auf dem erwärmten Untergrund vollzogen, um der Wärmequelle zu entkommen. 80 $\mu$ l Wasser wurden auf eine 95°C heiße Hitzeplatte pipettiert und regelmäßige Überprüfungen der Wassertemperatur erfolgten mit einem Thermometer. Die Larven wurden in den erwärmten Tropfen überführt und eine Zählung der Rollen mithilfe einer Stoppuhr und unter einem Binokular folgte. Eine vollständige Umdrehung der Larve konnte anhand der Position der Tracheen erkannt werden. Auf der Hitzeplatte wurden 30 gemischtgeschlechtliche Larven pro Genotyp getestet.

### **4.2.7.2 Selbstafrichtungs-Assay**

Die Fähigkeit es Selbstafrichtens wurde mit Hilfe eines Assays überprüft (Picao-Osorio et al., 2016). Larven des gewünschten Genotyps wurden in einem Uhrglasschälchen, mit Wasser, von Futterresten befreit und in Fliegenröhrchen bis zur Durchführung des Assays aufbewahrt. Der Test wurde auf einer 35mm x 13mm Apfelagarfläche, in einer Petrischale, durchgeführt und begann nach wenigen Minuten der Akklimatisierung. Mithilfe einer Feder wurden die Larven auf die dorsale Körperseite gedreht und mittels eines Binokulars erfolgte die Beobachtung der Selbstafrichtung. Benötigte eine Larve länger als zwei Minuten für die Rückkehr in die Kriechposition, wurde der Versuch nicht gewertet. Die Fähigkeit der Selbstafrichtung wurde an 30 gemischtgeschlechtlichen Larven pro Genotyp getestet.

### **4.2.7.3 Kriech-Assay**

Larven eines gewünschten Genotyps wurden gereinigt und auf eine 35mm x 13mm große Apfelagarfläche übertragen. Die Geschwindigkeitsbestimmung kriechender Larven erfolgte anhand einer drei-minütigen Videoaufnahme, welche jeweils zwei vorwärts kriechende Larven eines Genotyps zeigte. Für die Aufnahmen wurde das Nikon SMZ25 Stereomikroskop (0,5x Objektiv) mit der Nikon DS-Qi2 monochromen Kamera verwendet. Gefilmt wurde mit einer Bildfrequenz von 0,5 Bilder pro Sekunde und eine Übertragung der Bilder erfolgte in das Programm „Fiji“. Ausgewertet wurden die Bilder anhand der Verwendung der Z-Projektion und des freien-Hand-Linien Werkzeuges. Für den Wildtyp wurde die Kriechgeschwindigkeit von 33 gemischtgeschlechtlichen Larven bestimmt, die mit der Geschwindigkeit von 28 *unc-5* und *beat* Mutanten verglichen wurde.

### **4.2.8 Beiträge durch studentische Abschlussarbeiten**

Während dieser Arbeit betreute ich unterschiedliche Bachelorarbeiten, die folgende Beiträge zu dieser Arbeit erbrachten.

Tabelle 4.18: Übersicht der Beiträge

Abbildung	In Zusammenarbeit durchgeführt mit	Referenz
2.9: <i>Unc-5</i> und <i>beat</i> mutante Larven kriechen mit reduzierter Geschwindigkeit.	Katharina Töpfer	Töpfer (2019)
2.10: <i>Unc-5</i> und <i>beat</i> doppelmutante Larven zeigen ein verändertes Kriechverhalten.	Katharina Töpfer	Töpfer (2019)
2.12: Drastische Reduktion der Schmerzrolle beim Verlust von <i>Unc-5</i> und <i>Beat</i> .	Katharina Töpfer	Töpfer (2019)
2.17: Teilrettung des doppelmutanten Phänotyps durch eine <i>Beat</i> Expression mit <i>Hb9-Gal4</i>	Hanna Kahle	Kahle (2021)
2.26: Starke Projektionsdefekte durch muskuläre Expression von <i>Unc-5</i> und <i>Beat</i> .	Hanna Kahle	Kahle (2021)
2.34: Expression von <i>Unc-5</i> in ventral projizierenden Neuronen führt zu embryonalen und larvalen Innervierungsdefekten	Sarah Abts	Abts (2020)
2.40: Verstärkung des embryonalen <i>side</i> -Phänotyps durch den Verlust von <i>NetA</i> oder <i>NetB</i> .	Sarah Abts	Abts (2020)
2.41: <i>NetA/NetB</i> und <i>side</i> Doppelmutanten zeigen keine Verstärkung des larvalen Phänotyps	Sarah Abts	Abts (2020)
2.42: Verstärkung des <i>side</i> -Phänotyps durch den simultanen Verlust von <i>NetAB</i> .	Sarah Abts	Abts (2020)
2.32: Netrine werden nicht in die larvale Hämolymphe sekretiert.	Celina Schillings	Schillings (2022)

## Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Haghghi, A.P., Fetter, R.D., McCabe, B.D., Magalhaes, T.R., and Goodman, C.S. (2002). Wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 33, 545–558.
- Abram, P.K., Wang, X., Hueppelsheuser, T., Franklin, M.T., Daane, K.M., Lee, J.C., Lue, C.-H., Girod, P., Carrillo, J., Wong, W.H.L., et al. (2022). A Coordinated Sampling and Identification Methodology for Larval Parasitoids of Spotted-Wing *Drosophila*. *J. Econ. Entomol.* 115, 922–942.
- Abrell, S., and Jäckle, H. (2001). Axon guidance of *Drosophila* SNb motoneurons depends on the cooperative action of muscular Krüppel and neuronal capricious activities. *Mech. Dev.* 109, 3–12.
- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110, 791–804.
- Bate, M., Rushton, E., and Currie, D.A. (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 113, 79–89.
- Bateman, J., Shu, H., and Van Vactor, D. (2000). The guanine nucleotide exchange factor trio mediates axonal development in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 26, 93–106.
- Baylies, M.K., and Bate, M. (1996). Twist: A myogenic switch in *Drosophila*. *Science*. 272, 1481–1484.
- Bazan, J.F., and Goodman, C.S. (1997). Modular structure of the *Drosophila* Beat protein. *Curr. Biol.* 7, 338–339.
- Bellows, C.G., Ciaccia, A., and Herrsche, J.N.M. (1998). Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone* 23, 119–125.
- Berrigan, D., and Pepin, D.J. (1995). How maggots move: Allometry and kinematics of crawling in larval Diptera. *J. Insect Physiol.* 41, 329–337.
- Beuchle, D., Schwarz, H., Langegger, M., Koch, I., and Aberle, H. (2007). *Drosophila* MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure. *Mech. Dev.* 124, 390–406.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Brankatschk, M., and Dickson, B.J. (2006). Netrins guide *Drosophila* commissural



axons at short range. *Nat. Neurosci.* 9, 188–194.

Bray, D., and Chapman, K. (1985). Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J. Neurosci.* 5, 3204–3213.

Broadus, J., Skeath, J.B., Spana, E., Bossing, T., Technau, G.M., and Doe, C.Q. (1995). New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* CNS. *Mech. Dev.* 54, 1–10.

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

Buck, K.B., and Zheng, J.Q. (2002). Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J. Neurosci.* 22, 9358–9367.

Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V. (1997a). Central Nervous System. In: *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. (New York: Springer 2), pp. 233–269.

Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V. (1997b). Musculature. In: *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. (New York: Springer 2), pp. 109–123.

Carton, Y., Boulétreau, M., van Alphen, J.J.M., and van Lenteren, J.C. (1986). The *Drosophila* Parasitic Wasps. *Genet. Biol. Drosophila* 347–394.

Certel, S.J., and Thor, S. (2004). Specification of *Drosophila* motoneuron identity by the combinatorial action of POU and LIM-HD factors. *Development* 131, 5429–5439.

Chattopadhyay, A., Gilstrap, A. V., and Galko, M.J. (2012). Local and Global Methods of Assessing Thermal Nociception in *Drosophila* Larvae. *J. Vis. Exp.* 1–10.

Chin, M.R., and Tracey, W.D. (2017). Nociceptive circuits: Can't escape detection. *Curr. Biol.* 27, 796–798.

Davis, G.W., Schuster, C.M., and Goodman, C.S. (1996). Genetic Dissection of Structural and Functional Components of Synaptic Plasticity. I. Fasciclin II Controls Synaptic Stabilization and Growth. *Neuron* 17, 641–654.

Dent, E.W., Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2011). The growth cone cytoskeleton in Axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–39.

Desai, C.J., Gindhart, J.G., Goldstein, L.S.B., and Zinn, K. (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the *Drosophila* embryo. *Cell* 84, 599–609.

Desai, C.J., Krueger, N.X., Saito, H., and Zinn, K. (1997). Competition and cooperation among receptor tyrosine phosphatases control motoneuron growth cone guidance in

## Anhang

*Drosophila*. *Development* 124, 1941–1952.

Doe, C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116, 855–863.

Dominici, C., Moreno-Bravo, J.A., Puiggros, S.R., Rappeneau, Q., Rama, N., Vieugue, P., Bernet, A., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2017). Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* 545, 350–354.

Driskell, A.C., Macdonald, K.S., Lue, C., Leips, J., and Buffington, M.L. (2016). Using next generation and modified PCR approaches to DNA barcode *Drosophila* species and their parasitoid wasps in the eastern U.S.A. Poster 784.

Dun, X.P., and Parkinson, D.B. (2017). Role of Netrin-1 signaling in nerve regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–22.

Elkins, T., Zinn, K., McAllister, L., Hoffmann, F.M., and Goodman, C.S. (1990). Genetic analysis of a *Drosophila* neural cell adhesion molecule: Interaction of fasciclin I and abelson tyrosine kinase mutations. *Cell* 60, 565–575.

Fambrough, D., and Goodman, C.S. (1996). The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell* 87, 1049–1058.

Garces, A., and Thor, S. (2006). Specification of *Drosophila* aCC motoneuron identity by a genetic cascade involving even-skipped, grain and zfh1. *Development* 133, 1445–1455.

Goodman, C.S., Bastiani, M.J., Doe, C.Q., du Lac, S., Helfand, S.L., Kuwada, J.Y., and Thomas, J.B. (1984). Cell recognition during neuronal development. *Science*. 225, 1271–1279.

Gorczyca, M., Augart, C., and Budnik, V. (1993). Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 13, 3692–3704.

Gould, A.P., and White, R.A.H. (1992). Connectin, a target of homeotic gene control in *Drosophila*. *Development* 116, 1163–1174.

Grenningloh, G., Jay Rehm, E., and Goodman, C.S. (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: Fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* 67, 45–57.

Grueber, W.B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* 129, 2867–2878.

