

**Untersuchungen zu Spindelorientierung  
und Zellpolarität während der Neurogenese  
des Zebrafischs *Danio rerio***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Benedikt Geldmacher-Voß**

aus Paderborn

Köln 2004

Berichtersteller:

Prof. Dr. Siegfried Roth

Prof. Dr. Diethard Tautz

Tag der mündlichen Prüfung:

8.12.2004



José A. Campos-Ortega

22.8.1940 – 8.5.2004



1. Einleitung.....	4
1.1 Die Stadien der sekundären Neurulation beim Zebrafisch.....	4
1.2 Die mitotischen Teilungen neuroepithelialer Zellen sind polarisiert.....	7
1.3 Der Einfluss der Spindelorientierung auf das Zellschicksal.....	8
1.3.1 Spindelrotation in <i>Drosophila</i> Neuroblasten.....	8
1.3.2 Die Zelllinie der sensorischen Borsten in <i>Drosophila</i> .....	9
1.4 Einflussmechanismen auf die Spindleorientierung.....	11
1.4.1 Zellkontaktkomplexe: Komponenten und Lokalisation.....	11
1.4.2 Par3/ASIP-aPKC: ein konservierter Proteinkomplex.....	15
1.4.3 Die Entwicklung von Zellkontaktkomplexen.....	16
1.5 In vivo Beobachtung von Zellteilungsmustern.....	17
1.6 Der Zebrafisch als Modellsystem.....	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Zur Haltung und Zucht des Zebrafisches.....	21
2.2 Puffer, Materialien und Lösungen.....	21
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.3.1 Phagenbank, Bakterienstämme und Plasmide.....	27
2.3.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	27
2.3.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	28
2.3.4 Quantifizierung von DNA und RNA.....	28
2.3.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	29
2.3.6 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten.....	29
2.3.7 Dephosphorylierung von Vektorenden.....	30
2.3.8 Agarosegelelektrophorese.....	30
2.3.9 Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen.....	30
2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.3.11 Sequenzierung von DNA-Konstrukten.....	31
2.3.12 In vitro mRNA-Synthese.....	31
2.4 Histologische Methoden.....	32
2.4.1 Bestimmung der Entwicklungsstadien.....	32
2.4.2 Betäubung von Fischembryonen und -larven.....	32
2.4.3 Fixierung.....	32
2.4.4 Histologische Färbemethoden.....	33

2.5 Konfokale Mikroskopie .....	36
2.5.1 Aufnahmemethoden .....	37
2.5.2 Statistische Analyse der Mitosen in der Neuralplatte.....	38
2.6 Transmissionselektronenmikroskopie .....	38
2.6.1 Cacodylatpuffer .....	39
2.6.2 Simultanfixierung .....	39
2.6.3 hartes Durcupan zur Einbettung elektronenmikroskop. Präparate .....	40
2.6.4 mittelfestes Durcupan für lichtmikroskopische Schnitte .....	41
2.6.5 Herstellung formvarbeschichteter Trägernetzchen .....	41
2.6.6 Semidünn- und Ultradünnschnitte .....	41
2.6.7 Kontrastierung elektronenmikroskopischer Ultradünnschnitte.....	42
2.6.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen .....	42
2.7 Verwendete Zebrafischstämme .....	43
2.8 Abkürzungen, Symbole und Konventionen .....	43
3. Ergebnisse.....	46
3.1 Mitotische Orientierung während der Neurulation .....	46
3.1.1 Neuroepitheliale Zellen teilen sich bevorzugt apikal.....	47
3.1.2 Orientierung mitotischer Teilung in der Neuralplatte.....	50
3.1.3 Orientierung mitot. Teilungen während des Neuralkiels und Neuralstabs	52
3.1.4 Orientierung der Mitosen im Neuralrohr. ....	55
3.1.5 Der Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr .....	57
3.2 Migration postmitot. Zellen in subventrikuläre Neuralrohrbereiche .....	59
3.3 Polaritäts- und Zellkontaktmarker .....	60
3.3.1 aPKC - eine Komponente des Par3/ASIP-aPKC Komplexes .....	61
3.3.2 f-Actin und Phosphotyrosin; weitere Marker der apikalen Region .....	62
3.3.3 Die Lokalisierung von aPKC während der Mitosen.....	64
3.3.4 Spindelorientierung in der aPKC – Mutante <i>heart and soul</i> .....	65
3.3.5 ZO1 als Tight Junction Marker .....	67
3.3.6 $\beta$ -Catenin als Adherens Junction Marker.....	73
3.4 Die Ultrastruktur von Zellkontaktkomplexen.....	77
3.4.1 Zellkontakte in wildtypischen Embryonen.....	77
3.4.2 Zellkontakte in <i>heart and soul</i> homozygoten Embryonen .....	82
4. Diskussion .....	86
4.1 Zur Orientierung mitotischer Teilungen während der Neurulation.....	86

4.1.1 Während der Neurulation sind Teilungen gerichtet.....	86
4.1.2 Der Einfluss epithelialer Polarität auf die Teilungsorientierung.....	88
4.2 Die Teilungsorientierung und das Verhalten vom Tochterzellen .....	90
4.3 Zellkontaktkomplexe reifen im Verlauf der Neurulation .....	91
4.4 Spindelrotation im Neuralkiel / Neuralstab Stadium des Zebrafischs .....	93
4.5 Die funktionelle Bedeutung der Spindeldrehung in Neuralkiel / Stab .....	96
5. Literatur .....	98
6. Anhang .....	103
6.1 Beschreibung der in der Arbeit gezeigten Zeitrafferfilme .....	103
6.2 Zusammenfassung.....	106
6.3 Abstract.....	107
6.4 Danksagung .....	108
6.5 Erklärung.....	110
6.6 Lebenslauf .....	111

**Anmerkung zum Zusatzmaterial:**

Die in der Arbeit erwähnten Filme und alle verwendeten Abbildungen liegen auf der beigefügten CD in elektronischer Form vor.

## 1. Einleitung

Die klassischen Modellorganismen der Vertebratenentwicklung, der Krallenfrosch *Xenopus laevis*, die Maus *Mus musculus* und der Zebrafisch *Danio rerio* durchlaufen gleichermaßen Gastrulation und Neurulation. Diese Entwicklungsschritte verlaufen aber nicht einheitlich, sondern sind auf Grund der gegebenen morphologischen Unterschiede dem jeweiligen Organismus angepasst. Während die auf die Befruchtung folgenden Furchungsteilungen beim Zebrafisch beispielsweise auf Grund der großen Dottermenge meroblastisch sind und dadurch den Dotter nicht mit einschließen, teilt sich die Zygote des Krallenfroschs holoblastisch.

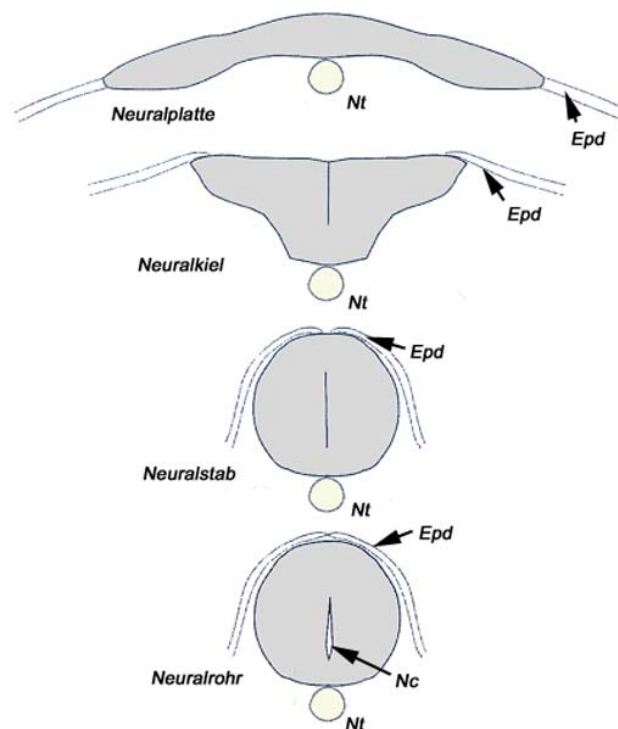
Die Furchungsteilungen lassen aus den anfänglich einzelligen Zygoten vielzellige Blastulastadien entstehen. Während der Gastrulation werden die anfangs noch auf der Blastulaoberfläche oder dem Blastoderm nebeneinander liegenden Keimblätter in ihre entgültige Position gebracht. Endoderm und Mesoderm wandern in das Innere des Embryos, an der Oberfläche verbleibt das Ektoderm. An die Gastrulation schließt sich in Vertebraten die Neurulation an, bei der das zentrale Nervensystem aus dem Neuroektoderm geformt wird. Im Laufe der Entwicklungsprozesse ändert sich die Form des Embryos von einer Kugel, hin zu einem Organismus mit definierten anteriorposterioren und dorsoventralen Körperachsen.

Um die Strukturen des voll differenzierten, zentralen Nervensystems richtig interpretieren zu können, ist ein genaues Verständnis der Neurulation notwendig. Die einzelnen Stadien des Entwicklungsvorgangs werden daher im nächsten Kapitel näher beschrieben werden.

### 1.1 Die Stadien der sekundären Neurulation beim Zebrafisch

Der Zebrafisch *Danio rerio* durchläuft, wie andere Vertreter der Unterordnung der Knochenfische (Teleostei) auch, den Prozess der sekundären Neurulation (Kimmel, 1989), (Schmitz et al., 1993), (Kimmel et al., 1990). Im Gegensatz zur primären Neurulation, die sich durch die Bildung von Neuralfurche und der sie umgebenden Neuralfalten auszeichnet, bildet sich das Neurocoel im Prozess der sekundären Neurulation in einem nachgeordneten Schritt. Die hier gegebenen Beschreibungen

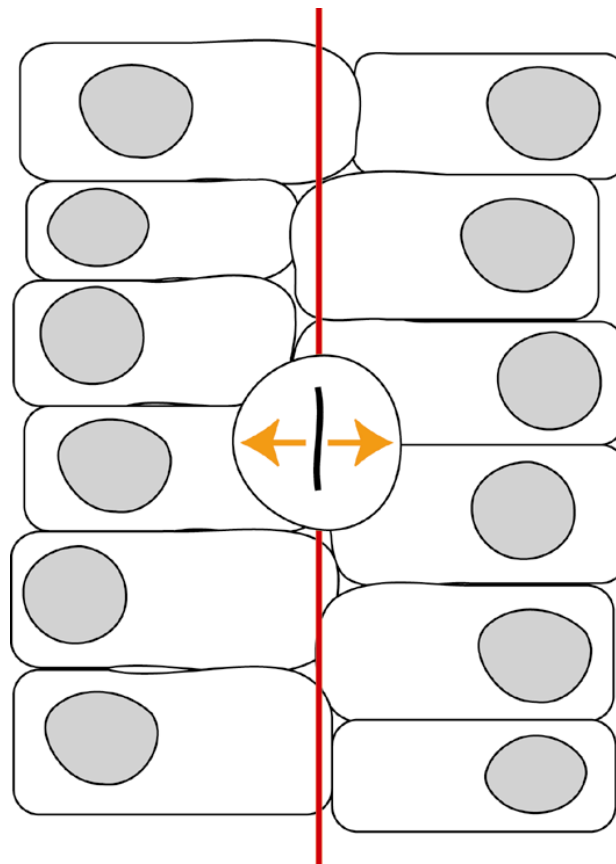
des Vorgangs beziehen sich auf einen Bereich zwischen dem ersten und fünften Somiten, dem späteren cervikalen Rückenmark (Schmitz et al., 1993). Im Fall des Zebrafischs lassen sich dabei vier Stadien unterscheiden. Die Neuralplatte erreicht bei einem Alter von circa 9-10 hpf ihre volle Ausdehnung. Durch zur Mittellinie hin gerichtete Konvergenzbewegungen faltet sie sich dann ein und formt dadurch den Neuralkiel. Dieser Vorgang vollzieht sich in der Zeit zwischen 12 und 14 hpf. Zwischen 14 und 16 hpf rundet sich der Neuralkiel zum Neuralstab ab, nach dem sich die früheren lateralen Außenbereiche der Neuralplatte dorsal geschlossen haben. Die Epidermis schließt sich über dem Neuralstab bei circa 16 hpf, nachfolgend lösen sich die beiden Schichten voneinander. Abbildung 1.1-1 gibt einen Überblick über den beschriebenen Vorgang.



**Abb. 1.1–1:** Die Abbildung stellt schematisch die vier Stadien der Neurulation dar. Auf die Darstellung von Zellen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. (Nt – Notochord, Epd – Epidermis, Nc – Neurocoel)

Durch die Bewegungen der Neurulation liegen die zwei Hälften des Primordiums während des Neuralkiel- / Neuralstab-Stadiums in engem Kontakt nebeneinander. Horizontalschnitte zeigen, dass die Mittellinie des Neuralstabs zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollkommen gerade ist, sondern sich unregelmäßig in Form einer Zick-Zacklinie darstellt (Abbildung 1.1-2). Durch den engen Kontakt der beiden Seiten der

neuralen Anlage werden Nachkommen mitotisch aktiver und an der Mittellinie sich teilender Zellen auf beide Hälften des Neuralkiel- / Neuralstabs verteilt (Concha and Adams, 1998; Kimmel et al., 1995; Kimmel and Warga, 1987; Kimmel et al., 1994; Papan and Campos-Ortega, 1994; Papan and Campos-Ortega, 1997; Papan and Campos-Ortega, 1999; Schmitz et al., 1993). Eine solche bilaterale Verteilung klonal verwandter Zellen wurde bisher nur im Zebrafisch beobachtet (Artinger et al., 1995; Hartenstein, 1989; Hartenstein, 1993; Leber and Model, 1991; Lumsden et al., 1994; Soula et al., 1993).



**Abb. 1.1-2:** Zellkontakte an der Mittellinie im Neuralkiel / Neuralstab Stadium. Die Mittellinie des Neuralstabs ist zu diesem Zeitpunkt nicht vollkommen gerade markiert, sondern verläuft eher in Form einer Zick-Zacklinie. Vor der Mitose runden sich die Zellen im Bereich der Mittellinie ab und teilen sich dann mediolateral. Die Nachkommen werden auf beide Seiten der Anlage aufgeteilt. (rote Linie – Markierung der angenommenen Mittellinie. Abbildung modifiziert nach (Kaltschmidt and Brand, 2002))

Es konnte gezeigt werden, dass Neuralplattenzellen sich zu Zellklonen sehr ähnlicher Zusammensetzung weiterentwickeln, die beide Seiten des Neuralrohrs besiedeln. Weitaus häufiger aber differenzieren sich Nachkommen definierter Klone in

unterschiedliche Zelltypen auf einer Seite des Neuralrohrs aus (Papan and Campos-Ortega, 1997; Papan and Campos-Ortega, 1999).

Am Ende des Neuralstabs, bei einem Alter von 17 bis 18 hpf oder circa 17 Somiten markiert die sekundäre Bildung des Neurocoels den Beginn des Neuralrohrstadiums. Durch den Rückzug ihrer apicalen Endfüße bilden die neuroepithelialen Zellen des Neuralstabs die neurocoeliale Höhlung. Dieser Vorgang beginnt im ventralen Bereich des Neuralstabs und ist mit der Bildung des 30. Somiten abgeschlossen. Während der gesamten Neurulation bleibt das Neuroepithel des Zebrafisches pseudostratifiziert. Es besteht aus columnalen Zellen, die die ganze Höhe des Epithels von der Basalmembran bis zur apikal Seite hin einnehmen. Die Zellen des Neuroepithels runden sich bei Eintritt in den Zellteilungszyklus ab und teilen sich dann apikal (Hinds and Ruffet, 1971). Diese Art der Teilung kann nicht nur im sich entwickelnden Rückenmark, sondern auch in anderen Epithelien, wie zum Beispiel der Retina (Das et al., 2003) beobachtet werden.

## **1.2 Die mitotischen Teilungen neuroepithelialer Zellen sind polarisiert**

Kimmel et al (Kimmel et al., 1994) konnten auf der Basis einer klonalen Analyse zeigen, dass sich die mitotische Orientierung sich teilender neuraler Vorläuferzellen von Teilung 15 nach Teilung 16 ändert. Die Zahl der Teilungen oder Zellzyklen wurde durch das befruchtete Ei definiert, das in Zyklus 1 eintritt. Die sich anschließenden Zyklen wurden durch Zeitrafferaufnahmen verfolgt.

Ist die Orientierung bei Teilung 15 noch vornehmlich anteriorposterior, so verschiebt sie sich ab Teilung 16 nach mediolateral. Diese mediolateralen Teilungen führen zu den beschriebenen bilateralen Klonen des Neuralrohrs. Verfolgt man fluorescein markierte Zellen der Neuralplatte, stellt sich heraus, dass diese Nachkommen auf beiden Seiten des Neuralstabs erzeugen (Papan and Campos-Ortega, 1994). In der Neuralplatte sind Mitosen planar zur Oberfläche des Primordiums und bevorzugt anteriorposterior orientiert. Concha und Adams (Concha and Adams, 1998) konnte diese Orientierung sich teilender neuroepithelialer Zellen der Neuralplatte durch die Verfolgung einzelner Zellen des Epiblasts während der Gastrulation und früherer Stadien der Neurulation nachweisen. Auch zeigten sie, dass sich die Orientierung der Mitosen ab der Einfaltung der Neuralplatte, zu Beginn des Neuralkielstadiums nach

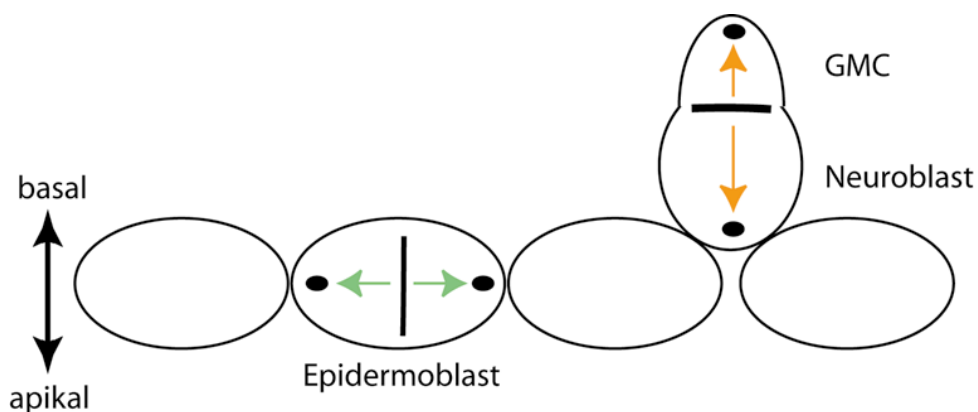
mediolateral ändert (Concha and Adams, 1998). Es lässt sich also, bei Vergleich von Neuralplatte, Neuralkiel und Neuralstab, eine Umorientierung der Mitosen von planar, bevorzugt anteriorposterior, nach mediolateral hin beschreiben.

### 1.3 Der Einfluss der Spindelorientierung auf das Zellschicksal

In *Drosophila melanogaster* wurden zwei Fälle von Spindeldrehungen beschrieben, bei denen Zellen mit unterschiedlichem späteren Schicksal bei den vorausgehenden Teilungen unterschiedliche mitotische Orientierungen besitzen. Dabei kommen Komponenten von Zellkontaktkomplexen, den sogenannten Adherens und Tight Junctions, sowie dem zwischen *Drosophila* und Vertebraten konservierten Par3/Bazooka/ASIP-Par6-aPKC Komplex besondere Bedeutung zu.

#### 1.3.1 Spindelrotation in *Drosophila* Neuroblasten

Beim ersten Beispiel handelt es sich um die Teilung epidermaler Vorläuferzellen im Vergleich zu delaminierenden Neuroblasten. Während sich die Vorläufer epidermaler Zellen planar zum Neuroektoderm teilen, rotieren die Spindeln in delaminierten Neuroblasten kurz vor der Mitose um 90° (Kaltschmidt et al., 2000; Knoblich, 2001).



**Abb. 1.3.1-1:** Spindelrotation in delaminierenden Neuroblasten von *D. melanogaster*. Während sich die Epidermoblasten planar zum Neuroektoderm teilen, rotiert die mitotische Spindel in delaminierenden Neuroblasten kurz vor der Mitose um 90°. Die Teilung erfolgt so senkrecht zum Epithel. (GMC – Gangliemutterzelle)

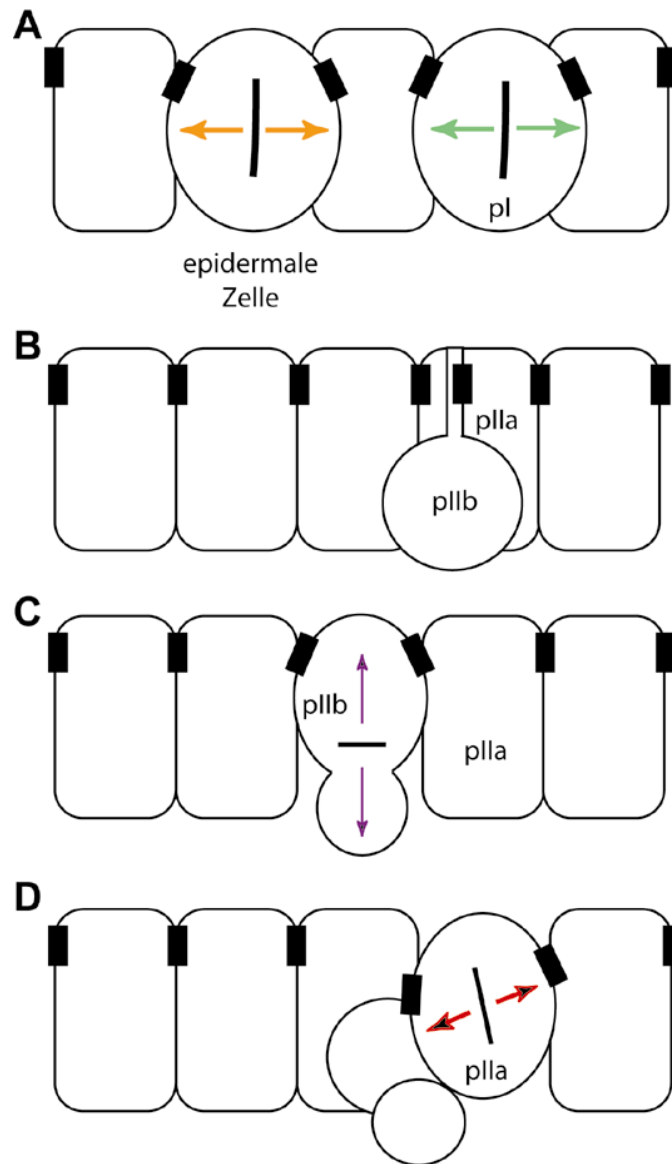


Durch diese Rotation findet die Zellteilung in diesen Neuroblasten orthogonal zum Epithel statt (Abbildung 1.3.1-1). Die Orientierung der Spindel wird durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert. Anfänglich werden die planaren Teilungen des Neuroektoderms durch die Anwesenheit der Adherens Junctions und des Proteinkomplexes des subapikalen Bereichs gesteuert (Lu et al., 2001). Nach der Delamination des Neuroblasten aus dem Neuroektoderm verschwinden die vorher apikal lokalisierten Adherens Junctions. Die Rotation der Spindel wird nun durch die apikale Lokalisation von Inscutable angetrieben (Kraut and Campos-Ortega, 1996; Kraut et al., 1996), zusammen mit Bazooka (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999), Partner of Inscutable (Pins) (Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000), *Drosophila* Par6 (Petronczki and Knoblich, 2001) und *Drosophila* aPKC (Lu et al., 2001; Wodarz et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Zellkontaktkomplexe auch in *crumbs* – Mutanten oder nach der Misexpression von Crumbs verschwinden (Lu et al., 2001), wodurch die Teilungsebene nur noch zufällig und nicht mehr orientiert ausgerichtet ist. Crumbs ist ein Protein, das in *Drosophila* in der subapikalen Region lokalisiert ist, und einen Teil des Crumbs-Stardust-Discs lost-Komplexes darstellt. Als Transmembranprotein bindet es das Protein Stardust und rekrutiert Discs lost in den Komplex. (Knust and Bossinger, 2002).

### 1.3.2 Die Zelllinie der sensorischen Borsten in *Drosophila*

Genauso wie bei der Orientierung der Spindel in den *Drosophila* Neuroblasten spielen Komponenten von Zellkontaktkomplexen auch bei der Teilung der pIIa und pIIb Zellen der Zelllinie der sensorischen Borsten in *Drosophila* eine Rolle (Le Borgne et al., 2002). Die pl Vorläuferzelle teilt sich asymmetrisch in der Ebene des Epithels. Aus dieser Teilung entstehen die pIIa Zelle, die innerhalb des Epithels verbleibt, und die pIIb Zelle, die teilweise delaminiert. Am Kontaktpunkt zwischen pIIa und pIIb konnte eine starke Anreicherung von Adherens Junctions Komponenten nachgewiesen werden (Abbildung 1.3.2-1). Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass *Drosophila* E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin an der Kontaktstellen akkumulieren (Le Borgne et al., 2002). Auf die genaue Zusammensetzung von Zellkontaktkomplexen und ihre Lokalisation in unterschiedlichen Organismen wird in einem der folgenden Kapitel eingegangen werden. Während in der pIIb Zelle eine lokale Anreicherung der beschriebenen Proteine gezeigt werden konnte, ist deren

Lokalisation in der pIIa Zelle vergleichbar zu der in der pI Zelle. Und genauso wie die pI teilt sich die pIIa Zelle planar.



**Abb. 1.3.2-1:** Spindelrotation in der Zelllinie der sensorischen Borsten von *D. melanogaster*. **A** Epidermale Zellen teilen sich genauso wie die pI Zelle planar zum Neuroektoderm. **B** Die pIIb Zelle delaminiert, bleibt jedoch über einen dünnen Stiel mit der pIIa Zelle verbunden. Innerhalb des Stiels akkumulieren Zellkontaktkomponenten, zusammen mit Inscutable, Pins und Bazooka. **C** Durch die Lokalisation der Zellkontaktkomponenten im Stiel (B) wird die Spindel in die orthogonale Ausrichtung dirigiert. **D** Ähnlich der pI Zelle, teilt sich die pIIa Zelle wieder planar zum Epithel. (modifiziert nach (Le Borgne et al., 2002))

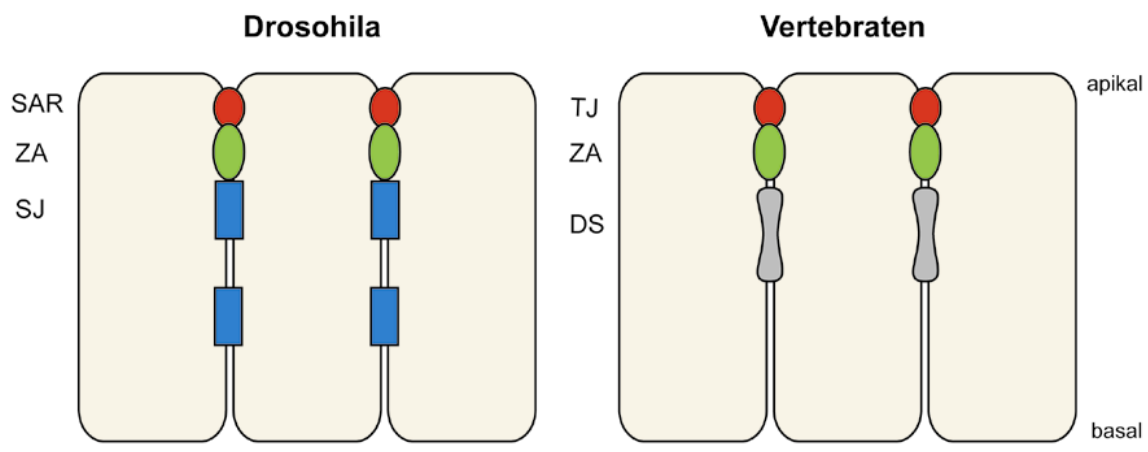
Dies lässt darauf schließen, dass der Zellkontaktkomplex für die Ausrichtung der Spindel verantwortlich ist (Le Borgne et al., 2002). Im Gegensatz zur pIIa Zelle teilt sich die pIIb Zelle orthogonal zum Epithel. Das Modell der Steuerung der

Spindelorientierung durch Adherens Junctions wird auch hier durch die eindeutige Lokalisation der Zellkontaktkomplexproteine unterstützt. Es zeigte sich, dass die Proteine im apikalen Fortsatz der p11b Zelle angereichert sind, durch den p11a und p11b verbunden bleiben. Innerhalb des Fortsatzes werden Inscutable und Pins durch Bazooka apikal in die Nähe der Zellkontaktkomplexe rekrutiert. Dadurch wird die orthogonale Orientierung der mitotischen Spindel gewährleistet (Le Borgne et al., 2002).

## 1.4 Einflussmechanismen auf die Spindlorientierung

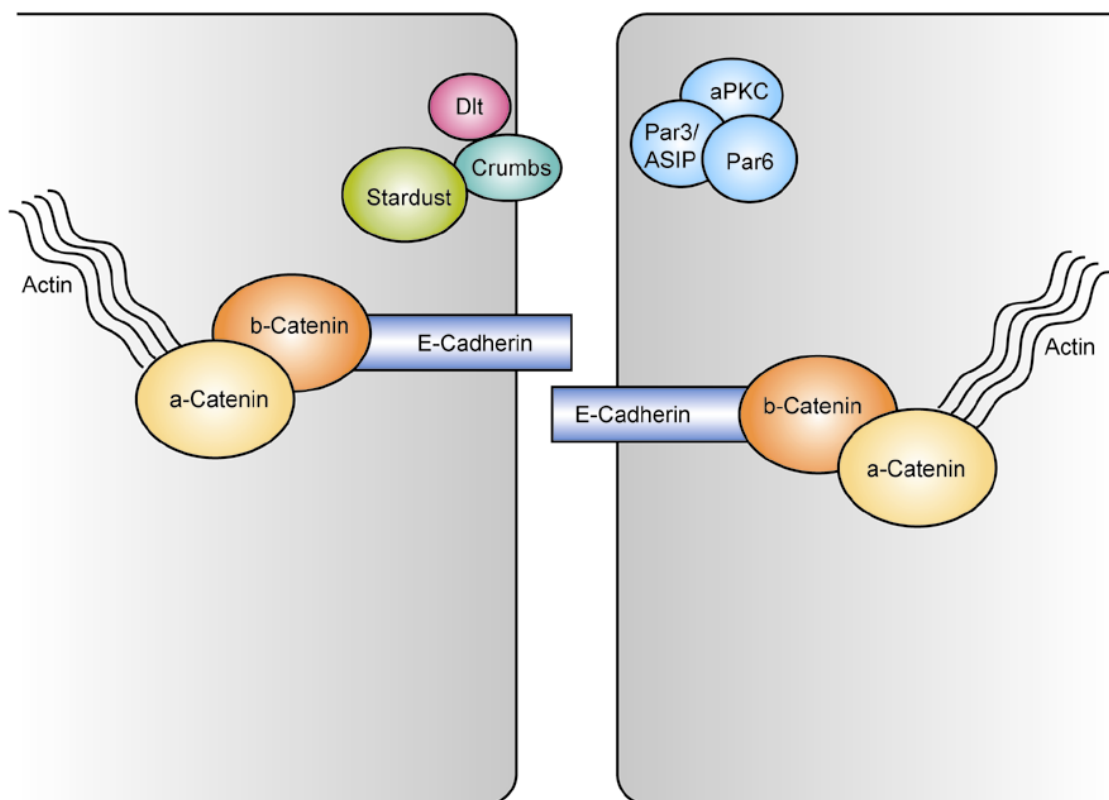
### 1.4.1 Zellkontaktkomplexe: Komponenten und Lokalisation

In den vorhergehenden Kapiteln wurde bereits die Bedeutung von Zellkontaktkomplexen, Tight und vor allem der Adherens Junctions für die Spindelorientierung diskutiert. Abbildung 1.4.1-1 soll die Lokalisation der unterschiedlichen Komplexe in verschiedenen Organismen verdeutlichen.



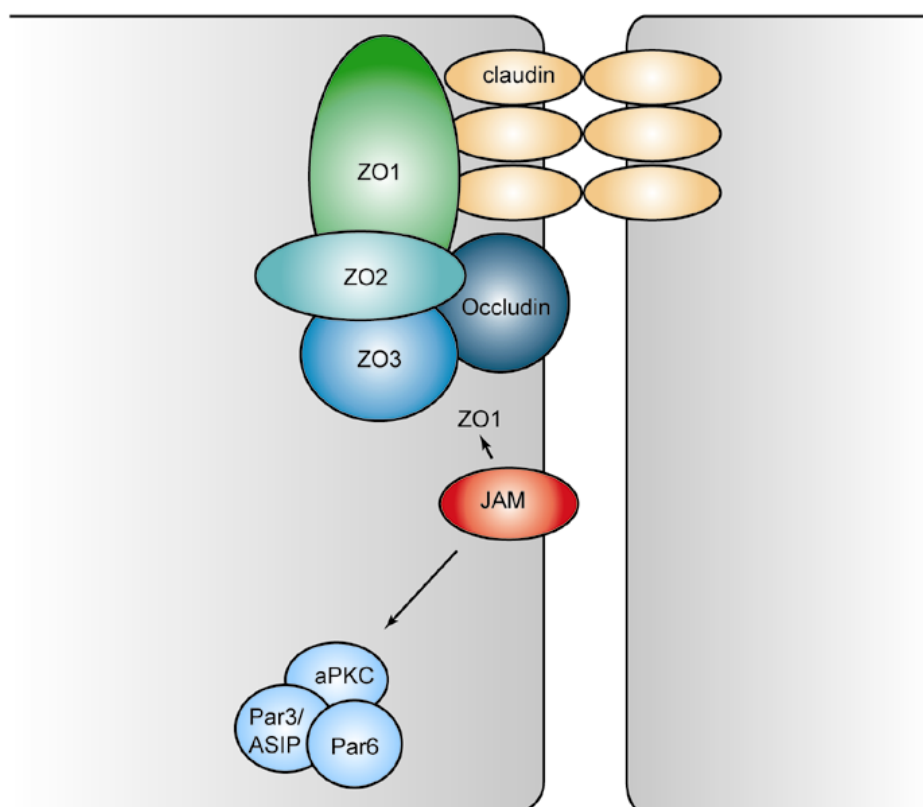
**Abb. 1.4.1-1:** Lokalisation von Zellkontaktkomplexen. Schematische Gegenüberstellung der Lokalisation von Zellkontaktkomplexen in *Drosophila* und Vertebraten. In rot Markierung von SAR – Subapikale Region und TJ – Tight Junctions. In grün, einheitlich in *Drosophila* und Vertebraten ZA – Zonula adherens. Grau in *Drosophila* SJ – Septate Junctions. Grau in Vertebraten DS – Desmosomen. (modifiziert nach (Knust and Bossinger, 2002))

Epitheliale Zellen zeichnen sich unter anderem durch zwei Eigenschaften aus: sie sind polarisiert und besitzen hoch differenzierte Zellkontaktkomplexe. Die Plasmamembran wird durch diese Komplexe in unterschiedliche Domänen eingeteilt. Einerseits die apikale Domäne, die Kontakt zum umgebenden Lumen besitzt, andererseits die basolaterale Domäne, die den Kontakt zu, und den Zusammenhalt mit den Nachbarzellen gewährleistet. Die apikale Zelldomäne wird in *Drosophila* als SAR (Subapikale Region) bezeichnet (Knust and Bossinger, 2002). Obwohl diese Region nicht, wie in Vertebraten, durch Tight Junctions gekennzeichnet ist, konnten Proteinkomplexe nachgewiesen werden, die in epithelialen Zellen von Vertebraten mit Tight Junctions kolokalisieren (Knust and Bossinger, 2002). In diesem Zusammenhang ist vor allem der hochkonservierte Par3(Bazooka/ASIP)-Par6-aPKC Komplex zu nennen. Basal zur apikalen Region ist in *Drosophila* die sogenannte Zonula adherens mit Adherens Junctions (Abbildung 1.4.1-2 und 1.4.1-4 ) lokalisiert.