Grueber, W.B., Ye, B., Yang, C.H., Younger, S., Borden, K., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.

## Anhang

- (2007). Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: Links with peripheral dendrite morphology. *Development* 134, 55–64.
- Haas, J.N. (1950). Cytoplasmic growth in the muscle fibers of larvae of *Drosophila melanogaster*. *Growth* 14, 277–294.
- Hall, S.G., and Bieber, A.J. (1997). Mutations in the *Drosophila* neuroglian cell adhesion molecule affect motor neuron pathfinding and peripheral nervous system patterning. *J. Neurobiol.* 32, 325–340.
- Halpern, M.E., Chiba, A., Johansen, J., and Keshishian, H. (1991). Growth cone behavior underlying the development of stereotypic synaptic connections in *Drosophila* embryos. *J. Neurosci.* 11, 3227–3238.
- Harmansa, S., Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Caussinus, E. (2015). Dpp spreading is required for medial but not for lateral wing disc growth. *Nature* 527, 317–322.
- Harris, R., Sabatelli, L.M., and Seeger, M.A. (1996). Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: Identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* 17, 217–228.
- Hartenstein, V. (1988). Development of *Drosophila* larval sensory organs: Spatiotemporal pattern of sensory neurones, peripheral axonal pathways and sensilla differentiation. *Development* 102, 869–886.
- Hartenstein, V., and Campos-Ortega, J.A. (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 308–325.
- Hatzihristidis, T., Desai, N., Hutchins, A.P., Meng, T.C., Tremblay, M.L., and Miranda-Saavedra, D. (2015). A *Drosophila*-centric view of protein tyrosine phosphatases. *FEBS Lett.* 589, 951–966.
- Heckscher, E.S., Lockery, S.R., and Doe, C.Q. (2012). Characterization of *Drosophila* larval crawling at the level of organism, segment, and somatic body wall musculature. *J. Neurosci.* 32, 12460–12471.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4, 61–85.
- Hessinger, C., Technau, G.M., and Rogulja-Ortmann, A. (2017). The *Drosophila* Hox gene *Ultrabithorax* acts in both muscles and motoneurons to orchestrate formation of specific neuromuscular connections. *Development.* 144, 139–150.
- Heymann, C.D.S. (2017). Structure-function analysis of the axon guidance molecules *Sidestep* and *Beaten path 1a* in *Drosophila melanogaster*. PhD thesis Heinrich-Heine-

## Anhang

Universität.

Von Hilchen, C.M., Hein, I., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2010). Netrins guide migration of distinct glial cells in the *Drosophila* embryo. *Development* 137, 1251–1262.

Hoang, B., and Chiba, A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev. Biol.* 229, 55–70.

Hortsch, M., Homer, D., Malhotra, J.D., Chang, S., Frankel, J., Jefford, G., and Dubreuil, R.R. (1998). Structural requirements for outside-in and inside-out signaling by *Drosophila* neuroglian, a member of the L1 family of cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 142, 251–261.

Hwang, R.Y., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., and Tracey, W.D. (2008). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *17*, 2105–2116.

Jacobs, J.R., and Goodman, C.S. (1989). Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. II. Behavior of pioneer growth cones. *J. Neurosci.* 9, 2412–2422.

Jeon, M., Nguyen, H., Bahri, S., and Zinn, K. (2008). Redundancy and compensation in axon guidance: Genetic analysis of the *Drosophila* Ptp10D/Ptp4E receptor tyrosine phosphatase subfamily. *Neural Dev.* 3:3.

Jeong, S. (2021). Molecular mechanisms underlying motor axon guidance in *drosophila*. *Mol. Cells* 44, 549–556.

Johansen, J., Halpern, M.E., and Keshishian, H. (1989a). Axonal guidance and the development of muscle fiber-specific innervation in *Drosophila* embryos. *J. Neurosci.* 9, 4318–4332.

Johansen, J., Halpern, M.E., Johansen, K.M., and Keshishian, H. (1989b). Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *J. Neurosci.* 9, 710–725.

De Jong, S., Cavallo, J.A., Rios, C.D., Dworak, H.A., and Sink, H. (2005). Target recognition and synaptogenesis by motor axons: Responses to the sidestep protein. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 397–410.

Keleman, K., and Dickson, B.J. (2001). Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 Netrin receptor. *Neuron* 32, 605–617.

Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425–435.

## Anhang

- Kennedy, T.E., Wang, H., Marshall, W., and Tessier-Lavigne, M. (2006). Axon guidance by diffusible chemoattractants: A gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *J. Neurosci.* *26*, 8866–8874.
- Keshishian, H., Broadie, K., Chiba, A., and Bate, M. (1996). The *Drosophila* neuromuscular junction: A model system for studying synaptic development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* *19*, 545–575.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* *92*, 205–215.
- Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* *96*, 785–794.
- Kinold, J.C. (2016). Function and regulation of the axon guidance molecules sidestep and beaten path 1a in *Drosophila melanogaster*. PhD thesis Heinrich-Heine-Universität.
- Kinold, J.C., Pfarr, C., and Aberle, H. (2018). Sidestep-induced neuromuscular miswiring causes severe locomotion defects in *Drosophila* larvae. *Dev.* *145*.
- Kinold, J.C., Brenner, M., and Aberle, H. (2021). Misregulation of *Drosophila* Sidestep Leads to Uncontrolled Wiring of the Adult Neuromuscular System and Severe Locomotion Defects. *Front. Neural Circuits* *15*, 1–18.
- Koch, I., Schwarz, H., Beuchle, D., Goellner, B., Langeegger, M., and Aberle, H. (2008). *Drosophila* ankyrin 2 is required for synaptic stability. *Neuron* *58*, 210–222.
- Kolodkin, A.L., and Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: A primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, 1–14.
- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* *75*, 1389–1399.
- Kolodziej, P.A., Timpe, L.C., Mitchell, K.J., Fried, S.R., Goodman, C.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). frazzled Encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* *87*, 197–204.
- Krueger, N.X., Vactor, D. Van, Wan, H.I., Gelbart, W.M., Goodman, C.S., and Saito, H. (1996). Controls Motor Axon Guidance in *Drosophila*. *Cell* *84*, 611–622.
- Kullander, K., Butt, S.J.B., Lebret, J.M., Lundfald, L., Restrepo, C.E., Rydström, A., Klein, R., and Kiehn, O. (2003). Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits

that control walking. *Science*. 299, 1889–1892.

Labrador, J.P., O'Keefe, D., Yoshikawa, S., McKinnon, R.D., Thomas, J.B., and Bashaw, G.J. (2005). The homeobox transcription factor even-skipped regulates netrin-receptor expression to control dorsal motor-axon projections in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1413–1419.

Lai, S.L., and Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 9, 703–709.

Landgraf, M., Baylies, M., and Bate, M. (1999a). Muscle founder cells regulate defasciculation and targeting of motor axons in the *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* 9, 589–592.

Landgraf, M., Roy, S., Prokop, A., VijayRaghavan, K., and Bate, M. (1999b). even-skipped determines the dorsal growth of motor axons in *Drosophila*. *Neuron* 22, 43–52.

Larrivé, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I., and Eichmann, A. (2009). Guidance of vascular development: Lessons from the nervous system. *Circ. Res.* 104, 428–441.

Layden, M.J., Odden, J.P., Schmid, A., Garces, A., Thor, S., and Doe, C.Q. (2006). *Zfh1*, a somatic motor neuron transcription factor, regulates axon exit from the CNS. *Dev. Biol.* 291, 253–263.

Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73–84.

Li, H., Watson, A., Olechwie, A., Anaya, M., Sorooshyari, S.K., Harnett, D.P., Lee, H.K. (Peter), Vielmetter, J., Fares, M.A., Garcia, K.C., et al. (2017). Deconstruction of the beaten path-sidestep interaction network provides insights into neuromuscular system development. *Elife* 6, e28111.

Lin, C.H., and Forscher, P. (1993). Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J. Cell Biol.* 121, 1369–1383.

Lin, D.M., and Goodman, C.S. (1994). Ectopic and increased expression of fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13, 507–523.

Lin, C.H., Thompson, C.A., and Forscher, P. (1994). Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 640–647.

Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* 20, 2715–2722.

Lowery, L.A., and Vactor, D. Van (2009). The trip of the tip: Understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 332–343.

## Anhang

- Meadows, L.A., Gell, D., Broadie, K., Gould, A.P., and White, R.A. (1994). The cell adhesion molecule, connectin, and the development of the *Drosophila* neuromuscular system. *J. Cell Sci.* 107, 321–328.
- Mehlen, P., and Furne, C. (2005). Netrin-1: When a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2599–2616.
- Meyer, F., and Aberle, H. (2006). At the next stop sign turn right : The metalloprotease Tolloid-related 1 controls defasciculation of motor axons in *Drosophila*. 133, 4035–4044.
- Mitchell, K.J., Doyle, J.L., Serafini, T., Kennedy, T.E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Dickson, B.J. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17, 203–215.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–772.
- Monastirioti, M., Gorczyca, M., Rapus, J., Eckert, M., White, K., and Budnik, V. (1995). Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 356, 275–287.
- Moreno-Bravo, J.A., Roig Puiggros, S., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2019). Synergistic Activity of Floor-Plate- and Ventricular-Zone-Derived Netrin-1 in Spinal Cord Commissural Axon Guidance. *Neuron* 101, 625-634.
- Mushegian, A.R. (1997). The *Drosophila* Beat protein is related to adhesion proteins that contain immunoglobulin domains. *Curr. Biol.* 7, 336–338.
- Nagarkar-Jaiswal, S., Lee, P.T., Campbell, M.E., Chen, K., Anguiano-Zarate, S., Gutierrez, M.C., Busby, T., Lin, W.W., He, Y., Schulze, K.L., et al. (2015). A library of MiMICs allows tagging of genes and reversible, spatial and temporal knockdown of proteins in *Drosophila*. *Elife* 4, e05338.
- Nose, A., Mahajan, V.B., and Goodman, C.S. (1992). Connectin: A homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* 70, 553–567.
- Nose, A., Takeichi, M., and Goodman, C.S. (1994). Ectopic expression of connectin reveals a repulsive function during growth cone guidance and synapse formation. *Neuron* 13, 525–539.
- Odden, J.P., Holbrook, S., and Doe, C.Q. (2002). *Drosophila* HB9 is expressed in a subset of motoneurons and interneurons, where it regulates gene expression and axon pathfinding. *J. Neurosci.* 22, 9143–9149.