**Abb. 1.4.1-2:** Zusammensetzung von Adherens Junctions und Par3/ASIP-aPKC Komplex. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Aufbau beider Komplexe vereinfacht dargestellt. (modifiziert nach (Braga and Harwood, 2001))

Komponenten dieser Adherens Junctions sind E-Cadherin, das den Transmembrananker zu den Nachbarzellen bildet, sowie  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin. Diese cytoplasmatischen Proteine binden an E-Cadherin und bilden ihrerseits die Brücke zu Actinsträngen (Braga and Harwood, 2001). Basal zur Zonula adherens befinden sich die sogenannten Septate Junctions. Diese sind für *Drosophila* charakteristisch und erfüllen die Barrierefunktion, die in Vertebraten von den Tight Junctions geleistet wird. In Vertebraten lokalisieren die Tight Junctions apikal und hemmen durch die enge Verknüpfung der benachbarten Zellmembranen den parazellulären Transport. Damit leisten sie eine wichtige Schutzfunktion gegenüber den Einflüssen des die Epithelzellen an der apikalen Seite umgebenden Lumens (Knust and Bossinger, 2002).



**Abb. 1.4.1-3:** Zusammensetzung von Tight Junction Komplexen. Neben den Barriere bildenden Transmembrankomponenten Claudin und Occludin und den cytosolischen Proteinen ZO1-3, soll besonders auf JAM als Brücke zwischen ZO1 und dem konservierten Par3/ASIP-aPKC Komplex hingewiesen werden.

Innerhalb der Tight Junction Komplexe (Abbildung 1.4.1-3 und 1.4.1-4) bilden die Claudine als Transmembranproteine das Rückrad der Zellkontakte (Anderson et al., 2004; Fanning et al., 1999). An Claudin binden die Zonula occludens Proteine ZO1-

ZO3, die ihrerseits mit Actin gekoppelt sind (Fanning et al., 1999). Eine weitere wichtige Komponente von Tight Junction Komplexen ist das Junction Adhesion Molecule JAM (Martin-Padura et al., 1998). Es kontaktiert über seine PDZ – Domänen ZO1 als Tight Junction Komponente. PDZ-Domänen sind ein strukturelles Aminosäuremotiv, über das Proteine mit anderen Proteinen in Kontakt treten können. Gleichmaßen kann JAM aber auch mit Par3 interagieren und stellt dadurch die Verbindung zwischen Zellkontaktkomponenten der Zonula occludens und dem Par3(Bazooka/ASIP)-Par6–aPKC–Komplex dar (Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2004). Genau wie in *Drosophila* liegt in Vertebraten basal zur apikalen Domäne die Zonula adherens mit Adherens Junctions. Jenseits dieser basolateralen Domäne erstreckt sich der Bereich der Desmosomen, einer weiteren Zellkontaktart in Vertebraten. In *C.elegans* konnte lediglich ein einzelner, dreiteiliger Zellkontaktkomplex identifiziert werden, der Ähnlichkeiten zur Zonula adherens in *Drosophila* und Vertebraten aufweist (Fleming et al., 2000; Muller, 2000).

	Transmembranproteine		Gerüstproteine	
	<i>Drosophila</i>	Vertebraten	<i>Drosophila</i>	Vertebraten
SAR ( <i>Drosophila</i> ) Tight Junctions (Vertebraten)	Crumbs	CRB1 Occludin Claudine JAM	Bazooka DmPar6 DaPKC Cdc42 Stardust Discs lost Polychaetoid DMoesin	ASIP Par6 aPKC Cdc42 Pals1 hINAD1/PATJ ZO1-3 ERMs  Cingulin JEAP MUPP1
Zonula adherens	Shotgun	E-Cadherin L1CAM Nectin Vezatin	Armadillo $\alpha$ -Catenin Canoe (Rexin)	$\beta$ -Catenin $\alpha$ -Catenin AF-6 Ponsin
Septate Junct. ( <i>Drosophila</i> ) Desmosomen (Vertebraten)	Neurexin IV Fasciclin III		Scribble Discs large  Coracle Lgl	Erbin hDLG

**Abb. 1.4.1-4:** Übersicht über Transmembran- und Gerüstproteine in epithelialen Zellkontaktkomplexen. Soweit bekannt wurden homologe Proteine einander in einer Reihe gegenüber gestellt. Die Regionen der Septate Junctions in *Drosophila* und der Desmosomen in Vertebraten sind nicht direkt mit einander vergleichbar, wurden der

Übersichtlichkeit halber aber dennoch in einem Bereich erfasst. (modifiziert nach (Knust and Bossinger, 2002)).

#### 1.4.2 Par3/ASIP-aPKC: ein konservierter Proteinkomplex

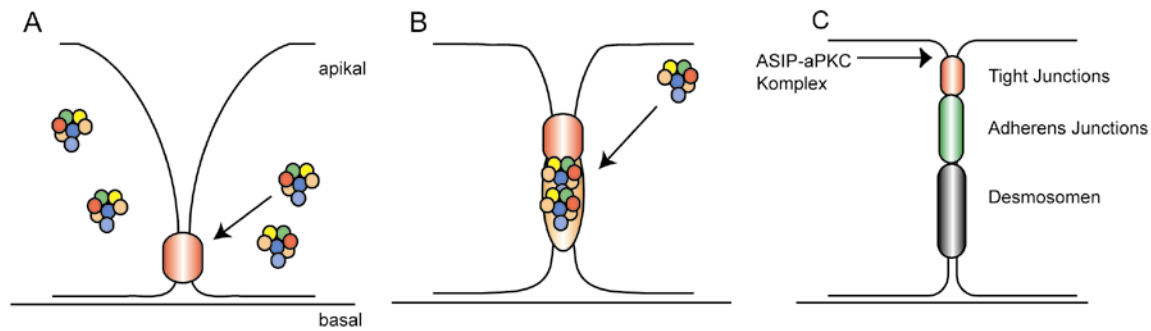
In *C.elegans* wurde erstmalig ein Komplex aus den zwei PDZ-Domänen enthaltenen Proteinen Par3 und Par6 und einer atypischen Proteinkinase aPKC beschrieben, der dort die Polarität der ersten Teilungen bestimmt (Cheng et al., 1995; Guo and Kemphues, 1996; Kemphues et al., 1988). Der Komplex ist evolutionär konserviert. In *Drosophila* ist er in der subapikalen Region lokalisiert (Horne-Badovinac et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Bazooka/Par3, DmPar6 und DmaPKC partiell mit Armadillo ( $\beta$ -Catenin) überlappen, es also auch eine enge Assoziation mit Adherens Junctions in *Drosophila* gibt (Kuchinke et al., 1998; Muller and Wieschaus, 1996; Petronczki and Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000). Das Par3/Bazooka Homolog in Vertebraten trägt den Namen ASIP (atypical PKC isotype-specific interacting protein). Zusammen mit Par6 und den zwei eng verwandten aPKC Proteinen  $\lambda$  und  $\xi$  kolokalisiert es in der epithelialen Zelllinie MDCK II mit ZO1. Dieses lässt den Schluss zu, dass der Komplex in voll polarisierten Epithelien von Vertebraten im Bereich der Zonula occludens und damit der Tight Junctions lokalisiert ist (Izumi et al., 1998; Suzuki et al., 2001). Weitere Hinweise darauf brachten Immunogold elektronenmikroskopische Aufnahmen, die die Anwesenheit von Par3 an Tight Junctions des intestinalen Epithels der Ratte nachweisen konnten (Izumi et al., 1998). In Säugern interagieren die drei Proteine ASIP/Par3, aPKC und Par6 direkt miteinander und bilden so den ternären Komplex (Suzuki et al., 2001). Der eigentliche Kontakt erfolgt dabei über die Kinasedomäne von aPKC und der Cr3 Domäne von ASIP (Izumi et al., 1998). Im Zebrafisch konnte bis jetzt kein Par6 Homolog nachgewiesen werden, Komponenten des Komplexes sind hier aPKC (Horne-Badovinac et al., 2001), ASIP (Geldmacher-Voss et al., 2003) und CdC42. Es gibt daneben aber starke Hinweise auf die Existenz eines Zebrafisch JAM Homologs (I. Riedl, unveröffentlichte Daten). Neben Überexpressionsstudien mit Zebrafisch ASIP (Geldmacher-Voss et al., 2003), kommt auch der aPKC Mutante *heart and soul (has)* (Malicki et al., 1996; Schier et al., 1996; Stainier et al., 1996) eine wichtige Bedeutung bei der Untersuchung des Einflusses des ASIP-aPKC Komplexes auf die Spindelorientierung im Zebrafisch zu. Die die *has* Mutation tragenden Embryonen exprimieren eine aPKC mit inaktiver Kinasedomäne. Diese Inaktivierung wird durch

ein verfrühtes Stopp-Codon im Allel m129 hervorgerufen, dass zur Deletion von 73 Aminosäuren der C-terminalen Domäne führt (Horne-Badovinac et al., 2001). Homozygote Embryonen zeichnen sich durch einen charakteristischen, mutanten Phänotyp des sich entwickelnden Herzens und Gehirns aus. Unter auflichtmikroskopischen Bedingungen ist die Mutante erstmalig ab einem Zeitpunkt von circa 26 hpf von wildtypischen Embryonen unterscheidbar. Zur Überprüfung der Spindelorientierung in den mutanten Embryonen wurden Individuen der transgenen Histon GFP Linie (Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup> / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>)) und die Mutante eingekreuzt.

### 1.4.3 Die Entwicklung von Zellkontaktkomplexen

Der Par3/Bazooka/ASIP – Komplex lokalisiert in Zellen des intestinalen Gewebes der Ratte im Bereich der Tight Junctions (Izumi et al., 1998). Dieses Erkenntnis wirft die Frage nach der Funktion des Komplexes bei der Bildung der reifen Zellkontakte auf. Die Überexpression eines aPKC – Proteins ohne Kinaseaktivität in der epithelialen Zelllinie MDCK führt zur Mislokalisierung von ASIP/Par3. Daneben ist auch die Lokalisation der Tight Junction Komponenten ZO1, Occludin und Claudin-1 gestört, die Entwicklung der Junctions wird behindert (Suzuki et al., 2001). Eine generelle Störung der Zell – Zellkontakte ist aber nicht festzustellen. Die Mutation wirkt sich nur auf Zellen im Polarisationsprozess aus, bereits voll polarisierte Zellen werden nicht beeinträchtigt. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass aPKC und seine Kinaseaktivität für die Bildung, nicht aber für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität von Bedeutung ist. Abbildung 1.4.3-1 zeigt ein Model der Bildung von Zellkontakten. JAM wird zu ersten, punktartigen Adherens Junctions, den Primordien späterer reifer Adherens Junctions rekrutiert (Ebnet et al., 2001; Ohno, 2001). Dies geschieht zusammen mit E-Cadherin und ZO1 zu einem sehr frühen Zeitpunkt, noch bevor ASIP mit in den Komplex eintritt. Die Rekrutierung des ASIP/aPKC Komplexes wird vermutlich durch E-Cadherin aktiviertes Cdc42 über eine Phosphorylierung von aPKC initiiert. Dadurch ändert sich die Struktur des Komplexes, wodurch die Bindungsstelle für JAM freigelegt wird.





**Abb. 1.4.3-1:** Abbildung Reifung Junctions: Die Reifung von Zellkontaktkomplexen. (modifiziert nach (Ohno, 2001)). Die verschiedenen Schritte der Reifung wurden schematisch dargestellt. **A:** Eine unpolarisierte Zelle mit erstem punktförmigem Zellkontakt. Der aPKC-ASIP Komplex lokalisiert an diesem Kontakt und rekrutiert weitere Zellkontaktkomponenten. **B:** Der Gesamtkomplex aus ASIP-aPKC und primären Adhärenz Junction ähnlichen Kontaktkomplex wandert in die apikale Region der Zellen. **C:** Differenzierung des Vorläuferkomplexes in Tight Junctions, Adhärenz Junctions und Desmosomen. Die Tight Junctions nehmen nun, zusammen mit dem ASIP-aPKC – Komplex die apikale Domäne der Zelle ein.

Bild A zeigt einen frühen Kontakt in zu diesem Zeitpunkt noch depolarisierten Zellen, zu dem der aPKC –ASIP Komplex rekrutiert wird. Mit fortschreitender Reifung der Zellkontakte wandert der Komplex in den apikalsten Bereich der Zellen (B) und verbleibt dort bis zur vollen Polarisierung. Komponenten von Adhärenz und Tight Junctions werden in diesen Komplex mit eingebunden, der als Gerüst für die späteren, reifen Tight Junctions dient (C) (Ohno, 2001). Nach Ende der Zellkontaktreifung sind die Adhärenz Junctions weiter mediolateral lokalisiert.

Die Komponenten von Adhärenz und Tight Junctions sind zu Anfang des Polarisierungsprozesses epithelialer Zellen in einem gemeinsamen apikalen Zellkontaktkomplex lokalisiert, der sich später in Tight Junctions und den weiter lateral gelegenen Adhärenz Junctions ausdifferenziert.

## 1.5 In vivo Beobachtung von Zellteilungsmustern

Um das Verhalten neuroepithelialer Zellen während der Mitose und das Schicksal der dabei entstehenden Tochterzellen zu untersuchen, bieten sich zahlreiche Möglichkeiten. Concha und Adams (Concha and Adams, 1998) kombinierten Nomarskioptiken und die sogenannte Zeitraffer oder Time-Lapse Mikroskopie, um

das Schicksal einzelner Epiblastzellen zu verfolgen. Aus der Beobachtung der Zellteilung an Hand der Zellumrisse lässt sich allerdings nur indirekt ein Rückschluss auf die Orientierung der mitotischen Spindel ziehen. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf die von Pauls et al. (Pauls et al., 2001) etablierte, transgene Zebrafisch Histon H2A F/Z:GFP Linie. Die Individuen dieser Linie tragen die Insertion eines Fusionsproteins von Zebrafisch Histon H2A F/Z und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP). Histon GFP markiert das Chromatin der Zellen, wodurch beispielsweise die für die Beurteilung der Teilungsorientierung wichtige Metaphaseplatte visualisiert werden kann. H2A:GFP ist maternal in den Eiern vorhanden, von der siebten bis achten Teilung an wird es zygotisch hergestellt. Die Histon:GFP Linie stellt einen ubiquitär exprimierten Chromatinmarker dar, mit dem sowohl in situ als auch in vivo Beobachtungen möglich sind. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass sich die transgenen Individuen der H2A:GFP Linie vollkommen wildtypisch verhalten, und das Fusionsprotein keinen Einfluss auf die Zellteilung hat (Pauls et al., 2001). Im Zusammenhang mit der Histon GFP Linie ist die Konfokale Mikroskopie die Methode der Wahl. Sie erlaubt es Daten in definierten Z-Ebenen der Embryonen aufzuzeichnen, während gleichzeitig störende Hintergrundfluoreszenz minimiert wird. Zusätzlich kombiniert mit „Zeitraffer“ Techniken ist eine in vivo Verfolgung von individuellen Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg möglich. Die Technik der Zeitraffer oder Time-Lapse Aufnahmen beinhaltet, dass von zu beobachtenden Bereich in definierten Abständen jeweils Einzelaufnahmen gemacht werden, die später zu einer bewegten Bilderserie, einem Film zusammengestellt werden können. Im Rahmen der Arbeit wurde dabei nicht nur eine konfokale Z-Ebene, sondern bis zu 10 nacheinander gespeichert, um die volle Ausdehnung der neuralen Anlage erfassen zu können.

Neben der Verwendung der Histon H2A:GFP Linie wurde auch noch ein Fusionsprotein des Tubulin assoziierten Proteins Tau und GFP als mRNA injiziert (Kaltschmidt et al., 2000). Wie bereits durch den Namen verdeutlicht, lagert sich Tau an Tubulinstränge an und macht dadurch, in Kombination mit GFP, eine direkte in vivo Beobachtung der Spindelorientierung möglich.

## 1.6 Der Zebrafisch als Modellsystem

Lange Zeit war *Drosophila melanogaster* der bestimmende Modellorganismus der Entwicklungsbiologie. Grundlegende Mechanismen der Entwicklung wurden hier zum erstenmal untersucht und in ihren Details verstanden. Dieses gilt, wie beschrieben, für Beispiele der Spindelrotation in Neuroblasten (Knoblich, 2001) oder der pl – Zelllinie (Le Borgne et al., 2002). Auch der Einfluss der Zellkontakte (Knust and Bossinger, 2002) und anderer Komplexe wurde hier intensiv untersucht. Um diese Erkenntnisse aber mit der Neurulation in Vertebraten vergleichen zu können, waren geeignete Modellorganismen notwendig. Neben den bereits seit langem etablierten Systemen Maus und Ratte wurde der Zebrafisch *Danio rerio* als alternativer Modellorganismus der Wirbeltierentwicklung gewählt. Ursprünglich in den Flüssen Indiens beheimatet, ist er im Labor einfach zu halten und zu züchten. Die Zahl der Nachkommen ist für eine kontinuierlich Forschung und Erhaltung mit bis zu 200 Embryonen pro Weibchen und Woche ausreichend hoch. Durch die extrakorporale Befruchtung und Entwicklung ist während des gesamten Entwicklungsvorgangs der Zugang gewährt. Die Embryonen sind nahezu transparent und können mit einfachen mikroskopischen Mitteln beobachtet werden. Die Embryonalentwicklung vollzieht sich mit 72h in relativ kurzer Zeit, wodurch die wichtigsten Entwicklungsvorgänge schnell durchlaufen werden (Kimmel et al., 1995). Die Generationszeit beträgt 8-12 Wochen, so dass einerseits die Herstellung und Sichtung induzierter Mutanten (Driever et al., 1996), aber auch die Herstellung transgener Organismen (Bayer and Campos-Ortega, 1992; Scheer and Camnos-Ortega, 1999) in geeigneten Mengen möglich ist. Durch die nahezu abgeschlossene Sequenzierung des Zebrafischgenoms ist die Analyse und Klonierung neuer Gene erleichtert und beschleunigt worden. Trotz einiger Besonderheiten der Zebrafischentwicklung sind die bei diesem Modellorganismus gewonnenen Erkenntnisse auf andere Modellorganismen übertragbar und mit ihnen vergleichbar (Eyal-Giladi, 1997; Kimmel, 1989).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

In *Drosophila* sind zwei Fälle bekannt, bei denen eine Änderung der Teilungsorientierung neuraler Vorläuferzellen zu unterschiedlichem späteren Zellschicksalen führt. Es handelt sich dabei um die Teilung delaminierender Neuroblasten [Knoblich, 2001 #79] und die Zelllinie der sensorischen Borsten (Le Borgne et al., 2002). In beiden Fällen sind die Spindeln in denjenigen Zellen senkrecht zum Epithel orientiert, die später ein anderes Schicksal als die übrigen, sich planar teilenden ektodermalen Zellen annehmen. Im cerebralen Cortex des Frettchens konnten asymmetrische Mitosen gezeigt werden, die eine zum Epithel senkrechte Teilungsorientierung besitzen (Chenn and McConnell, 1995). Die Tochterzellen dieser Teilungen verhalten sich in so weit unterschiedlich, als dass eine am Ventrikel verbleibt und sich weiterhin teilt, während die andere in subventrikuläre Bereiche wandert, postmitotisch wird und sich differenziert (Chenn and McConnell, 1995).

Vor diesem Hintergrund war das anfängliche Ziel der Arbeit eine Untersuchung der Spindelorientierung während der verschiedenen Neurulationsstadien des Zebrafisches. Es sollte geklärt werden, ob auch in diesem Modellorganismus asymmetrischen Teilungen existent sind und zu welchen Zellschicksalen sie möglicherweise führen. Wichtigstes Hilfsmittel war dabei die im Labor etablierte Histon H2A F/Z:GFP Zebrafischlinie, die in vivo Beobachtungen von Zellteilungsmustern ermöglicht. Neben dieser sollte mit der Verwendung des tau:GFP Konstrukts ein Werkzeug zur direkten Visualisierung der Spindel eingesetzt werden. Nachdem die Orientierung der Teilungen während der Neurulationsstadien weitgehend analysiert werden konnte, galt es einen möglichen Zusammenhang zwischen epithelialer Polarität und Spindelorientierung zu klären. Bei der Entwicklung der epithelialen Polarität kommt dem Status der Zellkontakte eine wichtige Funktion zu. Es zeigte sich aber, dass zu diesem Zeitpunkt fast keine Daten zur Entwicklung der Zellkontakte im Zebrafisch, besonders der Tight Junctions zugänglich waren. Aus diesem Grund sollte der Analyse der Markerlokalisierung auch eine ultrastrukturelle Analyse der Zellkontaktentwicklung angeschlossen werden, um die Teilungsorientierung möglicherweise in einen Zusammenhang mit dem Status der Zellkontakte stellen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zur Haltung und Zucht des Zebrafisches

Die Haltung der für die Experimente verwendeten Fische erfolgte in einem geschlossenen Aquariensystem der Firma Schwarz (Aquarienbau Göttingen), bei einem Lichtrythmus von 14 h hell zu 10 h dunkel. Die Wassertemperatur wurde in einem Bereich von 26 - 28°C gehalten.

Das zur Aquarienfällung verwendete Leitungswasser wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit VE Wasser verschnitten (Leitwert von ca. 500 - 600  $\mu\text{S/cm}$ , Gesamthärte 17 - 20°dH). Nitrit- und Ammoniumkonzentration (nicht nachweisbar), Nitratkonzentration (< 50 mg / l) und pH-Wert (=7) wurden in regelmäßigen Zeitabständen kontrolliert und bei Abweichung nachreguliert.

Das Futter bestand aus einer Kombination aus herkömmlichem Fischtrockenfutter, frischgeschlüpften Larven des Salinenkrebse *Artemia salina* sowie *Bosmiden*, heimische Süßwasserkrebse, die tiefgefroren bezogen und über mehrere Monate gelagert werden konnten.

Die Eiablage und Aufzucht der Fische geschah in Anlehnung an die Angaben in „*The Zebrafish Book*“ (Westerfield, 1994).

### 2.2 Puffer, Materialien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad: zur Analyse (z.A.).

#### Antikörper

1. AK	Beschreibung	eingesetzte Verdünnung	bezogen von
$\alpha$ -aPKC $\xi$	polyklonaler anti aPKC $\lambda\xi$ (C20) aus Ratte	1 : 500	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ - $\beta$ - Catenin	polyklonaler Antikörper gegen - $\beta$ -Catenin aus Kaninchen	1 : 500	zur Verfügung gestellt v. P.Hausen (Schneider et al., 1996)

<b><math>\alpha</math>-ZO1</b>	Antikörper gegen ZO1 aus Maus	1: 100	(Itoh et al., 1993) und Zymed Laboratories
<b><math>\alpha</math>-pTyr</b>	Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (PY20) aus Maus	1 : 100	Transduction Laboratories

Für Immunofluoreszenzbeobachtungen wurden zweite Antikörper der Firma Amersham Pharmacia konjugiert mit Cy2, Cy3 oder Cy5 verwendet. Für lichtmikroskopische Beobachtungen wurden die folgenden 2. Antikörper verwendet:

<b>AK</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>eingesetzte Verdünnung</b>	<b>bezogen von</b>
<b>b-G-<math>\alpha</math>-M/Rab-HRP</b>	biotinylierter Ziege-Maus Antikörper, Meerettich-Peroxidase konjugiert	1 : 200	Vectastain

**Mowiol/DABCO (Anti-Fading Reagenzien für die konfokale Mikroskopie)**

5gr in 20ml PBS, 12h rühren  
10ml Glycerin zugeben, 12h rühren  
zentrifugieren; 12000 rpm (Sorvall)  
in Aliquots bei -20°C lagern

**BCIP-Lösung**

50 mg / ml BCIP-Toluidinsalz in DMF

**Blockreagenz**

Zum Abblocken unspezifischer Antikörperbindungen; 1 % - 10 %iges BSA oder GS, 1%iges DMSO in PBT.

**Collagenase**

0,1%ige Collagenaselösung (*Sigma*, Typ IA) zur Permeabilisierung von >24 h Embryonen.

**DAB**

Diaminobenzidin (*Sigma*), HRP-Färbelösung. 100 mg DAB werden in 100 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) gelöst. Die Lösung kann in 1 ml Aliquots portioniert werden und ist bei -20°C haltbar.

**DABCO**

Triethylendiamin

**DEPC- H<sub>2</sub>O**

0,1 %iges (w/v) DEPC in H<sub>2</sub>O ü.N. auf 37°C stellen, dann autoklavieren.

**Dig-Färbelösung**

100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris / HCl pH 8, 0,1 %ige Tween 20, 1 mM Levamisol (*Sigma*).

**DMSO**

Dimethylsulfoxid; wasserfreies Detergens, erleichtert das Eindringen von z.B. Antikörpermolekülen in das Gewebe.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

(Fluka; 30 %ig); zum Bleichen stark pigmentierter Fischlarven:

24 h-Embryonen : 1 %ige Lösung , ü.N.

> 24 h - Embryonen : 2 – 4 %ige Lösung ,ÜT + ü.N.

**Hyb-**

50 %iges Formamid; 5 x SSC, 0,1 %iges Tween 20.

**Hyb+**

976 µl Hyb- , 10 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg / ml),

10 µl Heparin (5 mg / ml), 4 µl Hefe-tRNA (25 mg / ml).

**Methylenblau**

gegen Verpilzung der Embryonen, 100 - 200 µl je Petrischale in  $\frac{1}{3}$  ZFR,

**PFA/PBT, 4%**

(Paraformaldehyd; Serva) zur Fixierung der Embryonen;

4 g Paraformaldehyd werden in 80 ml PBS eingerührt, auf 60°C erwärmt und solange 2 M NaOH dazugegeben, bis die Lösung klar wird. Auf RT abkühlen lassen, mit HCl auf pH 7 einstellen, mit PBS auf 100 ml auffüllen.

**Glutaraldehyd 25%**

Verwendung in wässriger Lösung als alternative Fixierungsmethode für whole mount Antikörperfärbungen und in Kombination mit OsO<sub>4</sub> zur Simultanfixierung

**PBS**

130 mM NaCl; 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; auf pH 7,6

**PBT**

0,1 %ige Tween 20 in PBS



**Proteinase K**

(Roche Diagnostic GmbH); 14 – 22 mg / ml zum Anverdauen von Embryonen vor Antikörperfärbungen.

**Seren:****BSA**

(Bovines Serum Albumin; *Sigma*); Stock-Lösung 10 %ig in PBS; 1 g BSA werden in 100 ml PBS / 1 %iger Dimethylsulfoxid-Lösung gelöst. Lösung bei -20°C haltbar.

**GS**

(Ziegen Serum; Gibco/BRL); Inaktivieren des Komplements 1 h bei 56°C. Lagern bei -20°C. 2% ige GS-Lösung in PBS, Blocklösung, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern,

**SSC, 20 x**

3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat.

**TAE**

40 mM Tris-Acetat, pH 8; 1 mM EDTA.

**Tricain (3-amino benzoic acidethylester)/ Mesap**

Stocklösung:

400mg Tricain

97,9 ml dH<sub>2</sub>O

ca. 2,1 ml 1M Tris (ph 9)

pH Angleichung auf ph 7.

Arbeitslösung:

4,2 ml Stocklösung

100 ml Aquarienwasser

**Vectastain-ABC-Kit**

Detektionssystem für immunologische Verfahren;

Die enthaltenden Reagenzien A und B bilden einen Avidin-Biotin-Enzymkomplex, der angewandt auf Antikörperfärbungen zu einer vielfachen Signalverstärkung führt. Grundlage dafür ist die außerordentlich hohe Affinität des Proteins Avidin zu dem Vitamin Biotin ( $K_a = 10$  bis  $10^9$  M). Als Bindeglied zwischen spezifischem Primärantikörper und ABC-Komplex dient ein biotinylierter Zweitantikörper, der die spezifische Ig-Kette des Primärantikörpers erkennt. Über diesen Zweitantikörper findet die Nachweisreaktion mit dem ABC-Komplex statt.

**ZFR:****Stocklösungen**

#1 25 x 169,5 g / l NaCl; 5,4 g / l KCl; 29,75 g / l HEPES (Sigma)

#2 100 x 26,4 g / l; CaCl<sub>2</sub>; 34,96 g / l; CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; Autoklavieren.

**<sup>1</sup>/<sub>3</sub>ZFR**

12 ml #1 + 9 ml #2 + 879 ml dd H<sub>2</sub>O; auf pH 7,2 mit NaOH, 1N einstellen.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Phagenbank, Bakterienstämme und Plasmide

Für allgemeine Klonierungen mit pBluescript-Derivaten oder dem Expressionsvektor pCS2+ wurde der Bakterienstamm *DH5 $\alpha$*  verwendet. Die Genotypen dieses Bakterienstammes sind Sambrook *et al.* (1989) oder den Angaben von *Stratagene* zu entnehmen.

### 2.3.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation in Bakterien transformiert. Als transformations-kompetente Bakterien wurde der E.coli-Stamm *DH5 $\alpha$*  verwendet. Die Herstellung erfolgte nach folgendem Verfahren:

- Animpfen von 1 l LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur im Verhältnis 100:1
- Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1
- 15-20 min auf Eis kühlen
- 15 min bei 4°C und 4000 rpm in einem GSA-Rotor zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 0,5 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 20 ml 10 % Glycerin / H<sub>2</sub>O lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 2-3 ml 10 % Glycerin / H<sub>2</sub>O lösen
- Suspension in 40  $\mu$ l Aliquots aufteilen und in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei -70°C

Für die Transformation wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit 0,5-2  $\mu$ l der gewünschten Plasmid-DNA gemischt und in, auf Eis gekühlte, 0,2 cm Elektroporations-küvetten überführt. Die Küvette wurde in einen *Gene Pulser<sup>TM</sup>* (Biorad) gestellt und es wurde für 4-5 ms eine Feldstärke von 12,5 kV / cm angelegt

(Geräteinstellung: Kapazität 25  $\mu\text{F}$ ; Spannung 2,5 kV; Widerstand 200  $\Omega$ ). Anschließend wurde die Küvette schnell entnommen, 1 ml bei 37°C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für ca. 60 min bei 37°C belassen. Schließlich wurde ein geeignetes Volumen auf selektive Agarplatten (LB-Agarplatten mit 50  $\mu\text{g}$  Ampicillin / ml) ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

### 2.3.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen analytischen Charakterisierung von Plasmiden in transformierten Bakterien wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Animpfen einer einzelnen Bakterienkolonie von Platte in ca. 2 ml LB / Amp-Medium
- Inkubation in einem Roller bei 37°C ü.N.
- Bakterienkultur bei 13000 rpm für 30 sec in Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 250  $\mu\text{l}$  STET-Puffer lösen
- 2 min im Wasserbad kochen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit sterilem Zahnstocher entfernen
- Fällung der DNA durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  eines 1:4-Gemisches aus 10 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  / Isopropanol
- 5-10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet mit 70 % Ethanol waschen und unter Tischlampe trocknen
- Pellet in 50-100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  / RNase A (50  $\mu\text{g}$  / ml) lösen
- Charakterisierung der DNA durch geeignete Restriktionsanalyse

### 2.3.4 Quantifizierung von DNA und RNA

In der Regel wurde die DNA-Menge durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt, wobei eine 1 kb-Leiter von Gibco/BRL mit bekannter Konzentration als Referenz diente. Für eine genauere Quantifizierung wurde eine photometrische Bestimmung

vorgenommen. Dazu wurden geeignete Verdünnungen in Wasser hergestellt und deren Extinktion bei  $\lambda=260\text{nm}$  gemessen. Für eine Schichtdicke von 1cm gilt hier:

doppelsträngige DNA: 1 OD=40 $\mu\text{g}$

einzelsträngige DNA oder RNA: 1 OD=50 $\mu\text{g}$

Zur Überprüfung der Sauberkeit wurde auch die Extinktion bei  $\lambda=280\text{nm}$  gemessen und ein Quotient gebildet. Hier gilt für DNA bzw. RNA guter Reinheit: OD 260nm/280nm = 1,8-2

### 2.3.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Analytische Restriktionsverdau zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurden in Endvolumina von 20 $\mu\text{l}$  durchgeführt, präparative Totalverdau in Endvolumina von 50-200  $\mu\text{l}$ . Die Inkubation erfolgte für 1-2 Stunden bei für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur- und Pufferbedingungen (beides laut Herstellerangaben).

### 2.3.6 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Während die meisten Klonierungsschritte über kohäsive Enden („sticky ends“) erfolgten, war es manchmal notwendig, die Enden von zu ligierenden DNA-Fragmenten durch eine Auffüllreaktion kompatibel zu machen („blunt ends“). Hierzu wurde das „Klenow-Fragment“ der Polymerase I aus E.coli verwendet, welches die Fähigkeit besitzt, die komplementären Nukleosidtriphosphate (dNTPs) an 5'-überhängenden Enden einzufügen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 30  $\mu\text{l}$  unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1  $\mu\text{g}$  DNA;
- 0,5 mM dNTPs;
- 1 x Klenow-Puffer;
- 1 U Klenow-Enzym;
- Inkubation: 30' auf Eis.

Anschließend wurde das Enzym bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.

### 2.3.7 Dephosphorylierung von Vektorenden

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektorenden zur Vermeidung von Religation erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). 1 U Enzym wurde dem Restriktionsansatz direkt zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Phosphatase 15 min bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.

### 2.3.8 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) in 0.8-1.5% TAE-Agarosegelen bei einer Feldstärke von ca.10V/cm aufgetrennt. Pro 100ml Gelvolumen wurden 0.5µl einer Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) zugegeben. Mit einem UV-Transluminator ( $\lambda=312\text{nm}$ ) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht, über Videokamera und das *Bioprint DS-System* (*Froebel Labor-Technik*, Software *Amibios* von *American Megatrends*) fotografiert und das Bild über einen *Mitsubishi Video Copy Processor*-Thermodrucker ausgegeben werden.

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte über Vergleich der Laufstrecken mit Fragmenten bekannter Länge (1 kb-Leiter von *Gibco/BRL*).

### 2.3.9 Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen

DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 0,8-1,2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden mit Hilfe einer sauberen Rasierklinge auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *JETsorb* DNA-Extraktionskits (*Gel Extraction Kit / 300*) der Firma Genomed entsprechend der Herstellerangaben eluiert.

### 2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten durch das Enzym T4-DNA-Ligase (Roche). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl durchgeführt. Es wurden 100-200 ng

geschnittene und mit CIP behandelte Vektoren eingesetzt. Die zu klonierenden Restriktionsfragmente wurden in einem dreifachen molaren (sticky ends) bzw. zehnfachen molaren (blunt ends) Überschuß hinzugegeben. Die Reaktionen wurden bei 16°C ü.N. unter den empfohlenen Puffer-bedingungen durchgeführt. Bei „blunt end“-Ligationen wurden, anstelle der sonst üblichen 1U Ligase, 2-3 U des Enzyms eingesetzt.

### 2.3.11 Sequenzierung von DNA-Konstrukten

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten wurde entweder mit Standardprimern (T3, T7, SP6) oder mit, für das jeweilige Konstrukt, spezifischen Primern durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das DNA-Sequenzierungskit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* der Firma Perking Elmer Applied Biosystems unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet. Als automatischer Sequenzierer stand das Modell ABI 3.77 der Firma Perking Elmer Applied Biosystems zur Verfügung.

Die Verarbeitung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Lasergene / DNASTAR-Biocomputing* Software der Firma DNASTAR, INC., Madison Wisconsin.

### 2.3.12 In vitro mRNA-Synthese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *SP6-RNA-Polymerase Message Kit* der Firma *Ambion* verwendet. Pro Reaktion wurden 1µg linearisierte DNA eingesetzt und gemäss den Herstellerangaben eingesetzt.

Konstrukt	Linearisiert mit:	Hergestellt durch:
CS2+tau:GFP	Not I	B. Geldmacher-Voss pCasperTau erhalten von A. Brand

## 2.4 Histologische Methoden

### 2.4.1 Bestimmung der Entwicklungsstadien

Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte durch einfache Beobachtung am Stereomikroskop bei 10 bis 40facher Vergrößerung und orientierte sich an den veröffentlichten Beschreibungen von (Kimmel et al., 1995)

### 2.4.2 Betäubung von Fischembryonen und -larven

Zur Lebendbeobachtung von Fischlarven unter dem Mikroskop waren Betäubungen notwendig, die mit Tricaine (3-Aminobenzoessäure-Ethylester; Sigma A-5040) durchgeführt wurden.

Stocklösung: 400 mg Tricaine Pulver wurden in 97,9 ml dd H<sub>2</sub>O gelöst, 2,1 ml 1M Tris (pH 9) zugegeben und auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die Stocklösung wurde bei -20°C gelagert, da sie altert. Zur Anwendung als Anesthetikum werden 100 ml <sup>1</sup>/<sub>3</sub>ZFR mit 4,2 ml Tricainlösung versetzt.

### 2.4.3 Fixierung

Embryonen wurden ü. N. bei 4°C in einer 4%igen PFA / PBS-Lösung fixiert, bzw. 2 h bei RT.

Waschen in PBT bei RT für 2 x 5 min.

Als alternative Fixierungsmethode wurde eine kombinierte Lösung von Glutaraldehyd 25% / PFA 4% in einem Verhältnis von 1:3 verwandt.



## 2.4.4 Histologische Färbemethoden

### 2.4.4.1 *whole mount* Immunohistochemie

Die hier beschriebenen histologischen Methoden wurden nach Westerfield 1994 in geringfügig modifizierter Form durchgeführt. Änderungen betreffen sowohl die Fixierungs- als auch die Detektionsschritte. Zebrafischembryonen zeigen bei 24 hpf ein äußerst stark ausgebildetes Ektoderm, wodurch das Eindringen des Antikörpers erheblich erschwert wird. Diesem Problem wurde mit einer Collagenasebehandlung im Anschluss an die Permeabilisierung (Azetonschritt) bei 24 h Embryonen begegnet.

Da eine HRP-Antikörperfärbung aufgrund der starken Pigmentierung der Larven nicht sichtbar wäre, wurden Embryonen älter als 2 Tage einer Wasserstoffperoxid-Bleichung unterzogen. Um eine Zerstörung des Fluoreszenzchromophors durch  $H_2O_2$  zu verhindern, wurde der Bleichschritt nach dem ersten Antikörperschritt durchgeführt. Zur Verstärkung des häufig sehr schwachen Fluoreszenzsignals wurde mit einem Antikörper-Enhancerkitt gearbeitet. Das Verstärker-Prinzip beruht auf der Verwendung eines biotinylierten zweiten Antikörpers, an den dann in einem dritten Schritt HRP-konjugiertes A/B-Streptavidin angelagert wird.

Im Anschluss an die Fixierung:

- Waschen in 100 %igem bei  $-20^\circ\text{C}$  vorgekühltem Methanol und für mind. 30 min bei  $-20^\circ\text{C}$  zur Permeabilisierung aufbewahren. Dieser Schritt dient auch der Inaktivierung endogener Peroxidasen. Embryonen können in Methanol bei  $-20^\circ\text{C}$  für mehrere Wochen gelagert werden.
- Rehydrierung der Embryonen für jeweils 5 min in 50 %igem, 30 %igem Methanol / PBS und 2 x 5 min in PBT bei RT.
- zur weiteren Permeabilisierung die Embryonen für 7 min mit vorgekühltem Azeton (100 %ig) bei  $-20^\circ\text{C}$  behandeln.
- Spülen in PBT bei RT für 2 x 5 min.
- Embryonen > 24 h: inkubieren in einer 0,1 %igen Collagenase / PBT-Lösung für 20 min bei RT.
- Waschen in PBT bei RT für 4 x 5 min.
- Embryonen für 2 h bei RT in 10 %igem Serum / PBT Lösung blocken.

- Blocklösung gegen den entsprechend in 1 %igem Serum / PBT verdünnten 1. Antikörper austauschen und ü.N. bei 4°C oder 2 – 3 h bei RT inkubieren.
- Waschen in PBT bei RT für 10 x 10 min.
- Embryonen > 36 h: Bleichen in einer 1 % - 4 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (je nach Alter der Embryonen) bei RT, ü.N. .
- Jeweils 2 x 5 min und 2 x 10 min waschen in PBT bei RT.
- Inkubation mit einer entsprechenden Verdünnung vom 2. Antikörper in 1,5 % igem Serum / PBT.
- Waschen in PBT bei RT für 10 x 10 min / A - B-Komplex ansetzen und 30 min inkubieren lassen: pro ml PBT 20 µl A + 20 µl B.
- Inkubation mit HRP-Streptavidin bei RT für 2 – 3 h.
- Waschen in PBT bei RT für 6 - 7 x 15 min.
- HRP-Prozessierung mit 40 µl DAB / 0,3 %ig H<sub>2</sub>O in 200 µl PBT in Dreierblockschälchen im Dunkeln.
- Abstoppen der Färbereaktion nach 30 s bis 3 min mit PBT.
- 3 x gründlich Spülen mit PBT.

#### 2.4.4.2 Färbung von Semidünnschnitten

##### Toluidinblau:

0,2% in dH<sub>2</sub>O

##### Borax-Methylenblau:

0,5 gr Borax ( Natriumtetraborat) in 30 ml dH<sub>2</sub>O lösen. 0,5 gr Methylenblau hinzugeben. Auf 50 ml auffüllen. Filtrieren. Zum Gebrauch je 5 ml der Stocklösungen verwenden und auf 100 ml auffüllen.

#### 2.4.4.3 Sytox Kern Färbungen

(Sytox Green / Orange – Molecular Probes)

Vorbehandlung mit RNase zur Hintergrundreduzierung 30 ngr/ml – 1h

Färbung 30 min 100nM

*alternativ:*

30 min RNase gleichzeitig Zugabe von Sytox bis zur Endkonzentration

#### 2.4.4.4 Detektierung von F-Actin mit Rhodamin-Phalloidin

Nach der Fixierung dürfen Embryonen für die Rhodamin-Phalloidin Färbung nicht in Methanol gelagert werden, da dieses die Bindung an das Actin verhindert.

nach PFA-Fixierung:

2x 5' PBT

Permeabilisierung der Zellen:

0,1% Triton X100 / PBT 1' RT

2x 5' PBT

Hintergrundreduzierung:

1% BSA / PBT 30' RT

Färbung mit dem RHD-Phall. Methanolstock (200 U/ml )

Verdünnung 1:40 → 5µl auf 195µl PBT 60' RT

2x 5' PBT

Ausrichtung in Glycerin / PBT → Konfocale Beobachtung

#### 2.4.5 Einbettungen in Durcopan

- Entwässern der Embryonen jeweils 2 x 5 min in 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und 95 %igem Ethanol, sowie für jeweils 2 x 10 min in 100 %igem Ethanol und 100 %igem Azeton.
- ü.N. in einem 1 : 1 Gemisch aus 100 %igem Azeton und Durcopan (mittelfest) inkubieren.

- Azeton abdampfen lassen.
- Embryonen in frisches Durcopan (mittelfest) in Einbettungsförmchen überführen und für 24 h bei 65°C aushärten lassen, zu Beginn der Inkubation die Embryonen alle 30 min nachorientieren.

#### 2.4.6 Einbettungen in Glycerin

- Fixierte Embryonen jeweils in 30 %iges, 50 %iges, 70 %iges und 87 %iges Glycerin inkubieren, bis sie zu Boden sinken.
- den Dottersack der Embryonen mit feinen Wolframnadeln abpräparieren, den Embryo flach auf einen Objektträger aufspannen und mit einem Deckglas sichern.
- um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern wird das Deckglas mit Nagellack umrandet.

### 2.5 Konfokale Mikroskopie

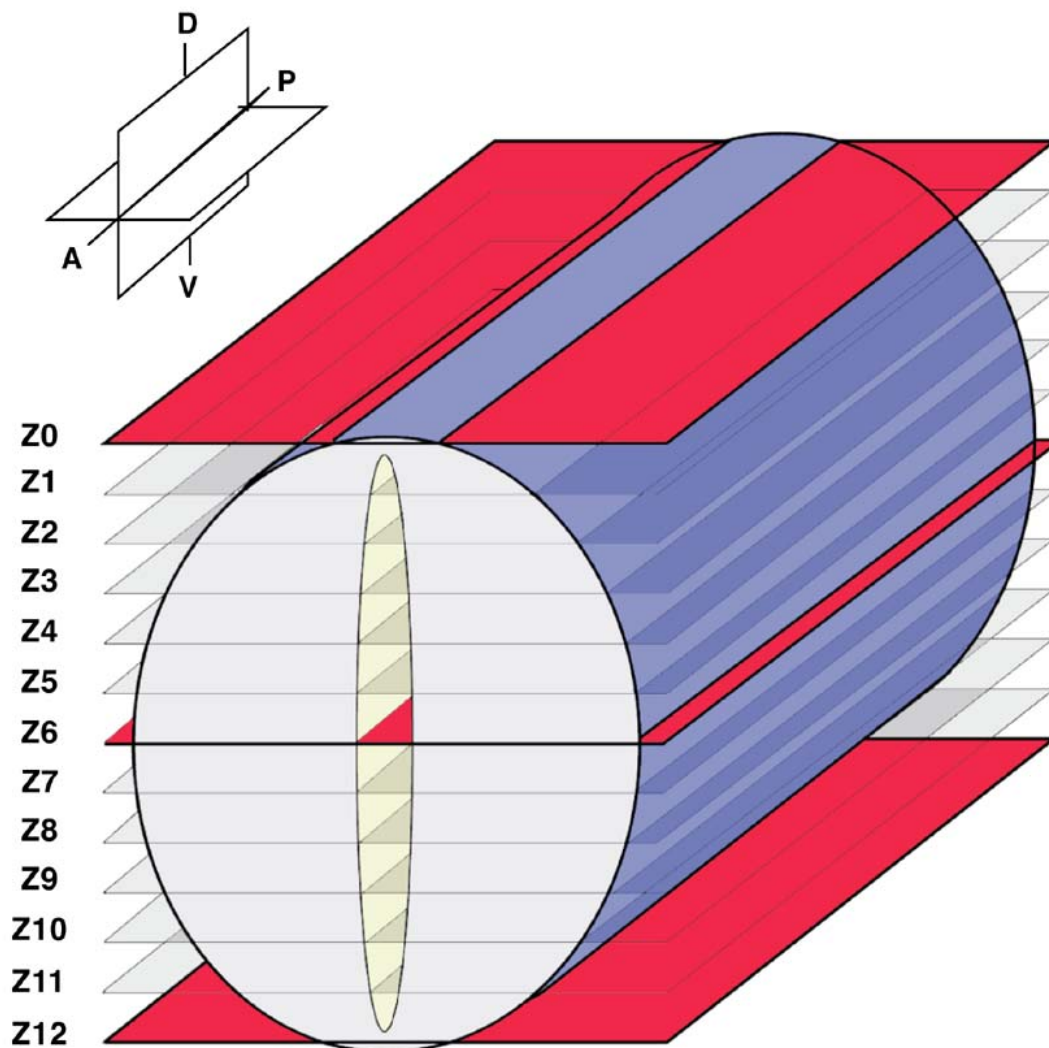
Konfokale Bilder wurden an einem Zeiss „LSM 410Axiovert“ unter Verwendung eines 40x oder 63x plan-Neofluar Objektivs aufgenommen.

Zur Lebendbeobachtung von Embryonen wurden spezielle Einbettungskammern angefertigt. Die Wandungen der Kammer bildete ein 1 cm dicker Plastikträger, der in seiner Mitte eine runde Aussparung von 2 cm Durchmesser besaß. Die Unterseite der Kammer schloß ein Deckglas (< 0,9 mm) ab, das mit Silikongel an dem Träger befestigt wurde. Die Unterseite der Kammer war die dem Objektiv zugewandte Seite, da an einem invertierten Mikroskop gearbeitet wurde. In die mittige Öffnung wurde ein Agarosebett (1,2 – 1,7 %iger Agarose in  $\frac{1}{3}$ ZFR) gegossen, in das mit Pasteurglaspipetten Vertiefungen ausgestanzt wurden. Die Vertiefungen dienten als Liegefläche der Embryonen. Sie waren der Körperform des jeweiligen Tieres angepasst, um ein mögliches Umkippen oder andere Lageverschiebungen während der Aufnahmen zu vermeiden. Mit einer Mischung aus 1 %iger PTU- und 0.5 %iger Mesap-Lösung ( bei Beobachtungen an Embryonen älter als 24h ) in  $\frac{1}{3}$ ZFR wurde die Kammer großzügig bedeckt. Um das das Verdunsten der Flüssigkeit und ein

Austrocknen der Fische über längere Untersuchungszeiträume hinweg zu vermeiden wurde die Kammer mit einem weiteren Deckglas abgeschlossen.

### 2.5.1 Aufnahmemethoden

Für die Herstellung von Filmen wurden speziell angefertigte Makros genutzt, die es erlauben vom zu untersuchende Objekt in mehreren Z-Ebenen und definierten Zeitabständen Aufnahmen aufzuzeichnen. Die resultierenden Bildserien wurden in die Programme NIH-Image (Macintosh) oder Scion Image (PC) importiert und zu Filmdateien umgewandelt.



**Abb. 2.5.1-1:** Konfokale Aufnahmemethode. Horizontale Schnittebenen durch das Neuralrohr eines Zebrafischembryos.

Die orthogonalen Schnitte durch die Neuralplatte nach Injektion von Tau-GFP RNA wurden durch Übereinanderlagerung von bis zu 260 Z-Eben eines definierten Bereichs hergestellt. Die dafür notwendige Funktion ist Teil der Betriebssoftware des Zeiss LSM410.

### **2.5.2 Statistische Analyse der Mitosen in der Neuralplatte**

Die Orientierung der Anaphase wurde wie von Concha und Adams beschrieben ermittelt (Concha and Adams, 1998). Zuerst wurde die Mittellinie auf jedem Einzelbild des am Konfokalen Mikroskop erzeugten Film markiert und die mediolaterale Ausdehnung der Neuralplatte in drei gleichgrosse Einheiten geteilt. Zur Ermittlung der Orientierung der Anaphase wurde eine zur Teilungsebene parallele Linie gezogen, die dann auf die Mittellinie projiziert wurde. Die Winkel des Anaphase zur Mittellinie wurde aufgezeichnet und für jede der untersuchten Regionen der Neuralplatte in Gruppen von  $10^\circ$  zusammengefasst. An ihnen wurde Kreisstatistik für multimodale Werte durchgeführt (Batschelet, 1981). Für die statistische Einordnung wurde die Winkel an beiden Seiten der Neuralplatte gemessen. Die erhaltenen Werte wurde zur Auswertung verdoppelt, um eine zirkuläre Verteilung der Winkel zu erhalten. Anschließend wurde die durchschnittliche Vektorlänge ermittelt und ein Raleigh Test zur Untersuchung der Signifikanz durchgeführt (Batschelet, 1981).

## **2.6 Transmissionselektronenmikroskopie**

Zur Untersuchung von Zellkontaktkomplexen wurden Ultradünnschnitte von Zebrafischembryonen angefertigt und danach, im Anschluss an die notwendigen Verarbeitungsschritte, für das TEM verwandt. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen.

- Simultanfixierung nach (Franke et al., 1969]
- Einbettung in hartes Durcupan.
- Herstellung Formvar beschichteter Trägernetzen
- Semidünnschnitte zur Vorbereitung des Blocks

- Ultradünnschnitte
- Kontrastierung der Ultradünnschnitte
- Beobachtungen am TEM
- Weiterverarbeitung von Filmen und Papierabzügen.

### 2.6.1 Cacodylatpuffer

(0,2 M - pH7,1) für die Simultanfixierung

Lösung A:

Natrium Cacodylat	4,28 Gr.
dH <sub>2</sub> O	100 ml

Lösung B: (0,2 M HCl )

konz. HCl ( 36-38% )	10 ml
dH <sub>2</sub> O	603 ml

Für pH 7,1 werden 5,5 ml Lösung B zu 50 ml Lösung A hinzugegeben und auf ein entgültiges Volumen von 200 ml hin mit dH<sub>2</sub>O verdünnt.

### 2.6.2 Simultanfixierung

- 4% Glutaraldehyd, cacodylatgepuffert pH7,1
- 2% Osmiumtetroxid, cacodylatgepuffert.

Embryonen dechorionisieren, kurz mit dH<sub>2</sub>O waschen. Das Glutaraldehyd vorlegen, Osmiumtetroxid zur gewünschten Konzentration hinzugeben. Das Osmium darf auf keinen Fall aus der Lösung ausfallen, da die Embryonen sonst vollkommen geschwärzt werden(Franke et al., 1969).

- Fixierung auf Eis, möglichst unter Lichtausschluss für 30´
- 4x mit kaltem Cacodylatpuffer waschen
- Nachfixierung 2h in 2% Osmiumtetroxid, cacodylatgepuffert.
- Auswaschen des Osmiums mit kaltem dH<sub>2</sub>O (3X)

- Entwässerung über eine Alkoholreihe:
- 50% EtOH, 10´
- Zumischung von 0,1% Uranylacetat in 70% EtOH, Schütteln bei RT üN.
- 80%, 90%, 96% (2x), 100% EtOH je 10´ Schütteln.

Dabei ist es äußerst wichtig, dass der 100%ige Alkohol möglichst wasserfrei ist.

- Propylenoxid (2x) 15´ schütteln

Hier gilt das Gleiche wie für den 100%igen Alkohol. Propylenoxid ist extrem hygroskopisch, es ist aus diesem Grund möglichst eine frische Flasche zu verwenden.

- Einbettung. Propylenoxid, Durcupangemisch (1:1) üN.
- Überführung in frisches Durcupan. 8-12h
- Einbettung in Formen, Polymerisierung bei 65°C üN.

### 2.6.3 hartes Durcupan zur Einbettung elektronenmikroskop. Präparate

Komponenten bezogen von Fluka (Sigma)

#### Mengenangaben für die Mischung des Epoxidharzes:

Durcupan A/M	27,175 Gr.
Durcupan B	23,705 Gr.
Durcupan C	1,75 Gr.
Durcupan D	1,00 Gr.

Komponenten A und B verrühren bis die Mischung homogen ist. Danach D und C tropfenweise hinzugeben und bis zu völligen Schlieren- und Blasenfreiheit weiterrühren. In Spritzen aufziehen und bei -20°C lagern.



### 2.6.4 mittelfestes Durcupan für lichtmikroskopische Schnitte

Mengenangaben für die Mischung des Epoxidharzes:

Durcupan A/M	32 ml
Härter	27 ml
Beschleuniger	1 ml
Weichmacher	0,6ml

Komponenten auch hier von Fluka (Sigma)

### 2.6.5 Herstellung formvarbeschichteter Trägernetzchen

Für die Herstellung der Netzchen wurden Kupferträger mit 1500  $\mu\text{m}$  Öffnung verwandt, die über die Firma Plano bezogen wurden. Zur Beschichtung sind Pioloform und Formvar gleichermaßen geeignet. Im hier vorliegenden Fall wurde aus Gründen der Kontinuität Formvar der Firma Merck verwandt.

Pioloform 0,6% gelöst in 100%, wasserfreiem Chloroform  
Filtrierung der Lösung vor der Verwendung.

Objektträger werden mit einem sauberen Tuch gereinigt und dann kurz in die Formvar/Chloroform Lösung getaucht. Nach einer Trockenzeit von 15-30 min wird die Formvarschicht mit einer Klinge auf dem Objektträger angeritzt. Danach lässt man die Schicht auf eine geeignete Wasseroberfläche gleiten. Auf dieser Oberfläche schwimmend belegt man den Kunststofffilm mit den Netzchen der Wahl und nimmt ihn dann mit einem Stück Parafilm auf. Die Trocknung erfolgt am Besten  $\bar{u}N$  im Vakuum mit einem Feuchtigkeitsabsorbierenden Mittel wie Calciumchlorid.

### 2.6.6 Semidünn- und Ultradünnschnitte

Verwendet wurde hierfür ein Ultratom der Firma Reichert. Für reine Semidünnschnitte wurden die zu untersuchenden Objekte in mittelhartes, für Ultradünnschnitte in hartes Durcupan eingebettet. Die Blöcke wurden mit

Maximaldicken von 2,5µm angeschnitten und dann bei ca. 200-400 Å ultradünngeschnitten. Die so erhaltenen Schnittserien wurden mit beschichteten Netzchen aufgenommen und getrocknet.

### 2.6.7 Kontrastierung elektronenmikroskopischer Ultradünnschnitte

Die auf beschichteten Netzchen befindlichen Schnittserien wurden einer kombinierten Bleicitrat und Uranylacetat Kontrastierung unterworfen.

Bleicitrat Lösung (Reynolds, 1963):

0,03 Gr. Bleicitrat auf 10ml dH<sub>2</sub>O

durch leichtest Schütteln aufschwemmen

Lösen durch 10 Tropfen 10N NaOH

vor der Verwendung Sterilfiltrieren

Kontrastierung 1 min RT, gründliches Spülen mit dH<sub>2</sub>O

Uranylacetat Lösung:

1% Uranylacetat in 70% EtOH

Verwendung: 15 min RT, gründliches Spülen mit dH<sub>2</sub>O

### 2.6.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Für die Herstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde ein TEM 910 der Firma Zeiss verwandt. Für Aufnahmen wurde der Kodak EM Film SO-163genutzt, der in Kodak D19 Entwickler weiterverarbeitet wurde. Der Fixierer wurde im Selbstansatz hergestellt:

Fixierer EM Filme:

2000 ml dH<sub>2</sub>O

500 Gr. Natriumthiosulfat

50 Gr. Natriumdisulfit

mit Wasser auffüllen auf 2500ml

Die Aufnahmen wurden mit einem Kienzle Grossformatvergrösserer auf Ilford Ilfospeed RC Fotopapier vergrössert.

Die Digitalisierung erfolgte mittels eines Agfa Flachbrettscanners an einem Apple G3 Computer.

## 2.7 Verwendete Zebrafischstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zebrafisch-Wildtyplinie entstammt ursprünglich einem Kölner Zoofachgeschäft (im Folgenden als *Wildtyp Köln* bezeichnet).

Weiterhin wurden Embryonen der folgenden Genotypen verwendet: Tiere mit den Insertionen Tg(H2A.F/Z)<sup>kca37</sup> und Tg(H2A.F/Z)<sup>kca66</sup> (Pauls et al., 2001). Die Individuen dieser transgenen Linien exprimieren ein Fusionsprotein bestehend aus Zebrafisch Histon H2A.F/Z und GFP. Unter Fluoreszenzbedingungen oder mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops können so die Zellkerne der Embryonen in vivo beobachtet werden. Ursprünglich wurden unterschiedliche Gründerfische der Insertionen Tg(H2A.F/Z)<sup>kca37</sup> und Tg(H2A.F/Z)<sup>kca66</sup> isoliert, die aber zur Verstärkung der Fluoreszenz untereinander gekreuzt wurden. Außerdem wurden Embryonen der Mutation *heart and soul* (Allel m129) verwendet, bei denen durch ein Stoppcodon 73 Aminosäuren des C-terminalen Bereichs deletiert sind (Horne-Badovinac et al., 2001).

## 2.8 Abkürzungen, Symbole und Konventionen

Abs	–	Absorption (in nm)
AK	–	Antikörper
Å	-	Angström
AP	–	Alkalische Phosphatase
BCIP	–	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	–	( <i>bovine serum albumine</i> ) Rinderserumalbumin
DAB	–	Diaminobenzidin
dd H <sub>2</sub> O	–	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
DEPC	–	Diethylpyrocarbonat

dH	–	Grad deutscher Härte (Gesamthärte des Leitungswassers)
Dig	–	Digoxygenin
DMF	–	Dimethylformamid
Dpf	-	(days after fertilisation) Tag(e) nach der Befruchtung
EDTA	–	Ethylen-Diamin-Tetraacid
Em	–	Emission (in nm)
FDA	–	Fluoreszein Dextran Amin
h	–	Stunde
HEPES	–	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N`-(2-Ethan)-Sulfonsäure
hpf	–	( <i>hours post fertilisation</i> ) Stunde(n) nach der Befruchtung
min	–	Minute
m-RNA	–	( <i>messenger RNA</i> ) Boten-RNA
NBT	–	Nitro-Blue-Tetrazolium
nm	–	Nanometer
Nm	–	Neuromast
PBS	–	( <i>phosphate buffered saline</i> ) Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	–	PBS mit 1%igem Tween 20
PFA	–	Paraformaldehyd
pH	–	(von lat. <i>pondus hydrogenii</i> ; Wasserstoff-Gewicht) negativer dekadischer Logarithmus der aktuellen Hydroniumionenaktivität
RT	–	Raumtemperatur
s	–	Sekunden
SSC	–	<i>standart saline citrat</i>
TAE	–	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TEM	-	Transmissionselektronenmikroskop
Tris	–	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	–	( <i>unit</i> ) Reaktionseinheit
ü. N.	–	über Nacht
UV	–	ultraviolette Strahlung
VE	–	voll entsalztes Wasser

**Genetische Nomenklatur in dieser Arbeit:**

Gene, m-RNAs und Phänotypen werden klein und *kursiv*; Proteine nicht kursiv und deren Anfangsbuchstaben jeweils groß geschrieben.

Bezeichnung von Entwicklungsstadien beim Zebrafisch: Die Einteilung und Bezeichnung jüngerer Stadien erfolgte im Wesentlichen nach den Kriterien von (Kimmel et al., 1995). Bei älteren Stadien wurde die Zeit nach der Befruchtung unter standardisierten Aufzuchtbedingungen zur Bezeichnung eines Stadiums verwendet. Da sich selbst unter diesen Bedingungen nicht alle Individuen genau gleich schnell entwickeln (Kimmel et al., 1995), mag es zu leichten Unterschieden im Alter zweier Vergleichstiere kommen. Zeitangaben zur Bezeichnung eines Entwicklungsstadiums beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, immer auf den Zeitpunkt der Befruchtung.

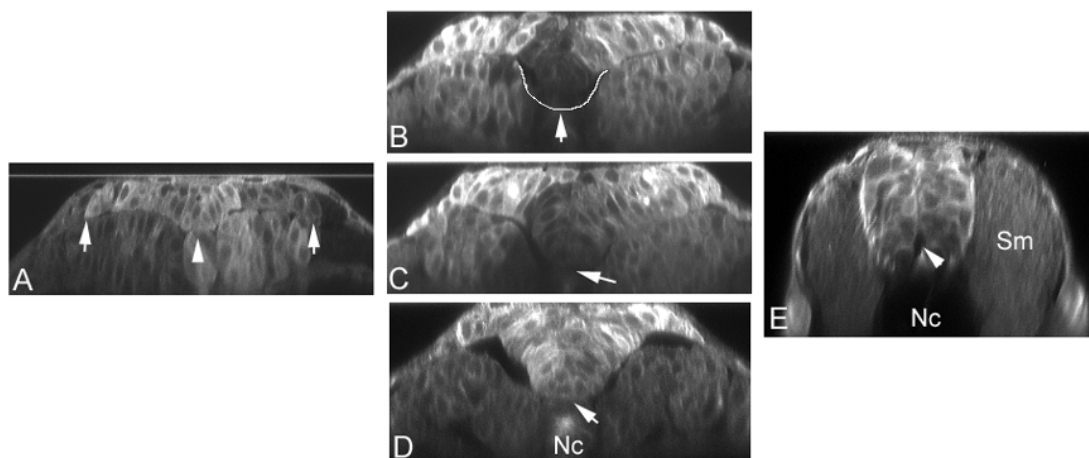
In Fällen bei denen der Ausdruck Larve verwendet wurde, müssen drei Tage zur Berechnung der seit der Befruchtung vergangenen Zeit hinzugezählt werden, da Larven mit ca. drei Tagen aus dem Chorion schlüpfen

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Mitotische Orientierung während der Neurulation

Zur sekundären Neurulation des Zebrafisch *Danio rerio* werden die Entwicklungsstadien der Neuralplatte, des Neuralkiels, des Neuralstabs und des Neuralrohrs gezählt. Im Verlauf dieses Prozesses bleibt das Neuroepithel pseudostratifiziert. Es besteht aus einer einzigen Schicht kolumnaler Zellen, die sich von der apikalen zur basalen Seite hin erstrecken.

Die oben beschriebenen Stadien werden in Abbildung 3.1-1 durch Querschnitte durch die neurale Anlage illustriert. Für die Aufnahmen wurden die Embryonen im Ein- bis Zweizellstadium mit Tau:GFP mRNA injiziert und dann am Konfokalen Mikroskop beobachtet. Die orthogonalen Abbildungen wurde computergestützt aus Stapeln von Z-Ebenen-Aufnahmen erzeugt. Die Konturen der Zellen lassen sich von der Basalmembran bis zu apikalen Seite verfolgen.



**Abb. 3.1-1:** Orthogonale Schnitte durch Neuralplatte (A), Neuralkiel (B – D) und Neuralrohr nach Injektion von Tau:GFP mRNA. Pfeile und Pfeilspitzen markieren die mediale und lateralen Verdickungen der Neuralplatte in Bild A. In B – D markieren Pfeile die ventralsten Punkte des Neuralkiels, in B wurde er zusätzlich durch eine weiße Linie markiert. Bild E zeigt das Neuralrohr, umgeben von den Somiten (Sm).

Bild A zeigt die Neuralplatte eines Tau:GFP injizierten Embryos. Die weiße Linie oberhalb der Anlage repräsentiert das Deckglaschen, auf dem der Embryo für die Aufnahmen positioniert wurde. Die beiden Pfeile markieren die lateralen Verdickungen der Neuralplatte, die Pfeilspitze die mediale (Schmitz et al., 1993). Die

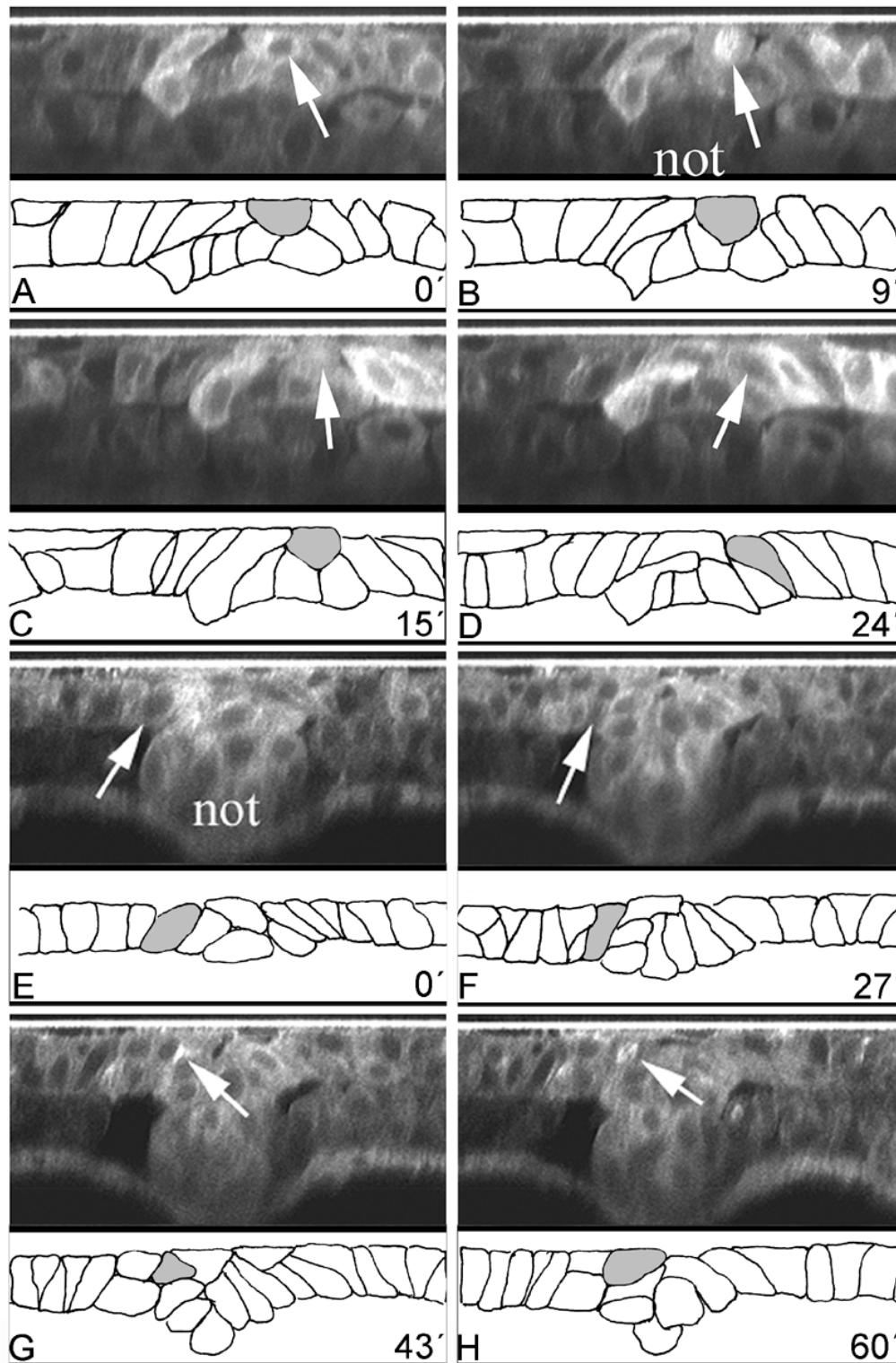
Bilder B-D zeigen unterschiedlich alte Stadien des durch Einfaltung der Neuralplatte entstandenen Neuralkiels. Pfeilspitzen deuten in allen drei Aufnahmen auf die ventralsten Bereiche der Anlage hin. In B wurde die Bodenregion des Kiels zusätzlich durch eine weiße Linie hervorgehoben. In D ist, ventral zum Kiel gelegen, das Notochord (Nc) zu erkennen. Bild E zeigt einen Querschnitt durch das Neuralrohr. Die Pfeilspitze deutet auf das im ventralen Bereich sehr prominente, sekundäre entstandene Neurocoel. Die Epidermis hat sich über dem Rohr geschlossen, die Somiten (Sm) erstrecken sich auf beiden Seiten.

### 3.1.1 Neuroepitheliale Zellen teilen sich bevorzugt apikal

Neuroepitheliale Zellen runden sich kurz vor der Mitose an der apikalen Seite des Epithels ab und teilen sich dann dort (Hinds and Ruffet, 1971). Abbildung 3.1.1-1 zeigt mitotische Zellen während des Neuralplatten-Stadiums nach Tau:GFP Injektion. Aus Z-Stapeln der betreffenden Region wurden, wie bei Abbildung 3.1-1 orthogonale Schnitte hergestellt.

Bild A zeigt die markierte Zelle bereits apikal abgerundet, sie liegt nun über der neuroepithelialen Zellschicht. An Hand des vorliegenden Materials kann nicht geklärt werden, ob die mitotische Zellen möglicherweise noch über einen dünnen Fortsatz mit der Basalmembran verbunden bleiben. Das Auftreten solch dünner Fortsätze wurde im cerebralen Cortex der Maus beschrieben (Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001). Nach der Teilung (Bild C) integriert sich die im Querschnitt sichtbare Nachkommenzelle wieder in die neuroepitheliale Zellschicht ein. Die Bilder E-H verdeutlichen die apikale Abrundung einer Neuralplattenzelle nach Verlust der Verbindung mit der Basalmembran. Sowohl die Bildung eines Centrosoms (Bild G), wie auch ein erstes Auftreten der mitotischen Spindel (Bild H) sind durch Pfeile markiert.