## Anhang

- Ohyama, T., Jovanic, T., Denisov, G., Dang, T.C., Hoffmann, D., Kerr, R.A., and Zlatic, M. (2013). High-Throughput Analysis of Stimulus-Evoked Behaviors in *Drosophila* Larva Reveals Multiple Modality-Specific Escape Strategies. *PLoS One* 8, e71706.
- Oyallon, J., Apitz, H., Miguel-Aliaga, I., Timofeev, K., Ferreira, L., and Salecker, I. (2012). Regulation of locomotion and motoneuron trajectory selection and targeting by the *Drosophila* homolog of Olig family transcription factors. *Dev. Biol.* 369, 261–276.
- Parker, L., Ellis, J.E., Nguyen, M.Q., and Arora, K. (2006). The divergent TGF-beta ligand Dawdle utilizes an activin pathway to influence axon guidance in *Drosophila*. *Development* 133, 4981–4991.
- Paul, C. (2016). Regulation von axonalen Wegfindungsmolekülen und deren Auswirkungen auf die Innervierung der somatischen Muskulatur in *Drosophila melanogaster*. Master thesis. Heinrich-Heine-Universität.
- Picao-Osorio, J., Johnston, J., Landgraf, M., Berni, J., and Claudio, R. (2016). microRNA-encoded behaviour in *Drosophila*. *+* 350, 815–820.
- Pipes, G.C., Lin, Q., Riley, S.E., and Goodman, C.S. (2001). The beat generation: A multigene family encoding IgSF proteins related to the beat axon guidance molecule in *Drosophila*. *Development* 128, 4545–4552.
- Ranganayakulu, G., Schulz, R.A., and Olson, E.N. (1996). Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 176, 143–148.
- Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R.J., Mertel, S., Sigrist, C.B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G., et al. (2005). Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 898–905.
- Robertson, J.L., Tsubouchi, A., and Tracey, W.D. (2013). Larval Defense against Attack from Parasitoid Wasps Requires Nociceptive Neurons. *PLoS One* 8, e78704.
- Rothberg, J.M., Hartley, D.A., Walther, Z., and Artavanis-Tsakonas, S. (1988). slit: An EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* 55, 1047–1059.
- Rothberg, J.M., Jacobs, J.R., Goodman, C.S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). slit: An extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev.* 4, 2169–2187.
- Saerens, D., Pellis, M., Loris, R., Pardon, E., Dumoulin, M., Matagne, A., Wyns, L., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2005). Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol.*



## Anhang

Biol. 352, 597–607.

Santiago, C., and Bashaw, G.J. (2017). Islet Coordinately Regulates Motor Axon Guidance and Dendrite Targeting through the Frazzled/DCC Receptor. *Cell Rep.* 18, 1646–1659.

Santiago, C., Labrador, J.P., and Bashaw, G.J. (2014). The homeodomain transcription factor Hb9 controls axon guidance in drosophila through the regulation of robo receptors. *Cell Rep.* 7, 153–165.

Sarov, M., Barz, C., Jambor, H., Hein, M.Y., Schmied, C., Suchold, D., Stender, B., Janosch, S., Vinay Vikas, K.J., Krishnan, R.T., et al. (2016). A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. *Elife* 5, e12068.

Schindelholz, B., Knirr, M., Warrior, R., and Zinn, K. (2001). Regulation of CNS and motor axon guidance in *Drosophila* by the receptor tyrosine phosphatase DPTP52F. *Development* 128, 4371–4382.

Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., and Dixon, J.E. (2000). *Drosophila* Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity modified by neuronal activity. *Cell* 101, 671–684.

Schnorrer, F., and Dickson, B.J. (2004). Muscle building mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev. Cell* 7, 9–20.

Sepp, K.J., Schulte, J., and Auld, V.J. (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev. Biol.* 238, 47–63.

Serafini, T., Kennedy, T.E., Gaiko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409–424.

Serpe, M., and O'Connor, M.B. (2006). The metalloprotease tolloid-related and its TGF-beta-like substrate Dawdle regulate *Drosophila* motoneuron axon guidance. *Development* 133, 4969–4979.

Shen, Y., Mani, S., Donovan, S.L., Schwob, J.E., and Meiri, K.F. (2002). Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance. *J. Neurosci.* 22, 239–247.

Siebert, M., Banovic, D., Goellner, B., and Aberle, H. (2009). *Drosophila* motor axons recognize and follow a sidestep-labeled substrate pathway to reach their target fields. *Genes Dev.* 23, 1052–1062.

Sink, H., and Whittington, P.M. (1991). Location and connectivity of abdominal motoneurons in the embryo and larva of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* 22, 298–311.

## Anhang

- Sink, H., Rehm, E.J., Richstone, L., Bulls, Y.M., Goodman, C.S., and Hughes, H. (2001). sidestep Encodes a Target-Derived Attractant Essential for Motor Axon Guidance in *Drosophila*. *Cell* 105, 57–67.
- Sun, Q., Schindelholz, B., Knirr, M., Schmid, A., and Zinn, K. (2001). Complex genetic interactions among four receptor tyrosine phosphatases regulate axon guidance in *Drosophila*. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 274–291.
- Suter, D.M., and Forscher, P. (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J. Neurobiol.* 44, 97–113.
- Sweeney, S.T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., and O’Kane, C.J. (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14, 341–351.
- Tanaka, E.M., and Kirschner, M.W. (1991). Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J. Cell Biol.* 115, 345–363.
- Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274, 1123–1133.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., and 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.
- Tracey, W.D., Wilson, R.I., Laurent, G., and Benzer, S. (2003). painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113, 261–273.
- Van Vactor, D., Sink, H., Fambrough, D., Tsou, R., and Goodman, C.S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* 73, 1137–1153.
- Varadarajan, S.G., Kong, J.H., Phan, K.D., Kao, T.J., Panaitof, S.C., Cardin, J., Eltzschig, H., Kania, A., Novitch, B.G., and Butler, S.J. (2017). Netrin1 Produced by Neural Progenitors, Not Floor Plate Cells, Is Required for Axon Guidance in the Spinal Cord. *Neuron* 94, 790–799.
- Wang, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J. Neurosci.* 19, 4938–4947.
- Wang, J., Zugates, C.T., Liang, I.H., Lee, C.H.J., and Lee, T. (2002). *Drosophila* Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron* 33, 559–571.
- Wassenberg, D.R., Kronert, W.A., Donnell, P.T.O., Bernsteint, S.I., Mol, J., and Biol, C. (1987). Analysis of the 5' end of the *Drosophila* muscle Myosin Heavy Chain Gene.