Film 1 (siehe auch Abbildung 3.1.1-2) zeigt die Neuralplatte von dorsal nach Injektion von Tau:GFP mRNA. Die mit einem Pfeil markierte, mitotische Zelle, zeichnet sich durch die Ausbildung eines polarisierten Fortsatzes aus. Zellen mit solchen zur Mittellinie hin orientierten Fortsätzen konnten im Rahmen der Arbeiten recht häufig beobachtet werden. Während und nach der Mitose bewahren die sich teilenden Zellen ihre relative Position innerhalb der Neuralplatte (Abbildung 3.1.1-2 und Film1), da die Konvergenzbewegungen sowohl von den

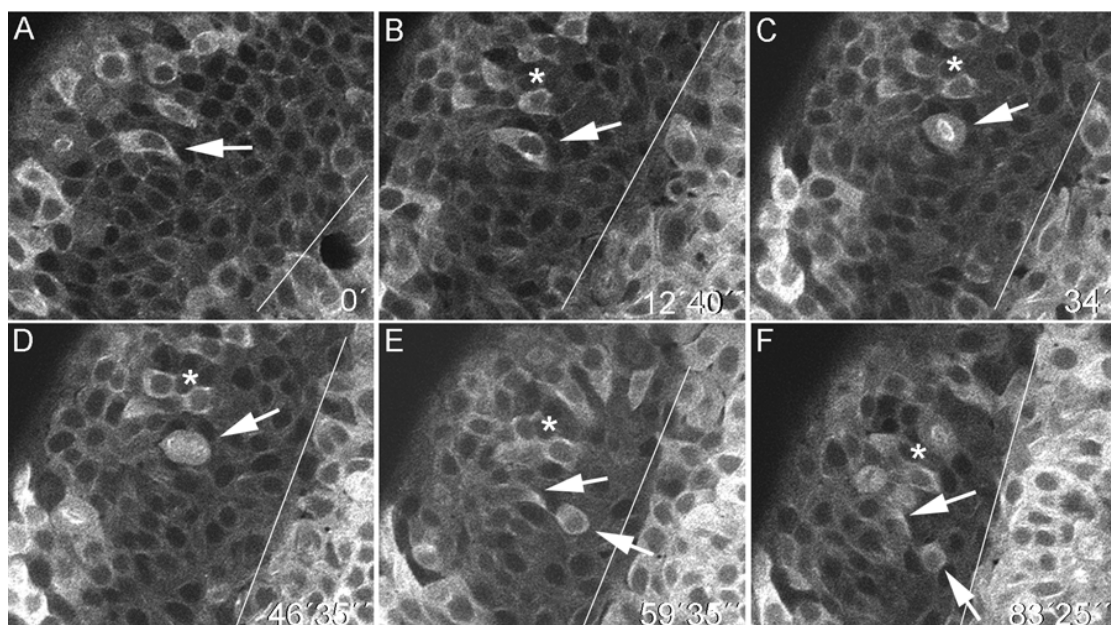


**Abb. 3.1.1-1:** Apikale Mitosen in der Neuralplatte. Die Abbildung zeigt orthogonale Schnitte (rechnergestützte Umrechnung der orthogonalen Schnitte aus 250 Einzelbildern, Abstand der orthogonalen Schnitte 60 Sekunden) durch die Neuralplatte nach Injektion von Tau:GFP mRNA bei 10 – 11 hpf. Neuroepitheliale Zellen teilen sich bevorzugt apikal und reintegrieren nach der Mitose in ihre Ursprungspalten. Bilder **A – B** zeigen die



apikale Abrundung einer Zelle (Pfeil) vor der Mitose und nach Verlust des Kontakts mit der Basalmembran. Die Zelle teilt sich daraufhin 9 Minuten später (C) und nimmt ihre Ursprungsposition wieder ein (D). Der Embryo in E – H ist etwas älter der in A – D. Eine Zelle (Pfeil) verlässt das Epithel (E– G) und teilt sich 60 Minuten später (H). not – Notochord.

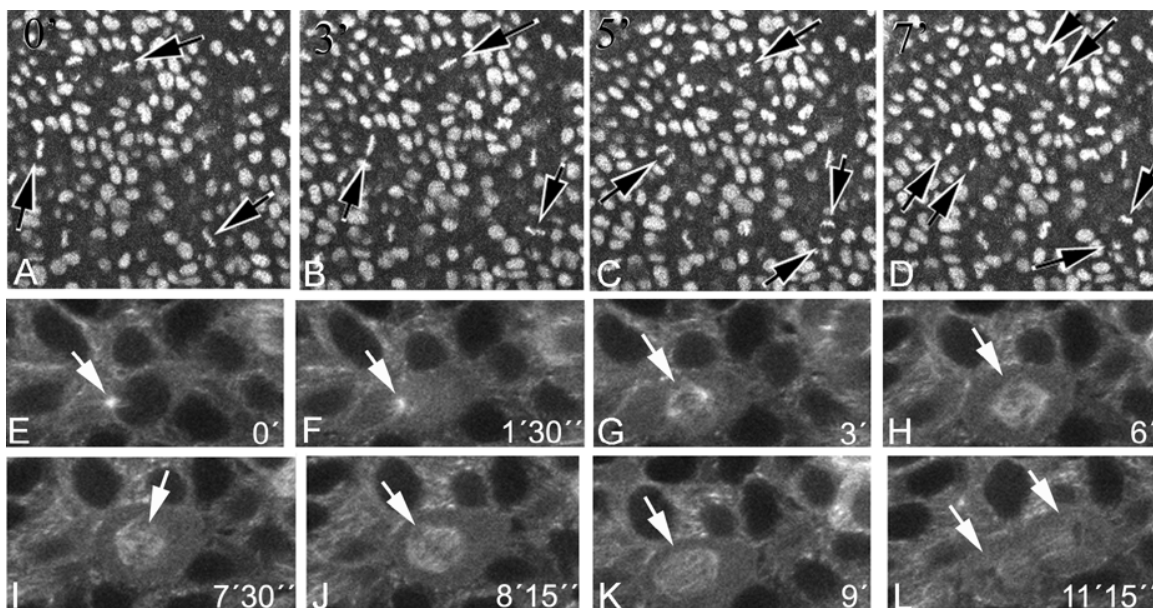
nichtmitotischen, wie auch von den mitotischen Zellen vollführt werden. Die sich in Teilung befindlichen Zellen bewegen sich mit den nichtmitotischen Zellen innerhalb des Zellverbands. Ihre Nachkommenzellen reintegrieren nach der Mitose in die Bereiche der Ursprungspositionen ihrer Vorläufer. Diese räumliche Konstanz wird auch in (Abbildung 3.1.1-1) Aufnahmen E – H deutlich.



**Abb. 3.1.1-2:** Sequenz von 6 konfokalen Aufnahmen der Neuralplatte zwischen 10 und 11 hpf aus Sicht von dorsal (nach Tau:GFP mRNA Injektion). Eine mitotischen Zelle (Pfeil) verlässt das Epithel und teilt sich apikal. Dabei entwickelt sie dünne, zur Mittellinie hin orientierte Fortsätze. Während der Konvergenzbewegungen hält die Zelle ihre relative Position zu den Nachbarzellen (Stern) ein.

### 3.1.2 Orientierung mitotischer Teilung in der Neuralplatte

Zur Beschreibung der Orientierung mitotischen Teilungen können zwei Referenzpunkte herangezogen werden: Zum einen werden in dieser Arbeit die Körperachsen und zum anderen das Neuroepithel als Bezugspunkte angesehen und verwandt. Mitosen können somit anteriorposterior, mediolateral oder dorsoventral orientiert sein. Sie könne aber auch eine planare, schräge oder senkrechte Orientierung zum Epithel besitzen. Bei der Analyse der Neuralplatte wurde ein Zeitraum vom 10 – 11 hpf gewählt. Unmittelbar nach der Bildung des 3. Somiten, bei 11 hpf, beginnt die Neuralplatte mit der Einfaltung zum Neuralkiel. Bei 10 hpf hat die Neuralplatte eine mediolaterale Ausdehnung von 150  $\mu\text{m}$ , durch Konvergenzbewegungen zur Mittellinie hin verringert sich die Ausdehnung bis 11 hpf auf 90  $\mu\text{m}$ . Während dieses Zeitraums vergrößert sich die Tiefe des Epithels von 10-15  $\mu\text{m}$  auf 25-36 $\mu\text{m}$ .



**Abb.3.1.2-1:** Mitotische Teilungen in der Neuralplatte, (A – D) in einem Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup>) / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>) transgenen Embryo und (E – L) nach Injektion von Tau:GFP mRNA. Aufnahme (A) zeigt drei Metaphaseplatten (Pfeile), die weiteren Aufnahmen, (B) 3 Minuten, (C) 5 Minuten und (D) 7 Minuten später geben Anaphase und Telophase wieder. Die Teilungsebene ist in allen Teilungen senkrecht zum Neuroepithel orientiert. (E – L) Time Lapse Aufnahmen von dorsal nach Tau :GFP Injektion (Abstand von 45 sec zw. den Bildern in der Originalsequenz). Ein Centrosom (E) ist stark markiert, teilt sich (G) und wandert zu gegenüberliegenden Polen der Zelle. Die Spindel bildet sich parallel zum Epithel (H). Nach leichten planaren Bewegungen (I – J) tritt die Zelle in die Anaphase eintritt (K). Anterior ist in den Aufnahmen immer an der oberen Seite.

Alle hier aufgeführten Längenangaben wurden durch Messungen an konfokalen Aufnahmen gewonnen. Zellen der Neuralplatte teilen sich strikt apikal, aus diesem Grund wurde eine einzelne Fokusebene zur Analyse der Mitosen ausgewählt. Insgesamt wurden 327 Mitosen aus vier unterschiedlichen Embryonen zur Auswertung herangezogen; alle zeigten eine Orientierung planar zum Neuroepithel. Abbildung 3.1.2-1 (Filme 1 und 2), Aufnahmen A - D zeigen solche planaren Teilungen in der Neuralplatte in einem H2A:GFP transgenen Embryo mit Blickrichtung von dorsal. In E-L wurde der Spindelapparat durch die Injektion von Tau:GFP sichtbar gemacht. In A sind 3 Kerne in Metaphase zu sehen, deren Spindelapparat parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist. Nach Rotation der Metaphaseplatte in Aufnahme B erfolgt die Trennung der Chromosomenpaare in C und D. Die Orientierung der Spindel kann bei Beobachtung der H2A:GFP Linie nur durch die Lage der Metaphaseplatte abgeleitet werden. Um die Spindel unmittelbar abzubilden, zeigen die Aufnahmen E – L den gleichen Vorgang wie in A-D noch einmal nach Tau:GFP Injektion. Nahezu alle Metaphaseplatten, die bei den untersuchten 327 Mitosen beobachtet werden konnten, vollführten planare Rotationen von  $10^{\circ}$ - $90^{\circ}$ . Die Rotationen stoppten erst am Ende der Metaphase, bevor die Zellen in die Anaphase eintraten (Abbildung 3.1.2-1, Aufnahmen B und C). Ähnliche Rotationen wurden in der ventrikulären Zone der sich entwickelnden zerebralen Cortex der Ratte beschrieben (Adams, 1996). Hierbei konnten allerdings Spindeldrehungen vor der Mitose von bis zu  $360^{\circ}$  gezeigt werden. Den Beobachtungen in Ratte und Zebrafisch ist gemeinsam, dass sich die Chromosomenpaare in der Anaphase ohne zusätzliche Änderungen der Spindelorientierung teilen.

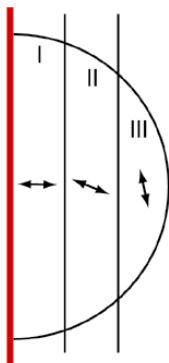
Zur statistischen Analyse wurde die Neuralplatte in drei gleichgroße Untereinheiten geteilt. Die Orientierung der Anaphase wurde dann mit Bezug auf die Mittellinie erfasst. Abbildung 3.1.2-2 soll die Aufteilung der Anlage in Auswertungseinheiten illustrieren. Während des Neuralplattenstadiums sind alle Mitosen planar, dennoch ist jede Orientierung mit Bezug auf die mediolaterale oder anteriorposteriore Achse des Epithels denkbar. Es zeigte sich in diesem Zusammenhang, dass Mitosen in der medialen Region bevorzugt mediolateral orientiert sind, mit einem Winkel von  $89,6^{\circ} \pm 35,9^{\circ}$  ( $P=0,05$ ). Innerhalb der intermediären und lateralen Regionen zeigen die Mitosen keine bevorzugte Orientierung (intermediär:  $68^{\circ} \pm 39^{\circ}$  mit  $0,27 < P < 0,7$  und lateral  $12,38^{\circ} \pm 37,94^{\circ}$  mit  $0,24 < P < 0,49$ ).

Man kann feststellen, dass Teilungen in der Neuralplatte strikt planar zur Oberfläche des Epithels verlaufen. Die Zellen der medialen Region sind dabei bevorzugt mediolateral orientiert, die Teilungen der anderen Regionen zeigen keine bevorzugte Orientierung,

**Neuralplatte** ( 10 – 11hpf )      untersuchte Mitosen N = 327  
 bei 100% planare Rotationen von 10° - 90°

Tab 3.1.2-1 Orientierung der Teilungen in der Neuralplatte:

Region der Neuralplatte	Winkel zur Mittellinie	Fehler P
<i>medial</i>	89,6° ± 35,9°	0,05
<i>intermediär</i>	68° ± 39°	0,27<P<0,7
<i>lateral</i>	12,38° ± 37,94°	0,24<P<0,49

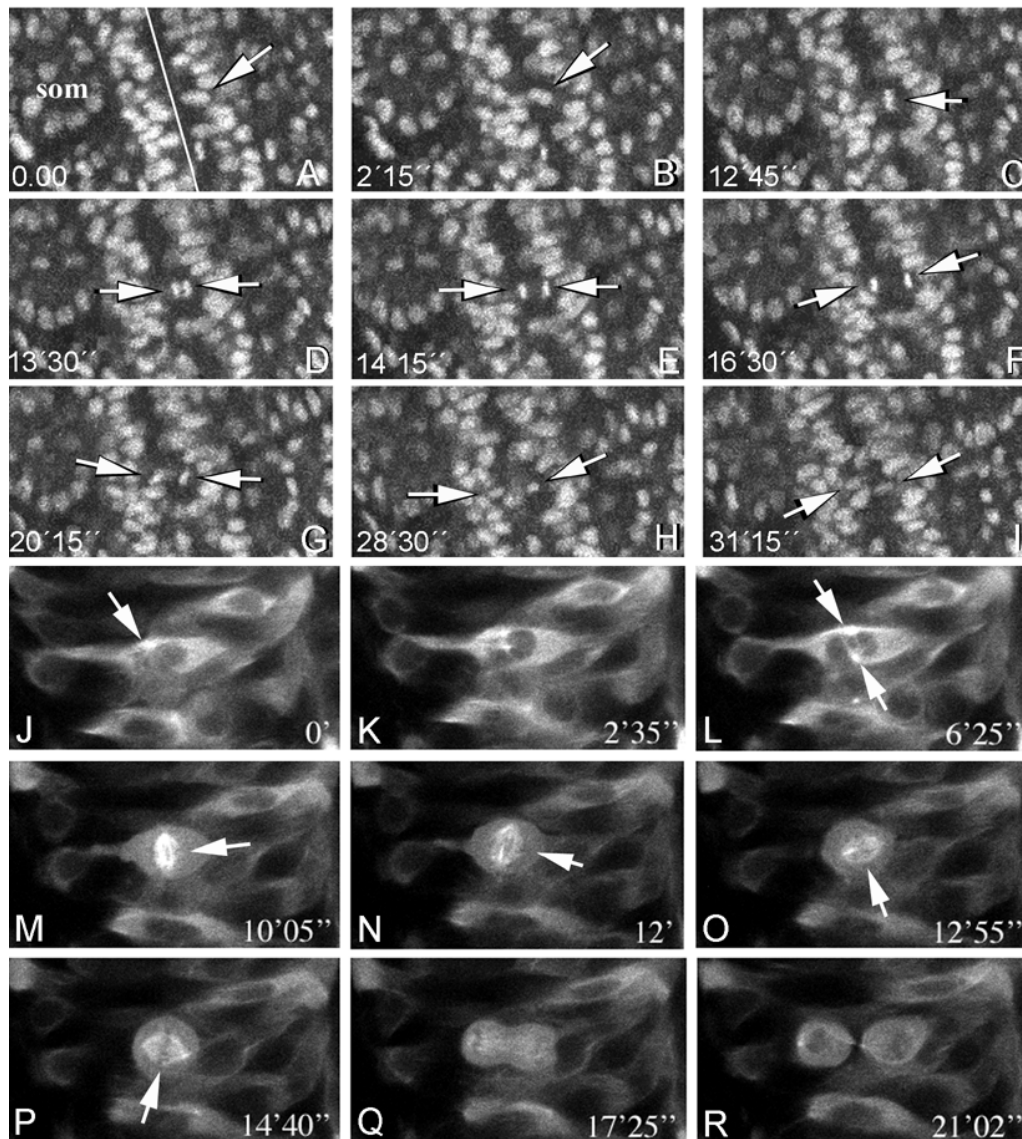


**Abb. 3.1.2-2:** Erhebung der Teilungsorientierung in der Neuralplatte. Die Mittellinie wurde markiert (rote Linie) und von dort ausgehend die mediolaterale Ausdehnung in drei gleich große Einheiten (I – medial, II – intermediär, III – lateral) geteilt. Die Orientierung der Teilungen wird in der Abbildung durch Doppelpfeile verdeutlicht.

### 3.1.3 Orientierung mitot. Teilungen während des Neuralkiels und Neuralstabs

Zur Untersuchung der Teilungsorientierung in Neuralkiel- und Neuralstab wurden Embryonen zwischen 12 – 16,5 hpf ( 6 - 15 Som. ) genutzt. Die beobachteten Mitosen waren orthogonal zur apikalen Seite des Epithels orientiert, die in diesem Stadium die Kontaktregion zwischen den beiden Seiten der neuralen Anlage darstellt. Mediolaterale Teilungen finden über die gesamt dorsoventrale Ausdehnung des Neuralkiels / Neuralstabs in vergleichbarer Anzahl statt (Abbildung 3.1.3-1, Filme 3 und 4). Beobachtete Abweichungen von einer strikt orthogonalen Ausrichtung

gehen mit Unregelmäßigkeiten des sich einfaltenden Epithels einher. Im Neuralstabs-Stadium überschritten die gemessenen Abweichungen dabei nicht  $\pm 25^\circ$ , bei einer Gesamtzahl von 291 untersuchten Mitosen.



**Abb. 3.1.3-1:** Orientierung der Teilungen in Neuralkeil und Neuralstab, (A – J) in einem Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup>) / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>) transgenen Embryo und (J – R) nach Tau:GFP Injektion. (A – J) Der Neuralstab mit umlagernden Somiten (som). Die weiße Linie (A) verdeutlicht die Position der Mittellinie, eine mitotische Zelle ist durch einen Pfeil markiert. In C, 12'45'' später, hat sich die Orientierung der Metaphaseplatte um 90° gedreht. Die Zelle teilt sich dann innerhalb der folgenden 3' 45'' (D – F). Die Tochterkerne werden in die unterschiedlichen Seiten des Neuralstabs eingebunden (G – J, Pfeile). Während der Mitosen ist die Teilungsebene parallel zum Epithel orientiert. (J – R) Mitose des Neuralstabs nach Tau:GFP mRNA Injektion. Pfeile in J und L verdeutlichen die Position der Centrosomen vor und während der Teilung. Die Spindel rotiert (M – O) und ist während der Mitose senkrecht zur Mittellinie orientiert (P – R). Anterior ist in den Aufnahmen immer an der oberen Seite.

Abbildung 3.1.3-1 A-B zeigt den Kern einer mitotischen Zelle, der sich zur Kontaktregion der beiden Hälften der neuralen Anlage an der Mittellinie bewegt, die hier durch eine Linie gekennzeichnet ist. Der Kern rundet sich apikal ab und die Metaphaseplatte bildet sich aus (Bild C). Im Folgenden trennen sich die Chromosomenpaare (D-F) und die hier durch ihre Kerne repräsentierten Nachkommenzellen reintegrieren in beide Seiten der Anlage. Nach Injektion von Tau:GFP mRNA wurden 267 Mitosen aus 4 unterschiedlichen Embryonen im Neuralkiel / Neuralstab-Stadium untersucht (Abbildung 3.1.3-1 J-R und Film 4). Es zeigte sich, dass sich die einzelnen Centrosomen der Zellen vor der Auflösung der Kernmembran teilen, und die Tochtercentrosomen dann vor der Bildung der Spindel zu gegenüberliegenden Zellpolen wandern (Abb. 3.1.3-1 J-L). In  $89,5\% \pm 3,6\%$  der beobachteten, Tau:GFP markierten Mitosen bildet sich die Spindel ungefähr ( $\pm 15^\circ$ ) parallel zur epithelialen Oberfläche. Innerhalb von 60-120 Sekunden dreht sich der gesamte Spindelapparat dann um  $90^\circ$ , um schließlich orthogonal zur Mittellinie ausgerichtet zu sein (Abb. 3.1.3-1 M-P). Die mitotischen Zellen durchlaufen danach Anaphase und Telophase mit einer mediolateral orientierten Spindel. (Abb. 3.1.3-1 Q-R). In den übrigen beobachteten Teilungen während des Kiel / Stab Stadiums bildeten sich die Spindeln bereits orthogonal oder schräg, mit Winkeln zwischen  $70^\circ$  und  $120^\circ$  zur Mittellinie. In 236 Fällen konnte die bilaterale Integration der Tochterzellkerne in den Histon:GFP transgenen Embryonen beobachtet werden (Abb 3.1.3-1 G-I). Bei den verbleibenden 55 Mitosen verließ entweder einer der Tochterkerne die Fokusebene, oder eine Bestimmung der bilateralen Verteilung war generell nicht möglich. Alle 267 sich teilende Zellen, die in Tau:GFP injizierten Embryonen gezählt wurden, produzierten bilaterale Nachkommen. In keinem Fall konnte gezeigt werden, dass sich beide Tochterkerne in die gleiche Seite des Anlage reintegrieren.

Es lässt sich somit feststellen, dass die Mehrzahl der Mitosen im Neuralkiel / Stabstadium bilateral verteilte Nachkommen erzeugen. Die Bildung der Spindel erfolgt primär parallel zum Epithel, kurz von der Mitose kommt es aber zu einer Spindeldrehung von  $90^\circ$ .

**Neuralkiel / Stab** ( 12 – 16,5 hpf )      untersuchte Mitosen 291 ( H2A:GFP Linie )  
267 ( tau:GFP mRNA Inj)

Tab 3.1.3-1 Ausrichtung der Spindel bei Mitosen in Neuralkiel / -Stab (tau:GFP mRNA injizierten Embryonen)

<b>parallel (<math>\pm 15^\circ</math>)</b>	<b>schräg (Winkel 15-75°)</b>	<b>senkrecht (<math>\pm 15^\circ</math>)</b>
89,5% $\pm$ 3,6%	10,5% $\pm$ 2,3%	-/-

Die Ausrichtung der Spindel zur Mittellinie wurde im Moment ihrer Bildung erfasst, kurz vor der Teilung drehen sich die Spindelapparate um 90° zur senkrechten Orientierung

Tab. 3.1.3-2 Bilaterale Integration in unterschiedl. Hälften des Neuralkiels / -Stabs:

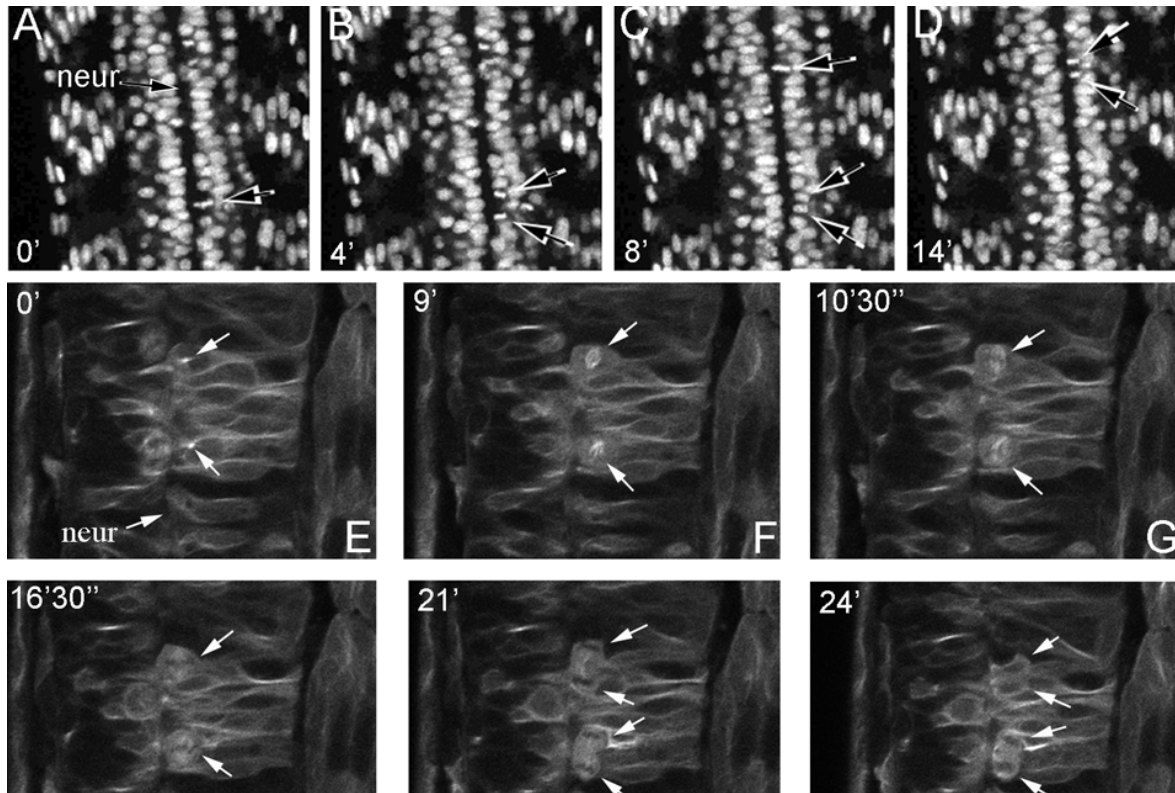
<b>tau:GFP injizierte Embryonen (n=267)</b>	<b>H2A:GFP transgene Embr. (n=291)</b>
100%	81,1%

### 3.1.4 Orientierung der Mitosen im Neuralrohr.

Im Neuralrohr-Stadium ist die Spindel stets parallel zur Fläche des Epithels, dem Ventrikel ausgerichtet, die Teilungen erfolgen strikt planar (Abb 3.1.4-1 und Film 5). Abb. 3.1.4-1 A-D zeigt solche Teilungen im Neuralrohr in einem H2A:GFP transgenen Embryo, in E-J wurde Tau:GFP mRNA zu Visualisierung des Spindelapparates injiziert. Bild A zeigt eine Zelle in der Metaphase, die Metaphaseplatte ist senkrecht zum Neurocoel orientiert. Diese Situation entspricht der in Bild G, wo der Spindelapparat einer Metaphase parallel zum Neurocoel zu sehen ist. Die Teilung geht in Ana- und Telophase über (Bilder B und H-I), danach runden sich die beiden Zellkerne wieder ab und verbleiben am Neurocoel (Bilder C, untere zwei Pfeile und J).

Zur genauen Analyse dieses Stadiums wurden 2733 Mitosen aus zwei unterschiedlichen Embryonen herangezogen. Der Bereich der Untersuchung erstreckte sich auf drei aufeinanderfolgende Neuomere über einen Zeitraum von 20 hpf bis circa 32-35 hpf hinweg. Zur Erstellung der Filme wurden die Aufnahmen von 12 Z-Ebenen über die ganze Tiefe des Neuralrohrs genutzt. Lediglich die dorsalsten

und ventralsten Regionen, die Dach- und Bodenplatte, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen.



**Abb. 3.1.4-1:** Mitotische Teilungen im Neuralrohr in einem Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup>) / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>) transgenen Embryo (A – D) und nach Injektion von Tau:GFP mRNA (E – F). In A – D (0'–14') flankieren die Somiten das Neuralrohr des Embryos. Der Pfeil in A markiert eine mitotische Zelle, deren Metaphaseplatte senkrecht zum Neurocoel (neur) ausgerichtet ist. In B, nach 4 Minuten, teilt sich die Zelle, die Tochterkerne verbleiben auf der selben Seite des Neuralrohrs (D). (E – J) Embryo nach Tau:GFP mRNA Injektion. die Centrosomen verdoppeln sich vor der Teilung (E, Pfeile) und wandern zu gegenüber liegenden Seiten der Zellen. Die Spindel bildet sich parallel zum Neurocoel (neur) (F) und die Teilung erfolgt (G – J). Anterior ist in den Aufnahmen immer an der oberen Seite.

Bei 2716 Mitosen war die Orientierung der Spindel parallel zum Ventrikel mit einer Abweichung von lediglich  $\pm 5\text{-}15^\circ$ . 17 Zellen teilten sich mit einer schrägen Teilungsebene, mit Winkeln zwischen  $15^\circ$  und  $25^\circ$ . Neben diesen 2733 Mitosen wurde eine große Zahl weiterer sich teilender Zelle über einen langen Entwicklungszeitraum verfolgt. Senkrecht zur Mittellinie orientierte Mitosen wurden dabei nicht entdeckt. Genau wie in Neuralplatte und Neuralkiel / Stab vollführten die Metaphaseplatten der beobachteten Zellen planare Rotation von bis zu  $90^\circ$ . Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Orientierung sich teilender Zellen



während des Neuralrohr-Stadiums strikt planar zum Ventrikel verläuft. In keiner der beobachteten Mitosen konnte eine senkrechte Spindel gezeigt werden.

**Neuralrohr** ( 20hpf-35hpf )

untersuchte Mitosen n = 2733

Tab. 3.1.4-1 Ausrichtung der Spindel bei Mitosen im Neuralrohr (H2A:GFP transgene Embryonen)

<b>parallel (<math>\pm 15^\circ</math>)</b>	<b>schräg (<math>15^\circ</math>-<math>75^\circ</math>)</b>	<b>senkrecht (<math>\pm 15^\circ</math>)</b>
2716 (99,38%)	17 (0,62%)	-/-

Untersucht wurde die Ausrichtung der Spindel zur Mittellinie

Tab.3.1.4-2 Wanderung von Zellkernen des Neuralrohrs in die subventrikuläre Region

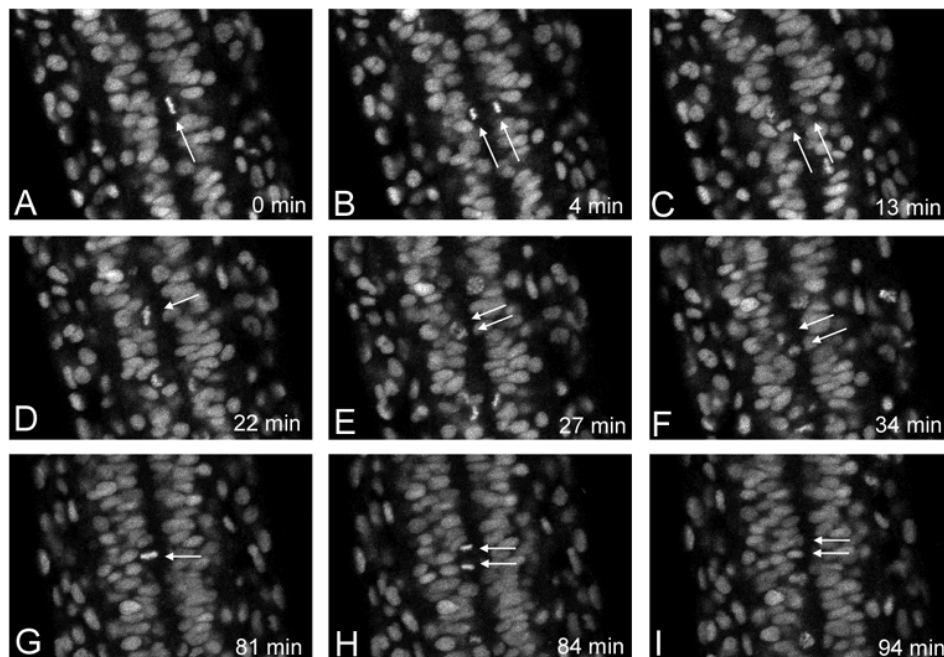
<b>Wanderung nach der Mitose</b>	<b>keine Wanderung</b>
2681 (98,1%)	52 (1,9%)

### 3.1.5 Der Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr

Durch die starken, morphologischen Veränderungen ist die kontinuierliche Beobachtung eines Embryos beim Übergang von der Neuralplatte zum Neuralkiel mit der gewählten Untersuchungsmethode nicht möglich. Der Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr kann hingegen ohne Probleme dargestellt werden (Film 6). Die Transition zwischen den unterschiedlichen Orientierungsmodi geschieht fließend, beginnend mit zur Mittellinie hin schräg ausgerichteten Mitosen im späten Neuralstab-Stadium.

Abbildung 3.1.5-1 soll den Vorgang verdeutlichen. Bild A zeigt den Metaphasekern einer Zelle, die sich in B und C mediolateral im Sinne des Neuralkiel / Stab Stadiums teilt. In D – F ist eine Zelle mit Metaphaseplatte markiert, die ihre schräge Ausrichtung auch beim Übergang in die Anaphase beibehält. Verfolgt man das Schicksal der beiden Tochterzellen, so wird deutlich, dass diese auf einer Seite der Anlage verbleiben und nicht bilateral verteilt werden. Ab einem Zeitpunkt von 16,5 hpf sind, in ventralen Regionen beginnend, mehr und mehr Teilungen planar orientiert ( Bilder G-H). Die Umorientierung der Teilungsebene setzt sich nach dorsal

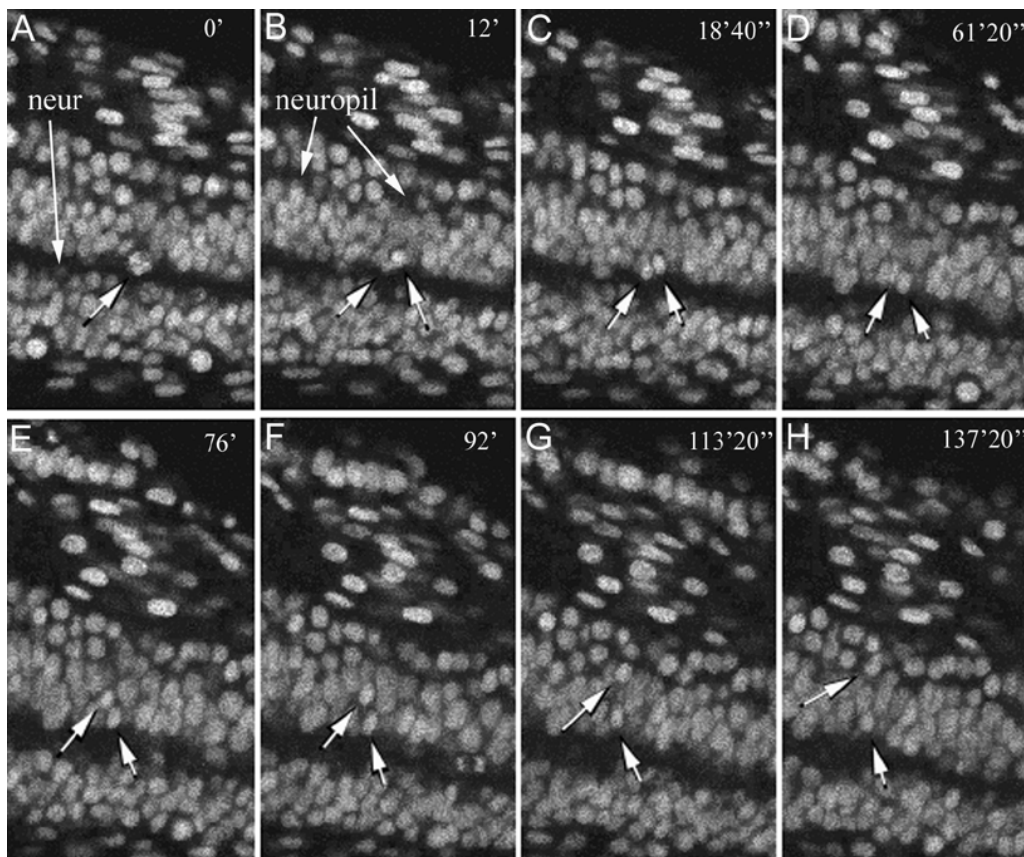
fort. Da auch die Bildung des Neurocoels von ventral nach dorsal verläuft (Schmitz et al., 1993), liegt der Schluss nahe, dass die Umorientierung eine Folge des sich bildenden Neurocoels und der Separierung der Hälften der neuralen Anlage ist. Es kann festgestellt werden, dass sich der Übergang von Neuralstab zum Neuralrohr-Stadium durch eine kontinuierlich Umorientierung der Teilungsorientierung von mediolateral nach planar zum Neurocoel auszeichnet.