## Anhang

- Weitkunat, M., and Schnorrer, F. (2014). A guide to study *Drosophila* muscle biology. *Methods* 68, 2–14.
- Wills, Z., Bateman, J., Korey, C.A., Comer, A., and Van Vactor, D. (1999). The tyrosine kinase Abl and its substrate enabled collaborate with the receptor phosphatase Dlar to control motor axon guidance. *Neuron* 22, 301–312.
- Winberg, M.L., Mitchell, K.J., and Goodman, C.S. (1998). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: Complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* 93, 581–591.
- Wojtowicz, W.M., Wu, W., Andre, I., Qian, B., Baker, D., and Zipursky, S.L. (2007). A vast repertoire of Dscam binding Specificities Arises from Modular Interactions of Variable Ig Domains. *Cell* 130, 1134–1145.
- Woods, C.G. (2004). Crossing the midline. *Science*. 304, 1455–1456.
- Xia, X., Hu, Z., Wang, S., and Yin, K. (2022). Netrin-1: An emerging player in inflammatory diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 64, 46–56.
- Yazdani, U., and Terman, J.R. (2006). The semaphorins. *Genome Biol.* 7.
- Yoshino, J., Morikawa, R.K., Hasegawa, E., and Emoto, K. (2017). Neural circuitry that evokes escape behavior upon Activation of Nociceptive Sensory Neurons in *Drosophila* Larvae. *Curr. Biol.* 27, 2499–2504.
- Yu, H.H., Aranj, H.H., Ralls, S.A., and Kolodkin, A.L. (1998). The transmembrane Semaphorin Sema I is required in *Drosophila* for embryonic motor and CNS axon guidance. *Neuron* 20, 207–220.
- Zarin, A.A., and Labrador, J.P. (2019). Motor axon guidance in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 85, 36–47.
- Zarin, A.A., Daly, A.C., Hulsmeier, J., Asadzadeh, J., and Labrador, J.-P. (2012). A GATA/homeodomain transcriptional code regulates axon guidance through the Unc-5 receptor. *Development* 139, 1798–1805.
- Zarin, A.A., Asadzadeh, J., Hokamp, K., McCartney, D., Yang, L., Bashaw, G.J., and Labrador, J.-P. (2014). A Transcription Factor Network Coordinates Attraction, Repulsion, and Adhesion Combinatorially to Control Motor Axon Pathway Selection. *Neuron* 81, 1297–1311.
- Ziegler, A.B., Thiele, C., Tenedini, F., Richard, M., Leyendecker, P., Hoermann, A., Soba, P., and Tavosanis, G. (2017). Cell-Autonomous Control of Neuronal Dendrite Expansion via the Fatty Acid Synthesis Regulator SREBP. *Cell Rep.* 21, 3346–3353.
- Zinn, K. (2009). Choosing the road less traveled by: A ligand-receptor system that

## Anhang

controls target recognition by drosophila motor axons. *Genes Dev.* 23, 1042–1045.

Zito, K., Fetter, R.D., Goodman, C.S., and Isacoff, E.Y. (1997). Synaptic clustering of Fasciclin II and Shaker: Essential targeting sequences and role of dig. *Neuron* 19, 1007–1016.

Zito, K., Parnas, D., Fetter, R.D., Isacoff, E.Y., Goodman, C.S., and Hughes, H. (1999). Watching a Synapse Grow: Noninvasive Confocal Imaging of Synaptic Growth in *Drosophila*. 22, 719–729.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aCC	engl. anterior corner cell
ank2	Ankyrin2
ap	apterous
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Beat	Beaten path Ia
C4 da	IV Neurone
cDNA	engl. complementary DNA
Con	Connectin
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
Dfr	Drifter
DIG	Digoxigenin
Dlar	<i>Drosophila</i> Leukocyte-antigen-related-like
Dlg	Discs large
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsCAM	<i>Drosophila</i> Down Syndrome Zell Adhäsion Molekül
EDTA	engl. ethylenediaminetetraacetic acid
Ena	Enabled
Eve	Evenskipped
FBS	engl. Fetal bovine serum
FasII	Fasciclin II
Fra	Frazzled
FNIII	Fibronectin Typ 3- Domänen
fTRG	transgene fly-TransgeneOme
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Grn	Grain
HRP	engl. horse raddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
isl	Islet
ISN	intersegmentaler Nerv
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L3	drittes larvales Entwicklungsstadium
mCSIs	Interneurone
Mef2	engl. myocyte enhancer factor 2
MHC	engl. myosin heavy chain
mRNA	engl. messenger Ribonukleinsäure
NetA	Netrin A
NetB	Netrin B
NGS	engl. normal goat serum
Nrg	Neuroglian
n.s.	nicht signifikant
NMJ`s	neuromuskuläre Endplatten
Oli	Olig Family
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
repo	reversed polarity
RNA	Ribonukleinsäure
Robo	Roundabout

## Anhang

RPTP	Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase
SN	segmentaler Nerv
sna	snail
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
Sh	Shaker
Side	Sidestep
SSC	Natriumdodecylsulfat
TN	transversaler Nerv
TNT	Tetanustoxin
Tlr	Tollid-related
TSP	Thrombospondin
twi	twist
U	engl. Units
UAS	engl. upstream activating sequence
Ubx	Ultrabithorax
Unc-5	Uncoordinated-5
VE	vollentsalzt
VUM	engl. ventral unpaired neuron
Wt	Wildtyp
YFP	engl. yellow fluorescent protein
Zf1	Zinkfinger 1
ZNS	zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Embryonale neuromuskuläre Entwicklung.	2
Abbildung 1.2: Segmentale Gliederung einer Drosophila Larve.	3
Abbildung 1.3: Innervierungsmuster der abdominalen Muskulatur einer Drosophila Larve.	4
Abbildung 1.4: Der strukturelle Aufbau eines Wachstumskegels.	5
Abbildung 1.5: Transkriptionelle Regulation von Wegfindungsmolekülen in dorsalen und ventralen Motoneuronen.	8
Abbildung 1.6: Proteinstrukturen von Netrin, Unc-5 und DCC.	11
Abbildung 1.7: Proteinstruktur des Wegfindungsmoleküls Sidestep.	13
Abbildung 1.8: Proteinstruktur des Wegfindungsmoleküls Beaten Path Ia.	14
Abbildung 1.9: Schema der Interaktion von Sidestep und Beat.	15
Abbildung 1.10: Induktion des Fluchtverhaltens bei Drosophila melanogaster.	17
Abbildung 2.1: Verlust von Unc-5 und Beat führt im Embryo zu starken Wegfindungsdefekten des SNas.	21
Abbildung 2.2: Starke laterale und ventrale Projektionsfehler in unc-5 und beat Doppelmutanten.	22
Abbildung 2.3: Unc-5 und Beat Verlust führt zu Wegfindungsdefekten des SNas und SNcs.	23
Abbildung 2.4: Keine Verstärkung des unc-5 mutanten Gliazellen Migrationsphänotyps in unc-5 und beat Doppelmutanten.	25
Abbildung 2.5: Unc-5 und beat doppelmutante Larven zeigen starke Projektionsfehler des SNas.	26
Abbildung 2.6: Simultaner Verlust von unc-5 und side entspricht dem unc-5 und beat mutanten Phänotyp.	27
Abbildung 2.7: Starke laterale Innervierungsdefekte in unc-5 und side mutanten L1 Larven.	28
Abbildung 2.8: Unc-5, beat und side Dreifach-Mutanten zeigen keine Verstärkung des unc-5 und beat mutanten Phänotyps.	28
Abbildung 2.9: Unc-5 und beat mutante Larven kriechen mit reduzierter Geschwindigkeit.	29
Abbildung 2.10: Unc-5 und beat doppelmutante Larven zeigen ein verändertes Kriechverhalten.	30
Abbildung 2.11: Verhaltensreaktionen von Drosophila Larven auf Wespenattacken.	32
Abbildung 2.12: Drastische Reduktion der Schmerzrolle beim Verlust von Unc-5 und Beat.	33
Abbildung 2.13: Reduziertes Fluchtverhalten von unc-5 und beat mutanten Larven auf der Hitzeplatte.	34
Abbildung 2.14: Verlust von Unc-5 und Beat beeinträchtigt nicht die Fähigkeit der Selbstaufrichtung.	35
Abbildung 2.15: Unvollständige Rettung des unc-5 und beat mutanten Phänotyps.	36
Abbildung 2.16: Keine verstärkte Rettung des Phänotyps durch die simultane Expression von Unc-5 und Beat mit der beat Enhancer Fragment Linie 40636.	37
Abbildung 2.17: Teilrettung des doppelmutanten Phänotyps durch eine Beat Expression mit Hb9-Gal4.	38
Abbildung 2.18: Rettung des beat mutanten Phänotyps durch pan-neuronale Beat Expression.	39
Abbildung 2.19: Unc-5 wird vom gesamten segmentalen Nerv und den Gliazellen exprimiert, die den ISN umgeben.	40
Abbildung 2.20: Insertion der GFP-Moleküle in der Unc-5 Exon-Trap- und fTRG-Linien.	41
Abbildung 2.21: Unc-5 mRNA wird von Gliazellen in der Peripherie und Zellen des ZNS exprimiert.	41
Abbildung 2.22: Unc-5 interagiert nicht mit Beat.	42
Abbildung 2.23: Muskelspezifische Überexpression von Unc-5 und Beat führt zur Reduktion von NMJs in abdominalen Hemisegmenten.	44
Abbildung 2.24: Muskeldegeneration bedingt durch muskelspezifische Unc-5 Expression.	45
Abbildung 2.25: Reduktion der lateralen Muskelfasern verringert die Ausführung der Fluchtrolle.	46
Abbildung 2.26: Starke Projektionsdefekte durch muskuläre Expression von Unc-5 und Beat.	47
Abbildung 2.27: NetA Expression in epidermalen Feldern und dem ZNS.	48
Abbildung 2.28: Starke NetA Expression auf einigen dorsalen und dorsolateralen Muskeln.	49
Abbildung 2.29: NetB Expression im ZNS, der ventralen Muskulatur und Muskel 1 und 2.	49
Abbildung 2.30: FasII Morphotrapping.	50
Abbildung 2.31: Keine Sekretion der Netrine im Embryo.	51
Abbildung 2.32: Netrine werden nicht in die larvale Hämolymphe sekretiert.	52
Abbildung 2.33: NetB exprimierende Muskeln stoßen Unc-5 positive Motoaxone ab.	53
Abbildung 2.34: Expression von Unc-5 in ventral projizierenden Neuronen führt zu embryonalen und larvalen Innervierungsdefekten.	54
Abbildung 2.35: NetB Expression auf der gesamten Muskulatur erzeugt starke larvale Innervierungsdefekte der lateralen Muskulatur.	55
Abbildung 2.36: Verstärkung des dorsalen side-Phänotyps durch die Expression von Unc-5 in dorsal projizierenden Motoneurone.	56