**Abb. 3.1.5-1:** Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr in einem Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup>) / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>) transgenen Embryo. Die Abbildung zeigt 9 Einzelaufnahmen aus einer konfokalen Zeitrafferserie. Pfeile in **A – C** markieren eine senkrecht orientierte Mitose (**A - B**) mit bilateraler Verteilung der Tochterzellen (**C**). In **D – E** ist eine schräg orientierte Teilungsebenen zu sehen (**D**), deren Tochterkerne auf einer Seite des Stabs verbleiben (**F**). **G – H** zeigen eine Mitose, deren Metaphaseplatte senkrecht ausgerichtet ist (**G**), die Spindel ist parallel zur Mittellinie. Auch hier verbleiben die beiden Tochterkerne auf einer Seite der neuralen Anlage (**I**). Es ist festzustellen, dass der Übergang zwischen Neuralstab und Rohr nicht abrupt, sondern vielmehr fließend erfolgt, was sich in der Orientierung der Mitosen widerspiegelt.

### 3.2 Migration postmitot. Zellen in subventrikuläre Neuralrohrbereiche

Im sich entwickelnden cerebralen Cortex des Frettchens korreliert die Orientierung der Mitosen neuroepithelialer Zellen mit dem Verhalten der Tochterzellen nach der Mitose (Chenn and McConnell, 1995). Circa 15% der untersuchten Mitosen zeigten eine senkrechte Orientierung zum Neuroepithel. Damit einhergehend unterschieden sich die aus diesen Mitosen hervorgehenden Tochterzellen voneinander in ihrer späteren Lokalisation. Während die eine an der ventrikulären Oberfläche verblieb und sich dort weiter teilte, wanderte die andere Zelle in subventrikuläre Regionen (Chenn and McConnell, 1995).



**Abb. 3.2-1:** Sequenz 8 konfokaler Aufnahmen des Neuralrohrs eines Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup>) / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>) transgenen Embryos zur Illustration der Wanderung postmitotischer Zellen in subventrikuläre Regionen. In **A**, bei 0 min, ist ein mitotischer Kern am Neurocoel durch einen Pfeil markiert. Nach 12 Minuten (**B**) beginnt eine der Tochterzellen in Richtung des subventrikulären Bereichs zu wandern (weiter in **C – G**). Die Zelle tritt in **H**, nach 137 Minuten 20 Sekunden in den Bereich sich differenzierender Zellen ein, der durch eine Neuropilschicht abgetrennt ist. In den Aufnahmen ist anterior nach links orientiert.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der mitotischen Orientierung im Neuralrohr-Stadium konnten keine senkrecht angeordneten Mitosen festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden die Tochterzellen der sich planar teilenden Zellen einer weitergehenden Untersuchung unterzogen. In einigen Fällen konnten Nachkommenzellen über einen genügend langen Zeitraum verfolgt werden, um Aussagen über das spätere Zellschicksal treffen zu können. Bei 52 von ihnen wanderte eine Tochterzelle in subventrikuläre Bereich, während die andere am Neurocoel verbleibt (Film 7).

In Abbildung 3.2-1 ist die in Film 7 zu sehende Wanderung noch einmal in einigen Einzelaufnahmen zusammengefasst. Zeitpunkt 0 erfasst den Augenblick der Teilung. Die beiden Tochterzellen sind für ungefähr 1 Stunde gemeinsam am Neurocoel lokalisiert, bevor eine der beiden in die subventrikuläre Regionen wandert. Der Vorgang ist nach circa 80 Minuten abgeschlossen. Es ist wahrscheinlich, dass sich die basale Zelle in Neurone oder Gliazellen differenziert, da die subventrikuläre Region in die sie migriert ist solche Zelltypen beinhaltet. Das Neuralrohr besteht zu diesem Zeitpunkt nicht mehr ausschließlich aus der ventrikulären Schicht mitotisch aktiver Zellen, sondern auch aus weiter basal gelegenen Zellen, die sich ausdifferenzieren. Diese Lage postmitotischer Zellen ist klar durch eine Neuropilschicht vom Bereich mitotisch aktiver Zellen getrennt. Leider war es im Rahmen unsere Untersuchungen nicht möglich eine erneute Teilung einer am Neurocoel verbliebenen Zelle zu zeigen.

Die Beobachtungen zeigen aber, das die Orientierung der Spindel im Neuralrohr nicht mit dem Verhalten der Tochterzellen im sich entwickelnden Rückenmark korreliert.

### **3.3 Polaritäts- und Zellkontaktmarker**

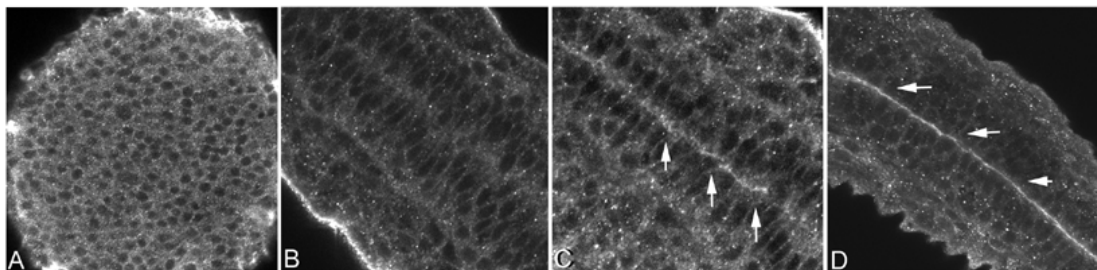
Komponenten des konservierten Par3/ASIP-aPKC Komplexes und der Zellkontakte spielen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung epithelialer Polarität und der Orientierung der mitotischen Spindel (Adams, 1996; Reinsch and Karsenti, 1994). Die dargestellte, stereotype Orientierung der Spindel während der Neurulation des Zebrafischs wirft somit die Frage auf, ob die beschriebenen Proteine auch in diesem Organismus steuernde Funktion bei der mitotischen Orientierung innehaben. Im

Rahmen der Arbeit wurde deswegen die Lokalisation der genannten Proteine in den verschiedenen Stadien der Neurulation genauer analysiert.

### 3.3.1 aPKC - eine Komponente des Par3/ASIP-aPKC Komplexes

Wie in der Einleitung dargestellt assoziiert die atypische Proteinkinase C (aPKC) mit dem Zebrafisch Bazooka Homolog ASIP und steuert in diesem Komplex die epitheliale Polarität in Vertebraten (Izumi et al., 1998; Ohno, 2001; Suzuki et al., 2001). Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die beiden aPKC Isoformen  $\lambda$  und  $\zeta$  (Horne-Badovinac et al., 2001) kann die Lokalisation der Proteine in vivo bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Mutation, die den Phänotyp der *has<sup>m129</sup>* Linie hervorruft, um eine Deletion in aPKC $\lambda$  handelt. Im Nervensystem des Zebrafischs ist lediglich aPKC $\lambda$  expremiert, Antikörperfärbungen mit dem beschriebenen Antikörper gegen beide Isoformen geben in *has<sup>m129</sup>* mutaten Embryonen kein Signal (Horne-Badovinac et al., 2001).

Die räumliche Verteilung von aPKC in Neuralplatte, Neuralkiel/Stab und Neuralrohr, ist in Abbildung 3.3.1-1 dargestellt.



**Abb. 3.3.1-1:** Vier konfokale Aufnahmen wildtypischer Aufnahmen nach Behandlung mit einem Anti-aPKC Antikörper gegen aPKC $\lambda$  und  $\zeta$ . Bild **A** zeigt die Neuralplatte 10,5 hpf von dorsal. aPKC ist in den Zellen der Neuralplatte diffus verteilt und nicht lokalisiert. (**B** – **C**) Zwei Aufnahmen des Neuralstabs bei circa 17 hpf, anterior ist nach links orientiert. Während in dorsalen Bereichen des Stabs (**B**) keine Lokalisation von aPKC festzustellen ist, beginnt diese in dorsalen Bereichen über der Bodenplatte erstmals sichtbar zu werden (Pfeile in **C**). Im Neuralrohr (**D**) ist aPKC klar apikal lokalisiert (Pfeile).

Die konfokale Aufnahme A zeigt die Neuralplatte eines 10 – 11 hpf alten Embryos im Querschnitt. Das Protein ist nicht lokalisiert, es kann keine spezifische Färbung festgestellt werden. Die Bilder B und C zeigen einen dorsalen (B) und einen ventralen (C) Schnitt durch den Neuralstab. Wie in der Neuralplatte auch, ist in dorsalen Bereichen des Stabs keine spezifische Färbung zu erkennen. Ventral dagegen zeigen sich an den apikalen Seiten der Zellen Signale der Antikörperfärbung. Es handelt sich dabei um die Region, in der die beiden Seiten des Neuralkiel/Stabs nach der Einfaltung bereits in Kontakt getreten sind. Die Intensität der Färbung steigert sich zum Neuralrohr-Stadium hin (D). Wie im Neuralstab markiert der Antikörper auch hier ein Epitop an den apikalen Polen der neuroepithelialen Zellen. Neben dem neuralen Gewebe zeigte auch die Epidermis der untersuchten Embryonen unspezifische Antikörperfärbung.

Abhängig vom Neurulationsstadium verstärkt sich die Lokalisation von aPKC. Während aPKC in der Neuralplatte entweder gar nicht oder diffus expremiert ist, ist in Neuralstab und Neuralrohr eine zunehmende Reifung der Markerkonzentration zu verzeichnen.

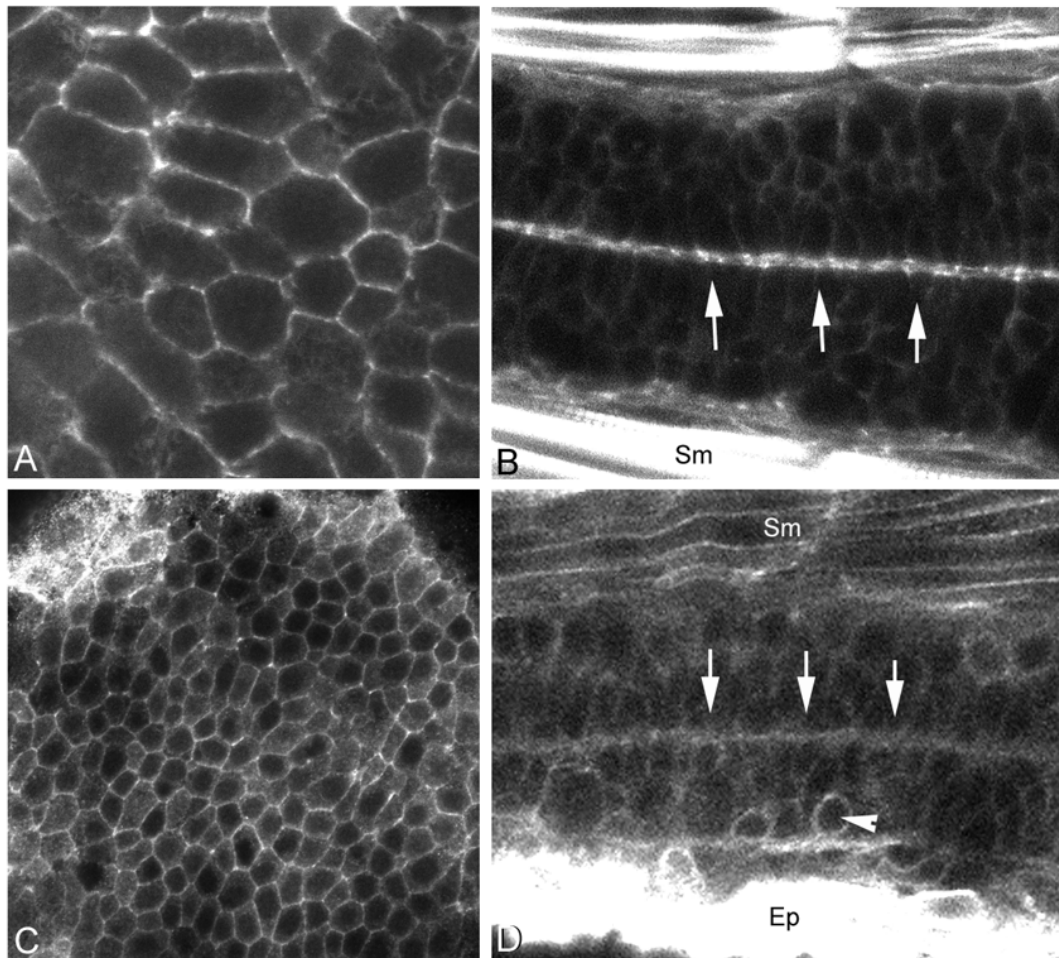
### 3.3.2 f-Actin und Phosphotyrosin; weitere Marker der apikalen Region

Neben der Lokalisierung von aPKC wurde außerdem die Verteilung weiterer apikaler Marker wie f-Actin und Phosphotyrosin (pTyr) in neuroepithelialen Zellen während der Neurulation untersucht.

Filamentöses (F) Actin ist Bestandteil des Cytoskeletts, es kann durch die Bindung von Phalloidin aus dem Pilz *Amanita phalloides* nachgewiesen werden. Im Rahmen der Arbeit wurde mit Rhodamin konjugiertes Phalloidin verwendet, dass unter Epifluoreszenz oder mit Konfokalen Methoden detektierbar ist.

Abbildung 3.3.2-1 zeigt die Lokalisierung von filamentösem Actin (A und B) sowie membranständigem Phosphotyrosin (C und D) jeweils in Neuralplatte und Neuralrohr. Bild A zeigt das Auftreten von f-Actin an den Membranen der Neuralplattenzellen. Das detektierte Epitop ist in apikalen wie basalen Bereichen gleichmäßig verteilt, es kann keine lokalisiertes Auftreten von Actinsträngen an einer bestimmten Seite der Zellen festgestellt werden. Beginnend im späten Neuralstab - Stadium wird eine apikale Lokalisation von f-Actin in den Zellen deutlich. Die Konzentration des Signals steigert sich mit dem Entwicklungsalter der neuralen

Zellen, im Neuralrohr ist f-Actin klar apikal lokalisiert. Neben der Lokalisation in neuralem Gewebe, ist in den Aufnahmen auch noch eine deutliche Konzentration von f-Actin in den Muskelfasern (Sm) der Somiten erkennbar.



**Abb. 3.3.2-1:** Die Abbildung zeigt die Lokalisation von f-Actin (**A - B**) und Phosphotyrosin (pTyr) (**C - D**) in Neuralplatte und Neuralrohr. f-Actin kann membranständig in den Zellen der Neuralplatte nachgewiesen werden (**A**), es liegt, im Gegensatz zur apikalen Lokalisation im Neuralrohr (**B**), kein gerichtetes Auftreten des Proteins vor. Im Neuralrohr ist f-Actin daneben auch noch stark in den Somiten (Sm) vertreten. Genauso wie f-Actin ist pTyr in der Neuralplatte nicht lokalisiert verteilt (**C**). Im Neuralrohr ist eine schwache, apikale Lokalisation vorhanden (**D**). Bei beiden Markern reift die Lokalisation der untersuchten Marker im Verlauf der Neurulation. In **B** und **D** ist anterior jeweils links, der Blick auf die Neuralplatte in **A** und erfolgt von dorsal.

In den Antikörperfärbungen gegen Phosphotyrosin (C-D) lässt sich eine ähnliche Lokalisation wie bei f-Actin feststellen. In der Neuralplatte (C) ist pTyr gleichmäßig an den Membranen der Zellen verteilt. Auch in diesem Fall wurden Z-Aufnahmen der gesamten Zellschicht durchgeführt, ohne dass eine örtliche Konzentration des Proteins festgestellt werden konnte. Im Neuralrohr (D) ist die apikale Lokalisation von

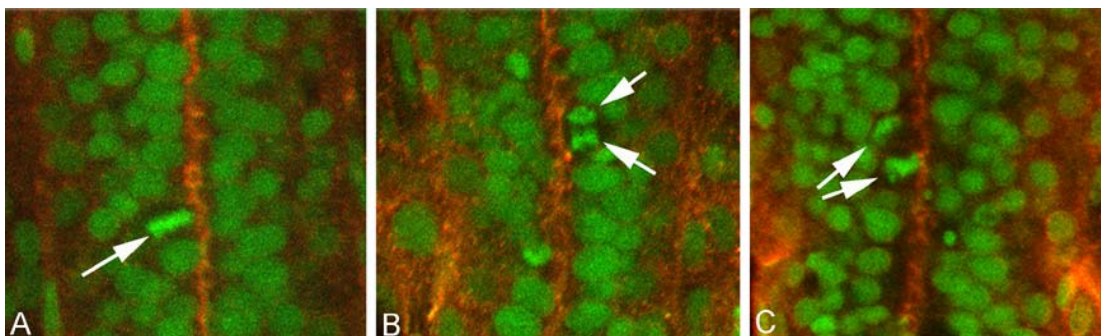
pTyr (Pfeile) zwar recht schwach, aber dennoch sichtbar. Daneben zeigen auch postmitotische, basal orientierte Zellen pTyr Färbung (Pfeilkopf), wie auch Somiten (Sm) und umhüllende Epidermis (Ep).

f-Actin und pTyr gemeinsam ist eine nichtlokalisierte, membranständige Detektierung durch die Antikörper im Neuralplattenstadium, und eine klar apikale Konzentration im Neuralrohr-Stadium. Die Konzentration der Marker reift im Laufe der Neurulation.

### 3.3.3 Die Lokalisierung von aPKC während der Mitosen

Die Expression von Polaritätsmarkern reift im Verlauf der Neurulation. Es stellte sich daraufhin die Frage, ob die apikale Lokalisation der Marker im Neuralrohr-Stadium während der Mitosen Bestand hat. Neben dem bereits beschriebenen Antikörper gegen aPKC $\lambda$  und  $\zeta$  wurde zusätzlich eine DNA-Färbung (Sytox Green) verwendet. Durch diese Kombination können aPKC Lokalisation und Chromatinstatus simultan in einer Aufnahme wiedergegeben werden.

Abbildung 3.3.3-1 zeigt das Resultat der gewählten Methode. In den Bildern B und C ist sichtbar, wie die in Aufnahme A durch Pfeile markierte Zelle die Anaphase mit der Trennung der Chromosomenpaare durchläuft. Sowohl in der vorhergehenden Metaphase, wie auch in der Anaphase und Telophase (B-C) ist die apikale Lokalisation von aPKC (rot, Kernfärbung grün) sichtbar.



**Abb. 3.3.3-1:** Aufnahmen des Neuralrohrs eines wildtypischen Embryos, in denen eine DNA Färbung (Sytox Green) mit einem anti-aPKC Antikörper gegen aPKC $\lambda$  und  $\zeta$  (rot) kombiniert wurde. Eine mitotische Zelle (Pfeile) ist in (A) Metaphase, (B) Anaphase und (C) Telophase zu sehen. Während der Mitose (B - C) bleibt die aPKC – Färbung bestehen. Die Zelle verliert ihre Polarität während der Teilung nicht. (Anterior ist jeweils oben)



Die fest etablierte Polarität der neuroepithelialen Zellen bleibt während der Mitosen im Neuralrohr Stadium bestehen, die apikale Lokalisation von aPKC geht nicht verloren.

### 3.3.4 Spindelorientierung in der aPKC – Mutante *heart and soul*

In delaminierenden Neuroblasten von *Drosophila melanogaster* steuert Bazooka, zusammen mit anderen Proteinen, die Ausrichtung der mitotischen Spindel (Schober et al., 1999; Wodarz, 2001). Ähnlich agiert Bazooka gemeinsam mit Inscutable und Pins bei der Spindelorientierung in der Zelllinie der sensorischen Borsten (Le Borgne et al., 2002). Es stellte sich die Frage, ob der Bazooka/ASIP-aPKC Komplex auch im Zebrafisch ein steuernde Wirkung auf die Orientierung der Spindel besitzt. Zur Beantwortung der Frage wurde die transgene Linie H2A:GFP (Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup> / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>)) in die aPKC Zebrafisch Mutante *heart and soul* (*has*) eingekreuzt, die eine durch Deletion inaktive atypische Kinase expremiert. Mit *has* homozygoten Embryonen wurden dann „Zeitraffer“ - Filme ab einem Entwicklungsstadium von circa 26 hpf hergestellt.

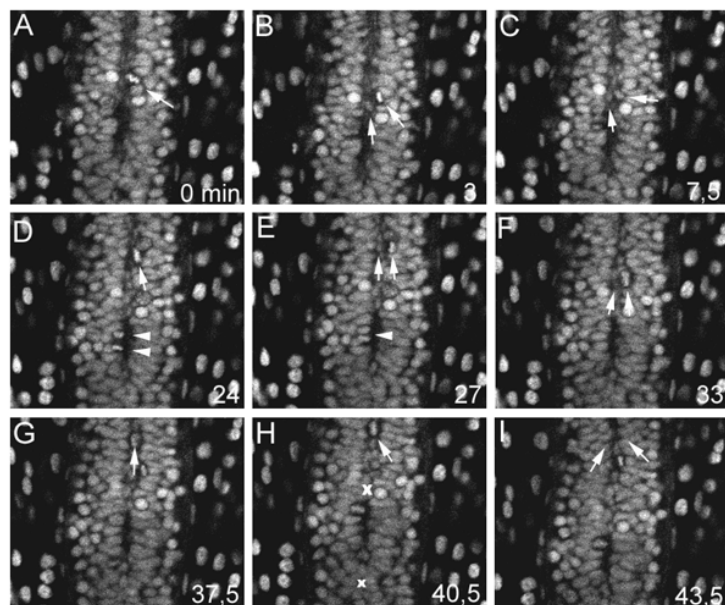


Abb. 3.3.4-1: 9 konfokale Aufnahmen des Neuralrohrs eines *has*<sup>m129</sup> homozygoten und Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca37</sup>) / Tg(H2A F/Z:GFP<sup>kca66</sup>) transgenen Embryos. Mit Pfeilen markiert sind die unterschiedlichen, auftretenden Teilungsmodi. Die Bilder **A – C** zeigen eine schräg orientierte Mitose (**A**), deren Tochterkerne (**C**) auf einer Seite des Neuralrohrs verbleiben. In **D – I** sind senkrechte Teilungen mit Pfeilen markiert, deren Tochterzellen bilateral verteilt werden (**F - I**). **D** und **E** zeigen eine parallel zum Neuroepithel orientierte

Mitose (Pfeilspitzen). Neben wildtypisch aussehenden Bereichen zeigt das Neuralrohr auch Region, in denen die beiden Hälften der Anlage fusioniert sind (H, markiert durch x). Die Orientierung der Mitosen in *has* homozygoten Embryonen ist, verglichen mit dem Wildtyp, beeinträchtigt.

Abbildung 3.3.4-1 zeigt einige ausgewählte Teilungen eines solchen Films. In Bild A deutet ein Pfeil auf die Metaphaseplatte einer mitotischen Zelle. Die Metaphaseplatte rotiert, und teilt sich dann in B schräg zum Ventrikel. Die beiden Tochterkerne (C) verbleiben auf einer Seite des Neuralrohrs. Abbildungen D – G zeigen, durch Pfeile markiert, eine senkrechte Mitose. In diesem Fall ist es nicht möglich genau zu bestimmen, ob beide Tochterkerne auf einer Seite des Neuralrohrs verbleiben, oder beide bilateral verteilt werden. In den meisten Mitosen, in denen senkrechte Orientierungen des Spindelapparats beobachtet werden konnten, verbleiben beide Nachkommenzellen auf einer Seite des Neuralrohrs. Die Bilder D und E zeigen, markiert durch Pfeilspitzen, eine planare Teilung. H und I verdeutlichen dagegen eine senkrechte bis leicht schräg orientierte Mitose.

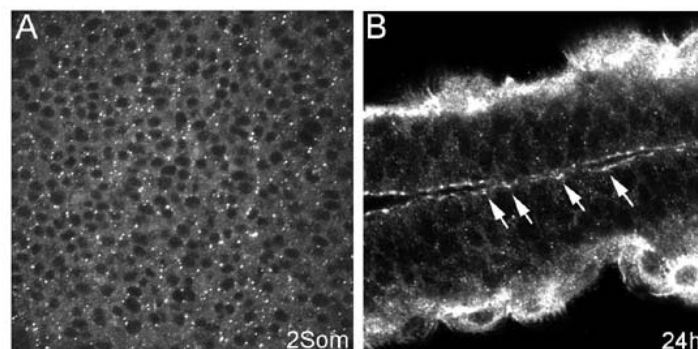
Ab 26 hpf können *has* homozygote Embryonen von wildtypischen Embryonen unterschieden werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Morphologie des Neuralrohrs der untersuchten Homozygoten noch weitgehend unauffällig. Im weiteren Verlauf der Entwicklung aber zeigen sich markante Störungen. Im Bild H sind zwei Bereiche des Neuralrohrs mit x markiert, in denen der Status des Neurocoels nicht dem Entwicklungsalter entspricht. Die beiden Hälften der Anlage sind fusioniert und optisch nicht von einander trennbar. In der Region zwischen den beiden markierten und undifferenzierten Bereichen (H) umlagern neuroepitheliale Zellen ein partielles Neurocoel.

Die Orientierung von mitotischen Teilungen in *has* homozygoten Embryonen wurde statistisch an einer Gesamtzahl von 750 Teilungen des Neuralrohr-Stadiums ausgewertet. In 603 Fällen (80,4%) waren die Teilungen planar zur neuroepithelialen Oberfläche. 68 Teilungen (9,1%) zeigten einen schräge (bis zu 45°) Ausrichtung, 79 Mitosen (10,5%) waren senkrecht (60° - 90°) orientiert.

In homozygoten Embryonen der aPKC Mutante *has* ist die mitotische Spindel bei einem gewissen Prozentsatz misorientiert, circa 80% der Teilungen zeigen eine planare Ausrichtung der Spindel.

### 3.3.5 ZO1 als Tight Junction Marker

Neben den Komponenten des Par3/Bazooka/ASIP Komplexes haben auch die Zellkontaktkomplexe eine steuernde Wirkung bei der Orientierung der mitotischen Spindel in *Drosophila* (Knust and Bossinger, 2002; Le Borgne et al., 2002). Im Rahmen der Arbeit wurde deswegen das Auftreten von Zellkontaktkomponenten während der Neurulation untersucht. Zuerst wird nun die Lokalisation von ZO1 als Tight Junction Komponente dargestellt werden. Abbildung 3.3.5-1 zeigt ZO1 in Immunfluoreszenzaufnahmen der Neuralplatte bei 10,5 hpf und im Neuralrohr bei 24 hpf. Bild A zeigt die Neuralplatte von dorsal. ZO1 ist diffus verteilt, eine spezifische Lokalisation ist nicht erkennbar. Im Neuralrohr dagegen ( Bild B, Embryo bei 24 hpf ) ist eine klar apikale Lokalisation des Epitops sichtbar, die im Bild durch Pfeile markiert ist. Bei der abgebildeten Region handelt es sich um den Bereich der ersten zwei Somiten. Neben der Expression in neuralem Gewebe ist im Bild auch noch eine starke Färbung in der umhüllenden Epidermis zu erkennen.

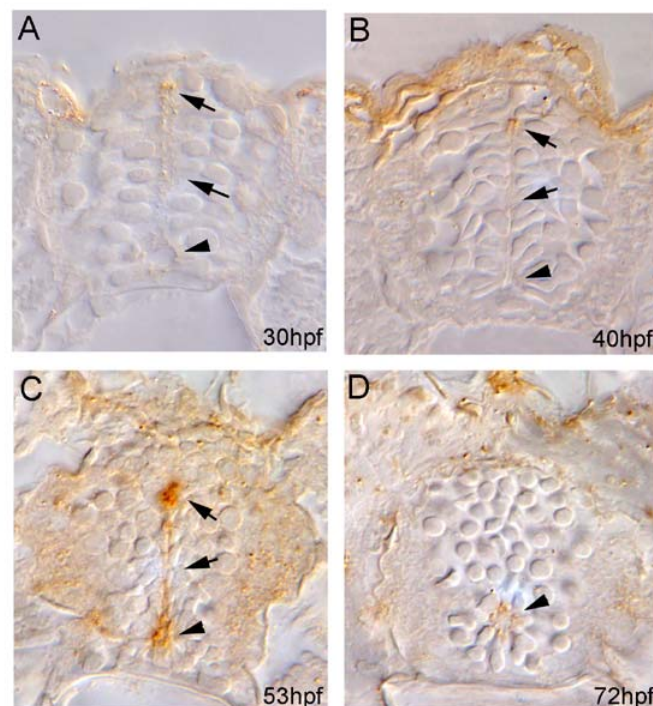


**Abb. 3.3.5-1:** Verteilung von ZO1 in Neuralplatte und Neuralrohr. Von wildtypischen Embryonen wurden konfokale Aufnahmen, nach Behandlung mit einem anti ZO1 Antikörper hergestellt. (A) zeigt die Neuralplatte eines 10,5 hpf alten Embryos (2 Som) von dorsal. Das Epitop ist diffus an den Membranen der Zellen verteilt. Im Neuralrohr eines 24 hpf alten Embryos (B) ist ZO1 (Pfeile) an den apikalen Seiten der Neuroepithelialen Zellen lokalisiert. ZO1 bildet einen Ring um die Zellen, wodurch im konfokalen Schnitt zwei Lokalisationspunkte pro Zelle erkennbar sind. Die anteriore Seite ist in Aufnahme B nach links orientiert.

An Hand älterer Stadien des Neuralrohrs wurde nun die Entwicklung der ZO1 Lokalisation untersucht.

Abbildung 3.3.5-2 zeigt die ZO1 Lokalisation in wildtypischen Embryonen von 30 – 72 hpf. In A bis C markieren Pfeile jeweils das ZO1 Signal an der apikalen Seite der

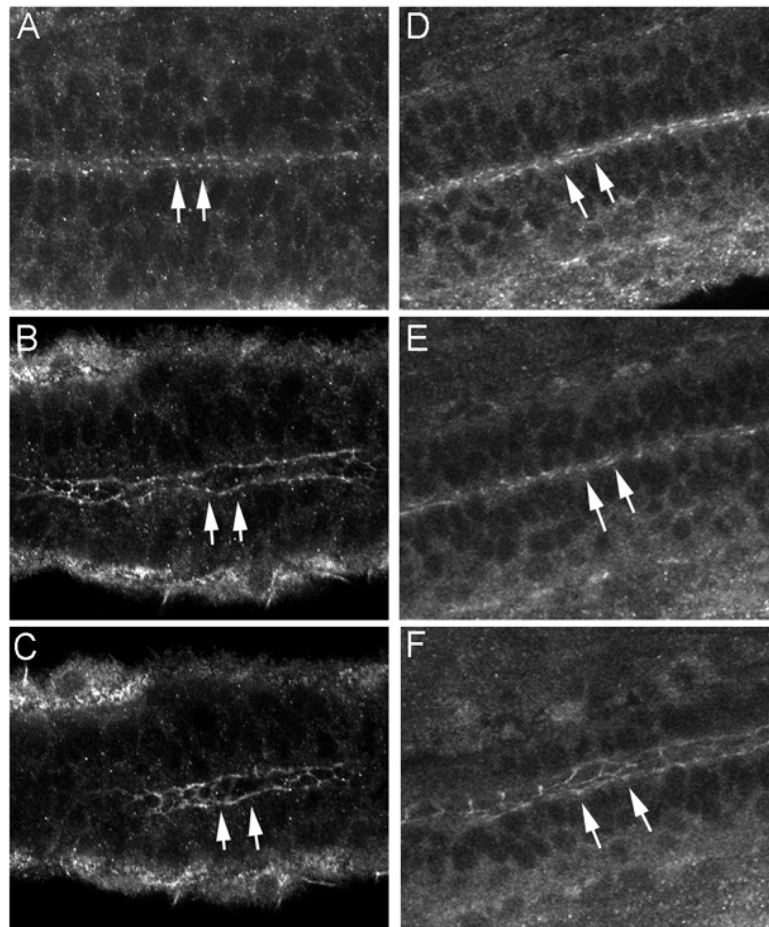
neuroepithelialen Zellen. Für die Aufnahmen wurden mit einem Microtom 5  $\mu$ m dicke Querschnitte des Neuralrohrs nach einer ZO1 Antikörperfärbung hergestellt. Das ZO1 Protein zieht sich in Form eines Ringes um die apikale Seite der Zellen. Aus diesem Grunde können jeder Zelle im Querschnitt zwei Lokalisationspunkte zugeordnet werden. Bis zu einem Alter von 53 hpf ist ZO1 über die ganze Ausdehnung des Neuralrohrs hinweg sichtbar. Besonders starke Färbungen zeigen während dieses Zeitraum die dorsalen Bereiche und die Region über der Bodenplatte, in der das Neurocoel seine größte Ausdehnung aufweist.



**Abb. 3.3.5-2:** Dorsoventrale Verteilung von ZO1 im Neuralrohr wildtypischer Embryonen. Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden 5  $\mu$ m dicke Schnitte nach Behandlung mit einem anti-ZO1 Antikörper erstellt. Die Position der ZO1 Lokalisation ist jeweils durch Pfeile, im Bereich der Bodenplatte durch Pfeilspitzen markiert. In **A – C** (30, 40 und 53 hpf) ist ZO1 von dorsal nach ventral gleichmäßig an den apikalen Seiten der Zellen verteilt. Bei 72 hpf (**D**) ist ZO1 nur noch über der Bodenplatte um das stark erweiterte Neurocoel sichtbar (Pfeilspitze).

Dieser ventrale Bereich ist in den Bildern A – D durch Pfeilspitzen markiert. Ab 53 hpf beschränkt sich die ZO1 Lokalisation auf ventrale Bereiche des Neuralrohrs, wie es in Bild D bei einem 72 hpf alten Embryo zu sehen ist. Die Pfeilspitze deutet in Bild D, wie in A – C, auf die Region über der Bodenplatte.

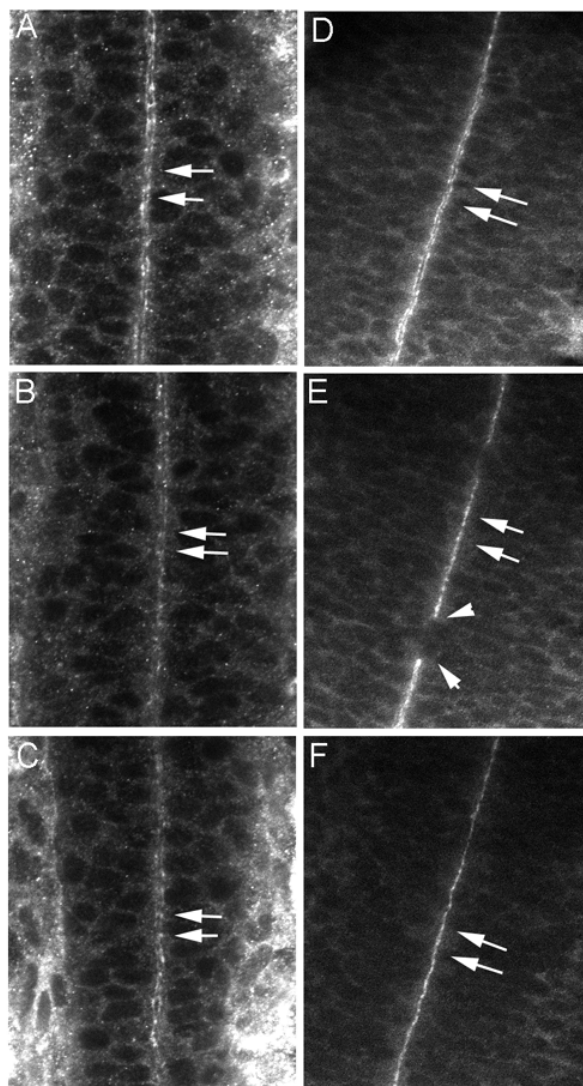
Um zu überprüfen, ob sich eine Störung des ASIP – aPKC Komplexes auf die Entwicklung der Zellkontakte auswirkt, wurde die Lokalisation von ZO1 im Wildtyp mit derjenigen in der aPKC Mutante *has* untersucht. Abbildung 3.3.5-3 zeigt Aufnahmen eines wildtypischen (A – C) und eines *has* homozygoten Embryos (D – E) jeweils von dorsal. Von jedem Embryo wurde dabei eine Aufnahme des dorsalen, des medialen und des ventralen Bereichs des Neuralrohrs angefertigt.