## Anhang

Abbildung 2.37: Verstärkung dorsaler Innervierungsdefekte durch NetB Expression in dorsal projizierende Motoneurone, im side mutanten Hintergrund. _____	57
Abbildung 2.38: Muskelspezifische Expression von NetB im side mutanten Hintergrund verstärkt den side-Phänotyp gravierend. _____	58
Abbildung 2.39: Verstärkung des side mutanten Phänotyps durch den zusätzlichen Verlust der Netrine. _____	59
Abbildung 2.40: Verstärkung des embryonalen side-Phänotyps durch den Verlust von NetA oder NetB. _____	60
Abbildung 2.41: NetA/NetB und side Doppelmutanten zeigen keine Verstärkung des larvalen Phänotyps. _____	61
Abbildung 2.42: Verstärkung des side-Phänotyps durch den simultanen Verlust von NetAB. _____	62
Abbildung 4.1: Lebenszyklus von <i>Leptopilina boulardi</i> und <i>Drosophila melanogaster</i> . _____	89
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung von Expressionssysteme. _____	90
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Morphotraps. _____	91

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Laborgeräte _____	79
Tabelle 4.2: Chemikalien _____	79
Tabelle 4.3: Lösungen und Puffer _____	81
Tabelle 4.4: Fliegenstämme _____	83
Tabelle 4.5: <i>Leptopilina boulardi</i> Stämme _____	85
Tabelle 4.6: Primer _____	85
Tabelle 4.7: Plasmide _____	86
Tabelle 4.8: Erstantikörper _____	86
Tabelle 4.9: Sekundärantikörper _____	87
Tabelle 4.10: Kits _____	87
Tabelle 4.11: Verwendete Software _____	88
Tabelle 4.12: In-vitro-Transkription _____	95
Tabelle 4.13: cDNA Synthese _____	98
Tabelle 4.14: PCR-Reaktionsansatz _____	98
Tabelle 4.15: Thermocycler-Einstellungen _____	99
Tabelle 4.16: TOPO-Klonierung _____	101
Tabelle 4.17: Restriktionsverdau _____	103
Tabelle 4.18: Übersicht der Beiträge _____	106



## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass die Dissertation bisher noch nicht an einer anderen Fakultät eingereicht worden ist und es somit noch keinen bisherigen Promotionsversuch gegeben hat.

---

Düsseldorf, den 19.09.2022

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Hermann Aberle bedanken, für die Möglichkeit die Arbeit in seinem Institut zu verfassen. Vielen Dank für die Anregungen, oftmals ausgefallenen Ideen und für die vielen Gespräche. Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Eckhard Lammert für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation und sein Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an meine beiden Kolleginnen Jaqueline und Na, die mir immer mit Rat und Tat beiseite gestanden und mit ihrer positiven Einstellung eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Liebe Jaqueline, ich danke dir für deine immerwährende Hilfe und Unterstützung (schon seit der Masterarbeit!). Vielen Dank für die Taxidienste, das Versorgen mit selbstgekochten Mahlzeiten und die Übernachtungsmöglichkeit, wenn die Bahn mich nicht nach Hause bringen wollte/konnte.

Dear Na, I want to thank you for your helpfulness, your company and your emotional support. Whenever I had worries and problems, I could ask you for advice and your assistance. Ebenfalls möchte ich mich bei Marcel Brenner für seinen Erfindungsreichtum, seine Geduld und Hilfsbereitschaft bedanken. Ohne dich wäre ich oftmals verloren gewesen.

Auch möchte ich mich bei den ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, Caroline Heymann und Carsten Pfarr, für ihren emotionalen Beistand, das fortbestehende Interesse an meiner Arbeit und für die vielen schönen Treffen und Kanutouren herzlich bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei all meinen Studenten für die Hilfe bei der Umsetzung der Experimente und die Unterstützung.

Ein großes Dankeschön geht an Resi und Herbert Roofls für das Umsorgen und natürlich auch für das regelmäßige Reparieren meines Fahrrades. Besonders bedanken möchte ich mich bei dir, Andi, für dein Verständnis, deine bedingungslose Hilfe und deinen Rückhalt.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie für den Zuspruch, den emotionalen Beistand und die immerwährende Unterstützung bedanken.