**Abb. 3.3.5-3:** Konfokale Aufnahmen der Lokalisation von ZO1 im Neuralrohr eines wildtypischen Embryos (A – C) und eines *has*<sup>m129</sup> homozygoten Embryos (D – F) bei 26 hpf. Die Abbildung zeigt für Wildtyp und Mutante jeweils ein Bild (von oben nach unten) der dorsalen, medialen und ventralen Region des Neuralrohrs. Dieses gilt genauso für die im weiteren folgenden Aufnahmen bei 30, 48 und 72 hpf. Im Wildtyp (A – C) ist ZO1 durchgehend von dorsal (A) nach ventral (C) apikal (Pfeile) lokalisiert. Das gleiche gilt für die Mutante (D – F). Hier sind keine Störungen des ZO1 Musters zu erkennen. Anterior ist in den Aufnahmen jeweils links

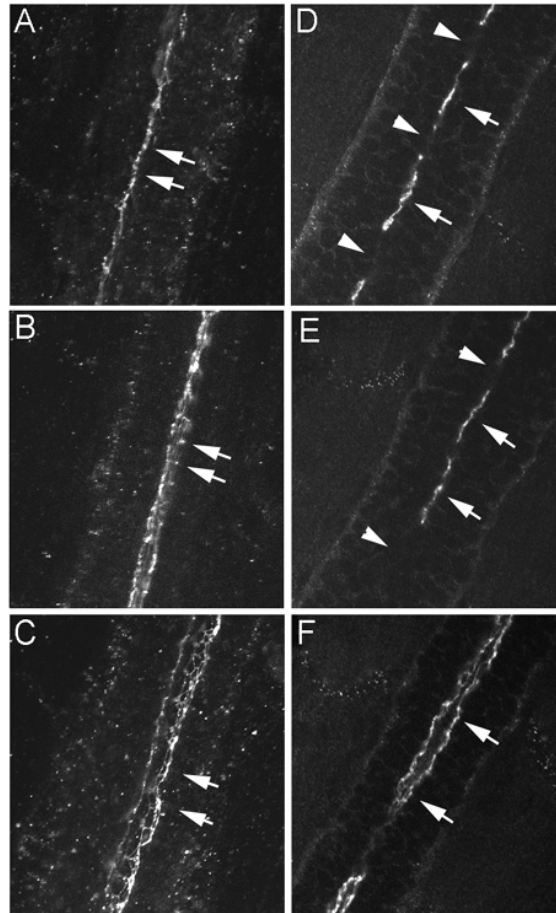
Genauso wurde auch bei den Aufnahmen der 30, 48 und 72 hpf alten Embryonen verfahren. ZO1 ist in beiden Embryonen an der apikalen Seite der neuroepithelialen Zellen lokalisiert. Bei 26 hpf unterscheidet sich die Mutante bei Betrachtung von ZO1

nicht vom wildtypischen Embryo. Ab einem Zeitpunkt von 30 hpf dagegen (Abbildung 3.3.5-4) zeigen sich Unterschiede beim Vergleich der ZO1 Lokalisation im Wildtyp ( A – C ) und in der *has* Mutante ( D – F ). Während ZO1 im wildtypischen Embryo von dorsal nach ventral weiterhin apikal lokalisiert ist, treten in der Mutante Bereiche an der Mittellinie des Neuralrohrs auf, in denen keine ZO1 Färbung nachweisbar ist ( in den Aufnahmen durch Pfeilspitzen markiert ). Während solche Bereiche ohne ZO1 Lokalisation bei 30 hpf noch relativ selten sind, ist ihr Auftreten bei 48 hpf in der Mutante ( Abbildung 3.3.5–5, Bilder D - F ) regelmäßig zu beobachten.



**Abb. 3.3.5-4:** Konfokale Aufnahmen der ZO1 Lokalisation in Wildtyp und *has* Mutante bei 30 hpf. Im Wildtyp (A – C) ist ZO1 von dorsal nach ventral gleichmäßig apikal verteilt (Pfeile). In der *has* Mutante ist die Lokalisation in dorsalen Bereichen (D) gleichmäßig apikal, im medialen Bereich (E) treten Unterbrechungen der Lokalisation auf (Pfeilspitzen). Im ventralen Bereich über der Bodenplatte (F) ist ZO1 wiederum

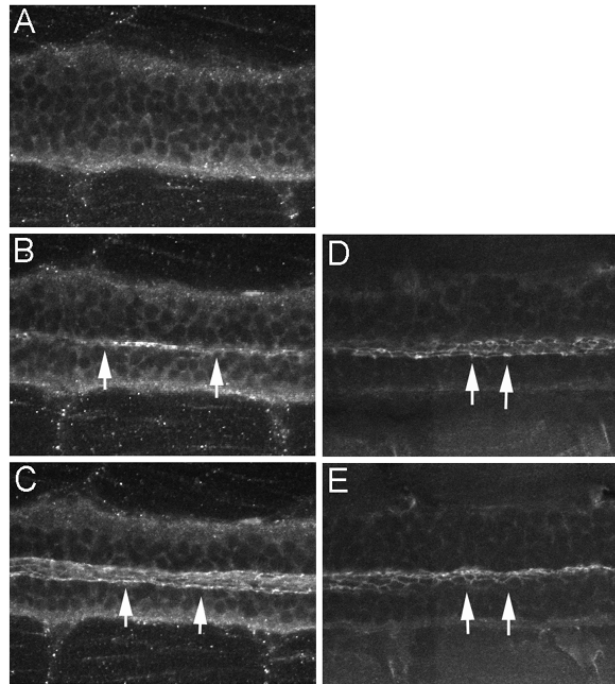
gleichmäßig apikal lokalisiert. Die Mutation in der *aPKC* hat somit bei 30 hpf Auswirkungen auf die ZO1 Lokalisation. In **A – C** ist anterior nach oben, in **D – F** nach schräg rechts orientiert.



**Abb. 3.3.5-5:** Konfokale Aufnahmen der ZO1 Lokalisation bei 48 hpf in Wildtyp und *has* Mutante. Im Wildtyp ( **A – C** ) ist ZO1 von dorsal nach ventral gleichmäßig apikal lokalisiert. In der Mutante zeigen sich auf allen Ebenen des Neuralrohrs ( **D – F** ) Unterbrechungen ( Pfeilspitzen ) der apikalen ZO1 Lokalisation ( Pfeile ). In diesem Fall ist eine solche Unterbrechung auch ventral ( **F** ) über der Bodenplatte sichtbar. In den Aufnahmen ist anterior stets schräg rechts oben.

Bild D zeigt das Neuralrohr im dorsalen Bereich. Regionen mit apikaler ZO1 Lokalisation (Pfeile) werden kontinuierlich durch Bereiche ohne Färbung unterbrochen. Gleichzeitig ist die Morphologie des Neuralrohrs grundsätzlich gestört. Unter Normarskibedingungen lassen sich Bereiche bestimmen, in denen die beiden Hälften des Neuralrohrs fusioniert zu sein scheinen. Innerhalb dieser Regionen ohne sichtbares Neurocoel lässt sich keine ZO1 Färbung feststellen. Dieser Zusammenhang zwischen Bereichen ohne sichtbares Neurocoel und dem Fehlen der

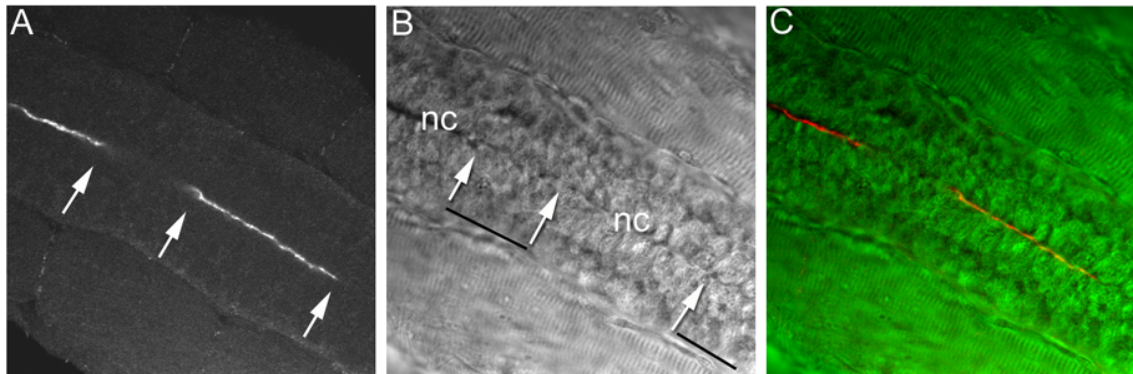
Zo1 Färbung ist in Abbildung 3.3.5 ZO1 Korrelation in einer Kombination von Durchlichtbild und konfokaler Aufnahme dargestellt. Bild A zeigt die Unterbrechungen der apikalen ZO1 Lokalisation, markiert durch Pfeile, in Bild B deuten die Pfeile auf die Endpunkte der fusionierten Hälften des Neuralrohrs hin.



**Abb. 3.3.5 -6:** Konfokale Aufnahmen der ZO1 Lokalisation in Wildtyp (**A – C**) und *has* Mutante (**D – E**) bei 72 hpf. Im dorsalen Bereich des Neuralrohrs im Wildtyp (**A**) ist bei 72 hpf keine lokalisierte ZO1 – Färbung zu erkennen. Im ventralen Bereich dagegen (**B – C**, Pfeile) ist ZO1 apikal in den Zellen des Neuroepithels lokalisiert. Im Neuralrohr des *has* homozygoten Embryo ist ZO1 ebenfalls nur ventral lokalisiert (**D - E**, Pfeile), dorsal ist keine Färbung sichtbar (hier nicht gezeigt). In den Aufnahmen der Abbildung ist anterior steht nach links orientiert.

Bild C zeigt die Überlagerung der beiden Aufnahmen. Es zeigt sich, dass Bereiche des Neuralrohrs, in denen die beiden Hälften der Anlage fusioniert sind, keine ZO1 Färbung mehr aufweisen. Bei 72hpf (Abbildung 3.3.5-6) ist in dorsalen Bereichen des Wildtyps keine ZO1 Lokalisation zu erkennen (Bild A), die Färbung beschränkt sich auf ventrale Bereiche (C – D). In der *has* Mutante (D – E) ist dorsal ebenfalls keine Färbung zu erkennen, in ventralen Regionen des Neuralrohrs ist ZO1 apikal lokalisiert.





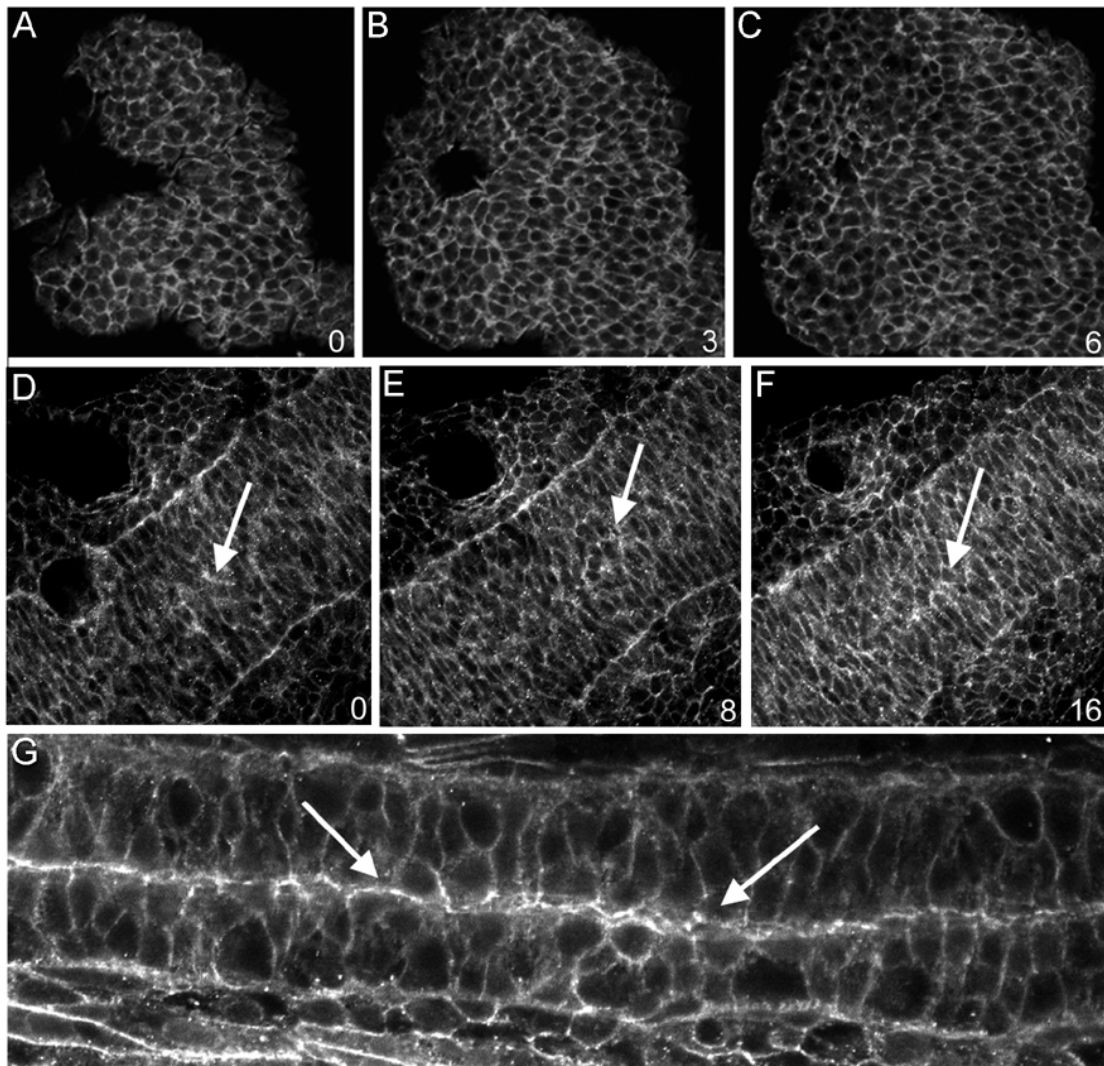
**Abb. 3.3.5-7:** Die Aufnahmen zeigen in einer Überlagerung (C) den Zusammenhang zwischen der Fusion der Neuralrohrhälften und der Unterbrechung der ZO1 Lokalisation. Pfeile markieren in A die Bereiche, in denen eine ZO1 Lokalisation nicht beobachtet werden kann. Im Durchlichtbild B sind die fusionierten Bereiche als diejenigen markiert (Pfeile und schwarze Linien), die kein Neurocoel (nc) aufweisen. In der Überlagerung der beiden Kanäle (C) wird deutlich, dass diese fusionierten Bereiche keine ZO1 Lokalisation aufweisen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die apikale ZO1 Lokalisation im Wildtypen bis 53hpf in der gesamten dorsoventralen Ausdehnung des Neuralrohrs zu sehen ist, und sich danach auf ventrale Bereiche über der Bodenplatte beschränkt. In der *has* Mutante sind Regionen der Mittellinie ohne ZO1 Färbung sichtbar, die sich mit zunehmendem Entwicklungsalter bis 48 hpf ausweiten. Bei 72 hpf lässt die in ventralen Bereichen des Neuralrohrs noch vorhandene ZO1 Färbung keine Unterschiede zum Wildtypen erkennen.

### 3.3.6 $\beta$ -Catenin als Adherens Junction Marker

Neben ZO1 als Tight Junction Komponente wurde im Rahmen der Arbeit  $\beta$ -Catenin als Marker der Adherens Junctions verwendet. Abbildung 3.3.6-1 gibt einen Überblick über die Verteilung von  $\beta$ -Catenin in Neuralplatte (A – C), Neuralkiel/ Stab (D – F) und Neuralrohr (G).  $\beta$ -Catenin ist in der Neuralplatte diffus an den Zellmembranen verteilt (A – C), die Untersuchung unterschiedlicher Z-Ebenen der Zellschicht zeigt keine spezielle Lokalisation des Proteins. Ab dem Neuralstab Stadium wird in ventralen Bereichen der Neuralen Anlage eine erste apikale Lokalisation deutlich (E),

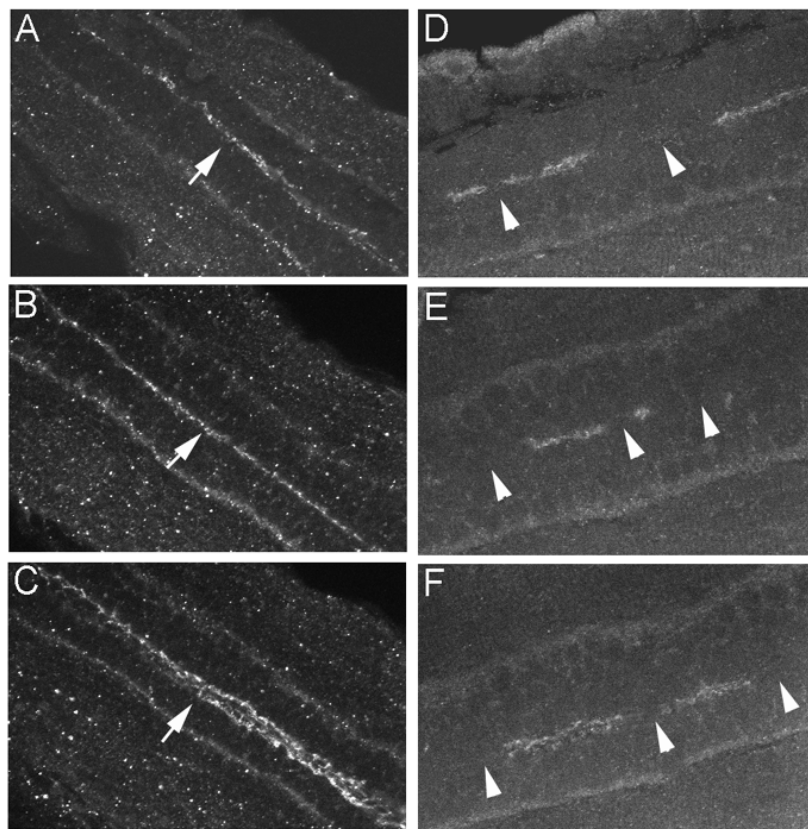
die sich im weiteren Verlauf der Neurulation verstärkt (E – F). Im Neuralrohr, nach Bildung des Neurocoels ist  $\beta$ -Catenin klar apikal an der Mittellinie lokalisiert (G).



**Abb. 3.3.6-1:** Überblick über die  $\beta$ -Catenin Lokalisation in Neuralplatte (A – C), Neuralstab (D – F) und Neuralrohr (G). A – C zeigen konfokale Aufnahmen der Neuralplatte bei 10,5 – 11 hpf (2 – 3 Som.).  $\beta$ -Catenin ist diffus an den Zellmembranen sichtbar, zeigt aber keine dorsoventrale Lokalisation in den neuroepithelialen Zellen. In ventralen Bereichen des Neuralstabs (Pfeile, 16 – 17 hpf) wird eine erste Lokalisation des Proteins deutlich. Die Angaben in den Bildern A – F beziehen sich jeweils auf Focusschritte in  $\mu\text{m}$ . Im Neuralrohr (G) ist  $\beta$ -Catenin besonders stark apikal an der Mittellinie lokalisiert (Pfeile).

*Has* homozygoten Embryonen zeigen in weiten Bereichen des Neuralrohrs keine ZO1 Färbung. Um zu überprüfen, ob die Abwesenheit einer funktionellen aPKC auch Auswirkungen auf die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin hat, wurde die Verteilung des Proteins in *has* homozygoten Embryonen untersucht. In Abbildung 3.3.6-2 wurden

Immunofluoreszenzbilder von  $\beta$ -Catenin Antikörperfärbungen eines 48 hpf alten, wildtypischen Embryos (A – C) einer Färbung an einem 35 hpf alten, *has* homozygoten Embryo (D – F) gegenübergestellt. Im Wildtypen ist  $\beta$ -Catenin durchgängig von dorsal nach ventral apikal am Ventrikel lokalisiert (A – C, markiert durch Pfeile). In der *has* Mutante dagegen zeigt die apikale Lokalisation von  $\beta$ -Catenin deutliche Lücken (D – F, markiert durch Pfeilspitzen). Die Unterbrechungen sind in allen Bereichen des Neuralrohrs sichtbar und kommen dorsal (D), wie medial (E) und ventral (F) vor.



**Abb. 3.3.6-2:** Lokalisation von  $\beta$ -Catenin in Wildtyp und *has* Mutante. Die Konfokalen Aufnahmen nach Behandlung mit einem anti  $\beta$ -Catenin Antikörper zeigen dorsale, mediale und ventrale Bereiche eines wildtypischen (A – C) und *has*<sup>m129</sup> mutanten (D – E) Neuralrohrs. Im Wildtyp ist  $\beta$ -Catenin in allen Bereichen des Neuralrohrs apikal am Neuroepithel lokalisiert (A – C, Pfeile). Im homozygot mutanten Embryo dagegen zeigen sich entlang der dorsoventralen Achse Unterbrechungen der Lokalisation (D – E, Pfeilspitzen). Diese gilt auch für den Bereich über der Bodenplatte (F). Anterior ist in den Aufnahmen A – C links oben, in D – F links unten.

$\beta$ -Catenin ist in der Neuralplatte diffus an den Zellmembranen verteilt, die apikale Lokalisation reift vom Neuralstab Stadium an. In der Neuralplatte ist  $\beta$ -Catenin klar apikal am Ventrikel lokalisiert. In *has* homozygoten Embryonen zeigt die  $\beta$ -Catenin Verteilung am Ventrikel deutliche Lücken, die in allen dorsoventralen Bereichen des Neuralrohrs zu finden sind.

### 3.4 Die Ultrastruktur von Zellkontaktkomplexen

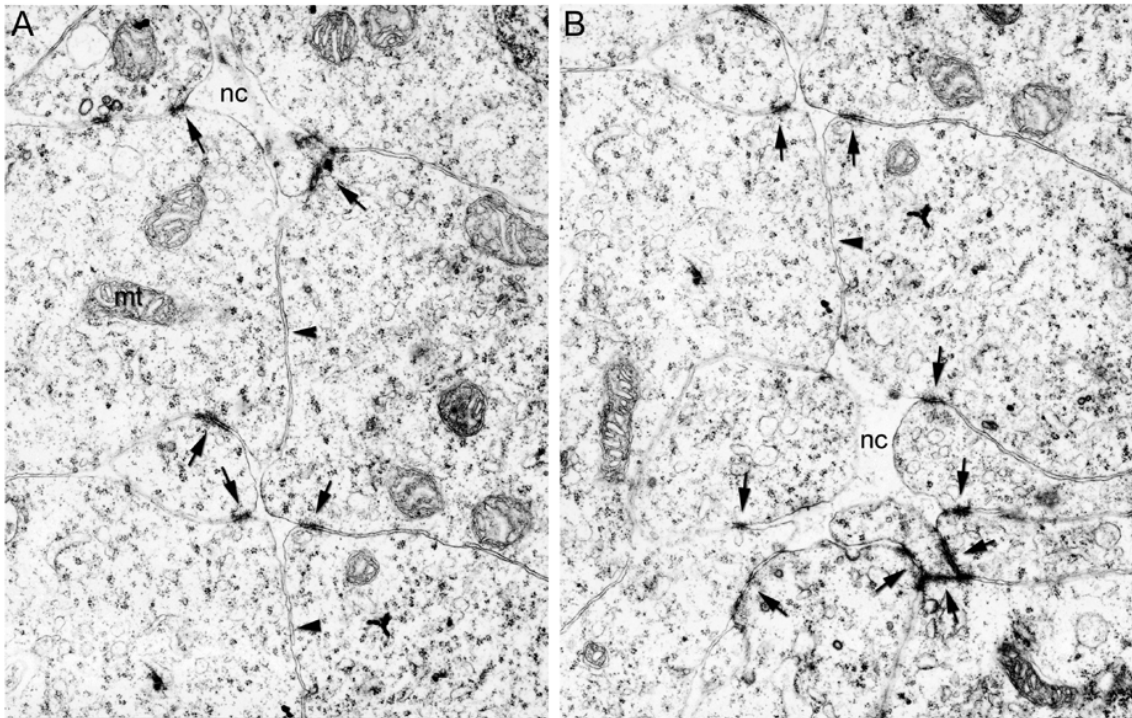
Neben der Analyse der Lokalisation von Zellkontaktkomponenten in Wildtyp und *has* Mutante wurden im Rahmen der Arbeit auch Entwicklung und Ultrastruktur der Zellkontakte untersucht. Als geeignetes Mittel erwies sich dabei ein Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM), mit dessen Hilfe der Zeitpunkt des ersten Auftretens reifer Zellkontaktkomplexe gezeigt werden konnte. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf den für Vertebraten spezifischen Tight Junctions. Zur Klärung des Status der Zellkontakte wurden zu Beginn großformatige Mosaikaufnahmen von Querschnitten des Neuralrohrs in Stadien von 26 hpf bis 72 hpf hergestellt. Auf Grund der Formate der Zusammenstellungen können in dieser Arbeit allerdings nur relevante Details wiedergegeben werden.

#### 3.4.1 Zellkontakte in wildtypischen Embryonen

Die Analyse der Ultrastruktur von Zellkontakten wurde an Stadien des Neuralrohrs von 24 hpf bis 72 hpf durchgeführt. Dieser Zeitpunkt erschien angebracht, da sowohl Marker für Adherens als auch Tight Junctions beim Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr erstmals lokalisiert auftreten.

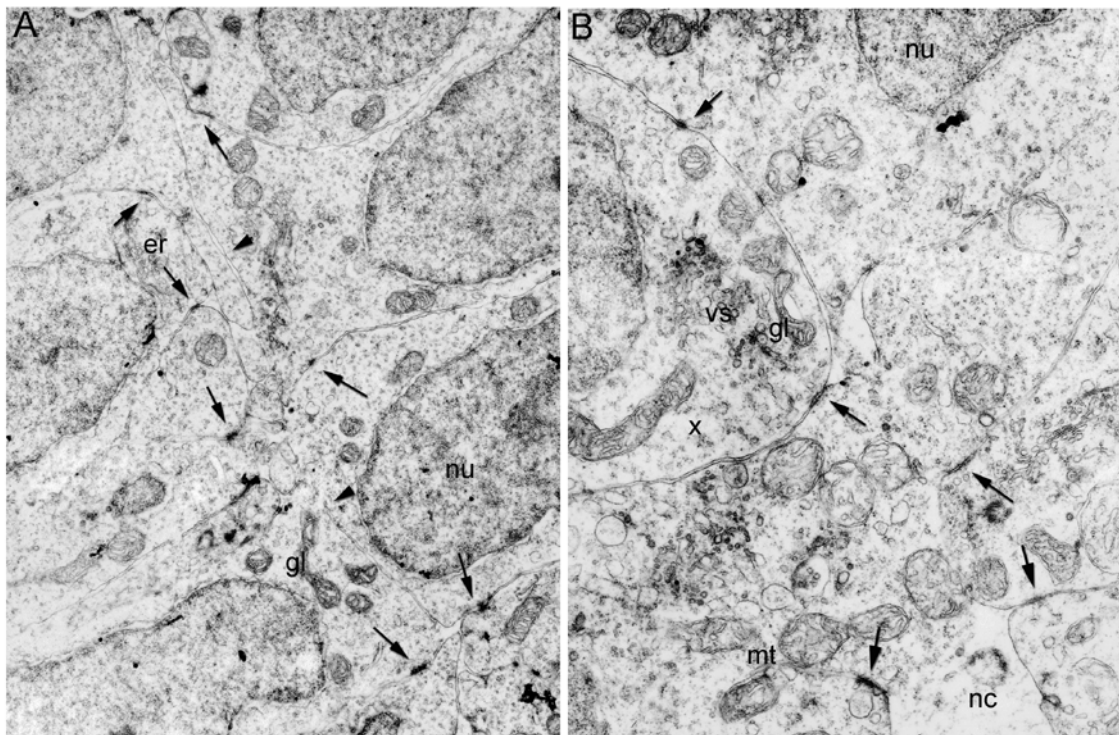
Abbildung 3.4.1-1 zeigt zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mittellinienregion eines 24 hpf alten, wildtypischen Embryos. Das Neuralrohr wurde für die Aufnahmen transversal geschnitten. Pfeilspitzen markieren in beiden Bildern den Kontakt der zwei Hälften der neuralen Anlage. Neben den die Zellen umhüllenden Membranen sind in den Aufnahmen angeschnittene Mitochondrien (mt) und Teile des Neurocoels (nc) zu erkennen. Pfeile markieren Zellkontaktstrukturen mit den Charakteristika von Adherens Junctions in den apikalen Bereichen der Zellen. Bild B zeigt einen großen Adherens Junction Komplex, der durch den Kontakt von 4 Zellen an dieser Position entstanden ist. Zum Zeitpunkt der Aufnahmen sind die apikalen Zellkontaktkomplexe einteilig und zeigen keine weitergehende apikal – basale Differenzierung. Neben den beschriebenen Adherens Junctions ist keine weitere Form von Zellkontaktkomplexen vorhanden.

Abbildung 3.4.1-2 A gibt einen Überblick über den Mittellinienbereich eines 36 hpf alten Embryos im Querschnitt. Pfeilspitzen markieren den Kontakt der beiden Hälften des Neuralrohrs, insgesamt sind die apikalen Regionen von 9 Zellen sichtbar.



**Abb. 3.4.1-1:** Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen der Mittellinienregion eines 24 hpf alten, wildtypischen Embryos (Vergr. 12000x). In Aufnahme **A** ist die Kontaktseite der Hälften des Neuralrohrs durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Kurze Adherens Junctions (Pfeile) treten an den apikalen Seiten der teilweise erfassten Zellen auf. Mitochondrien (mt) sind im Querschnitt genauso sichtbar wie Ribosomen und Vesikel unbekannter Herkunft. In **B** ist die Kontaktseite zwischen den Neuralrohrhälften mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet. Das Neurocoel (nc), hier im Bereich der Bodenplatte, ist stärker erweitert als in der dorsaleren Aufnahme **A**. Adherens Junctions sind mit Pfeilen markiert.

Das Neurocoels ist in diesen Aufnahmen nicht so stark erweitert wie in denen des 24 hpf alten Embryos. Neben den Zellkernen ( nu ) sind auch Golgi-Stapel ( gl ), und im Bereich der Zellkerne lokalisiertes endoplasmatisches Retikulum ( er ) sichtbar. Pfeile markieren die auftretenden Zellkontaktkomplexe, die, wie auch im 24 hpf alten Embryos gesehen, einteilig sind und die Charakteristika von Adherens Junctions besitzen. Bild B gibt die ventrale Mittellinienregion in gesteigerter Vergrößerung wieder. Das Neurocoel ( nc ) ist hier stark erweitert, in den darüber liegenden Zellen sieht man einige Mitochondrien ( mt ) und Vesikel ( vs ), möglicherweise des Golgi Apparates im Anschnitt. Die mit x bezeichnete Zelle ist zur Teilung abgerundet. Gleichzeitig halten aber Adherens Junctions (Pfeile) den Kontakt zu den Nachbarzellen. Die Verbund zwischen den Zellen des Neuralrohrs über Adherens Junctions scheint also während der Zellteilung gewahrt zu bleiben.

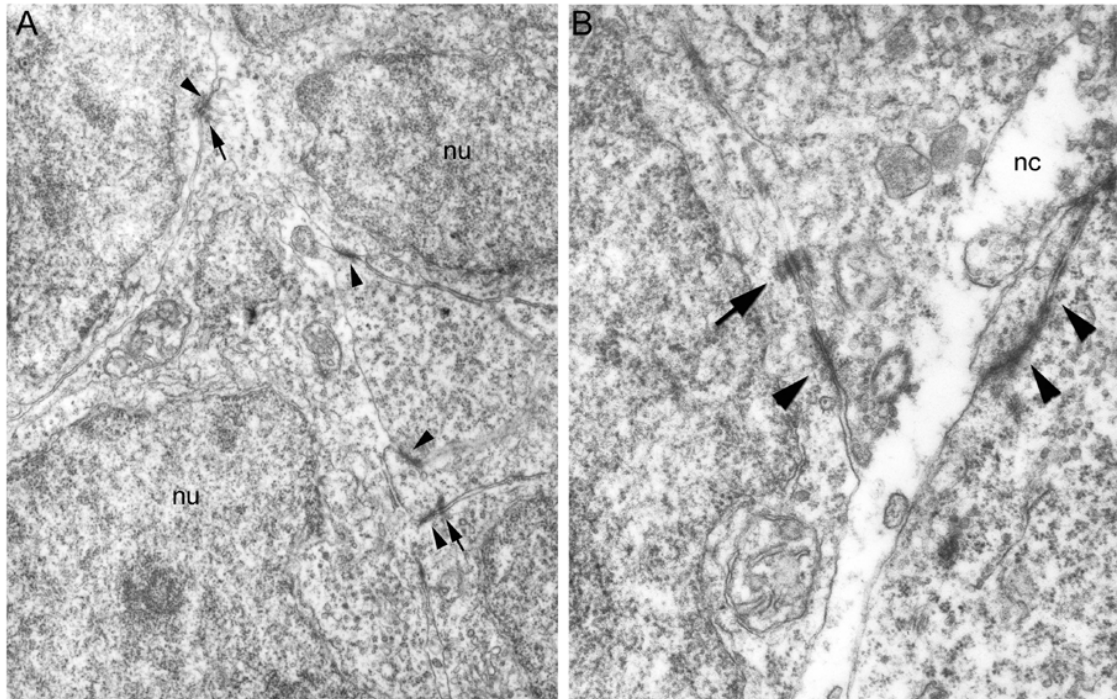


**Abb. 3.4.1-2:** EM Aufnahmen der Mittellinienregion eines 36 hpf alten wildtypischen Embryos (Vergrößerung A – 7000x, B – 12000x). Die Kontaktseite an der Mittellinie (**A**) ist mit Pfeilspitzen markiert. An den apikalen Seiten der Zellen sind kurze Adherens Junctions (Pfeile) als einzige Zellkontaktkomplexen dieses Stadiums zu sehen. Neben den prominenten Zellkernen (nu) mit ihren Kernmembrane, ist auch ein Golgi Stapel in einer Zelle sichtbar. Die Aufnahme **B** wurde in ventraleren Regionen des Neuralrohrs des selben Embryos aufgenommen. Das Neurocoel (nc) ist hier stärker erweitert als in **A**. Adherens Junctions sind durch Pfeile markiert. Die durch x gekennzeichnete Zelle hat sich zur Mitose apikal abgerundet, Zellkontaktkomplexe wahren dennoch den Kontakt zu den Nachbarzellen. In der mitotischen Zelle ist ein Golgi Stapel im Querschnitt, und assoziierte Versikel sichtbar. Die in der Aufnahme wiedergegebenen Zellen enthalten eine große Zahl von Mitochondrien (mt).

Ab 55 hpf ( Abbildung 3.4.1-3) zeigen die Zellkontakte eine größere Differenzierung. Der Querschnitt durch die Mittellinienregion eines Embryos (Bild A) macht dieses deutlich. Neben den auch in jüngeren Stadien vorhandenen Adherens Junctions (Pfeilspitzen) sind nun auch Desmosomen (Pfeil ) weiter basal sichtbar. Bild B zeigt einen solchen Zellkontakt im Detail. Apikal ist eine Adherens Junction mit einer Pfeilspitze markiert, weiter basal sieht man das strukturell verschiedene Desmosom mit den Anknüpfungspunkten des Cytoskeletts. Die beiden Aufnahmen bei 36 hpf wirken durch eine große Anzahl von Ribosomen oder Komponenten des endo-



plasmatischen Retikulums sehr viel dichter als die vorhergehend gezeigten Aufnahmen bei 24 und 36 hpf. Dieses ist vor allem durch die Dicke der verwandten Schnitte bedingt. Verglichen mit den Aufnahmen der jüngeren Stadien haben die Adherens Junctions an Größe zugenommen, sie nehmen nun einen größeren Bereich der apikalen Region der Zellen ein.

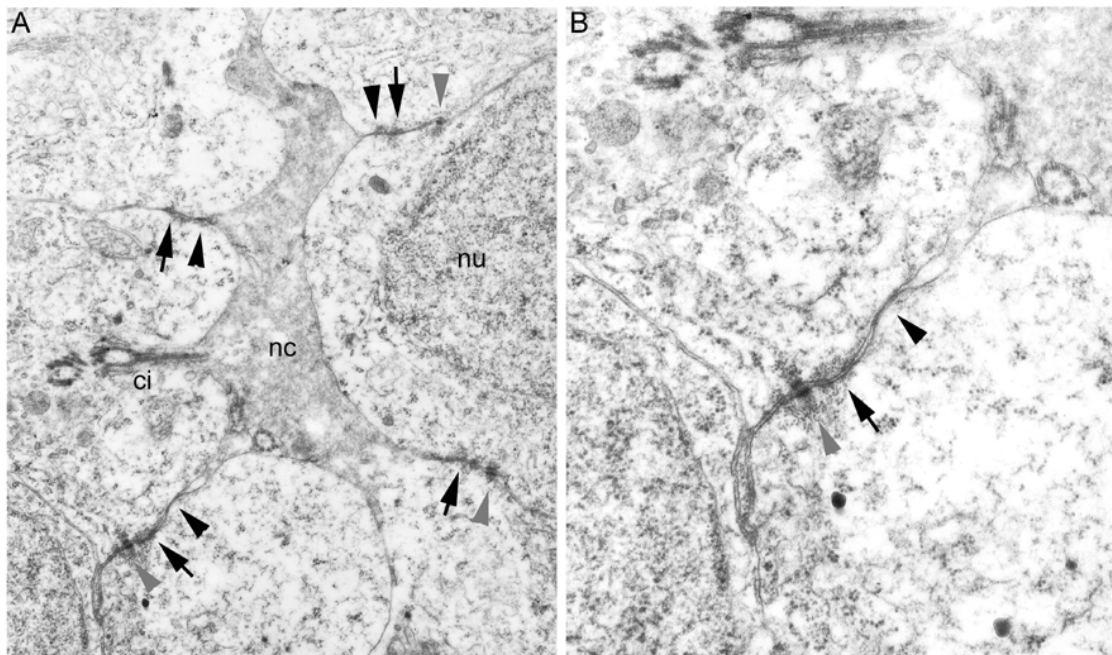


**Abb. 3.4.1-3:** EM Aufnahmen der Mittellinienregion eines 55 hpf alten Embryos (Vergr. **A** 12000x, **B** 20000x). In den Aufnahmen **A** und **B** sind neben den auch in jüngeren Stadien beobachteten Adherens Junctions (Pfeile) mehr basal angeordnete Desmosomen (Pfeilspitzen) erkennbar. Aufnahme **B** zeigt einen Zellkontaktkomplex bei stärkerer Vergrößerung. Adherens Junctions sind durch Pfeilspitzen, Desmosomen durch Pfeile markiert, wobei die Adherens Junctions apikal zum Neurocoel (nc) hin orientiert sind.

Zwischen 55 und 72 hpf sind erstmals reife Tight Junctions in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar. Abbildung 3.4.1-4 A zeigt die ventrale Region des Neuralrohrs über der Bodenplatte im Querschnitt. Das Neurocoel ist hier sehr prominent zu sehen, die Cilie (ci) einer angrenzenden Zelle ragt in das Lumen. Eine weitere Cilie ist quer angeschnitten sichtbar. Die mit dieser Aufnahme dokumentierten Zellkontakte sind dreiteilig. Apikal mit Tight Junctions (schwarze Pfeilspitzen) beginnend, folgen weiter basal Adherens Junctions (Pfeile) und darauf Desmosomen (graue Pfeilspitzen). In Aufnahme **B** ist ein Zellkontaktkomplex vergrößert wiedergegeben. Deutlich ist die Region der apikale

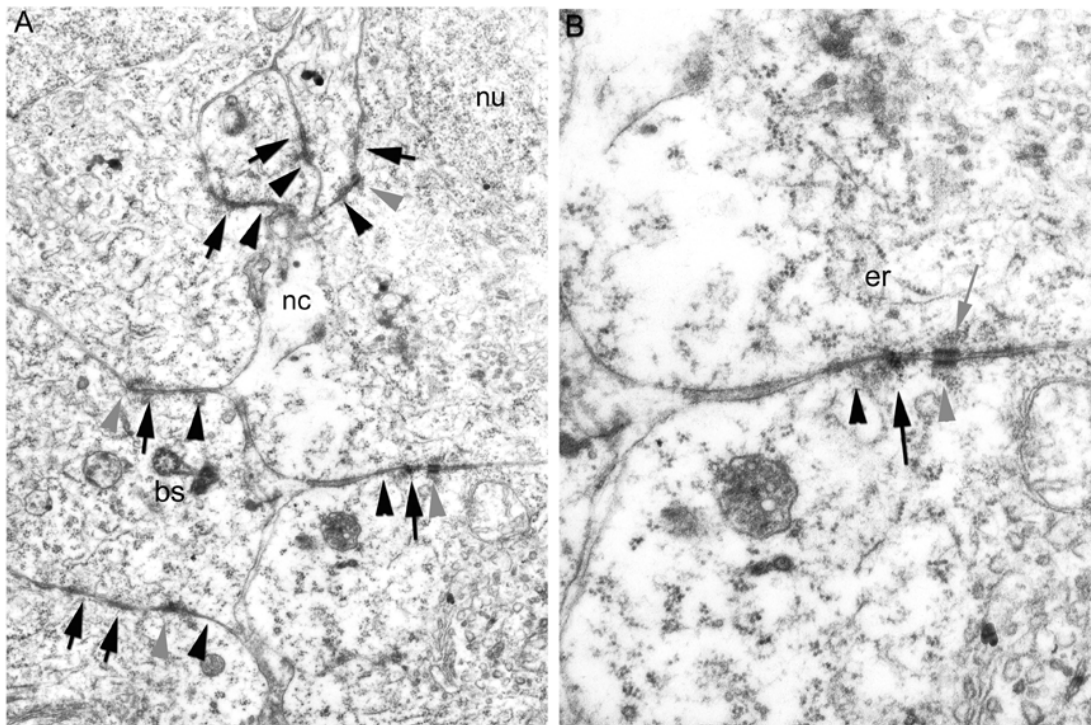


Tight Junctions erkennbar, in der die beiden Seiten der Zellmembranen zu fusionieren scheinen. Abbildung 3.4.1-5 A gibt einen Überblick über weiter dorsal gelegene Regionen der Mittellinie des Embryos aus Abbildung 3.4.1-4. Bild B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der selben EM-Aufnahme. Das Neurocoel ist hier nicht so stark erweitert wie in Abbildung 3.4.1-4, dennoch ist es klar zwischen den beiden Hälften des Neuralrohrs sichtbar. Schwarze Pfeilspitzen markieren wieder Tight Junctions, Pfeile Adherens Junctions und graue Pfeilspitzen Desmosomen.



**Abb. 3.4.1-4:** EM Aufnahmen der Mittellinienregion eines 72 hpf alten, wildtypischen Embryos (Vergr. in **A** - **B** 12000x). Die Aufnahmen zeigen die Region über der Bodenplatte, in der das Neurocoel (nc) seine größte Ausdehnung aufweist. Die Zellkontaktkomplexe sind nun dreiteilig: apikal beginnend mit Tight Junctions (schwarze Pfeilspitzen), liegen basolateral Adherens Junctions (Pfeile). Die Reihe der Zellkontakte wird durch basal positionierte Desmosomen (graue Pfeilspitzen) abgeschlossen. In das Neurocoel hinein ragt eine Cilie, eine weitere ist im Anschnitt zu erkennen. Bild **B** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der selben Aufnahme, um noch einmal die Abfolge von Tight Junctions, Adherens Junctions und Desmosomen zu dokumentieren.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Zellkontaktkomplexe im Wildtyp zwischen 24 und 72 hpf reifen. Während am Anfang nur kurze Adherens Junctions sichtbar sind, erkennt man ab 55 hpf auch Desmosomen. Reife, voll entwickelte Tight Junctions können auf ultrastruktureller Ebene zwischen 55 hpf und 72 hpf nachgewiesen werden.



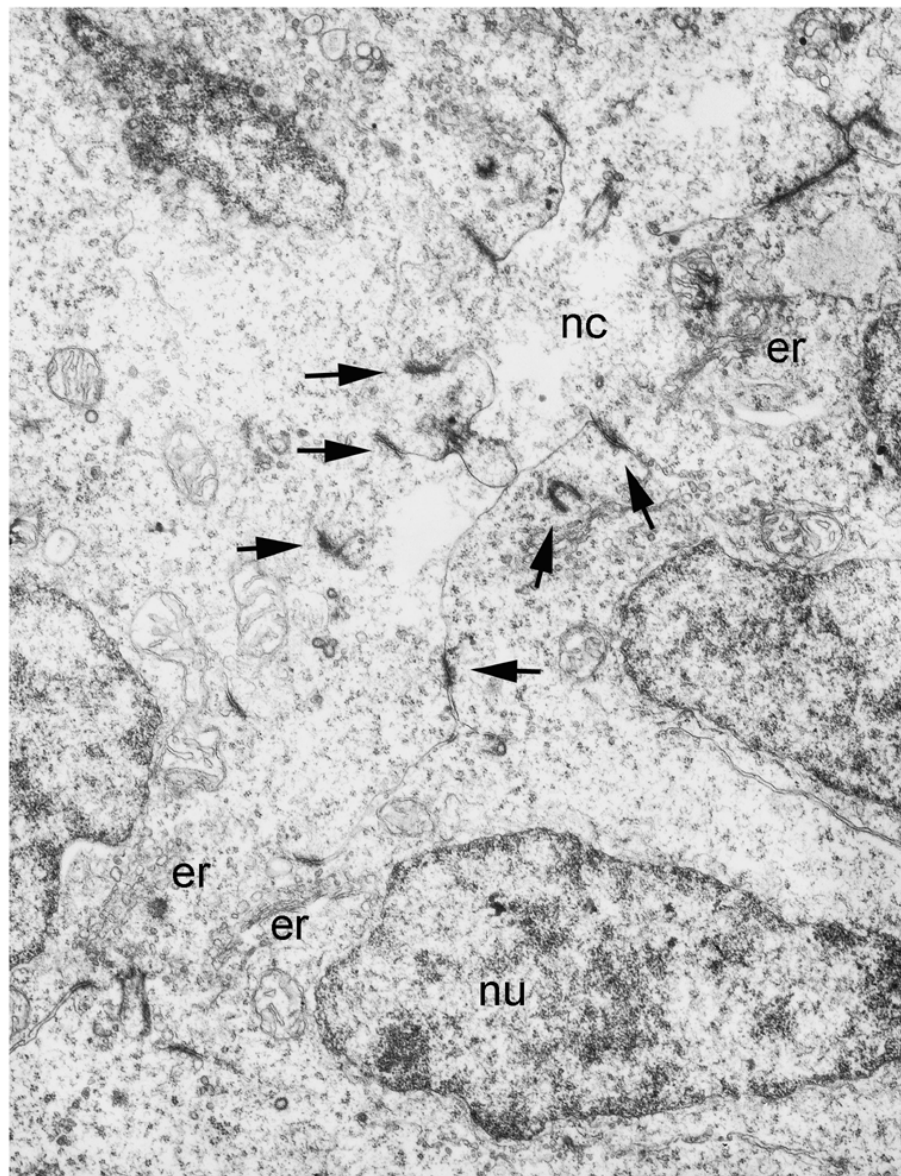
**Abb. 3.4.1-4:** EM Aufnahmen des ventralen Bereichs des Embryos aus Abb. 3.4.1-4 (Vergr. **A** 12000x, Detailvergrößerung in **B**). Gezeigt (**A**) sind die mehrteiligen Zellkontaktkomplexe bei 72 hpf im Bereich der Mittellinie. Tight Junctions sind mit schwarzen Pfeilspitzen, Adherens Junctions mit Pfeilen und Desmosomen mit grauen Pfeilspitzen markiert. In einer Zelle sind die Basalkörper einer Cilie (bs) sichtbar. Bei Aufnahme **B** handelt es sich um die Vergrößerung eines Zellkontaktkomplexes aus Aufnahme **A**. Hier sind die Anknüpfungspunkte (graue Pfeile) der Desmosomen (graue Pfeilspitzen) an das Cytoskelett der Zelle sichtbar. Oberhalb der Zellkontakte befinden sich Fragmente des endoplasmatischen Retikulums (er).

### 3.4.2 Zellkontakte in heart and soul homozygoten Embryonen

An Hand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen *has* homozygoter Embryonen sollte untersucht werden, ob die Mutation in der aPKC Kinasedomäne einen Einfluss auf die Entwicklung der Zellkontaktkomplexe hat.

Abbildung 3.4.2-1 zeigt einen Querschnitt im Bereich der Mittellinie durch das Neuralrohr eines 26 hpf alten, *has* homozygoten Embryos. Durch die Mutation ist die Morphologie der hier sichtbaren apikalen Bereiche der Zellen nicht wildtypisch.

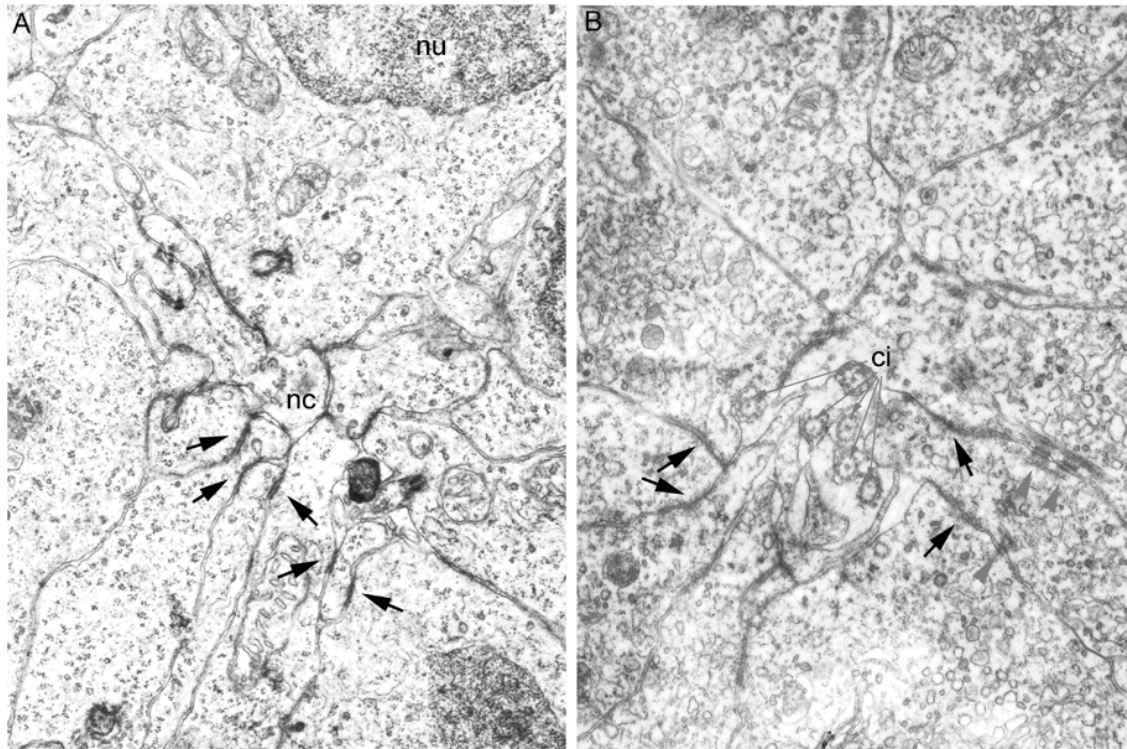
Die Zellenden scheinen kleiner zu sein, die komplette Region wirkt weniger geordnet.



**Abb. 3.4.2-1:** EM Übersichtsaufnahme (Vergr. 7000x) der Mittellinienregion eines 26 hpf alten, *has* homozygoten Embryos. Markiert sind Adherens Junctions (Pfeile), die im Vergleich mit dem Wildtyp, deutlich vergrößert sind. Die Morphologie der Zellen ist beeinträchtigt, ihre apikalen Bereich erscheinen sehr viel kleiner als die des Wildtyps. Endoplasmatisches Retikulum – er

Die vorhandenen Zellkontakte ( Pfeile ) haben die Charakteristika von Adherens Junctions, sind aber im Vergleich zum Wildtyp bei 24 hpf vergrößert. In der Aufnahme sind Bestandteile des endoplasmatischen Retikulum (er) in Nähe der Zellkerne (nu) zu erkennen. Diese Zellkompartimente zeigen keine gestörte Morphologie. Abbildung 3.4.2-2 zeigt Querschnitte der Mittellinienregion eines 44 hpf (A) und eines 72 hpf alten *has* Embryos. In Embryonen dieser Alterstufen sind

Zellkontaktkomplexe auf einzelne Kumulationspunkte entlang der dorsoventralen Achse des Neuralrohrs beschränkt.



**Abb. 3.4.2-2:** EM Aufnahmen des Neuralrohrs eines 44 hpf (**A**) und eines 72 hpf alten, homozygoten Embryos (**B**). (Vergr. jew. 12000x). Die Aufnahmen zeigen Kumulationspunkte von Zellkontaktstrukturen. Während es bei 44 hpf in der dorsoventralen Ausdehnung des Neuralrohrs noch einige solcher Anhäufungspunkte gibt, sind sie bei 72 hpf auf den Bereich über der Bodenplatte beschränkt. In beiden Stadien sind stark vergrößerte Adherens Junctions (Pfeile) zu sehen. Tight Junctions sind nicht, Desmosomen (graue Pfeilspitzen) nur in **B** bei 72 hpf sichtbar. Die apikalen Enden der Zellen erscheinen sehr dünn ausgezogen, eine Vielzahl von Cilien (ci) ist im Neurocoel sichtbar, das von den Zellen sphärisch eingeschlossen wird.

Die übrigen Bereiche sind frei von Zellkontakten. Beide Aufnahmen geben solche Anhäufungen von Zellkontakten wieder. In A ( 44 hpf ) erkennt man eine Vielzahl von Adherens Junctions in den apikalen Bereichen der Zellen, die um das Neurocoel herum angeordnet sind. Die Endbereiche der Zellen, die hier zusammenstoßen, wirken größtenteils dünner als im Wildtyp beobachtet. Die Adherens Junctions sind stark vergrößert ( beispielhaft durch Pfeile markiert ), weitere Differenzierungen der Zellkontakte sind nicht zu sehen. Bei 72 hpf ( B ) sind neben vergrößerten Adherens Junctions ( Pfeile ) auch Desmosomen ( graue Pfeilspitzen ) sichtbar. Die im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt beobachteten Tight Junctions können an Hand des

vorliegenden Materials nicht nachgewiesen werden. Die Zellen umlagern eine neurocoeliale Höhlung, in die eine Vielzahl von Cilien hineinragen. Dieses konnte so beim Wildtyp nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Adherens Junctions in *has* Embryonen, verglichen mit korrespondierenden Stadien des Wildtyps, vergrößert sind. Die Morphologie der Zellen ist beeinträchtigt, Tight Junctions können in der Mutante bis 72 hpf nicht nachgewiesen werden.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Zellteilungsorientierung und der Lokalisation von Polaritäts- und Zellkontaktmarkern während der Neurulation untersucht. Im Folgenden sollen nun die unterschiedlichen Erkenntnisse zur Spindelorientierung und der daran beteiligten Komponenten diskutiert werden.

### 4.1 Zur Orientierung mitotischer Teilungen während der Neurulation

An Hand der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und den Resultaten früherer Arbeiten zur mitotischen Orientierung (Concha and Adams, 1998; Kimmel et al., 1994) können zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen zeigen neuroepitheliale Mitosen bevorzugte Teilungsorientierungen in Relation zu Körperachse und Neuroepithelium. Zum Zweiten bildet sich die mitotische Spindel während der Neurulation stets parallel zur Ebene des Neuroepithels. Nach der parallelen Bildung dreht sie sich im Neuralkiel / Neuralstab Stadium um 90°.

#### 4.1.1 Während der Neurulation sind Teilungen gerichtet

Im Rahmen einer klonalen Analyse untersuchten Kimmel et al., 1994 das Schicksal markierter Blastomere des Zebrafischs und zogen aus der Verteilung der Tochterzellen im späteren Hinterhirn und Rückenmark Rückschlüsse auf die Teilungsorientierung der Vorläuferzellen (Kimmel et al., 1994). Sie konnten zeigen, dass neurale, die 15. embryonale Teilung durchlaufende Vorläuferzellen Nachkommen erzeugen, die bevorzugt entlang der anterior-posterioren Achse verteilt sind. Zellen hingegen, die bereits die 16. Teilung vollzogen haben, zeigen bei der Mitose mediolaterale Orientierung und führen zu bilateral verteilten Tochterzellen (Kimmel et al., 1994). Aus diesen Beobachtungen kann der Schluss gezogen werden, dass Teilung 16 während des Neuralkiel / Neuralstab – Stadiums stattfindet, da nur zu diesem Zeitpunkt Teilungen zu bilateral verteilten Nachkommenzellen führen (eigene Ergebnisse) (Concha and Adams, 1998; Papan and Campos-Ortega, 1994; Papan and Campos-Ortega, 1997). Die 15. embryonale Teilung findet

dementsprechend im frühen Neuralplattenstadium statt, eine Veränderung der Teilungsorientierung im Verlauf des Neuralplattenstadiums wurde von Kimmel et al. nicht beschrieben.

Concha und Adams, 1998 untersuchten die Richtung der Zytokinese in verschiedenen Stadien der Neurulation an Hand der Zellumrisse (Concha and Adams, 1998). Die Daten der vorliegenden Arbeit können direkt mit den Ergebnissen der Autoren verglichen werden, da mit den Epitheloberflächen die gleichen Referenzpunkte zur Bestimmung der Teilungsorientierung verwendet wurden. Sie konnten eine Änderung der Teilungsorientierung von anterior-posterior in der frühen nach mediolateral in der späten Neuralplatte zeigen (Concha and Adams, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Untersuchung der mitotischen Orientierung hingegen auf die späte Neuralplatte beschränkt. Die erhobenen Daten wurden analog zur Methode von Concha und Adams ausgewertet und bestätigen ihre Ergebnisse. Zwischen 10 und 11 hpf sind die Anaphasen der beobachteten Mitosen in der medialen Region signifikant mediolateral orientiert. In der intermediären und lateralen Region der restlichen Neuralplatte zeigen Mitosen lediglich zufällige Orientierungen. Es bleibt festzustellen, dass die in der Neuralplatte beobachteten mediolateralen Teilungen in keinem Zusammenhang zu den mediolateralen Teilungen des Neuralkiel / Neuralstab – Stadiums stehen. Die späteren Teilung führen zu bilateral verteilten Nachkommenzellen und zeigen eine Rotation der Spindel von 90° kurz vor der Mitose.

Mit dem Neuroepithel als Referenzpunkt sind Mitosen planar (parallel) in der Neuralplatte (diese Arbeit) (Concha and Adams, 1998) und orthogonal im Neuralkiel / Neuralstab– Stadium ausgerichtet (diese Arbeit) (Concha and Adams, 1998; Kimmel et al., 1994; Papan and Campos-Ortega, 1994). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vereinbar mit der Annahme, dass alle Mitosen in der Neuralplatte planar orientiert sind, da keine Ausnahmen beobachtet werden konnten. Einschränkend muss aber darauf hingewiesen werden, dass innerhalb der Neuralplatte starke Konvergenzbewegungen stattfinden und die Orientierungen der auftretenden Teilungen dadurch bisweilen schwer zu bestimmen sind. Ausnahmen der oben beschriebenen Regel sind somit denkbar. In mit Tau:GFP markierten Zellen konnte in keinem Fall beobachtet werden, dass Zellen ihre ursprüngliche Position in einer Hälfte der Neuralplatte verließen und die Mittellinie überquerten. Eine bilaterale Verteilung von Zellen trat lediglich im Kiel / Stab Stadium auf. Das dargestellte

Material legt den Schluss nahe, dass alle Teilungen dieses Stadiums orthogonal orientiert sind und zu bilateralen Nachkommenzellen führen. Im Neuralrohr sind wieder alle Mitosen planar zum Epithel orientiert.

Die Beobachtung der stereotypen Orientierung der mitotischen Teilungen während der Neurulation wirft die Frage nach den grundlegenden Mechanismen auf. Concha und Adams versuchten die Bewegungsrichtung der Zellen des Epiblasts und die Orientierung der Mitosen in Gastrulation und Neurulation auf mechanische Zugkräfte innerhalb des betreffenden Gewebes zurück zu führen (Concha and Adams, 1998). Es wäre in der Tat denkbar, dass auf das Neuroepithel einwirkende Faktoren, wie zum Beispiel die darüber liegende, den Embryo umhüllende EVL – Schicht, mechanisch die planare Orientierung der Mitosen in der Neuralplatte bestimmen. Concha und Adams hoben besonders die Streckung des Epiblasten als Voraussetzung dafür hervor, dass sich Zellen in Richtung der stärksten Ausdehnung teilen (Concha and Adams, 1998).

In der Tat könnten anterior-posteriore Streckungen als Grundlage der Teilungsorientierung früher im Epiblast durchaus eine Rolle spielen. Nach Beobachtung der starken, nach medial orientierten Konvergenzbewegungen vor Bildung des Kiels lässt sich dieses für die Neuralplatte aber nahezu ausschließen. Die erwähnten Konvergenzbewegungen könnten ihrerseits wiederum für die mediolaterale Orientierung der Mitosen des medialen Drittels der Neuralplatte verantwortlich sein.

Genauso könnten zwischen den beiden Hälften des Neuralkiels / Stabs wirkende Kräfte für die Bildung und Orientierung der Spindel verantwortlich sein, wobei der Ursprung solcher Kräfte noch zu klären wäre. Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass mechanische Kräfte einen Teilaspekt der, die Teilungsorientierung bestimmenden Mechanismen darstellen könnten, gleichzeitig aber höchst wahrscheinlich nicht allein für die Ausrichtung des Spindelapparates zuständig sind. Dieses zeigen die im Folgenden zu diskutierenden Beobachtungen mit Polaritäts- und Zellkontaktkomponenten.

#### **4.1.2 Der Einfluss epithelialer Polarität auf die Teilungsorientierung**

Neben den diskutierten mechanischen Faktoren spielt die im Laufe der Neurulation reifende Polarität des Epithels eine zusätzliche Rolle bei der Teilungsorientierung. Im



Rahmen der Arbeit wurde der Einfluss des in einigen Organismen stark konservierten Par3/Bazooka/ASIP–Par6–aPKC untersucht. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die Teilungen von Retinazellen in *heart and soul* (*has* / aPKC) homozygoten Zebrafischmutanten Abnormalitäten der Orientierung aufweisen (Horne-Badovinac et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss der Komplexkomponente aPKC auf die planare Teilungsorientierung des Neuralrohrs untersucht. Für das *has* Allel *has*<sup>m129</sup> homozygote Individuen weisen eine durch Deletion von 73 C-terminalen Aminosäuren inaktive Kinasedomäne auf. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass es sich um Null-Allele des Gens handelt (Horne-Badovinac et al., 2001). Die mit *m129* homozygoten Individuen angefertigten Zeitrafferfilme zeigen eine leichte Störung der Spindelorientierung des Neuralrohrs im beobachteten Zeitraum. Bis zu 10% senkrechte und weitere 9% zum Ventrikel schräge Mitosen konnten gezeigt werden. Obwohl die Auswirkungen im Vergleich zum Wildtyp, wo keine senkrechten Mitosen beobachtet werden konnten, gut erkennbar sind, wäre aber dennoch ein stärkere Effekt zu erwarten gewesen. Eine Erklärung für diese schwachen Auswirkungen ist eine mögliche funktionelle Redundanz. Im sich entwickelnden Nervensystem des Zebrafischs existieren mit  $\lambda$  und  $\zeta$  zumindest zwei aPKC Isoformen. Es ist denkbar, dass neben diesen noch weitere atypische Kinasen existieren, die ähnliche Funktionen übernehmen könnten.

Ein ähnliches Bild ergibt sich aus Beobachtungen nach Injektion von Morpholinos, die gegen Zebrafisch-ASIP gerichtet sind (Geldmacher-Voss et al., 2003). In der Morpholintechnik werden kurze Ketten von Morpholinuntereinheiten, gekoppelt mit DNS-Basen in Zellen eingebracht. Für spezielle Zielsequenzen entworfen, zeigen sie hohe Affinität zur korrespondierenden mRNA und blocken dadurch irreversibel die Initiation der Translation.

ASIP assoziiert mit aPKC und spielt bei der Kontrolle epithelialer Polarität eine wichtige Rolle (Izumi et al., 1998; Ohno, 2001; Suzuki et al., 2001). Das Genprodukt des klonierten ASIP Homologs zeigt eine 65%ige Identität zu ASIP aus Ratte. Aus ihm wurde zusammen mit GFP ein Fusionskonstrukt zur Herstellung von mRNA für Überexpressionsstudien hergestellt. Gleichzeitig wurden auch gegen die ASIP-RNA gerichtete Morpholinos entworfen. Nach ASIP Morpholinoinjektion zeigten sich im Neuralrohrstadium einige wenige senkrechte Mitosen (abhängig von der Morpholinokonzentration 0,6 – 7,6%) und eine relativ hohe Zahl zum Ventrikel

schräger Mitosen ( 2 – 23,3% ). Auch hier ist der Effekt der Ausschaltung von ASIP relativ schwach. Genau wie bei aPKC ist die Anwesenheit zusätzlicher ASIP Gene im Zebrafisch sehr wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang zeigen neuere Untersuchungen die Existenz mindestens eines weiteren ASIP Gens ( A. Reugels, unveröffentlichte Daten ).

Aus den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen lässt sich schließen, dass aPKC $\lambda$ , als Komponente des konservierten aPKC/ASIP – Komplexes, an der Kontrolle der stereotypen Orientierung der Spindel während der Neurulation beteiligt ist, jedoch nur einen Teil der Kontrollmaschinerie darstellt.

## 4.2 Die Teilungsorientierung und das Verhalten vom Tochterzellen

Die Bildung der mitotischen Spindel erfolgt in den unterschiedlichen Stadien der Neurulation des Zebrafisch stets parallel zum Neuroepithel. Untersuchungen der Neurogenese im cerebralen Cortex des Frettchens (Chenn and McConnell, 1995), der Retina der Ratte (Cayouette et al., 2001), oder anderen Organen des Zebrafischs (Horne-Badovinac et al., 2001) zeigten hingegen große Variabilität bei der Teilungsorientierung im Bezug auf das Neuroepithel. Im cerebralen Cortex des Frettchens waren 85 % der Mitosen planar und erzeugten Tochterzellen, die am Ventrikel verblieben und sich weiter teilten. Diese Art der Teilung wurde als symmetrisch bezeichnet (Chenn and McConnell, 1995). Bei den restlichen 15 % der auftretenden Mitosen zeigte sich eine zum Epithel senkrechte Orientierung. Auf Grund des Verhaltens der Tochterzellen nach der Mitose wurden diese Teilungen als asymmetrisch bezeichnet. Während eine Tochterzelle am Ventrikel verblieb und sich weiter teilte, wanderte die andere in den subventrikulären Bereich und differenzierte sich aus (Chenn and McConnell, 1995). Im cerebralen Cortex der Ratte konnten solche asymmetrischen Teilungen nicht beobachtet werden (Adams, 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine große Zahl von Teilungen des Neuralrohrstadiums untersucht. So asymmetrische Teilungen überhaupt während der Neurulation des Zebrafischs vorkommen sollten, sind sie doch extrem selten und bringen nicht die große Zahl postmitotischer Zellen hervor, die ab circa 30h im subventrikulären Bereich des Neuralrohrs erkennbar sind.

Obwohl alle beobachteten Mitosen strikt planar ausgerichtet waren, wurden bei den Auswertungen der Zeitrafferfilme in 52 Fällen Tochterzellen beobachtet, die sich aus dem ventrikulären Bereich fortbewegten. Vergleicht man diese Zahl mit den mehr als 2700 beobachteten Mitosen, so erscheint sie sehr niedrig. Die tatsächliche Zahl migrierender Tochterzellen liegt vermutlich etwas höher, da aus technischen Gründen nur Fälle ausgewertet werden konnten, in denen beide Tochterzellen nach der Teilung entweder in der selben Z-Ebene verblieben, oder ihr Verbleib zumindest einwandfrei geklärt werden konnte. In einigen Fällen konnte eine Separation der Tochterzellen beobachtet werden, bevor eine Tochterzelle die Fokusebene verließ und dadurch nicht weiter verfolgt werden konnte.

Aus den gezeigten Daten kann der Schluss gezogen werden, dass die Spindelorientierung während der Neurogenese des Zebrafischs nicht mit dem Verhalten der Tochterzellen nach der Mitose korreliert werden kann.

#### **4.3 Zellkontaktkomplexe reifen im Verlauf der Neurulation**

Im Rahmen der Arbeit wurde die Lokalisation von Komponenten der Adherens und Tight Junctions in verschiedenen Stadien der Neurulation untersucht. Während ZO1 und  $\beta$ -Catenin in der Neuralplatte nur diffus nachweisbar sind, zeigt sich bei  $\beta$ -Catenin eine erste Lokalisation in ventralen Regionen des späten Neuralstabs. Im Falle von ZO1 konnte eine erste Lokalisation im frühen Neuralrohr gezeigt werden. Das Protein ist im apikalen Bereich der neuralen Zellen lokalisiert und ist Teil des späteren Tight Junctions Komplexes, der ringförmig die paracellulären Verschlussleisten bildet. Vorher durchgehend im gesamten Querschnitt des Neuralrohrs lokalisiert, ist ZO1 ab einem Entwicklungsalter von 53-55 hpf auf ventrale Bereiche des Neuralrohrs beschränkt. Untersuchungen der Ultrastruktur der Zellkontaktkomplexe zeigen ein erstes Auftreten reifer Tight Junctions in 72 hpf alten wildtypischen Embryonen.

Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass ZO1 als Komponente der Tight Junctions zwar ab circa 18 – 20 hpf in der gesamten Ausdehnung des Neuralrohrs lokalisiert ist, aber nur in drei Tage alten Embryonen tatsächlich ventral in reife Zellkontakte eingebaut wird. Die Untersuchungen der Ultrastruktur unterstützen diese

Annahmen, da erste Tight Junctions in der Tat in ventralen Bereichen des Neuralrohrs beobachtet werden konnten.

$\beta$ -Catenin ist als Adherens Junction Komponente erstmals im Neuralkiel / Neuralstab Stadium detektierbar. Die Anwesenheit des Proteins kann ab 16 – 18 hpf bis 72 hpf für den apikalen Bereich der epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu ZO1 erfolgt bei  $\beta$ -Catenin in älteren Stadien keine Beschränkung auf ventrale Bereiche. Untersuchungen der Ultrastruktur zeigen einen kontinuierlichen Reifungsprozess der Adherens Junctions ab ihrem ersten Auftreten im Neuralkiel Stadium. Während zu Anfang lediglich punktförmige Zellkontaktkomplexe sichtbar sind, entwickeln sich diese im Verlauf der Neurulation zu deutlich unterscheidbaren Adherens Junctions. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass sich reife Adherens und Tight Junctions aus einem gemeinsamen Anfangskomplex unter Vermittlung des ASIP/aPKC Komplexes bilden (Ebnet et al., 2001; Ohno, 2001). Der ASIP/aPKC Komplex ist dabei schon früh an ersten, punktförmigen Adherens Junctions vorhanden und rekrutiert im Folgenden weitere Zellkontaktkomponenten in den Verband.

Die im Rahmen der Arbeit vorgelegten Daten geben erste Hinweise auf die Entwicklung von Adherens und Tight Junctions aus einem ähnlichen gemeinsamen Komplex heraus. Obwohl das Protein ZO1 mit Hilfe eines Antikörpers bereits ab 20 hpf nachweisbar ist, sind reife Tight Junctions erst ab 72 hpf in der Ultrastruktur sichtbar.

Adherens Junctions entwickeln sich punktförmig und reifen dann bis 72 hpf immer weiter aus. Die Auswertungen der  $\beta$ -Catenin und ZO1 Antikörperfärbung ergeben außerdem eindeutig, dass  $\beta$ -Catenin und ZO1 in den apikalen Bereichen der Zellen kolokalisieren. Entgültigen Aufschluss würden in diesem Zusammenhang Immunogoldstudien am TEM bringen, die aber im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ZO1 in äußerster Nähe zu den sich entwickelnden Adherens Junctions lokalisiert ist. Es stellte sich nun die Frage, ob der ASIP/aPKC Komplex auch im Zebrafisch eine für die Entwicklung der Zellkontakte bestimmenden Wirkung besitzt, wie es für andere Organismen gezeigt werden konnte (Ebnet et al., 2001; Ohno, 2001). Zur Klärung der Frage, wurde die Entwicklung der Zellkontakte in der aPKC *heart and soul* Mutante untersucht. Es zeigte sich, dass eine inaktive aPKC eindeutige Effekte auf die Lokalisation der Zellkontaktkomponenten und auf die Entwicklung der Zellkontakte hat.  $\beta$ -Catenin und

ZO1 sind in Mutanten in weiten Neuralrohrbereichen der untersuchten Stadien nicht oder nur fragmentarisch lokalisiert. Der Effekt der Unterbrechung der Lokalisation der Zellkontaktkomponenten ist ab 30 hpf erstmals in has homozygoten Embryonen sichtbar und verstärkt sich innerhalb des beobachteten Zeitraums. Die Morphologie der Adherens Junctions ist beeinträchtigt, die Zellkontakte sind im Vergleich zum Wildtyp vergrößert und treten gehäuft auf. Besonders auffällig ist die Abwesenheit reifer Tight Junctions in mutanten Embryonen.

Die beschriebene Mutation in aPKC hat eine Störung der Entwicklung reifer Zellkontakte aus dem initialen Kontaktkomplex zur Folge. Demgegenüber scheint aPKC keinen Einfluss auf das erste Auftreten von primordialen Zellkontakten zu haben, da Adherens Junctions auch in der Mutante nach wie vor beobachtet werden können. Bis zu einem Entwicklungsalter von 26 hpf sind homozygote Individuen unauffällig und durch rein visuelle Beobachtung nicht von wildtypischen Geschwistern zu unterscheiden. Dadurch sind zeitlich früher angesetzte ultrastrukturelle Untersuchungen, die das erste Auftreten initialer Kontakte analysieren könnten, nicht möglich.

Es ist festzustellen, dass der Einfluss der aPKC Mutation auf die Entwicklung der Zellkontakte auch sekundär, über die Störung der Zellpolarität erfolgen könnte. Die Untersuchung der Ultrastruktur der Neuroepithels zeigt aber keine so fundamentalen Veränderungen der Morphologie der Zellen, als dass allein dadurch die Störung der Zellkontaktentwicklung erklärt werden könnte. Weitere Untersuchungen der beteiligten Komponenten könnten offene Fragen klären. Die vorliegenden Daten aber sprechen für eine Beteiligung des ASIP/aPKC Komplexes an der Reifung der Zellkontakte.

#### **4.4 Spindelrotation im Neuralkiel / Neuralstab Stadium des Zebrafischs**

Im Augenblick der Teilung sind die mitotischen Spindeln im Neuralkiel / Neuralstab Stadium orthogonal orientiert. Diese Orientierung wird durch ein Rotation des Spindelapparats um 90° kurz vor der Mitose erreicht. Beobachtungen zeigten, dass sich die Spindel in 89% der Teilungen parallel zum Neuroepithel bildet, bevor der Spindelapparat sich zur orthogonalen Orientierung um 90° dreht. Das herausragende Merkmal des Neuralkiel / Neuralstab Stadiums ist der enge Kontakt der beiden

Seiten der neuralen Anlage. Dieser Kontakt geht erst mit der Bildung des Neurocoels beim Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr verloren. Das Auftreten orthogonaler Teilungen in diesem Stadium lässt auf einen Zusammenhang zwischen der morphologischen Beschaffenheit der neuralen Anlage und der Teilungsorientierung schließen. Der enge Kontakt der beiden Hälften würde es einem wie auch immer gearteten Signal ermöglichen von einer Seite zur anderen weitergeleitet zu werden, und so die Orientierung der Spindel zu beeinflussen. Die Bildung des Neurocoels würde die Weiterleitung eines solchen hypothetischen Signals unterbinden und dadurch die Rotation der Spindel stoppen. Die Aufdeckung eines solchen Signals wäre eine Antwort auf die durch die Beobachtungen aufgeworfene Frage nach dem Steuermechanismus und der molekularen Natur der Spindeldrehung.

Während der neuralen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* sind zwei Fälle von Spindeldrehung bekannt, die Ähnlichkeiten mit der hier beschriebenen Drehung besitzen. Das erste Beispiel ist das der delaminierenden Neuroblasten, in denen die Spindel, im Gegensatz zur planaren Teilung der neuroektodermalen Zellen, orthogonal ausgerichtet sind (Kaltschmidt et al., 2000; Knoblich, 2001). Die Steuerung der Spindelorientierung wird hier von zwei unterschiedlichen Mechanismen gewährleistet. Auf der einen Seite kontrollieren Adherens Junctions und Komponenten des subapikalen Komplexes die planaren Teilungen des Neuroektoderms (Lu et al., 2001). In delaminierenden Neuroblasten verschwinden die Zellkontaktkomplexe, die Spindelorientierung wird nun über die Lokalisation von Inscuteable, Bazooka, Pins und DmPKC gewährleistet (Kraut and Campos-Ortega, 1996; Kraut et al., 1996; Lu et al., 2001; Petronczki and Knoblich, 2001; Schaefer et al., 2000; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 2000; Wodarz et al., 1999; Yu et al., 2000).

Eine genauso große Rolle spielen Zellkontaktkomponenten bei der Kontrolle der Spindel in der Zelllinie der sensorischen Borsten in *Drosophila*. Die pl Vorläuferzelle teilt sich asymmetrisch innerhalb der Ebene des Epithels. Aus dieser Teilung geht die pll<sub>b</sub> Zelle hervor, die teilweise delaminiert, sowie die pll<sub>a</sub> Zelle, die im Epithel verbleibt. An der Kontaktstelle zwischen pll<sub>a</sub> und pll<sub>b</sub> konnte im apikalen Fortsatz der pll<sub>b</sub>-Zelle eine starke Lokalisation von Dm E-Cadherin,  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden. Da die Teilung in der pll<sub>a</sub>-Zelle planar verläuft, liegt es nahe den Kontrollmechanismus der Teilungsorientierung in der Lokalisation der

Zellkontaktkomponenten zu sehen. Innerhalb des apikalen Fortsatzes der pIIb Zelle rekrutiert Bazooka Inscuteable und Pins apikal in die Nähe der Zellkontakte und dirigiert so die Zellteilung in orthogonale Richtung (Le Borgne et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aPKC eine Rolle bei der Reifung der Zellkontakte selbst spielt. Die untersuchten Komponenten der Zellkontakte sind erstmals im späten Neuralstab Stadium eindeutig lokalisiert. Reife Tight Junctions sind hingegen erst nach zwei bis drei Tagen in der Ultrastruktur sichtbar. Für die Spindelrotation um 90° scheinen voll polarisierte Zellkontakte nicht notwendig zu sein, da die Komponenten der Zellkontaktkomplexe zwar am Ende des Neuralstadiums lokalisiert sind, zu Beginn der Spindelrotation im Neuralkielstadium aber noch nicht lokalisiert nachgewiesen werden können. Die Kontrolle der Drehung scheint somit anders geregelt zu sein, als in den beiden oben genannten Prozessen aus *Drosophila* beschrieben. Die Frage nach der Beteiligung von Zellkontaktkomponenten an der Spindeldrehung im Kiel / Stab kann an Hand der vorliegenden Daten nicht schlüssig beantwortet werden.

Für die Spindeldrehung im Neuralkiel und Neuralstab des Zebrafischs sind keine voll polarisierten Zellkontakte notwendig. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich die Expression von ASIP:GFP während der Mitosen im Kiel / Stab ändert (Geldmacher-Voss et al., 2003). Die apikale Lokalisation von ASIP und aPKC geht bei Teilungen im Kiel / Stab vor Eintritt in die Prophase verloren. Im Neuralrohr hingegen bleibt sie während der Teilung vorhanden.

Auf der einen Seite könnte der Verlust der Lokalisation den Status der bis dahin nicht voll polarisierten Zellkontakte widerspiegeln. In polarisierten Zellen des Neuralrohrs bleibt die Lokalisation der Komponenten des konservierten Komplexes erhalten. Ein zweite mögliche Schlussfolgerung wäre, dass die Neuorientierung der Spindel in Kiel und Stab eine Reaktion auf den Verlust der apikalen Lokalisation von ASIP und aPKC ist.

Während der Beginn der Spindelrotation nicht mit dem Auftreten von Markern oder morphologischen Veränderungen des Epithels korreliert werden kann, scheint das Ende der Rotation im Übergang zwischen Stab und Rohr recht deutlich mit der Bildung des Neurocoels und der zunehmenden Polarisierung der Zellen verknüpft zu sein. Die Bildung des Neurocoels ist erstmalig ventral über der Bodenplatte zu sehen. Dies ist gleichzeitig auch die Position, an der planare Teilungen des Neuralrohrs gezeigt werden konnten.

Im Rahmen der Arbeit wurde versucht, den Kontakt der beiden Hälften des Neuralkiels zu unterbinden, um so Rückschlüsse auf die grundlegenden Mechanismen der Spindelorientierung zu gewinnen. Solch ein Experiment war technisch allerdings nicht durchführbar, so dass ein eindeutiger Nachweis nicht erbracht werden konnte. Die Beobachtungen der Transition zwischen Stab und Rohr geben aber starke Hinweise darauf, dass die Bildung des Neurocoels eine Bedingung für die Beendigung der Spindelrotation darstellen könnte.

In Anbetracht der getroffenen Abwägungen kann die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Komponenten der Zellkontaktkomplexe und der Kontrolle der Spindelorientierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. In der anschließenden Untersuchung sollte ein besonderer Augenmerk auf die Analyse weiterer in Zebrafisch vorkommender Komponenten des ASIP/aPKC Komplexes gelegt werden. Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang besonders alternative ASIP oder aPKC Gene.

#### **4.5 Die funktionelle Bedeutung der Spindeldrehung in Neuralkiel / Stab**

Neben der Erörterung der zu Grunde liegenden Mechanismen stellt sich bei Beobachtung der Spindeldrehung auch noch die Frage nach ihrer funktionellen Bedeutung. Die orthogonalen Teilungen des Kiel / Stab Stadiums sind unzweifelhaft mit der bilateralen Verteilung von Nachkommenszellen verknüpft. Zellklone mit bilateraler Verteilung wurden für unterschiedliche Positionen der anterior-posterioren Achse des Zebrafischs beschrieben (Kimmel et al., 1994; Kimmel et al., 1990; Papan and Campos-Ortega, 1994; Papan and Campos-Ortega, 1997; Papan and Campos-Ortega, 1999; Schmitz et al., 1993).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nahezu alle der im Kiel / Stab Stadium stattfindenden Mitosen zu bilateralen Nachkommen führen. Da sich Tochterzellen eines Zellklons zu unterschiedliche Zelltypen auf den zwei Seiten des Rückenmarks differenzieren können (Papan and Campos-Ortega, 1997; Papan and Campos-Ortega, 1999), könnten die senkrechten, zu bilateraler Verteilung führenden Mitosen auch von einer differenziellen Verteilung cytoplasmatischer Determinanten begleitet sein.



In an diese Arbeit anknüpfenden Untersuchungen könnten die aus *Drosophila* bekannten Determinaten weitergehend untersucht werden. Besonders die Analyse von Numb wäre in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse.

## 5. Literatur

- Adams, R. J.** (1996). Metaphase spindles rotate in the neuroepithelium of rat cerebral cortex. *J Neurosci* **16**, 7610-8.
- Anderson, J. M., Van Itallie, C. M. and Fanning, A. S.** (2004). Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 140-5.
- Artinger, K. B., Fraser, S. and Bronner-Fraser, M.** (1995). Dorsal and ventral cell types can arise from common neural tube progenitors. *Dev Biol* **172**, 591-601.
- Batschelet, E.** (1981). Circular Statistics in Biology. *London: Academic Press*.
- Bayer, T. A. and Campos-Ortega, J. A.** (1992). A transgene containing lacZ is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. *Development* **115**, 421-6.
- Braga, V. and Harwood, A. J.** (2001). 'Super glue'. *Nat Cell Biol* **3**, E168-70.
- Cayouette, M., Whitmore, A. V., Jeffery, G. and Raff, M.** (2001). Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci* **21**, 5643-51.
- Cheng, N. N., Kirby, C. M. and Kemphues, K. J.** (1995). Control of cleavage spindle orientation in *Caenorhabditis elegans*: the role of the genes *par-2* and *par-3*. *Genetics* **139**, 549-59.
- Chenn, A. and McConnell, S. K.** (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* **82**, 631-41.
- Concha, M. L. and Adams, R. J.** (1998). Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula: a time-lapse analysis. *Development* **125**, 983-94.
- Das, T., Payer, B., Cayouette, M. and Harris, W. A.** (2003). In vivo time-lapse imaging of cell divisions during neurogenesis in the developing zebrafish retina. *Neuron* **37**, 597-609.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkuis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z. et al.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37-46.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M. K., Suzuki, A., Imhof, B. A. and Vestweber, D.** (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* **116**, 3879-91.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Ohno, S. and Vestweber, D.** (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J* **20**, 3738-48.

- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D.** (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* **117**, 19-29.
- Eyal-Giladi, H.** (1997). Establishment of the axis in chordates: facts and speculations. *Development* **124**, 2285-96.
- Fanning, A. S., Mitic, L. L. and Anderson, J. M.** (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1337-45.
- Fleming, T. P., Papenbrock, T., Fesenko, I., Hausen, P. and Sheth, B.** (2000). Assembly of tight junctions during early vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 291-9.
- Franke, W., Krien, S. and Brown, R. M. J.** (1969). Simultaneous glutaraldehyde-osmium tetroxid with post osmification. *Histochemie* **10**, 162-164.
- Geldmacher-Voss, B., Reugels, A. M., Pauls, S. and Campos-Ortega, J. A.** (2003). A 90-degree rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development* **130**, 3767-80.
- Guo, S. and Kemphues, K. J.** (1996). Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 408-15.
- Hartenstein, V.** (1989). Early neurogenesis in *Xenopus*: the spatio-temporal pattern of proliferation and cell lineages in the embryonic spinal cord. *Neuron* **3**, 399-411.
- Hartenstein, V.** (1993). Early pattern of neuronal differentiation in the *Xenopus* embryonic brainstem and spinal cord. *J Comp Neurol* **328**, 213-31.
- Hinds, J. W. and Ruffet, T. L.** (1971). Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral cortex. *Z. Zellforsch.* **115**, 226-264.
- Horne-Badovinac, S., Lin, D., Waldron, S., Schwarz, M., Mbamalu, G., Pawson, T., Jan, Y., Stainier, D. Y. and Abdelilah-Seyfried, S.** (2001). Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC lambda in zebrafish organogenesis. *Curr Biol* **11**, 1492-502.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T. and Tsukita, S.** (1993). The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* **121**, 491-502.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, K. J. and Ohno, S.** (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* **143**, 95-106.
- Kaltschmidt, J. A. and Brand, A. H.** (2002). Asymmetric cell division: microtubule dynamics and spindle asymmetry. *J Cell Sci* **115**, 2257-64.

- Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H. and Brand, A. H.** (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol* **2**, 7-12.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. and Cheng, N. S.** (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-20.
- Kimmel, C. B.** (1989). Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet* **5**, 283-8.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.
- Kimmel, C. B. and Warga, R. M.** (1987). Cell lineages generating axial muscle in the zebrafish embryo. *Nature* **327**, 234-7.
- Kimmel, C. B., Warga, R. M. and Kane, D. A.** (1994). Cell cycles and clonal strings during formation of the zebrafish central nervous system. *Development* **120**, 265-76.
- Kimmel, C. B., Warga, R. M. and Schilling, T. F.** (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* **108**, 581-94.
- Knoblich, J. A.** (2001). Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 11-20.
- Knust, E. and Bossinger, O.** (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-9.
- Kraut, R. and Campos-Ortega, J. A.** (1996). *inscuteable*, a neural precursor gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev Biol* **174**, 65-81.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L. Y., Jan, Y. N. and Knoblich, J. A.** (1996). Role of *inscuteable* in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* **383**, 50-5.
- Kuchinke, U., Grawe, F. and Knust, E.** (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr Biol* **8**, 1357-65.
- Le Borgne, R., Bellaïche, Y. and Schweisguth, F.** (2002). *Drosophila* E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol* **12**, 95-104.
- Leber, S. M. and Model, P. G.** (1991). Effect of precocious and delayed afferent arrival on synapse localization on the amphibian Mauthner cell. *J Comp Neurol* **313**, 31-44.
- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* **409**, 522-5.
- Lumsden, A., Clarke, J. D., Keynes, R. and Fraser, S.** (1994). Early phenotypic choices by neuronal precursors, revealed by clonal analysis of the chick embryo hindbrain. *Development* **120**, 1581-9.

**Malicki, J., Neuhauss, S. C., Schier, A. F., Solnica-Krezel, L., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Abdelilah, S., Zwartkruis, F., Rangini, Z. and Driever, W.** (1996). Mutations affecting development of the zebrafish retina. *Development* **123**, 263-73.

**Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A. et al.** (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* **142**, 117-27.

**Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M.** (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* **31**, 727-41.

**Muller, H. A.** (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev Dyn* **218**, 52-67.

**Muller, H. A. and Wieschaus, E.** (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J Cell Biol* **134**, 149-63.

**Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. and Kriegstein, A. R.** (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**, 714-20.

**Ohno, S.** (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 641-8.

**Papan, C. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. *Roux's Arch. Dev. Biol* **203**, 178-186.

**Papan, C. and Campos-Ortega, J. A.** (1997). A clonal analysis of spinal cord development in the Zebrafish. *Dev Genes Evol* **207**, 135-144.

**Papan, C. and Campos-Ortega, J. A.** (1999). Region-specific cell clones in the developing spinal cord of the zebrafish. *Dev Genes Evol* **209**, 135-44.

**Pauls, S., Geldmacher-Voss, B. and Campos-Ortega, J. A.** (2001). A zebrafish histone variant H2A.F/Z and a transgenic H2A.F/Z:GFP fusion protein for in vivo studies of embryonic development. *Dev Genes Evol* **211**, 603-10.

**Petronczki, M. and Knoblich, J. A.** (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-9.

**Reinsch, S. and Karsenti, E.** (1994). Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized MDCKII cells. *J Cell Biol* **126**, 1509-26.

**Reynolds, E.** (1963). the use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electromicroscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-212.

**Schaefer, M., Shevchenko, A. and Knoblich, J. A.** (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 353-62.

**Scheer, N. and Camnos-Ortega, J. A.** (1999). Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev* **80**, 153-8.

**Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D. Y., Zwartkuis, F., Abdelilah, S., Stemple, D. L., Rangini, Z. et al.** (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* **123**, 165-78.

**Schmitz, B., Papan, C. and Campos-Ortega, J. A.** (1993). Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Roux's Arch. Dev. Biol* **202**, 250-259.

**Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M. and Hausen, P.** (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* **57**, 191-8.

**Schober, M., Schaefer, M. and Knoblich, J. A.** (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548-51.

**Soula, C., Foulquier, F., Duprat, A. M. and Cochard, P.** (1993). Lineage analysis of early neural plate cells: cells with purely neuronal fate coexist with bipotential neuroglial progenitors. *Dev Biol* **159**, 196-207.

**Stainier, D. Y., Fouquet, B., Chen, J. N., Warren, K. S., Weinstein, B. M., Meiler, S. E., Mohideen, M. A., Neuhauss, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. et al.** (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123**, 285-92.

**Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T. and Ohno, S.** (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol* **152**, 1183-96.

**Wodarz, A.** (2001). Cell polarity: no need to reinvent the wheel. *Curr Biol* **11**, R975-8.

**Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E.** (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.

**Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. and Knust, E.** (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544-7.

**Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W.** (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399-409.

## 6. Anhang

Die in der Arbeit erwähnten Filme und alle verwendeten Abbildungen liegen auf der beigefügten CD in elektronischer Form vor.

### 6.1 Beschreibung der in der Arbeit gezeigten Zeitrafferfilme

#### **Film 1: Neuroepitheliale Zellen teilen sich bevorzugt apikal**

Die Neuralplatte eines Zebrafisch Embryos wurde während der den Neuralkiel formenden Konvergenzbewegungen gefilmt. Zur Markierung des Actins wurde der Embryo im Zweizell – Stadium mit Tau:GFP mRNA injiziert. Durch die Injektion wurde die rechte Hälfte des Embryos stärker markiert als die linke. Festzuhalten ist die planare Orientierung der mitotischen Spindeln während des gesamten Neuralplattenstadiums. Die überwiegende Zahl der Zellen teilt sich apikal. Kurz bevor sie in die Mitosen eintreten, entwickeln viele Zellen zur Mittellinie hin ausgerichtete Fortsätze. Eine beispielhafte Zelle wurde zur besseren Beobachtung durch einen Pfeil markiert. Diese Zelle behält während der Konvergenzbewegungen den relativen Abstand zu ihren Nachbarzellen (mit einem Stern markiert) bei. Nach der Mitose reintegriert die lateral gelegene Tochterzelle wieder in das Epithel.

#### **Film 2: Während des Neuralplattenstadiums sind Mitosen parallel zum Neuroepithelium ausgerichtet**

Ein Fragment der Neuralplatte eines  $Tg(H2AF/Z)^{kca37}$  ;  $Tg(H2AF/Z)^{kca66}$  transgenen Embryos wurde von dorsal in Abständen von 60 Sekunden fotografiert. Anterior ist nach links orientiert, um die Neuralplatte herum erkennt man die großen Zellkerne der EVL (Enveloping layer). Im Laufe der Sequenz konvergieren Zellkerne in Richtung der Mittellinie und sinken dann, während der Einfaltung zum Neuralkiel, ein und verlassen dabei die Fokusebene. Durch weitere Konvergenz verkleinert sich die Ausdehnung der Neuralplatte. Es ist festzuhalten, dass alle beobachtbaren Mitosen planar zum Neuroepithelium verlaufen.

**Film 3: Im Neuralkiel / Neuralstab Stadium sind Mitosen senkrecht zum Neuroepithelium orientiert.**

Der Neuralstab eines  $Tg(H2AF/Z)^{kca37}$  ;  $Tg(H2AF/Z)^{kca66}$  transgenen Embryos in der Übergangsregion zwischen Hinterhirn und Rückenmark. Der Neuralstab ist in der Mitte der Bilder sichtbar, lateral umgeben von Somiten. Die Einzelaufnahmen erfolgten im Abstand von 60 Sekunden. Mitotische Teilungen finden apikal, an der Kontaktstelle der beiden Seiten des Neuralstabs in der Mitte der Anlage statt. Zur Verdeutlichung wurde eine Mitose der Sequenz mit Pfeilen markiert. Die aus der Teilung hervorgehenden Tochterzellen werden bilateral auf beide Seiten des Neuralstabs verteilt. Dieses trifft auf alle Teilungen zu, die während dieses Stadiums beobachtet wurden. Anterior ist im Film oben.

**Film 4: Im Neuralkiel / Stab Stadium bildet sich die Spindel parallel zum Epithelium und rotiert dann um 90°.**

Eine Mitose während des Neuralstab Stadiums in einem tau:GFP exprimierenden Embryo. Während des Vorgangs teilt sich das Centrosom, beide Centrosomen wandern dann zu gegenüberliegenden Seiten der Zelle. Die Bildung der Spindel findet vor der Rotation um 90° statt. Nach der Teilung werden die Tochterzellen in die beiden unterschiedlichen Seiten des Stabs integriert. Anterior ist im Film oben

**Film 5: Während des Neuralrohr Stadiums sind Mitosen parallel zum Neuroepithelium ausgerichtet.**

Mitosen im Neuralrohr eines  $Tg(H2AF/Z)^{kca37}$  ;  $Tg(H2AF/Z)^{kca66}$  transgenen, wildtypischen Embryos. Umgeben von Somiten ist das Neuralrohr in der Mitte der Aufnahmen sichtbar. Bei 19 Minuten wurde ein Kern mit einem Pfeil markiert, der sich später (Pfeil bei 43 – 63 min) teilt. Es ist festzustellen, dass die Teilungsebene aller Mitosen rechtwinklig zum Neurocoel verläuft. In der Sequenz ist anterior nach oben orientiert.



**Film 6: Die stereotype Orientierung der Spindel ändert sich beim Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr.**

Der Zeitrafferfilm (Abstand zwischen Einzelaufnahmen 90 Sekunden ) verdeutlicht die kontinuierliche Veränderung der Orientierung der mitotischen Spindel beim Übergang zwischen Neuralstab und Neuralrohr. Mediolaterale, senkrechte Teilungen: Pfeile zwischen 4,5 und 27 Minuten. Die Teilungsprodukte der Mitosen integrieren in beide Seiten des Neuralstabs, korrespondierend mit dem Teilungsschema während Neuralkeil und Stab. Schräge Teilungen: Zeitraum zwischen 28,5 und 57 Minuten. Trotz der schrägen Teilungsebene verbleiben beide Tochterkerne an der gleichen Seite des Neuralstabs. Parallele Teilungen: 82 bis 111 min. Durch Pfeile verdeutlicht ist eine Teilung, deren Spindel parallel zum Epithel ausgerichtet ist. Die Teilung hat die Charakteristika einer Mitose im Neuralrohr. Von allen drei Teilungsmustern sind jeweils einige Beispiele im Films vorhanden. Anterior ist nach oben orientiert.

**Film 7: Postmitotische Zellen migrieren in subventrikuläre Regionen des Neuralrohrs.**

Zeitrafferfilm ( Zeitintervalle 90 Sekunden ) eines  $Tg(H2AF/Z)^{kca37}$  ;  $Tg(H2AF/Z)^{kca66}$  transgenen Embryos im Neuralrohr Stadium. Der Embryo ist leicht gekippt aufgenommen worden, weswegen die beiden Hälften nicht vollkommen in Deckung sind. Bei 16, 9 Minuten wurde ein Zelle in Metaphase mit einem Pfeil markiert. Die Orientierung der Teilungsebene ist dorsoventral und parallel zum Epithel. Nach der Teilung bei 31,2 Minuten (Pfeile markieren beide Tochterzellen, wandert der linke Tochterkern in Richtung der subventrikulären Region mit sich differenzierenden Zellen. Diese Zellschicht ist von den mitotischen Zellen durch eine dunkel erscheinende Neuropilregion getrennt. Während der Gesamtsequenz sind auch die Zellen eines wandernden Laterallinienprimordiums im oberen Teil der Aufnahmen zu erkennen. Anterior ist jeweils nach links orientiert.

## 6.2 Zusammenfassung

In der Neuralplatte und im Neuralrohr des Zebrafischembryos sind sich teilende Zellen parallel zur Oberfläche des Neuroepithels ausgerichtet. Im Neuralkiel- / Stab Stadium dagegen teilen sie sich senkrecht zur Ebene des Neuroepithels. Diese Änderung der Teilungsorientierung ist durch eine Rotation der mitotischen Spindel um 90° bedingt. Da sich die beiden Hälften des neuralen Primordiums im Neuralkiel- / Stab in engem Kontakt gegenüberliegen, führt die senkrechte Orientierung der Mitosen dieses Stadiums zur einer Verteilung von Tochterzellen auf beide Seiten des Neuralrohrs. Um die Rolle der Zellkontakte bei der Kontrolle der Teilungsorientierung zu studieren, untersuchten wir Expression und Lokalisation von Komponenten der Adherens und Tight Junctions in neuroepithelialen Zellen. Die Experimente zeigten, dass die untersuchten Proteine in der Neuralplatte diffus verteilt sind und eine apikale Polarisierung in den Zellmembranen erst im Neuralstab erfahren. In einem zweiten Schritt wurde die Entwicklung der neuroepithelialen Zellkontakte auf der Ebene der Ultrastruktur untersucht. Es zeigte sich, dass reife Tight Junctions erst nach 3 Tagen nach der Befruchtung sichtbar sind. Durch Funktionsverlust der Zellkontaktkomponenten aPKC oder ASIP wird die Spindelorientierung nur leicht gestört. Gleichzeitig hat die Inaktivierung der Kinasedomäne von aPKC in der Zebrafischmutante *heart and soul* einen eindeutigen Effekt auf die Entwicklung von Tight Junctions aus einem gemeinsamen apikalen Zellkontaktkomplex. Daraus lässt sich schließen, dass die Orientierung der mitotischen Spindel nur in Teilen von der Integrität der Zellkontakte und der Polarität des Neuroepithels als Ganzem abhängt. In *heart and soul* mutanten Embryonen ist die Morphologie der Adherens Junctions gestört, reife Tight Junctions konnten nicht beobachtet werden. Die Rotation der mitotischen Spindel um 90° im Neuralkiel- / Stab Stadium setzt also keine vollkommen polarisierten Zellen voraus, da die Spindelorientierung in *heart and soul* Mutanten und nach ASIP Morpholino Injektion nur leicht gestört wird.

### 6.3 Abstract

In the neural plate and neural tube of the developing zebrafish embryo, dividing cells are oriented parallel to the plane of the neuroepithelium, while in neural keel/rod, cells divide perpendicular to it. This change in the orientation of mitosis is brought about by a 90° rotation of the mitotic spindle. As the two halves of the neural primordium in keel/rod stage are in apposition, the perpendicular orientation of mitoses in this stage determines that daughter cells become allocated to both sides of the neural tube. To assess the role played by cell junctions in controlling the orientation of dividing cells, we studied the expression of components of adherens and tight junctions in the neuroepithelial cells. We find that these proteins are distributed irregularly at the neural plate stage and become polarised apically in the cell membrane only during the rod stage. In a second step we studied the development of adherens and tight junctions on the ultrastructural level. We find that mature tight junctions are not visible until 3 days of development. The stereotypic orientation of mitoses is perturbed only weakly upon loss of function of the cell junction components ASIP and aPKC, suggesting that mitotic orientation depends in part on the integrity of cell junctions and the polarity of the epithelium as a whole. A mutation affecting the function of the kinase domain of aPKC, called *heart and soul*, has a clear effect on the maturation of the cellular junctions out of a common apical junctional complex. In *heart and soul* mutant embryos the morphology of adherens junctions is altered, tight junctions are not visible at all. However, the 90° rotation of the spindle does not require perfectly polarised cell junctions between the neuroepithelial cells, as spindle orientation is perturbed only weakly in *heart and soul* mutants or after injection of ASIP morpholinos.

## 6.4 Danksagung

Am 22. Mai 2004 starb José Campos-Ortega im Alter von 63 Jahren. Trotz seines langen Kampfs war sein rascher Tod bestürzend.

Fünf Jahre lang, während meiner Diplomarbeit von 1999 bis 2000 und später bei der Doktorarbeit von 2000 bis 2004, war José ein selbstverständlicher Bestandteil meiner Arbeitswelt. Die Zusammenarbeit mit ihm war nie einfach. Dennoch hinterlässt sein Tod eine Lücke, die nicht zu schließen sein wird.

Es obliegt dem Leser dieser Arbeit, José's wissenschaftliche Visionen und Anliegen stets präsent zu halten. Sie waren der Anstoß für die begonnenen Projekte und die Motivation für die Suche nach Antworten.

---

Ich möchte an dieser Stelle besonders Prof. Siegfried Roth danken, der sich nach dem Tod von José bereit erklärte, mich in den letzten Monaten der Arbeit zu betreuen und auch das Gutachten zu übernehmen. Ebenso danken möchte ich Prof. Diethard Tautz für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dank gebührt auch jenen Exkollegen, die das Labor bereits vor längerer Zeit verlassen haben. Besonders erwähnt seien in diesem Zusammenhang Nico Scheer, Stefan Pauls, Stefan Hans, André Quinkertz und Anne Groth!

Besondere Unterstützung erfuhr ich während meiner gesamten Arbeit von den technischen Mitarbeitern des Labors. Christel Schenkel danke ich für die hervorragenden Insitus und Antikörperfärbungen, Thomas Wagner ist für molekularbiologische Arbeiten und für die Erhaltung des Fischbestands zu danken.

Iris Riedl stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, ohne sie wären „Ascheanflugglasuren“ für mich böhmische Dörfer!

Nachdem sich die Reihen der „alten“ Fischgruppe langsam lichten, gibt es mit den Drüsenforschern doch Hoffnung für die Wirbeltierforschung am Institut: Herr Rohr, Herr Wendl und Herr Alt, es war sehr nett mit Ihnen Chicago unsicher zu machen, auch wenn uns der eine oder andere Burger entgangen sein sollte... .

Julia ist an dieser Stelle zuzurufen: Halte inne, auch Haut hat ein Recht auf Unversehrtheit!!!

An Daniel einen besonderen Dank, für die hilfreichen Kommentare und Anregungen beim Schreiben.

Fast alles ist nun geschrieben und gesagt, nur eines fehlt noch:

Danke Tina, Lucie und Tom – es ist sehr schön mit Euch!

## 6.5 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. S. Roth Prof. und Dr. Campos-Ortega betreut worden.

Köln, den

Teilpublikationen:

**Geldmacher-Voss, B., Reugels, A. M., Pauls, S. and Campos-Ortega, J. A.** (2003). A 90-degree rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development* **130**, 3767-80.

## 6.6 Lebenslauf

<b>Name:</b>	Benedikt Geldmacher Voß geb. Voß
<b>Geburtsdatum/-ort:</b>	9.1.1974 in Paderborn
<b>Schulbildung:</b>	
1980-1984 1984-1993	Kath. Grundschule Paderborn-Elsen Goerdeler Gymnasium Paderborn Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
<b>Zivildienst:</b>	
1993–1994	mobiler sozialer Hilfsdienst, Arbeiterwohlfahrt Paderborn
<b>Studium:</b>	
1994-1996 1996 1996-2000 2000	Grundstudium der Biologie an der Universität zu Köln Vordiplom Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln Diplomprüfung in den Fächern: Entwicklungsbiologie (Hauptfach), Biochemie und Genetik
1999-2000	Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln mit dem Titel: „Klonierung und Charakterisierung von Zebrafisch bmp6“
<b>Promotion:</b>	
2000-2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega und Prof. Dr. Roth am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

**Berufliche Tätigkeit:**

1999-2000	Studentische Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
2001-2002	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
seit 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

Köln, September 2004